

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

***TSH- Rezeptor- Antikörper mit stimulierender und blockierender Funktion
bei Patienten mit M. Basedow und anderen Schilddrüsen- und
Autoimmunerkrankungen***

INAUGURAL- DISSERTATION

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

vorgelegt von

Anna- Maria Wangler
aus Alma- Ata

Frankfurt am Main, 2002

Dekan: Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter
Referent: Fr. Prof. Dr. med. P. M. Schumm- Draeger
Koreferent: Prof. Dr. med. F. Grünwald

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2004

Danksagung

Frau Prof. Dr. med. P.- M. Schumm- Draeger danke ich für die Überlassung des Themas und die fachliche Beratung für diese Arbeit.

Frau Dr. phil nat. M. Penna- Martinez möchte ich für die intensive Betreuung und stetige Bereitschaft zur Lösung inhaltlicher Probleme danken.

Herzlich bedanke ich mich auch bei Frau Dr. S. Röddiger für die gute Einweisung in die experimentelle Laborarbeit, sowie Frau Ilickovic und Frau Koracowic für die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft während der Arbeit im Labor.

*Meinen Eltern und meinem Bruder in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet.*

Frankfurt am Main, Juni 2002

Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	1
<u>I. EINLEITUNG</u>	2
1. Schilddrüsenerkrankungen	2
1.1. M. Basedow	2
1.2. Hashimoto- Thyreoiditis	3
1.3. Thyreoiditis de Quervain	3
1.4. Struma	4
2. Methoden zum Nachweis von Antikörpern	5
2.1. Herkömmlicher Radiorezeptorassay: TRAK [®] - Assay	5
2.2. Assay der zweiten Generation mit humanem TSH- Rezeptor	5
3. Schilddrüsenpezifische Antikörper	6
3.1. Antikörper gegen den TSH- Rezeptor	6
3.2. Antikörper gegen das mikrosomale Schilddrüsenantigen Thyreoperoxidase	8
3.3. Thyreoglobulin- Antikörper	8
4. Ziel	9
<u>II. MATERIAL</u>	10
1. Verwendete Materialien	10
1.1. Geräte	10
1.2. Verbrauchsmaterialien	10
1.3. Zellkulturmedium	10
1.4. Chemikalien und Lösungen	11
1.5. Standardchemikalien	11
1.6. Desinfektionsmittel	11
1.7. <i>BIOTRAK</i> - KIT	11

2.	Zelllinien	11
3.	Antikörper	11
4.	Patientenseren	12
<u>III. METHODEN</u>		<u>13</u>
1.	Kultivierung der CHO- Zellen	13
2.	Passagieren der CHO- Zellen	13
3.	Gewinnung der Patientenseren aus Blutproben	13
4.	Radioimmunoassay	14
4.1.	Vorbereitung	14
4.2.	Bestückung der 96- Wellplatten	14
4.3.	Auswertung	15
4.3.1.	Verwendete Reagenzien des Assay- Systems	16
4.3.2.	Auswertungsverfahren	16
5.	Auswahlkriterien und Einteilung der Patientenseren	18
<u>IV. ERGEBNISSE</u>		<u>20</u>
1.	Vorversuche	20
1.1.	Vergleich der cAMP- Konzentrationen der CHO- Zelllinien JP 26 und JP 02	20
1.2.	TSH- Verdünnungsreihe mit JP 26	21
1.3.	Kompetitiver Hemmversuch mit blockierenden IgG- Antikörpern und TSH	22
2.	Antikörper mit stimulierender Funktion am TSH- Rezeptor	24
2.1.	Funktionsstimulierende Antikörper aller Patientengruppen	24
2.1.1.	Vergleich der Patientengruppen mit dem Kontrollkollektiv	24
2.1.2.	Anteil der Patienten mit signifikant erhöhtem Antikörper- Titer	25
2.1.3.	Geschlechtsverteilung der Patienten	27
2.1.4.	Altersverteilung der Patienten	28
2.2.	Funktionsstimulierende Antikörper bei Patienten mit M. Basedow	29

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.	Vergleich der M. Basedow- Untergruppen mit dem Kontrollkollektiv	30
2.2.2.	Anteil der Patienten mit signifikant erhöhtem Antikörper- Titer	31
2.2.3.	Geschlechtsverteilung der M. Basedow- Patienten	32
2.2.4.	Altersverteilung der M. Basedow- Patienten	33
2.3.	Vergleich der M. Basedow- Gruppen mit allen anderen Patientengruppen	34
2.3.1.	Vergleich der cAMP- Konzentrationen	34
2.3.2.	Häufigkeit von funktionsstimulierenden Antikörpern	35
3.	Antikörper mit blockierender Funktion am TSH- Rezeptor	36
3.1.	Funktionsblockierende Antikörper aller Patientengruppen	36
3.1.1.	Vergleich der Patientengruppen mit dem Kontrollkollektiv	36
3.1.2.	Anteil der Patienten mit signifikant erniedrigten cAMP- Konzentrationen	37
3.1.3.	Geschlechtsverteilung der Patienten	39
3.1.4.	Altersverteilung der Patienten	40
3.2.	Funktionsblockierende Antikörper bei Patienten mit M. Basedow	41
3.2.1.	Vergleich der M. Basedow- Untergruppen mit dem Kontrollkollektiv	41
3.2.2.	Anteil der Patienten mit signifikant erniedrigten cAMP- Konzentrationen	43
3.2.3.	Geschlechtsverteilung der M. Basedow- Patienten	44
3.2.4.	Altersverteilung der M. Basedow- Patienten	45
3.3.	Vergleich der M. Basedow- Gruppen mit allen anderen Patientengruppen	46
3.3.1.	Vergleich der cAMP- Konzentrationen	46
3.3.2.	Häufigkeit von funktionsblockierenden Antikörpern	47
4.	Statistik	48
<u>V. DISKUSSION</u>		50
1.	Material und Methode	50
1.1.	Auswahl der Zelllinie JP 26	50
1.2.	Auswahl der Zelldichte	51
1.3.	cAMP- KIT	51
2.	Diskussion der Ergebnisse	51
2.1.	Geschlechtsverteilung der Patienten	52
2.2.	Altersverteilung der Patienten	52
2.3.	Vorversuche	52

2.4. TSHR- Antikörper mit stimulierender Funktion	54
2.5. Funktionsstimulierende Antikörper bei M. Basedow	55
2.6. TSHR- Antikörper mit blockierender Funktion	56
2.7. Funktionsblockierende Antikörper bei M. Basedow	57
<u>VI. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>62</u>
<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>63</u>
<u>Ehrenwörtliche Erklärung</u>	
<u>Lebenslauf</u>	
<u>Zusammenfassung der Dissertation auf Deutsch</u>	
<u>Zusammenfassung der Dissertation auf Englisch</u>	

Abkürzungsverzeichnis

AIK	Autoimmunerkrankungen
AK	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
b- TSH	bovines TSH
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHO	Chinesische Hamster- Ovarien- Zellen
d.h.	das heißt
FKS	fötales Kälberserum
HLA	Humanes Lymphozyten Antigen
hTSHR	humaner TSH- Rezeptor
JP	Zelllinie der CHO- Zellen
Konz.	Konzentration
Lsg	Lösung
M.	Morbus
MB	M. Basedow
MHC	(engl.) major histocompatibility complex
MW	Mittelwert
n	Anzahl
RAA	Routine- Radiorezeptor- Assay
sog.	sogenannt
SD	Standardabweichung
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin = Tetrajodthyronin
TAK	Thyreoglobulin- Antikörper
TBG	thyroxinbindendes Alphaglobulin der Schilddrüse
TcTU	Technetium Thyreoidaler Uptake
Th.	Thyreoiditis
TPO	Thyreoperoxidase
TRAK	TSH- Rezeptor- Antikörper
TRH	(engl.) thyreotropine releasing hormone
TSH	thyreoidestimulierendes Hormon
TSHR	TSH- Rezeptor
VB	Versuch zur Bestimmung von AK mit blockierender Funktion
VS	Versuch zur Bestimmung von AK mit stimulierender Funktion
z. B.	zum Beispiel

Synonyme:

TRAK = TSHR- AK = IgG
RRA = TRAK- Assay[®]

I. EINLEITUNG

1. Schilddrüsenerkrankungen

1.1. M. Basedow

Dem M. Basedow liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde. Dabei spielen Umwelteinflüsse und psychosoziale Faktoren bei genetisch prädisponierten Individuen, mit gehäuftem Vorkommen von HLA- DRW 3 und HLA- B 8, eine Rolle [Zamani et al. 2000]. Es kommt zur Aktivierung zellulärer und humoraler Immunmechanismen, die gegen Schilddrüsengewebe und antigenverwandte Strukturen in extrathyreoidalen Geweben gerichtet sind [Heufelder et al. 1998].

Für die Auslösung der Krankheit werden außerdem exogene Faktoren wie Bakterien, Viren, Streß und Rauchen verantwortlich gemacht [Prummel et al. 1993].

Die immunogene Hyperthyreose manifestiert sich in Zweidritteln der Fälle nach dem 35. Lebensjahr und überwiegend bei Frauen (w : m = 5:1) [Herold et al. 2002].

Beim M. Basedow kann ein vielgestaltiges klinisches Bild mit unterschiedlich führender Symptomatik vorliegen. Die Schilddrüse ist meistens vergrößert, ein Schwirren kann palpabel sein. Wichtige Zuordnungskriterien sind ein zirkumskriptes prätibiales Myxödem und eine endokrine Ophthalmopathie. Bei 50% der Patienten ist die Merseburger Trias mit Struma, Exophthalmus und Tachykardie zu finden. Als prätibiales Myxödem oder auch Myxoedema circumscriptum tuberosum werden kissenartige derbe, gelbliche bis lividrote Infiltrate mit apfelsinenschalenartiger Oberfläche der prätibialen Haut an den Unterschenkel- Streckseiten oder der gesamten Tibia und am Fußrücken bezeichnet. Die Ursache ist die lokalisierte Ablagerung von Mukopolysacchariden.

Die endokrine Ophthalmopathie oder auch endokrine Orbitopathie ist eine meist beidseitig, gelegentlich aber auch einseitig lokalisierte, wahrscheinlich eigenständige Autoimmunkrankheit der Augenmuskeln und des orbitalen Bindegewebes. In mehreren Arbeiten wurde belegt, dass es zur Ausbildung von TSH- Rezeptoren (TSHR) in retroorbitalen Adipocyten kommt, was durch Antikörpereinfluß zur Zunahme des Fettgewebes führt [Endo et al. 1995; Roselli-Rehfuss et al. 1992; Crisp et al. 1997; Janson et al. 1995]. Die Augensymptome reichen von Protrusio bulbi bis zu Augenmuskelparesen, seltenem Lidschlag (Stellwag- Zeichen), Konvergenzschwäche (Moebius- Zeichen), Retraktion des Oberlides und dessen Zurückbleiben bei Blicksendung (Graefe- Zeichen) und einem sichtbaren Sklerastreifen oberhalb der Hornhaut beim Blick gradeaus (Dalrymple- Zeichen).

Subjektiv klagen Patienten oft über Gereiztheit, Unruhe, emotionale Labilität, Herzklopfen und – stolpern, Schwäche, Schlaflosigkeit und Gewichtsverlust trotz gesteigerten Hunger- und Durstgefühls. Zu beobachten sind außerdem blasse feuchte Haut, ein feinschlägiger Fingertremor, Haarausfall und gelegentlich neuromuskuläre Erscheinungen wie die thyreotoxische Myopathie.

Die Diagnose einer Hyperthyreose wird gesichert durch den Nachweis eines erhöhten Gesamt- T₄ und Gesamt- T₃. Die Bestimmung eines Parameters für das freie Thyroxin (T₄/TBG- Quotient, fT₄- Index) ermöglicht Veränderungen des TBG- Spiegels festzustellen,

welcher die Bestimmungen von Gesamt- T₄ und Gesamt- T₃ beeinflussen kann. Weiterhin wird der TSH- Spiegel bestimmt, um zwischen primärer und sekundärer Hyperthyreose zu unterscheiden. In der Sonographie sind umschriebene oder diffuse echoarme Areale zu sehen, in der Szintigraphie zeigt sich eine homogene intensive Radionuklidanreicherung.

Charakteristischerweise finden sich im Serum von Patienten mit M. Basedow Antikörper gegen den TSH- Rezeptor (TRAK) [McKenzie et al. 1989; Rees Smith et al. 1988]. Aber auch Antikörper gegen das mikrosomale Schilddrüsenantigen TPO sind in 60- 70% der Fälle vorhanden [Scherbaum et al. 1982].

Die Funktionen der Antikörper werden gesondert besprochen.

1.2. Hashimoto- Thyreoiditis

Die Hashimoto- Thyreoiditis ist die häufigste aller Thyreoiditiserkrankungen. Sie wird auch als Autoimmunthyreoiditis oder lymphozytäre Thyreoiditis bezeichnet. Frauen sind davon häufiger betroffen als Männer.

Bei der Entstehung geht man von genetischen Faktoren aus, welche vor allem die MHC-Klasse- II- Moleküle und die Regulationsgene der Zytokine und der T- Zellen betreffen. Bei der Initialphase spielen jedoch auch andere Faktoren wie Streß, Infektionen und Jodzufuhr eine Rolle [Schumm- Draeger 1998].

Klassischerweise besteht bei der Hashimoto- Thyreoiditis eine zunehmende Vergrößerung der Schilddrüse mit folgender Funktionseinschränkung. Bei der atrophischen Form der chronisch lymphozytären Thyreoiditis kommt es dagegen zur progredienten Zerstörung des Schilddrüsengewebes [Pfannenstiel et al. 1999, 237]. Die Verläufe sind symptomarm. Die Patienten klagen erst bei manifester Hypothyreose, welche meist im Spätstadium diagnostiziert wird, über deren Symptome wie Antriebsarmut, Verlangsamung, Kälteintoleranz, Müdigkeit, Gewichtszunahme, schuppige trockene Haut und depressive Verstimmungen.

Oft kann man das gemeinsame Auftreten der Hashimoto- Thyreoiditis mit anderen Autoimmunerkrankungen beobachten, wie zum Beispiel M. Addison und Diabetes mellitus Typ 1. Charakteristisch sind die sehr hohen Titer von Autoantikörpern gegen mikrosomale Schilddrüsenantigene (Anti- TPO- AK), welche bei über 90% der Hashimoto- Patienten zu finden sind und von Thyreoglobulinantikörpern (TAK) in ca. 70% der Fälle.

Die Diagnose wird außer durch den Nachweis dieser Antikörper durch Feinnadelbiopsie und die Histologie gesichert, bei denen man die typischen lymphozytären und plasmazellulären Infiltrate findet.

1.3. Thyreoiditis de Quervain

Die Entstehung der subakuten Thyreoiditis de Quervain oder auch Riesenzellthyreoiditis ist noch nicht genau bekannt. Man geht aber von vorausgegangenen Virusinfektionen der Luftwege als Auslöser aus. Genetische Dispositionen werden ebenfalls diskutiert. Frauen sind bis zu fünf mal häufiger betroffen als Männer.

Die Symptome können unterschiedlich stark ausgeprägt sein und reichen von Müdigkeit, Fieber, starken Schmerzen in der Halsgegend, welche in die Ohren und den Kiefer ausstrahlen können, bis zu Symptomen einer Hyperthyreose. Man findet oft eine extreme BSG- Erhöhung bei normalen Leukozytenwerten. Die anfangs hyperthyreote

Schilddrüsenfunktion geht später wieder in eine euthyreote oder sogar hypothyreote Stoffwechsellaage über.

Charakteristisch findet man bei der histologischen Untersuchung eine granulomatöse Thyreoiditis mit Epitheloid- und Langhans- Riesenzellen. In der Sonographie sieht man miteinander teils verschmolzene echoarme Areale.

Die Krankheitsdauer liegt durchschnittlich bei einem bis drei Monaten, kann aber in Ausnahmefällen bis zu einem Jahr betragen. Meist findet eine vollständige Ausheilung statt. Rezidive treten in ca. 20% der Fälle auf [Pffannenstiel et al. 1999, 235].

1.4. Struma

Die häufigste Strumaform, mit 90% aller Schilddrüsenenerkrankungen, ist die blande Struma, welche definiert ist als nicht entzündliche und nicht maligne diffuse oder knotige Vergrößerung der Halsschilddrüse bei euthyreoter Stoffwechsellaage. Dies ist die häufigste endokrinologische Erkrankung. Sind mehr als 10% der Bevölkerung betroffen, spricht man von endemischer, ansonsten von sporadischer Struma. In Teilen von Westeuropa und Deutschland leiden etwa 15% der Bevölkerung an der endemischen Jodmangelstruma [Davies et al. 1998]. Die oberen Referenzwerte für die Größe der Schilddrüse betragen bei Frauen 18 ml, bei Männern 25 ml. Nach Größe und Kompressionszeichen werden vier bis fünf Stadien unterschieden.

Die Hauptursache für die endemische Struma ist der Jodmangel, die sporadische Struma ist oft Folge von angeborenen Jodverwertungsstörungen, erhöhten Jodverlusten oder Einnahme von strumigen wirkenden Medikamenten bzw. Nahrungsmitteln. Auch bei Akromegalie kann der Einfluß des Wachstumshormons zu Strumabildung führen. In allen Fällen kommt es zu Störungen der Regelkreise zwischen der Höhe der peripheren Hormone und der Sekretion der übergeordneten Hormone TSH bzw. TRH.

Der intrathyroidale Jodmangel als entscheidender pathogenetischer Faktor führt zu einer Aktivierung von intrathyroidalen lokalen Wachstumsfaktoren, z.B. epidermal growth factor und insulin- like growth factor I, was zur Hyperplasie der Thyreozyten führt.

Der Abfall der peripheren Hormone verursacht eine erhöhte Ausschüttung des trophischen Hormons TSH, es kommt zu einer Hypertrophie einzelner Schilddrüsenbezirke.

Da es Unterschiede zwischen der Proliferationsgeschwindigkeit benachbarter Thyreozyten gibt, kommt es vor allem bei Kindern und Jugendlichen vorerst zu einem homogenen Erscheinungsbild, einer diffus vergrößerten Struma. Durch jahrelange chronische Stimulation des Wachstums entwickelt sich dann im erst im Erwachsenenalter eine Struma nodosa [Studer et al. 1989]. Weitere Stimulation und Spontanmutationen können im weiteren Verlauf zur Bildung von klonalen Knoten und uni- oder multifokalen Adenomen führen, welche eine Hyperthyreose auslösen können.

In der (Farbdoppler-) Sonographie kann die Form, Lage, Größe und Struktur der Schilddrüse beurteilt werden. Mithilfe der Szintigraphie können die quantitative Radionuklidtaufnahmen durch TcTU- Bestimmung und somit Areale mit vermehrter oder verminderter Stoffwechselaktivität dargestellt werden. Außerdem läßt sich ektopes Schilddrüsengewebe nachweisen.

Differenzialdiagnostisch muß bei einer Struma an eine Thyreoiditis und an ein Schilddrüsenmalignom gedacht werden.

2. Methoden zum Nachweis von Antikörpern

Charakteristisch für Patienten mit M. Basedow ist, wie oben erwähnt, das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen die TSH- Rezeptoren der Schilddrüse, welche die Adenylatzyklase und somit die Hormonproduktion anregen und zu einer Hyperthyreose führen [Volpé 1985; Weetmann et al. 1984; Zakarija et al. 1980, 1985]. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene sog. Such- oder Screening- Verfahren entwickelt, welche für breite Untersuchungen von Patienten in der Routinediagnostik im Klinikalltag geeignet sind. Dabei werden TSH- Rezeptor- Antikörper (TRAK) nachgewiesen, welche die Verdachtsdiagnose M. Basedow erhärten oder ausschließen. Wichtige Eigenschaften eines guten Screening- Tests müssen sein: geringer Zeit- und Kostenaufwand, hohe Sensitivität und Spezifität und somit möglichst geringe Irrtumswahrscheinlichkeit.

2.1. Herkömmlicher Routine- Radiorezeptor- Assay: TRAK- Assay[®]

Seit 1998 wurde die quantitative Bestimmung der TRAK in Humanserum mit dem TRAK- Assay[®] der *Firma Brahms, Berlin* durchgeführt.

Bei diesem Assay werden als Tracer Jod- 125- markiertes TSH, welches aus Rinderhypophysen isoliert wurde und TSH- Rezeptoren aus Schilddrüsen vom Schwein verwendet.

Zunächst wird die zu untersuchende Serumprobe mit dem TSH- Rezeptor vermischt. Während der ersten Inkubationsphase kommt es beim Vorhandensein von TRAK zur Besetzung der TSH- Rezeptoren. Nach Zugabe des markierten TSH werden die restlichen Rezeptoren in der zweiten Inkubationsphase besetzt. Je mehr TRAK im Serum vorhanden sind, desto weniger TSH kann folglich an die TSH- Rezeptoren binden.

Zur Bestimmung der Menge des gebundenen TSH, wird durch Präzipitation des TSH- Rezeptors mittels eines Fällungsreagenzes und anschließender Zentrifugation das freie TSH vom gebundenen Tracer getrennt. Die überstehende Flüssigkeit wird entfernt. Mittels Gamma- Counter kann nun über die Radioaktivitätsbestimmung die Menge des gebundenen TSH ermittelt werden. Dabei ist die gemessene Radioaktivität umgekehrt proportional zu der Menge an TRAK.

Dieser TRAK- Assay[®] zeichnet sich durch seine hohe Sensitivität, gute Reproduzierbarkeit und einfache Handhabung aus.

TRAK- Werte < 10 U/l gelten als TRAK- negativ und Werte > 15 U/l als TRAK- positiv. Werte dazwischen befinden sich im sog. Graubereich.

2.2. Assay der zweiten Generation mit humanem TSH- Rezeptor

Im Januar 2000 wurde im Endokrinologischen Labor der Universitätsklinik Frankfurt/Main ein weiterentwickelter Test zur Routinedetektion von TRAK eingeführt. Dies war der LUMItest[®] TRAK human der *Firma Brahms, Berlin*.

Bei diesem Lumineszenzrezeptorassay (LRA) wird ein Coated Tube System verwendet, bei welchem die Teströhrchen mit humanen, rekombinanten TSH- Rezeptoren beschichtet wurden.

Der Tracer bei diesem Reagenzansatz ist Lumineszenz- markiertes b- TSH vom Rind. Durch den Einsatz von humanen TSH- Rezeptoren sollte eine signifikante Verbesserung der klinischen Sensitivität bei gleicher Spezifität gelingen.

Das Assayprinzip ist folgendes: Der erste Schritt besteht aus der Inkubation der Patientenprobe im Teströhrchen. Als nächstes folgt die Zugabe des markierten TSH, welches die restlichen TSH- Rezeptoren besetzt. Durch einen Waschschrift wird das ungebundene TSH entfernt und das gebundene markierte TSH kann anschließend im Luminometer bestimmt werden. Die Stärke des Messsignals ist umgekehrt proportional zu der Menge der vorhandenen TRAK.

Mit diesem Assay können im Gegensatz zu der herkömmlichen Methode des RRA- Tests auch Plasmaproben von Patienten ausgewertet werden.

Die klinische Prüfung des LUMItest[®] TRAK human erfolgte an 86 Patienten mit unbehandeltem M. Basedow und 282 gesunden Kontrollpersonen. Die Beurteilungsgrenze von 1 IU/l zeigte eine diagnostische Sensitivität von 98,8% bei einer Spezifität von 99,6% [Costagliola et al. 1999].

TRAK- Werte < 1 IU/l werden als TRAK- negativ, TRAK- Werte > 2 IU/l werden als TRAK- positiv bewertet. Der Bereich dazwischen gilt als Graubereich.

Zu den Assays der zweiten Generation gehört auch der TRAK human DYNObest[®], *Brahms Diagnostica GmbH, Berlin*. Laut einigen Studien von Zöphel et al. (2000), Giovanella et al. (2001) und Wallaschofski et al. (2001), zeigt auch dieser Test eine bessere diagnostische Sensitivität bei der Diagnostizierung von Patienten mit M. Basedow. Falsch negative Ergebnisse, welche in einigen Fällen dazu führten, dass Patienten mit M. Basedow durch ein negatives TRAK- Ergebnis als Struma diffusa klassifiziert wurden, können dadurch verhindert werden.

3. Schilddrüsenpezifische Antikörper

Bei dieser Arbeit sollte das Vorkommen von Antikörpern gegen TSH- Rezeptoren der Schilddrüse bei verschiedenen Erkrankungen getestet werden. Es gibt eine Reihe von Antikörpern, die gegen Schilddrüsenewebe gerichtet sein können. Im Rahmen der Pathogenese und Diagnostik spielen aber nur drei Antikörpertypen eine wichtige Rolle: Antikörper gegen den TSH- Rezeptor (TRAK), gegen das mikrosomale Schilddrüsenantigen (TPO) und gegen Thyreoglobulin (TAK). Auf diese Antikörper soll nun näher eingegangen werden.

3.1. Antikörper gegen den TSH- Rezeptor

Um die Wirkung der Antikörper zu verstehen, soll hier die Struktur des TSH- Rezeptors erklärt werden.

Der TSH- Rezeptor ist ein einzelnes Protein mit 764 Aminosäuren (AS) [Rapoport et al. 1998] mit einem kalkulierten molekularen Gewicht von etwa 90000 und sechs potentiellen Glykolisationsstellen. Mit sieben transmembranösen Domänen, welche mit den G- Protein-Modulatoren der Adenylatzyklase interagieren, ist er in der Plasmamembran der Thyreozyten verankert. Damit gehört der TSH- Rezeptor zur gleichen Familie wie der LH/CG- Rezeptor, das Rhodopsin, der α - und β - adrenerge Rezeptor, der Muskarin- und Cholin-

Rezeptor, der Dopamin- und Substanz- K- Rezeptor, die alle ebenfalls sieben transmembranöse Domänen besitzen [Rapoport 1991].

Untersuchungen haben gezeigt, dass der TSH- Rezeptor aus zwei Untereinheiten A und B besteht, welche durch eine Disulfid- Brücke miteinander verbunden sind [Rees Smith et al. 1988]. Die Einheit A, mit einem molekularen Gewicht von ca. 44000 (50 kDa) und einer Länge von 400 AS, ist wasserunlöslich, bildet den extrazellulären Teil des Rezeptors und stellt die Bindungsstelle für TSH dar. Die Einheit B, mit dem molekularen Gewicht von 30 kDa, besteht aus 80 AS durchdringt die Lipid- Doppelmembran [Furmaniak et al. 1991] und bildet die kurze intrazelluläre Domäne [Libert et al. 1989; Nagayama et al. 1989; Misrahi et al. 1990]. Andere Erkenntnisse lassen jedoch darauf schließen, dass der TSH- Rezeptor aus zwei Untereinheiten mit 53 und 40 kDa [McQuade et al. 1986] bzw. drei Untereinheiten 31, 17 und 63 kDa ohne Disulfidbrücken- Verbindung besteht [Gennick et al. 1987].

TSH- Rezeptor- Antikörper (TRAK) treten, wie oben erwähnt, typischerweise bei Patienten mit M. Basedow auf. Sie kommen jedoch auch bei der Autoimmunthyreoiditis Hashimoto und anderen Schilddrüsenerkrankungen vor. TRAK wirken als TSH- Agonisten. Sie binden an Epitope der TSH- Rezeptoren und stimulieren die Adenylatzyklase. Die Produktion des Second Messengers cAMP wird gesteigert und somit auch die Ausschüttung der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T₄) und Trijodthyronin (T₃).

