

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik I, Schwerpunkt: Endokrinologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K.-H. Usadel

**Nachweis von TSH-Rezeptorantikörpern mittels
eines Bindungsassays und JP26-Zellen
bei Patienten mit Autoimmunthyreoiditis.**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Lucas Johannes Meisemann
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2002

*Die vorliegende Arbeit
ist meinen Eltern
Eva Maria und
Dr. med. Hans Meisemann
gewidmet.*

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	4
1.1 Allgemeine Schilddrüsenerkrankungen.....	4
1.1.1 Immunhyperthyreose, Typ Morbus Basedow.....	7
1.1.2 Chronisch lymphozytäre Thyreoiditis, Typ Hashimoto.....	10
1.2 Diagnostik des Morbus Basedow.....	12
1.3 Endokrine Orbitopathie.....	14
1.4 Schilddrüsenantikörper.....	17
1.4.1 Antikörper gegen Thyreoglobulin.....	17
1.4.2 Antikörper gegen thyreoidale Peroxidase.....	18
1.4.3 Antikörper gegen TSH-Rezeptoren.....	19
1.5 TRAK-Assay.....	23
1.6 Zielsetzung.....	25
2. Material.....	26
2.1 Verwendete Materialien.....	26
2.2 Verwendete CHO – Zellen.....	28
2.3 Unterteilung der Patientenserum.....	29
3. Methode.....	31
3.1 Vorbereitung des modifizierten Krebs-Ringer-Puffers.....	31
3.2 Vorbereitung des Kulturmediums.....	31
3.3 Kultivierung der CHO-Zellen.....	31
3.4 Gewinnung des Patientenserums.....	31
3.5 Radiorezeptorassays.....	32
3.5.1 Passagieren der CHO-Zellen.....	32
3.5.2 Bestückung der Lochplatten.....	34
3.5.3 Auswertung.....	35
3.6 Statistik.....	35

	Seite
4. Ergebnisse.....	36
4.1 Bestimmung der Totalaktivität.....	36
4.2 Berechnung der Bindung der Totalaktivität.....	36
4.3 Bestimmung der unspezifische Bindung mittels JP02-Zellen.....	37
4.4 Bestimmung der spezifische Bindung mittels JP26-Zellen.....	38
4.5 Ermittlung der Standardkurven.....	39
4.6 Berechnung der Standardkurve.....	41
4.7 Nachweis von Autoantikörpern.....	44
4.7.1 Verteilung der Patientenseren.....	44
4.7.2 Vergleich der Kontrollgruppe mit Patientengruppen.....	47
4.8 Vergleiche der gemessenen TRAK-Konzentrationen innerhalb der Morbus Basedow-Gruppe.....	50
4.9 Vergleiche der Ergebnisse des angewendeten Bindungsassays mit denen des Routinelabors.....	51
4.10 Geschlechtsverteilung in der Morbus Basedow-Gruppe.....	52
4.11 Altersverteilung in der Morbus Basedow-Gruppe.....	53
5. Diskussion.....	54
5.1 Die Zellen der JP26-Zelllinie.....	54
5.2 Die Auswahl der Patientenseren.....	55
5.3 Kompetitiver Radiorezeptorassay.....	56
5.4 Auswertung der TRAK-Nachweise.....	57
5.5 Gegenüberstellung der Gruppen.....	60
5.6 Verlaufskontrolle bei einem Hashimoto- und einem Strumapatienten.....	63
5.7 Verlaufskontrolle bei Morbus Basedow-Erkrankung.....	64
5.8 Analyse der Fehlerquellen.....	66
6. Zusammenfassung.....	67
6.1 Deutsche Zusammenfassung.....	67
6.2 Englische Zusammenfassung (Summary).....	69
7. Literaturverzeichnis.....	71

Tabellenanhang 1 und 2

Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

¹²⁵ I - bTSH	125 Radiojod markiertes Rinderhypophysen TSH (bovines TSH)
¹²⁵ I - hTSH	125 Radiojod markiertes humanes TSH
Abb.	Abbildung
AIT	Autoimmunthyreoiditis
AK	Antikörper
B/T%	Bindung durch Totalaktivität in [%]
CHO	Chinesische Hamsterovarienzellen
CPM	Impuls pro Minute (Counts per minute)
EO	Endokrine Orbitopathie
Gr.	Gruppe
HT	Hashimoto-Thyreoiditis
hTSHr	humaner TSH-Rezeptor
JP02	CHO-Zellen ohne TSH-Rezeptoren
JP26	CHO-Zellen mit ca. 2.000 humanen TSH-Rezeptoren
MB	Morbus Basedow
neg.	negativ
pTSHr	Schweine TSH-Rezeptor (porciner TSH-receptor)
pos.	positiv
RRA	Radiorezeptorassay
SD	Schilddrüse
Tab.	Tabelle
TBAb	Funktionsblockierende TSH Rezeptorantikörper
TBII	TSH-bindendes inhibierendes Immunglobulin
Tg-AK	Thyreoglobulin-Antikörper
TPO-AK	Thyreoidale Peroxidase-Antikörper
TRAK	TSH Rezeptorantikörper
TRH	Thyreotropin freisetzendes (Releasing) Hormon
TSAb	Funktionsstimulierende TSH Rezeptorantikörper
TSH	Thyreoidale stimulierendes Hormon
TSHr	TSH-Rezeptor

1.1 Allgemeine Schilddrüsenerkrankungen

Schilddrüsenerkrankungen zählen in Deutschland zu den häufigsten Gesundheitsstörungen überhaupt. Dazu gehören zwei Gruppen, die Autoimmunthyreoiditiden und die nicht-autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen.

Der Morbus Basedow, sowie die Hashimoto-Thyreoiditis, auch als chronisch-lymphozytäre und chronisch atrophische Thyreoiditis unterschieden und seltenere chronische Thyreoiditiden (siehe Tab. 1) werden zusammengefaßt unter dem Begriff der „Autoimmunthyreoiditiden“ (AIT).

Zu den nicht-autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen zählen die verschiedenen Strumen, Schilddrüsenentzündungen, Autonomien und Schilddrüsenkarzinome.

Tab. 1: Einteilung der wichtigsten Schilddrüsenerkrankungen

Autoimmunthyreoiditiden				
Hyperthyreose		Hypothyreose		
Morbus Basedow		Hashimoto – Thyreoiditis (chronisch-lymphozytäre und chronisch-atrophische Thyreoiditis) <u>Selten:</u> Juvenile Thyreoiditis postpartale Thyreoiditis fokale Thyreoiditis invasiv-fibrinöse Thyreoiditis Stumme (silent) Thyreoiditis		
Nicht-autoimmune Schilddrüsenerkrankungen				
Struma	Thyreoiditis	Hyperthyreose	Hypothyreose	Schilddrüsen-CA
blande diffuse nodöse multi- nodöse	akute infektiöse granulomatöse subakute (de Quervain) Riedel-Struma	medikamentös- jod-/amiodaron- induzierte Auto- nomie, diff./lokale/ funktionelle/ lat. Autonomie	primäre sekundäre angeborene erworbene	papilläre follikuläre medulläre anaplastische oder andere Neoplasmen

Die häufigste Schilddrüsenerkrankung und daher an erster Stelle zu erwähnen, ist die Schilddrüsenvergrößerung. Jede nicht neoplastische und nicht entzündlich bedingte Schilddrüsenvergrößerung wird als Struma bezeichnet. Sie kann sowohl mit euthyreoter, als auch mit hypothyreoter oder hyperthyreoter Stoffwechsellage einhergehen.

Die Struma kommt in Deutschland endemisch vor, das heißt, daß mehr als 10 % der Gesamtbevölkerung unter einer Strumaentstehung leiden. In einer Untersuchung von 221 Einwohnern Essens wurde bei 48 % der Frauen und 37 % der Männer eine Struma diagnostiziert. Das mittlere Alter betrug 54 ± 14 Jahre (Mann 2001).

Nach Aussage von Pfannenstiel (1999, S. 17) haben etwa 50 % der deutschen Bevölkerung eine vergrößerte Schilddrüse und 20-30 %, das wären 20 Millionen Einwohner, eine behandlungsbedürftige Struma.

1. Einleitung

Die blande Struma bzw. euthyreote Struma, die ca. 90 % aller Strumen ausmacht, kommt sporadisch oder endemisch vor.

Eine vergrößerte Schilddrüse, die zunächst ihre Form beibehält wird als Struma diffusa bezeichnet.

Die Struma parenchymatosa ist kolloidarm, die Struma colloides hingegen kolloidreich.

Die sich häufig im Erwachsenenalter entwickelnde Struma nodosa ist gekennzeichnet durch eine knotigen Hyperplasie kolloidreicher Follikel, welche das benachbarte Gewebe komprimieren und zu regressiven Veränderungen, wie Nekrosen Blutungen, Ablagerungen von Cholesterinkristallen und Hyalin, sowie zur Bildung von Narben führen kann.

Hauptursache jeder Strumaentstehung ist unverändert der alimentäre Jodmangel. Die tägliche Jodzufuhr liegt dabei unterhalb von 100 µg. Von der WHO wird jedoch eine Optimum von 150- 250 µg Jod/Tag bei Erwachsenen gefordert (Pfannenstiel 1999, S. 23).

Bereits 3000 v. Chr. war der Zusammenhang zwischen Jodmangel und dem Auftreten von Strumen bekannt. Zur Therapie bediente man sich damals des Genußes von Seegrass oder gebrannten Meerschwämmen (Pfannenstiel 1999, S. 137-139).

Mehr als die Hälfte der sich aus den beschriebenen Strumen entwickelnden autonomen Adenome und multifokalen Autonomien der SD finden sich in Jodmangelgebieten.

Nach neusten Erkenntnissen führt der Jodmangel zu Mutationen im TSH-Rezeptor- oder im Gs-alpha-Gen, einem nachgeschaltetem Signalprotein in autonomen Adenomen und hyperthyreoten Knotenstrumen. Diese Mutationen verursachen eine gesteigerte lokale SD-Hormonproduktion, welche eine Hyperthyreose bedingt (Derwahl 1999).

Zusätzlich zu diesen jodmangelbedingten Krankheiten können auch einige ander Schilddrüsenerkrankungen, wie Immunthyreopathien, Entzündungen oder Tumore zur Schilddrüsenvergrößerungen führen. Eine Struma wird somit als Leitsymptom dieser verschiedenen Krankheiten angesehen (siehe Abb. 1) (Pfannenstiel 1999, S. 17).

Auch hohe HCG-Spiegel während der Schwangerschaft stimulieren das Wachstum der Schilddrüse und führen zur Strumaentwicklung. Neueste Untersuchungen weisen auf einen Polymorphismus des MNG-1-Gens auf Chromosom 14 hin (Mann 2001).

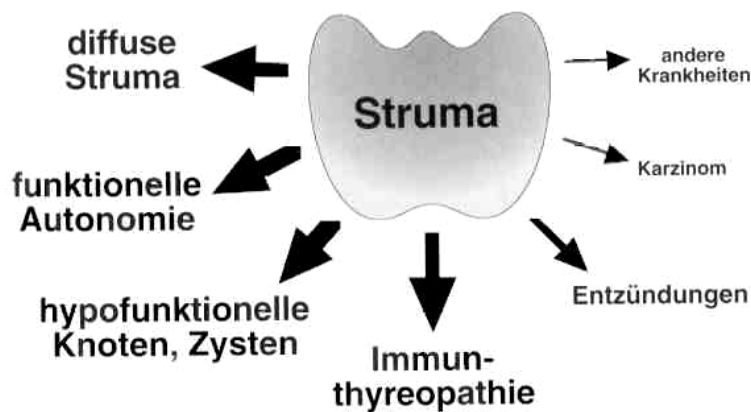


Abb. 1: Darstellung der wichtigsten Schilddrüsenerkrankungen ausgehend vom Leitsymptom Struma (Pfannenstiel 1999, S. 17).

Von größter Bedeutung für das Schilddrüsenwachstum und die Schilddrüsenfunktion ist die hypothalamisch-hypophysäre Steuerung.

Der Hypothalamus stimuliert als übergeordnetes Organ durch die Bildung des Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) den Hypophysenvorderlappen (HVL).

Die Freisetzung von TRH wird im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus reguliert aber auch über einen durch die Patientenserumkonzentration der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T_3) und Tetraiodthyronin (T_4) abhängigen Feedback-Mechanismus.

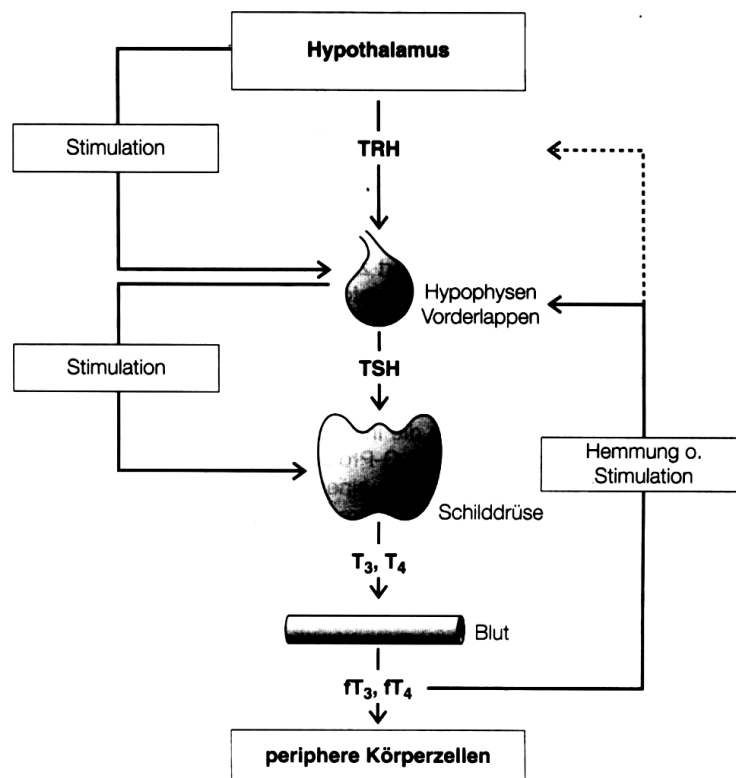


Abb. 2: Hypothalamisch-hypophysäre Steuerung (Pfannenstiel 1999, S. 35)

Der Hypophysenvorderlappen wiederum steuert durch sein Thyreoidea stimulierendes Hormon (TSH), die Synthese und Sekretion von SD-Hormonen, die dann an den Zielorganen ihre biologische Wirkung ausüben (Nillni & Sevarino 1999). Das Hypophysenhormon TSH spielt so eine zentrale Rolle innerhalb des endokrinen Systems und erfaßt die Funktion des SD-Regelkreises am sensitivsten (Zöphel et al. 1999).

TSH gehört, wie auch FSH, LH und HCG zur Gruppe der Glykoproteinhormone. Es weist ein Molekulargewicht von ca. 28.000 Dalton auf und setzt sich kovalent zusammen aus einer α -Untereinheit und einer β -Untereinheit (Hoermann 1998).

Das TSH wird in den basophilen, thyreotropen Zellen des HVL gebildet. Seine pulsartige Sekretion wird einerseits durch das TRH und andererseits durch die Konzentration der freien SD-Hormone im Blut reguliert. Zudem unterliegt diese einem zirkadianen Rhythmus, wobei die höchste TSH-Konzentration um Mitternacht und die niedrigste am Nachmittag gemessen wird (Brabant 1998).

TSH bindet an den extrazellulären Anteil des TSH-Rezeptors und stimuliert über intrazelluläre Signalsysteme die Adenylatzyklase. Dadurch erfolgt die differenzierte Funktion der SD-Zellen, das heißt die aktive Aufnahme von Jodid, die Thyreoglobulinsynthese sowie die SD-Hormonensynthese und deren Freisetzung. Zusätzlich wird das Schilddrüsenwachstum durch TSH stimuliert (Pfannenstiel 1999, S. 36).

Bei der Hyperthyreose sind die T_3/T_4 -Spiegel erhöht und die TSH-Ausschüttung unterdrückt. Hingegen sind bei der Hypothyreose das TSH erhöht und die peripheren SD-Hormone erniedrigt.

1.1.1 Immunhyperthyreose, Typ Morbus Basedow

Im deutschsprachigen Raum ist diese Erkrankung bereits seit 1858 mit dem Namen Karl Adolf von Basedow verbunden.

Karl Adolph von Basedow (1799-1854) beschrieb die Basedowsche Krankheit 1840 unter dem Titel „Exophthalmus durch Hypertrophie des Zellgewebes in der Augenhöhle“ erstmals in Caspers Wochenschrift für die gesamte Heilkunde.

Die Hauptkennzeichen dieser Krankheit, seinerzeit auch „Merseburger Trias“ genannt, sind: Struma, Exophthalmus und Tachykardie.

Nach Basedows Vorstellungen der allgemeinen Säftelehre, vermutete er eine fehlerhafte Mischung des Blutes, eine sogenannte Dyskrasie, die sich in Zellgewebsanschoppungen und Drüsenvegetationen ausdrückte. Das dieser Erkrankung ursächlich eine Überfunktion der Schilddrüse zugrundeliegt, wurde erst im Jahre 1886 von Möbius erkannt (Meng 1999).

1. Einleitung

Im englischen Sprachraum hat sich die Krankheitsbezeichnung „Graves´disease“ durchgesetzt nach dem irischen Internisten Robert James Grave 1796-1853. Dieser beschrieb die Erkrankung und ihre typischen Symptome bereits 1835, also vor K. A. von Basedow.

Der Morbus Basedow (MB) ist eine zu den organspezifischen Autoimmunerkrankungen zählende Immunthyreopathie mit thyreoidalen und extrathyreoidalen Manifestationen.

Als thyreoidale Manifestation kommt es zu einer Schilddrüsenvergrößerung bis auf das vierfache der Norm.

Extrathyreoidale Manifestationen sind die endokrine Orbitopathie mit Lidödem, Protrusio bulbi und Augenmuskelparesen, das prätibiale Myxödem und selten die Akropachie mit Knochen- und Weichteilverdickungen (Mann 1999). Ein Myxödem ist gekennzeichnet durch eine verstärkte Einlagerung von Proteoglykanen und Wasser in die Haut. Das beim Morbus Basedow auftretende prätibiale Myxödem ist häufig vergesellschaftet mit überschießender Glykosaminoglykaneinlagerungen in das periorbitale Gewebe und führt dadurch zur sogenannten endokrinen Ophthalmopathie (Heufelder et al.1996a).

Histologisch kennzeichnend für einen Morbus Basedow ist der Nachweis von herdförmigen lymphozytären Ansammlungen im betroffenen Gewebe der Schilddrüse, Augenmuskulatur und Subkutis.

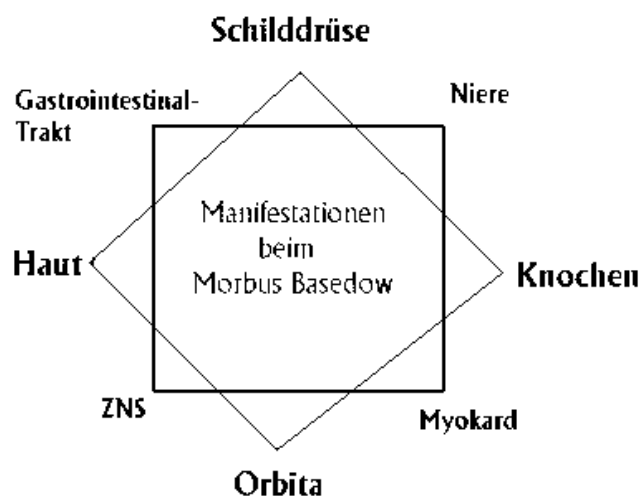


Abb. 3: Systemerkrankung Morbus Basedow (Heufelder & Spitzweg 1998)

Der MB ist mit einer Prävalenz von 2-6% keine seltene Erkrankung (Heufelder 2001).

Man geht heute davon aus, daß der Entstehung eines Morbus Basedow ein komplexes, multifaktorielles Geschehen zugrunde liegt.

In Phasen hormoneller Umstellung wie in der Pubertät, peripartal oder im Klimakterium kommt die Erkrankung vermehrt zum Ausbruch. Ein Drittel der Betroffenen ist jünger als 35 Jahre. Frauen erkranken etwa fünfmal häufiger als Männer (Heufelder et al. 1996b).

1. Einleitung

Als mögliche Ursache für einen Morbus Basedow werden polygenetische Ursachen diskutiert. Hierfür sprechen eine familiäre Häufung, insbesondere ein vermehrtes Auftreten der Erkrankung bei Menschen mit bestimmten vererbten Gewebsantigenen. Diese werden als Histokompatibilitätsantigene HLA-B8, HLA-DR3 und HLA-DQA10501 bezeichnet (Badenhoop et al. 1997).

Die spezifische HLA-DQA10501-Sequenz befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6, welches auch für die Manifestation von anderen Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ I und Hashimoto-Thyreoiditis verantwortlich zu sein scheint (Schumm-Draeger 1998).

Als exogene Auslöser des MB werden infektiöse Agenzien wie *Yersinia enterocolitica* oder virale Kapsidproteine angenommen aufgrund epitoper Gemeinsamkeiten mit dem TSHr. Psychosozialer Stress und Rauchen werden als Triggerfaktoren diskutiert.

Auf jeden Fall wird aber durch Rauchen nachweislich der Verlauf des MB negativ beeinflusst und das Risiko eine endokrine Orbitopathie (EO) zu entwickeln erhöht (Heufelder & Spitzweg 1998; Mann et al. 1999).

Als Entstehungsgrundlage des MB liegt offenbar ein Toleranzdefekt der Lymphozyten gegenüber den Thyreozyten vor. Durch diesen Defekt der natürlichen Selbsttoleranz gegenüber Schilddrüsenantigenen können aktivierte autoreaktive Lymphozyten (CD4+ - und CD8+ -T-Lymphozyten, B-Lymphozyten) über bestimmte Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, ICAM-2, E-Selektin, VCAM-1, LFA-1, LFA-3, CD44) in das Schilddrüsengewebe infiltrieren. Dort erkennen sie Schilddrüsenantigene, die von dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten und HLA-DR exprimierenden Schilddrüsenfollikelzellen prozessiert und präsentiert werden. Im Rahmen des fortschreitenden Immunprozesses setzen diverse, von T-Lymphozyten gebildete, Zytokine und Signalstoffe eine humorale Immunantwort in Gang. Über eine antigenspezifische Stimulation von B-Lymphozyten im Schilddrüsengewebe, in den drainierenden Lymphknoten sowie in Milz und Knochenmark führt diese zur Ausreifung von Plasmazellen und so zur Bildung spezifischer Immunglobuline gegen Schilddrüsenantigene. Diese Schilddrüsenantigene sind der TSH-Rezeptor, die Schilddrüsenperoxidase und das Thyreoglobulin (Heufelder et al. 1996b).

Die auf der Thyreozytenoberfläche lokalisierten TSH-Rezeptoren (TSHr) spielen eine zentrale Rolle bei der Genese der Immunthyreoiditis (Minich et al. 1997). Sie werden von den entstandenen TSH-Rezeptorantikörper (TRAK), auch Thyreoidea stimulierendes Immunglobulin bezeichnet, besetzt und führen daraufhin zu einer ungerichteten Schilddrüsenhormonproduktion. Daraus resultiert meist eine hyperthyreote Stoffwechsellage.

1. Einleitung

Bei über 90% der neu diagnostizierten Fälle von Morbus Basedow sind TRAK nachweisbar. Immunologische Aktivität oder Remission des Morbus Basedow korreliert offenbar mit der Titerhöhe von TRAK. Eine ausreichende Spezifität für den Ausschluß eines Rezidivs besteht jedoch nicht (Badenhoop et al. 1997).

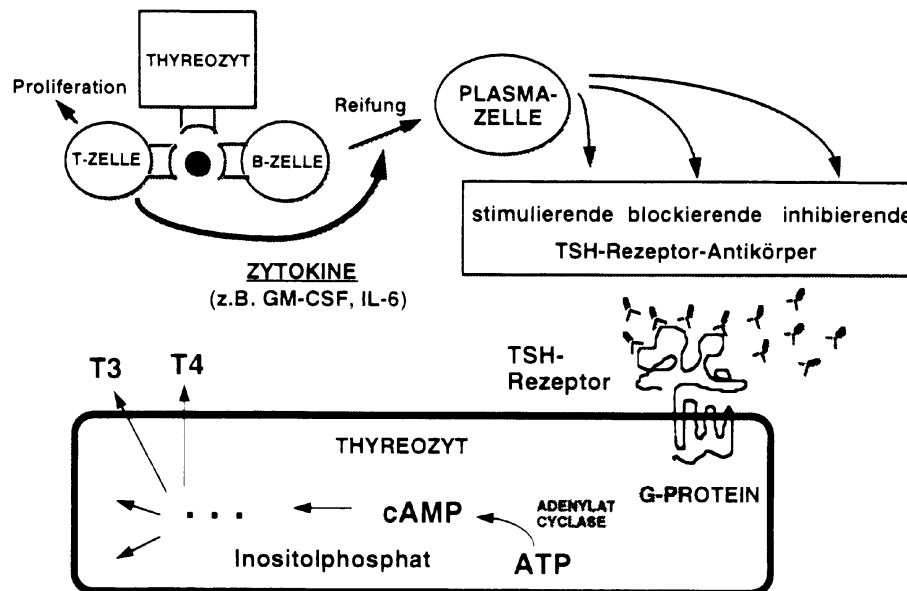


Abb. 4: Schema zur Pathogenese beim Morbus Basedow (Heufelder & Spitzweg 1998)

1.1.2 Chronische lymphozytäre Thyreoiditis, Typ Hashimoto

Neben der Immunthyreopathie vom Typ Morbus Basedow stellt die von Hashimoto beschriebene chronische lymphozytäre Thyreoiditis die häufigste immunogene Schilddrüsenerkrankung dar. Sie ist bei Adoleszenten in Regionen ohne endemischen Jodmangel für 40 Prozent aller Strumen verantwortlich (Heufelder & Hofbauer 1998).

In ihrer *klassischen* Form führt die Hashimoto-Thyreoiditis zu einer diffusen, kleinknotigen, schmerzlosen Vergrößerung und Konsistenzvermehrung der Schilddrüse mit fortschreitender Funktionseinbuße (hypothyreote Struma) (Pfannenstiel 1999, S. 237)

Demgegenüber führt die *atrophische* Variante der Hashimoto-Thyreoiditis zu einer progredienten Zerstörung von Schilddrüsengewebe. Sie ist die mit 80 % häufigste Schilddrüsenerkrankung überhaupt und bedingt eine der jeweiligen Progression entsprechende Hypothyreose mit allmählich nachlassender Schilddrüsenhormonsynthese und Entwicklung eines primären Myxödems (Heufelder & Hofbauer 1998).

1. Einleitung

Neben einer genetischen Prädisposition (Assoziation mit HLA-DR5, bei atrophischer Hashimoto-Thyreoiditis mit HLA-DR3, ferner HLA-B8 und HLA-DR4) dürften Alter, Geschlecht, Umweltfaktoren wie Jodid- und Virusexposition eine Rolle spielen. Daneben kommen Dysregulationen im zellulären Immunsystem bei der Antigenpräsentation und im Thyreozytenmetabolismus ursächlich in Frage (Heufelder & Hofbauer 1998).