TRAK sind heterogene Antikörper. Man kann sie nach ihrer Funktion in stimulierende und blockierende Antikörper einteilen [M. Zakarija et al. 1983]. Außerdem geht man von einer dritten Klasse von Antikörpern aus, die zwar an den TSH- Rezeptor binden, aber keine intrinsische Funktion besitzen [Gupka 1992]. Eine ähnliche Einteilung findet man bei Kohn et al. (1985), welcher stimulierende, blockierende und gemischte Antikörper unterscheidet.

Die Entdeckung blockierender Antikörper wurde aufgrund der Kenntnis gemacht, dass die Schilddrüse bei der hypothyreoten Thyreoiditis Hashimoto unfähig ist auf die erhöhten TSH- Spiegel mit erhöhter Produktion peripherer Hormone zu reagieren. Dabei besetzen die blockierenden Antikörper TSH- Rezeptoren und hemmen somit die Adenylatzyklase und den weiteren Syntheseweg der Schilddrüsenhormone [Chiovato et al. 1990].

Die Bedeutung der Unterscheidung zwischen den Antikörpern liegt in der Möglichkeit zur Abschätzung der Prognose bei Patienten mit M. Basedow. Eventuell lassen sich durch separate Antikörperbestimmung Aussagen über eine Remission oder einen Übergang in eine Hypothyreose unter thyreostatischer Therapie treffen [Scherbaum 1993].

Mit den in der Klinik verwendeten Routinemethoden zur TRAK- Bestimmung kann aber nicht zwischen den verschiedenen Antikörpertypen unterschieden werden, es wird nur die Gesamtheit aller Antikörper gemessen. Dabei weist ein anhaltend hoher Antikörpertiter auf die Persistenz oder einen drohenden Rückfall in die Hyperthyreose bei M. Basedow hin. Ein erhöhter Antikörpertiter im Blut von Schwangeren ist außerdem ein Hinweis auf mögliche Risiken einer intrauterinen bzw. neonatalen Hyperthyreose des Kindes [Matsuda et al. 1988; Zakarija et al. 1983]. Das liegt daran, dass TRAK von intrathyreoidalen B- Lymphozyten gebildete Antikörper der Klasse IgG, und somit plazentagängig sind.

Die Entstehung bzw. der Verlauf einer Schilddrüsenerkrankung kann aber nicht allein aus dem Vorhandensein von Antikörpern erklärt werden. Es gibt Hinweise dafür, dass z.B. auch das Zytokinmuster verschiedener T- Helferzellen der Schilddrüse, die bei einer Entzündung auftreten, und Mutationen des TSH- Rezeptors eine Rolle spielen [Cuddihy et al. 1997].

3.2. Antikörper gegen das mikrosomale Schilddrüsenantigen Thyreoperoxidase

Das konventionelle mikrosomale Schilddrüsenantigen ist identisch mit der Thyreoperoxidase. Dies wurde 1985 erstmals von Czarnocka et al. beschrieben. 1986 wurde die TPO kloniert [Magnusson et al. 1986] und 1987 gelang dieses beim thyroidalen mikrosomalen Antigen [Seto et al. 1987; Libert et al. 1987].

TPO ist ein Protein auf der Oberfläche der Zelle und besteht aus 933 AS. Die Polypeptidkette zeigt auf der intrazellulären Seite (63 AS) ein hydrophobes N-terminales Signalpeptid. Der größte Teil (845 AS) befindet sich aber extrazellulär, was dem Lumen des Follikels entspricht. Eine transmembrane Domäne verbindet beide Anteile [Yokoyama et al. 1988].

TPO- Antikörper sind heterogen und gehören der IgG- Klasse an. Ihnen wird vor allem die Zerstörung der Follikelzellen bei der Autoimmunthyreoiditis zugeschrieben. Durch Bindung von Komplement vermitteln sie die Zytotoxizität [Scherbaum 1993], welche an der Ausbildung einer Hypothyreose bei M. Basedow- Patienten beteiligt sein könnte [Bogner et al. 1984; Khoury 1981].

Außer mit Schilddrüsenerkrankungen werden TPO mit anderen Erkrankungen assoziiert. Hierbei wären zu nennen Diabetes mellitus Typ 1, M. Addison oder Systemischer Lupus erythematodes.

3.3. Thyreoglobulin- Antikörper

Thyreoglobulin- Antikörper (TAK) findet man in 60 bis 70% bei Patienten mit Autoimmunthyreoiditis und in 20 bis 40% bei Patienten mit M. Basedow.

Die Grundstruktur der TAK wurde 1985 aufgedeckt [Malthiery et al. 1985].

Da TAK aufwendig nachzuweisen sind und in der Pathogenese von Krankheiten eine untergeordnete Rolle spielen, werden sie vielmehr als Marker herangezogen.

4. Ziel

Die herkömmlichen und die derzeitig verwendeten Screening- Tests (RRA) zur Detektion von Antikörpern bei Schilddrüsenerkrankungen sind sehr geeignete Methoden, um Verdachtsdiagnosen wie M. Basedow oder Hashimoto- Thyreoiditis zu bestätigen oder auszuschließen. Ihr Nachteil ist jedoch, dass sie nicht differenzieren können, ob es sich um Antikörper stimulierender, blockierender oder ohne weitere Funktion handelt. Diese Unterscheidung könnte aber wichtige Hinweise dafür liefern, warum das klinische Bild bei vielen Erkrankten nicht mit dem Vorhandensein oder der Höhe der TRAK korreliert und Anhaltspunkte über die Prognose über den weiteren Verlauf der Erkrankung geben.

Um die unterschiedlichen Antikörpertypen getrennt erfassen zu können, wurden die Versuche in dieser Arbeit mithilfe eines cAMP- Assays durchgeführt.

Als Träger der TSH- Rezeptoren bediente man sich einer Zelllinie JP 26 chinesischer Hamster- Ovarien (CHO)- Zellen, welche in etwa die gleiche Dichte von Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimieren, wie menschliche Thyreozyten. Bisher wurden nur wenige Studien mit JP 26 durchgeführt. Die meisten Veröffentlichungen bezogen sich auf Arbeiten mit JP 09.

In dieser Studie sollte das Vorhandensein von funktionsstimulierenden und funktionsblockierenden TRAK bei großen Kollektiven von insgesamt über 300 Patienten mit M. Basedow, mit Hashimoto- Thyreoiditis, mit anderen Autoimmunerkrankungen wie M. Addison und Diabetes mellitus Typ 1, mit nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen wie Struma nodosa und Struma diffusa oder mit Thyreoiditis de Quervain getestet werden.

Die Erkrankung, bei der das Vorhandensein von Autoantikörpern diagnostisch die wohl größte Rolle spielt, ist M. Basedow.

Patienten, die an dieser Krankheit leiden, wurden deshalb nach den Kriterien Krankheits- bzw. Therapiedauer und Vorhandensein von TRAK im RRA in vier weitere Untergruppen eingeteilt.

Durch die Differenzierung der M. Basedow- Patienten sollten weiterhin folgende Sachverhalte untersucht werden:

Hat eine thyreostatische Therapie bei M. Basedow- Patienten einen Einfluß auf das Vorhandensein von TRAK mit stimulierender oder blockierender Funktion?

Werden mithilfe des cAMP- Assays bei den selben Patienten TRAK detektiert, wie auch beim RRA?

II. Material

1. Verwendete Materialien

1.1. Geräte

Autoklav, Typ 2450 EL	Fa. Tuttnauer/ Breda, NL
Brutschrank, CO ₂ - Auto- Zero	Fa. Haereus/ Hanau
Digital- pH- Meter, Typ 646	Fa. Knick/ Berlin
Kühlraum	Fa. Dieter Auth/ Offenbach
Lichtmikroskop, Phase Contrast 2, Typ 108	Fa. Nikon/ Düsseldorf
Multipetten	
Pipettierhilfe, Automatic- Sarpette	Fa. Sarstedt/ Zürich
Sartorius- Vorwaage, Typ 2462	Fa. Sartorius/ Göttingen
Schüttler, IKA- Vibrax- VXR, Typ VX1	Fa. Janke & Kunkel/ Luckenwalde
Separatoren	
Sterile Werkbank, Lamin Air HLB 2448 GS	Fa. Haereus/ Hanau
Vortex, Reax 2000	Fa. Heildolph/ Schwabach
Wasserbad	Fa. Memmert/ Schwabach
Zentrifuge, Rotixa/ RP	Fa. Hettrich/ Wernecke
γ- Counter, LB 2111	Fa. Berthold/ Barsinghausen

1.2. Verbrauchsmaterialien

Combitips 25 ml	Fa. Eppendorf/ Köln
Falconröhrchen, Conical Tubes, steril, 15 ml	Fa. Falcon/ Gräfelting
Glaspipetten, steril, 5 ml/ 10 ml	Fa. Brand/ Wertheim
Latex- Handschuhe, No Powder	Fa. Ansell Medical/ München
Plastikpipetten, steril, 5 ml/ 12 ml/ 25 ml	Fa. Greiner/ Solingen
Sartolab V500	Fa. Sartorius/ Göttingen
96- Wellplatten, Multidish, Nuclon Surface	Fa. Brand/ Wertheim
Zellkulturflaschen, steril, 250 ml (75 cm ²)	Fa. Falcon/ Gräfelting

1.3. Zellkulturmedium

Fötale Kälberserum (FKS)	Fa. Sigma/ Deisenhofen
Penicillin/ Streptomycin- Lösung, steril, 100 ml	Fa. Sigma/ Deisenhofen
5000 U/ml Penicillin und 5000 mg/ml Streptomycin	
Zellkulturmedium (IMDM), 1 U/l	
W/o Supplements, w/o Glutamine, w/o NaHCO ₃	Fa. Gibco BRL/ Eggenstein

1.4. Chemikalien und Lösungen

Albumin bovine Fraction V, pH 7,0, 25 g	Fa. Boehringer/ Ingelheim
PBS Dulbeccos w/o Ca. und Mg.	Fa. Gibco BRL/ Eggenstein
Trypan Blau- Lösung (Lsg.) (0,4 %), 100 ml	Fa. Sigma/ Deisenhofen
Trypsin/ EDTA- Lsg., 100 ml, 0,05/ 0,02 %ig in PBS	Fa. Sigma/ Deisenhofen

1.5. Standardchemikalien

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

1.6. Desinfektionsmittel

Flächendesinfektion, Aerodesin 2000, 1000 ml	Fa. Lysoform/ Berlin
Handedesinfektion, Amphisep E, 500 ml	Fa. Bode Chemie/ Hamburg

1.7. BIOTRAK- KIT

cAMP [¹²⁵ I] assay system	Fa. Amersham/ Buckinghamshire
---------------------------------------	-------------------------------

2. Zelllinien

Die cAMP- Assays fanden mit Chinesischen Hamster- Ovarien (CHO)- Zellen der Zelllinie JP 26, mit stabil exprimierten humanen TSH- Rezeptoren auf der Oberfläche, statt. Als Kontrolle dienten CHO- Zellen der Zelllinie JP 02 ohne Oberflächenrezeptoren. Diese Zelllinien wurden von der Firma *G. Vassart, Brüssel* zur Verfügung gestellt.

3. Antikörper

Bei einem Vorversuch wurden Mäuse- IgG (Klon 3H10) mit der Stammkonzentration von 0,56 mg/ml von der Firma *Brahms* verwendet.

4. Patientenseren

Die getesteten Patientenseren wurden von der Endokrinologischen Ambulanz des Instituts für Innere Medizin I der J. W. Goethe- Universitätsklinik, Frankfurt a. M. zur Verfügung gestellt.

III. Methoden

Das Kultivieren, das Passagieren sowie das Einbringen der CHO- Zellen auf die Wellplatten erfolgten unter einer sterilen Werkbank.

1. Kultivierung der CHO- Zellen

Die CHO- Zellen wurden in sterilen Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und einer 5%-igen feuchten CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium diente IMDM mit 5% FKS und einer Penicillin (125 U/ml)- Streptomycin (125 mg/ml)- Lösung.

Alle zwei bis drei Tage wurde das alte Nährmedium verworfen und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Passagiert wurden die Zellen je nach Wachstumsgeschwindigkeit ein- bis zweimal pro Woche.

2. Passagieren der CHO- Zellen

Zuerst wurde das Nährmedium aus den Zellkulturflaschen abgeschüttet, daraufhin die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. 5 ml Trypsin wurden danach in die Zellkulturflasche pipettiert und die Zellen für zwei Minuten in den Brutschrank gestellt, da festgestellt wurde, dass sich die CHO- Zellen so besser vom Boden der Kulturflasche ablösen lassen. Durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche nach dem Herausnehmen, konnten auch die restlichen Zellen gelöst werden.

Nachdem 10 ml Nährmedium in die Zellkulturflasche zur Neutralisation des Trypsins hinzugegeben wurden, konnte die Lösung samt Zellsuspension in ein Falcon- Röhrchen pipettiert werden.

Die so behandelten Zellen wurden sofort bei einer Geschwindigkeit von 1200 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet am Boden des Gefäßes durch Beklopfen des Röhrchens aufgelockert. Durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium konnten die CHO- Zellen in eine sterile Pipette aufgenommen und in frische Zellkulturflaschen überführt oder weiter zur Untersuchung verwendet werden.

3. Gewinnung der Patientenserum aus Blutproben

Die Blutproben der Patienten wurden bei 2000 U/min, 10 Minuten lang zentrifugiert und die so gewonnenen Seren im Kühlraum bei -20°C bis zum Versuch aufbewahrt.

4. Radioimmunoassay

4.1. Vorbereitung

Die vorher passagierten CHO- Zellen wurden mit 5 ml Nährmedium versetzt und unter sterilen Bedingungen gut durchmischt.

Danach wurde eine kleine Probe der Zellsuspension entnommen, in ein Reagenzröhrchen gegeben und mithilfe eines *Vortex*- Gerätes homogenisiert.

10 µl des Homogenisats wurden mit 90 µl *Trypan Blau* versetzt und durch Vortexen gut vermischt.

Wiederum 10 µl dieser gefärbten Zellsuspension wurden auf eine vorher gesäuberte und mit einem Deckglas versehene *Neubauer- Zählkammer* gegeben. Anschließend wurde die Konzentration der CHO- Zellen in der Zellsuspension, durch Auszählen der Zellen in den einzelnen Quadranten unter einem Mikroskop, ermittelt.

Die Zellzahl/ ml wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ ml} = \text{MW der Zellanzahl aus den vier Quadranten} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Zellsuspension wurde mit Nährmedium so verdünnt, dass sich eine Endkonzentration von 10^5 Zellen /ml ergab. 100 µl (10^4 Zellen) dieser vorher gründlich durchgemischten Zellsuspension wurden in jede Vertiefung einer *96- Lochplatte* pipettiert.

Die *96- Wellplatten* wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C unter einer 5%- igen feuchten CO₂- Atmosphäre für 24 Stunden inkubiert, so dass die CHO- Zellen am Boden der Plattenvertiefungen einen Zellrasen bilden konnten.

4.2. Bestückung der 96- Wellplatten

Die am Vortag vorbereiteten *96- Wellplatten* wurden dekantiert, danach je zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurde die in den Vertiefungen noch befindliche Flüssigkeit mithilfe einer Pipette abgesaugt.

In die einzelnen Vertiefungen wurden je nach Versuch folgende Substanzen in doppeltem Ansatz nacheinander pipettiert:

Versuch zur Bestimmung der Funktion stimulierender AK	Versuch zur Bestimmung der Funktion blockierender AK
60 µl KRB (hypoton) 20 µl IMBX 20 µl Patientenserum	40 µl KRB (hypoton) 20 µl IMBX 20 µl Patientenserum 20 µl TSH (Konz.: 0,5 mU/ml)

Bei jedem Assay wurde eine Leerwertbestimmung mit Kulturmedium sowie die Messung einer TSH- Verdünnungsreihe durchgeführt.

Leerwertbestimmung

Bei der Leerwertbestimmung wurden als Testsubstanz 20 µl Nährmedium verwendet. Ansonsten enthielten die Vertiefungen 60 µl KRB und 20 µl IMBX.

Standardkurve

Zur Ermittlung der Standardkurve wurde eine TSH- Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen erstellt: 0,5 mU/ml, 0,05 mU/ml, 0,005 mU/ml und 0,0005 mU/ml, wobei in die einzelnen Vertiefungen 20 µl der jeweiligen TSH- Verdünnung, 60 µl KRB und 20 µl IMBX pipettiert wurden.

Die 96- Wellplatten wurden nach der Präparation für genau zwei Stunden zur Inkubation in den Brutschrank gestellt. Diese Inkubationszeit wurde laut verschiedener Literatur empfohlen [Vitti et al. 1993; Morgenthaler et al. 1998]. Danach wurde der Inhalt der einzelnen Vertiefungen in Reagenzröhrchen pipettiert und im Kühlraum bei -20°C bis zur Auswertung aufbewahrt oder gleich ausgewertet.

4.3. Auswertung

Die Auswertung der Bio- Assays fand mit dem BIOTRAK[®] cAMP [¹²⁵I] assay system nach angegebener Anleitung statt.

Es wurde der Nicht- Acetylations- Assay verwendet (siehe Diskussion, V.1.3.).

Die Auswertung wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, jedoch innerhalb von 24 Stunden durchgeführt.

4.3.1. Verwendete Reagenzien des Assay- Systems

Amerlex- M Sekundäres- Antikörper- Reagenz

Anti- Kaninchen- Serum vom Esel, umhüllt mit magnetisierenden Polymerpartikeln, blau- grün- farbkodiert, gebrauchsfertig, 55 ml

Antiserum

Kaninchen- Anti- Succinyl- cAMP- Serum

2,5 M- Acetat-Puffer

cAMP- Standard

2 ml cAMP- Standard: 64 pmol, nach Auflösen ergibt sich eine Konzentration von 32 pmol cAMP/ml

Tracer

Adenosin 3',5'- Zyklische Phosphorsäure 2'- 0- Succinyl- 3- [¹²⁵I] Jodthyrosin- Methylester
~59 kBq, 1,6 µCi

4.3.2. Auswertungsverfahren

Als Vorbereitung zur Auswertung wurden die Reagenzien und Testproben verdünnt und bis zum nächsten Tag zur Inkubation bereitgestellt.

Verdünnung der Reagenzien

Die Reagenzien wurden zunächst auf Zimmertemperatur erwärmt, danach konnte mit der Verdünnung der Reagenzien begonnen werden:

10 ml des Acetat- Puffer- Konzentrates wurden in 500 ml destilliertem Wasser aufgelöst, so dass sich ein 0,05 M Acetat- Puffer ergab, und mithilfe eines Magnetrührgerätes 10 Minuten lang homogenisiert.

Der cAMP- Standard wurde anschließend in 2 ml Puffer, Tracer und Antiserum jeweils in 11 ml Puffer aufgelöst. Danach wurden diese Reagenzien für 20 Minuten auf ein Rührband gelegt.

Verdünnung der Testproben

In der Zwischenzeit konnten die zu untersuchenden Testproben verdünnt werden. Sofern sie gekühlt aufbewahrt worden waren, mussten auch sie vorher auf Zimmertemperatur erwärmt werden. Danach wurde in jedes Teströhrchen 1 ml Puffer hinzugegeben und die Röhrchen mithilfe eines Vortex- Gerätes homogenisiert.

Erstellen der cAMP- Standard- Verdünnungsreihe

500 µl des Standardreagenzes mit der Konzentration von 32 pmol cAMP/ml wurden im ersten Verdünnungsschritt mit 500 µl Puffer verdünnt und anschließend homogenisiert. So ergab sich in der ersten Verdünnung eine Konzentration von 16 pmol cAMP/ml. 500 µl dieser Suspension wurden nun wieder mit 500 µl Puffer verdünnt und homogenisiert. Nach diesem Schema wurden 8 Verdünnungsstufen erstellt, wobei die letzte Verdünnung eine Konzentration von 0,25 pmol cAMP/ml aufwies.

50 µl, sowohl der jeweiligen Verdünnung, als auch der Testproben, wurden im Doppelansatz zur weiteren Bearbeitung abpipettiert. In alle so vorbereiteten Reagenzröhrchen wurden 50 µl Tracer und anschließend 50 µl Antigen (Patientenserum) dazugegeben.

Als Leerwert wurden 50 µl Puffer, zur Ermittlung der Gesamtaktivität wurden 50 µl Tracer verwendet.

Nach nochmaligem Homogenisieren mithilfe des Multi- Tube- Vortex und Abdecken der Platten, auf welche die Reagenzröhrchen aufgesteckt wurden, konnten die Testsubstanzen bis zur weiteren Bearbeitung am nächsten Tag bei -20°C aufbewahrt werden.

Zu Beginn des zweiten Tages wurden die Proben auf Zimmertemperatur erwärmt und das Sekundäre- Antikörper- Reagenz für ca. 5 Minuten auf dem Rührband homogenisiert. Bei diesem Vorgang konnte ein Farbumschlag von blau nach grün beobachtet werden.

Anschließend wurden in alle Proberöhrchen 250 µl des Sekundären- Antikörper- Reagenzes pipettiert. Danach wurden die Platten mithilfe des Multi- Tube- Vortex wieder homogenisiert.

Nach einer Inkubation von 10 Minuten wurden die Platten für 30 Minuten auf Separatoren gestellt, wobei man eine rot- braune Verfärbung am Boden der Röhrchen erkennen konnte.

Nach dieser Zeit wurden die Platten dekantiert und für 10 Minuten stehen gelassen, anschließend erfolgte eine Spülung der Probenröhrchen mit destilliertem Wasser, danach die Homogenisierung. Nach weiteren 15 Minuten wurde wieder dekantiert.

Die Aktivität der einzelnen Proben konnte anschließend mithilfe des Gamma- Counters gemessen werden.

5. Auswahlkriterien und Einteilung der Patientenseren

Das Vorhandensein von Autoantikörpern sollte bei Patienten mit M. Basedow, bei Patienten mit anderen Schilddrüsenerkrankungen und anderen Autoimmunerkrankungen bestimmt werden. Die Patienten wurden ihrer Erkrankung nach in eine der folgenden sechs Gruppen eingeteilt:

Gruppe	Erkrankung
Gruppe I	M. Basedow
Gruppe II	Kontrollkollektiv
Gruppe III	Hashimoto- Thyreoiditis
Gruppe IV	Andere Autoimmunerkrankungen: M. Addison, Diabetes mellitus Typ 1
Gruppe V	Nicht- autoimmune Schilddrüsenerkrankungen: Struma nodosa, Struma diffusa, Autonomes Adenom
Gruppe VI	Thyreoiditis de Quervain

Als Kontrollkollektiv dienten Patienten der Endokrinologischen Ambulanz, die weder wegen einer Schilddrüsen- noch einer Autoimmunerkrankungen in Behandlung waren. Die häufigste Erkrankung in dieser Gruppe stellte der Diabetes mellitus Typ 2 dar.

Patienten mit M. Basedow, Gruppe I, wurden nach zwei Einteilungskriterien in vier Untergruppen, Ia bis Id, unterteilt.

Erstes Kriterium sollte die Höhe der TRAK im Routine- TRAK- Assay[®] sein. Werte von ≥ 15 U/l wurden als TRAK positiv, Werte von ≤ 10 U/l, als TRAK negativ gewertet. Dieses Kriterium wurde eingesetzt, um den herkömmlichen TRAK- Assay[®] und den hier verwendeten cAMP- Assay hinsichtlich ihrer Sensitivität bei der Feststellung von TRAK vergleichen zu können. Außerdem sollte überprüft werden, aus welchen Typen von Antikörpern sich die TRAK zusammensetzen: aus Antikörpern stimulierender oder blockierender Funktion.

Das zweite Kriterium war die Behandlungsdauer der Patienten mit thyreostatischen Medikamenten, da man den Einfluß einer thyreostatischen Behandlung auf das Auftreten von Antikörpern mit stimulierender und blockierender Funktion überprüfen wollte.

Tab. 1: Einteilung der Patienten mit M. Basedow in vier Untergruppen anhand der TRAK-Höhe und der medikamentösen Behandlungsdauer

	Antikörper	
	TRAK positiv ≥ 15 U/l	TRAK negativ ≤ 10 U/l
<u>M. Basedow- Patienten</u>		
Thyreostatische Behandlung kürzer als vier Wochen (florider MB)	Gruppe Ia	Gruppe Ib
Thyreostatische Behandlung länger als neun Monate (behandelter MB)	Gruppe Ic	Gruppe Id

Patienten, deren medikamentöse Behandlungsdauer zwischen vier Wochen und neun Monaten betrug, wurden nicht in die Studie aufgenommen.

IV. Ergebnisse

1. Vorversuche

1.1. Vergleich der cAMP- Konzentrationen der CHO- Zelllinien JP 26 und JP 02

Um zu beweisen, dass bei der CHO- Zelllinie JP 02, im Gegensatz zur CHO- Zelllinie JP 26, keine TSH- Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert sind, wurde auf beide Zelllinien parallel eine TSH- Verdünnungsreihe gegeben.

Tab. 2: cAMP- Konzentrationen (Konz.) in pmol/ml (n = 4) in Abhängigkeit bestimmter TSH- Konzentrationen bei JP 26 und JP 02, Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD).

TSH- Konz.	5 mU/ml	0,5 mU/ml	0,05 mU/ml	0,005 mU/ml	0,0005 mU/ml
JP 26 cAMP [pmol/ml]	2070,5	644,1	95,8	47,1	40,2
	2019,4	577,3	86,9	41,6	40,1
	2100,9	1087,7	165,2	73,9	68,7
	1928,3	1243,5	180,1	66,6	63,6
	MW ± SD	2029,8 ± 75,5	888,2 ± 327,8	132 ± 47,5	57,3 ± 15,4
JP 02 cAMP [pmol/ml]	15,0	12,6	13,3	14,5	9,7
	14,0	9,6	10,5	13,3	9,0
	12,4	11,0	11,3	13,5	9,0
	14,3	17,2	16,7	16,3	11,1
	MW ± SD	13,9 ± 1,1	12,6 ± 3,3	13,0 ± 2,8	14,4 ± 1,4

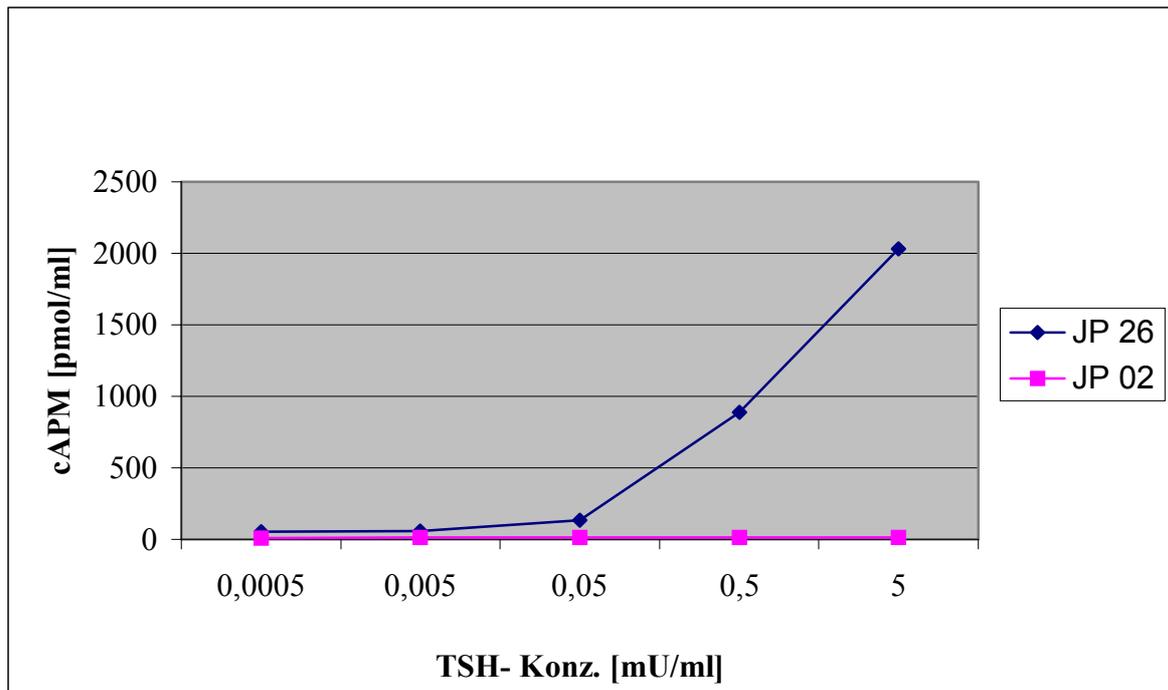


Abb. 1: Vergleich der MW der cAMP- Konz. von JP 26 und JP 02 in Abhängigkeit bestimmter TSH- Konzentrationen.