Die Hashimoto-Thyreoiditis (HT) tritt vorwiegend bei Frauen im 4. bis 5. Dezennium auf. Oft stammen diese Frauen aus Familien, die bereits gehäuft andere Schilddrüsenerkrankungen aufweisen (Heufelder & Hofbauer 1998).

An der Pathogenese der HT sind sowohl zelluläre als auch humorale Mechanismen beteiligt. Suppressor-T-Zelldefekt führen zur unkontrollierten Helfer-T-Zellaktivität mit Zytokinfreisetzung, Stimulation von B- und Plasmazellen und zur Produktion komplementfixierender Antikörper (Heufelder & Hofbauer 1998).

Für das Labor ist die TSH-Bestimmung zum Nachweis oder Ausschluß einer Hypothyreose unerlässlich (TSH > 4,0 mE/L). Ebenso ist der freie T4-Wert (fT4) unverzichtbar, da er über die ungenügende Produktion von Schilddrüsenhormonen informiert. (Pfannenstiel 1999, S. 250). Weitere Laborparameter sind die Bestimmung der AK gegen die Schilddrüsenperoxidase (TPO-AK), die bei ungefähr 90 % und der AK gegen das Thyreoglobulin (Tg-AK), die bei etwa 60-70 % der Patienten mit einer HT positiv sind (Dietlein et al. 1999).

Nach neuesten Erkenntnissen und Meinungen einiger Autoren, sollen bei der atrophischen Form der HT auch funktionsblockierende TSH-Rezeptorantikörper eine wichtige Rolle spielen (Heufelder & Hofbauer 1998).

In einer Studie von Meller et al. (2000) konnten pathologische TRAK-Werte im DYNOTest TRAKhuman bei 22,5% (9/40) der hypothyreoten Patienten nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß die funktionsblockierenden TRAK bei der Pathogenese der AIT eine größere Rolle spielen, als dies bislang angenommen wurde. Es wird aber vor allem, wie auch beim MB, eine genetische Komponente angenommen. Histokompatibilitätsantigene HLA-B8, DR3, 4, 5 und 8 werden verantwortlich gemacht (Barbesino & Chiovato 2000).

1.2 Diagnostik des Morbus Basedow

Im Allgemeinen bereitet die Diagnose eines Morbus Basedow (MB) heutzutage keine Schwierigkeiten mehr.

Die klinischen Symptome können diskret sein und in Abhängigkeit vom Alter der Patienten in unterschiedlicher Häufigkeit und Ausprägung auftreten.

Allen Altersgruppen gemeinsam sind folgende klinische Parameter: Tachykardie, Fingertremor, Nervosität, Unruhe, Herzklopfen und Palpitationen.

In der Regel beginnt ein MB akut und mit ausgeprägter Symptomatik. Bei älteren Patienten mit MB dominieren oligosymptomatische Verlaufsformen mit unspezifischen Symptomen wie Anorexie, Kraftlosigkeit oder Müdigkeit und Durchfällen, die als Alterungserscheinungen verkannt werden können (Heufelder et al. 1996b).

Bei etwa 50 Prozent der Patienten aller Altersgruppen präsentiert sich der MB, wie bereits erwähnt, mit der typischen Symptomenkonstellation der "Merseburger Trias" (Struma, Tachykardie und Exophthalmus) (Heufelder et al. 1996b).

Die akute, lebensbedrohliche klinische Exazerbation der Hyperthyreose wird als thyreotoxische Krise bezeichnet (Mann 2001). Dabei kommt es wegen der extremen Hyperthyreose zu erheblicher Tachykardie, Arrhythmie, starkem Flüssigkeitsverlust infolge Transpiration und Diarrhöe, zu exzessiver Kerntemperatursteigerung bis 41 °C und zu hypovolämisch bedingtem Kreislaufkollaps.

Unbehandelt führt die Hyperthyreose von Somnolenz über das Koma bis hin zum Tod.

Die Letalität der thyreotoxischen Krise beträgt im Stadium I bis 10 %, im Stadium III bis über 30 % (Pfannenstiel 1999, S.227).

Tab. 2: Stadieneinteilung der thyreotoxischen Krise (Pfannenstiel 1999, S. 227)

Stadium	Symptome
I	Tachykardie (> 150/min), Herzrhythmusstörungen, Hyperthermie, Adynamie, profuse Durchfälle, Dehydratation, verstärkter Tremor, Unruhe, Agitiertheit, Hyperkinese, eventuell stark erhöhte SD-Hormonkonzentration
II	Symptome des Stadium I, zusätzlich Bewußtseinsstörungen, Stupor, Somnolenz, psychotische Zeichen, örtliche und zeitliche Desorientiertheit
III	Symptome des Stadium II, zusätzlich Koma

1. Einleitung

Bei der Diagnostik des MB steht das TSH als verlässlicher Parameter für die Schilddrüsenfunktion. Ein normaler TSH-Wert schließt eine Schilddrüsenfehlfunktion in 99,9% der Fälle aus (Mann 1997). Der Normalbereich des basalen TSH liegt zwischen 0,4 und 4,0 mU/l. Finden sich supprimierte TSH-Werte unter 0,05 mU/l, liegt eine der Formen von Hyperthyreose vor. TSH-Spiegel zwischen 0,05 und 0,4 mU/l sind grenzwertig.

Zur weiteren Sicherung der Diagnose sind die Bestimmung der peripheren Schilddrüsenhormone Trijodthyronin und Thyroxin und des durch TRH stimulierten TSH erforderlich. Nur bei Nachweis einer Hyperthyreose ist die TRAK-Messung indiziert.

Bei deutlich positivem TRAK-Wert ist das Vorliegen eines Morbus Basedow faktisch gesichert. Die Erkrankung ist jedoch bei einem negativen TRAK-Ergebnis nicht ausgeschlossen (Grußendorf 2001).

Der klinische Befund einer diffus vergrößerten Schilddrüse, die palpatorisch pulsiert und auskultatorisch schwirrende Geräusche aufweist, paßt zur Diagnose einer Hyperthyreose vom Typ MB.

Mit Hilfe der Schilddrüsenultraschall, des Doppler-Sonogramms und des Schilddrüsen-Szintigramms erfolgt die Differentialdiagnose hyperthyreoter Zustände.

Bei Morbus Basedow findet sich sonographisch eine symmetrisch vergrößerte Schilddrüse und eine diffus verminderte Echogenität des Schilddrüsenparenchyms. Im Doppler-Sonogramm kann eine typische Hypervaskularisation und im Schilddrüsen-Szintigramm eine hohe homogene thyreoidale Radionuklidaufnahme festgestellt werden.

Differentialdiagnostisch ist aber bei sonographisch diffus- oder fokalechoarmer Schilddrüse, vor allem an eine Hashimoto-Thyreoiditis zu denken (Heufelder et al. 1996a).

Eine endokrine Orbitopathie (EO) gilt als pathognomonisch für einen Morbus Basedow (Heufelder et al. 1996a).

1.3 Endokrine Orbitopathie

Die EO stellt die häufigste extrathyreoidale Manifestation des Morbus Basedow dar.

Man geht heute davon aus, daß über 85 % der an Morbus Basedow Erkrankten im Verlauf der Erkrankung diese Augenbeteiligung entwickeln (Heufelder & Spitzweg 1998).

Patienten mit prätibialem Myxödem weisen regelhaft eine EO auf. Bei der körperlichen Untersuchung von Patienten mit einer EO sollte deshalb nicht nur auf die thyreoidalen und systemischen Manifestationen des Morbus Basedow (schwirrende Struma diffusa, feuchte Haut, Tachykardie, Hyperreflexie und andere) sondern auch auf das Vorliegen eines prätibialen Myxödems, sowie einer Akropachie geachtet werden (Heufelder et al. 1996a).

Eine EO kann in seltenen Fällen auch mit einer euthyreoter Stoffwechsellage einhergehen. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen thyreoidale Antigene, wie Schilddrüsenperoxidase oder Thyreoglobulin ist für den Verlauf und die Prognose der EO ohne Bedeutung. Auch die für den Morbus Basedow typischen TRAK korrelieren nicht eng genug mit dem Schweregrad, dem Verlauf und der Prognose der EO (Heufelder et al. 1996a).

Nach Behandlung der Schilddrüsenkrankheit kann es bei 50 % der Morbus Basedow Patienten innerhalb von zwei Jahren noch zu einem Auftreten einer EO kommen. Die Ausprägung der Symptome kann dabei sehr unterschiedlich sein. Eine endokrine Orbitopathie muß nicht immer durch hervortretende Augen gekennzeichnet sein. Sie betrifft meist beide Augen, allerdings oft in unterschiedlich starker Ausprägung (Heufelder et al. 1996a).

Die EO kann demgemäß der MB-Erkrankung vorausgehen, gleichzeitig auftreten oder mit zeitlicher Verzögerung folgen (Heufelder & Spitzweg 1998).

An der Pathogenese des retroorbitalen Immunprozesses ist eine komplexe Vielzahl zellulärer und humoraler Mechanismen beteiligt.

Als Ursache werden TSH-Antikörper und bestimmte Immunzellen, die gegen Schilddrüsenzellen gerichtet sind, diskutiert. TSH-Rezeptoren befinden sich auch in den Fibroblasten des Unterschenkelgewebes und der Augenhöhlen. Hier lagern sich die TSH-Rezeptorantikörper an und lösen, wie in der Schilddrüse, eine Reihe von entzündungsfördernden Prozessen aus, die letztendlich das Gewebe schädigen (Heufelder et al. 1996a).

1. Einleitung

Durch die von den Plasmazellen gebildeten Antikörper gegen TSH-Rezeptoren wird der Immunprozess eingeleitet.

Die mononukleäre Zellen wandern vermehrt in das Binde-, Fett- und Muskelgewebe der Augenhöhlen ein.

Eine entscheidende Rolle bei der organ- oder gewebespezifischen Rekrutierung antigenspezifischer, immunkompetenter Zellen in das Retroorbitalgewebe spielen diverse Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 und CD44), die durch ein komplexes Netzwerk aus Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert werden. Neben T-Lymphozyten sind am retroorbitalen Immunprozeß auch zahlreiche andere professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten beteiligt (Heufelder et al.1996a).

Die hier ausgelöste Reaktion kann sich durch Bildung und Freisetzung von Entzündungsbotenstoffen, sogenannten Zytokinen (IL-1 α , TNF- α , IFN- γ) aus T-Zellen und Orbitafibroblasten, sowie Wachstumsfaktoren und Prostaglandinen selbst unterhalten und verstärken (Heufelder & Spitweg 1998; Bahn 2000).

Die Fibroblasten im Binde- und Muskelgewebe der Orbita produzieren unter dem Einfluß der Entzündungsbotenstoffe vermehrt flüssigkeitsbindende Moleküle, die sogenannten Glykosaminoglykane, insbesondere Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat. Dies führt zu verstärkter Bindegewebsbildung, die wiederum die Muskelfasern auseinander drängt und in ihrer Funktion beeinträchtigt. Daraus resultieren Augenbewegungsstörungen mit oder ohne Diplopie. Die geschilderten Vorgänge verursachen weiterhin eine Raumnot in den Augenhöhlen. Es kommt zu einer Druckentlastung durch das Vortreten der Augäpfel (Protrusio bulbi) und zu einem Prolaps der entzündeten und geschwollenen Binde- und Fettgewebsanteile im Bereich der Ober- und Unterlider (periorbitale Ödeme) (Heufelder et al. 1996a).

Weiter typischen Merkmale und Beschwerden der manifesten EO sind retrobulbäre Druck-, Fremdkörper- oder Sandkorngefühle, Augenbrennen, Tränenträufeln und Lichtscheue.

In der Regel treten die geschilderten Symptome beidseits, häufig asymmetrisch, aber praktisch nie unilateral auf (Heufelder et al. 1996a; Heufelder & Spitweg 1998).

1. Einleitung

Bei typischer Präsentation einer EO kann die Diagnose bereits prima vista gestellt werden. Die typischen Augenzeichen der Basedow-Hyperthyreose, das Stellwag-Zeichen (seltener Lidschlag), das Dalrymple-Zeichen (Oberlidretraktion mit sichtbarem Sklerastreifen über dem Cornearand beim Blick geradeaus), das Graefe-Zeichen (Zurückbleiben des Oberlids beim Blick nach unten) sowie das Möbius-Zeichen (Konvergenzschwäche), sind teils Folge der sympathoadrenergen Aktivität bei Hyperthyreose, teils Ausdruck einer subklinisch vorhandenen EO (Heufelder et al. 1996a).

Im Endstadium entstehen bei weiterer Volumenzunahme in den Orbitae Störungen der Blutversorgung und des Blutabflusses, sowie daraus resultierende Kompressionsschäden der Sehnerven (Optikusatrophie) mit drohendem Visusverlust (Heufelder et al. 1996a).

Offizielle Stadieneinteilung der endokrinen Orbitopathie:

Tab. 3: EO-Stadieneinteilung nach Werner (Pffannenstiel 1999, S. 211)

Klasse	Symptome
0	Keine Symptome
I	Lidretraktion, seltener Lidschlag
II	Lidschwellung, Chemosis, Konjunktivitis
III	Exophthalmus
IV	Augenmuskelveränderung
V	Hornhautläsionen
VI	Beteiligung des N. opticus

1.4 Schilddrüsenantikörper

Die drei wichtigsten und bereits erwähnten Antigene der Schilddrüsen sind das Thyreoglobulin (Tg), die Schilddrüsenperoxidase (TPO) und der TSH-Rezeptor (TSHr) (Rapoport et al. 1997). Gegen diese drei Antigene kann das Immunsystem Autoantikörper bilden. Diese Autoantikörperbildung ist verantwortlich für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung (AIT).

Tab. 4: Antikörpernachweis der 3 schilddrüsenspezifischen Antigene bei AIT vom Typ MB und HT

Antikörpernachweis	Morbus Basedow (MB)	Hashimoto – Thyreoiditis (HT)
TRAK	70 - > 90 %	10 - 20 %
TPO-AK	60 - 80 %	ca. 90 %
Tg-AK	20 - 40 %	60 - 70 %

1.4.1 Antikörper gegen Thyreoglobulin

Thyreoglobulin (Tg) ist ein Glykoprotein. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 660.000 Dalton und ist somit das größte der drei wichtigsten Antigene der Schilddrüse (Mann et al. 1991).

Tg akkumuliert im Lumen der Schilddrüsenfollikel und ist in geringer Konzentration im Patientenserum nachweisbar (Tonacchera et al. 2001). Es besteht aus zwei Untereinheiten, die über Disulfidbrücken verbunden sind.

Das durch die TPO oxydierte Jodid wird in organische Jodverbindungen, insbesondere in Tyrosylreste des Tg eingebaut. Jedes Tg enthält 140 Tyrosinreste, von denen aber nur 25% Jod aufnehmen können. Jodiertes Tg enthält in vivo daher 1 bis 20 Jodatome, verteilt auf 3-Monojodtyrosin (MIT), 3,5-Dijodtyrosin (DIT), T₃ und T₄ (Pfannenstiel 1999, S. 27).

Der Vorrat an gespeicherten Schilddrüsenhormonen deckt den Bedarf eines Gesunden für etwa zwei Monate.

Antikörper gegen Thyreoglobulin (Tg-AK) werden bei Verdacht auf eine Autoimmunthyreoiditis bestimmt.

Bei Hashimoto-Thyreoiditis werden 60-70 % der Patientenseren als positiv detektiert.

Bei Verdacht auf Morbus Basedow besteht in der Regel keine Indikation zur Tg-AK-Bestimmung, weil sie nur in 20-40 % der Fälle nachweisbar sind. (Pinchera et al. 1989; Dietlein et al. 1999).

In bis zu 20 % zeigen sich positive Befunde auch bei nicht-autoimmunen Schilddrüsen-Erkrankten und selten sogar bei Schilddrüsen-gesunden (Pfannenstiel 1999, S. 67).

1.4.2 Antikörper gegen thyreoidale Peroxidase

Die Schilddrüsenperoxidase ist ein 103.000 Dalton großes, aus 933 Aminosäuren mit 5 glykosylierten Seiten bestehendes membranständiges Protein der apikalen Schilddrüsenzellmembran. Diese thyreoidale Peroxidase (TPO) spielt eine Schlüsselrolle bei der Schilddrüsenhormonsynthese. Mitte der 80er Jahre konnte gezeigt werden, daß die TPO mit dem bis dahin bekannten mikrosomalen Antigen identisch ist (Czarnocka et al. 1985).

Die bei einer Immunthyreopathie der Schilddrüse nachweisbaren thyreoidalen Peroxidase Antikörper (TPO-AK) sind gegen den extrazellulären Anteil der TPO gerichtet.

TPO-AK werden mit Standardmethoden wie RIA, IRMA oder ELISA nachgewiesen unter Verwendung gereinigter humaner oder rekombinanter Schilddrüsenperoxidase als Antigen (Dietlein et al. 1999).

Diese TPO-AK, früher auch als mikrosomale Autoantikörper (MAK) bezeichnet, sind mit erhöhtem Seramtiter bei etwa 90 % der Patienten mit chronischer Autoimmunthyreoiditis und etwa 70 % der Patienten mit floridem Morbus Basedow zu finden. Leicht erhöhte Titer lassen sich auch bei etwa 20 % der Patienten mit nicht-immunogen bedingten Schilddrüsenkrankheiten nachweisen. Gelegentlich sind sogar leicht erhöhte Titer bei älteren Menschen auch ohne Schilddrüsenenerkrankung nachgewiesen worden (Dietlein et al. 1999) Im Verlauf einer Schwangerschaft bzw. nach Entbindung finden sich bei 6 -12 % der Mütter erhöhte TPO-AK. Bei diesen Frauen besteht offenbar ein erhöhtes Risiko an der sogenannten „Post-partum Thyreoiditis“ zu erkranken. (Pffannenstiel 1999, S. 66).



Abb.: 5 Schematische Darstellung des TPO-Moleküls. Die Lokalisation der Disulfidbrücken basiert auf der Entdeckung von Yokoyama & Taurog (1988).

1.4.3 Antikörper gegen TSH-Rezeptoren

Der TSH-Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle für Wachstum und Funktion der Thyrozyten. Er gehört zu den G-Protein-gekoppelten Glykoprotein-Rezeptoren.

Alle Rezeptoren dieser Gruppe haben eine große N-terminal extrazelluläre Domäne, welche notwendig für die Ligandenbindung ist. Auf der Oberfläche der humanen Thyrozyten präsentiert sich der TSH-Rezeptor in einer Anzahl von ca. 1.000 – 10.000 TSHr pro Zelle (Furmaniak & Smith 1991).

Der TSH-Rezeptor besteht aus einer Proteinkette von 764 Aminosäuren mit 6 glykosylierten Seiten. 3 Anteile, einen schon erwähnten extrazellulären, einen transmembranären und einen intrazellulären Anteil bilden den TSH-Rezeptor.

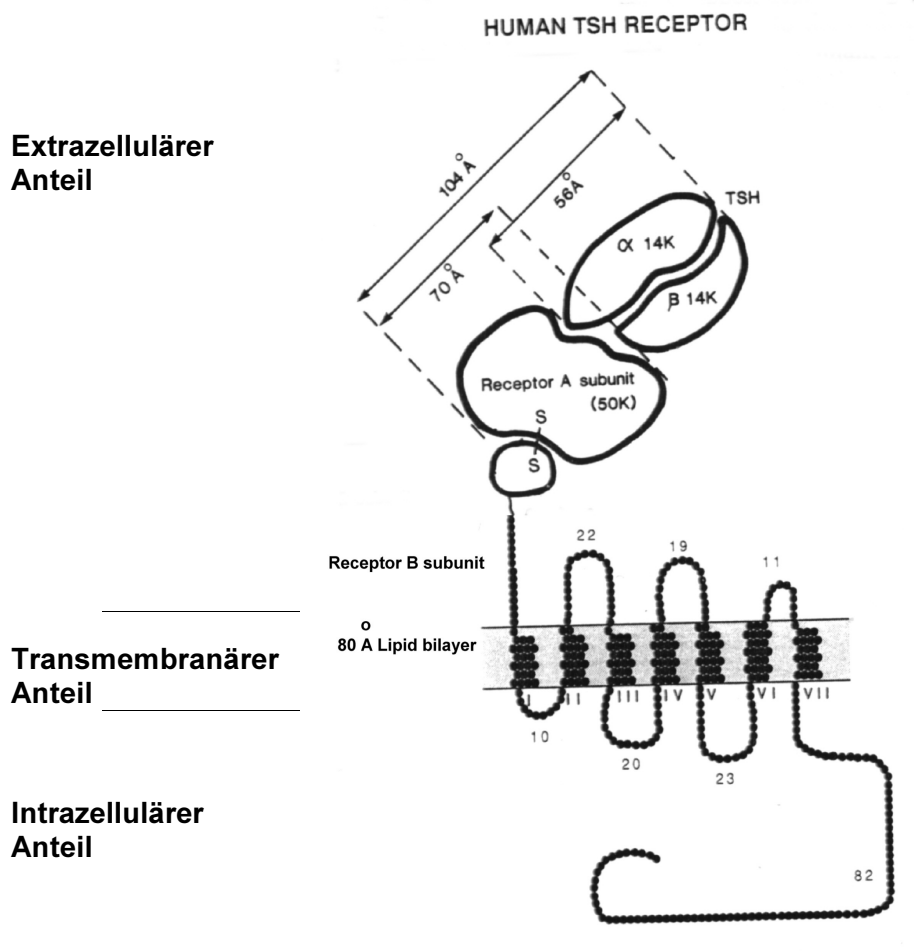


Abb.: 6 Schematische Präsentation des humanen TSH-Rezeptors, zusammengesetzt aus Zeichnungen von Rapoport et al. (1991) und Furmaniak & Smith (1991)

1. Einleitung

Der TSH-Rezeptor gehört zur Rezeptorfamilie mit einem transmembranären Anteil bestehend aus 7 Segmenten. Dieser transmembranärer Anteil ist verankert an der Plasmamembran. Die intrazellulären und transmembranären Anteile sind an die intrazellulären Signalsysteme, vor allem an dem stimulierenen G-Protein (GS) gekoppelt.

Der TSH-Rezeptor ist das für die Entstehung des Morbus Basedow wichtigste Antigen und direkt mit dessen klinischen Manifestationen assoziiert (Rapoport et al. 1991).

In wieweit für seine Präsentation als Autoantigen ein TSH-Rezeptorpolymorphismus mit entsprechender Konformationsänderung des Rezeptormoleküls und oder TSH-Rezeptor-splicing-Varianten eine Rolle spielen ist noch ungeklärt (Mann et al. 1999).

Bahn et al. (1994) beschrieben einen Polymorphismus im Codon 52 des TSHr-Gens in genomischer DNA orbitaler Fibroblasten von Patienten mit MB, EO und prätibialem Myxödem. Dieser Polymorphismus liegt in einem, für eine immunogene Region des TSH-Rezeptors kodierenden Genabschnitts. Hierdurch wird die Aktivität des TSHr gesteigert. Dies, so wird vermutet, ist verantwortlich für die Hyperthyreose bei Morbus Basedow.

Die TRAK gehören der IgG-Klasse an und sind daher diaplazentar von der Mutter auf das Kind übertragbar. Bei Schwangeren im 3. Trimenon mit hohem TRAK-Spiegel läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit eine kongenitale Hyperthyreose, seltener eine Hypothyreose des Kindes voraussagen (Pfannenstiel 1999, S. 63).

In den 50er Jahren gelang der Nachweis einer stimulierenden Wirkung von TRAK auf die Schilddrüse mittels eines In-vivo-Versuchs an Mäusen. Seren von MB-Patienten führten daraufhin in einem Vergleichstest mit TSH zu einer protrahierten Stimulation der Schilddrüse. Aus dieser Beobachtung resultierte zunächst der Begriff „lange wirksamer Schilddrüsenstimulator“ (long-acting thyroid stimulator = LATS).

Erst später erkannte man, daß es sich hierbei um die TSH-Rezeptorantikörper handelt (Pfannenstiel et al. 1999, S. 60).

Pathogenetisch entscheidend für die Entstehung und Unterhaltung der Hyperthyreose vom Typ Morbus Basedow sind die TSH-Rezeptorantikörper (TRAK) (Mann et al., 1999).

Die TSH-Rezeptorautoantikörper sind eine heterogene Gruppe von Antikörpern, da sie an unterschiedlichen Epitope des TSHr binden. Überwiegend liegen sie als funktionsstimulierende TRAK, seltener und in unterschiedlicher Ausprägung auch als inhibierende bzw. funktionsblockierende TRAK vor (Mann et al. 1999).

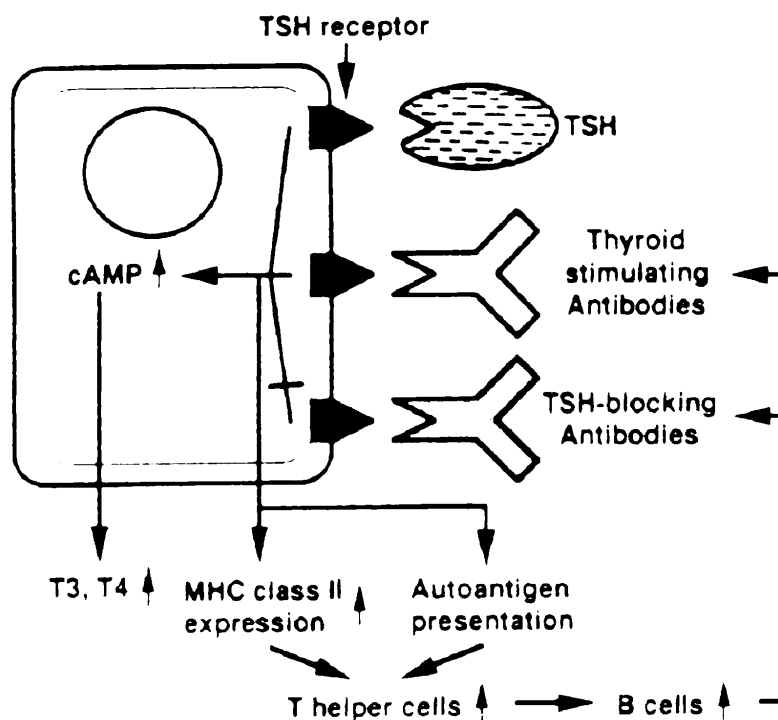


Abb. 7: Anschauungsmodell über die Interaktionen und Funktionen des TSHs und der TSH-Rezeptor Autoantikörper mit der Thyreozyt (Mann et al. 1991)

Nach heutigen Erkenntnissen können drei Arten von TRAK unterschieden werden:

1. Funktionsstimulierende TRAK (TSAb)

Die Bindung dieser Antikörper an den TSH-Rezeptor führt zu einer unkontrollierten Stimulation der Schilddrüsenzellen und damit zur Hyperthyreose.