Bei den CHO- Zellen JP 26 steigt die cAMP- Konzentration mit steigender TSH- Konzentration an. Dagegen ist bei JP 02 die cAMP- Produktion bei allen Konzentrationen vernachlässigbar gering.

1.2. TSH- Verdünnungsreihe mit JP 26

Vor der Testung von Patientenserum wurden in neun Versuchen TSH- Standardkurven mit der Zelllinie JP 26 erstellt.

Tab. 3: cAMP- Konz. und SD bei verschiedenen TSH- Konz. einer TSH- Verdünnungsreihe.

TSH- Konz. [mU/ml]	cAMP- Konz. [pmol/ml] ± SD
0,0005	58,4 ± 106,9
0,005	58,4 ± 484,6
0,05	117,8 ± 61,7
0,5	792,8 ± 17,3
5	2028,1 ± 20,4

Als cAMP- Konzentrationen sind die Mittelwerte (MW) aus 9 Messreihen mit der dazugehörigen TSH- Konzentration angegeben. Bei steigender TSH- Konzentration steigt auch die cAMP- Konzentration. Die Zellen der CHO- Zelllinie JP 26 verhalten sich also wie humane Thyreozyten, bei denen eine steigende TSH- Konzentration ebenfalls zu einer verstärkten cAMP- Produktion führt.

1.3. Kompetitiver Hemmversuch mit blockierenden IgG- Antikörpern und TSH

Um die Hemmung von TSH- Rezeptoren, und somit die verminderte cAMP- Produktion bei CHO- Zellen der Zelllinie JP 26 durch blockierende Antikörper zu untersuchen, wurde ein Versuch mit blockierenden Mäuseantikörpern vom Typ IgG durchgeführt.

Diese Messungen wurden im Rahmen der Vorversuche vor dem Versuch zur Bestimmung funktionsblockierender Antikörper in Patientenseren vorgenommen.

Es wurde eine IgG- Verdünnungsreihe ausgehend von der Stammkonzentration 0,56 mg/ml erstellt, wobei in fünf Schritten jeweils um den Faktor 10 verdünnt wurde.

Diese Verdünnungsreihe wurde mit zwei unterschiedlichen TSH- Konzentrationen (0,5 mU/ml und 0,005 mU/ml) auf die Zelllinie JP 26 aufgetragen.

Das Ziel dieses Versuches war es, diejenige TSH- Konzentration zu ermitteln, bei der eine eindeutige Hemmwirkung der blockierenden IgG- Antikörper auf die cAMP- Produktion beobachtet werden kann.

Das **Pipettierschema** setzte sich folgendermaßen zusammen:

40 µl KRB (hypoton)
20 µl IMBX
20 µl TSH (in der jeweiligen Konzentration)
20 µl IgG (in der jeweiligen Verdünnung)

Tab. 4: cAMP- Konz. nach kompetitiver Hemmung von IgG- AK mit TSH in verschiedenen Konzentrationen.

IgG- Konz. [mg/ml]	cAMP- Konz. [pmol/ml] bei TSH- Konz.: 0,5 mU/ml	cAMP- Konz. [pmol/ml] bei TSH- Konz.: 0,05 mU/ml
0,0000056	1067,6	115,4
0,000056	1037,1	120,5
0,00056	889,2	112,7
0,0056	564,1	65,8
0,056	287,7	58,1

Die hemmende Wirkung der blockierenden IgG- Antikörper auf die cAMP- Produktion der CHO- Zellen war deutlicher bei der TSH- Konzentration von 0,5 mU/ml zu sehen. Bei der TSH- Konzentration von 0,05 mU/ml war zwar auch eine hemmende Wirkung zu beobachten, die Messergebnisse waren aber durchgehend sehr niedrig.

Ergebnisse

Bei steigender IgG- Konzentration nahm die cAMP- Konzentration sowohl bei der TSH- Konzentration von 0,5 mU/ml, als auch von 0,05 mU/ml ab. Um genauere Ergebnisse zu erhalten, wurden 10 Messungen mit der IgG- Verdünnungsreihe und der TSH- Konzentration von 0,5 mU/ml durchgeführt, was in der folgenden Tabelle gezeigt wird.

Tab. 5 : cAMP- Konz. beim Hemmversuch mit einer IgG- AK- Verdünnungsreihe und einer TSH- Konz. von 0,5 mU/ml . Die cAMP- Konz. sind MW aus 10 Messungen.

IgG- Konz. [mg/ml]	cAMP- Konz. [pmol/ml] bei TSH- Konz. von 0,5 mU/ml
0,0000056	556,1
0,000056	536,5
0,00056	427,3
0,0056	253,4
0,056	172,2

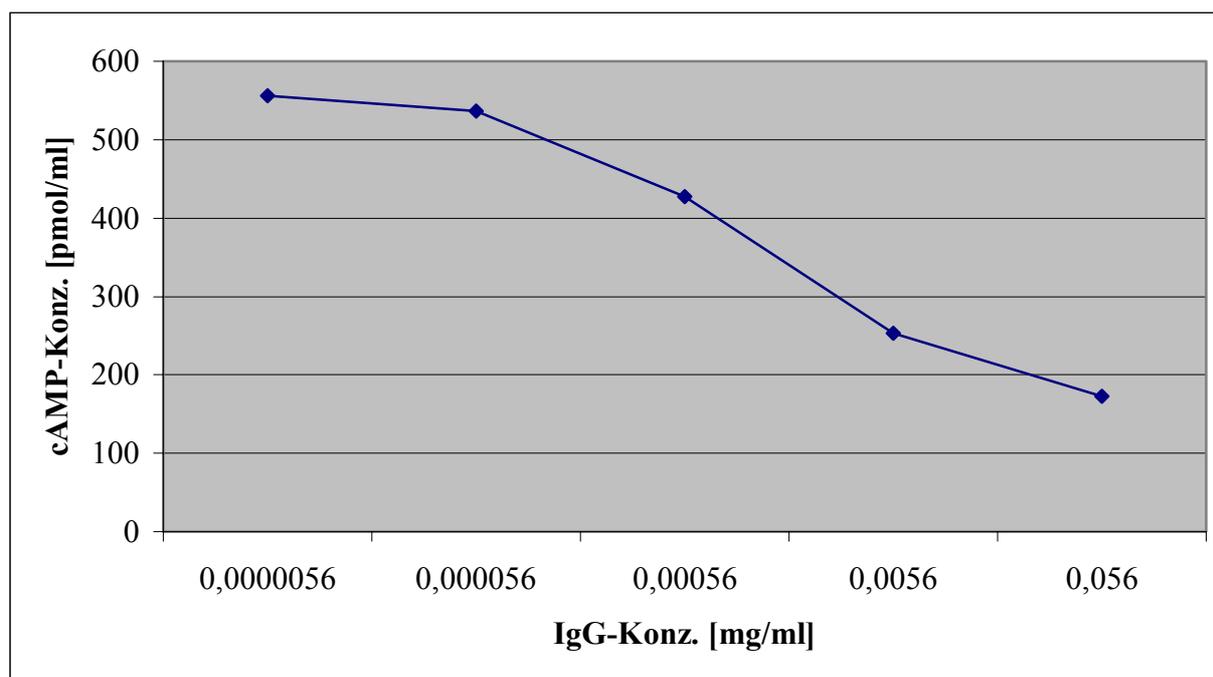


Abb. 2: cAMP- Konz. beim Hemmversuch mit einer IgG- AK- Verdünnungsreihe und einer TSH- Konz. von 0,5 mU/ml . Die cAMP- Konz. sind MW aus 10 Messreihen.

Auch hier wird noch einmal deutlich, dass sich die cAMP- Konzentration und die jeweilige IgG- Konzentration umgekehrt proportional verhalten.

Aufgrund dieses Versuches wurde die Entscheidung getroffen, für die folgenden Bestimmungen von blockierenden Antikörpern in Patientenseren, die TSH- Konzentration von 0,5 mU/ml zu verwenden.

2. Antikörper mit stimulierender Funktion am TSH- Rezeptor

2.1. Funktionsstimulierende Antikörper aller Patientengruppen

Mithilfe des cAMP- Bio- Assays wurde im Serum von Patienten die Funktion stimulierender Antikörper nachgewiesen. Da die cAMP- Produktion durch die Anwesenheit von stimulierenden Antikörpern angeregt wird, ist die Höhe der cAMP- Konzentration der Höhe des Antikörpertiters direkt proportional.

2.1.1. Vergleich der Patientengruppen mit dem Kontrollkollektiv

Tab. 6: Anzahl (n) der Patienten, MW \pm SD und Mediane der cAMP- Konz. in den einzelnen Patientengruppen.

Gruppen	n	cAMP- Konz. [pmol/ml]	
		MW \pm SD	Median
I (M. Basedow)	119	119,6 \pm 149	84,0
II (Kontrolle)	87	49,4 \pm 17	50,5
III (Hashimoto- Th.)	35	68,0 \pm 25	59,5
IV (Andere AIK)	18	50,4 \pm 16	50,0
V (Struma)	46	65,1 \pm 19	61,5
VI (Th. de Quervain)	4	63,4 \pm 35	55,0

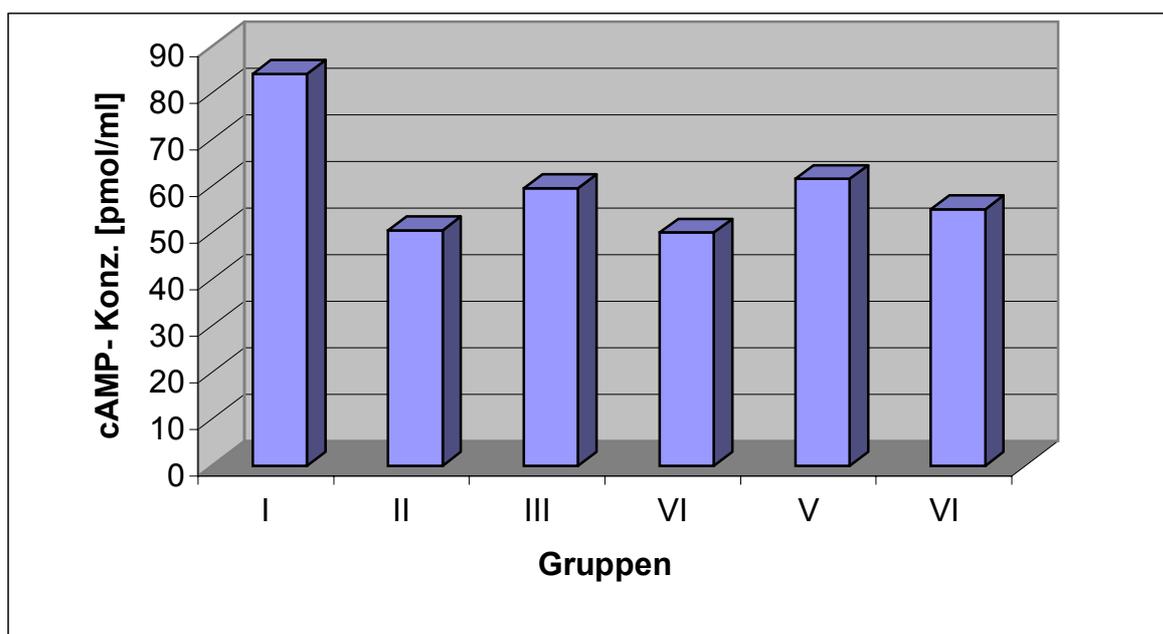


Abb. 3: Mediane der cAMP- Konz. in den Gruppen I (M. Basedow), II (Kontrolle), III (Hashimoto- Th.), IV (andere AIK), V (Struma) und VI (Th. de Quervain).

Vergleicht man die Werte fällt auf, dass die cAMP- Konzentrationen in den Gruppen III bis VI wesentlich niedriger sind als in der M. Basedow- Gruppe (I).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (II) ergeben sich signifikant erhöhte cAMP- Konzentrationen für die Gruppen der Patienten mit M. Basedow ($p < 0,001$), Hashimoto- Thyreoiditis ($p = 0,009$) und nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen ($p = 0,006$). In diesen Gruppen ist somit von dem Vorhandensein von Antikörpern mit stimulierender Funktion auszugehen.

In den Gruppen mit anderen Autoimmunerkrankungen ($p = 1$) und mit Thyreoiditis de Quervain ($p = 1$) gibt es keine signifikanten Unterschiede zu den cAMP- Konzentrationen der Kontrollgruppe.

2.1.2. Anteil der Patienten mit signifikant erhöhtem Antikörper- Titer

Im Folgenden soll näher auf die Werte der einzelnen Patienten eingegangen werden, um den Anteil der signifikant erhöhten cAMP- Werte in den einzelnen Gruppen bestimmen zu können. Hierbei wird sich auf die Kontrollgruppe II bezogen.

Der Grenzwert liegt bei der 4,4. Perzentile, ausgehend vom höchsten Wert der Kontrollgruppe II. Das heißt jeder Wert, der größer oder gleich 81,5 pmol/ml ist, ist als eindeutig erhöht zu betrachten. Bei diesen Patienten kann man von einem erhöhten Antikörper- Titer mit stimulierender Funktion ausgehen (siehe Statistik, IV.4.).

Für die Anzahl (n) der Patienten mit erhöhten cAMP- Konzentrationen ergibt sich folgende Verteilung:

Tab. 7: Anzahl (n) und prozentualer Anteil der Patienten mit signifikant erhöhter cAMP- Konz. am Gesamtkollektiv der einzelnen Gruppen.

Gruppen	n (gesamt)	n (mit erhöhter cAMP- Konz.)	Anteil der Patienten mit erhöhter cAMP- Konz. [%]
I (M. Basedow)	119	62	52,10
II (Kontrolle)	87	4	4,60
III (Hashimoto- Th.)	35	9	25,70
IV (Andere AIK)	18	1	5,56
V (Struma)	46	8	17,40
VI (Th. de Quervain)	4	1	25,00

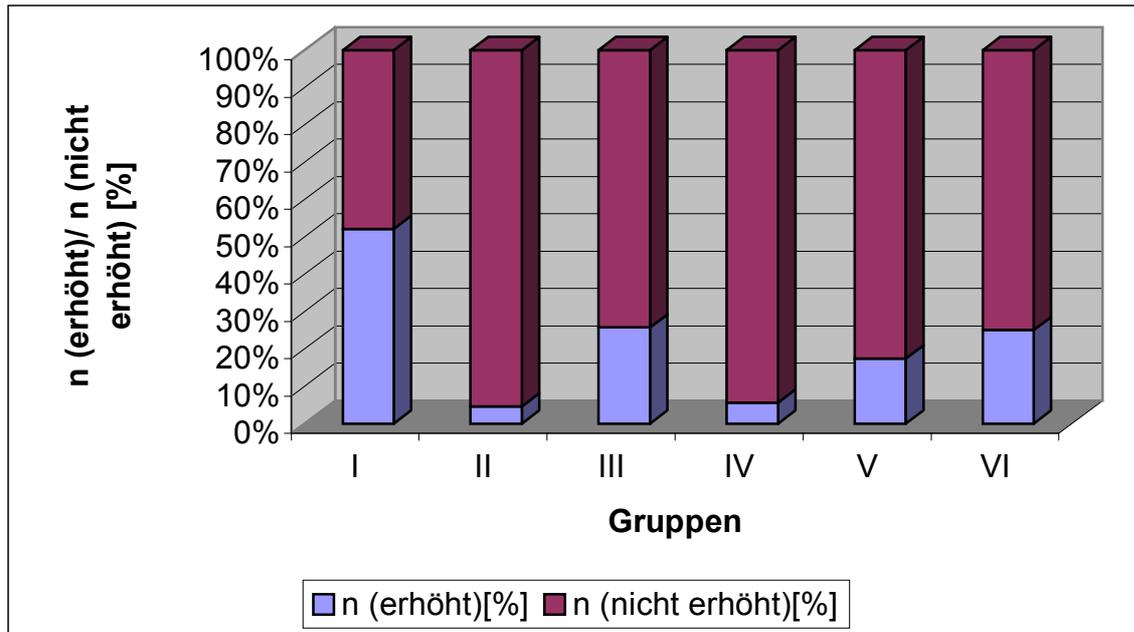


Abb. 4: Prozentualer Anteil der Patienten mit signifikant erhöhter cAMP- Konz. [n (erhöht)] am Gesamtkollektiv der Gruppen I (M. Basedow), II (Kontrolle), III (Hashimoto- Th.), IV (andere AIK), V (Struma) und VI (Th. de Quervain).

Anhand Tab. 7 und Abb. 4 ist zu erkennen, dass sich in Gruppe I, die sich aus Patienten mit M. Basedow zusammensetzt, mit 52,1 % die meisten Patienten mit erhöhten Antikörpertitern finden. In Gruppe III (Hashimoto- Thyreoiditis) und in Gruppe VI (Thyreoiditis de Quervain) lassen sich jedoch auch in ca. 25% der Fälle funktionsstimulierende Antikörper nachweisen. In der Gruppe V (nicht- autoimmune Schilddrüsenerkrankungen) weisen immer noch 17,4% der Patienten erhöhte Antikörpertiter auf, wobei in der Gruppe IV (andere Autoimmunerkrankungen) der Anteil mit 5,56% vernachlässigbar gering ist.

2.1.3. Geschlechtsverteilung der Patienten

Tab. 8: Anzahl (n) und prozentualer Anteil von Frauen (f) und Männern (m) am Gesamtkollektiv der einzelnen Gruppen.

Gruppen	n (f)	Anteil (f) [%]	n (m)	Anteil (m) [%]
I (M. Basedow)	92	77,3	27	22,7
II (Kontrolle)	44	50,6	43	49,4
III (Hashimoto- Th.)	31	88,6	4	11,4
IV (Andere AIK)	11	61,1	7	38,9
V (Struma)	33	71,7	13	28,3
VI (Th. de Quervain)	3	75,0	1	25,0

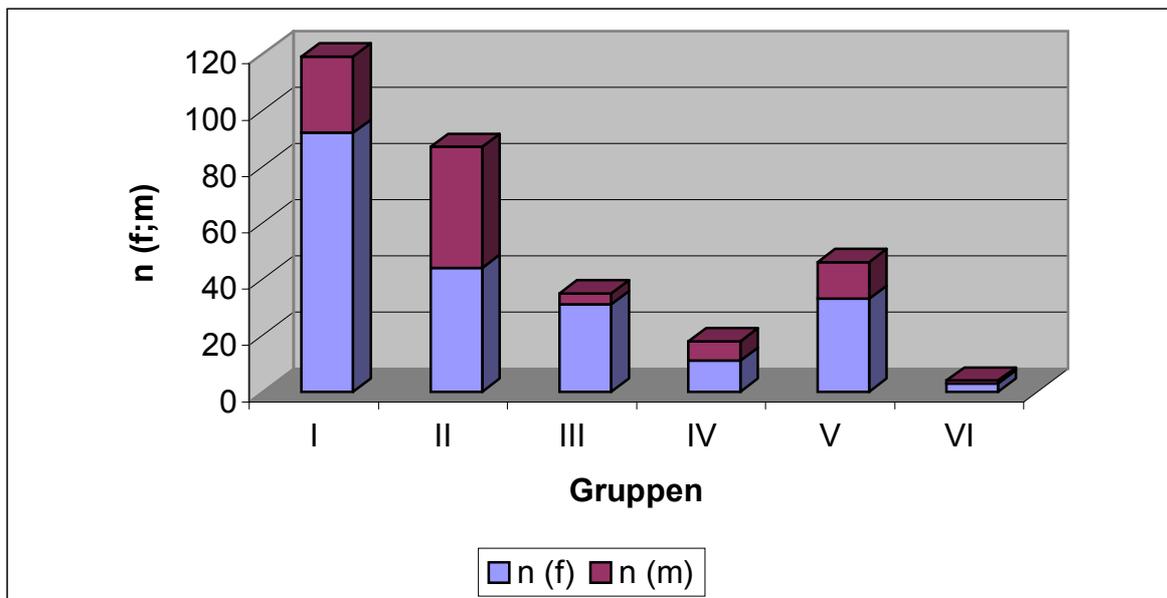


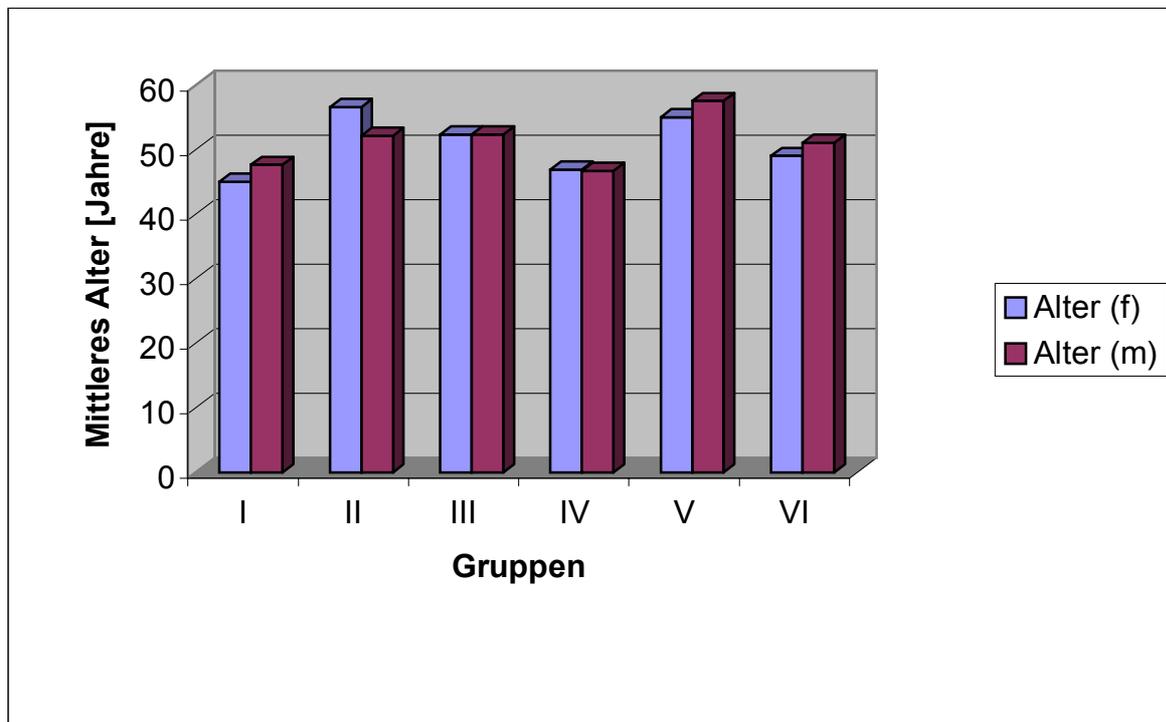
Abb. 5: Anzahl (n) von Frauen (f) und Männern (m) in den Gruppen I (M. Basedow), II (Kontrolle), III (Hashimoto- Th.), IV (andere AIK), V (Struma) und VI (Th. de Quervain).

Wie aus den Tabellendaten und der Grafik ersichtlich ist, überwiegt in allen Gruppen, außer in der Kontrollgruppe, der Anteil der Frauen gegenüber den Männern. In der Gruppe II, der Kontrollgruppe, ist das Verhältnis zwischen Männern und Frauen bewusst ausgeglichen gewählt worden.

Insgesamt wurden die Seren von 214 Frauen und 95 Männern untersucht.

2.1.4. Altersverteilung der Patienten**Tab. 9: Mittleres Alter in Jahren \pm SD der Patienten der Gruppen I bis VI, getrennt nach Frauen (f) und Männern (m).**

Gruppen	Alter (f) [Jahre] \pm SD	Alter (m) [Jahre] \pm SD
I (M. Basedow)	45,0 \pm 14,3	47,6 \pm 15,0
II (Kontrolle)	56,6 \pm 16,7	52,1 \pm 16,8
III (Hashimoto- Th.)	52,3 \pm 16,5	52,3 \pm 6,2
IV (Andere AIK)	46,9 \pm 15,9	46,7 \pm 11,3
V (Struma)	55,0 \pm 17,4	57,5 \pm 11,8
VI (Th. de Quervain)	49,0 \pm 18,0	51,0 \pm 0

**Abb. 6: Mittleres Alter in Jahren von Frauen (f) und Männern (m) der Gruppen I (M. Basedow), II (Kontrolle), III (Hashimoto- Th.), IV (andere AIK), V (Struma) und VI (Th. de Quervain).**

Zwischen Frauen und Männern bestehen keine wesentlichen Altersunterschiede innerhalb der gleichen Gruppe. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt etwa fünfzig Jahre.

2.2. Funktionsstimulierende Antikörper bei Patienten mit M. Basedow

Da bekanntlich Patienten mit M. Basedow (MB) Antikörper gegen den TSH- Rezeptor aufweisen, wurden diese Patienten in vier weitere Gruppen aufgeteilt, um diese näher zu betrachten.

Auf die Einteilungskriterien wurde bereits in den Abschnitten *Einleitung* und *Methoden* ausführlich eingegangen. Hier ist noch einmal ein Überblick über die Untergruppen der M. Basedow- Patienten:

	Antikörper	
<u>M. Basedow- Patienten</u>	TRAK positiv ≥ 15 U/l	TRAK negativ ≤ 10 U/l
Thyreostatische Behandlung kürzer als vier Wochen (florider MB)	Gruppe Ia	Gruppe Ib
Thyreostatische Behandlung länger als neun Monate (behandelter MB)	Gruppe Ic	Gruppe Id

2.2.1. Vergleich der M. Basedow- Untergruppen mit dem Kontrollkollektiv

Tab. 10: Anzahl (n) der Patienten, MW \pm SD und Mediane der cAMP- Konz. in den Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

Gruppen	n	cAMP- Konz. [pmol/ml]	
		MW \pm SD	Median
Ia	24	162,6 \pm 212	106,3
Ib	6	72,8 \pm 24	75,3
Ic	32	174,4 \pm 199	104,3
Id	57	75,6 \pm 41	71,0

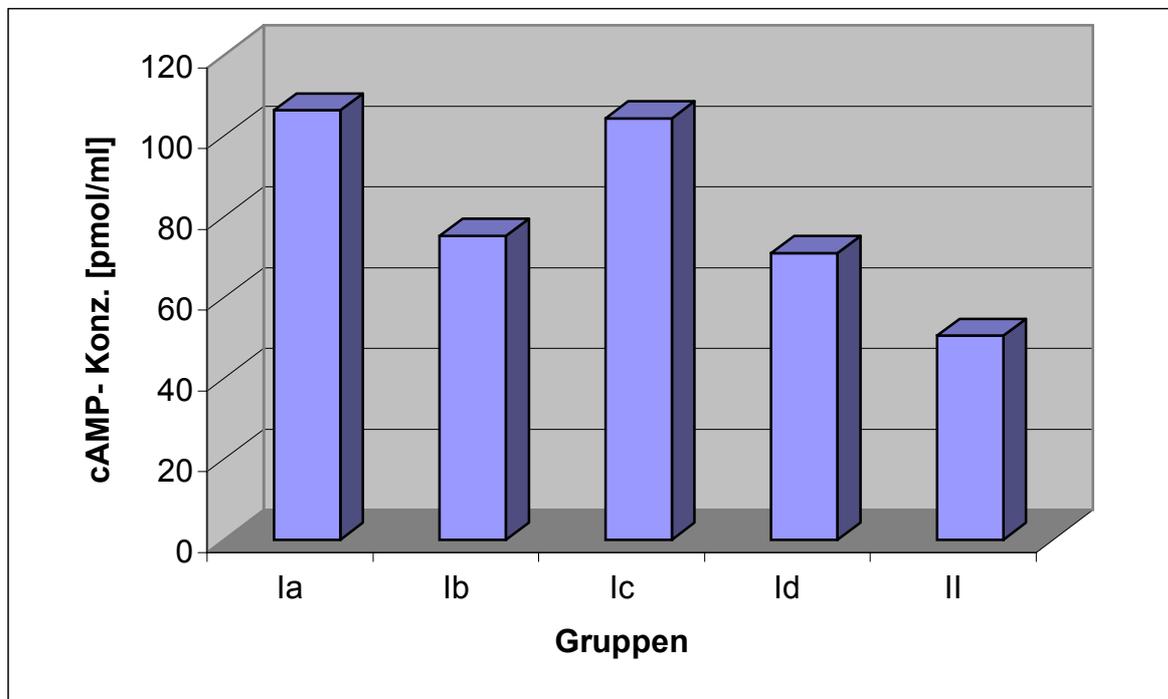


Abb. 7: Mediane der cAMP- Konz. in den Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv), Id (behandelter MB, TRAK negativ) und der Kontrollgruppe II.

Gruppen Ia und Ic, die aus Patienten mit positivem TRAK bestehen, zeigen deutlich höhere cAMP- Konzentrationen als die Gruppen Ib und Id, deren Patienten einen negativen TRAK im RRA aufweisen. In allen Gruppen finden wir signifikant hohe cAMP- Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe II, mit $p < 0,001$ in den Gruppen Ia, Ic und Id. In der Gruppe Ib ist mit einem p- Wert von 0,3 keine Signifikanz vorhanden.

2.2.2. Anteil der Patienten mit signifikant erhöhtem Antikörper- Titer

Nach dem gleichen statistischen Prinzip, wie schon bei der Auswertung aller Patientengruppen, wurde ein cAMP- Grenzwert von 81,5 pmol/ml ermittelt. Das heißt, alle Werte, die darüber liegen, lassen auf das Vorhandensein von Antikörpern mit stimulierender Funktion schließen. Zur genauen Berechnung siehe Statistik, IV.4.

Tab. 11: Anzahl (n) und prozentualer Anteil der Patienten mit Antikörpern stimulierender Funktion in den Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

Gruppen	n (gesamt)	n (mit erhöhter cAMP- Konz.)	Anteil der Patienten mit erhöhter cAMP- Konz. [%]
Ia	24	15	62,50
Ib	6	3	50,00
Ic	32	22	68,75
Id	57	22	38,60

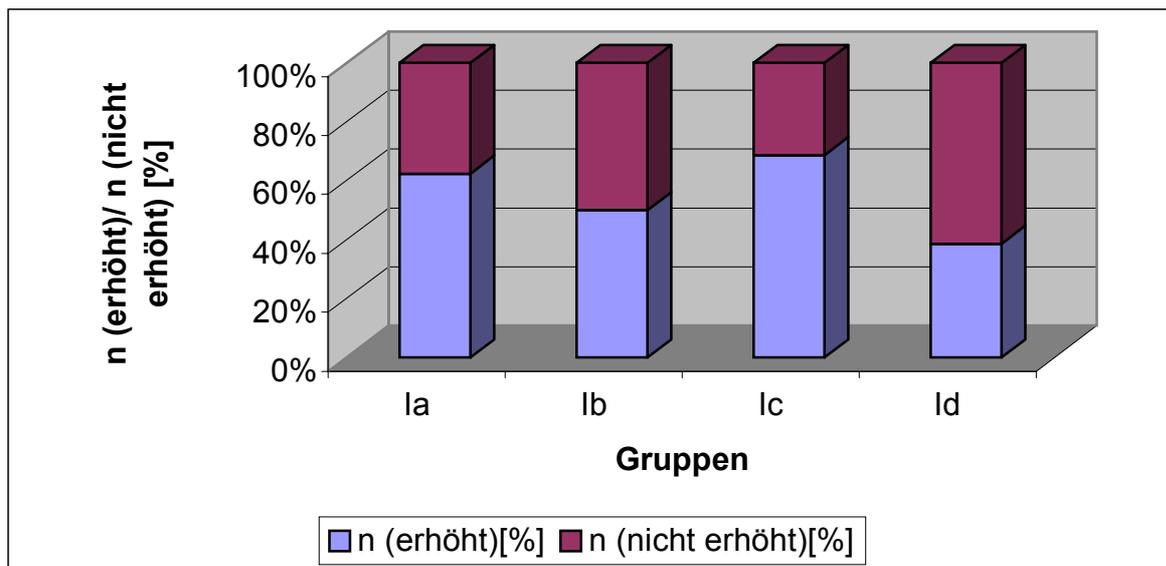


Abb. 8: Darstellung des prozentualen Anteils von Patienten mit signifikant erhöhtem Titer von Antikörpern mit stimulierender Funktion an den Gesamtkollektiven der M. Basedow-Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

Es ist anhand Tab. 11 zu erkennen, dass sich in den Gruppen Ia und Ic der größte Anteil der Patienten mit erhöhten Antikörper- Titern befindet. Dies sind auch die Patientengruppen, bei welchen die Patienten im TRAK- Assay[®] als TRAK- positiv identifiziert wurden. Mit dem hier verwendeten cAMP- Assay konnten jedoch auch in den beiden anderen Gruppen Patienten mit stimulierenden Antikörpern aufgefunden werden, zu 50% in der Gruppe Ib und zu 38,6% in der Gruppe Id.

2.2.3. Geschlechtsverteilung der M. Basedow- Patienten

Tab. 12: Anzahl (n) und Verhältnis von Frauen (f) und Männern (m) in den M. Basedow-Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

Gruppen	n (f)	Anteil in % (f)	n (m)	Anteil in % (m)
Ia	21	87,5	3	12,5
Ib	4	66,7	2	33,3
Ic	22	68,8	10	31,2
Id	45	78,9	12	21,1

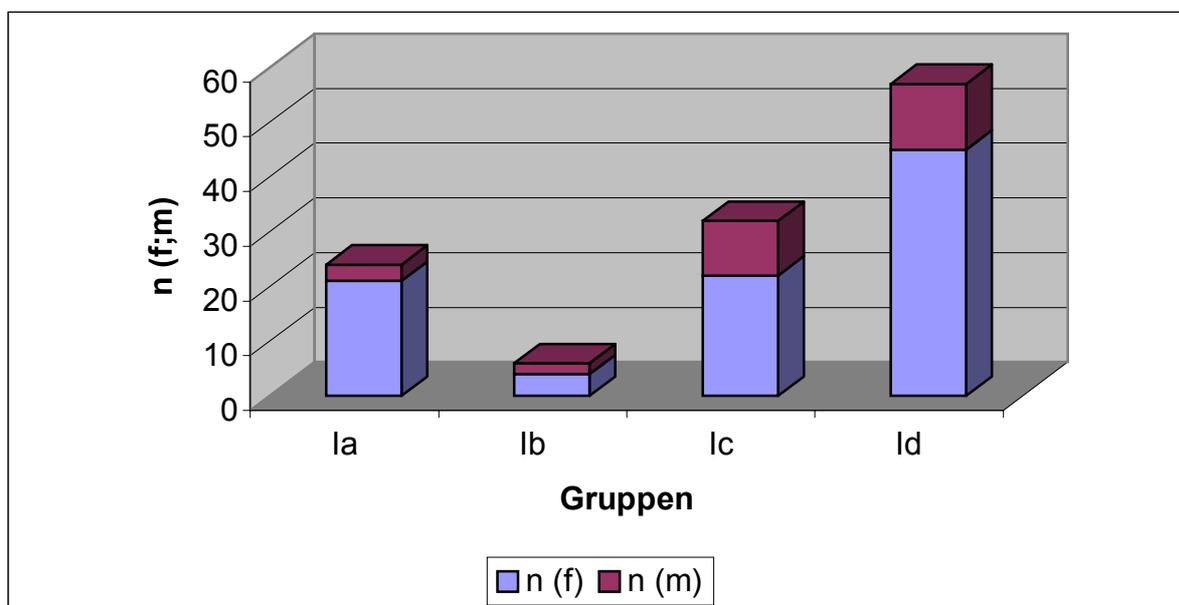


Abb. 9: Anzahl von Frauen (f) und Männern (m) in den M. Basedow- Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

In den Gruppen Ia, Ic und Id überwiegt deutlich die Anzahl der Frauen gegenüber den Männern. Nur in der Gruppe Ib ist das Verhältnis von Frauen und Männern mit jeweils zwei Patienten ausgeglichen.

2.2.4. Altersverteilung der M. Basedow- Patienten

Tab. 13: Mittleres Alter \pm SD von Frauen (f) und Männern (m) in den M. Basedow- Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

Gruppen	Alter (f) [Jahre] \pm SD	Alter (m) [Jahre] \pm SD
Ia	47,0 \pm 16,5	40,0 \pm 12,2
Ib	39,0 \pm 1,6	64,0 \pm 0
Ic	44,4 \pm 17,6	45,3 \pm 15,5
Id	44,4 \pm 12,0	48,5 \pm 15,5

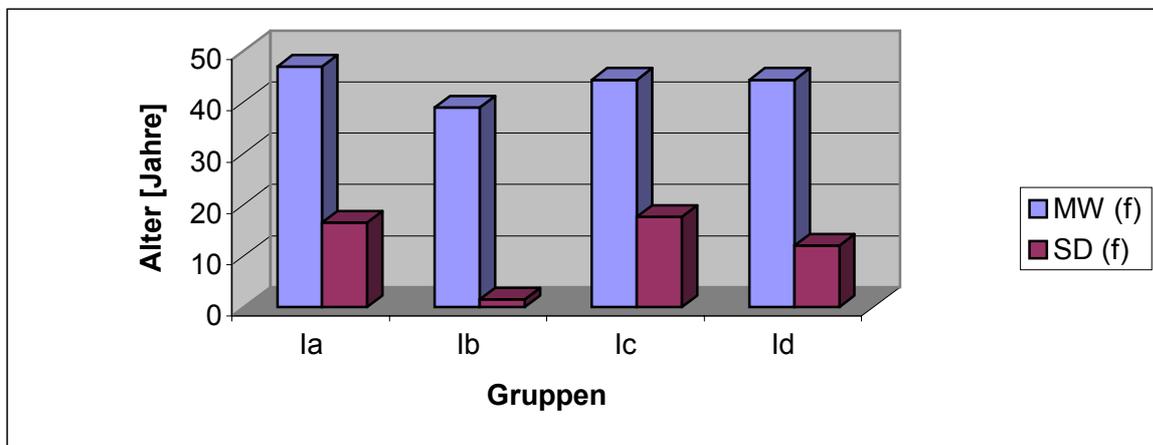


Abb. 10: Mittleres Alter (MW) und SD der Frauen (f) in den M. Basedow- Gruppen.

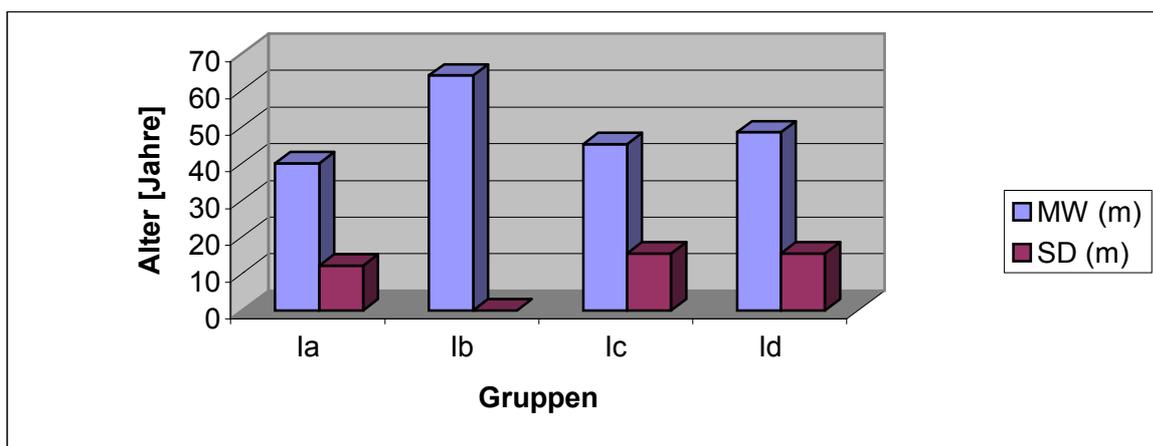


Abb. 11: Mittleres Alter (MW) und SD der Männer (m) in den M. Basedow- Gruppen.

Das Alter der Frauen ist in allen Gruppen ausgeglichen. Größere Altersschwankungen finden sich bei den männlichen Patienten mit dem höchsten durchschnittlichen Lebensalter in der Gruppe Ib.

2.3. Vergleich der M. Basedow- Gruppen mit allen anderen Patientengruppen

2.3.1. Vergleich der cAMP- Konzentrationen

Da bei der cAMP- Messung sowohl bei den M. Basedow- Patienten als auch bei den Patienten aller anderen Gruppen die gleiche Methode angewandt wurde, lassen sich die Ergebnisse dieser insgesamt neun Gruppen direkt miteinander vergleichen.

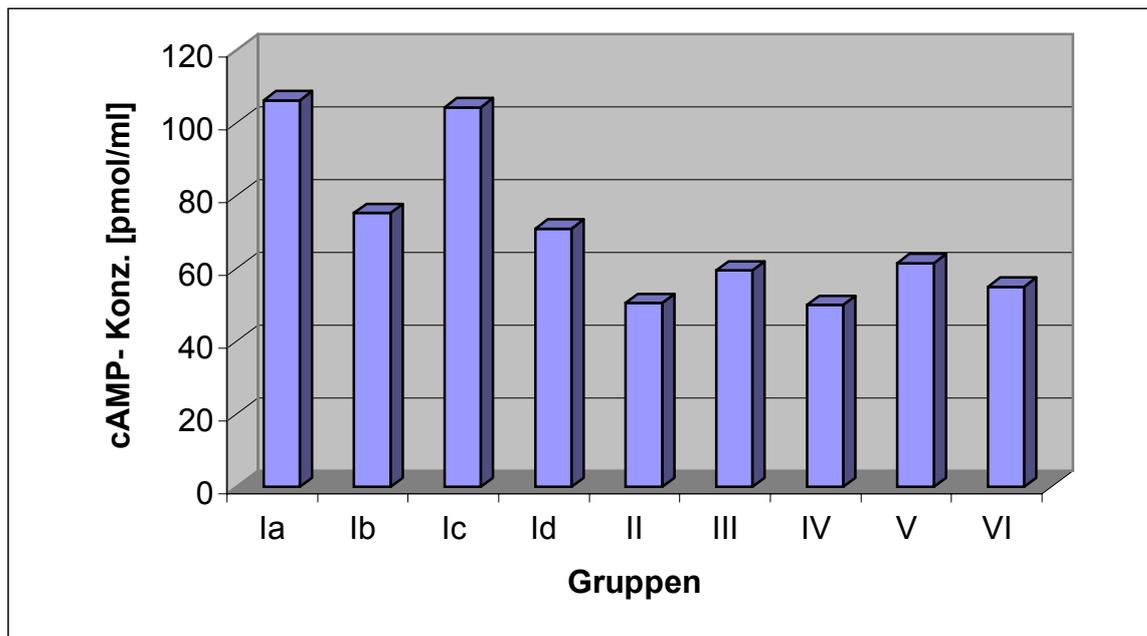


Abb. 12: Mediane der cAMP- Konz. der M. Basedow- Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ) im Vergleich zu den Patientengruppen III (Hashimoto-Thyreoiditis), IV (andere Autoimmunerkrankungen), V (nicht- autoimmune Schilddrüsenerkrankungen) und VI (Thyreoiditis de Quervain). Gruppe II ist die Kontrolle.

In der graphischen Darstellung der Abb. 12 ist deutlich zu erkennen, dass in den Gruppen Ia und Ic, welche aus Patienten mit M. Basedow zusammengesetzt sind, die im RRA einen positiven TRAK aufweisen, viel höhere cAMP- Konzentrationen vorliegen, als in allen anderen Gruppen.

Das heißt, auch mit dem cAMP- Assay können, entsprechend dem Routine- TRAK- Assay[®], in diesen beiden Gruppen die höchsten Konzentrationen von Antikörpern mit stimulierender Funktion nachgewiesen werden.

Im direkten Vergleich aller Gruppen zur Kontrollgruppe ergeben sich signifikant hohe cAMP- Konzentrationen für folgende Gruppen: Ia (florider MB, TRAK positiv) , Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ) mit $p < 0,001$, Gruppe III (Hashimoto- Th.) und Gruppe V (nicht- autoimmune Schilddrüsenerkrankungen) mit $p < 0,05$. Die Gruppen IV (andere AIK) und VI (Th. de Quervain) weisen keine Signifikanz mit $p = 1$ auf. Auch in der Gruppe Ib (florider MB, TRAK negativ) ist laut dem hier verwendeten Kruskal- Wallis- Test keine Signifikanz vorhanden.

2.3.2. Häufigkeit von funktionsstimulierenden Antikörpern

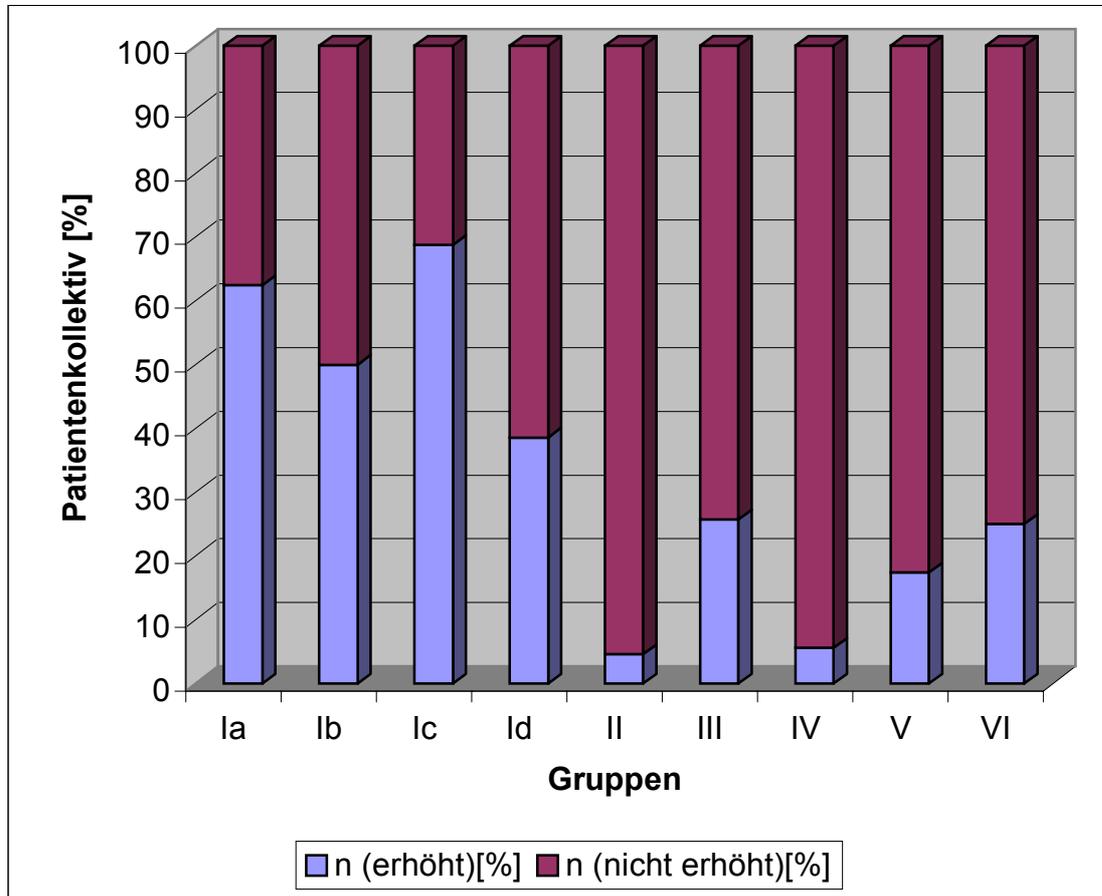


Abb. 13: Prozentualer Anteil der Patienten mit erhöhten Antikörpertitern (n erhöht) im Verhältnis zu den Patienten ohne Antikörpertitererhöhung (n nicht erhöht) in den Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv), Id (behandelter MB, TRAK negativ), II (Kontrolle), III (Hashimoto- Thyreoiditis), IV (andere Autoimmunerkrankungen), V (nicht- autoimmune Schilddrüsenerkrankungen) und VI (Thyreoiditis de Quervain).

In Abb.13 ist zusammenfassend, bezogen auf die einzelnen Patientengruppen, der Anteil der Patienten dargestellt, welche signifikant hohe cAMP- Konzentrationen aufweisen und somit funktionsstimulierende Antikörper besitzen.

Deutlich zu erkennen ist das hohe Antikörpervorkommen in allen vier M. Basedow-Gruppen. Der Anteil der Antikörper- positiven Patienten in der Hashimoto- Thyreoiditis- Gruppe (III) und der Thyreoiditis- de- Quervain- Gruppe (VI) liegt bei ca. 25%. In der Gruppe V (nicht- autoimmune Schilddrüsenerkrankungen) sind es 17,4%. Der Anteil der Antikörper- positiven Patienten in der Gruppe mit anderen Autoimmunerkrankungen ist mit 5,6% vernachlässigbar gering.

3. Antikörper mit blockierender Funktion am TSH- Rezeptor

3.1. Funktionsblockierende Antikörper aller Patientengruppen

Mithilfe des cAMP- Assays wurde versucht, in den Seren von Patientengruppen Antikörper mit blockierender Funktion an dem TSH- Rezeptor nachzuweisen. Dabei wurde die Einteilung der Gruppen wie beim Versuch mit Antikörpern mit stimulierender Funktion beibehalten. Da es sich jedoch um einen kompetitiven Hemmversuch handelt, bei dem zugegebenes TSH mit vorkommenden blockierenden Antikörpern im Serum reagiert, ergibt sich eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Höhe der ermittelten cAMP- Konzentration und der Höhe des Antikörper- Titers.

3.1.1. Vergleich der Patientengruppen mit dem Kontrollkollektiv

Tab. 14: Anzahl (n) der Patienten, MW \pm SD und Mediane der cAMP- Konz. in den einzelnen Patientengruppen.

Gruppen	n	cAMP- Konz. [pmol/ml]	
		MW \pm SD	Median
I (M. Basedow)	104	367,2 \pm 193	346,2
II (Kontrolle)	86	298,8 \pm 67	294,0
III (Hashimoto- Th.)	42	225,5 \pm 77	226,8
IV (Andere AIK)	18	188,5 \pm 48	201,9
V (Struma)	50	171,8 \pm 59	181,7
VI (Th. de Quervain)	4	371,8 \pm 51	371,5

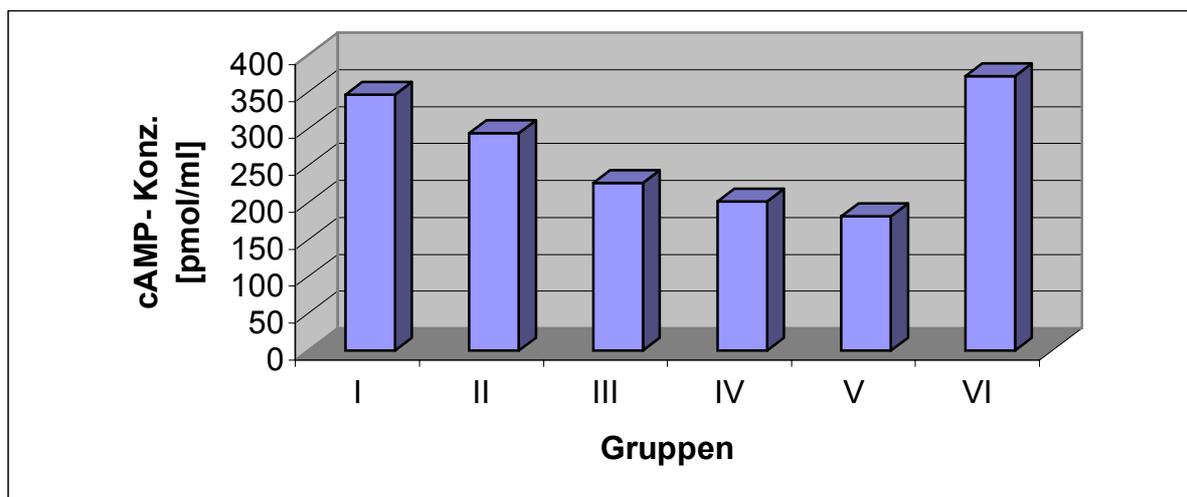


Abb. 14: Mediane der cAMP- Konz. in den Gruppen I (M. Basedow), II (Kontrolle), III (Hashimoto- Th.), IV (andere AIK), V (Struma) und VI (Th. de Quervain).

In der M. Basedow- Gruppe (Gruppe I) und in der Gruppe der Patienten mit Thyreoiditis de Quervain (Gruppe VI) wurden höhere cAMP- Konzentrationen als in allen anderen Patientengruppen ermittelt. Diese beiden Gruppen zeigen mit $p = 0,2$ für die Gruppe I und $p = 0,5$ für die Gruppe VI keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe II.

Die cAMP- Konzentrationen der Patienten mit Hashimoto- Thyreoiditis (Gruppe III), mit anderen Autoimmunerkrankungen (Gruppe IV) und mit nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (Gruppe V) liegen jeweils mit $p < 0,001$ signifikant unterhalb des Kontrollwertes. In diesen drei Gruppen sind funktionsblockierende Antikörper zu erwarten.

3.1.2. Anteil der Patienten mit signifikant erniedrigten cAMP- Konzentrationen

Um die cAMP- Konzentration jedes einzelnen Patienten beurteilen zu können und somit das Vorhandensein von Antikörpern mit blockierender Funktion in dessen Serum, wurde ein cAMP- Schwellenwert mithilfe der Perzentilenrechnung ermittelt.

Der Grenzwert, ab welchem man von einer signifikant erniedrigten cAMP- Konzentration sprechen kann, muss bei $n = 86$, kleiner oder gleich der 4,35. Perzentile, vom niedrigsten Wert des Kontrollkollektivs ausgehend, liegen. Dies gilt für alle cAMP- Konzentrationen $\leq 178,2$ pmol/ml. (Genaue Berechnung siehe Abschnitt Statistik, IV.4.)

Die Verteilung der Patienten mit erniedrigten cAMP- Werten in den einzelnen Patientengruppen ist in Tab. 15 dargestellt.

Tab. 15: Anzahl (n) und prozentualer Anteil der Patienten mit erniedrigten cAMP- Konz. im Gesamtkollektiv der einzelnen Gruppen.