2. Funktionsblockierende TRAK (TBAb)

Sie üben eine inhibierende Wirkung aus, daher die physiologische TSH-Wirkung wird durch sie antagonisiert. Dies kann zum Erscheinungsbild der Hypothyreose vom Typ Hashimoto führen (Akamizu et al. 2000). Auch beim Morbus Basedow können TBAb nachgewiesen werden.

3. Neutrale TRAK

Diese Antikörper wirken weder stimulierend noch inhibierend. Sie blockieren lediglich den TSH-Rezeptor und verhindern somit die Wirkung von TSH an diesem Rezeptor.

1. Einleitung

Hohe funktionsstimulierende TRAK-Titer weisen vor allem Morbus Basedow-Patienten auf. Leicht erhöhte TSAb-Titer können gelegentlich bei Schilddrüsengesunden oder bei blanden Strumen nachgewiesen werden (Costagliola et al. 1999).

Die funktionsstimulierenden TSH-Rezeptorautoantikörper funktionieren analog dem thyreoideastimulierenden Hormon (TSH). Sie binden als Liganden auf Ebene der Thyreozyten an die Untereinheit A des extrazellulären TSH-Rezeptor-Anteils (Furmaniak & Smith 1991).

Die hochaffine Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Es wird eine Dissoziation von G-Proteinen induziert und auf nachfolgende Kinasen innerhalb der Zelle übertragen. Eine Vielzahl von G-Proteinen ist an TSH-Rezeptoren gekoppelt. Für die Hormonsekretion entscheidend ist die durch die α -Untereinheit des G-Proteins GS2 bewirkte Aktivierung der Adenylatcyclase. Sie ist meist stärker als die des körpereigenen TSH. Die durch die funktionsstimulierenden TRAK nun aktivierte Adenylatcyclase steigert die Produktion des Botenstoffes, des cyclischen 3',5'-Adenosinmonophosphats (Second Messenger cAMP). Daraus resultiert eine lang andauernde und vermehrte Hormonproduktion von T₃ und T₄ (Mann et al. 1991; Mann et al. 1999).

Im Gegensatz dazu, verringern die funktionsblockierenden TRAK (TBAb) die Aktivität der Adenylatcyclase, wodurch die Produktion des Second Messengers cAMP und somit auch die der Hormone gesenkt wird. Die Zellen werden refraktär gegen TSH. Im Ergebnis führt dies zu einer Hypothyreose.

Die funktionsblockierenden TRAK findet man in neusten Studien von Meller et al. (2000) im DYNObest TRAKhuman bei 22,5 % der hypothyreoten Patienten.

In einigen Fällen von Morbus Basedow und Hashimoto wird auch eine Koexistenz von TSAb und TBAb diskutiert (Zakarija & McKenzie 1991).

1.5 TRAK-Assay

Noch immer besitzt die Bestimmung von TSH-Rezeptorantikörpern für die klinische Verlaufskontrolle des Morbus Basedow keinen gesicherten Stellenwert (Dietlein et al. 1999)

Zur Abgrenzung der immunogenen Hyperthyreose vom Typ MB von den anderen nicht immunogen bedingten Formen der Hyperthyreose ist die TRAK Bestimmung jedoch eine zwingende Notwendigkeit.

Es stehen daher verschiedene sensitive und spezifische Routine- und Bindungsassays zur Verfügung.

1) Klinische Routineassays

Bei den klinischen Routineassay handelt es sich um Bindungsassays. Ein Bindungsassay oder kompetitiver Assay, prüft lediglich die Bindungsmenge, beziehungsweise die Konzentration, von Antikörper an den TSH-Rezeptoren.

Diese Bestimmungsmethode unterscheidet deshalb nicht zwischen funktionsstimulierenden und funktionsblockierenden Autoantikörper.

a) In der klinischen Routine wurde bis vor kurzen, die TRAK-Messung mit dem Schweine-Radiorezeptorassay (RRA), einem Bindungsassay als validierteste Methode durchgeführt. Hierbei wurden lösliche TSH-Rezeptoren der Schweineschilddrüsenzellmembran (pTSHr) nach dem Prinzip von Shewring & Rees Smith (1991) verwendet. Als Tracer, welcher die freien TSHr-Bindungsstellen markiert, wurde radio-jodiertes TSH aus Rinderhypophysen isoliert (¹²⁵ I-bTSH). Steigende Mengen an TRAK in der Patientenserumprobe führen zu einer Verringerung der Bindung von markiertem TSH an den Rezeptor. Die TRAK im Patientenserum konkurrieren mit den ¹²⁵ I-bTSH, daher ist die Menge an TRAK im Serum umgekehrt proportional zur gemessenen Radioaktivität.

Die gemessenen Ergebnisse des RRA werden wie folgt ausgewertet:

TRAK-Werte < 9 U/l werden als TRAK-negativ, oberhalb dieser Grenze liegende Konzentrationen als TRAK-positiv bewertet. Der Übergangsbereich zwischen 9 und 15 U/l wird als Graubereich bezeichnet. Eindeutig TRAK-positiv sind Werte > 15 U/l.

Mit diesem konventionellen Assay können in 70-90 % der Seren florider Morbus Basedow Patienten die TSH-Rezeptorantikörper detektiert werden (Meller et al. 2000). Das Fehlen von Antikörpern in 10-30 % der Patientenseren läßt sich unter anderem dadurch erklären, daß TRAK vorwiegend von intrathyreoidal lokalisierten Lymphozyten produziert werden und meßbare Antikörper nur einem Überlaufphänomen entsprechen. Dies ist offenbar neben methodischen Gründen die Hauptursache für den unter Umständen fehlenden Nachweis dieser Rezeptorantikörper trotz aktiven immunogenen Prozesses der Schilddrüse (Meller et al. 2000).

1. Einleitung

- b) Der neue Lumineszenzrezeptorassay (LRA) ist ebenfalls zur quantitativen Bestimmung der TRAK in Humanserum bestimmt in Gebrauch.

Hierfür gibt es gebrauchsfertige, mit humanen rekombinanten TSH-Rezeptoren beschichteten Teströhrchen (Coated tubes) und einem Tracer mit Lumineszenz markiertem (Akridinium-Derivat) bovinem-TSH, welches lyophilisiert und blau eingefärbt wurde.

Die gemessenen Ergebnisse des LRA werden wie folgt ausgewertet:

TRAK-Werte < 1 IU/l werden als TRAK-negativ, TRAK-Werte > 2 IU/l werden TRAK-positiv bewertet. Der Bereich zwischen 1 und 2 IU/l wird als Übergangsbereich beurteilt.

2.) Experimentelle Assays

- a) Der für diese Arbeit gewählte kompetitiver Assay ist ein Radiorezeptorassay, der anstelle der TSH-Rezeptoren von Schweineschilddrüsenmembranen, humane TSH-Rezeptoren verwendet. Er prüft ebenfalls nur die Bindungsmenge beziehungsweise die Konzentration von Antikörpern an den TSH-Rezeptoren.

Mit diesem Bindungsassay kann man also ebenfalls nicht zwischen funktionsstimulierenden und funktionsblockierenden TSH-Rezeptorantikörpern unterscheiden.

- b) Die zweite Methode ist der funktionelle Bioassay, der den funktionellen Status des TSH-Rezeptors, nämlich den cAMP-Spiegel bestimmt.

Mittels dieses funktionellen Assays kann durch Messung des produzierten cAMPs zwischen funktionsstimulierenden oder funktionsblockierenden TRAK unterschieden werden (Terry et al. 2000, Orgiazzi 2000).

An dieser Stelle muß noch der neueste Assay der 2. Generation erwähnt werden mit dem ein großer Schritt vorwärts zu vollkommenerer TRAK-Detektion gelungen ist. Die hierfür verwendeten Leukämiezelllinien (K562) exprimieren einen humanen TSH-Rezeptor. Mit diesem neuen Assay können bis zu 98,8 % der TRAK positiven Seren detektiert werden (Costagliola et al. 1999).

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Chinesischen Hamster Ovarienzellen (CHO-Zellen) der JP26-Zelllinie exprimieren ebenfalls solche hTSHr.

Bei diesen CHO-Zellen geht man davon aus, daß ihre Sensibilität höher liegt als beim herkömmlichen Schweine-RRA. Gerade der JP26-Zellklon mit seinen ca. 2.000 hTSHr pro Zelle kommt den physiologischen Schwankungen der humanen Thyreozyten am nächsten.

Dank der dadurch optimaleren Vergleichsmöglichkeiten mit in vivo Bedingungen kann Verlauf und Prognose des Morbus Basedow vor allem unter thyreostatischer Therapie besser verfolgt und beurteilt werden.

1.6 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Studie war der Nachweis von TSH-Rezeptorantikörpern mittels eines bekannten Zellklons (JP26-Zellklon) und eines Bindungsassays.

Der Schweinemembran-Radiorezeptorassays (RRA) ist zur TRAK-Messung in der klinischen Routine die bisher einzige validierte Methode (Zöphel et al. 2000). Dieser RRA ist jedoch, wie oben ausgeführt, nur in 70-90 % der Seren von Patienten mit floriden Morbus Basedow in der Lage, die TRAK zu detektieren (Meller et al. 2000).

Mit der vorliegenden Arbeit sollte deshalb versucht werden, eine sensitivere Nachweismethode zur Bestimmung von TSH-Rezeptorantikörpern zu entwickeln, um die Diagnose Morbus Basedow bei klinisch Erkrankten auch laborchemisch in einem höheren Prozentsatz zu sichern.

Eine weitere entscheidende Zielsetzung war die TRAK-Detektion bei Hashimoto-Thyreoiditis. Man weiß, daß bei ca. 10-20 % der HT-Patienten funktionsblockierende TRAK nachgewiesen werden können. Dies sollte mit diesem experimentellen Bindungsassay bestätigt werden.

Schon seit längerem wird eine TSH-Rezeptormutation bei autonomen Adenomen und Knotenstrümen diskutiert (Derwahl 1999). Bei den Schilddrüsenerkrankten ohne nachweisbare Autoimmunität sollten deshalb die durch die TSH-Rezeptormutationen induzierten TRAK-Bildungen aufgedeckt werden. Dies wäre dann ein wichtiger Schritt zur möglichen Früherkennung der Autoimmunthyreoiditis.

Ein Vergleich zwischen den in der Vergangenheit verwendeten Schweine-Radiorezeptorassays und dem für diese experimentelle Arbeit herangezogenen Humanen-Radiorezeptorassay sollte feststellen, welcher der sensitivere ist.

2.1 Verwendete Materialien

Geräte

Sterile Werkbank, Lamin Air HLB 2448 GS	Fa. Haereus, Hanau
Brutschrank, CO ₂ -Auto-Zero	Fa. Haereus, Hanau
Zentrifuge, Rotixa/RP	Fa. Hettrich, Wernecke
Lichtmikroskop, Phase Contrast 2, Typ 108	Fa. Nikon, Düsseldorf
γ-Counter, LB 2111	Fa. Berthold, LKB Freiburg
Automatische Pipettierhilfe	Fa. Desaga, Wiesloch
Schüttler, IKA-Vibrax-VXR, Typ VX1	Fa. Janke & Kunkel, Breisgau
Wasserbad	Fa. Memmert, Schwabach
Kühlraum (-20 Grad Celsius)	Fa. Dieter Auth, Rödermark
Digital-pH-Meter, Typ 646	Fa. Knick, Berlin
Vortex, Reax 2000	Fa. Heildolph, Schwabach
Sartorius-Vorwaage, Typ 2462	Fa. Sartorius, Göttingen
Autoklav, Typ 2540 EL	Fa. Tuttnauer, Breda, NL
Magnetrührer IKAMAG RH Basic	Fa. IKA-Werk, Staufen

Verbrauchsmaterialien

Glaspipetten, steril, 5 ml/10 ml	Fa. Brand, Wertheim
Plastikpipetten, steril, 5 ml/12 ml/25 ml	Fa. Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, Micro Test Tubes, 1,5 ml	Fa. Eppendorf, Köln
Zellkulturflaschen, steril 250 ml (75 cm ²)	Fa. Falcon, Franklin Lakes (USA)
Röhren-Tubes, 5 ml (75x12 mm)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Falconröhrchen, Conical Tubes, steril, 15 ml	Fa. Falcon, Franklin Lakes (USA)
PP-Röhrchen, steril, 50 ml	Fa. Greiner, Frickenhausen
Sartolab V500	Fa. Sartorius, Göttingen
Combitips, 25 ml	Fa. Eppendorf, Köln
24-Lochplatten, Multidish, Nuclon Surface	Fa. Brand, Wertheim
Latex-Handschuhe	Fa. Ansell Medical, München
S-Monovetten, 9 ml	Fa. Sarstedt, Nümbrecht

Zellkulturmedium

Zellkulturgrundmedium (IMDM), 1 Unit für 1 Liter w/o Supplements, w/o Glutamine, w/o NaHCO ₃	Fa. Life Technologie, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin(5000 U/ml)/Streptomycin(5000 mg/ml) - Lösung, 100ml	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2. Material

Lösungen

PBS Dulbeccos w/o Ca.und Mg.	Fa. Life Technologie, Eggenstein
Trypsin / EDTA-Lösung, 100 ml, 0,05/0,02 %ig in PBS	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Albumin bovine Fraction V, pH 7,0, 25 g	Fa. Boehringer, Ingelheim
Trypan-Blau-Lösung (0,4 %), 100 ml	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
pH-Pufferlösungen 4,01; 7,00; 9,21	Fa. Mettler Toledo, Steinbach

Chemikalien

NaOH, 5N, 1000 ml	Fa. Merck, Darmstadt
NaHCO ₃ , 500 g	Fa. Merck, Darmstadt
KCl, 500 g	Fa. AppliChem, Darmstadt
MgSO ₄ , 500 g	Fa. AppliChem, Darmstadt
Saccharose, 250 g	Fa. Merck, Darmstadt
Hepes Pufferan, 100 g	Fa. Merck, Darmstadt
Aqua dest., 1000 ml	Fa. Braun, Melsungen

Desinfektionsmittel

Flächendesinfektion, Aerodesin 2000, 1000 ml	Fa. Lysoform, Berlin
Händedesinfektion, Amphisept E, 500 ml	Fa. Bode Chemie, Hamburg

Tracer-Kit

Fa. Brahms, Berlin

Zusammensetzung:

- a) TRAK-Tracer, ¹²⁵I-bTSH (TSH isoliert aus Rinderhypophysen; radiojodiert),
jedes Fläschchen à 5,5 ml, Aktivität: < 40 kBq

- b) TRAK-Standards (bTSH) (nicht radioaktiv-markiertes bovines TSH)
TRAK Standard 1 TSH-AK-Konzentration 5 U/L
TRAK Standard 3 TSH-AK-Konzentration 45 U/L
TRAK Standard 5 TSH-AK-Konzentration 405 U/L

2.2 Verwendete CHO – Zellen

CHO-Zellen sind chinesische Hamsteroovarienzellen mit stabilen exprimierten humanen TSH-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche.

Die Exprimierung des humanen TSH-Rezeptors ist der Arbeitsgruppe von Vassart gelungen. Die CHO-Zellen wurden mit der cDNA für den rekombinanten TSH-Rezeptor transfiziert. Dabei fand eine modifizierte Ca-Phosphat-Präzipitationsmethode Anwendung (Velu et al. 1989). Die Zellen wurden mit dem hTSHr-pSVL Expressionsshuttle und dem pSV2-NEO Neomycin-Resistenz-Gen-Vektor kotransfiziert (Perret et al. 1990).

Am 2. Tag nach der Transfektion hatte man den Zellen frisches Medium mit einer Geneticin-Konzentration von 400 mg/l zugesetzt.

Bei täglichem Mediumwechsel waren nach ca. 10 Tagen alle nicht transfizierten Zellen abgestorben. Die verbleibenden Zellen wurden daraufhin trypsiniert und einer limitierten Verdünnung unterzogen, wodurch einzelne Klone, die jeweils nur aus einer einzigen transfizierten Zelle entstanden waren, angezüchtet werden konnten (Perret et al. 1990).

Der JP26-Zellklon, der ca. 2.000 hTSH-Rezeptoren exprimiert, wurden der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Schumm-Draeger freundlicherweise zusammen mit den Kontrollzellen, den JP02-Zellen, welche lediglich mit dem Neomycin-Resistenz-Gen transfiziert sind (van Sande et al. 1990) und somit keine TSH-Rezeptoren aufweisen, von Herrn Prof. Vassart und Frau Dr. Maenhaut aus Brüssel, für die vorliegende Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Tab. 5: Die zwei im Versuch verwendeten Zelllinien

CHO – Zelllinie	TSH – Rezeptoren
JP 02	keine hTSHr
JP 26	ca. 2.000 hTSHr pro Zelle

2.3 Unterteilung der Patientenseren

Grundlage dieser Studie bilden 242 Patientenseren (160 Frauen (w), 82 Männer (m)) im Alter von 9 bis 85 Jahren.

Die Patientenseren wurden in einem Zeitraum von 2 Jahren in der endokrinologischen Ambulanz der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main gesammelt und in verschiedene Gruppen eingeteilt.

Tab. 6: Einteilung und Charakterisierung der untersuchten Patienten, deren Diagnose, Durchschnittsalter \pm Standardabweichung (SD) und Geschlechtsverhältnis.

Gruppe	Patienten (n)	Diagnose	Durchschnittsalter (Jahre \pm SD)	Geschlecht (Männer : Frauen)
1	85	Morbus Basedow	43,0 \pm 15,1	1 : 3,2
2	76	Kontrollkollektiv (Diabetes mellitus Typ II)	55,3 \pm 16,4	1 : 1,1
3	29	Hashimoto-Thyreoiditis	50,0 \pm 16,2	1 : 4,6
4	14	Andere Autoimmunerkrankungen (Diabetes mellitus Typ I und Morbus Addison)	49,1 \pm 12,4	1 : 1,8
5	38	Nicht-autoimmune Schilddrüsenerkrankungen	52,6 \pm 16,5	1 : 2,5

2. Material

Tab. 7: Einteilung der MB-Patientenseren unter Berücksichtigung des TRAK und der Behandlungsdauer

Morbus Basedow-Gruppe	TRAK positiv (TRAK \geq 15 U/L)	TRAK negativ (TRAK < 10 U/L)
Florider MB (< 4 Wo. therapiert)	Gruppe 1A (n = 15)	Gruppe 1B (n = 6)
Therapierter MB (> 9 Mon. therapiert)	Gruppe 1C (n = 22)	Gruppe 1D (n = 42)

Tab. 8: Einteilung der MB-Patientenseren deren Durchschnittsalter \pm Standardabweichung (SD) und Geschlechtsverhältnis

MB-Gruppe	Patienten (n)	Durchschnittsalter (Jahre \pm SD)	Geschlecht (Männer : Frauen)
1A	15	44,4 \pm 18,7	1 : 6,0
1B	6	42,2 \pm 7,1	1 : 5,0
1C	22	45,7 \pm 18,6	1 : 3,4
1D	42	41,2 \pm 12,6	1 : 2,5

Alle Morbus Basedow-Seren wurden mit dem TRAK-Assay der Firma BRAHMS mit radioaktiv markiertem 125 I-bTSH –Tracer und isolierten, löslichen TSH-Rezeptoren der Schweineschilddrüsenzellmembran, im Hormonlabor des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgemessen.

Die Einteilung der MB-Gruppen konnte somit in TRAK positive (TRAK \geq 15 U/L) und TRAK negative (TRAK < 10 U/L) Patienten erfolgen.

Weiterhin wurden die MB-Patienten in floride, das heißt weniger als 4 Wochen thyreostatisch therapierte MB-Patienten und in thearpierte, das soll heißen in länger als 9 Monate thyreostatisch therapierte MB-Patienten eingeteilt.

3.1 Vorbereitung des modifizierten KRB-Puffers

Zusammensetzung:

190 g	Sucrose
2g	Glucose
0,74 g	KCL
0,59 g	MgSO ₄ x H ₂ O
1,7 g	NaHCO ₃
0,298 g	CaCl ₂ x H ₂ O
0,326 g	KH ₂ PO ₄
2,38 g	HEPES
2 g	BSA

2000 ml Aqua dest. wurde dazugegeben und der pH-Wert mit Natronlauge (NaOH) auf pH 7,4 eingestellt. Danach wurde der so zubereitete modifizierte KRB-Puffer steril filtriert, in Aliquots zu 12 ml bzw. 50 ml portioniert und bei –20 °C im Kühlraum aufbewahrt.

3.2 Vorbereitung des Kulturmediums

Jeden Monat wurde ein neues Kulturmedium (IMDM-Medium) angesetzt.

Das IMDM-Pulver wurde in 1 Liter Aqua dest. mit einem Magnetrührer aufgelöst und ordentlich durchmischt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt. In der sterilen Werkbank wurde das fertige IMDM-Medium zur Keimbefreiung in zwei Sartolabs V500 verteilt und abgefiltert. Das so hergestellte IMDM-Medium wurde im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.3 Kultivierung der CHO-Zellen

Die CHO-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Nährmedium unter sterilen Bedingungen und in einer feuchten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Nährmedium bestand aus IMDM-Medium, 5 % FKS, Penicillin (125 U/ml) und Streptomycin (125 mg/ml). Alle 2 bis 3 Tage wurden das Medium der kultivierten CHO-Zellen dekantiert und das verbrauchte Nährmedium durch 10 ml frisches ersetzt.

3.4 Gewinnung des Patientenserums

Als Probenmaterial für den TRAK-Assay wurde Humanserum verwendet.

Die Blutentnahmen erfolgten in der Ambulanz der Universitätsklinik an nüchternen Probanden. Die Proben wurden im Hormonlabor bei einer Geschwindigkeit von 2000 U/min 10 Minuten zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Die so gewonnenen Patientenserum wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße portioniert und zur weiteren Verwendung bei –20 °C im Kühlraum gelagert.

3.5 Radiorezeptorassays

Der in dieser Arbeit verwendete Radiorezeptorassay basiert auf dem Prinzip der Verdrängung von radioaktiv markiertem ^{125}I -bTSH durch im Patientenserum vorhandene TSH-Antikörper, welche ebenfalls an den TSH-Rezeptor der JP26-Zellen binden. Die Menge an TRAK im Patientenserum ist daher umgekehrt proportional zur gemessenen Radioaktivität.

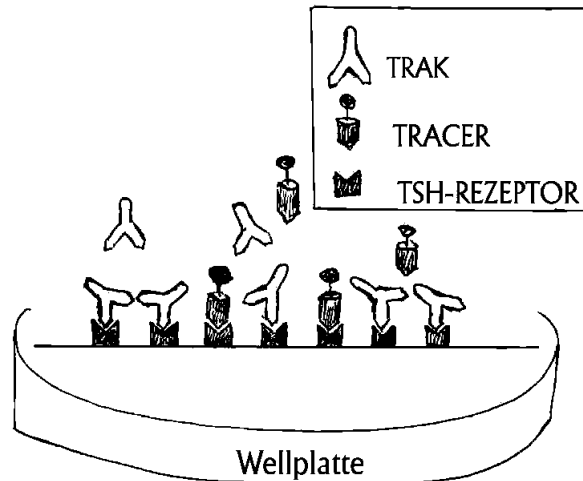


Abb. 8: Anschauungsmodell eines Radiorezeptorassays (Meisemann 2002)

Die angewandte Bestimmungsmethode unterscheidet nicht zwischen funktionsstimulierenden und funktionsblockierenden AK, da sich beide an den gleichen TSHr binden.

3.5.1 Passagieren der CHO-Zellen

Nachdem sich ein ausreichend großer Monolayer gebildet hatte, wurden die Zellen passagiert. Die durchschnittliche Konfluenz des Zellbodens betrug ca. 80-90 %.

Die CHO-Zellen wurden mit 15 ml PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche erfolgte mit 5 ml Trypsin unter 2-minütiger 37 °C Inkubation. Die proteolytische Enzymreaktion wurde mit 10 ml IMDM-Medium gestoppt.

Danach wurden die abgelösten Zellen zur Pelletierung 5 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Zum Zellpellet wurde 10 ml frisches IMDM-Medium hinzugefügt.

Zur Zellzahl- und Lebensfähigkeitsbestimmung wurde eine Trypanblaufärbung der Zellen durchgeführt.

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann.

3. Methode

Das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation (1200 U/min, 5 Min.) mit 10 ml IMDM-Medium verdünnt. Anschließend wurde zu 10 µl dieser Zellsuspension 90 µl Trypanblau als Testansatz zugegeben. Nach Durchmischen mit dem Farbstoff wurde 10 µl des Testansatzes in eine Neubauerkammer pipettiert und sofort mit der Zählung begonnen.

Lebende Zellen durften nicht angefärbt sein, während die toten Zellen durchgängig blau angefärbt sein mußten.

Die Zellzahl / ml wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{MW der Zellen in den 4 Quadraten} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Den Prozentsatz an lebenden Zellen erreicht man mit der Auswertung nach folgendem Schema:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$$

Durch Zugabe von IMDM-Medium konnte die ermittelte Zellzahl der Suspension auf 1 Millionen lebende Zellen / ml eingestellt werden.

Nun wurden 300 µl und somit 300.000 Zellen in jede Vertiefung der 24-Wellplatten pipettiert.

Die Wellplatten wurden anschließend über 24 Stunden unter einer feuchten Atmosphäre von 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3. Methode

3.5.2 Bestücken der Lochplatten

Von den mit JP26-Zellen bestückten und inkubierten Wellplatten wurde zunächst das Medium dekantiert und anschließend mit 600 µl PBS zweimal gewaschen.

Nachdem letzten Waschvorgang wurde das restliche PBS abgesaugt.

Alle folgenden Pipettierschemen für die Bestimmung der Standardkurve und der TRAK-Bestimmung der Patientenseren wurden im Doppelansatz vorgenommen.

Zur Erstellung einer Standardkurve wurden zuerst die Standardwerte für die Standardkurve mittels eines vordefinierten TRAK-Standardsets mit bekannten Konzentrationen von TSH-Rezeptorantikörpern bestimmt.

Die Lochplatten wurden daher mit 150 µl modifizierten KRB-Puffer, 50 µl TRAK Standard und 50 µl Tracer bestückt.

Tab. 9: Pipettierschema für die Erstellung der Standardkurven

TRAK-Standard	KRB-Puffer	Tracer
50 µl TRAK 0 (0 U/L)	150 µl	50 µl
50 µl TRAK 1 (5 U/L)	150 µl	50 µl
50 µl TRAK 3 (45 U/L)	150 µl	50 µl
50 µl TRAK 5 (405 U/L)	150 µl	50 µl

Für die eigentliche quantitative Antikörperbestimmung der Patientenseren wurden anstelle des TRAK-Standards die Seren des Patientenkollektivs verwendet.

Zuerst wurde 150 µl KRB-Puffer zu den JP26-Zellen pipettiert. Danach wurde die langsam im Kühlschrank aufgetauten Patientenseren einzeln gevortext und zu je 50 µl / Well einpipettiert. Im Anschluß daran wurde zur Bestimmung des RIA ebenfalls in alle JP26-Vertiefungen 50 µl Tracer pipettiert. Die Zeit zwischen der Pipettierung des Patientenserums und der des Tracers durfte 5 Minuten nicht überschreiten.

Tab. 10: Pipettierschema für die Patientenseren

Pipettierschema	KRB-Puffer	Patientenserum	Tracer
JP26-Zellen	150 µl	50 µl	50 µl

Nachdem alle Vertiefungen mit Standardlösungen und Patientenseren bestückt waren, fand eine 24-stündige Inkubation im Kühlschrank bei 4 °C statt.

3.5.3 Auswertung

Am dritten Tag wurden alle JP26-Wellplatten erneut dekantiert, zweimal mit 500 µl 4 °C kaltem modifizierten KRB-Puffer pro Well gewaschen und im Anschluß daran wieder abgesaugt.

Das Lösen der Zellen vom Untergrund der einzelnen Wells wurden durch Zugabe von 500 µl einer 0,1 normalen Natronlauge erreicht.

Nach 15-minütigem Schütteln der Wellplatten auf dem Schüttler, wurde der Überstand mit den abgelösten Zellen sorgfältig in Plastikreagenzröhrchen abpipettiert.

Die in den Röhrchen verbliebene Radioaktivität wurde im γ -Counter gemessen. Aus Zweifachbestimmungen wurde der Mittelwert der Standards und der Patientenserien errechnet.

3.6 Statistik

Für die statistischen Auswertungen der gemessenen Ergebnisse wurde das Statistikprogramm BIAS (neuste Version 7.04) von Dr. Ackermann, Biomathematiker an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main angewendet.

Die Meßergebnisse des vorliegenden Versuches zeigten eine nicht normale Verteilung in den einzelnen Gruppen. Es mußten deshalb die Mediane und nicht die Mittelwerte für die Berechnungen der Statistik herangezogen werden.

Für die Ergebnispräsentation wurde für die Arbeit neben dem Median, die Schwankungen (Minimum und Maximum) sowie das 1. und 3. Quartil dargestellt.

Für die Vergleichsanalysen wurde der Kruskal-Wallis-Test ausgewählt, weil die einzelnen Werte innerhalb der Gruppen kein Gauß'sches Verteilungsmuster bzw. keinen ordinalen Charakter aufwiesen. Es kam daher nur ein unparametrischer Test in Frage.

Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnten die Vergleiche der Mediane der einzelnen Gruppen untereinander erfolgen und die Signifikanzen errechnet werden.

Als signifikantes Ergebnis wurde ein p-Wert von unter 0,05 bewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Totalaktivität

Zur Bestimmung der Totalaktivität, des verwendeten Tracers, wurden im Doppelansatz je 50 µl Tracer im γ -Counter gemessen und der Mittelwert errechnet.

Tab. 11: Mittelwert der gemessenen Totalaktivität des Tracers der 6 Versuche; Impuls pro Minute (CPM).

Versuch	1	2	3	4	5	6
Totalaktivität des Tracers (CPM)	12947	11284	13754	13566	12874	10997

Wenn die gemessene Totalaktivität des Tracers unterhalb von 10.000 CPM lag, wurden die geforderten Standardwerte nicht mehr erreicht und der Versuch nicht gewertet.

4.2 Berechnung der Bindung der Totalaktivität (B/T%)

Zur Auswertung der Messergebnisse im γ -Counter wurde der Mittelwerte der gemessenen Impulse pro Minute (CPM) der im doppelten Ansatz bestimmten Probe durch den Mittelwert der CPM der Totalaktivität des Tracers mal 100 berechnet und die verbleibende Bindung (B) des radioaktiv markierten ^{125}I -bTSH – Tracers (T) in Prozent (%) angegeben:

$$B/T\% = \frac{\text{CPM der Probe}}{\text{CPM der Totalaktivität des Tracers}} \times 100$$

4. Ergebnisse

4.3 Bestimmung der unspezifische Bindung mittels JP02-Zellen

Eine wesentliche Voraussetzung für die Durchführung des Bindungsassays war der Nachweis, daß die unspezifische Bindung des verwendeten radioaktiven 125 I-bTSH (Tracer) an JP02-Zellen nur in dem zu vernachlässigenden Umfang von 1-2% der Totalaktivität stattfand. Damit war eine hohe Spezifität des Tests für TRAK gewährleistet.

Die unspezifische Bindung wurde in einem Vorversuch ermittelt. Die erwähnten JP02-Zellen wurden angezchtet und in Lochplatten inkubiert. Die so vorbereiteten JP02-Lochplatten wurden mit 200 µl modifizierten KRB-Puffer und 50 µl Tracer bestückt.

Tab.12: Pipettierschema zur Ermittlung der unspezifischen Bindung des Tracers an JP02-Zellen

Pipettierschema	KRB-Puffer	Patientenserum	Tracer
JP02-Zellen	200 µl	0 µl	50 µl

Nach 6 Versuchen im Doppelansatz wurde eine durchschnittliche unspezifische Bindung von 1,3 % erzielt. Dies entspricht den Ergebnissen vorangegangener Studien und liegt im Toleranzbereich (Poert et al. 1995).

Tab. 13: Mittelwerte (n = 2) der gemessenen unspezifischen Bindungen des Tracers an JP02-Zellen.

Versuch	1	2	3	4	5	6
CPM	156	180	174	90	153	121
B/T%	1,4 %	1,5 %	1,5 %	<1,0 %	1,4 %	1,1 %

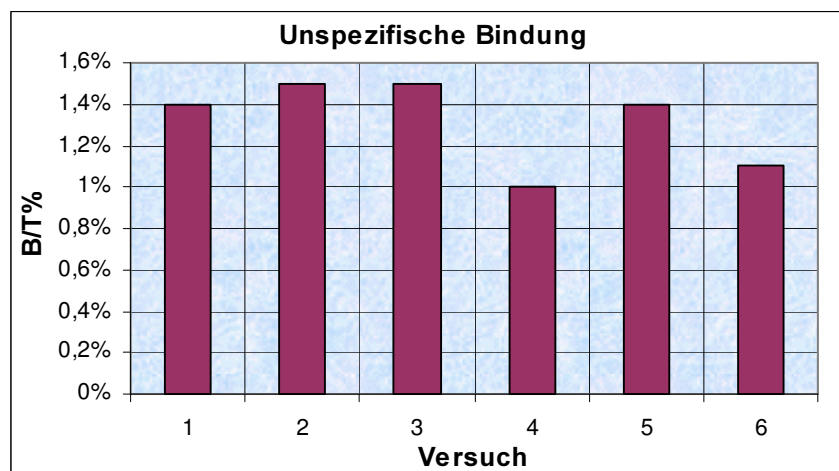


Abb. 9: Unspezifische Bindung des Tracers an JP02-Zellen. Eine B/T% von 1,0 bis 1,5% wurde erzielt.

4. Ergebnisse

4.4 Bestimmung der spezifische Bindung mittels JP26-Zellen

Die spezifische Bindung beschreibt die Bindung, die durch den radioaktiv markierten ^{125}I -bTSH (Tracer) an den TSH-Rezeptoren der JP26-Zellen erfolgt.

Die maximale spezifische Bindungskapazität des Tracers wird auch als Maximalbindung bezeichnet. Laut Literaturangaben liegt die Maximalbindung bei ca. 20 bis 30 % (Poert et al. 1995).

Zur Bestimmung der Maximalbindung wurden 200 μl KRB-Puffer und 50 μl Tracer im Doppelansatz in die vorbereiteten JP26-Lochplatten pipettiert.

Tab.14: Pipettierschema zur Ermittlung der spezifischen Bindung des Tracers an JP26-Zellen

Pipettierschema	KRB-Puffer	Tracer
JP26-Zellen	200 μl	50 μl

Durch mehrere Versuche konnte eine Maximalbindung des verwendeten Tracers von 29 % \pm 3,9 % (MW \pm SD) erzielt werden.

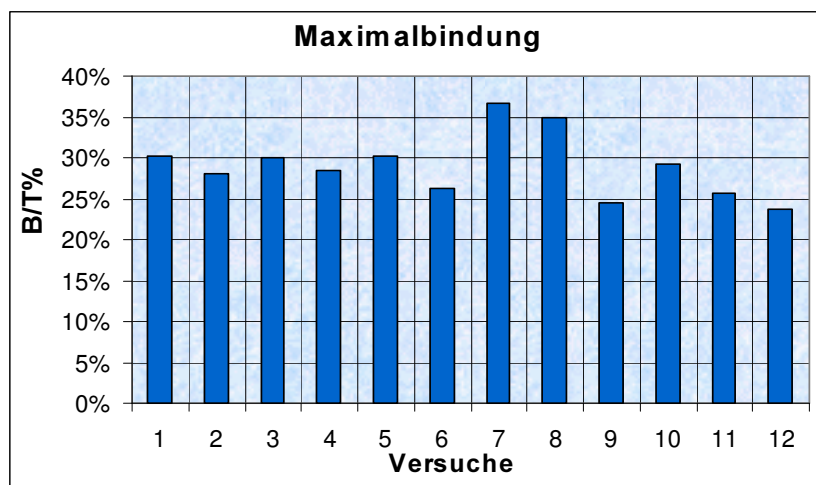


Abb. 10: Spezifische Bindung des Tracers an JP26-Zellen.
Eine B/T% von $29 \pm 3,9\%$ (MW \pm SD) wurde erzielt.

Das Versuchsergebnis belegte, daß eine überdurchschnittlich hohe spezifische Bindung an den TSH-Rezeptoren erfolgte.

Die hohe spezifische Bindung und die sehr niedrige unspezifische Bindung waren für den weiteren Versuchsablauf sehr wichtig.

4.5 Ermittlung der Standardkurven

Eine der Versuchsbedingungen war eine eine maximale Abweichung der Standardwerte von $\pm 10 \%$. Bei darüberhinausgehenden Schwankungen durfte die Probe mit den gemessenen TRAK-Konzentrationen des Patientenserums nicht gewertet werden.

Mit steigender TRAK-Konzentration der Standards, wurde der konkurrierende radioaktiv markierte Tracer verdrängt und somit sank die verbleibende Bindung von Totalaktivität.

Tab. 15: Gemessenen Standardproben (TRAK 0, 1, 3, 5) aus 12 Versuchen, angegeben in B/T%.
Schwarze Ergebnisse wurden gewertet, rote wurden bei der Wertung des Versuchs nicht berücksichtigt.

TRAK 0 (0 U/L)	TRAK 1 (5 U/L)	TRAK 3 (45 U/L)	TRAK 5 (405 U/L)
30,12 %	16,81 %	10,19 %	2,72
27,97 %	18,50 %	11,40 %	3,04
29,91 %	18,26 %	11,20 %	3,09
28,50 %	17,00 %	10,39 %	2,40
30,14 %	17,05 %	10,93 %	2,43
26,23 %	15,18 %	9,60 %	2,46
36,66 %	21,05 %	14,09 %	3,21 %
34,88 %	21,76 %	14,00 %	2,80 %
24,50 %	14,65 %	9,68 %	2,58 %
29,22 %	19,15 %	11,39 %	3,20 %
25,70 %	10,50 %	8,09 %	2,45 %
23,70 %	12,80 %	7,54 %	2,26 %

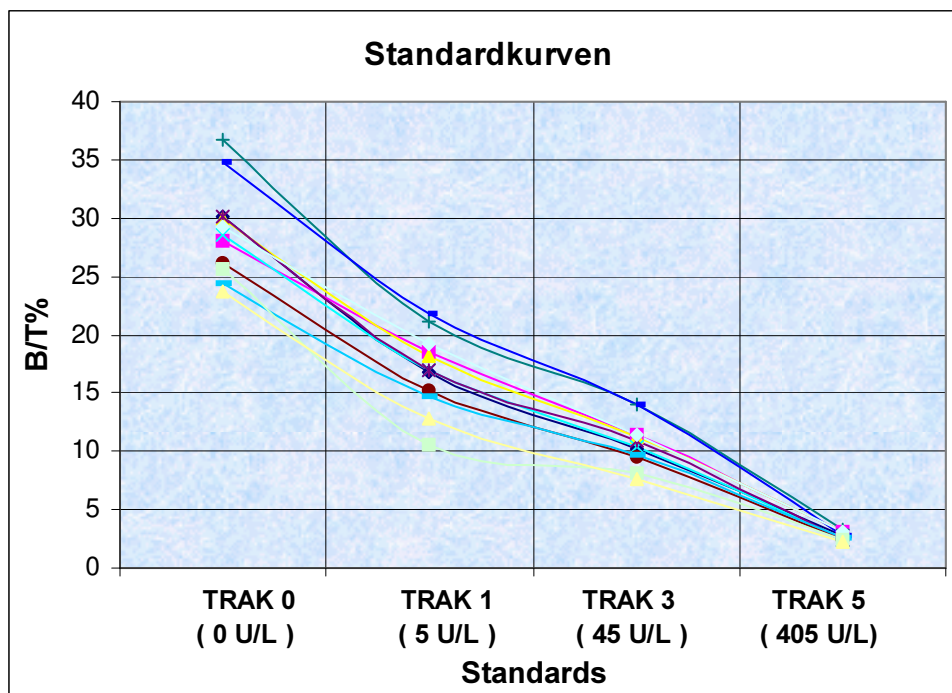


Abb. 11: 12 gemessene Standardkurven aus den Standardproben (TRAK 0, 1, 3, 5).

4. Ergebnisse

Zur Ermittlung des Standardbereichs wurde der Mittelwert der 12 Versuche berechnet und eine Standardabweichung von $\pm 10\%$ zugelassen.

Tab. 16: Mittelwerte aller gemessenen Standardproben $\pm 10\%$ ergaben den Standardbereich.

TRAK-Standard	-10 % vom Mittelwert	Mittelwert (B/T%)	+10 % vom Mittelwert
TRAK 0 (0 U/L)	26,10 %	29,00 %	31,90 %
TRAK 1 (5 U/L)	15,20 %	16,90 %	18,60 %
TRAK 3 (45 U/L)	9,60 %	10,70 %	11,80 %
TRAK 5 (405 U/L)	2,40 %	2,70 %	3,00 %

Durch den Standardbereich der TRAK-Standards konnten die zu wertenden Versuche ermittelt werden.

Tab. 17: 6 von 12 Standardkurven, die innerhalb des Standardbereiches lagen.

Versuch	1	2	3	4	5	6
TRAK 0 (0 U/L)	30,12 %	27,97 %	29,91 %	28,50 %	30,14 %	26,23 %
TRAK 1 (5 U/L)	16,81 %	18,50 %	18,26 %	17,00 %	17,05 %	15,18 %
TRAK 3 (45 U/L)	10,19 %	11,40 %	11,20 %	10,39 %	10,93 %	9,60 %
TRAK 5 (405 U/L)	2,72 %	3,04 %	3,09 %	2,40 %	2,43 %	2,46 %

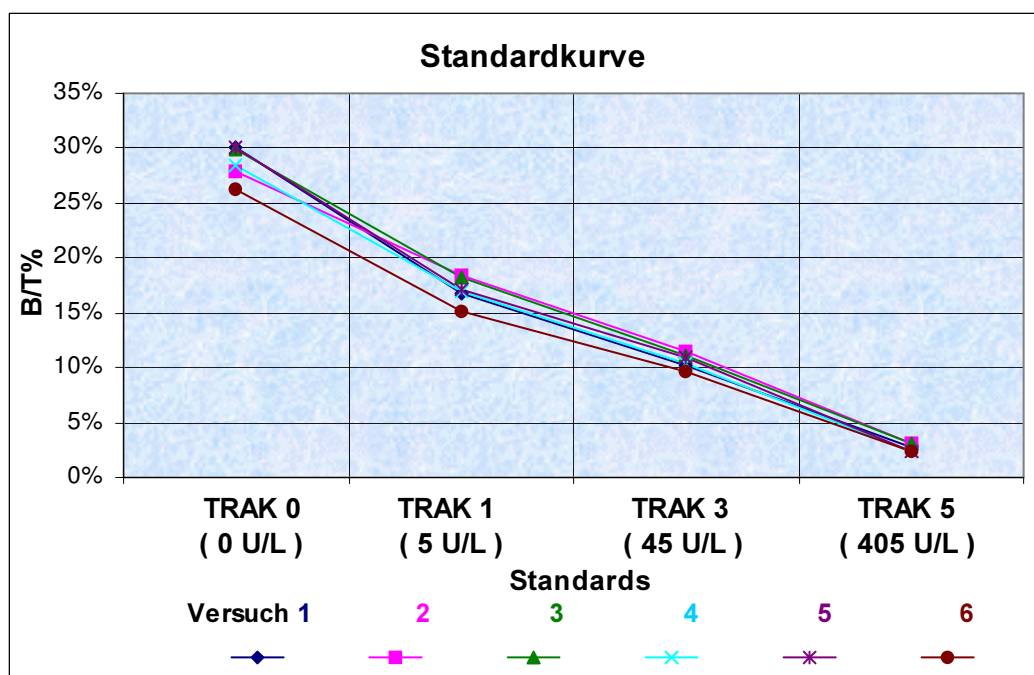


Abb. 12: Die 6 gewerteten Standardkurven, die innerhalb des Standardbereiches lagen.

4. Ergebnisse

4.6 Berechnung der Standardkurve

Zur besseren Präsentation und Vergleichsmöglichkeit mit den Ergebnissen des Hormonlabors der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main und mit anderen Studien, wurden die gemessenen Ergebnisse in Units pro Liter (U/L) umgerechnet. Dafür wurde auch eine Standardkurve ermittelt, um die gemessene Bindung (B/T%) direkt in U/L ablesen zu können.

Eine Formelherleitung freundlicherweise erstellt von dem Mathematiker Prof. Dr. Karl Jakob Dienst, Aachen ermöglichte mittels Ausgleichspotenzfunktion eine genaue Umrechnung der Ergebnisse. Die Standardkurve dient nur der Veranschaulichung.

Folgende Bedingungen müssen für die Berechnung der Standardkurve gelten:

$$\mathbf{x}_i = \bar{\mathbf{x}}_0 - \mathbf{x}_i, \mathbf{u}_i = \ln \bar{\mathbf{x}}_i, \mathbf{v}_i = \ln \mathbf{y}_i$$

Um die Bedingung :

$$(u_3 - u_2) / (u_2 - u_1) = (v_3 - v_2) / (v_2 - v_1) = \ln (y_3/y_2) / \ln (y_2/y_1) = \ln (405/45) / \ln (45/5) = 1$$

zu erfüllen, muß \mathbf{x}_0 verändert werden.

Durch verschiedene Rechnungsversuche kommt man letztlich zu

$$\begin{aligned} \mathbf{x}_0 = 0,38 & \rightarrow \bar{\mathbf{x}}_1 = 0,211 & \bar{\mathbf{x}}_1 = 0,273 & \bar{\mathbf{x}}_3 = 0,353 \\ & \rightarrow \mathbf{u}_1 = -1,5559 & \mathbf{u}_2 = -1,2983 & \mathbf{u}_3 = -1,0413 \\ & \rightarrow (u_3 - u_2) / (u_2 - u_1) = -0,2570 / -2,576 = 0,9977 \text{ gerundet auf } 1. \end{aligned}$$

Vorgegebene Standardwerte für die Berechnungstabelle gelten schließlich:

$$\begin{aligned} \mathbf{i} &= 0, 1, 2, 3 \\ \mathbf{x}_0 &= 0,38, \mathbf{x}_1 = 0,169, \mathbf{x}_2 = 0,107, \mathbf{x}_3 = 0,169 \\ \mathbf{y}_0 &= 0, \mathbf{y}_1 = 5, \mathbf{y}_2 = 45, \mathbf{y}_3 = 405 \end{aligned}$$

Tab. 18: Berechnungstabelle

$\mathbf{i} \leftrightarrow$ Reihenfolge	$\mathbf{x}_i \leftrightarrow$ (B/T%)/ 100	$\mathbf{y}_i \leftrightarrow$ U/L	$\bar{\mathbf{x}}_i$	\mathbf{u}_i	\mathbf{v}_i	\mathbf{u}_i^2	$\mathbf{u}_i \mathbf{v}_i$
0	0,38	0					
1	0,169	5	0,211	-1,5559	1,6094	2,4208	-2,5041
2	0,107	45	0,273	-1,2983	3,8067	1,6855	-4,9421
3	0,027	405	0,353	-1,0413	6,0039	1,0843	-6,2518
Σ				-3,8955	11,4200	5,1906	-13,6980

4. Ergebnisse

Die Punkte (u_i, v_i) für $i = 1, 2, 3$ liegen näherungsweise auf einer Geraden.

Ausgleichspotenzfunktion: $y = a x^b$

$$3c - 3,8955 b = 11,4200$$

$$-3,8955 c + 5,1906 b = -13,6980$$

$$\rightarrow c = 14,907 \quad b = 8,548$$

$$a = e^c = 2977255$$

$$y = 2977255 \bar{x}^{8,548}$$

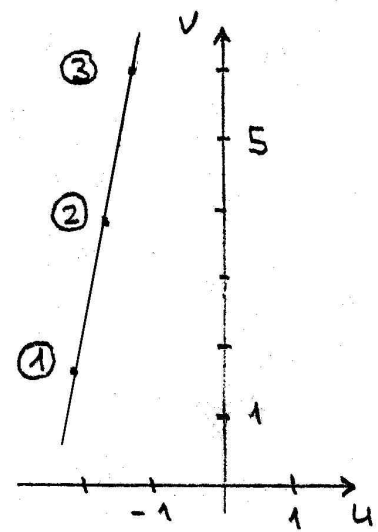


Abb. 13: Die Gerade geht durch die Punkte $i = 1, 2$ und 3

Die hergeleitete Formel zur Berechnung der U/L lautet:

$$\rightarrow y = 2977255 (0,38 - x)^{8,548}$$

Tab. 19: Einige Zahlenbeispiele für die **Standardkurve**, rot = Standardwerte, blau = Übergangsbereich

$x = B/T\% / 100$	$y = U/L$
0,38	0
0,29	0
0,22	0,5
0,20	1,3
0,169	5
0,154	9
0,1473	11,5
0,14	15
0,13	21,3
0,107	45
0,07	133,7
0,05	228,1
0,027	405
0,01	606,5

4. Ergebnisse

Üblicherweise werden TRAK-Werte < 9 U/L als Antikörper-negativ und TRAK-Werte > 14 U/L als Antikörper-positiv gewertet. Der Bereich zwischen 9 und 14 U/L wird als Übergangsbereich bezeichnet.

Zur Vereinfachung wurden bei dieser Arbeit alle Werte ≥ 14 U/L als Antikörper-positiv, Werte < 14 U/L als Antikörper-negativ bewertet.

$\geq 14,0$ U/L = TRAK positiv - - - - - $< 14,0$ U/L = TRAK negativ

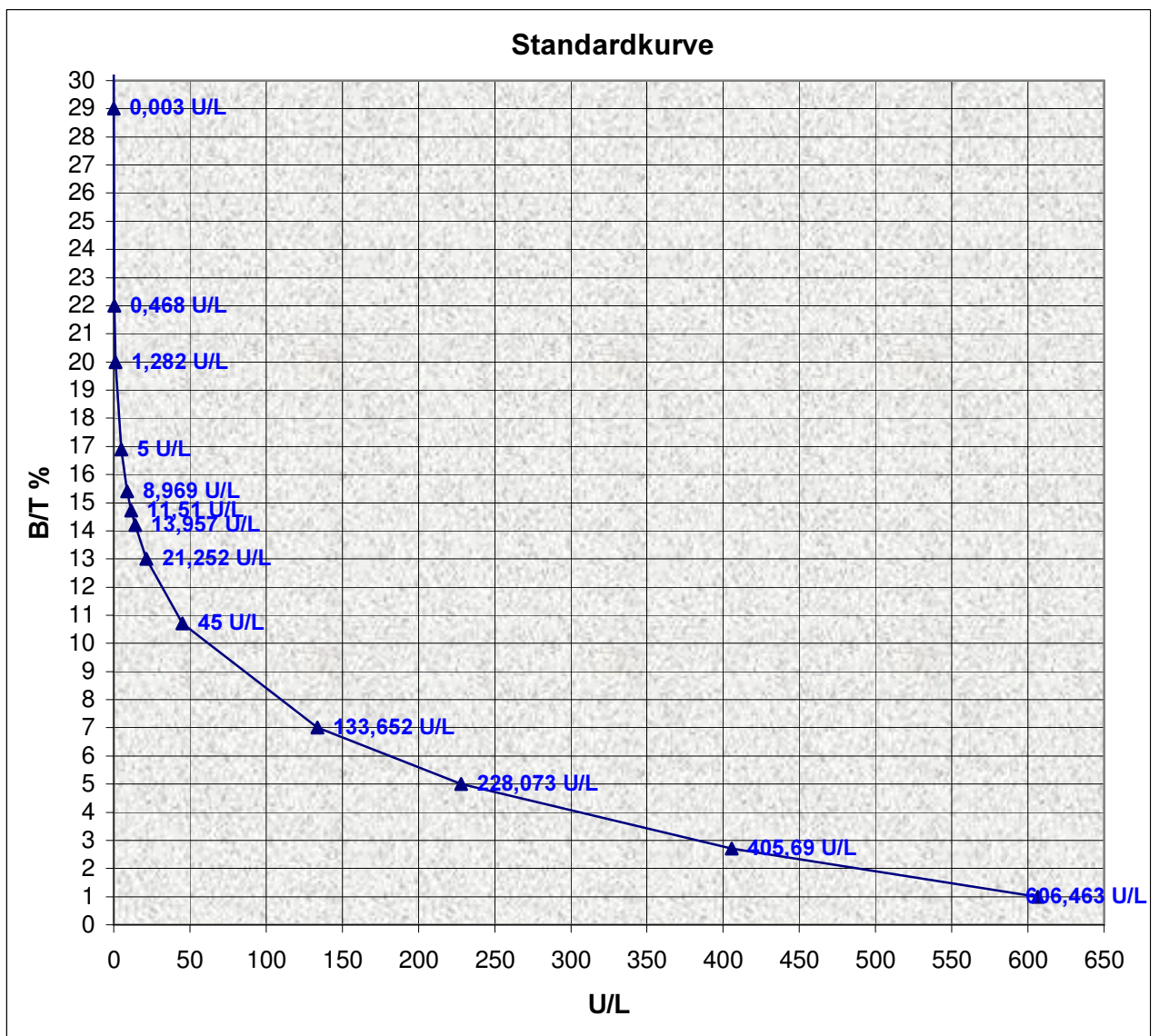


Abb. 14: Standardkurve mit den TRAK Standards und den berechneten Zahlenbeispielen.