Gruppen	n (gesamt)	n (mit erniedrigter cAMP- Konz.)	Anteil der Patienten mit erniedrigten cAMP- Konz. [%]
I (M. Basedow)	104	10	9,62
II (Kontrolle)	86	4	4,65
III (Hashimoto- Th.)	42	8	19,15
IV (Andere AIK)	18	5	27,78
V (Struma)	50	25	50,00
VI (Th. de Quervain)	4	0	0,00

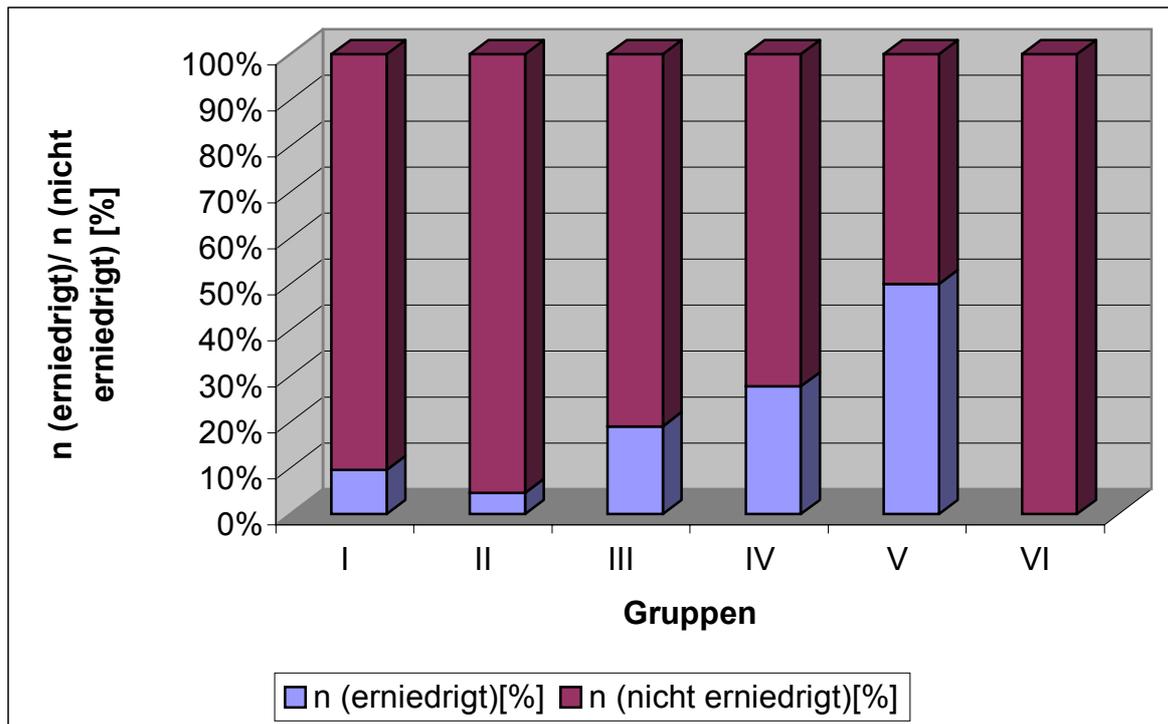


Abb. 15: Prozentualer Anteil der Patienten mit signifikant erniedrigten cAMP- Werten (n (erniedrigt)) im Gesamtkollektiv der Gruppen I (M. Basedow), II (Kontrolle), III (Hashimoto-Th.), IV (andere AIK), V (Struma) und VI (Th. de Quervain).

In den Gruppen III (Hashimoto- Thyreoiditis), IV (andere Autoimmunerkrankungen) und V (andere Schilddrüsenerkrankungen) sind die meisten Patienten mit einer Hemmung der cAMP- Produktion, d.h. niedrigen cAMP- Konzentrationen zu finden. In der Gruppe der Patienten mit Thyreoiditis de Quervain (Gruppe VI) gibt es keinen Fall von Antikörpern mit blockierender Funktion. Bei den M. Basedow- Patienten (Gruppe I) kommen blockierende Antikörper nur in knapp 10% der Fälle vor.

3.1.3. Geschlechtsverteilung der Patienten

Tab. 16: Anzahl (n) und prozentualer Anteil von Frauen (f) und Männern (m) im Gesamtkollektiv der einzelnen Gruppen.

Gruppen	n (f)	f [%]	n (m)	m [%]
I (M. Basedow)	81	77,9	23	22,1
II (Kontrolle)	43	50,0	43	50,0
III (Hashimoto- Th.)	35	83,3	7	16,7
IV (Andere AIK)	11	61,1	7	38,9
V (Struma)	34	68,0	16	32,0
VI (Th. de Quervain)	3	75,0	1	25,0

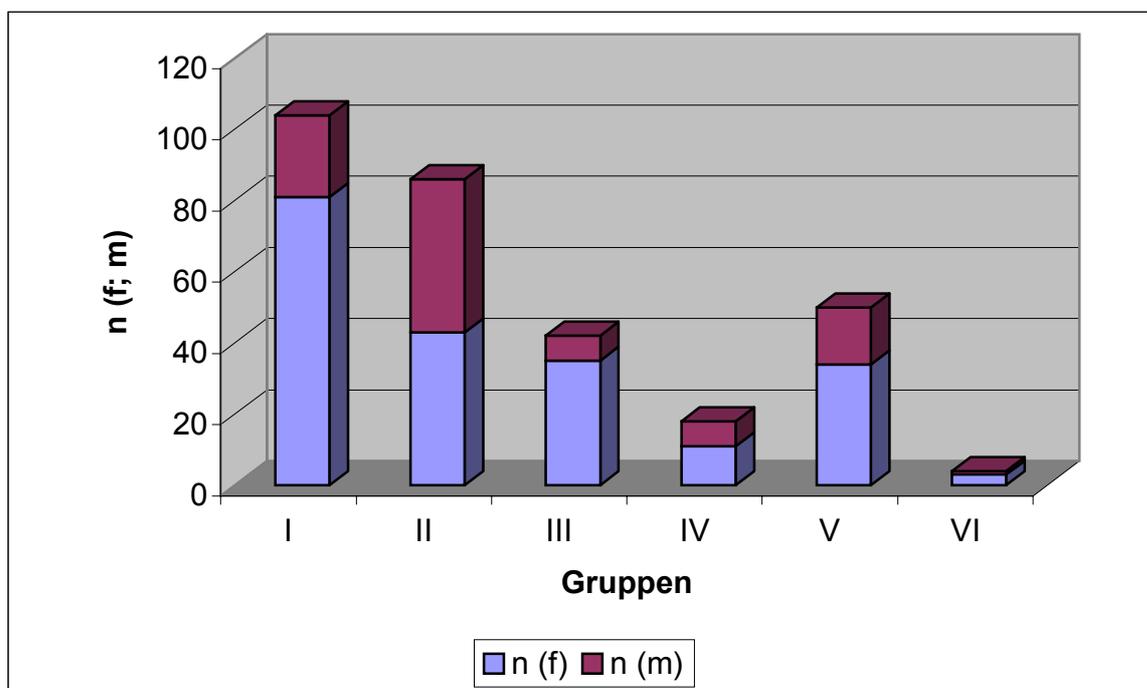


Abb. 16: Anzahl (n) von Frauen (f) und Männern (m) in den Gruppen I (M. Basedow), II (Kontrolle), III (Hashimoto- Th.), IV (andere AIK), V (Struma) und VI (Th. de Quervain).

Bei der Geschlechterverteilung überwiegen zahlenmäßig in allen Gruppen, außer in der Kontrollgruppe, die Frauen. Das Kontrollkollektiv, Gruppe II, besteht beabsichtigtweise zu 50% aus Frauen und zu 50% aus Männern.

Insgesamt wurden Blutseren von 207 Frauen und 97 Männer untersucht.

3.1.4. Altersverteilung der Patienten

Tab. 17: Mittleres Alter in Jahren \pm SD der Patienten der Gruppen I bis VI, getrennt nach Frauen (f) und Männern (m).

Gruppen	Alter (f) \pm SD	Alter (m) \pm SD
I (M. Basedow)	45,5 \pm 14,3	48,3 \pm 16,7
II (Kontrolle)	56,6 \pm 16,7	52,1 \pm 16,8
III (Hashimoto- Th.)	52,3 \pm 16,5	52,3 \pm 6,2
IV (Andere AIK)	46,9 \pm 15,9	46,7 \pm 11,3
V (Struma)	55,0 \pm 17,4	57,5 \pm 11,8
VI (Th. de Quervain)	49,0 \pm 18,0	51,0 \pm 0,0

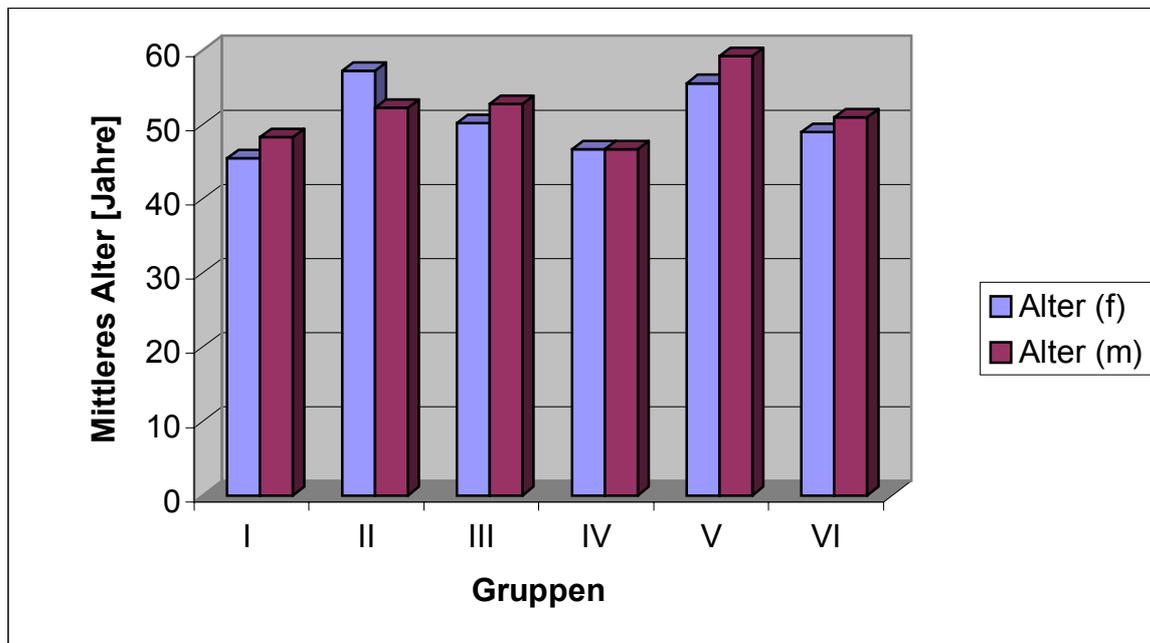


Abb. 17: Mittleres Alter in Jahren von Frauen (f) und Männern (m) der Gruppen I (M. Basedow), II (Kontrolle), III (Hashimoto- Th.), IV (andere AIK), V (Struma) und VI (Th. de Quervain).

In keiner Gruppe bestehen große Altersunterschiede zwischen Frauen und Männern. Die Patienten der Gruppe V (andere Autoimmunerkrankungen) haben durchschnittlich das höchste Lebensalter.

3.2. Funktionsblockierende Antikörper bei Patienten mit M. Basedow

Auch hier wurde die Gruppe der Patienten mit M. Basedow in vier weitere Gruppen Ia, Ib, Ic und Id eingeteilt.

Die Kriterien für die Einteilung waren die gleichen wie beim Versuch mit stimulierenden Antikörpern: die Gruppe Ia bildeten Patienten mit floridem M. Basedow, welche kürzer als vier Wochen behandelt wurden und laut TRAK- Assay[®] TRAK- positiv waren, Gruppe Ib bestand aus TRAK- negativen Patienten mit floridem M. Basedow, Gruppe Ic aus TRAK- positiven Patienten, welche länger als neun Monate thyreostatisch behandelt wurden und Gruppe Id aus TRAK- negativen Patienten, welche ebenfalls eine mehr als neunmonatige Behandlung hinter sich hatten.

3.2.1. Vergleich der M. Basedow- Untergruppen mit dem Kontrollkollektiv

Tab. 18: Anzahl (n) der Patienten, MW \pm SD und Mediane der cAMP- Konz. in den Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

Gruppen	n	cAMP- Konz. [pmol/ml]	
		MW \pm SD	Median
Ia	17	410,9 \pm 103	390,4
Ib	8	473,2 \pm 434	330,7
Ic	27	442,5 \pm 222	407,4
Id	52	297,5 \pm 105	317,9

Ergebnisse

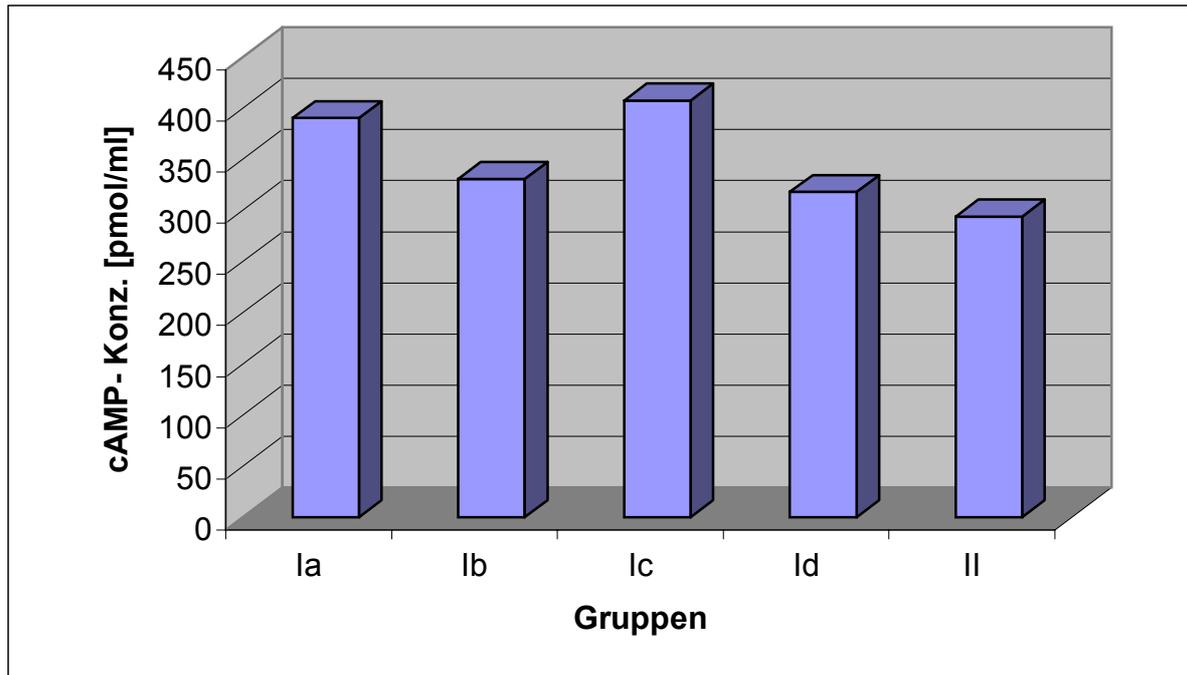


Abb. 18: Mediane der cAMP- Konz. in den Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv), Id (behandelter MB, TRAK negativ) und der Kontrollgruppe II.

In den Gruppen Ia und Ic, welche laut TRAK- Assay[®] TRAK- positiv sind, ergeben sich signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe II (jeweils $p < 0,001$). Diese beiden Patientengruppen weisen höhere cAMP- Konzentrationen auf, als die Kontrollgruppe. Das bedeutet, dass die Anzahl der Patienten in diesen beiden Gruppen, die Antikörper mit blockierender Funktion aufweisen, im Vergleich zu Gruppe II signifikant gering ist. Die Gruppen Ib und Id, welche TRAK- negativ waren, haben niedrigere cAMP- Konzentrationen als die Gruppen Ia und Ic. Mit $p = 1$ in diesen beiden Gruppen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der cAMP- Konzentrationen zur Kontrollgruppe II.

3.2.2. Anteil der Patienten mit signifikant erniedrigten cAMP- Konzentrationen

Wie bei der Analyse aller Gruppen, wurde auch hier vorgegangen. Alle cAMP- Werte $\leq 178,2$ pmol/ml, wurden als signifikant erniedrigt betrachtet. In den Gruppen Ia bis Id ergibt sich dann folgende Verteilung:

Tab. 19: Anzahl (n) und prozentualer Anteil der Patienten mit erniedrigter cAMP- Konz. im Gesamtkollektiv der Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

Gruppen	n (gesamt)	n (mit erniedrigter cAMP- Konz.)	Anteil der Patienten mit erniedrigter cAMP- Konz. [%]
Ia	17	0	0,00
Ib	8	0	0,00
Ic	27	3	11,11
Id	52	7	13,50

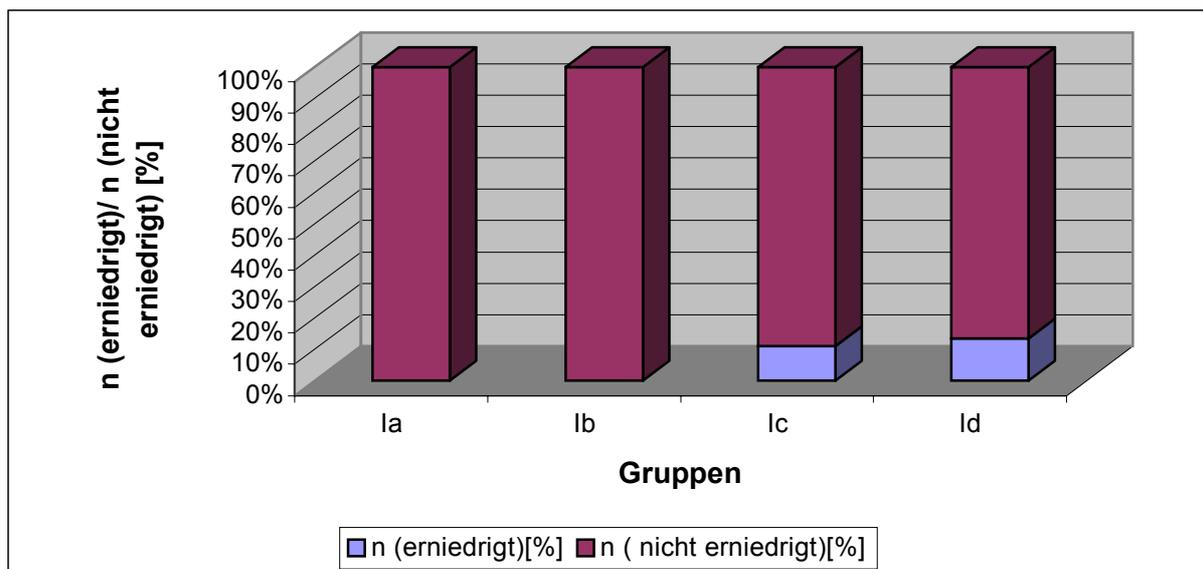


Abb. 19: Prozentuale Darstellung des Anteils der Patienten mit signifikant erniedrigter cAMP- Konz. im Gesamtkollektiv der M. Basedow- Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

In den Gruppen Ia und Ib, welche aus Patienten mit floridem M. Basedow bestehen, findet sich kein einziger Patient mit verminderter cAMP- Konzentration, und somit mit funktionsblockierenden Antikörpern. Im Gegensatz dazu sind in den Gruppen Ic 3 von 27 und in Gruppe Id 7 von 52 Patienten vorhanden, welche funktionsblockierende Antikörper besitzen. Die beiden letzteren Gruppen bestehen aus Patienten, welche mindestens neun Monate thyreostatisch behandelt wurden.

3.2.3. Geschlechtsverteilung der M. Basedow- Patienten

Tab. 20: Anzahl (n) und Verhältnis von Frauen (f) und Männern (m) in den M. Basedow-Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

Gruppen	n (f)	f [%]	n (m)	m [%]
Ia	14	82,4	3	17,6
Ib	7	87,5	1	12,5
Ic	20	74,1	7	25,9
Id	40	76,9	12	23,1

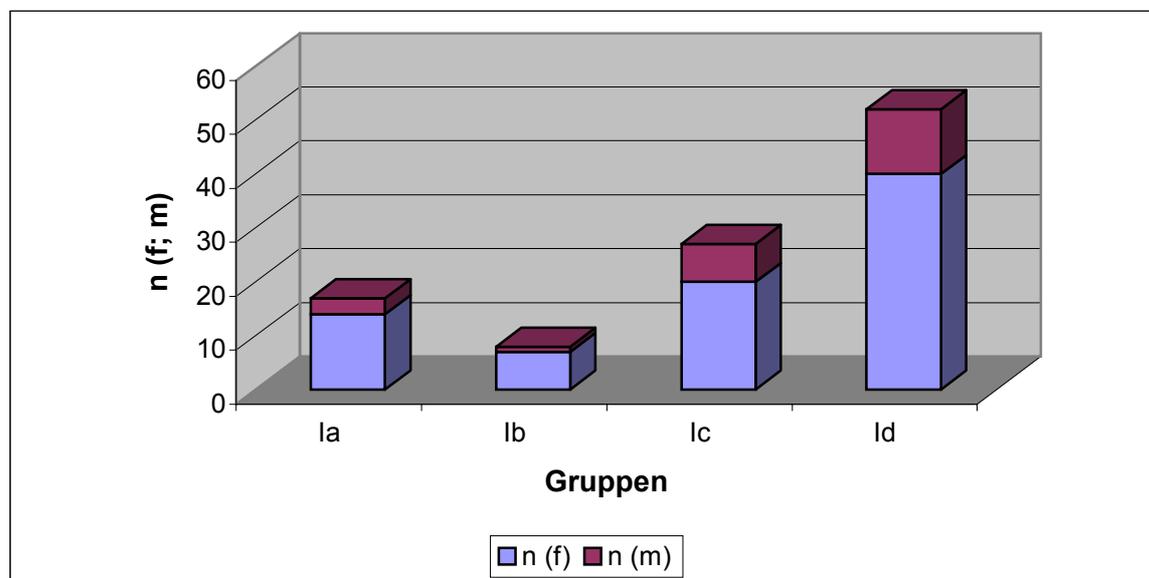


Abb. 20: Anzahl von Frauen (f) und Männern (m) in den M. Basedow- Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

Der Anteil der Frauen im Vergleich zu den Männern ist in allen vier M. Basedow- Gruppen deutlich höher mit einem Verhältnis von Frauen zu Männern von mindestens 1: 4.

3.2.4. Altersverteilung der M. Basedow- Patienten

Tab. 21: Mittleres Alter \pm SD von Frauen (f) und Männern (m) in den M. Basedow- Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ).

Gruppen	Alter (f) [Jahre] \pm SD	Alter (m) [Jahre] \pm SD
Ia	45,0 \pm 19,2	31,0 \pm 3,6
Ib	42,0 \pm 5,8	64,0 \pm 0,0
Ic	47,2 \pm 15,9	47,7 \pm 15,6
Id	45,4 \pm 12,7	51,7 \pm 17,4

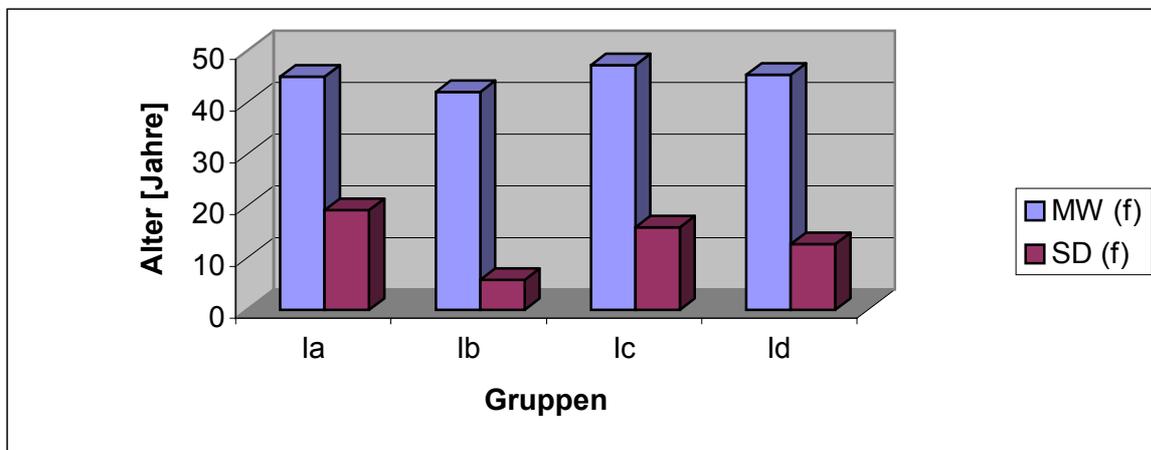


Abb. 21: Mittleres Alter (MW) und SD der Frauen (f) in den M. Basedow- Gruppen.

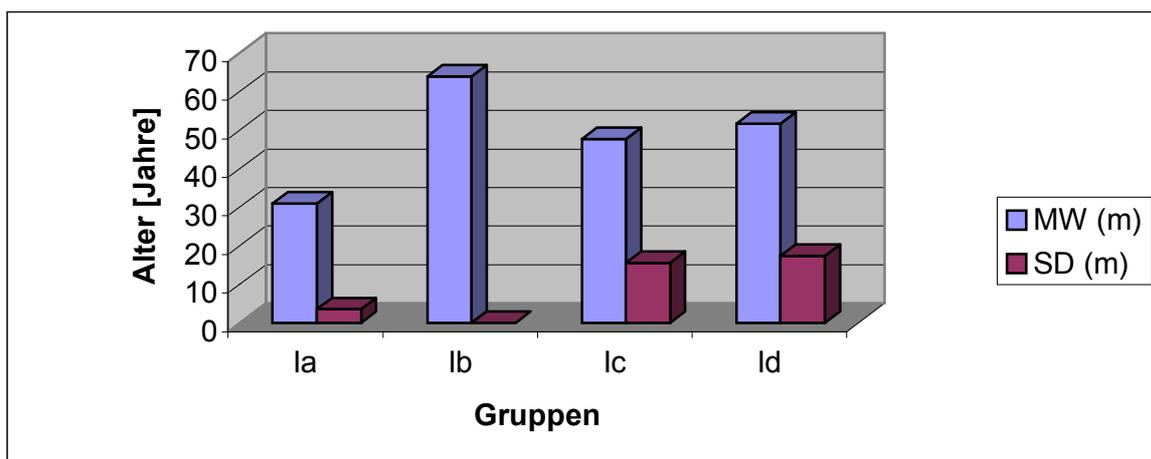


Abb. 22: Mittleres Alter (MW) und SD der Männer (m) in den M. Basedow- Gruppen.

Das Alter der Frauen ist in allen Gruppen relativ ausgeglichen und liegt um etwa 45 Jahren. Bei den Männern sind größere Altersschwankungen vorhanden. Hier reicht das mittlere Alter von 31 Jahren in der Gruppe Ia bis 64 Jahre in der Gruppe Ib.

3.3. Vergleich der M. Basedow- Gruppen mit allen anderen Patientengruppen

3.3.1. Vergleich der cAMP- Konzentrationen

Die gemessenen cAMP- Konzentrationen aller Gruppen lassen sich direkt miteinander vergleichen, da die Seren aller Patienten nach dem gleichen Verfahren behandelt wurden.