4.7 Nachweis von Autoantikörpern

4.7.1 Verteilung der Patientenseren

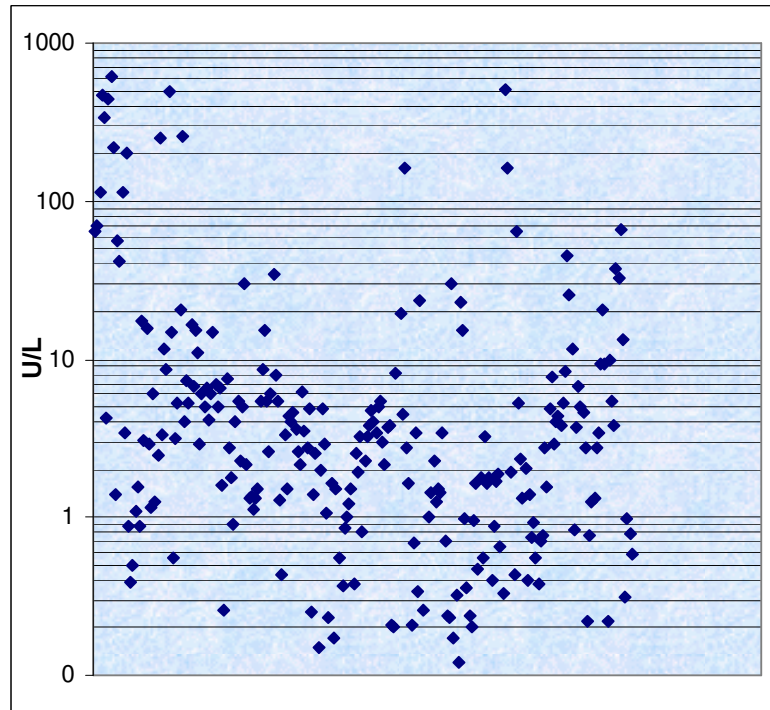


Abb. 15: Darstellung aller 242 getesteten Patientenseren, bezogen auf die TRAK (U/L).

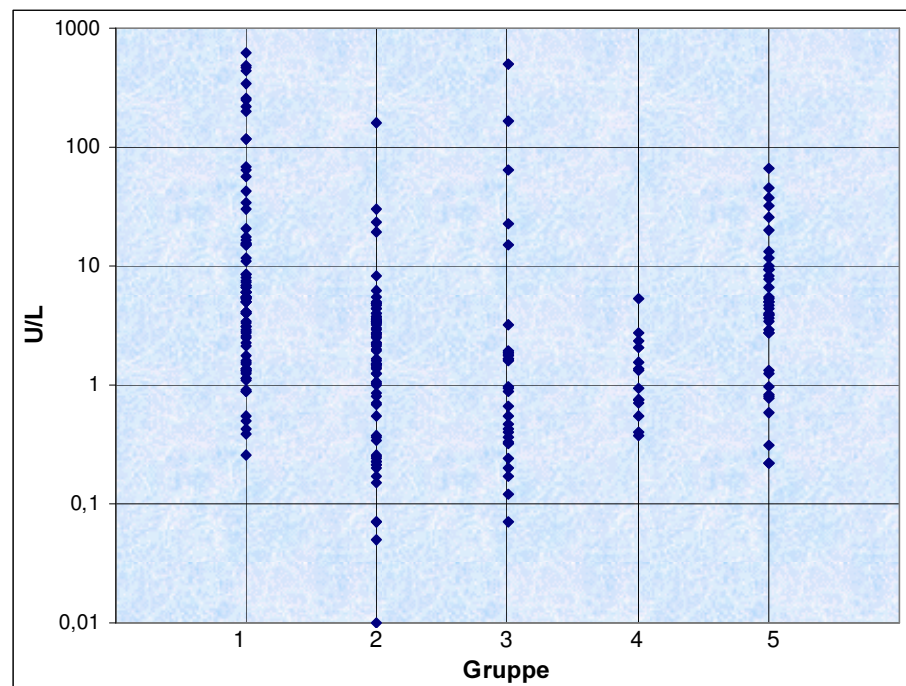


Abb. 16: Verteilung der 242 getesteten Patientenseren bezogen auf die TRAK (U/L) und ihre jeweiligen Gruppen: Gruppe 1 = Morbus Basedow, Gruppe 2 = Kontrollkollektiv, Gruppe 3 = Hashimoto-Tyreoiditis, Gruppe 4 = andere Autoimmunerkrankungen, Gruppe 5 = nicht autoimmune SD-Erkrankungen

4. Ergebnisse

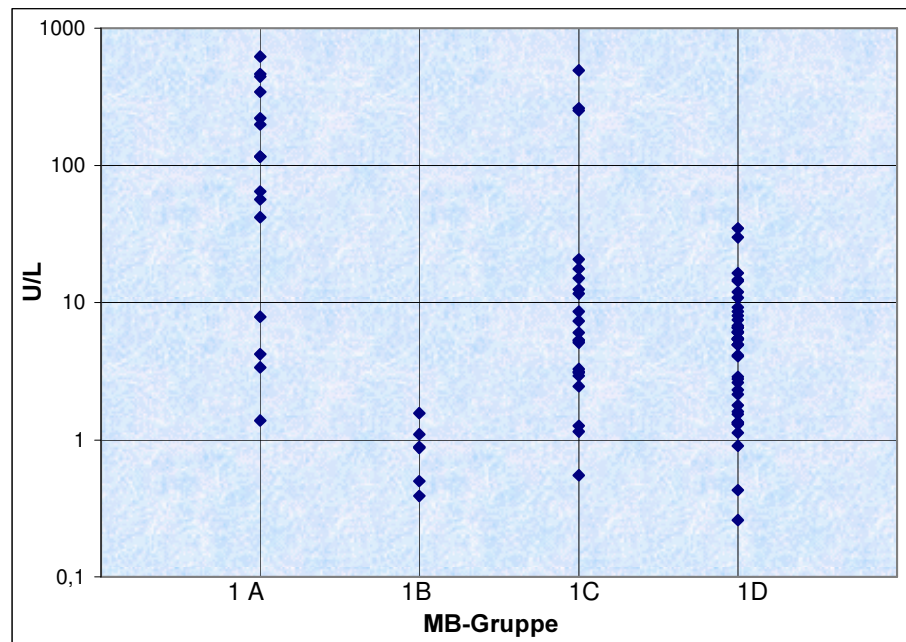


Abb. 17: Verteilung der 85 MB-Patientenserum bezogen auf die TRAK (U/L) und ihre jeweiligen Gruppe: Gruppe 1A = TRAK-pos./ florider MB, Gruppe 1B = TRAK neg./ florider MB, Gruppe 1C = TRAK-pos./ therapierter MB, Gruppe 1D = TRAK-neg./ therapierter MB.

Man kann in der Abb. 16 sehr gut erkennen, daß sich die meisten im Versuch positiv gemessenen Patientenserum in der Morbus Basedow-Gruppe befinden.

In der MB-Gruppe und in der Hashimoto-Thyreoiditis-Gruppe wurden die höchsten TRAK-Werte (> 100 U/L) gemessen. Dies waren in der HT-Gruppe mit nur 2 Patientenserum jedoch sehr wenige.

Innerhalb der MB-Gruppe wiesen die zwei TRAK-positiven Gruppen (1A und 1C), gleichzeitig auch die höchsten TRAK-Titer überhaupt auf, wie in Abb. 17 ersichtlich.

Die im Durchschnitt niedrigsten TRAK-Werte fanden sich auch in diesen Versuchen bei den floriden / TRAK negativen MB-Gruppen (1B und 1D).

4. Ergebnisse

Ermittlung der Antikörper-positiven Patientenseren

Tab. 20: Angaben der Antikörper-positiven Patientenseren in den einzelnen Gruppen: Gruppe 1 = Morbus Basedow, Gruppe 2 = Kontrollkollektiv, Gruppe 3 = Hashimoto-Tyreoiditis, Gruppe 4 = andere Autoimmunerkrankungen, Gruppe 5 = nicht autoimmune SD-Erkrankungen

Gruppe	TRAK-positive Patientenseren im Versuch
1	26 von 85 → 31 %
2	4 von 76 → 5 %
3	5 von 29 → 17 %
4	0 von 14 → 0 %
5	6 von 38 → 16 %

26 Patientenseren der 85 MB-Seren hatten im experimentellen Versuch ein TRAK-positives Ergebnis, das waren 31 %.

Die Hashimoto-Thyreoiditis-Gruppe zeigte mit 17 % TRAK-positiver Seren, den zweitgrößten Anteil an positiv gemessenen Patientenseren auf.

In der Gruppe der nicht-autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen waren 16 % der Patientenseren als positiv detektiert worden.

4 von 76 Seren der Kontrollkollektivgruppe (5 %), wurden als positiv gewertet.

Ermittlung der Antikörper-positiven MB-Patientenseren

Tab. 21: Angaben der Antikörper-positiven Patientenseren innerhalb der MB-Gruppe. Gruppe 1A = TRAK-pos./ florider MB, Gruppe 1B = TRAK-neg./ florider MB, Gruppe 1C = TRAK-pos./ therapierter MB, Gruppe 1D = TRAK-neg./ therapierter MB. Die höchsten Prozentwerte zeigen die TRAK-positiven MB-Gruppe 1A und 1C.

MB-Gruppe	TRAK-positive Patientenseren im Versuch
1A	12 von 15 → 80 %
1B	0 von 6 → 0 %
1C	8 von 22 → 36 %
1D	6 von 42 → 14 %

Vergleicht man die zwei TRAK-positiven MB-Gruppen so wird deutlich, daß in der floriden MB-Gruppe (1A) mehr als doppelt so viele Seren positiv detektiert wurden (80%), als in der länger als 9 Monaten therapierten MB-Gruppe (1C).

In den zwei TRAK-negativen MB-Gruppen fanden sich in der Gruppe mit florider Erkrankung (1B) keine positiven Seren, hingegen ließen sich in der länger als 9 Monaten therapierten MB-Gruppe (1D) 14 % als positiv detektieren.

4.7.2 Vergleich der Kontrollgruppen mit den Patientengruppen

Tab. 22: Anzahl der gemessenen Patientenserien, deren Median-, 1. / 3. Quartil- und Minimum-, Maximum-Werte in Units pro Liter (U/L) für die Gruppen:
 Gruppe 1 = MB-Gruppe, Gruppe 2 = Kontrollgruppe, Gruppe 3 = HT-Gruppe,
 Gruppe 4 = andere Autoimmunerkrankungen, Gruppe 5 = nicht autoimmune SD-Erkrankungen.

Gruppe	Anzahl (n)	Median (U/L)	1. / 3.Quartil (U/L)	Minimum-Maximum (U/L)
1	85	5,5	2,0 / 15,5	0,3 – 620,6
2	76	2,1	0,7 / 3,7	0,0 – 161,3
3	29	1,0	0,3 / 1,9	0,1 – 503,1
4	14	1,1	0,7 / 2,1	0,4 – 5,3
5	38	4,5	1,3 / 9,6	0,2 – 66,1

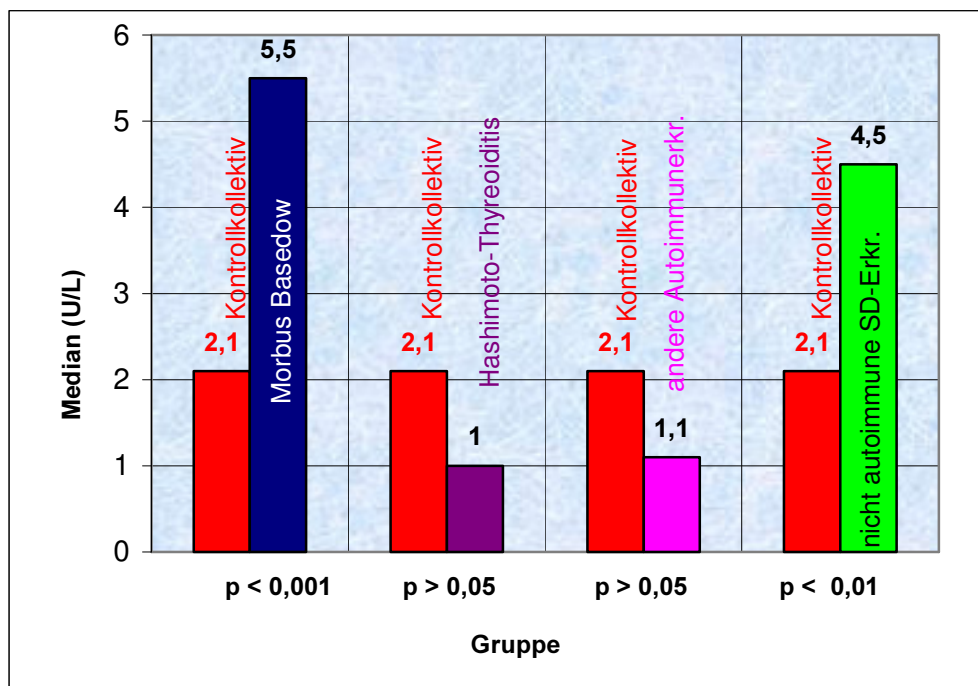


Abb. 18: Vergleich der TRAK-Konzentrationen der MB-Gruppe, der HT-Gruppe, der Gruppe der anderen nicht SD-bedingten Autoimmunerkrankungen und der Gruppe der nicht autoimmunen SD-Erkrankungen mit der Kontrollkollektivgruppe.

Im Vergleich der Morbus Basedow-Gruppe mit dem Kontrollkollektiv zeigte sich, daß die TRAK-Konzentration in der MB-Gruppe mit 5,5 U/L signifikant höher ausfiel ($p < 0,001$) als in der Kontrollkollektivgruppe mit 2,1 U/L.

Die TRAK-Konzentration in der MB-Gruppe war die größte, gefolgt von der in der Gruppe der nicht autoimmunen SD-Erkrankungen mit 4,5 U/L gemessenen.

Im Vergleich zu den Kontrollpatienten zeigte sich auch eine signifikant höhere Konzentration an TRAK ($p < 0,01$) bei dem Patientenkollektiv der nicht autoimmunen SD-Erkrankungen.

4. Ergebnisse

Im Vergleich der Kontrollkollektivgruppe mit der HT-Gruppe, die mit 1,0 U/L die niedrigste der positiv gemessenen TRAK-Konzentrationen enthielt, wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen ($p > 0,05$).

In der HT-Gruppe fand sich jedoch interessanterweise mit 503,1 U/L der zweithöchste überhaupt gemessene TRAK- Wert.

Die Gruppe der anderen nicht SD-bedingten Autoimmunerkrankungen stellte mit 14 Patienten das kleinste Patientenkollektiv und zeigte die geringsten Ergebnisschwankungen (0,4 bis 5,3). Die Gegenüberstellung des Kontrollkollektivs mit der vorher erwähnten Gruppe erbrachte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$).

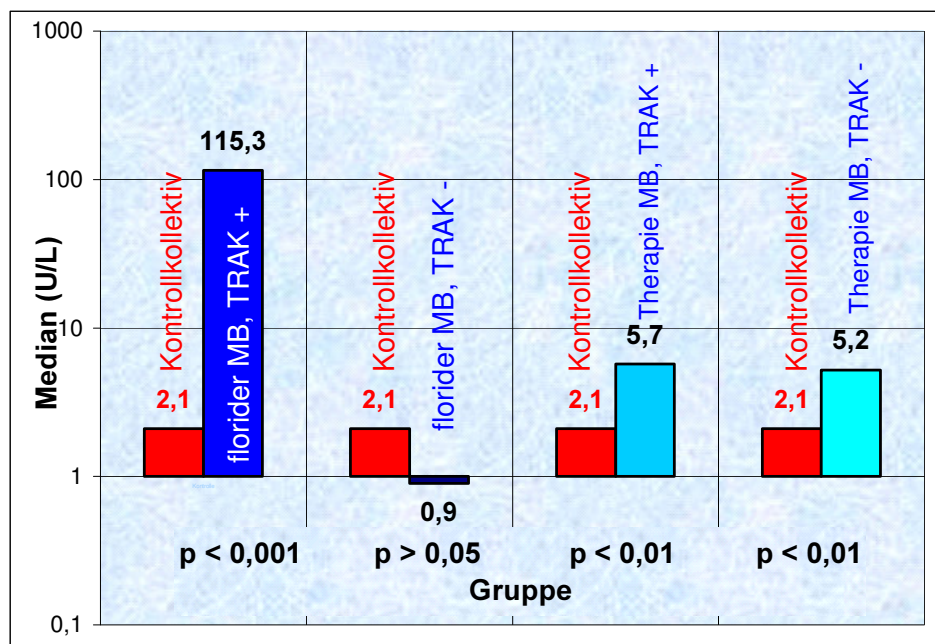


Abb. 19: Vergleich der beiden flori-der MB-Gruppen und der beiden länger als 9 Monaten therapierten MB-Gruppen mit der Kontrollkollektivgruppe.

Bei den Gegenüberstellungen in Abb.17 wurde die Gruppe des Kontrollkollektivs jeweils mit den 4 differenten MB-Gruppen verglichen.

Man kann gut erkennen, daß die höchste TRAK-Konzentration (115,3 U/L) in der Gruppe der flori-der / TRAK positiven MB-Patienten nachgewiesen wurde. Im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv (2,1 U/L) resultierte daher ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

Hingegen war die TRAK-Konzentration bei den flori-der / TRAK negativen MB-Patienten mit 0,9 U/L nicht signifikant niedriger ($p > 0,05$) als bei den Kontrollpatienten.

Die beiden länger als 9 Monaten therapierten MB-Gruppen hatten eine signifikant höhere TRAK-Konzentration (5,7 U/L und 5,2 U/L, jeweils $p < 0,01$) als die Kontrollkollektivgruppe.

4. Ergebnisse

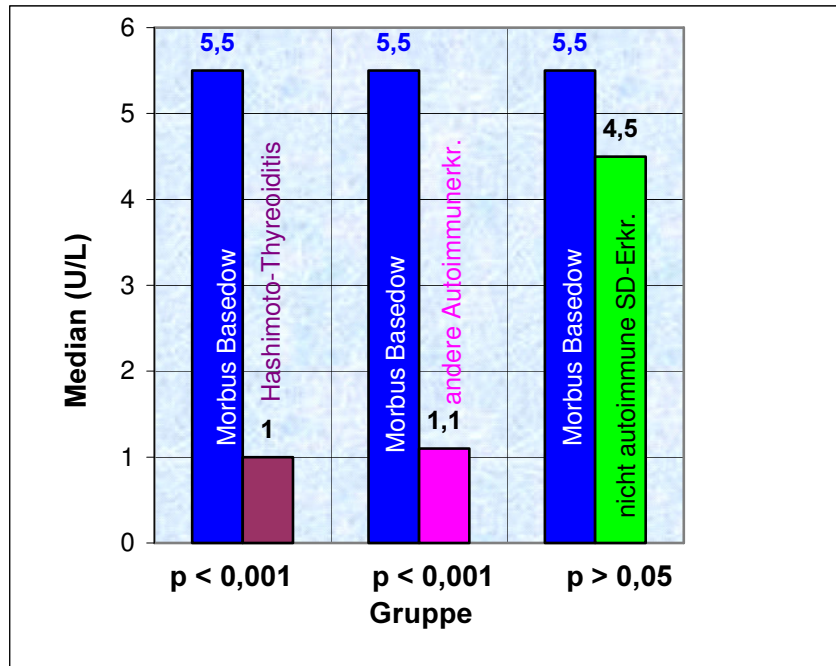


Abb. 20: Vergleich der HT-Gruppe, der Gruppe der anderen nicht SD-bedingten Autoimmunerkrankungen und der Gruppe der nicht autoimmunen SD-Erkrankungen mit der MB-Gruppe.

Im Vergleich der TRAK-Konzentrationen der HT-Gruppe von 1,0 U/L mit der MB-Gruppe von 5,5 U/L zeigte sich eine signifikant niedrigere TRAK-Konzentration ($p < 0,001$) bei der HT-Gruppe.

Auch der Vergleich der Gruppe der anderen Autoimmunerkrankungen mit der des MB ergab eine signifikant niedrigere TRAK-Konzentration von 1,1 U/L ($p < 0,001$) im Patientenkollektiv der anderen Autoimmunerkrankungen.

Die TRAK-Konzentration in der Gruppe der nicht autoimmunen SD-Erkrankungen war mit 4,5 U/L annähernd so hoch wie in der MB-Gruppe. Es ergab sich daher im Vergleich der TRAK-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Es wird somit deutlich, daß die MB-Gruppe die meisten TRAK-positiven Patienten aufweist, gefolgt von der Patientengruppe mit nicht autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen.

4.8 Vergleiche der gemessenen TRAK-Konzentrationen innerhalb der MB-Gruppen

Tab. 23: Vergleiche zwischen :

- 1) TRAK positive und TRAK negative MB-Patienten
- 2) floride und länger als 9 Monaten therapierte MB-Patienten.

Vergleich	Signifikanz
1) TRAK positive vs. TRAK negative MB-Patienten	$p < 0,001$
2) floride vs. therapierte MB-Patienten	$p > 0,05$

Der Antikörpernachweis innerhalb der Morbus Basedow-Gruppe war sehr unterschiedlich.

Die im Bindungsassay gemessenen TRAK-Konzentrationen waren signifikant höher ($p < 0,001$) im Vergleich der im Routinelabor nachgewiesenen TRAK positiven zu den dort TRAK negativen MB-Patienten.

Es ergab sich aber keine Signifikanz der TRAK-Konzentrationen zwischen den floriden und den therapierten MB-Patienten. Dieses Ergebnis wird im Diskussionsteil erörtert.

4.9 Vergleiche der Ergebnisse des angewendeten Bindungsassay mit denen des Routinelabors

Tab. 24: Vergleich der Ergebnisse des verwendeten Bindungsassays mit humanen TSHr und dem Schweinemembran-TSHr im etablierten Routinelabor der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Morbus Basedow-Patienten	Versuch	Labor
Alle positiv gemessenen Patientenseren der MB-Gruppe	26 von 85 → 30,6 %	37 von 85 → 43,5 %
Bezogen auf die TRAK positiv gemessenen Seren im Labor:	20 von 37 → 54,1 %	(100 %)
Florider MB (< 4 Wo. therapiert)	12 von 21 → 57,1 %	15 von 21 → 71,4 %
Therapierter MB (> 9 Mon.)	14 von 64 → 21,9 %	22 von 64 → 34,4 %

Die Anzahl positiver MB-Patientenseren war im etablierten Routinelabor mit 43,5 % größer als im angewendeten Bindungsassay mit 30,6 %.

Die im Routinelabor als TRAK positiv ermittelten Patientenseren (100 %) wurden mit der Methode dieser Arbeit lediglich in 54,1 % detektiert.

Die Patientenseren der floriden MB-Gruppen erreichten im Routinelabor eine TRAK positive Detektionsrate von 71,4 % und im Bindungsassay eine positive Nachweisrate von 57,1 %.

Den niedrigsten positiven TRAK-Nachweis erbrachten die länger als 9 Monaten therapierten MB-Gruppen. Hier konnten im Routinelabor in 34,4 % und in der vorliegenden Arbeit nur 21,9 % der Patientenseren mit einem positiven TRAK-Titer ermittelt werden.

4. Ergebnisse

4.10 Geschlechtsverteilung innerhalb der Morbus Basedow-Gruppe

Tab. 25: Anzahl der Frauen und Männer in den MB-Gruppen: Gruppe 1A = TRAK-pos./ florider MB, Gruppe 1B = TRAK-neg./ florider MB, Gruppe 1C = TRAK-pos./ therapierter MB, Gruppe 1D = TRAK-neg./ therapierter MB und deren Median, Quartile und Minimum-Maximum in U/L.

Morbus Basedow Gruppe 1A	Anzahl (n)	Median (U/L)	1. / 3. Quartil (U/L)	Minimum-Maximum (U/L)
Frauen	13	115,3	49,2 / 392,2	1,4 – 620,6
Männer	2	101,3	-	3,4 – 199,1
Frauen vs. Männer p > 0,05				
Gruppe 1B	Anzahl (n)	Median (U/L)	1. / 3. Quartil (U/L)	Minimum-Maximum (U/L)
Frauen	5	0,9	0,4 / 1,3	0,4 – 1,6
Männer	1	0,9	-	0,9
Frauen vs. Männer p > 0,05				
Gruppe 1C	Anzahl (n)	Median (U/L)	1. / 3. Quartil (U/L)	Minimum-Maximum (U/L)
Frauen	17	5,3	2,7 / 15,2	0,6 – 491,4
Männer	5	7,3	4,6 / 140,4	4,0 – 260,0
Frauen vs. Männer p > 0,05				
Gruppe 1D	Anzahl (n)	Median (U/L)	1. / 3. Quartil (U/L)	Minimum-Maximum (U/L)
Frauen	30	5,0	1,7 / 6,8	0,3 – 30,0
Männer	12	5,5	1,8 / 8,4	0,4 – 34,8
Frauen vs. Männer p > 0,05				

Im Vergleich der TRAK-Konzentrationen der weiblichen mit denen der männlichen MB-Patienten wird deutlich, daß es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei deren Nachweis gab.

Es wurde auch ersichtlich, daß in der TRAK positiven / floriden MB-Gruppe (1A) die jeweils höchsten TRAK-Konzentrationen bei Frauen wie bei Männer gemessen wurden.

Bis auf die TRAK negative, länger als 9 Monate therapierte, MB-Gruppe (1D) waren in allen anderen MB-Gruppen die TRAK-Konzentrationsmaxima der Frauen größer als die der Männer jedoch ohne Signifikanz.

Insgesamt befanden sich 65 Patientenseren von Frauen und 20 Seren von Männer (in Prozent 69,2 % / 30,8 %) in der Morbus Basedow-Gruppe.

4. Ergebnisse

4.11 Altersverteilung in der Morbus Basedow-Gruppe

Tab. 26: Anzahl der jüngeren und älteren Morbus Basedow-Patienten, deren Median, Quartile und Minimum-Maximum in U/L.

Morbus Basedow-Gruppe	Anzahl (n)	Median (U/L)	1. / 3. Quartil (U/L)	Minimum-Maximum (U/L)
1) Jüngere MB-Patienten (≤ 43 J.)	52	4,5	1,5 / 16,2	0,3 – 491,4
Ältere MB-Patienten (> 43 J.)	33	6,1	3,0 / 15,1	0,9 – 620,6
Jüngere vs. ältere MB-Patienten $p > 0,05$				
2) Jüngere + floride MB-Patienten	12	53,3	1,1 / 178,2	0,4 – 463,0
Ältere + florider MB-Patienten	9	56,3	1,2 / 392,2	0,9 – 620,6
Jüngere vs. ältere MB-Patienten $p > 0,05$				
3) Jüngere + therapierte MB-Patienten	40	4,1	1,6 / 10,6	0,3 – 491,4
Ältere + therapierte MB-Patienten	24	6,1	3,6 / 8,6	1,1 – 260,0
Jüngere vs. ältere MB-Patienten $p > 0,05$				

Die Grenze zwischen jüngeren und älteren MB-Patienten wurde anhand des Durchschnittsalters der MB-Gruppe ermittelt. Es lag bei 43 Jahren.

Im Vergleich der jüngeren mit den älteren MB-Patienten stellte sich weder bei der Gesamtheit der MB-Gruppe (1) noch bei der Unterscheidung von floriden (2) und länger als 9 Monate therapierten MB-Patienten (3) ein signifikante TRAK-Konzentrationsunterschied heraus.

5.1 Die Zellen der JP26-Zelllinie

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht an Hand eines Radiorezeptorassays die Detektion von TRAK mittels CHO-Zellen mit exprimierten humanen TSH-Rezeptoren zu optimieren.