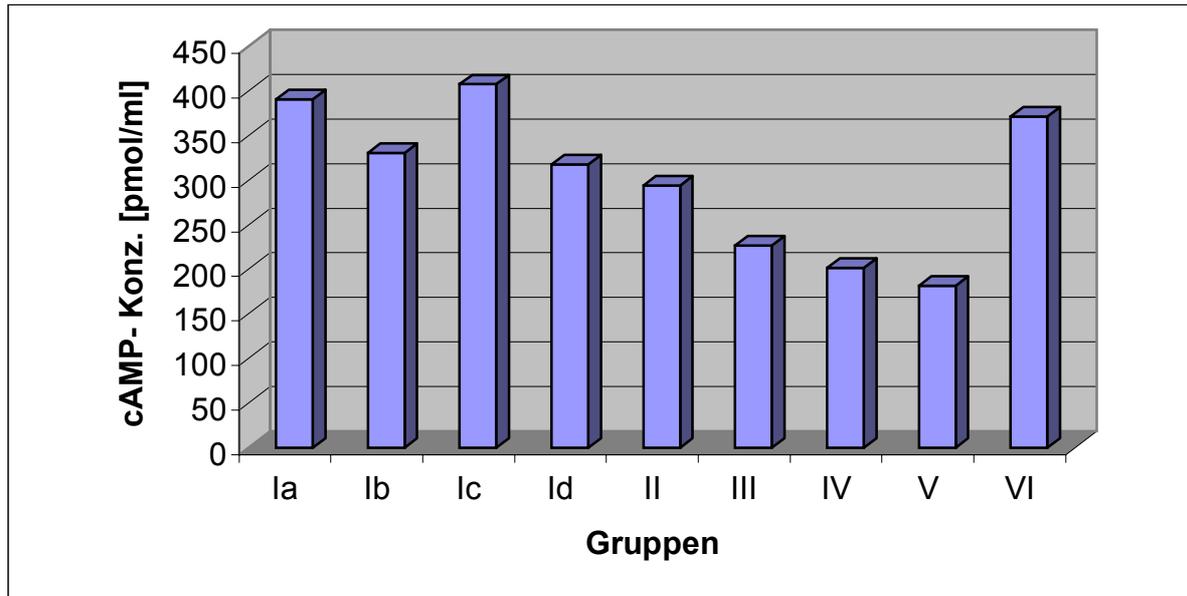


Abb. 23: Mediane der cAMP- Konz. der M. Basedow- Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ) im Vergleich zu den Patientengruppen III (Hashimoto-Thyreoiditis), IV (andere Autoimmunerkrankungen), V (nicht- autoimmune Schilddrüsenerkrankungen) und VI (Thyreoiditis de Quervain). Gruppe II ist die Kontrolle.

In der graphischen Darstellung ist zu erkennen, dass lediglich die Gruppen III (Hashimoto-Thyreoiditis), IV (andere Autoimmunerkrankungen) und V (nicht- autoimmune Schilddrüsenerkrankungen) niedrigere cAMP- Konzentrationen aufweisen, als die Kontrollgruppe II. Für diese drei Gruppen ergeben sich Signifikanzen mit p von jeweils $< 0,001$. Da es sich bei den cAMP- Konzentrationsangaben immer um den Mittelwert aller gemessenen cAMP- Konzentrationen der jeweiligen Gruppe handelt, kann man daraus schließen, dass sich in diesen drei Gruppen verhältnismäßig mehr Patienten mit Antikörpern blockierender Funktion befinden, als in den M. Basedow- Gruppen und der Gruppe mit Thyreoiditis de Quervain.

Für die anderen Gruppen kann kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe II festgestellt werden mit $p = 0,054$ in Gruppe Ia (florider MB, TRAK positiv), $p = 1,493$ in Gruppe Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und in den Gruppen Ib (florider MB, TRAK negativ), Id (behandelter MB, TRAK negativ) und VI (Thyreoiditis de Quervain) jeweils mit $p = 1$.

3.3.2. Häufigkeit von funktionsblockierenden Antikörpern

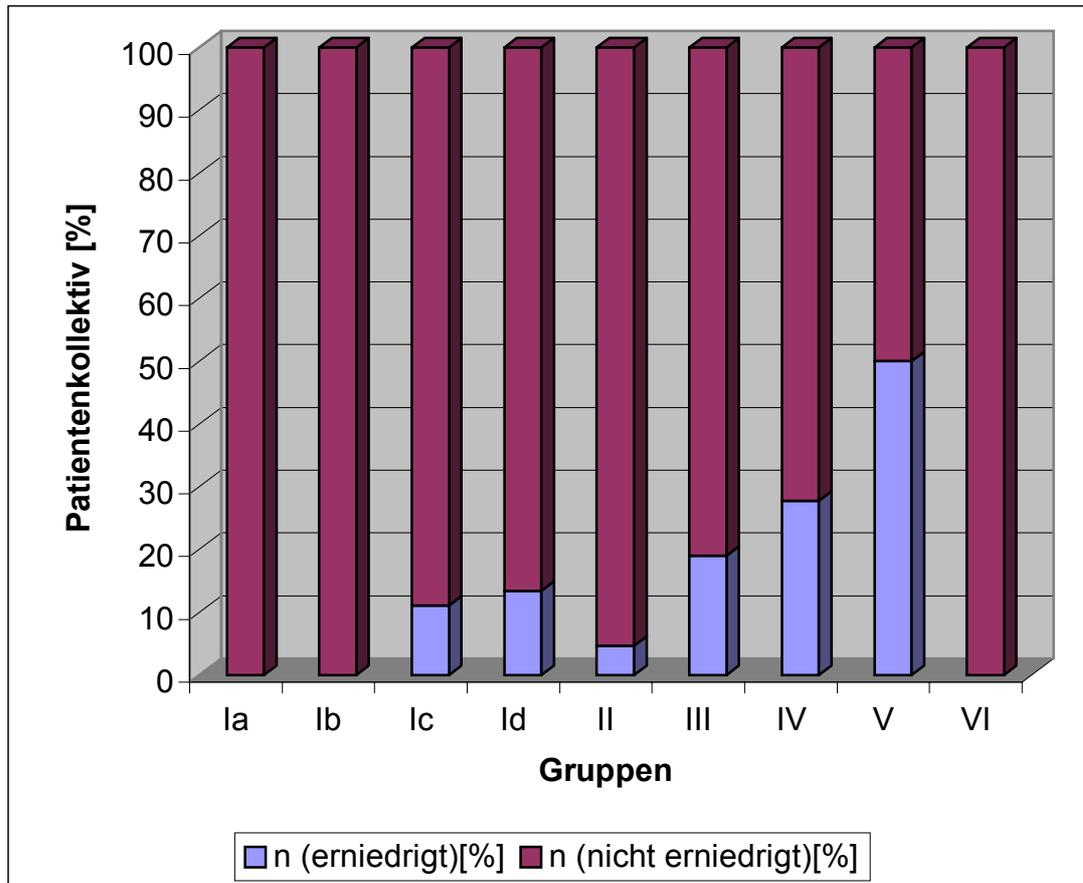


Abb. 24: Prozentualer Anteil der Patienten mit erniedrigten cAMP- Konz. (n erniedrigt) im Verhältnis zu denen ohne signifikante cAMP- Konz.- Verminderung (n nicht erhöht) in den Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv), Id (behandelter MB, TRAK negativ), II (Kontrolle), III (Hashimoto-Thyreoiditis), IV (andere Autoimmunerkrankungen), V (nicht- autoimmune Schilddrüsenerkrankungen) und VI (Thyreoiditis de Quervain).

Die Abb. 24 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten, deren cAMP- Konzentrationen signifikant niedrig sind, im Verhältnis zum jeweiligen Gesamtkollektiv.

Da eine signifikant niedrige cAMP- Konzentration mit dem Vorhandensein von funktionsblockierenden Antikörpern gleichgesetzt werden kann, kann man abschließend zusammenfassen: In den Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ) und VI (Thyreoiditis de Quervain) befindet sich kein Patient mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen den TSH- Rezeptor.

In den M. Basedow- Gruppen mit thyreostatisch behandelten Patienten (Ic und Id) treten Antikörper mit blockierender Funktion in jeweils ca. 10% auf.

In der Gruppe III (Hashimoto- Thyreoiditis) und der Gruppe IV (andere Autoimmunerkrankungen) liegt der Anteil der Antikörper- positiven Patienten bei 19% bzw. 27,8%.

50% aller Hashimoto- Thyreoiditis- Patienten haben signifikant niedrige cAMP- Konzentrationen und somit funktionsblockierende Antikörper.

4. Statistik

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Statistikprogramm *BiAS, Version 7* von Dr. Ackermann, J. W. Goethe- Universität Frankfurt am Main gearbeitet.

Da die Messergebnisse keine Gauß'sche Normalverteilung aufweisen, wurde beim Vergleichen der cAMP- Konzentrationen verschiedener Patientengruppen mit der Kontrollgruppe II der nichtparametrische Test nach Kruskal- Wallis, mit dem Signifikanzkoeffizienten $p \leq 0,05$, angewendet. Die einzelnen Patientengruppen wurden mithilfe des Dunn's Multiple Comparisons Tests miteinander verglichen.

Zu beachten ist, dass in beiden Versuchsteilen, sowohl bei der Bestimmung von Antikörpern mit stimulierender Funktion, als auch blockierender Funktion, jeweils dreimal diese Vergleichstests durchgeführt wurden. Im Abschnitt IV.2.1.1. bzw. IV.3.1.1. werden die Patientengruppen I, III, IV, V und VI mit der Kontrollgruppe II verglichen. Im Abschnitt IV.2.2.1. bzw. IV.3.2.1. werden nur die vier M. Basedow- Untergruppen Ia bis Id mit der Gruppe II verglichen und im Abschnitt IV.2.3.1. bzw. IV.3.3.1. sowohl die vier M. Basedow- Gruppen als auch alle anderen Patientengruppen.

In dieser Arbeit werden die cAMP- Werte der Gruppe I, als Gesamtheit aller M. Basedow- Patienten und die vier Untergruppen der M. Basedow- Gruppe einzeln mit dem Kontrollkollektiv verglichen. Durch das Aufsplitten der M. Basedow- Patienten in vier Untergruppen werden allen gemessenen Patientenwerten andere Rangnummern vergeben, was zu anderen Prüfgrößen führt und somit zu anderen p- Werten. Die Variation der Gruppenanzahl, welche zur Signifikanzprüfung herangezogen werden führt ebenfalls zu unterschiedlichen p- Werten.

So ist es auch möglich, dass beim Vergleich der M. Basedow- Untergruppen mit dem Kontrollkollektiv (IV.3.2.1.) die Gruppen Ia und Ic signifikant hohe cAMP- Konzentrationen aufweisen, bei der Signifikanzprüfung aller Gruppen (IV.3.3.2.) jedoch in keiner M. Basedow- Gruppe eine Signifikanz vorliegt.

Bei der differenzierteren Betrachtung der einzelnen Patientenkollektive und Berechnung des Anteils der Patienten mit signifikant erhöhten bzw. erniedrigten cAMP- Konzentrationen, wurde die Perzentilenrechnung eingesetzt. Die übliche Berechnung von p mithilfe der doppelten Standardabweichung konnte hier nicht durchgeführt werden, da es sich bei den Messwerten, wie bereits oben erwähnt, nicht um eine Normalverteilung handelt.

Diese Rechnungen beziehen sich auf Anzahl (n) der Patienten im Kontrollkollektiv.

Bei der Bestimmung der Funktion stimulierender Antikörper geht man davon aus, dass alle Werte, die größer sind als 95% aller Werte im Kontrollkollektiv, als eindeutig erhöht zu betrachten sind.

Da in Gruppe II $n = 87$ und $b = n + 1 = 88$ ist, ergibt sich folgende Rechnung:

$$x = 88 \times 0,05 = 4,4$$

Der gesuchte Grenzwert liegt also bei der 4,4. Perzentile ausgehend vom höchsten Wert der Kontrollgruppe II. Das heißt jeder Wert, der größer oder gleich 81,5 pmol/ml ist, ist als eindeutig erhöht zu betrachten. Bei diesen Patienten kann man von einem erhöhten Titer von Antikörpern mit stimulierender Funktion ausgehen.

Bei der Bestimmung der Funktion blockierender Antikörper geht man davon aus, dass alle Werte, die kleiner als 95% aller cAMP- Konzentrationswerte in der Kontrollgruppe sind, signifikant erniedrigt sind und so auf das Vorhandensein von Antikörpern mit blockierender Funktion schließen lassen.

Da in Gruppe II $n = 86$ und $b = n + 1 = 87$ ist, ergibt sich folgende Rechnung:

$$x = 87 \times 0,05 = 4,35$$

Der Grenzwert, ab welchem man von einer signifikant erniedrigten cAMP- Konzentration sprechen kann, muß also kleiner oder gleich der 4,35. Perzentile, ausgehend vom niedrigsten Wert des Kontrollkollektivs, sein. Dies gilt für alle Konzentrationen $\leq 178,2$ pmol/ml.

V. Diskussion

1. Material und Methode

1.1. Auswahl der Zelllinie JP 26

Die momentan gängigste Methode, Antikörper gegen den TSH- Rezeptor nachzuweisen, beruht auf der Eigenschaft dieser Antikörper, die Adenylatzyklase in Schilddrüsenzellmembranen oder Schilddrüsenzellkulturen zu stimulieren [Pinchera et al. 1985].

In früher eingesetzten Verfahren wurde mit humanen Thyreozyten- Primärkulturen oder der FRTL- 5- Zelllinie gearbeitet [Orgiazzi et al. 1976; Rapoport et al. 1984]. Die Klonierung des TSH- Rezeptors [Parmentier et al. 1989; Nagayama et al. 1989] erlaubte die Etablierung von Zelllinien, welche in In- vitro- Assays eingesetzt werden können [Filetti et al. 1991; Costagliola et al. 1992].

Der cAMP- Assay, der hier in dieser Studie verwendet wurde, ist eine oft verwendete Methode, Antikörper gegen den TSH- Rezeptor nachzuweisen und ermöglicht zwischen Antikörpern mit stimulierender und mit blockierender Funktion zu unterscheiden. Dabei werden CHO- Zellen verwendet, welche humane TSH- Rezeptoren (hTSHR) auf ihrer Oberfläche besitzen. Je nach Rezeptordichte gibt es unterschiedliche Zelllinien.

So besitzen beispielsweise JP 02 keine TSH- Rezeptoren, JP 09 ca. 90000 hTSHR pro Zelle und JP 26 ca. 2000 hTSHR pro Zelle [Wallaschofski et al. 1999].

Da humane Thyreozyten etwa 1000 bis 10000 hTSHR auf ihrer Oberfläche exprimieren [Rees Smith et al. 1988], wurde bei diesem Assay die CHO Zelllinie JP 26 verwendet, da diese die ähnlichste Rezeptordichte zu humanen Thyreozyten aufweist.

Die meisten beschriebenen cAMP- Assays mit CHO- Zellen fanden mit der Zelllinie JP 09 statt [Perret et al. 1990; Ludgate et al. 1992; Michaelangeli et al. 1994]. Es hat sich aber gezeigt, dass eine zu hohe hTSHR- Dichte zu niedrigeren und ungenaueren Messergebnissen führt [Kakinuma et al. 1997]. Gründe hierfür sind [Wallaschofski et al. 1999]:

1. eine negative Beeinflussung zwischen den hTSHR bei zu hoher Dichte in Bezug auf die TSH- Affinität [Chazenbalk et al. 1996]
2. die Wirkung eines Liganden, beschrieben von Conn et al. (1982), der abhängig vom Rezeptorabstand als Agonist bzw. Antagonist fungiert, und welcher eine höhere Wirkung in Zellen mit niedrigerer Rezeptordichte zeigt
3. die Beeinflussung der Art und Weise der G- Protein- Bindung und der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, welche abhängig von der Rezeptordichte ist [Gudermann et al. 1996].
4. Es wird außerdem angenommen, dass TSHR eine Grundaktivität besitzen, auch ohne das Vorhandensein von Liganden. Eine hohe Rezeptordichte, welche zu einer hohen Basal- cAMP- Aktivität führt, reduziere die Sensitivität für die Stimulation von Liganden oder Antikörpern [Kjelsberg et al. 1992].

1.2. Auswahl der Zelldichte

Laut Studien, die das Wachstumsverhalten und die Stimulierung der Adenylatzyklase, in Abhängigkeit von der Zelldichte in den Plattenvertiefungen beobachteten [Wallaschofski et al. 1999], wird die Zelldichte von maximal 40000 Zellen (JP 26) pro Vertiefung einer 96-Lochplatte empfohlen. Eine höhere Zellzahl führe zum vermehrten Zelltod und der Abnahme des Stimulationsindex*. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Zellverdünnung von 10000 Zellen pro Vertiefung, wie in der Arbeit von Vitti et al. (1993), verwendet.

1.3. cAMP- KIT

Die Messung der cAMP- Konzentrationen fand mit dem BIOTRAK® cAMP [¹²⁵I] assay system der Firma Amersham statt. In diesem KIT sind sowohl Reagenzien für einen Acetylations- Versuch wie auch für einen Nicht- Acetylations- Versuch enthalten. Der Einsatzbereich richtet sich nach der Menge des zu untersuchenden biologischen Materials pro Reagenzröhrchen. Mit dem Acetylations- Ansatz können niedrige cAMP- Werte in biologischen Proben von 2 - 128 fmol/ Röhrchen, mit dem Nicht- Acetylations- Ansatz größere Proben von 25 - 1600 fmol/ Röhrchen untersucht werden. Für diese Methode wurde der Nicht- Acetylations- Ansatz verwendet.

2. Diskussion der Ergebnisse

Es ist lange bekannt, dass die Hyperthyreose bei Patienten mit M. Basedow durch Antikörper mit stimulierender Funktion ausgelöst wird, welche an den TSH- Rezeptor binden und TSH- agonistisch wirken. Weiterhin wird vermutet, dass Antikörper mit blockierender Funktion zu einer Hypothyreose bei diesen Patienten führen können.

In dieser Arbeit sollten mithilfe des cAMP- Assays Antikörper mit stimulierender und mit blockierender Funktion bestimmt werden. Hierzu wurden große Patientenkollektive zusammengestellt. Insgesamt wurden 309 Patienten auf das Vorkommen von Antikörpern mit stimulierender Funktion und 304 Patienten auf Antikörper mit blockierender Funktion untersucht.

Die Patientenkollektive für beide Versuchsansätze wurden nach den gleichen Kriterien ausgewählt. Der größte Anteil, der an dieser Studie teilnehmenden Patienten, wurde also sowohl im Stimulationsversuch (VS) als auch im Blockierungsversuch (VB) getestet.

Die größte Gruppe, I, mit n = 119 im VS und n = 104 im VB bestand aus Patienten mit M. Basedow. Das Vorhandensein der verschiedenen Antikörper war in dieser Gruppe von besonderem Interesse.

Weiterhin wurden 35 Patienten im VS und 42 im VB mit Hashimoto- Thyreoiditis, jeweils 18 Patienten mit schilddrüsenunabhängigen Autoimmunerkrankungen, 46 Patienten im VS und 50 im VB mit nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen und jeweils 4 Patienten mit Thyreoiditis de Quervain untersucht.

* Hierbei wird Stimulationsindex definiert als Quotient aus maximaler cAMP- Produktion, welche durch TSH in einer Serum- Puffer- Lösung stimuliert wurde, und der cAMP- Produktion, welche durch die Serum- Puffer- Lösung ohne TSH stimuliert wurde [Wallaschofski H. et al., 1999].

Durch weitere Unterteilung der M. Basedow- Gruppe sollte untersucht werden, ob es Unterschiede gibt im Auftreten von Antikörpern, abhängig von einer Behandlung mit thyreostatischen Medikamenten. Dabei wurden nur Patienten untersucht, die entweder seit weniger als vier Wochen oder länger als neun Monate in Behandlung waren.

Weiterhin sollten unsere Ergebnisse, über das Vorhandensein von Antikörpern, mit dem TRAK- Assay[®] verglichen werden. Deshalb wurden die Patienten beider Gruppen in TRAK- positive und TRAK- negative unterteilt, wobei hier Patienten nicht berücksichtigt wurden, deren TRAK- Werte im Graubereich lagen, d.h. deren TRAK- Werte zwischen 10 und 15 U/l aufwiesen. Es ergaben sich somit vier Untergruppen von Patienten mit M. Basedow.

Die Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit fand vor der Einführung des LUMItest[®] TRAK human in die Routinediagnostik statt. Deshalb fand die Einteilung der Patienten mit M. Basedow nach den TRAK- Ergebnissen des RRA statt.

2.1. Geschlechtsverteilung der Patienten

In allen Gruppen, außer dem Kontrollkollektiv, überwiegt der Anteil der Frauen deutlich gegenüber den Männern. Beide Versuchsansätze zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster: Im VS finden wir 214 Frauen und 95 Männer, im VB 207 Frauen und 97 Männer.

Die Kontrollgruppe besteht dagegen im VS aus 44 Frauen und 43 Männern, im VB jeweils aus 43 Frauen und Männern.

Auffallend ist, dass in der Gruppe I insgesamt 77,3% bzw. 77,9% Frauen und nur 22,7% bzw. 22,1% Männer vertreten sind. Diese Patientenverteilung spiegelt ungefähr die statistische Verteilung von weiblich zu männlich etwa 5 zu 1 wieder.

Am deutlichsten wird die unterschiedliche Geschlechtsverteilung in der Gruppe III, der Hashimoto- Thyreoiditis- Gruppe. Diese besteht aus 88,6% bzw. 83,3% aus Frauen und aus 11,4% bzw. 16,7 % Männern.

2.2. Altersverteilung der Patienten

Die Altersverteilung der Patienten in den einzelnen Gruppen und zwischen den Geschlechtern ist relativ ausgeglichen. Die weiblichen Patienten waren in der Mehrheit zwischen 45 und 57 Jahren, die männlichen zwischen 47 und 58 Jahren alt.

In der Gruppe II finden wir die jüngsten Patienten mit 39 bis 47 Jahren bei den Frauen und 31 bis 64 Jahren bei den Männern. Die Gruppen mit einem etwas höheren Lebensalter sind die Kontrollgruppe und die Gruppe V (nicht autoimmune Schilddrüsenerkrankungen).

2.3. Vorversuche

Vor der eigentlichen Untersuchung von Patientenseren wurden einige Vorversuche durchgeführt. So wurde am Anfang die Reaktion von zwei CHO- Zelllinien, JP 26 und JP 02, auf unterschiedliche TSH- Konzentration untersucht. In vier Versuchswiederholungen zeigten sich ähnliche Ergebnisse:

Die Zelllinie JP 02 reagierte auf unterschiedliche TSH- Konzentrationen kaum. Die ermittelten cAMP- Konzentrationen befanden sich durchgehend im Messbereich zwischen

9,0 pmol/ml und 17,2 pmol/ml. Dies war zu erwarten, da die CHO- Zellen dieser Zelllinie keine TSH- Rezeptoren auf der Oberfläche tragen [Wallaschofski et al. 1999].

Bei der Zelllinie JP 26 verhielten sich die Konzentrationen des zugegebenen TSH und die cAMP- Konzentrationen direkt proportional. In allen Messwiederholungen sank die cAMP- Produktion der Zellen mit höherer TSH- Verdünnung deutlich ab. Dieser Zusammenhang ist seit langem bekannt. Eine der ersten Beschreibungen darüber finden wir in der Arbeit von McKenzie et al. (1978).

Dieser Versuch lieferte den Beweis dafür, dass CHO- Zellen JP 26, ebenso wie humane Thyreozyten, auf ihrer Oberfläche TSH- Rezeptoren tragen.

Ein weiterer Vorversuch beschäftigte sich mit der Hemmung der cAMP- Produktion durch blockierende IgG. Es wurden standardisierte Mäuseantikörper benutzt. In jeweils zehn Messwiederholungen konnte gezeigt werden, dass die stimulierende Wirkung des TSH kompetitiv durch die IgG blockiert wird. Die Hemmung der cAMP- Produktion stieg mit zunehmender IgG- Konzentration und abnehmender TSH- Konzentration.

Die cAMP- Konzentration verhält sich also umgekehrt proportional zu der IgG- Konzentration.

Bei diesem Versuch wurden zwei unterschiedliche TSH- Konzentrationen (0,5 mU/ml und 0,05 mU/ml) verwendet. Die cAMP- Beeinflussung durch blockierende IgG zeigte sich deutlicher bei der TSH- Konzentration von 0,5 mU/ml. Da auch die Patientenserum auf Antikörper blockierender Funktion getestet werden sollten, wurden die folgenden Versuche ebenfalls mit einer TSH- Konzentration von 0,5 mU/ml durchgeführt.

Eine weitere Überlegung war, mithilfe der hier erhaltenen cAMP- Konzentrationen, auf die Konzentrationen blockierender Antikörper im Serum von Patienten zu schließen. Die späteren Ergebnisse sollten mit denen dieser Verdünnungsreihe standardisierter Mäuse- IgG verglichen werden. Dieses Vorhaben wurde jedoch verworfen. Es gibt verschiedene Gründe, die eine direkte Umrechnung nicht zulassen:

1. Es ist bekannt, dass die TSH- Rezeptor- Struktur sehr komplex ist [Kohn et al. 1983]. Da es nicht sicher ist, ob die Mäuse- IgG und die im Patientenserum vorkommenden Antikörper mit blockierender Funktion an der gleichen Komponente des Rezeptors angreifen, kann nicht von einer identischen Wirkungsweise ausgegangen werden.
2. TSH- Rezeptor- Antikörper sind heterogen, d.h. sie haben sowohl stimulierende als auch blockierende Funktionen [Carayon et al. 1983]. Es kann somit zu einer Interaktion zwischen den verschiedenen Antikörpern kommen.
3. Die blockierende Potenz verschiedener Antikörper mit blockierender Funktion kann sich erheblich unterscheiden, auch wenn sie im Endeffekt eine antagonisierende TSH- Wirkung zeigen.
4. Es ist möglich, dass Antikörper, abhängig von der TSH- Dosis oder der eigenen Konzentration, als Agonist oder Antagonist wirken. Die Wirkungsweise ist also bei unbekannter Konzentration nicht immer abzuschätzen [Ealey et al. 1985].
5. Durch weitere Komponenten im Patientenserum, wie Proteine unterschiedlicher Funktion, kann die Wirkungsweise von IgG beeinflusst werden [Vlase et al. 1998].

2.4. TSHR- Antikörper mit stimulierender Funktion

Die bei den Versuchen erhaltenen cAMP- Konzentrationen waren nicht normal- verteilt, d.h. die Werte folgten nicht der Gauß'schen Normalverteilung. Darüber hinaus ergab sich in den einzelnen Patientengruppen zum Teil eine sehr große Streuung der Werte. Aus diesen Gründen war es aussagekräftiger mit den jeweiligen Medianen, anstatt den Mittelwerten zu arbeiten.

Vergleicht man die Mediane der cAMP- Konzentrationen der neun Patientengruppen, fällt auf, dass die Gruppe I, die M. Basedow- Gruppe, mit Abstand den höchsten Wert aufweist mit 84,0 pmol/ml. Im Vergleich zur Kontrollgruppe II mit dem Median der cAMP- Konzentration von 50,5 pmol/ml ist dieser Wert deutlich erhöht. Auch in der M. Hashimoto- Gruppe, Gruppe III, mit 59,5 pmol/ml und der Gruppe V, nicht autoimmune Schilddrüsenerkrankungen, mit 61,5 pmol/ml, werden ebenfalls signifikant hohe cAMP- Konzentrationen gefunden.

Die Gruppe IV (andere Autoimmunerkrankungen) mit 50,0 pmol/ml und Gruppe VI (Thyreoiditis de Quervain) mit 55,0 pmol/ml befinden sich mit ihren cAMP- Konzentrationen annähernd im Bereich der Kontrollgruppe.

Laut dieser Ergebnisse muß in den Gruppen I, III und V vom Vorhandensein von Antikörpern mit stimulierender Funktion auf den TSH- Rezeptor ausgegangen werden.

cAMP- stimulierende Antikörper in der Gruppe I wurden erwartet, da für M. Basedow bekanntlich Antikörper gegen den TSH- Rezeptor charakteristisch sind. Die vorliegenden Ergebnisse belegen dies mit den höchsten cAMP- Werten aller Gruppen in Gruppe I. Insgesamt 62 von 119 Patienten (52,1%) dieser Gruppe besitzen Antikörper stimulierender Funktion.

Überraschend ist, dass auch in den Gruppen III und V signifikant hohe Titer von Antikörpern gegen den TSH- Rezeptor zu finden sind.

Charakteristisch für die Hashimoto- Thyreoiditis ist, wie schon in der Einleitung beschrieben, in den meisten Fällen das Auftreten von Anti- TPO- Antikörpern und Thyreoglobulin- Antikörpern. Das Vorhandensein von TSHR- Antikörpern wurde allerdings ebenfalls beschrieben in der Arbeit von Morgenthaler et al (1998), in welcher 10% der Patienten mit Hashimoto- Thyreoiditis TRAK- positiv waren. Hier sind es 25,7% in der Gruppe III.

Es ist bekannt, dass ein M. Basedow spontan in eine Hashimoto- Thyreoiditis übergehen kann. Der umgekehrte Weg ist ebenfalls möglich und selbst wiederkehrende Zyklen beider Krankheitsbilder treten in seltenen Fällen auf [Kaplan, 1999]. So ist es nicht verwunderlich, dass Patienten mit Hashimoto- Thyreoiditis TRAK besitzen können. Es ist also möglich, dass die 9 der 35 positiven Fälle in Gruppe III entweder falschdiagnostizierte M. Basedow- Patienten sind oder Patienten mit Hashimoto- Thyreoiditis, welche TSHR- Antikörper besitzen, die mit dem Routine- TRAK- Assay[®] jedoch nicht erfasst wurden.

In der Gruppe der nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen wurden keine TSH- Antikörper erwartet, doch 17,4% der Patienten in dieser Gruppe zeigten ein Antikörpervorkommen.

Die 8 der 46 positiv diagnostizierten Struma- Patienten könnten ebenfalls nichterkannte M. Basedow- Patienten sein, mit falsch negativen TRAK- Werten im Routine TRAK- Assay[®] und in einer euthyreoten Phase [Kaplan, 1999]. Die Struma wäre bei diesen Patienten somit nicht Ausdruck eines Jodmangels oder funktionellen Hyperplasie z.B. durch ein autonomes

Adenom, sondern hervorgerufen durch Antikörper stimulierender Funktion [Ciovato et al. 1998; Vitti et al. 1994].

Denkbar wäre ebenfalls, dass diese Patienten aufgrund der funktionsstimulierenden Antikörper in Zukunft eine Hyperthyreose entwickeln werden.

Weiterhin wird die Entstehung von autonomen Adenomen und Knotenstrumen durch eine Mutation des TSH- Rezeptors diskutiert, was durch eine Überexpression von Wachstumsfaktoren, ihrer Rezeptoren und von Signalproteinen [Derwahl 1999; Derwahl et al. 1999] zustande kommen kann. Eine Aktivierung von TRAK ist bei Strumapatienten auch durch eine TSHR- Mutation denkbar.

Bei diesen Patienten wäre der Übergang in eine Hyperthyreose aufgrund der funktionsstimulierenden Antikörper in Zukunft möglich.

Da die Krankheitsverläufe der Patienten nach dem Zeitpunkt der Blutentnahme für diese Studie nicht verfolgt wurden bzw. nicht in diese Arbeit eingeflossen sind, ist eine Aussage über eine eventuell revidierte Diagnosestellung und die Bestätigung dieser Überlegungen leider nicht möglich.

Wie erwartet treten in den Gruppen der Patienten mit anderen AIK (IV) und Thyreoiditis de Quervain (VI) keine signifikanten cAMP- Konzentrationserhöhungen auf. Das zeigt, dass Patienten mit Autoimmunerkrankungen, die schilddrüsenunabhängig sind, z.B. M. Addison, keine Antikörper gegen den TSH- Rezeptor besitzen.

Es ist bekannt, dass das extrazelluläre Epitop des TSH- Rezeptors, welches für die Bindung von TRAK zuständig ist, organspezifisch ist und selbst in sehr ähnlichen Rezeptoren, wie dem Gonadotropin- Rezeptor [Tahara et al. 1991; Kosugi et al. 1991; Frazier et al. 1990] nicht vorkommt [Kosugi et al. 1992]. In der Gruppe IV gibt es nur einen Patienten von 18 (5,6%), welcher nach diesem Messverfahren stimulierende TSH- Antikörper aufweist. Es ist in diesem Fall denkbar, dass dieser Patient neben der Autoimmunerkrankung zusätzlich TSH- Antikörper besitzt.

In der Gruppe VI weist ein Patient Antikörper stimulierender Funktion auf. Bei vier getesteten Patienten sind das allerdings 25% des Gesamtkollektivs.

2.5. Funktionsstimulierende Antikörper bei M. Basedow

Die höchsten cAMP- Konzentrationen sind in den Gruppen Ia und Ic zu finden.

Die Patienten dieser beiden Gruppen waren im Routine- TRAK- Assay[®] TRAK- positiv und zeigen auch in diesem cAMP- Assay signifikant hohe cAMP- Konzentrationen, welche auf das eindeutige Vorhandensein von Antikörpern mit stimulierender Funktion schließen lassen.

Die Mediane betragen in Gruppe Ia 106,3 pmol/ml und in Gruppe Ic 104,3 pmol/ml. Die Werte dieser beiden Gruppen sind ähnlich hoch, obwohl Gruppe Ia aus Patienten besteht, die eine thyreostatische Behandlung von maximal vier Wochen hinter sich haben, die Patienten der Gruppe Ic aber schon seit mindestens neun Monaten therapiert wurden.

Die Aufschlüsselung der Patientengruppen ergibt, dass wir in der Gruppe Ia 15 von 24 Patienten (62,5%) und in der Gruppe Ic 22 von 32 Patienten (68,75%) finden, die erhöhte Titer TSHR- stimulierender Antikörpern besitzen. Im TRAK- Assay[®] waren jedoch alle dieser Patienten TRAK- positiv. Es wäre also zu erwarten gewesen, dass in diesen beiden Gruppen mit dem cAMP- Assay annähernd 100% der Patienten Antikörper mit stimulierender Funktion besitzen. Die Differenz könnte daraus resultieren, dass im TRAK-

Assay[®] die Gesamtheit aller TSH- Antikörper gemessen wird, in unserem cAMP- Assay aber nur die Antikörper mit stimulierender Funktion.

Auch in der Gruppe Id (behandelter MB, TRAK negativ) ist eine Signifikanz der cAMP- Werte in Vergleich zur Kontrollgruppe bei einem Median von 71,0 pmol/ml vorhanden. In der Gruppe Ib (florider MB, TRAK negativ) gibt es bei einem Median von 75,3 pmol/ml und einem Mittelwert von 72,8 pmol/ml keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Wie oben erwähnt, erfolgte die Signifikanzberechnung jedoch mit den Einzelwerten aller Patienten der jeweiligen Gruppen. Durch die große Streuung der Werte und eine relativ kleine Fallzahl von 6 Patienten fiel die Signifikanzberechnung negativ aus. Für eine genaue Aussage über eine eventuell vorhandene Signifikanz wäre eine Stichprobe von 20 Patienten notwendig. Vergleicht man allerdings die Mediane, die bei dieser Werteverteilung eine größere Genauigkeit besitzen, fällt auf, dass der Median in Gruppe Ib noch über dem der Gruppe Id liegt. In diesen beiden Gruppen treten also ebenfalls erhöhte Titer mit Antikörpern stimulierender Funktion auf.

Die nähere Betrachtung der beiden Patientengruppen zeigt in Gruppe Ib 3 von 6 Patienten (50%) und in der Gruppe Id 22 von 57 Patienten (38,6%) mit signifikant hohen Antikörpertitern. Da mithilfe des cAMP- Assays in diesen beiden Gruppen Patienten mit TSHR- Antikörpern gefunden wurden, die laut TRAK- Assay[®] keine Antikörper besitzen, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass unser Messverfahren sensitiver ist.

Im Vergleich der vier M. Basedow- Gruppen zu den anderen fünf Patientengruppen zeigen sich deutlich höhere cAMP- Werte in den Gruppen Ia bis Id (Abb. 12). Selbst in den Gruppen Ib und Id, deren Patienten laut TRAK- Assay[®] TRAK- negativ sind, zeigen sich im cAMP- Assay höhere Mediane als in den Gruppen II bis VI.

Durch den direkten Vergleich aller neun Gruppen ergab sich bei der Signifikanzberechnung eine neue Rangfolge, welche aber zu den selben Ergebnissen hinsichtlich vorhandener Signifikanzen führte: Eine signifikant hohe cAMP- Konzentration, im Vergleich zur Kontrollgruppe II, wird bei in den Patientengruppen mit M. Basedow mit positivem TRAK im RRA (Ia, Ic), der Gruppe der behandelten und TRAK- negativen M. Basedow- Patienten (Id), den Patienten mit Hashimoto- Thyreoiditis (III) und mit nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (V) gefunden. Das gehäufte Auftreten von funktionsstimulierenden Antikörpern muß allerdings, aufgrund vergleichender Messergebnisse, auch der Gruppe Ib (florider MB, TRAK- negativ) zugeschrieben werden. Obwohl in allen Gruppen Patienten mit Antikörpern stimulierender Funktion vorkommen, kann in den Gruppen IV und VI ein generelles Auftreten von TSHR- Antikörpern ausgeschlossen werden.

2.6. TSHR- Antikörper mit blockierender Funktion

Wie oben beschrieben, handelt es sich bei diesem cAMP- Assay, welcher zur Detektion von Antikörpern mit blockierender Funktion am TSH- Rezeptor eingesetzt wurde, um einen kompetitiven Hemmversuch, bei welchem TSH und Antikörper am TSH- Rezeptor konkurrieren. Eine verminderte cAMP- Konzentration spricht somit für das Vorhandensein für IgG mit blockierender Funktion.

Die Mediane der cAMP- Konzentrationen der einzelnen Patientengruppen sind im Vergleich zur Kontrollgruppe II, mit 294,0 pmol/ml, erniedrigt in den Gruppen III (226,8

pmol/ml), IV (201,9 pmol/ml) und V (181,7 pmo/ml). Das heißt, die Gruppen mit Hashimoto- Thyreoiditis, anderen Autoimmunerkrankungen und mit nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen haben signifikant verminderte cAMP- Konzentrationen, was für eine Blockierung der TSH- Wirkung und somit für das Vorhandensein von Antikörpern mit blockierender Funktion spricht.

Dies ist ein sehr überraschendes Ergebnis, da bisher in der Literatur das Vorhandensein von Antikörpern mit Blockierung am TSH- Rezeptor nur bei Patienten mit Hashimoto- Thyreoiditis, toxischem Myxödem und einigen Patienten mit M. Basedow beschrieben wurde [Kraiem et al. 1987; Endo et al. 1978].

In den Gruppen I und VI finden wir höhere cAMP- Konzentrationen als in der Kontrollgruppe (Siehe Tab. 17).

Nur 9,62% (10 von 104) der M. Basedow- Patienten zeigten eine verminderte cAMP- Konzentration. Alle vier getesteten Patienten mit Thyreoiditis de Quervain hatten höhere Konzentrationen als der Referenzwert von 178,2 pmol/ml.

Im Gegensatz dazu zeigten 19,15% (8 von 42) der Patienten in Gruppe III, 27,78% (5 von 18) in Gruppe IV und sogar 50,0% (25 von 50) in Gruppe V niedrige cAMP- Werte im Vergleich zu Gruppe II. Ein Vorkommen von Antikörpern mit blockierender Funktion bei Patienten mit Hashimoto- Thyreoiditis ist bekannt, die Ergebnisse der Gruppen IV und V sind jedoch überraschend. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass die Diagnosestellung nicht genau genug war. So könnten die Patienten mit Autoimmunerkrankungen ebenfalls an M. Basedow oder Hashimoto- Thyreoiditis leiden, was bisher nicht erkannt wurde. Diese Erklärung, sowie die Überlegung einer Mutation des TSH- Rezeptors, könnte man für die Gruppe der Patienten mit nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen heranziehen.

Zu erwähnen ist, dass mithilfe eines Radiorezeptorassays unserer Arbeitsgruppe, welcher von Lucas Meisemann durchgeführt wurde, in 17% bei Patienten mit Hashimoto- Thyreoiditis und 16% bei Patienten mit nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen TRAK gemessen wurden. Hierbei fand jedoch keine Differenzierung zwischen Antikörpern stimulierender und blockierender Funktion statt. Es wurden die gleichen Patientenkollektive wie in dieser Studie untersucht.

2.7. Funktionsblockierende Antikörper bei M. Basedow

Auch hier wurde die Gruppe I in vier M. Basedow- Gruppen unterteilt, um den Einfluß medikamentöser thyreostatischer Therapie auf das Auftreten von Antikörpern mit blockierender Wirkung zu untersuchen und die Ergebnisse dieses cAMP- Assays mit dem TRAK- Assay[®] zu vergleichen.

Es zeigte sich, dass alle vier M. Basedow- Gruppen höhere cAMP- Konzentrationen aufwiesen als die Kontrollgruppe. In den Gruppen Ia und Ic, welche laut TRAK- Assay[®] aus TRAK- positiven Patienten bestehen, zeigten sich signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. In diesen beiden Gruppen lagen die cAMP- Konzentrationen allerdings signifikant über, statt unter den Werten der Gruppe II.

Trotzdem wurden in der Gruppe Ic (behandelter MB, TRAK positiv) 11,11% (3 von 27) der Patienten positiv für Antikörper mit cAMP- Blockierung getestet. In der Gruppe Ia (florider MB, TRAK positiv) dagegen waren es wie erwartet 0%.

Auch die cAMP- Werte in den Gruppen Ib und Id lagen über den Referenzwerten der Gruppe II. In der Gruppe Ib (florider MB, TRAK negativ) fand sich kein einziger Patient

mit erniedrigten cAMP- Konzentrationen, in der Gruppe Id (behandelter MB, TRAK negativ) waren es 13,5% (7 von 52) der Patienten.

Es fällt auf, dass in den beiden Gruppen der unbehandelten M. Basedow- Patienten, Ia und Ib, kein Fall vorkommt, der auf das Vorhandensein von Antikörpern mit blockierender Funktion am TSH- Rezeptor schließen lässt.

Dagegen treten bei über 10% der Patienten, welche länger als neun Monate mit thyreostatischen Medikamenten behandelt wurden, blockierende IgG auf. Es besteht also ein Zusammenhang zwischen thyreostatischer Therapie und dem Auftreten von Antikörpern mit blockierender Wirkung am TSH- Rezeptor.

Dieser Zusammenhang wurde mehrfach beschrieben und wird meist mit einem Übergang zur Hypothyreose in Zusammenhang gebracht. Grundsätzlich sind auch nach thyreostatischer Therapie alle Übergänge zur Hypo-, Eu- oder Hyperthyreose möglich [Tamai et al. 1987]. Der Wechsel zur Hypothyreose ist noch nicht eindeutig geklärt, doch geht man davon aus, dass es durch die antithyreoidale Therapie zu einer diffusen oder fokalen Thyreoiditis mit Gewebszerstörung kommt [Wood et al. 1979; Hirota et al. 1986].

Ähnliche Prozesse werden auch nach einer Radiojodtherapie beobachtet [Chiovato et al. 1998]. Dabei induzieren die Effekte des Radiojods Nekrosen, Atrophie, Fibrosen und chronische Entzündungen des Schilddrüsengewebes. Diese Folgen führen zu einer Änderung der Autoimmunität, die mit einer Häufung von Antikörpern mit stimulierender Aktivität einhergeht und eine Neusynthese von Antikörpern mit blockierender Funktion nach sich ziehen kann [Atkinson et al. 1982; Cho et al. 1998].

Die Patienten in den Gruppen Ia und Ib befanden sich während der Blutabnahme in einem hyperthyreoten Stadium, sie wurden zu diesem Zeitpunkt maximal seit vier Wochen thyreostatisch behandelt.

Die Patienten der Gruppen Ic und Id zeigten unterschiedliche Bilder. Nur einer der zehn Patienten, welche Antikörper mit blockierender Funktion aufwiesen, war hypothyreot. Ein Patient befand sich in der Hyperthyreose, alle andern waren euthyreot. Auffallend ist, dass drei dieser zehn Patienten einen positiven Nachweis für TPO- Antikörper (zwischen 138 und 1245 U/ml) und TAK (zwischen 199 und 234 U/ml) aufwiesen, was für die Hashimoto-Thyreoiditis charakteristisch ist.

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede dieser zehn Patienten hinsichtlich ihres Alters, Geschlechts oder des Vorhandenseins klinischer Symptome, wie einer Struma oder einer Endokrinen Ophthalmopathie, im Vergleich zu den anderen Patienten mit M. Basedow.

Das Auftreten von Antikörpern mit blockierender Funktion bei M. Basedow- Patienten wurde ebenfalls von Morgenthaler et al. (1998) erwähnt. In seiner Studie waren 72% der Patienten mit blockierenden Antikörpern eu- oder hypothyreot. Die Arbeitsgruppe von Kim et al. (2000) konnte Antikörper mit blockierender Funktion in 18,5% bei hyperthyreoten Patienten finden.

Die Ergebnisse der vier M. Basedow- Gruppen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tab. 22: Prozentualer Anteil der TRAK- positiven Patienten im cAMP- Assay (unterteilt nach funktionsstimulierenden bzw. – blockierenden TRAK), im TRAK- Assay[®] und die Behandlungsdauer der Patienten in den Gruppen Ia (florider MB, TRAK positiv), Ib (florider MB, TRAK negativ), Ic (behandelter MB, TRAK positiv) und Id (behandelter MB, TRAK negativ)

Gruppe	AK (stimulierend) im cAMP- Assay vorhanden in %	AK (blockierend) im cAMP- Assay vorhanden in %	TRAK im TRAK- Assay [®] vorhanden in %	Behandlungsdauer
Ia	62,5	0,0	100,0	≤ vier Wochen
Ib	50,0	0,0	0,0	≤ vier Wochen
Ic	68,75	11,11	100,0	≥ neun Monate
Id	38,6	13,5	0,0	≥ neun Monate

Tab. 22 wirft einige Diskussionspunkte auf:

In den Gruppen Ib und Id finden sich laut TRAK- Assay[®] keinerlei TRAK. Mithilfe des cAMP- Assays konnten aber in beiden Gruppen Antikörper nachgewiesen werden. Das sind in der Gruppe Ib nur Antikörper stimulierender Funktion, in Gruppe Id sowohl stimulierender als auch blockierender Funktion. Dieser Sachverhalt spricht für eine höhere Sensitivität des cAMP- Assays.

Die Ergebnisse in den Gruppen Ia und Ic belegen diese Annahme jedoch nicht.

Die Patienten dieser Gruppen besitzen laut TRAK- Assay[®] in 100% Antikörper gegen den TSH- Rezeptor. Deshalb wäre im cAMP- Assay zu erwarten gewesen, dass die Summe der Antikörper annähernd 100% beträgt. Diese liegt jedoch in diesen beiden Gruppen mit 62,5% (Gruppe Ia) und 79,86% (Gruppe Ic) weit darunter.

Eine Erklärung könnte das Vorhandensein von Antikörpern mit neutraler oder ohne stimulierende oder blockierende Funktion sein. Mit dem TRAK- Assay[®] werden bekanntlich alle Antikörper, unabhängig ihrer Wirkung am TSH- Rezeptor gemessen, also auch Antikörper, die keine direkte stimulierende oder blockierende Funktion besitzen. Mithilfe des cAMP- Assays wurden jedoch nur die Antikörper mit stimulierender Funktion im ersten Teil der Untersuchung, und im zweiten Teil nur diejenigen mit blockierender Funktion nachgewiesen. Es ist also möglich, dass die Differenz durch die nicht erfassten Antikörper zustande kommt. Über die Menge von Antikörpern mit neutralem Verhalten am TSH- Rezeptor sind jedoch noch keine Studienergebnisse bekannt.

Der Einfluß der thyreostatischen Behandlungsdauer auf das Vorhandensein von Antikörpern mit stimulierender Funktion ist laut unseren Ergebnissen in geringer Ausprägung ebenfalls vorhanden. Faßt man die Patienten aus Gruppe Ia und Ib zusammen, welche kürzer als vier Wochen medikamentös thyreostatisch behandelt wurden, treten in 60% (18 von 30) der Fälle Antikörper mit stimulierender Funktion auf. In den beiden Gruppen Ib und Id, deren Patienten länger als neun Monate behandelt wurden, sind es jedoch nur 49,4% (44 von 89) der Patienten. Die TRAK- positive Gruppe hat somit im Vergleich zur TRAK- negativen Gruppe einen um ca. 10% höheren Patientenanteil mit Antikörpern stimulierender Funktion.

Auf das Auftreten von Antikörpern mit blockierender Funktion hat die thyreostatische Therapie einen eindeutigen Einfluß. Wie in Tab. 22 zu sehen ist, besitzt kein einziger der insgesamt 25 Patienten, welche eine Behandlungsdauer von höchstens vier Wochen hinter sich haben, Antikörper mit blockierender Funktion. Dagegen sind es in den Gruppen Ic und Id insgesamt 12,7% (10 von 79 Patienten).

Eine Therapie mit thyreostatischen Medikamenten führt also zum Auftreten von Antikörpern mit blockierender Wirkung am TSH- Rezeptor und in der Gesamtheit der Patienten zu einer Abnahme von Antikörpern mit stimulierender Funktion.

Es ist zu bedenken, dass die erhaltenen cAMP- Konzentrationen das Resultat aus allen Interaktionen am TSH- Rezeptor darstellen. Aus der Höhe des cAMP wird also auf das Vorhandensein von Antikörpern zurückgeschlossen. Durch verschiedene TSH- agonistische Einflüsse und antagonistische Effekte verschiedener Antikörper untereinander, in Bezug auf das TSH oder durch andere Proteine im Patientenserum kann das Messergebnis verfälscht sein.

Es muß also der genaue Angriffsort der Antikörper am TSH- Rezeptor und die Interaktion mit verschiedenen Faktoren bekannt sein.

Die Wirkung von IgG auf das TSH- Rezeptor- Adenylatzyklase- System hängt ab von:

1. der Art des IgG
2. der Konzentration des IgG und
3. der TSH- Konzentration [Maccia et al. 1988].

Das heißt, bei dem Versuch zur Erfassung funktionsblockierender Antikörper muß eine Beeinflussung durch im Serum vorhandene funktionsstimulierende Antikörper berücksichtigt werden. Diese TSH- agonistischen Wirkungen stehen der blockierenden Wirkung entgegen. Es ist also nicht möglich genau zu berechnen, wie hoch die Konzentration von Antikörpern mit blockierender Funktion im Serum beträgt. Vielmehr kann eine Gesamttendenz zur Stärke der Blockierung durch diesen Versuch verdeutlicht werden.

Verschiedene Blockierungsmodelle am TSH- Rezeptor sind denkbar: die direkte Blockierung des TSH durch die Besetzung der selben Rezeptorepitope, Störung der Adenylatzyklase- Aktivierung und die gegenseitige Blockierung von Antikörpern mit TSH- stimulierendem und – blockierendem Effekt. Weiterhin sind die Affinitätsunterschiede zu Rezeptordeterminanten wichtig. Zu diesen Punkten gibt es viele kontrovers diskutierte Arbeiten:

Einigen Studien zufolge binden Antikörper mit stimulierender Funktion an anderen Epitopen des TSHR als Antikörper mit blockierender Funktion. Dies beschrieben z.B. Cundiff et al. (2001), wonach TSH- blockierende IgG an den AS 22 bis 305 binden, TSH- stimulierende IgG aber an den AS 54 bis 254 des N- terminalen Endes.

Tahara et al. (1997) identifizierten als Bindungsdomäne für den größten Teil der Antikörper mit stimulierender Funktion die Aminosäuren zwischen 25 und 165, gezählt von der Methionin- Start- Seite der N- terminalen Region des TSHR, wogegen die Antikörper mit blockierender Funktion am C- terminalen Ende der extrazellulären Domäne binden.

Laut Kung et al. (2000) befinden sich die Bindungsregionen für Antikörper mit blockierender Funktion an mehreren Stellen des Rezeptors, vor allem zwischen den Residuen 90 bis 165 und 261 bis 370 aber auch zwischen 9 bis 89.

Unterschiedliche Angriffsorte werden ebenfalls von Kosugi et al. (1992) und Vlase et al. (1998) beschrieben.

In der Studie von Ealey et al. (1985) wird berichtet, dass Antikörper mit blockierender Funktion das TSH, aber kaum die Antikörper mit stimulierender Funktion blockieren. Zur Blockierung von stimulierenden Antikörpern werde ein mehr als 10000 höherer Aktivitätskoeffizient benötigt, als zur Blockierung von TSH.

Andere Ergebnisse gehen davon aus, dass sowohl Antikörper mit stimulierender als auch mit blockierender Funktion am gleichen Ort des Rezeptors angreifen wie das TSH, nämlich der dreidimensional gefalteten extrazellulären Domäne. Somit können beide Antikörpertypen die TSH- Bindung beeinflussen [Sanders et al. 1999].

Atger et al. (1999) konnten bei gesunden Probanden Antikörper, in zum Teil höherer Konzentration finden, als bei Patienten mit M. Basedow. Der entscheidende Unterschied sei jedoch, dass letztere Subpopulationen von Antikörpern aufweisen, die gegen spezifische Epitope gerichtet sind, welche für die Aktivierung des TSH- Rezeptors verantwortlich seien. Weiterhin seien zirkulierende und intrathyroidale T- Zellen mit TSHR- Spezifität vorhanden, welche bei der Signalübertragung eine Rolle spielen. Die meisten B- und T-Zell- Epitope befänden sich an der großen Ektodomäne des TSHR [Vlase et al. 1998].

Das Interesse an der TRAK- Bestimmung liegt in der Vermutung, aus ihrem Vorkommen und der Art ihrer Funktion, Aussagen über die Prognose der Erkrankung M. Basedow abzuleiten.

Interessante Aspekte werden in einigen Studien diskutiert, so z.B. von Michelangeli et al. (1998) und Schleusener et al. (1989), wonach Patienten mit hohen TRAK- Spiegel ein signifikant erhöhtes Rezidivrisiko nach 1,5 Jahren aufweisen, als Patienten ohne TRAK. Ähnliches wird berichtet von Maugendre und Massart (2001), wonach Patienten mit positiven Antikörper- Titern, nach 18 Monaten und thyreostatischer Therapie, eine signifikant erhöhte Rezidivneigung nach drei Jahren besitzen.

In unserer Arbeit konnten wir nicht auf die klinischen Symptome der untersuchten Patienten eingehen, da uns in Einzelfällen leider die Angaben dazu fehlten.

Laut Literatur korrelieren die klinischen Symptome nicht immer mit der Höhe der TRAK [Ilicki et al. 1992], obwohl ein Zusammenhang von Schilddrüsenwachstum und Vorhandensein von Antikörpern mit stimulierender Funktion vermutet wird [Chiovato et al. 1998]. Eine Korrelation von TSH- Antikörpern und Endokriner Ophthalmopathie [Gerding et al. 2000], vor allem bei Patienten mit Antikörpern blockierender Funktion [Kim et al. 2000], wird erwähnt.

Die genauen Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von funktionsstimulierenden und funktionsblockierenden Antikörpern und dem Verlauf von Schilddrüsenerkrankungen müssen sicherlich in weiteren Studien präzisiert werden.