Mit den konventionellen Radiorezeptorassays konnten bei Morbus Basedow-Erkrankten in nur 70 % bis 90 % der Seren TSH-Rezeptorantikörper nachgewiesen werden (Meller et al. 2000).

Ausgenommen hiervon sind nur die hohen, nahezu 100 %igen Nachweisergebnisse des neuesten Zweitgenerations-TRAK-Assays, dieser ist jedoch noch nicht überall einsatzbereit (Costagliola et al. 1999).

Die Verwendung eines humanen Antigens (hTSHr) ließ eine Sensitivitätssteigerung bei der TRAK-Bestimmung im Vergleich zu den bisher verfügbaren Routineassays mit Antigen von Schweineschilddrüsenmembranzellen (pTSHr) erwarten (Zöphel et al. 2000).

Die verwendeten JP26-Zellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie ca. 2.000 humane TSH-Rezeptoren an ihrer Oberfläche exprimieren. Dies entspricht den physiologischen Schwankungen der normalen humanen Thyreozyten, die eine TSH-Rezeptorenanzahl von ca. 1.000 – 10.000 hTSHr aufweisen. (Furmaniak & Smith 1991; Hoermann et al. 1995).

Eine Studie von Ludgate et al. (1990) belegt, daß die JP26-Zellen in einem hypotonen Bindungsassay genauso sensitiv sind, wie Ihr Analagon, die humanen Thyreozyten.

Es besteht demnach eine positive Korrelation zwischen den Ergebnissen der JP26-Zellen und den der humanen Thyreozyten.

Der Nachteil der verwendeten JP26-Zelllinie ist die geringe hTSHr-Dichte auf ihrer Zelloberfläche, woraus eine niedrigere Bindungskapazität resultiert, die zu Sensitivitätsverlust im Gegensatz zu anderen JP-Zelllinien führt.

Eine höhere Dichte hat zum Beispiel die JP09-Zelllinie, diese CHO-Zellen exprimieren 34.000 TSHr an ihrer Zelloberfläche (Hoermann et al. 1995).

Auch die JP26/26-Zellen weisen offensichtlich aufgrund einer doppelt so großen hTSHr-Dichte als die JP26-Zellen eine höhere Sensitivität auf (Massart et al. 2000).

Bei dieser Studie von Massart et al. (2000) wurde mit den JP26-Zellen eine Treffer-Rate von nur 53,2% ermittelt. Zellen des JP26/26-Zellklons kamen hierbei auf nahezu 95,7%.

5.2 Die Auswahl der Patientenserien

Die in die Studie aufgenommenen Serien von Probanden wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt.

Die Kontrollgruppe bildeten Typ II Diabetiker. Es handelte sich hierbei um Patienten, die sich regelmäßiger Laborkontrollen in der endokrinologischen Ambulanz unterzogen. Bei ihnen sollten bis dahin keine Schilddrüsenerkrankungen und keine TSH-Rezeptorantikörper nachgewiesen worden sein.

Die erste Hauptgruppe, die Morbus Basedow-Gruppe wurden in 4 Gruppe untergliedert, um eine genaue Einteilung zwischen floriden und behandelten sowie TRAK positiven und TRAK negativen Patienten zu gewährleisten.

Die nächste entscheidende Hauptgruppe war die Hashimoto-Thyreoiditis-Gruppe. Bei ihr sollten ebenfalls TRAK nachgewiesen werden. Hier vermutet man funktionsblockierende TRAK (TBAb). Es sei an dieser Stelle noch einmal erwähnt, daß eine Unterscheidung zwischen funktionsblockierenden und funktionsstimulierenden TRAK mit dem verwendeten Radiorezeptorassay (Bindungsassay) nicht möglich ist.

Zur Feststellung, einer undifferenzierten Antikörperbindung an den TSH-Rezeptor wurden auch Patienten mit anderen, nicht schilddrüsenbedingten, Autoimmunerkrankungen (Diabetes mellitus Typ I und Morbus Addison) ausgewählt.

Eine Gruppe sonstiger, nicht autoimmuner, SD-Erkrankungen wurde zusätzlich in das zu untersuchende Patientenkollektiv aufgenommen. Man ging hierbei davon aus, daß sich keine oder nur wenig erhöhte TRAK-Titer nachweisen ließen.

Auch an Hand aller in dieser Studie getesteter Serien konnte einmal mehr bestätigt werden, daß überwiegend Frauen an Schilddrüsenerkrankungen leiden. Ihr Erkrankungsrisiko ist im Allgemeinen 5-mal höher als das der Männer (Heufelder et al. 1996b).

In der vorliegenden Untersuchung ergab sich ein Verhältnis Frauen zu Männer in der MB-Gruppe von 3,2 zu 1 und in der Hashimoto-Gruppe von 4,6 zu 1.

In diesem Zusammenhang war es auch von Interesse, ob Frauen, insbesondere bei der MB-Erkrankung einen höheren TRAK-Titer aufweisen, als Männer. Dies konnte mittels eines statistischen Vergleichs verneint werden.

Man kann daraus den Schluß ziehen, daß beide Geschlechter mit der gleichen Intensität erkranken.

Das Durchschnittsalter des vorliegenden Patientenguts ist bei den MB-Erkrankten im Vergleich mit den anderen Schilddrüsenerkrankten relativ niedrig.

Es lag bei $43,0 \pm 15,1$ Jahren. Das war das niedrigste Durchschnittsalter aller Gruppen.

Die TRAK-Konzentrationen waren im floriden Stadium, aber auch nach 9 monatiger, thyreostatischer Therapie, bei den jüngeren bis 43-jährigen Patienten, jeweils niedriger als bei den über 43-jährigen Patienten.

Im statistischen Vergleich zwischen beiden Altersgruppen zeigten sich allerdings keine Signifikanzen.

Die HT-Gruppe hatte ein Durchschnittsalter von $50,0 \pm 16,2$ Jahre. Die Kontrollgruppe war mit $55,3 \pm 16,4$ Jahre die älteste Gruppe der vorliegenden Untersuchung.

5.3 Kompetitiver Radioimmunassay

Bei der für den Versuch ausgewählten Methode eines kompetitiven Radioimmunassays wurden Patientenserum und Tracer nahezu zur gleichen Zeit in die Vertiefungen pipettiert, wodurch ein Konkurrieren der beiden Bindungspartner, Patientenserum-TRAK und radioaktiv markiertes TSH, am TSH-Rezeptor ermöglicht wurde.

Aufgrund dieser Vorgaben und der resultierenden niedrigen TRAK-positiven Ergebnisse, läßt sich vermuten, daß das radioaktiv markierte ^{125}I -bTSH (Tracer) eine höhere Affinität zum TSH-Rezeptor hatte, als die TRAK in den Patientenseren. Eine Studie von Kakinuma et al. (1997) belegt, daß die Bindung an TSH-Rezeptoren mit ^{125}I -bTSH 5-mal höher sei als mit ^{125}I -hTSH.

Eine Studie von Hoermann et al. (1995) beschreibt wie hochsensitiv die TSH-Rezeptoren (TSHr) auf die stimulierende Wirkung von bTSH reagieren.

Diese erhöhte Affinität des Tracers für TSHr erklärt unter anderem die doch überwiegend hohe gemessene Radioaktivität (CPM) im vorliegenden Bindungsassay und die somit weniger TRAK-positiven Seren, die eine niedrigere CPM erzielten. Durch eine Erhöhung der Zahl der Waschvorgänge hätte man eine niedrigere Radioaktivität erzielen können. Auf diese Weise wären aber vermutlich mehr CHO-Zellen weggespült worden, bzw. eine zu geringe Radioaktivität zur Differenzierung der Seren übrig geblieben. Dies hätte falsch positive Resultate zur Folge gehabt.

Mittels eines Vorversuchs mit JP02-Kontrollzellen, die keine hTSHr exprimieren, wurde in 6 Versuchsreihen eine unspezifische Bindung von 1,5 % und weniger gemessen. Dies stellte sicher, daß die Anzahl der durchgeführten Waschvorgänge durchaus ausreichend war.

5.4 Auswertung der TRAK-Nachweise

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Bindungsassay stellte folgende TRAK-Nachweise sicher:

1. Im Kontrollkollektiv ergab sich im experimentellen Bindungsassay in nur 5 % der Patientenseren, ein positives Ergebnis. Dies liegt somit noch im Toleranzbereich.
2. In der Morbus Basedow-Gruppe wurden in 30,6 % der Seren als TRAK positiv detektiert. Dies war der größte Anteil TRAK-positiver Seren innerhalb des gesamten Patientenkollektivs. Betrachtet man jedoch die Seren unter Berücksichtigung der MB-Untergruppen, so findet sich der größte Anteil an TRAK-Nachweisen in der floriden / TRAK positiven MB-Gruppe mit 80,0 %.
3. Die Ergebnisse der Hashimoto-Thyreoiditis-Gruppe bestätigten erfreulicherweise die Erwartungen. Es ließen sich TRAK in 17,2 % der Seren nachweisen.
4. In der Gruppe der nicht schilddrüsenbedingten Autoimmunerkrankungen sind keine positiven TRAK-Nachweise ermittelt worden.
5. Die Gruppe der nicht autoimmunen SD-Erkrankungen zeigte mit 15,8 % eine relativ hohe Anzahl positiver TRAK-Nachweise. Hierbei muß die Frage gestellt werden, ob diese Patienten aufgrund einer Koexistenz von funktionsstimulierenden und funktionsblockierenden TRAK eine euthyreote Stoffwechsellage darboten und so ihre möglicherweise doch vorhandene Autoimmunthyreoiditis verschleiert wurde. Es ist denkbar, daß durch diesen Bindungsassay eine entsprechende Krankheitsentwicklung frühzeitig aufgedeckt werden könnte. Man weiß zum Beispiel auch, daß sich durch autonome Adenome Mutationen im TSH-Rezeptor ergeben können. Dies kann zu einem Toleranzdefekt der Thyreozyten führen und letztendlich eine Antikörperbildung durch die Plasmazellen auslösen.

5. Diskussion

Der Vergleich des verwendeten experimentellen Bindungsassays mit dem Routinelabor bei Morbus Basedow-Patienten erbrachte folgende TRAK-Ergebnisse:

1. Es waren von allen untersuchten Seren nur 30,6 % der MB-Patienten positiv gegenüber 43,5 % der positiven Paralleluntersuchungen mit Schweineschilddrüsenzellen.
2. Die im Routinelabor gemessenen TRAK positiven / floriden MB-Patientenserum konnten mit der experimentellen Methode in 80,0 % als positiv ermittelt werden. Diese Gruppe kann gewissermaßen als positive MB-Kontrollgruppe für die weiteren experimentellen Untersuchungen angesehen werden.
3. Betrachtet man die Seren der zwei floriden MB-Gruppen, so ergab sich auch im Routinelabor nur ein positives Ergebnis in 71,4 %, mit dem verwendeten Bindungsassay wiederum 20 % weniger, nämlich 57,1 %.
4. In der länger als 9 Monate thyreostatisch therapierten MB-Gruppe wurden im Routinelabor 34,4 % und in der vorliegenden Studie 21,9 %, also 1/3 weniger, als positiv ermittelt. Allerdings befanden sich noch 2 Patientenserum, das sind 9,1 % der TRAK positiven / länger als 9 Monaten behandelten MB-Gruppe, im Übergangsbereich zwischen 9 – 14 U/L.
Die Häufigkeit positiver Antikörperbefunde nahm offensichtlich bei thyreostatisch behandelten MB-Patienten im Gegensatz zu floriden Erkrankungen deutlich ab. Dies ist eine wichtige Aussage über den Erfolg einer thyreostatischen Therapie.
5. In der behandelten MB-Gruppe mit negativem TRAK im Routinelabor erwiesen sich in der vorliegenden Arbeit immerhin noch 14 % als positiv.

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß die TRAK-Detektion im Routinelabor der Untersuchungsmethode mittels experimentellen Bindungsassays überlegen ist.

Es stellt sich die Frage, ob die Sensitivitätseinbußen durch die Kompliziertheit der einzelnen Untersuchungsabläufe und die damit verbundenen möglichen methodischen und materiellen Fehlerquellen zustande kam.

Sämtliche notwendige Reagenzien und Reaktionsabläufe wurden jedoch immer wieder überprüft, um Fehler des Verfahrens zu minimieren.

Das Ergebnis der untersuchten TRAK negativen, länger als 9 Monate therapierten MB-Patientenseren wirft jedoch mit 14 % positiver Seren folgende Fragen auf:

- Warum erwies sich hier die Methode des Bindungsassay als sensitiver?
- Warum ergaben sich im Gegensatz dazu mittels Bindungsassay keine positiven TRAK-Nachweise in der TRAK negativen, floriden MB-Gruppe des Routinelabors?

Neueste Studien belegen den TRAK-Nachweis des Bindungsassays im Vergleich zum negativen Ergebnis im Routinelabor. Es war bislang unklar, ob die TRAK-negativ gemessenen MB-Patientenseren, eine mangelnde Sensitivität der Nachweismethoden widerspiegeln oder als eine differenziertere Krankheitsintensität einzustufen wären (Mann et al. 1999).

Nach jüngsten Studien von Costagliola et al. (1999) konnte mit dem verbesserten Zweitgenerations-TRAK-Assay (DYNOTest) dank K562 Leukämiezellen, die hTSHr exprimieren, eine Sensitivität von nahezu 100 % erreicht werden. Hierbei erwiesen sich die durch den Erstgenerations-TRAK-Assay mit Schweinemembranrezeptor gemessenen TRAK-negativen Seren als TRAK-positiv. Pathologisch erhöhte AK-Nachweise fanden sich bei praktisch allen floriden, immunogenen Hyperthyreosen, bei über 90 % der behandelten MB-Patienten und bei nahezu 50 % der Patienten in Remission.

Die Frage, warum sich bei der vorliegenden Arbeit keine positiven TRAK-Meßergebnisse für die TRAK negative / floride MB-Gruppe ergab, kann nur mit der geringen Anzahl von 6 Seren und dem damit nicht signifikanten Ergebnis beantwortet werden. Es lag aber keine größere Anzahl an TRAK negativen / floriden MB-Patientenseren vor. Dies spricht dafür, daß diese Konstellation seltener vorkommt bzw. der Routineassay im Hormonlabor der Johann Wolfgang Goethe-Universität eine sehr gute Detektionsrate aufwies.

5.5 Gegenüberstellungen der Gruppen

Beim Vergleich der TRAK-Konzentrationen zeigte sich bei den MB-Patienten eine signifikant höher TRAK-Konzentration als bei den Kontrollpatienten ($p < 0,001$).

Dies bedeutet ein Teilerfolg der vorliegenden Untersuchung die, bei diesen beiden größten Gruppen mit insgesamt 161 Patientenseren, einen signifikanten Unterschied nachweisen sollte.

Die Vergleiche der Untergruppen der MB-Gruppe mit der Kontrollgruppe erbrachten folgende Ergebnisse:

Die TRAK-Konzentration der TRAK positiven / floriden MB-Gruppe war signifikant höher als die der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Die beiden länger als 9 Monaten therapierten MB-Gruppen mit positivem und auch negativem TRAK-Nachweis im Routinelabor hatten ebenfalls eine signifikant höher TRAK-Konzentration ($p < 0,01$) als die Kontrollgruppe.

Nur die Gruppe der floriden / TRAK negativen MB-Gruppe (1B) wies eine etwas niedrigere TRAK-Konzentration als die Kontrollgruppe auf. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

In der MB-Gruppe 1B wurde bei 6 Seren kein positiver TRAK-Titer detektiert.

Im Vergleich der TRAK-Konzentrationen der Hashimoto-Thyreoiditis-Gruppe und der Gruppe der anderen Autoimmunerkrankungen mit der Kontrollgruppe konnten durch den experimentellen Bindungsassay keine signifikanten Konzentrationsunterschiede beim TRAK-Nachweis erbracht werden ($p > 0,05$).

Dagegen zeigten die Patienten mit nicht autoimmunen SD-Erkrankungen einen signifikant höheren TRAK-Titer als die Kontrollpatienten ($p < 0,01$). In dieser Gruppe der nicht autoimmunen SD-Erkrankungen wurden 15,8 % positive TRAK-Nachweise und 4 Seren (10,5 %) mit einer TRAK-Konzentration im Übergangsbereich, also zwischen 9 - 14 U/L detektiert. Insgesamt waren somit relativ hohe TRAK-Werte innerhalb dieser Gruppe gemessen worden, obwohl man einen autoimmunen Prozeß ausgeschlossen hatte.

Es wäre daher empfehlenswert, in Zukunft eine regelmäßige TRAK-Messung bei allen Strumapatienten vorzunehmen, um die Entstehung einer AIT rechtzeitig zu diagnostizieren.

Auch bei einem Vergleich der MB-Gruppe mit der Gruppe der nicht autoimmunen SD-Erkrankungen wurde deutlich, daß beide Gruppen erhöhte TRAK-Konzentrationen enthielten und keine signifikanten Konzentrationsunterschiede aufwiesen.

5. Diskussion

Der Nachweis von TRAK bei 15,8% der Patienten mit nicht autoimmunen SD-Erkrankungen und von 17,2% in der Hashimoto-Thyreoiditis-Gruppe könnte auch bedeuten, daß vorher „versteckte“, funktionsblockierende TSH-Rezeptorantikörper (TBAb) detektiert wurden.

Mehrere Veröffentlichungen stützen diese Vermutung:

So wurden zum Beispiel in der Studie von Meller et al. (2000) belegt, daß funktionsblockierende TRAK im DYNOTest TRAKhuman bei 22,5 % der hypothyreoten Patienten nachzuweisen sind.

Auch in der Studie von Costagliola et al. (1999) wurde mit rekombinaten hTSHr in einem „coated tube“-Prinzip (CT RRA) bei 15 % HT-Patienten ein positiver TBAb-Titer gemessen.

Der einzige, mit der Methode dieser Arbeit vergleichbare Bindungsassay von Kakinuma et al. (1999) detektierte 9,4 % der HT-Patientenseren als positiv.

Es sei an dieser Stelle auch darauf hingewiesen, daß in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. P.M. Schumm-Draeger, in einer Untersuchung von HT-Patienten, mittels eines funktionellen Assays, im gleichen Umfang TBAb nachgewiesen wurden wie in der hier vorliegenden Arbeit, die mit einem Bindungsassay durchgeführt wurde.

Tab. 27: Literaturangaben zu Studien mit ähnlichen TRAK-Nachweisen bei HT-Patienten.

Literaturangabe	Testprinzip	pos. TRAK-Nachweise bei HT-Patienten
Vitti et al. 1996	cAMP-Assay mit CHO-Zellen	8 / 38 → 21,1 %
	cAMP-Assay mit FTRL-5-Zellen	6 / 38 → 15,8 %
Morgenthaler et al. 1998	cAMP-Assay mit JP09-Zellen	4 / 40 → 10,0 %
Costagliola et al. 1999	CT RRA mit Leukämiezellen K562, die hTSHr exprimieren	8 / 54 → 14,8 %
Kakinuma et al. 1999	Bindungsassay mit hTSHr	3 / 32 → 9,4 %
Meller et al. 2000	DYNOTest TRAKhuman	9 / 40 → 22,5 % (hypothyreote Seren insg.)
Meisemann 2002	Bindungsassay mit JP 26-Zellen	5 / 29 → 17,2 %

5. Diskussion

Aufgrund der interessanten Ergebnisse dieses Bindungsassays, wurden die 5 positiven Meßergebnisse der HT-Gruppe und die 6 positiven Seren der Gruppe der nicht autoimmunen SD-Erkrankungen mit den Ergebnissen des Routinelabors (*siehe Tabellenanhang 2*) verglichen.

In der HT-Gruppe waren dort nur 2 von 5 Patientenseren zum Zeitpunkt der Blutentnahme für diese Arbeit, auf TRAK untersucht worden. Diese beiden Patienten hatten einen leicht erhöhten TRAK-Titer von 6 und 11 U/L. Es ist somit nicht ausgeschlossen, daß alle in vorliegender Untersuchung als positiv detektierten HT-Patientenseren auch TRAK im erhöhten Maße im Routinelabor enthalten hätten.

Einer der Patienten hatte bei einer Laboruntersuchung bereits 3 Jahren zuvor einen positiven TRAK-Titer von 296 U/L. 3 der 5 Patienten ließen im Verlauf ihrer Erkrankung eine Veränderung ihrer SD-Funktion erkennen. Dies könnte einerseits bedingt sein durch die Gabe von L-Thyroxin, andererseits aber auch durch Koexistenz heterogener TRAK und deren unterschiedlicher Konzentrationen.

Von den 6 positiv gemessenen Patienten der Gruppe der nicht autoimmunen SD-Erkrankungen waren in der endokrinologischen Ambulanz nur 5 Akten auffindbar.

Nur bei einem der 5 Patienten war gleichzeitig mit dieser Arbeit eine TRAK-Bestimmung im Routinelabor erfolgt, aber dieses Routinemeßergebnis war negativ. Bei 4 der 5 verbliebenden Patienten ließ sich eine wechselnde SD-Funktion dokumentieren. Auch hierbei könnte es sich um funktionsstimulierende bzw. -blockierende TRAK und deren Koexistenz zur Erklärung der variierenden Stoffwechsellage handeln. Allerdings sind therapiebedingte Schwankungen aufgrund Hormonsubstitution oder Thyreostatika, wie Carbimazol, nicht auszuschließen.

5.6 Verlaufskontrolle bei einem Hashimoto- und einem Strumapatienten

Verlaufskontrolle bei einem Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis:

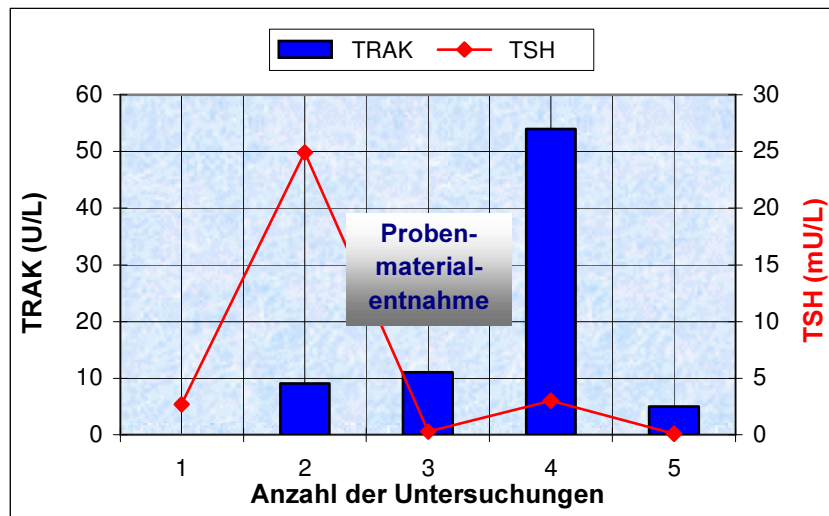


Abb. 21: Verlaufskontrolle von TRAK und TSH bei einem HT-Patienten im Routinelabor
Probenmaterialentnahme: Diese Blutabnahme wurde auch mit dem experimentellen Bindungsassay durchgemessen. Der TRAK-Titer im Bindungsassay war 164 U/L.

In der Abb. 21 wird deutlich, daß sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme für den Versuch, ein Änderung in der Stoffwechsellage, von hypothyreot in hyperthyreot vollzogen hatte. Das war auch der Beginn einer TRAK-Erhöhung, wie sie sich bei der nachfolgenden Untersuchung nach genau 2 Monaten herausstellte.

Verlaufskontrolle bei einem Patienten mit Struma:

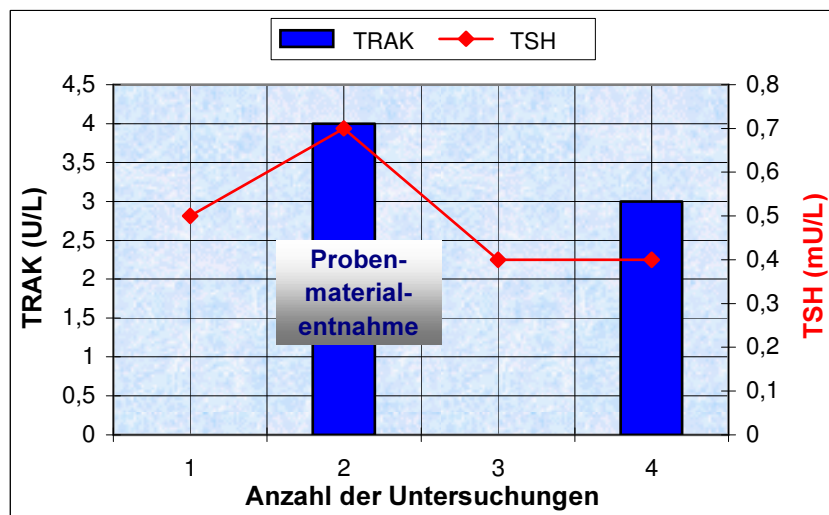


Abb. 22: Verlaufskontrolle von TRAK und TSH bei einem Strumapatienten im Routinelabor
Probenmaterialentnahme: Diese Blutabnahme wurde auch mit dem experimentellen Bindungsassay durchgemessen. Der TRAK-Titer im Bindungsassay war 37 U/L.

Bei dem nicht autoimmunen Schilddrüsenpatienten zeigte sich immer eine konstante euthyreote Stoffwechsellage. Auch der TRAK-Titer lag mit 0 bis 4 U/L im negativen Bereich. Diese Laborwerte deckten sich nicht mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit.

5.7 Verlaufskontrolle bei Morbus Basedow-Erkrankung

Man weiß seit kurzem, daß die thyreostatisch behandelten MB-Patienten im Laufe Ihrer Therapie eine Antikörperumwandlung von funktionsstimulierenden in funktionsblockierende TRAK erfahren und damit von einer Hyperthyreose in eine Hypothyreose übergehen können.

Diese Erkenntnis könnte den nicht signifikanten TRAK-Konzentrationsvergleich der floriden und der länger als 9 Monate behandelten MB-Gruppen im Bindungsassay erklären.

Das Ergebnis lag wahrscheinlich einerseits an dem nur in 57,1% nachgewiesenen positiven TRAK der floriden MB-Gruppen, andererseits aber auch an den häufigen Rezidivraten der Langzeittherapierten.

Die meisten Autoren empfehlen nämlich das Thyreostatikum bereits nach 12 bis 24 Monaten auszuschleichen. Danach erleidet mindestens die Hälfte der Patienten, mehrheitlich im ersten Jahr nach Aussetzen der Behandlung, ein Rezidiv der Hyperthyreose (Davies et al. 1998).

Andere Studien besagen, daß nur bei 30 bis 60 % der MB-Patienten eine Remission der Erkrankung nach thyreostatischer Langzeittherapie eintritt (Schumm-Draeger 1999).

Es wäre daher sehr hilfreich, Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko bereits vor Therapiebeginn identifizieren zu können, um sie dann eher einer ablativen oder einer Radiojodtherapie zuzuführen. Durch eine damit verbundene Reduktion des Antigenpools und des thyreoidalen Zielgewebes für TSH-Rezeptorantikörper kann der extrathyreoidale Immunprozess für den MB-Patienten günstig beeinflußt werden. Bei korrekter Durchführung der operativen SD-Resektion oder der Radiojodtherapie liegt die Erfolgsquote bei 80-100 % (Heufelder 2001).

Als prognostisch ungünstig haben sich eine lange Krankheitsdauer, große Struma, schwere Hyperthyreose und anhaltend hohe TRAK-Werte während der Thyreostatikatherapie erwiesen (Flückiger 1995).

Viele Arbeiten weisen auch auf einen signifikant niedrigeren Titer stimulierender TRAK im Gesamtkollektiv der Patienten in Remission hin gegenüber hoher TRAK-Titer bei rezidivierenden oder persistierenden Fällen (Rink et al. 1998).

Dennoch gilt dank einer Metaanalyse von Feldt-Rasmussen et al. (1994) als belegt, daß anhand des absoluten TRAK-Spiegels im individuellen Fall, keine eindeutige prädiktive Aussage möglich ist.

5. Diskussion

Auch in der Studie von Rink et al. (1998) fand sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe des TRAK-Titers und dem Grad der Funktionsstörung. Bei der Auswertung der individuellen Verläufe stellte man jedoch fest, daß in 94 % aller Fälle mit spontaner Remission ein Abfall des TRAK-Titers auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes nachweisbar war.

Als Empfehlung für die Morbus Basedow Behandlung sollte deshalb gelten:

Der Antikörpertiter eines thyreostatisch behandelten Morbus Basedow sollte innerhalb eines Jahres in den Referenzbereich abfallen. Anhaltend hohe Titer weisen auf eine Persistenz des Autoimmunprozesses und eine erhöhte Rezidivgefahr hin (Dietlein et al. 1999).

Es ist denkbar, daß gerade die TRAK positiven, in vorliegender Untersuchung zu 36 % als positiv detektierten, MB-Langzeittherapierten (Gruppe 1C) besonders gefährdet sind. Bei diesen Patientenseren war offenbar die Affinität der TRAK noch hoch genug, um den TSH-Tracer verdrängen zu können. Auch im Routinelabor zeigten diese Seren, wie im Bindungsassay, einen sehr hohen TRAK-Titer (25 – 61 U/L).

Im Vergleich zwischen den durch das Routinelabor bestimmten TRAK positiven und TRAK negativen MB-Gruppen ergab sich auch im angewendeten Bindungsassay ein signifikanter Konzentrationsunterschied. Die TRAK positiven MB-Gruppen erbrachten einen sehr viel höheren TRAK-Titer als die TRAK negativen MB-Gruppen.

Diese Ergebnisse belegten noch einmal, daß sich die Ergebnisse dieser Arbeit denen des Routinelabors angleichen.

5.8 Analyse der Fehlerquellen

Erklärungsansatz für mögliche Fehlerquellen.

- Im Vordergrund hatte sich die kompetitive Hemmung zum TRAK-Nachweis bei MB-Patienten als ungeeigneter, jedoch bei HT-Patienten und Strumapatienten als geeigneter erwiesen. In der Konkurrenz der Patientenserumantikörper mit dem Tracer um die gemeinsamen TSH-Bindungsstellen hat sich der Tracer wahrscheinlich zum Nachteil der funktionsstimulierenden TRAK durchgesetzt und somit weniger Bindungsmöglichkeiten für die TSH-Rezeptorantikörper frei gelassen. Der Tracer hatte möglicherweise eine für diesen Versuch zu hohe Affinität, sodaß er die Patientenantikörper von den TSH-Bindungsstellen verdrängen konnte. Daraus ergaben sich wohl eine meßbar zu hohe Radioaktivität und ein zu niedriges positives TRAK-Ergebnis.
- Es stellte sich weiter heraus, daß die JP26-Zellen eine zu niedrige humane TSH-Rezeptorendichte für TRAK-Nachweise bei MB-Patienten aufwies. Bei HT-Patienten hatte sich diese Zelllinie zum TRAK-Nachweis bewährt.
- Während des dreitägigen Versuchs konnte ein geringes Zellwachstum nicht ausgeschlossen werden.
- Während des Auftauvorganges sowie am 2. und 3. Versuchstag könnte eine Denaturierung der TSH-Rezeptorantikörper möglich gewesen sein.
- Die verschiedenen Waschschriffe beinhalten Fehlerquellen, so vor allem das Wegspülen der CHO-Zellen vom Boden der Wellplatten. Dank des Vorversuchs zur Bestimmung der spezifischen Bindung konnte diese Fehlerquelle durch die Optimierung der Waschvorgänge weitgehend minimiert werden.

Für ein Routinelabor ist die durchgeführte Versuchsreihe eher ungeeignet und zu komplex, zumal die Spezifität und Sensitivität der TRAK-Nachweise bei Morbus Basedow mit dem angewendeten Bindungsassay nicht höher lagen als im herkömmlichen Labor.

Die Ergebnisse bei Hashimoto-Thyreoiditis und den nicht autoimmunen SD-Erkrankungen waren allerdings erfreulich und geben Anlaß zum Umdenken. Es zeichnet sich ab, daß die TRAK-Bestimmung auch bei diesen Patientenkollektiven eine zunehmendere diagnostische Bedeutung spielen wird.

6.1 Deutsche Zusammenfassung

Einleitung und Zielsetzung:

In der vorliegenden Arbeit sollte der Nachweis von TSH-Rezeptorantikörpern mittels eines Bindungsassays und JP26- Zellen erbracht werden.

TSH-Rezeptorantikörper (TRAK) werden in Seren von vielen Patienten mit einer Autoimmunthyreoiditis entdeckt. Der in dieser Arbeit ausgewählte Radioimmunassay verwendet chinesische Hamster Ovarienzellen (CHO-Zellen), die humanen TSH-Rezeptoren exprimieren. Der Bindungsassay basiert auf dem Prinzip der Verdrängung von radioaktiv markiertem bovinem-TSH (Tracer) durch vorhandene TSH-Rezeptorantikörper im Patientenserum. Dabei ist es nicht entscheidend, ob es sich um funktionsblockierende oder funktionsstimulierende TRAK handelt.

Der verwendete Bindungsassay gilt als einer der sensitivsten, kompetitiven Bindungsassays für die Detektion von TRAK und kann deshalb ein relevanter Verlaufsmarker bei Patienten mit Morbus Basedow und Hashimoto sein.

Material und Methode:

Die JP26-Zellen wurden ausgewählt, weil sie sich mit einer Anzahl von 2.000 TSH-Rezeptoren an ihrer Oberfläche gut mit der TSH-Rezeptordichte humaner Thyrozyten vergleichen lassen.

Die verwendeten Patientenseren wurden unterteilt in 5 Gruppen:

Gruppe 1: Morbus Basedow (n = 85), Gruppe 2: Kontrollgruppe (n = 76), Gruppe 3: Hashimoto-Thyreoiditis (n = 29), Gruppe 4: Andere Autoimmunerkrankungen (n = 14), Gruppe 5: Nicht-autoimmune Schilddrüsenerkrankungen (n = 38).

Die Morbus Basedow-Gruppe wurde zusätzlich untergliedert in floride und länger als 9 Monate behandelte Gruppen sowie in TRAK positive und TRAK negative Gruppen:

Gruppe 1A: floride und positive TRAK, Gruppe 1B: floride und negative TRAK,

Gruppe 1C: behandelt und positive TRAK, Gruppe 1D: behandelt und negative TRAK.

Die kultivierten JP26-Zellen wurden mit einer Zellanzahl von 300.000 Zellen / Well zusammen mit IMDM-Medium in 24-Lochplatten aufgeteilt. Am nächsten Tag wurden die in 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C inkubierten Lochplatten mit PBS gewaschen. Danach wurde 150 µl modifizierter KRB-Puffer, 50 µl Serum und 50 µl 125 I-bTSH in jede Vertiefung pipettiert. Die bestückten Lochplatten wurden diesmal bei 4°C über 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die JP26-Zellen mit 0,5 ml 4 °C kalten KRB-Puffers gewaschen und mit 0,5 ml 1 N Natronlauge (NaOH) gelöst. Die verbliebene Radioaktivität wurde zuletzt im gamma-Counter gemessen.

6. Zusammenfassung

Ergebnisse:

Gruppe 1: 31 %, Gruppe 2: 5 %, Gruppe 3: 17 %, Gruppe 4: 0 %, Gruppe 5: 16 %.
Gruppe 1A: 80 %, Gruppe 1B: 0 %, Gruppe 1C: 36 %, Gruppe 1D: 14 %.

Schlußfolgerung:

Die Sensitivität der TRAK-Nachweise in der MB-Gruppe war entgegen aller Erwartungen niedriger als im Routinelabor. Dies lag vermutlich auch an einer sehr hohen Affinität des verwendeten bovinen-TSH-Tracers für TSH-Rezeptoren.

Es fanden sich jedoch bemerkenswerte Ergebnisse in der Gruppe der Hashimoto-Thyreoiditis und der nicht-autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen. In beiden Gruppen konnten in mehreren Seren (17 bzw. 16 %) positive TRAK-Werte nachgewiesen werden. Daraus läßt sich schließen, daß die in vorliegender Arbeit angewendete Untersuchungsmethode eine höhere Sensitivität zum Nachweis von TRAK bei Hashimoto-Thyreoiditis besitzt.

Gewichtige und neueste Studien, sowie Ergebnisse von Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe, die sich mit zwei unterschiedlichen Assays zur Unterscheidung funktionsblockierender und funktionsstimulierender TRAK befaßt haben, stützen diese Aussage.

Letztlich liegt der Schluß nahe, daß es sich bei den in diesen beiden Gruppen nachgewiesenen TSH-Rezeptorantikörpern, um überwiegend funktionsblockierende TRAK handelt.

Dagegen erscheint zum TRAK-Nachweis, insbesondere funktionsstimulierender TRAK bei Morbus Basedow Patienten, die Anwendung einer auf kompetitiver Hemmung beruhende Untersuchungsmethode nur unzureichend sensitiv.

Das in vorliegender Arbeit angewendete Verfahren eignet sich offenbar vergleichsweise besser zur Detektion funktionsblockierenden TRAK.

6.2 Englische Zusammenfassung (Summary)

Introduction and objective:

The objective of this work is to prove the presence of TSH-receptor antibodies by means of a binding inhibition assay and JP26 cells. TSH-receptor antibodies (TRAK) can be found in serums by many patients with autoimmune thyroid disease.

The Radio immune binding assay selected in this work used Chinese hamsters ovary cells (CHO cells), which express the human TSH receptors.

The Binding assay is based on the principle of the displacement of radioactively marked bovine TSH (tracer) by existing TSH-receptor antibodies in the patient serum. It is not crucial whether it concerns function-blocking or function-stimulating TRAK. The binding assay used here is one of the most sensitive competitive TSH binding inhibition assays for the detection of TRAK and can be a reliable process marker in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis.

Material and methods:

The JP26-cells were selected, because their TSH-receptor density with a number of 2.000 TSH-receptors on their surface is similar to the TSH-receptor density of human thyrocytes.

The used patient serums were divided into 5 groups: Group 1: Graves' disease (n=85), group 2: Control's group (n=76), group 3: Hashimoto's thyroiditis (n=29), group 4: Other autoimmune illnesses (n=14), group 5: non-autoimmune thyroid illnesses (n=38). The Graves' disease group furthermore was subdivided into florid groups and groups treated longer than 9 months, as well as in TRAK positive and TRAK negative groups: Group 1A: florid and positive TRAK, group 1B: florid and negative TRAK, group 1C: treated and positive TRAK, group 1D: treated and negative TRAK.

The cultivated JP26-cells 300.000 cells/well have been divided with IMDM-medium into 24-well-plates. On the next day the incubated well-plates under an atmosphere of 5 % CO₂ at 37°C were washed with PBS. Afterwards 150 µl modified KRB-buffer, 50 µl serum and 50 µl 125 I-bTSH was pipetted into each well.

The equipped perforated well-plates were incubated this time with 4°C over 24 hours.

Afterwards the JP26-cells were washed with 0.5 ml 4 °C cold KRB buffer and solved with 0.5 ml 1 N caustic soda liquid (NaOH). In the end the remaining radioactivity was measured in the gamma-Counter.

6. Zusammenfassung

Results:

Group 1: 31%, group 2: 5%, group 3: 17%, group 4: 0%, group 5: 16%.

Group 1A: 80%, group 1B: 0%, group 1C: 36%, group 1D: 14%.

Conclusion:

Contrary to expectations the sensitivity of TRAK-proof in the Graves' disease group was lower than in the routine laboratory. A reason for this could be a very high affinity of the used bovine TSH-Tracers for TSH-receptors.

However, there were remarkable results in the group of Hashimoto's thyroiditis and non-autoimmune thyroid disease. In both groups it was possible to detect several serums (17 respectively 16 %) of positive TRAK-value.

The conclusion of this scientific work is that the used method of investigation shows a higher sensitivity of proving TRAK on Hashimoto's disease. Authoritative and new studies in the same field, which also deal with function blocking and function stimulating TRAK have results supporting the statement in this scientific work.

The expectation is that the proven TSH-receptor antibodies are function blocking TRAK.

For TRAK-proof, especially for proof of function stimulating TSH-receptor antibodies on patients with Grave's disease, it seems that the use of competitive inhibition is insufficiently sensitive based on the method of investigation.

Opposed to that the method used here seems to be better for detection of function blocking TRAK.

7. Literaturverzeichnis

Akamizu T., Kohn LD., Hiratani H., Saijo M., Tahara K., Nakao K.:

Hashimoto's Thyroiditis with Heterogeneous Antithyrotropin Receptor Antibodies: Unique Epitopes may Contribute to the Regulation of Thyroid Function by the Antibodies.

J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 2116-2121

Badenhoop K., Donner H., Braun J., Siegmund T., Rau H., Usadel KH.:

Genetic markers in diagnosis and prediction of relapse in Graves' disease.

Exp Clin Endocrinol Diabetes 1997; 104: Suppl. 4: 98-100

Badenhoop K., Siegmund T., Mößeler S., Wenske I., Donner H., Usadel KH.:

Genetische Risikomarker des Morbus Basedow

ZaeFQ 1999; 93: Suppl. I: 11-15

Bahn RS.:

Understanding the Immunology of Graves' Ophthalmopathy

Endocrinol Metab Clin North Am 2000; 29: 357-369

Bahn RS., Dutton CM., Heufelder AE, Sarkar G.:

A genomic markers in the extracellular domain of the thyrotropin receptor in patients with Graves' ophthalmopathy.

J Clin Endocrinol Metab 1994; 78: 256-260

Barbesino G., Chiovato L.:

The Genetics of Hashimoto's Disease

Endocrinol Metab Clin North Am 2000; 29: 287-296

Brabant G.

Pulsatile und zirkadiane TSH-Sekretion

Internist 1998; 39: 619-622

Costagliola S., Morgenthaler NG., Hoermann R., Badenhoop K., Struck J., Freitag D., Poertl S., Weglöhner W., Hollidt JM., Quadbeck B., Dumont JE., Schumm-Dreager PM., Bergmann A., Mann K., Vassart G., Usadel KH.:

Second Generation Assay for Thyrotropin Receptor Antibodies has superior Diagnostic Sensitivity for Graves' Disease.

J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 90-97

7. Literaturverzeichnis

Czarnocka B., Ruf J., Ferrand M., Carayon P., Lissitzky S.:

Purification of the human thyroid peroxidase and identification as the microsomal antigen in thyroid diseases.

FEBS Letters 1985; 109: 147-152

Davies TF., Roti E., Braverman LE., Degroot LJ.:

Therapeutic Controversy

J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 3777-3785

Derwahl M.:

TSH-Rezeptor-Mutationen in der Pathogenese des autonomen Adenoms der multifokalen Autonomie und der angeborenen Hyperthyreose.

ZaeFQ 1999; 93; Suppl. I: 25-28

Dietlein M., Dressler K., Joseph B., Leisner E., Moser E., Reiners C., Rendl J., Schicha H.,

Schober O.:

Leitfaden zur Schilddrüsendiagnostik.

Nuklearmedizin 1999; 38: 215-218

Ehrenthal W.:

Autoantikörper der Schilddrüse

Zentrallabor Uni-Mainz, 2000

Feldt-Rasmussen U., Schleusener H., Carayon P.:

Meta-analysis evaluation of the impact of thyrotropin receptor antibodies on long-term remission after medical therapy of Graves' disease.

J Clin Endocrinol Metab 1994; 78: 98-102

Filetti S., Foti D., Costante G., Rapoport B.:

Recombinante Human Thyrotropin (TSH) Receptor in a Radioreceptor Assay for the Measurement of TSH Receptor Autoantibodies.

J Clin Endocrinol Metab 1991; 72: 1096-1101

Flückiger A.:

Thyreostatika

Infomed-Verlags-AG 1996; pharma-kritik Jahrgang 17, Nr. 10

Furmaniak J., Rees Smith R.B.:

Structur of the TSH Receptor

Exp Clin Endocrinol 1991; 97: 160-164

7. Literaturverzeichnis

Gerding M.N., van der Meer J.W., Broenink M., Wiersinga W.M., Prummel M.F.:

Association of thyrotrophin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy.
Clin Endocrinol 2000; 52: 267-71

Grußendorf M.:

Praxisbezogene Schilddrüsendiagnostik: Labormedizinische Untersuchungen
Med Welt 2001; 52: 24-27

Heufelder AE., Schworm D., Hofbauer, LC.:

Die endokrine Orbitopathie: Aktueller Stand zur Pathogenese, Diagnostik und Therapie
Dtsch Ärzteblatt 93 1996a; 20: 1336-1342

Heufelder E., Hofbauer C., Hörmann R.:

Morbus Basedow: Neuester Stand zur Pathogenese, Diagnostik und Therapie
Dtsch Ärzteblatt 93 1996b; 42: 2690-2696

Heufelder AE., Spitzweg Ch.

Pathogenese der immunogenen Hyperthyreose und endokrinen Orbitopathie
Internist 1998; 39: 599-606

Heufelder AE., Hofbauer LC.:

Die Thyreoiditiden: Aktueller Stand der Pathogenese, Diagnostik und Therapie.
Dtsch Ärzteblatt 95 1998; 9: 466-476

Heufelder AE.:

Funktionelle Autonomie und Immunhyperthyreose
Der Allgemeinarzt 2001; 23: 194-196

Hoermann R.

Rekombinantes TSH und TSH-Analoga
Internist 1998; 39: 607-609

Hoermann R., Poerlt S., Liss I., Amir SM., Mann K.:

Variation in the Thyrotropic Activity of Human Chorionic Gonadotropin in Chinese Hamster Ovary Cells arises from Differential Expression of the Human Thyrotropin Receptor and Microheterogeneity of the Hormone.
J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 1605-1610

7. Literaturverzeichnis

Kakinuma A., Chazenbalk GD., Jaume J.C., Rapoport B., Mc Lachlan SM.:

The Human Thyrotropin (TSH) Receptor in a TSH Binding Inhibition Assay for TRAK.

J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 2129-2134

Kakinuma A., Morimoto I., Kuroda T., Eto S., McLachlan SM., Rapoport B.:

Comparison of recombinant human thyrotropin receptors versus porcine thyrotropin receptor in the thyrotropin binding inhibition assay for thyrotropin receptor autoantibodies.

Thyroid 1999; 9: 849-855

Kim WB., Chung HK., Park YJ., Park DJ., Tahara K., Kohn LD., Cho BY.:

The prevalence and clinical significance of blocking thyrotropin receptor antibodies in untreated hyperthyroid Graves' disease.

Thyroid 2000; 10: 579-86

Ludgate M., Perret J., Parmentier M., Gerard C., Libert F., Dumont JE, Vassart G.:

Use of the recombinant human thyrotropin receptor (TSH-R) expressed in mammalian cell lines to assay TSH-R-autoantibodies.

Mol Cell Endocrinol 1990; 73: R13-R18

Mann K., Saller B., Hörmann R.:

Clinical Relevance of Immunological Markers in Graves' Disease

Exp Clin Endocrinol 1991; 97: 224-230

Mann K.:

Diagnostik und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen. Empfehlung zur Qualitätssicherung

Internist 1997; 38: 177-185

Mann K., Gieseler R., Hörmann R.:

Ätiopathogenese des Morbus Basedow

ZaeFQ 1999; 93: Suppl. I: 29-34

Mann K.:

Praxisbezogene Schilddrüsendiagnostik: Klinische Befunde

Med Welt 2001; 52: 18-23

Massart C., Gibassier J., Vérité F., Fergelot P., Maugeudre D.:

Use of Chinese Hamster ovary cell lines transfected with cloned human thyrotropin receptor for the measurement of thyroid stimulating antibodies: advantages and difficulties.

Clin Chim Acta 2000; 291: 67-81

7. Literaturverzeichnis

Meller J., Schreivogel I., Bergmann A., Morgenthaler M., Hübner M., Becker W.:

Klinische Implikation eines neuen TSH-Rezeptor-Antikörper-Assay (DYNOfest TRAKhuman) bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen.

Nuklearmedizin 2000; 5: 14-18

Meng W.:

Carl Adolph von Basedow- Zu seinem 200. Geburtstag

ZaeFQ 1999; 93: Suppl. I: 5-10

Minich W.B., Behr M., Loos U.:

Expression of a functional tagged human thyrotropin receptor in HeLa cells using recombinant vaccinia virus.

Exp Clin Endocrinol 1997; 105: 282-290

Morgenthal NG., Pampel I., Aust G., Seissler J., Scherbaum WA.:

Application of a Bioassay with CHO Cells for the Routine Detection of Stimulating and Blocking Autoantibodies to the TSH-Receptor

Horm Metab Res 1998; 30: 162-168

Nilni EA., Sevarino KA.:

The Biology of pro-Thyrotropin-Releasing Hormone-Derived Peptides

Endocr Rev 1999; 20: 599-648

Orgiazzi, J.:

Anti-TSH Receptor Antibodies in clinical practice.

Endocrinol Metab Clin North Am 2000; 29: 339-355

Perret J., Ludgate M., Libert F., Gerard C., Dumont JE., Vassart G., Parmentier M.:

Stable expression of the human TSH receptor in CHO cells and characterization of differentially expressing clones.

Biochem Biophys Res Commun 1990; 171: 1044-1050

Pfannenstiel P., Hotze L.A., Saller B.:

Schilddrüsenerkrankheiten: Diagnose und Therapie.

BMV 1999; 4. Auflage, Berlin

Pinchera A., Mariotti S., Vitti P., Marcocci C., Chiovato L., Fenzi G., Santini F.:

Thyroid autoantigens and their relevance in the pathogenesis of thyroid autoimmunity.

Biochemie 1989; 71: 237-245

7. Literaturverzeichnis

Poertl S., Liss I., Mann K., Hörmann R.:

Crude urinary human chorionic gonadotropin contains variant forms of HCG with low sialic acid content that exhibit an increased thyrotropic activity in CHO cells expressing the human TSH Receptor.

Exp Clin Endocrinol 1995; 103: 168-174

Rapoport B.:

Thyroid-Specific Antigen in Basedow's Disease.

Exp Clin Endocrinol 1991; 97: 147-152

Rink Th., Holle LH., Schroth HJ., Garth H.:

Individuelle Verlaufskontrolle der TSH-Rezeptor-Antikörper-Titer zur Einschätzung der Prognose eines Morbus Basedow.

Nuklearmedizin 1998; 37: 90-94

Schumm-Draeger PM.:

Thyreoiditis: Formen, Diagnostik, Therapie

Internist 1998; 39: 594-598

Schumm-Draeger PM.:

Hyperthyreose Typ Morbus Basedow - Medikamentöse Therapie

ZaeFQ 1999; 93 (Suppl. I): 41-45

Tonacchera M., Agretti P., Ceccarini G., Lenza R., Refetoff S., Santini F., Pinchera A., Chiovato L., Vitti P.:

Autoantibodies from patients with autoimmune thyroid disease do not interfere with the activity of the human iodide symporter gene stably transfected in CHO cells.

Eur J Endocrinol 2001; 144: 611-618

Velu TJ., Beguinot L., Vass WC., Zhang K., Pastan I., Lowy DR.

Retroviruses expressing different levels of the normal epidermal growth factor receptor: biological properties and new bioassay.

J Cell Biochem 1989; 39: 153-166

Vitti P., Chiovato L., Fiore E., Mammoli C., Rocchi R., Pinchera A.:

Use of cells expressing the human thyrotropin (TSH) receptor for the measurement of thyroid stimulating and TSH-blocking antibodies.

Acta Med Austriaca 1996; 23: 52-56

7. Literaturverzeichnis

Wallaschofski H., Kaczmarek M., Miehle K., Hentschel B., Paschke R.:

Differences between thyrotropin receptor antibody bioactivity and inhibition of ¹²⁵I-bovine thyrotropin binding.

Thyroid 2000; 10: 897-907

Yokoyama N., Taurog A.:

Procine thyroid peroxidase: Relationship between the native enzyme and an active, highly purified tryptic fragment.

Mol Endocrinol 1988; 2: 838-844

Zakarija M., McKenzie JM.:

Autoantibodies to the TSH Receptor.

Exp Clin Endocrinol 1991; 97: 165-169

Zöphel K., Wunderlich G., Koch R., Franke WG.:

Die Bestimmung von Thyreotropin-Rezeptor-Antikörpern (TRAK) mit einem Assay der zweiten Generation bei Patienten mit Morbus Basedow.

Nuklearmedizin 2000; 39: 113-120

Tabellenanhang 1

							Versuchsergebnisse (TRAK)			
Anz.	Name	Alter	F/M	TRAK	EO	Gruppe	CPM	B/T%	in U/L	pos./neg.
1	Ne., Re.	32	F	40		1A	1239	9,53%	64,55	pos.
2	Sch., lv.	41	F	50		1A	930	9,30%	69,15	pos.
3	Vi., Li.	27	F	22	+	1A	979	7,53%	115,33	pos.
4	Bo., Bi.	31	F	39	-	1A	280	2,15%	463,01	pos.
5	Kr., Im.	49	F	26	(+)	1A	442	3,40%	341,85	pos.
6	Ho., Ma.	78	F	26		1A	2230	17,32%	4,20	neg.
7	Hä., Al.	80	F	45		1A	301	2,34%	442,45	pos.
8	Bi., Ch.	50	F	55	+	1A	124	0,90%	620,62	pos.
9	Du., Ir	26	F	29	-	1A	660	5,13%	220,51	pos.
10	Oe., Me.	69	F	57	-	1A	2556	19,85%	1,38	neg.
11	Ta., Be.	52	F	≥15		1A	1298	9,98%	56,33	pos.
12	Mo., Ch.	32	F	25	-	1A	1331	10,24%	42,02	pos.
13	Vo., Ul.	45	F	≥15		1A	979	7,53%	115,33	pos.
14	Pl., Mi.	31	M	35	+	1A	2297	17,84%	3,38	neg.
15	Mü., Uw.	23	M	56		1A	717	5,52%	199,12	pos.
										pos. sind
Die durchschnittliche TRAK-Konzentration der Gruppe 1A ist 183,95 U/L										80,00%
1	Fr., Ed.	38	F	5		1B	2671	20,75%	0,89	neg.
2	Pe., Fr.	35	F	6		1B	2874	22,32%	0,39	neg.
3	Ko., Ja.	39	F	5		1B	2817	21,88%	0,50	neg.
4	Es., Ma.	49	F	12		1B	2616	20,32%	1,10	neg.
5	Da., B.	39	F	14		1B	2521	19,58%	1,56	neg.
6	Ke., We	53	M	7		1B	2678	20,80%	0,87	neg.
										pos. sind
Die durchschnittliche TRAK-Konzentration der Gruppe 1B ist 0,89 U/L										0,00%
1	Vo., Su.	23	F	61	+	1C	1489	13,54%	17,63	pos.
2	Kl., El.	57	F	15		1C	2322	18,04%	3,10	neg.
3	Sp., Is.	31	F	18		1C	1668	13,91%	15,48	pos.
4	St., Ed.	45	F	55		1C	2341	18,18%	2,92	neg.
5	Ka., Ga.	39	F	15		1C	2605	20,23%	1,15	neg.
6	Ko., Ge.	67	F	29		1C	2114	16,42%	6,04	neg.
7	Fl., Br.	57	F	21		1C	2580	20,04%	1,26	neg.
8	Dü., He.	69	F	52		1C	2391	18,57%	2,46	neg.
9	Hä., Al.	80	F	34		1C	594	4,61%	252,17	pos.
10	Se., Ma.	25	F	≥15		1C	2404	18,60%	2,43	neg.
11	Bo., Si.	35	F	25		1C	1737	13,97%	15,15	pos.
12	Kl., El.	58	F	15		1C	2132	15,50%	8,64	neg.
13	Vo., Su.	23	F	61	+	1C	202	1,90%	491,35	pos.
14	Mü., In.	68	F	57		1C	1752	14,00%	15,00	pos.
15	De., Ca.	34	F	≥15	+	1C	2984	21,70%	0,55	neg.
16	Sa., Gü.	24	F	≥15		1C	2319	18,01%	3,14	neg.
17	Bi., By.	37	F	44	-	1C	2303	16,74%	5,32	neg.
18	Ta., Be.	25	M	≥15		1C	1684	13,08%	20,68	pos.
19	Ka., Is.	50	M	≥15	+	1C	578	4,49%	260,02	pos.
20	He., Uw.	27	M	21		1C	2269	17,45%	3,98	neg.
21	No., Wa.	64	M	15	+	1C	2191	15,93%	7,32	neg.
22	Su., Ko.	69	M	25		1C	2159	16,77%	5,26	neg.
										pos. sind
Die durchschnittliche TRAK-Konzentration der Gruppe 1C ist 51,87 U/L										36,36%

Tabellenanhang 1

							Versuchsergebnisse (TRAK)			
Anz.	Name	Alter	F/M	TRAK	EO	Gruppe	CPM	B/T%	in U/L	pos./neg.
1	Kn., Ma.	33	F	1		1D	1512	13,75%	16,38	pos.
2	Mn., Ga.	42	F	2		1D	1773	16,12%	6,80	neg.
3	Sch., Br.	54	F	<15		1D	1547	13,97%	15,15	pos.
4	Ko., An.	79	F	0		1D	1637	14,89%	10,85	neg.-pos.
5	Ka., Ir.	40	F	3		1D	2004	18,22%	2,87	neg.
6	He., Ma.	61	F	2		1D	1807	16,43%	6,02	neg.
7	Ni., Ga.	41	F	6		1D	1861	16,92%	4,95	neg.
8	Ma., Cl.	44	F	3		1D	1781	16,20%	6,59	neg.
9	Va., An.	35	F	0		1D	1909	17,36%	4,13	neg.
10	Sch., Mo.	45	F	<15		1D	1805	16,41%	6,07	neg.
11	Da., Ir.	41	F	9		1D	1509	14,00%	15,00	pos.
12	Ba., Co.	42	F	1		1D	1804	16,10%	6,85	neg.
13	Gi., Ge.	59	F	8		1D	2327	16,92%	4,95	neg.
14	Ba., Ma.	53	F	?		1D	2231	16,22%	6,54	neg.
15	Je., Ca.	32	F	0		1D	2684	19,51%	1,61	neg.
16	Ma., Da.	29	F	0		1D	3169	23,04%	0,26	neg.
17	Ko., Sa.	30	F	12	+	1D	2184	15,88%	7,47	neg.
18	Se., Ma.	32	F	8	+	1D	2517	18,30%	2,77	neg.
19	He., Fa.	31	F	7	-	1D	2652	19,28%	1,79	neg.
20	Re., Ke.	36	F	<15	+	1D	2853	20,74%	0,90	neg.
21	De., El.	32	F	0		1D	1914	17,40%	4,06	neg.
22	Me., Ma	31	F	0		1D	1836	16,70%	5,41	neg.
23	Ka., Ga.	40	F	9		1D	2060	18,73%	2,30	neg.
24	Me., Ma	31	F	3		1D	1861	16,92%	4,95	neg.
25	Po., Mo.	36	F	5		1D	1316	11,97%	30,01	pos.
26	Ca., An.	35	F	13		1D	2077	18,89%	2,14	neg.
27	Ki., Na.	34	F	11		1D	2564	19,92%	1,33	neg.
28	Wa., La.	41	F	<15		1D	2560	19,89%	1,35	neg.
29	Lo., Ma.	71	F	<15		1D	2608	20,26%	1,13	neg.
30	Ca., An.	35	F	13		1D	2569	19,95%	1,31	neg.
31	Ta., Be.	26	M	0		1D	2700	19,63%	1,53	neg.
32	Mi., Ho.	56	M	14		1D	1834	16,68%	5,45	neg.
33	Ba., Gü.	57	M	2		1D	1755	15,40%	9,00	neg.-pos.
34	Ni., Ra.	20	M	11		1D	1553	13,92%	15,42	pos.
35	Pi., Gu.	34	M	0		1D	1834	16,68%	5,45	neg.
36	Ha., Ma.	52	M	8	+	1D	2538	18,45%	2,60	neg.
37	Fo., Ro.	31	M	9		1D	2257	16,41%	6,07	neg.
38	Za., Ca.	43	M	5	+	1D	1267	11,52%	34,75	pos.
39	Ka., Is.	52	M	8		1D	2158	15,69%	8,03	neg.
40	Fi., Em.	54	M	6		1D	2293	16,67%	5,47	neg.
41	Ha., Nh.	24	M	4	+	1D	2746	19,97%	1,30	neg.
42	Ru., Ma.	37	M	1	-	1D	3051	22,18%	0,43	neg.
									pos. sind	
Die durchschnittliche TRAK-Konzentration der Gruppe 1D ist 6,61U/L									14,29%	
1	Sch., Id.	67	F			2	2301	17,87%	3,33	neg.
2	Gö., Ma.	61	F			2	2544	19,65%	1,51	neg.
3	Ko., Ir.	53	F			2	2231	17,23%	4,36	neg.
4	Sch., Gi.	71	F			2	2257	17,43%	4,01	neg.
5	Bo., An.	54	F			2	2213	17,09%	4,62	neg.
6	We., Ma.	55	F			2	2291	17,70%	3,58	neg.
7	We., Hi.	73	F			2	2383	18,41%	2,64	neg.
8	As., Ch.	75	F			2	2446	18,89%	2,14	neg.
9	We., In.	59	F			2	2117	16,35%	6,21	neg.
10	Ho., Er.	66	F			2	2298	17,75%	3,51	neg.

Tabellenanhang 1

Anz.	Name	Alter	F/M	TRAK	EO	Gruppe	Versuchsergebnisse (TRAK)			
							CPM	B/T%	in U/L	pos./neg.
11	Fi., Sa,	38	F			2	2370	18,31%	2,76	neg.
12	Do., Ma.	76	F			2	2193	16,94%	4,91	neg.
13	St., Vi.	59	F			2	3004	23,11%	0,25	neg.
14	Ho., In.	53	F			2	2568	19,83%	1,39	neg.
15	Fe., Al.	42	F			2	2398	18,52%	2,52	neg.
16	Vo., Ka.	41	F			2	3127	24,05%	0,15	neg.
17	Br., Ul.	51	F			2	2468	19,06%	1,98	neg.
18	Me., Lo.	75	F			2	2199	16,98%	4,83	neg.
19	Mu., Ma.	66	F			2	2358	18,21%	2,88	neg.
20	Es., El.	52	F			2	2639	20,38%	1,07	neg.
21	Sp., El.	64	F			2	3025	23,27%	0,23	neg.
22	Kl., Bi.	29	F			2	2524	19,49%	1,63	neg.
23	Mu., Ir.	64	F			2	3091	23,78%	0,17	neg.
24	La., An.	49	F			2	2666	19,65%	1,51	neg.
25	Re., Ma.	83	F			2	3331	25,62%	0,05	neg.
26	Ro., An.	31	F			2	2819	21,68%	0,55	neg.
27	Vu., Iv.	63	F			2	2917	22,44%	0,37	neg.
28	Ju., Ra,	38	F			2	2823	20,81%	0,86	neg.
29	Ha., Me.	68	F			2	2779	20,49%	1,01	neg.
30	Ge., Ma.	58	F			2	2725	20,09%	1,23	neg.
31	Ka., Ir.	73	F			2	2666	19,65%	1,51	neg.
32	Vo., Ma.	76	F			2	2909	22,38%	0,38	neg.
33	Le., El.	72	F			2	2507	18,48%	2,56	neg.
34	Po., Li.	63	F			2	2597	19,14%	1,91	neg.
35	Lo., Lu.	82	F			2	2434	17,94%	3,27	neg.
36	Bo., Re.	39	M			2	2697	20,95%	0,81	neg.
37	Ja., He	73	M			2	2418	18,78%	2,25	neg.
38	Re., Jo.	58	M			2	2308	17,93%	3,25	neg.
39	En., Lo.	58	M			2	2273	17,56%	3,80	neg.
40	St., He.	65	M			2	2200	17,00%	4,79	neg.
41	Kl., Ax.	39	M			2	2253	17,40%	4,06	neg.
42	Fu., Di.	46	M			2	2309	17,83%	3,39	neg.
43	Sa., Jü	59	M			2	2190	16,92%	4,95	neg.
44	Bü., Kl.	41	M			2	2160	16,68%	5,45	neg.
45	Au., Ha.	69	M			2	2349	18,14%	2,97	neg.
46	Ts., Di.	55	M			2	2442	18,86%	2,17	neg.
47	Ka., Me.	33	M			2	2282	17,63%	3,69	neg.
48	Kr., Ha.	51	M			2	2274	17,56%	3,80	neg.
49	Th., Ja.	64	M			2	3051	23,47%	0,21	neg.
50	St., Er.	75	M			2	3053	23,48%	0,20	neg.
51	Bu., Ho.	73	M			2	2022	15,62%	8,25	neg.
52	To., Bo.	63	M			2	3651	28,08%	0,01	neg.
53	Le., Ma.	73	M			2	1715	13,25%	19,50	pos.
54	Hi., Jo.	27	M			2	2224	17,18%	4,45	neg.
55	Kl., Gü.	74	M			2	817	6,31%	161,32	pos.
56	De., Ot.	63	M			2	2371	18,31%	2,76	neg.
57	Kr., Em.	57	M			2	2520	19,46%	1,65	neg.
58	We., Ma	16	M			2	3045	23,42%	0,21	neg.
59	Sch., Uw.	32	M			2	2765	21,27%	0,69	neg.
60	Ip., Na.	20	M			2	2306	17,81%	3,42	neg.
61	Mu., Mi.	36	M			2	2934	22,57%	0,34	neg.
62	Om., Mo.	45	M			2	1728	12,74%	23,22	pos.
63	Sch., Be.	52	M			2	2998	23,06%	0,26	neg.
64	Wi., Ed.	63	M			2	3277	25,21%	0,07	neg.

Tabellenanhang 1

							Versuchsergebnisse (TRAK)			
Anz.	Name	Alter	F/M	TRAK	EO	Gruppe	CPM	B/T%	in U/L	pos./neg.
65	Po., Ed.	67	M			2	3266	25,12%	0,07	neg.
66	Ch., Di.	62	M			2	2777	20,47%	1,02	neg.
67	Pa., Pe.	33	M			2	2681	19,76%	1,44	neg.
68	We., Pe.	58	M			2	2643	18,75%	2,28	neg.
69	Sch., Wa.	51	M			2	2719	20,04%	1,26	neg.
70	Le., Ic.	79	M			2	2661	19,62%	1,53	neg.
72	Re., Fr.	38	M			2	2419	17,83%	3,39	neg.
73	Ho., St.	25	M			2	2757	21,20%	0,71	neg.
74	Th., Jo.	56	M			2	3013	23,18%	0,24	neg.
75	Na., Ki.	17	M			2	3027	23,28%	0,23	neg.
76	Ka., Ha.	35	M			2	1544	11,99%	29,82	pos.
Die durchschnittliche TRAK-Konzentration der Gruppe 2 ist 5,15 U/L										pos. sind 5,26%
1	Ru., Sa.	25	F	3		3	3268	23,76%	0,17	neg.
2	Re., Ed.	78	F			3	3125	22,72%	0,32	neg.
3	Ez., Fa.	52	F			3	3347	24,33%	0,12	neg.
4	Wi., An.	51	F			3	1756	12,77%	22,98	pos.
5	Fi., Li.	79	F			3	1902	13,96%	15,21	pos.
6	Gl., In.	71	F	7		3	2830	20,58%	0,97	neg.
7	Ne., Ma.	57	F			3	3091	22,47%	0,36	neg.
8	Ri., Ur.	70	F			3	3191	23,20%	0,24	neg.
9	Kr., Ni.	30	F	6		3	3239	23,55%	0,20	neg.
10	Kö., El.	55	F	3		3	2327	20,62%	0,95	neg.
11	Sch., El.	63	F			3	2200	19,50%	1,62	neg.
12	Tr., Ga.	37	F			3	2484	22,01%	0,47	neg.
13	Di., Bi.	29	F	1		3	2174	19,27%	1,80	neg.
14	Ts., Va.	41	F	2		3	2446	21,68%	0,55	neg.
15	Si., Be.	27	F	9		3	2022	17,92%	3,26	neg.
16	Wi., Ur.	55	F	3		3	2198	19,48%	1,64	neg.
17	Sch., M.	41	F	2		3	2176	19,28%	1,79	neg.
18	Bl., Hi.	59	F	2		3	2518	22,31%	0,40	neg.
19	We., Ir.	54	F	1		3	2343	20,76%	0,89	neg.
20	Fr., An.	31	F	7		3	2191	19,42%	1,68	neg.
21	Tr., He.	73	F			3	2161	19,15%	1,90	neg.
22	St., El.	62	F	9		3	2408	21,34%	0,66	neg.
23	Sch., Ch.	36	F			3	2555	22,64%	0,33	neg.
24	Ro., Je.	28	F			3	247	1,80%	503,10	pos.
25	Br., Si.	53	M	11		3	859	6,25%	163,95	pos.
26	Sch., En.	30	M	4		3	3473	25,25%	0,07	neg.
27	Se., Mo.	54	M	6		3	2628	19,11%	1,94	neg.
28	Wi., Pa.	55	M	4		3	2498	22,14%	0,43	neg.
29	Se., Mo.	53	M	6		3	1109	9,54%	64,36	pos.
Die durchschnittliche TRAK-Konzentration der Gruppe 3 ist 27,32 U/L										pos. sind 17,24%
1	Be., El.	34	F			4	1842	16,75%	5,30	neg.
2	Ka., Ch.	49	F			4	2572	18,70%	2,33	neg.
3	We., Er.	77	F			4	2744	19,95%	1,31	neg.
4	Pf., Re.	60	F			4	2609	18,97%	2,06	neg.
5	Sch., Sa.	37	F			4	2518	22,31%	0,40	neg.
6	Pf., Re.	60	F			4	2239	19,84%	1,38	neg.
7	We., Me.	55	F			4	2381	21,10%	0,75	neg.
8	Mü., Ka.	52	F			4	2331	20,66%	0,93	neg.
9	Jo., El.	44	F			4	2446	21,68%	0,55	neg.
10	He., Ul.	33	M			4	2526	22,39%	0,38	neg.

Tabellenanhang 1

							Versuchsergebnisse (TRAK)			
Anz.	Name	Alter	F/M	TRAK	EO	Gruppe	CPM	B/T%	in U/L	pos./neg.
11	Da., Ha.	46	M			4	2393	21,21%	0,71	neg.
12	Ku., Ro.	60	M			4	2378	21,07%	0,76	neg.
13	Mo., Jü.	40	M			4	2070	18,34%	2,73	neg.
14	Ra., Th.	40	M			4	2210	19,59%	1,55	neg.
Die durchschnittliche TRAK-Konzentration der Gruppe 4 ist 1,51 U/L										pos. sind 0,00%
1	Ni., Dö.	56	F			5	1862	16,93%	4,93	neg.
2	Do., Se.	56	F			5	1735	15,78%	7,76	neg.
3	Fa., Ul.	34	F			5	1999	18,18%	2,92	neg.
4	Pi., An.	64	F			5	1917	17,43%	4,01	neg.
5	Za., Ul.	25	F			5	1896	17,24%	4,34	neg.
6	Ke., In.	22	F			5	1928	17,53%	3,85	neg.
7	Ha., An.	66	F			5	1841	16,74%	5,32	neg.
8	Ju., El.	39	F			5	1713	15,58%	8,38	neg.
9	Br., Ru.	83	F			5	1172	10,66%	45,66	pos.
10	Mo., Ba.	88	F			5	1367	12,43%	25,77	pos.
11	To., An.	35	F			5	1617	14,70%	11,64	neg.-pos.
12	Da., Co.	43	F			5	2873	20,89%	0,83	neg.
13	De., Ma.	61	F			5	2426	17,64%	3,67	neg.
14	Kl., Bi.	41	F			5	2223	16,16%	6,69	neg.
15	He., Ga.	43	F			5	2320	16,87%	5,05	neg.
16	He., Ma.	36	F			5	2350	17,09%	4,62	neg.
17	Kl., Br.	49	F			5	2522	18,34%	2,73	neg.
18	Kl., Br.	49	F			5	3209	23,33%	0,22	neg.
19	Kr., He.	71	F			5	2375	21,05%	0,77	neg.
20	Sch., El.	65	F			5	2262	20,05%	1,25	neg.
21	Ar., Ma.	52	F			5	2248	19,92%	1,33	neg.
22	Zo., Ol.	71	F			5	2065	18,30%	2,77	neg.
23	Gr., Ka.	39	F			5	1962	17,84%	3,38	neg.
24	Sch., Ed.	66	F			5	1680	15,28%	9,38	neg.-pos.
25	Fr., An.	31	F			5	1444	13,13%	20,33	pos.
26	Ya., Az.	20	F			5	1678	15,26%	9,45	neg.
27	Sa., Gu.	54	F			5	3209	23,33%	0,22	neg.
28	Ku., He.	65	M			5	1662	15,11%	10,00	neg.-pos.
29	Sch., Wa.	67	M			5	1835	16,69%	5,43	neg.
30	Jü., Wi.	70	M			5	1929	17,54%	3,83	neg.
31	St., Ha.	62	M	4		5	1244	11,31%	37,17	pos.
32	He., He	66	M			5	1292	11,74%	32,36	pos.
33	To., An.	47	M			5	1039	9,45%	66,12	pos.
34	Ma., In	45	M			5	1970	14,32%	13,37	neg.-pos.
35	Ah., He.	64	M			5	3133	22,78%	0,31	neg.
36	Ku., He.	65	M			5	2321	20,57%	0,97	neg.
37	Bl., Je.	36	M			5	2370	21,00%	0,79	neg.
38	Po., Ma.	53	M			5	2435	21,58%	0,58	neg.
Die durchschnittliche TRAK-Konzentration der Gruppe 5 ist 9,69 U/L										pos. sind 15,79%
										pos. sind
242	Seren insgesamt gemessen !									37 Seren
										15,29%

Hashimoto-Thyreoiditis

BE --> Blutentnahmedatum für den Versuch

Die Stoffwechsellage wurde nach dem TSH-Wert eingeteilt in:	
Euthyreot	0,4 - 4,0 mU/l
Hyperthyreot	> 4,0 mU/l
Hypothyreot	< 0,4 mU/l

Name	Datum	Stoffwechsellage	TSH (mU/l)	T3 (ng/dl)	T4 (ug/dl)	TG-AK (U/ml)	TPO-AK (IU/ml)	TRAK (U/L)	
Wi., An.	1993-11-01	Euthyreot	1,4		7,8	9	30	3	
	1997-12-01	Hyperthyreot	0,2			166	47	9	
	1998-02-01	Hypothyreot	2,8						
BE -->	1998-06-01	Euthyreot	0,8	1,1		1055	497		
	1998-11-12	Euthyreot	1,8	1					
	1999-02-01	Euthyreot	1	1,4					
	2000-07-01	Hyperthyreot	0,03	2,1		122	77	< 0,1	
	2001-02-01	Euthyreot	1,8			266	55		
Fi., Li.	1996-11-01	Hyperthyreot	0,2	1	6,8	5025	8	6	
	1997-10-01	Hyperthyreot	0,3	1,1	6,9				
	BE -->	1998-10-09	Hyperthyreot	0,3	1,1	6,9			
	1999-11-01	Hyperthyreot	< 0,01	1,2	7,6				
	2000-06-01	Hyperthyreot	0,02	1	7,5	2886	16	0,6	
Rö., Je.	1996-04-26	Hypothyreot	37,9			5690	> 5000	296	
	1999-02-01	Hypothyreot	5,9						
Br., Si.	1997-05-07	Hypothyreot	2,7	1	4,8	2667	1294	0	
	1997-05-25	Hypothyreot	24,9	0,8	6,9	2493	1714	9	
	BE -->	1997-07-25	Hyperthyreot	0,3	1	6,9	2239	2499	11
	1997-09-16	Euthyreot	3	1	5,5	1378	908	54	
	1998-09-18	Hyperthyreot	0,08	1,1	8,2	39	31	5	
Se., Mo.	1998-06-29	Euthyreot	1,6	1,5	7,8	5618	1931	1	
	BE -->	1998-10-16	Hyperthyreot	0,02	1,7	13,5	1459	617	6
	1998-12-15	Hypothyreot	15,3	1,2	5,1	1453	874	0	

Nicht autoimmune SD-Erkrankungen

BE --> Blutentnahmedatum für den Versuch

Die Stoffwechsellage wurde nach dem TSH-Wert eingeteilt in:	
Euthyreot	0,4 - 4,0 mU/l
Hyperthyreot	> 4,0 mU/l
Hypothyreot	< 0,4 mU/l

Name	Datum	Stoffwechsellage	TSH (mU/l)	T3 (ng/dl)	T4 (ug/dl)	TG-AK (U/ml)	TPO-AK (IU/ml)	TRAK (U/L)
To., An.	1996-09-23	Hyperthyreot	0,01	1,8	11,4	4	30	2
	1997-08-01	Hyperthyreot	0,01		9,7	9	< 1	6
BE -->	1998-11-06	Hyperthyreot	< 0,01		9,9			
	1999-11-01	Hyperthyreot	0,01					
Br., Ru.	1996-10-01	Hyperthyreot	0,1	1,5	8,2	35	4	6
	1997-06-01	Hyperthyreot	0,03		14,1			
	1998-03-01	Hyperthyreot	0,1		11,1			
BE -->	1998-11-06	Euthyreot	0,4		10			
	2000-04-01	Hyperthyreot	0,05	1,5				
	2000-05-01	Euthyreot	1,1	1,3				
Mo., Ba.	1998-04-01	Hyperthyreot	0,03	1,5	8,4	531	47	4
	1998-09-01	Hypothyreot	8,2	1,4	4,3			
BE -->	1998-11-04	Euthyreot	2,8					
	1999-01-01	Euthyreot	2,8		5,5			
He., He.	1995-11-01	Hyperthyreot	< 0,01	2,3	11,6	50	2	0
	1997-03-01	Hyperthyreot	< 0,01	1,2	7,1			
	1997-10-01	Hypothyreot	8,5	1,1	4,7			
	1998-05-01	Hyperthyreot	0,03	1,3	7,2			
BE -->	1998-08-28	Hyperthyreot	0,01	1,7	7,2			
	1999-01-01	Hyperthyreot	0,01	1,7	8			
	1999-05-01	Hyperthyreot	0,02	1,5	7,4			
St., Ha.	1997-01-08	Euthyreot	0,5	1	8,9	67	9	0
BE -->	1998-07-01	Euthyreot	0,7	1	8,9	37	1	4
	1999-02-01	Euthyreot	0,4	1	7,6	47	14	0
	1999-08-01	Euthyreot	0,4	0,9	8,7	21	8	3
	2000-02-01	Hyperthyreot	0,2					

Danksagung

Frau Prof. Dr. med. Petra-Maria Schumm-Draeger danke ich vielmals für die Überlassung des Themas und ihre Bereitschaft zu konstruktiver Diskussion und Lösung schwieriger Fragen.

Bei Frau Dr. phil. nat. Marissa Penna-Martinez bedanke ich mich herzlich für ihre große Hilfsbereitschaft, sachliche Beratung und Begleitung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. med. Sandra Röddiger danke ich für meine Einführung in die experimentellen Laborarbeiten.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen des Hormonlabors von Herrn Prof. Dr. med. K.-H. Usadel, insbesondere der leitenden MTA Frau Ilickovic, herzlichen Dank für ihre Geduld und Hilfe.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Nachweis von TSH-Rezeptorantikörpern mittels
eines Bindungsassays und JP26-Zellen
bei Patienten mit Autoimmunthyreoiditis**

im Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. P.-M.- Schumm-Draeger, mit Unterstützung von Frau Dr. phil. nat. Marissa Penna-Martines ohne sonstige Hilfe selbst angefertigt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, 02.05.2002

Curriculum vitae

(Lebenslauf)

Lucas Johannes Meisemann
geboren am 19.04.1970 in Frankfurt am Main

Vater: Dr. med. Hans Meisemann, niedergelassener Facharzt für Allgemeinmedizin
in Eppstein-Bremthal im Taunus

Mutter: Eva Meisemann geb. Wagner, Krankenschwester und Hausfrau

Geschwister: Judith Meisemann (31 J.) Versicherungskauffrau,
Bernadette Meisemann (24 J.) Medizinstudentin in Frankfurt a.M.

Besuch der Grundschule (Comenius-Schule) in Eppstein-Bremthal,
des gymnasialen Zweigs der Freiherr v. Stein-Schule in Eppstein /Ts.
und der Oberstufe der Main-Taunus-Schule in Hofheim /Ts.

Schulabschluß: Abitur (1991)

Studium der Informatik
an der TH-Darmstadt (1991-1992)

Ausbildung zum examinierten Krankenpfleger
an den Städtischen Kliniken Frankfurt a. M. - Höchst (1992-1995)
dort auch teilzeitbeschäftigt seit Okt. 1995

Medizinstudium
Physikum (August 1998)
1. Staatsexamen (April 2000)
2. Staatsexamen (April 2002)
Praktisches Jahr (seit April 2002)