IV. Zusammenfassung

Mithilfe eines cAMP- Assays wurden anhand von CHO- Zellen, welche auf ihrer Oberfläche humane TSH- Rezeptoren tragen (Zelllinie JP 26), bei unterschiedlichen Patientengruppen TRAK mit stimulierender und blockierender Funktion getestet.

In der Gruppe der Hashimoto- Thyreoiditis sind 25,7% der Patienten für Antikörper mit stimulierender Funktion positiv. Dieses Ergebnis läßt sich durch mögliche Übergänge aus dem M. Basedow erklären. 19,15% der Patienten weisen Antikörper mit blockierender Funktion auf. Hierdurch wird die These unterstützt, dass die Hypothyreose durch blockierende Antikörper ausgelöst werde.

Die Patienten welche an einer schilddrüsenunabhängigen Autoimmunerkrankung leiden, zeigen in lediglich 5,56% der Fälle ein Vorkommen von Antikörpern mit stimulierender Funktion, jedoch sind 27,78% von ihnen positiv für blockierende Antikörper.

Überraschenderweise sind in der Gruppe der nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen 17,4% der Patienten positiv für Antikörper mit stimulierender Funktion, bei sogar 50% der Patienten können Antikörper mit blockierender Funktion nachgewiesen werden.

Die Gruppe der Thyreoiditis- de- Quervain- Patienten zeigt keine signifikanten Unterschiede im Vorkommen von Antikörpern zur Kontrollgruppe. Bei einem Patienten finden sich aber Antikörper mit stimulierender Funktion.

Von allen untersuchten Patientenkollektiven wurden in der Gruppe der Patienten mit M. Basedow am häufigsten Antikörper mit stimulierender Funktion nachgewiesen. 52,1% der M. Basedow- Patienten sind Antikörper- positiv.

Die laut RRA TRAK- positiven Patienten zeigen, unabhängig der Behandlungsdauer, den höchsten Patientenanteil mit funktionsstimulierenden Antikörpern.

Bei den unbehandelten Patienten wurden in ca. 10% mehr Antikörper- positive Fälle detektiert, als bei den thyreostatisch behandelten Patienten.

Nur 9,62% der M. Basedow- Patienten haben Antikörper mit blockierender Funktion. Diese verteilen sich ausschließlich auf Patienten, welche seit mindestens neun Monaten in thyreostatischer Behandlung waren.

Bei den Patienten mit einer Behandlungsdauer von höchstens vier Wochen, findet sich kein einziger Patient mit Antikörpern blockierender Funktion.

Die thyreostatische Therapie führt, unseren Ergebnissen zufolge, zu dem Auftreten von Antikörpern mit blockierender Funktion.

Bei 27,8% der Patienten, welche mit dem herkömmlichen RRA als TRAK- negativ eingestuft wurden, können mit unserem cAMP- Assay Antikörper mit stimulierender und/ oder blockierender Funktion festgestellt werden, was für eine höhere Sensitivität unseres Verfahrens spricht.

Literaturverzeichnis

Atkinson S., McGregor A.M., Kendall- Taylor P., Peterson M.M., Smith B.R. (1982) Effect of radioiodine on stimulatory activity of Graves' immunoglobulins. *Clin Endocrinol (Oxf)* 16: 537-543

Atger M., Misrahi M., Young J., Jolivet A., Orgiazzi J., Schaison G., Milgrom E. (1999) Autoantibodies interacting with purified native thyrotropin receptor. *Eur J Biochem* 265 (3): 1022-1031

Bogner U., Schleusener H., Wall J.R. (1984) Antibody- dependent cell- mediated cytotoxicity against human thyroid cells in Hashimoto's thyroiditis but not Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 734-738

Carayon P., Adler G., Roulier R., Lissitzky S. (1983) Heterogeneity of the Graves' immunoglobulins directed toward the thyrotropin receptor- adenylate cyclase system. *J Clin Endocrinol Metab* 56: 1202-1208

Chazenbalk G., Kakinuma A., Jaume J.C., McLachlan S., Rapoport B. (1996) Evidence for negative cooperativity among human thyrotropin receptors overexpressed in mammalian cells. *Endocrinology* 137: 4586-4591

Chiovato L., Fiore E., Vitti P., Rocchi R., Rago T., Dokic D., Latrofa F., Mammoli C., Lippi F., Ceccarelli C., Pinchera A. (1998) Outcome of thyroid function in graves' patients treated with radioiodine: role of thyroid- stimulating and thyrotropin- blocking antibodies and of radioiodine- induced thyroid damage. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 40-46

Chiovato L., Vitti P., Santini F., Lopez G., Mammoli C., Bassi P., Giusti L., Tonaccera M., Fenzi G., Pinchera A. (1990) Incidence of antibodies blocking thyrotropin effect in vitro in patients with euthyroid or hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 40

Cho B.Y., Shong Y.K., Chung J.K. et al. (1989) Changes in the properties of the thyrotropin receptor antibody in patients with Graves' disease after radioiodine treatment. *Thyroid* 3: 109-114

Conn P., Rogers D.C., Stewart J.M., Nidel J., Sheffield T. (1989) Conversion of a gonadotropin- releasing hormone antagonist to an agonist. *Nature* 296: 653-655

Costagliola S., Morgenthaler N.G., Hoermann R., Badenhoop K., Struck J., Freitag D., Poertl S., Weglöhner W., Hollidt J.M., Quadbeck B., Dumont J.E., Schumm- Draeger P.-M., Bergmann A., Mann K., Vassart G., Usadel K.-H. (1999) Second generation assay for TSH- receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (1): 90-97

Costagliola S., Swillens S., Niccoli P., et al. (1992) Binding Assay for thyrotropin receptor autoantibodies using the recombinant receptor protein. *J Clin Endocrinol Metab* 75 (6): 1540-1544

- Crisp** M.S., Lane C., Halliwell M., Wynford-Thomas D., Ludgate M. (1997) Thyrotropin receptor transcripts in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2003–2005
- Cuddihy** R.M., Dutton C.M., Spicer A.P., McDonald J.A., Bahn R.S. (1997) A genomic TSH receptor point mutation is highly associated with autoimmune thyroid disease in female. *Thyroid* 7 (1): 1-11
- Cundiff** J.G., Kaithamana S., Seetharamaiah G.S., Baker J.R. Jr., Prabhakar B.S. (2001) Studies using recombinant fragments of human TSH receptor reveal apparent diversity in the binding specificities of antibodies that block TSH binding to its receptor or stimulate thyroid hormone production. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (9): 4254-4260
- Czarnocka** B., Ruf J., Ferrand M., Carayon P. (1985) Antigenic relation between thyroid peroxidase and the microsomal antigen implicated in autoimmune diseases of the thyroid. *C. R. Acad Sci III*, 300 (15): 577-580
- Czarnocka** B., Ruf J., Ferrand M., Carayon P., Lissitzky S. (1985) Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett* 190 (1): 147-152
- Davies** T.F., MD, FRCP, FACE (1998) Thyroid-Stimulating Antibodies Predict Hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 83 (11): 3777-3781
- Derwahl** M. (1999) Mutations in the thyrotropin receptor gene in the pathogenesis of toxic thyroid adenomas, toxic goiter nodules and autosomal dominant hyperthyroidism. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* Apr;93 (1):25-28
- Derwahl** M., Broecker M., Kraiem Z. (1999) Thyrotropin May Not Be the Dominant Growth Factor in Benign and Malignant Thyroid Tumors. *J Clinical Endocrinol Metab* 84 (3): 829-834
- Ealey** P.A., Valente W.A., Ekins R.P., Kohn L.D., Marshall N.J. (1985) Characterization of monoclonal antibodies raised against solubilized thyrotropin receptors in a cytochemical bioassay for thyroid stimulators. *Endocrinology* 116: 124-131
- Endo** K., Kasagi K., Konishi J., et al. (1978) Detection and properties of TSH binding-inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 46: 734-739
- Endo** T., Ohta K., Haraguchi K., Onaya T. (1995) Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor cDNA from rat fat cells. *J Biol Chem* 270:10833–10837
- Filetti** S., Foti D., Costante G., Rapoport B. (1991) Recombinant human thyrotropin (TSH) receptor in a radioreceptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 1096-1101
- Frazier** A.L., Robbins L.S., Stork P.J., Sprengel R., Segaloff D.L., Cone R.D. (1990) Isolation of TSH and LH/ CG receptor cDNAs from human thyroid: regulation by tissue specific splicing. *Mol Endocrinol* 4: 1264-1276

Furmaniak J. & Rees Smith B. (1991) Structure of the TSH receptor. *Exp Clin Endocrinol* 97: 160-164

Gennick S.E., Thomas Jr C.G., Nayfeh S.N. (1987) Characterization of the subunit structure of the thyrotropin receptor in the FRTL-5 rat thyroid cell line. *Endocrinology* 121:2119–2130

Gerding M.N., van der Meer J.W., Broenink M., Bakker O., Wiersinga W.M., Prummel M.F. (2000) Association of thyrotrophin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52 (3): 267-271

Giovanella L., Ceriani L., Garancini S. (2001) Evaluation of the 2nd generation radio-receptional assay for anti- TSH receptor antibodies (TRAb) in autoimmune thyroid diseases. Comparison with 1st generation and anti- thyroperoxidase antibodies (AbTPO). *J Nucl. Med* 45 (1): 115-119

Gudermann Th., Kalkbrenner F., Schultz G. (1996) Diversity and selectivity of receptor- G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 429-459

Gupka M. (1992) Thyrotropin receptor antibodies: advances and importance of detection techniques in thyroid disease. *Clin Biochem* 25: 193-199

Herold G., Deuss U., Mödder G. (2002) Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. *Köln*

Heufelder A.E., Spitzweg Ch. (1998) Pathogenese der immunogenen Hyperthyreose und endokrinen Orbitopathie. *Internist* 39: 599-606

Hirota Y., Tamai H., Hayashi Y., Matsubayashi S., Matsuzuka F., Kuma K., Kumagai L.F., Nagataki S. (1986) Thyroid function and histology in forty- five patients with hyperthyroid Graves' disease in clinical remission more than ten years after thionamide drug treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 62: 165

Ilicki A., Gamstedt A., Karlsson F.A. (1992) Hyperthyroid Graves' disease without detectable thyrotropin receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 1090-1094

Janson A., Karlsson F.A., Micha-Johansson G., Bolme P., Bronnegard M., Marcus C. (1995) Effects of stimulatory and inhibitory thyrotropin receptor antibodies on lipolysis in infant adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1712–1716

Kakinuma A., Chazenbalk G.D., Jaume J.C., Rapoport B., McLachlan S. (1997) The human thyrotropin (TSH) receptor in a TSH binding inhibiting assay for TSH receptor autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2129-2134

Kaplan M.M. (1999) Clinical Perspectives in the Diagnosis of Thyroid Disease. *Clin Chem* 45: 1377-1383

Khoury E.L., Hammond L., Bottazzo G.F., Doniach D. (1981) Presence of organspecific complement- mediated cytotoxicity. *Clin Exp Immunol* 45: 316-328

Kim W.B., Chung H.K., Park Y.J., Park D.J., Tahara K., Kohn L.D., Cho B.Y. (2000) The prevalence and clinical significance of blocking thyrotropin receptor antibodies in untreated hyperthyroid Graves' disease. *Thyroid* 10 (7): 579-586

Kjelsberg M.A., Cotecchia S., Ostrowski J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1992) Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J Biol Chem* 267:1430-1433

Kohn L.D., Rotella C.M., Marcocci C., Toccafondi R., Pinchera A., Tombaccini D., Valente W.A., De Luca M. & Grollman E.F. (1985) Monoclonal antibodies and autoimmune thyroid disease. In *Monoclonal Antibodies 1984: Biological and Clinical Application* (eds A. Pinchera, G. Doria, F. Dammacco & A. Bargellesi): 169-199 Editrice Kurtis, Milan

Kohn L.D., Valente W.A., Laccetti P., Cohen J.L., Aloj S.M., Grollman E.F. (1983) Multicomponent structure of the thyrotropin receptor: relationship to Graves' disease. *Life Sci* 32: 15

Kosugi S., Ban T., Akamizu T., Kohn L.D. (1992) Identification of separate determinants on the thyrotropin receptor reactive with Graves' thyroid-stimulating antibodies and with thyroid-stimulating blocking antibodies in Idiopathic Myxedema: these determinants have no homologous sequence on Gonadotropin receptors. *Mol Endocrinol* 6: 168-180

Kosugi S., Ban T., Akamizu T., Kohn L.D. (1991) Site directed mutagenesis of a portion of the extracellular domain of the rat thyrotropin receptor important in autoimmune thyroid disease and nonhomologous with gonadotropin receptors: relationship of functional and immunogenic domains. *J Biol Chem* 266: 19413-19418

Kraiem Z., Lahat N., Glaser B., Baron E., Sadeh O., Sheinfeld M. (1987) Thyrotrophin receptor blocking antibodies: incidence, characterization and in-vitro synthesis. *Clin Endocrinol* 27: 409-421

Kung A.W., Lau K.S., Kohn L.D. (2000) Characterization of thyroid-stimulating blocking antibodies that appeared during transient hypothyroidism after radioactive iodine therapy. *Thyroid* 10 (10): 909-917

Libert F., Lefort A., Gerard C., Parmentier M., Perret J., Ludgate M. et al. (1989) Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for binding of autoantibodies. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165: 1250-1255

Libert F., Ruel J., Ludgate M., Swillens S., Alexander N., Vassart G., Dinsart C. (1987) Thyroperoxidase, an auto-antigen with a mosaic structure made of nuclear and mitochondrial gene modules. *EMBO J.* 6: 4193-4196

Ludgate M., Costagiola S., Danguy D., Perret J., Vassart, G. (1992) Recombinant TSH-receptor for determination of TSH-receptor antibodies. *Exp Clin Endocrinol* 100: 73-74

Maccia E., Concetti R., Carone G., Borgoni F. (1988) Demonstration of blocking immunoglobulins G, having a heterogeneous behaviour, in sera of patients with Graves' disease: possible coexistence of different autoantibodies directed to the TSH receptor. *Clin Endocrinol* 28: 147-156

Magnusson R.P., Gestautas J., Seto P., Taurog A., Rapoport B. (1986) Isolation and characterization of a cDNA clone for porcine thyroid peroxidase. *FEBS Lett* 208 : 391-396

Malthiery Y., S. Lissitzky S. (1985) Sequence of the 5'- end quarter of the human-thyroglobulin messenger ribonucleic acid and of its deduced amino- acid sequence. *Eur J Biochem* 147: 53-58

Matsuda T., Momoi T, Akaishi K, Yagura T, Kasagi K, Endo K. (1988) Transient neonatal hyperthyroidism and maternal thyroid stimulating immunoglobulins. *Arch Dis Child* 63(2): 205-7

Maugendre D., Massart C. (2001) Clinical value of a new TSH binding inhibitory activity assay using human TSH receptors in the follow- up of antithyroid drug treated Graves' disease. Comparison with thyroid stimulating antibody bioassay. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54 (1): 89-96

McKenzie J.M., Zakarija M., Sato A. (1978) Humoral immunity in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 7: 31-45

McKenzie J.M., Zakarija M. (1989). The clinical use of thyrotropin receptor antibody measurements. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 69:1093

McQuade R., Thomas Jr C.G., Nayfeh S.N. (1986) Covalent crosslinking of thyrotropin to thyroid plasma membrane receptors: subunit composition of the thyrotropin receptor. *Arch Biochem Biophys* 246:52-62

Merck KGaA, Darmstadt. (1997) Update in Diagnosis of Thyroid Disorders. *Thyroid International* 2

Michelangeli V.P., Munro D.S., Poon C.W., Fraumann A.G., Colman P.G. (1994) Measurement of thyroid stimulating immunoglobulin in a new cell line transfected with a functional human TSH receptor (JP09), compared with an assay using FRTL- 5 cells. *Clin Endocrinol* 40: 645-652

Michelangeli V.P., Poon C.W., Taft J., Newham H., Topliss D., Colman P. (1998) The prognosis value of thyrotropin receptor antibody measurement in the early stages of treatment of Graves' disease with antithyroid drugs. *Thyroid* 8: 119-124

Misrahi M., Loosfelt M., Atger M., Sar S., Guiochon- Mantel A., Milgrom E. (1990) Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 166: 394-403

Morgenthaler N.G., Pampel I., Aust G., Seissler J., Scherbaum W.A. (1998) Application of a bioassay with CHO cells for the routine detection of stimulating and blocking autoantibodies to the TSH- receptor. *Horm Metab Res* 30: 162-168

Nagayama Y., Kaufman K.D., Seto P., Rapoport B. (1989) Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 165: 1184-1190

Orgazzi J., Williams D.E., Chopra I.J., Solomon D.H. (1976) Human thyroid adenyl cyclase- stimulating activity in immunoglobulin G of patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 42: 341-354

Parmentier M., Libert F., Maenhaut C. et al. (1989) Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* 246: 1620-1622

Perret J., Ludgate M., Libert F., Gerad C., Dumont J.E., Vassart G., Parmentier M. (1990) Stable expression of human TSH receptor in CHO cells and characterisation of differentially expressing clones. *Biochem Biophys Res Comm* 171: 1044-1055

Pinchera A., Fenzi G.F., Vitti P. et al. (1985) Significance of thyroid autoantibodies in autoimmune thyroid disease. In Walfish P.G., Wall J.R., Volpe R., eds. *Autoimmunity and the thyroid*. Toronto: Academic press 139-151

Pfannenstiel P., Hotze L.- A., Saller B. (1999) Schilddrüsenerkrankungen: Diagnose und Therapie. Hrsg. Von Henning Berlin. 4. Aufl.: Berliner Med. Verl.- Anst.: 237

Pfannenstiel P., Hotze L.- A., Saller B. (1999) Schilddrüsenerkrankungen: Diagnose und Therapie. Hrsg. Von Henning Berlin. 4. Aufl.: Berliner Med. Verl.- Anst.: 235

Prummel M.F., Wiersinga W.M. (1993) Smoking and risk of Graves' disease. *J Am Med Assoc* 269: 479-482

Rapoport B. (1998) Thyroid- specific antigens in Basedow's disease. *Exp Clin Endocrinol* 97: 147-152

Rapoport B., Chazenbalk G.D., Jaume J.C., McLachlan S.M. (1998) The Thyrotropin (TSH)-Releasing Hormone Receptor: Interaction with TSH and Autoantibodies. *Endocr Rev* 19 (6):673-716

Rapoport B., Greenspan F.S., Filetti S., Pepitone M. (1984) Clinical experience with a human thyroid cell bioassay for thyroid stimulating immunoglobulin. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 332-335

Rees Smith B., McLachlan S.M., Furmaniak J. (1988) Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocr Rev* 9: 106-121

Roselli-Rehfuß L., Robbins L.S., Cone R.D. (1992) Thyrotropin receptor messenger ribonucleic acid is expressed in most brown and white adipose tissues in the guinea pig. *Endocrinology* 130:1857-1861

Sanders J., Oda Y., Roberts S., Kiddie A., Richards T., Bolton J., McGrath V., Walters S., Jaskólski D., Furmaniak J., Rees Smith B. (1999) The interaction of TSH receptor autoantibodies with ²³I- labelled TSH receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3797-3802

Scherbaum W.A. (1993) Immunthyreopathie.

Scherbaum W.A., Stöckle G., Wichmann J., Berg P.A. (1982) Immunological and clinical characterization of patients with untreated euthyroid and hypothyroid autoimmune thyroiditis. Antibody spectrum, response to TRH and clinical study. *Acta Endocrinol (Copenh)* 100: 373

Schleusener H., Schwander J., Fischer C. et al. (1989) Prospective multicentre study on the prediction of relapse after antithyroid drug treatment in patients with Graves' disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 120: 689-701

Schumm- Draeger P.-M. (1998) Thyreoiditis. Formen, Diagnostik, Therapie. *Internist* 39: 594-598

Seto P., Hirayu H., Magnusson R.P., Gestautas J., Portmann S., De Groot L.J., Rapoport B. (1987) Isolation of a cDNA clone for the thyroid microsomal antigen : Homology with the gene for thyroid peroxidase. *J Clin Invest* 80: 1205-1208

Studer H., Peter H.J., Gerber H. (1989) Natural heterogeneity of thyroid cells: the basis for understanding thyroid function and nodular goiter growth. *Endocr Rev* 10: 125-135

Tahara K., Ban T., Minegishi T., Kohn L.D. (1991) Immunoglobulins from Graves' disease patients interact with different sites on TSH receptor/ LH- CG receptor chimeras than either TSH or immunoglobulins from idiopathic myxedema patients. *Biochem Biophys Res Comm* 179:70-77

Tahara K., Ishikawa N., Yamamoto K., Hirai A., Ito K., Tamura Y., Yoshida S., Saito Y., Kohn L.D. (1997) Epitopes for thyroid stimulating and blocking autoantibodies on the extracellular domain of the human thyrotropin receptor. *Thyroid* 7(6): 867-877

Tamai J., Hirota Y., Kasagi K., Matsubayashi S., Kuma K., Iida Y., Konishi J., Okimura M.C., Walter R.M., Kumagai L F., Nagataki S. (1987) The mechanism of spontaneous hypothyroidism in patients with Graves' disease after antithyroid drug treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 718-722

Vitti P., Chiovato L., Tonacchera M., et al. (1994) Failure to detect thyroid growth-promoting activity in immunoglobulin G of patients with endemic goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1020-1025

Vitti P., Elisei R. Tonacchera M., Chiovato L., Manucusi F., Rago T., Mammoli C., Ludgate M., Vassart G., Pinchera A. (1993) Detection of thyroid- stimulating antibody using chinese hamster ovary cells transfected with cloned human thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 499-503

Vlase H., Weiss M., Graves P.N., Davies F. (1998) Characterization of the murine immune response to the murine TSH receptor ectodomain: induction of hypothyroidism and TSH receptor antibodies. *Clin Exp Immunol* 113: 111-118

Volpé R. (1985) Autoimmune thyroid disease. In *Autoimmunity and Endocrine Disease* ed. R. Volpe), pp. 109-285. Dekker, New York

Wallaschowski H., Orda C., Georgi P., Miele K., Paschke R. (2001) Distinction between autoimmune and non- autoimmune hyperthyroidism by determination of tsh- receptor antibodies in patients with the initial diagnosis of toxic multinodular goiter. *Horm Metab Res* 33 (8): 504-7

Wallaschowski H., Paschke R. (1999) Detection of thyroid stimulating (TSAB)- and thyroid stimulation blocking (TSBAB) antibodies with CHO cell lines expressing different TSH-receptor numbers. *Clin Endocrinol* 50: 356-372

Weetman A.P., McGregor A.M. (1984) Autoimmune thyroid disease: developments in our understanding. *Endocr Rev* 5: 309-355

Wood L.C., Ingbar S.H. (1979) Hypothyroidism as a late sequela in patients with Graves' treated with antithyroid agents. *J Clin Invest* 64: 1429

Yokoyama N., Taurog A. (1988) Porcine thyroid peroxidase: Relationship between the native enzyme and an active, highly purified tryptic fragment. *Mol Endocrinol* 2: 838-844

Zakarija M., Garcia A., McKenzie J.M. (1985) Studies on multiple thyroid cell membrane-directed antibodies in Graves' disease. *J Clin Invest* 76: 1885-1891

Zakarija M., McKenzie J.M. (1983) Pregnancy-associated changes in the thyroid-stimulating antibody of Graves' disease and the relationship to neonatal hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 57(5): 1036-40

Zakarija M., McKenzie J.M., Banovac K. (1980) Clinical significance of assay of the thyroid-stimulating antibody of Graves' disease. *Ann Intern Med* 93: 28-32

Zakarija M., McKenzie J.M., Munro D.S. (1983) Immunglobulin G inhibitor of thyroid stimulating antibody is cause of delay in onset of neonatal Graves' disease. *J Clin Invest* 72: 1352

Zamani M., Spaepen M., Bex M., Bouillon R., Cassiman J.J. (2000) Primary role of the HLA class II DRB1*0301 allele in Graves disease. *Am J Med Genet* 18; 95 (5):432-437

Zöphel K., Wunderlich G., Koch R., Franke W.- G. (2000) Measurement of thyrotropin receptor antibodies (TRAK) with a second generation assay in patients with Graves' disease. *Nuklearmedizin* 39: 113-120

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich, Anna- Maria Wangler, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin zur Promotionsordnung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„TSH- Rezeptor- Antikörper mit stimulierender und blockierender Funktion bei Patienten mit M. Basedow und anderen Schilddrüsen- und Autoimmunerkrankungen“

im Zentrum der Inneren Medizin, Med. Klinik I- Endokrinologie, des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe- Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. P.- M. Schumm- Draeger, mit Unterstützung von Frau Dr. phil. nat. M. Penna- Martinez und Frau Dr. med. S. Röddiger, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt 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 der Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 10.06.2002

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Anna- Maria Wangler
Geburtstag: 06.12.1974
Geburtsort: Alma- Ata

Schulbildung

1981-1985 Alfred- Schmidt- SAS- Oberschule (Leipzig)
1985-1989 Hermann- Duncker- Oberschule (Leipzig)
1989-1991 Laurentius- Gymnasium (Neuendettelsau)
1991-1994 Elisabethen- Gymnasium (Frankfurt/ Main)
Abitur am 13.06.1994

Studium

1995-1997 Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-
Universität (Frankfurt/Main): Vorklinischer Abschnitt
Physikum am 04.04.1997
1997-1998 Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-
Universität (Frankfurt/Main): Erster klinischer Abschnitt
1. Staatsexamen am 16.04.1998
1998-2000 Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-
Universität (Frankfurt/Main): Zweiter klinischer Abschnitt
2. Staatsexamen am 13.09.2001
2001-2002 Praktischen Jahres im Hospital zum Heiligen Geist (Frankfurt/M.)
3. Staatsexamen am 10.04.2002
seit 2002 ÄIP im Hospital zum Heiligen Geist, Abt. Anästhesie

**Zusammenfassung der Dissertation von Anna- Maria Wangler
mit dem Titel:**

**TSH- Rezeptor- Antikörper mit stimulierender und blockierender Funktion bei
Patienten mit M. Basedow und anderen Schilddrüsen- und Autoimmunerkrankungen**

Einleitung

Mithilfe der klinischen Routinemethode, TRAK- Assay[®], wurden bei Patienten TSH-Rezeptor- Antikörpern (TRAK) nachgewiesen, um die Diagnose M. Basedow zu erhärten oder auszuschließen. Diese Methode ist aber nur in der Lage die Gesamtheit aller TRAK zu erfassen.

In dieser Studie wurde eine andere Methode, der cAMP- Assay verwendet, bei welchem Chinesische Hamster Ovarien (CHO)- Zellen eingesetzt wurden, die auf ihrer Oberfläche stabil exprimierte humane TSH- Rezeptoren besitzen, und welcher in der Lage ist, zwischen dem Vorhandensein von funktionsstimulierenden und funktionsblockierenden Antikörpern zu unterscheiden.

Die Differenzierung zwischen diesen verschiedenen Antikörper- Typen kann wichtige Hinweise dafür liefern, warum das klinische Bild bei vielen Erkrankten nicht mit dem Vorhandensein oder der Höhe der TRAK korreliert und Anhaltspunkte über die Prognose über den weiteren Verlauf der Erkrankung geben.

Große Patientenkollektive von insgesamt mehr als 300 Patienten wurden auf das Vorhandensein von TRAK im Serum untersucht, getrennt nach TRAK mit stimulierender und blockierender Funktion. Neben Patienten mit M. Basedow wurden in diese Studie auch Patienten einbezogen, welche an Hashimoto- Thyreoiditis, an einer anderen Autoimmunerkrankung, an nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen oder an Thyreoiditis de Quervain erkrankt waren.

Bei Patienten mit M. Basedow wurde außerdem der Einfluß der thyreostatischen Behandlungsdauer auf das Auftreten von TRAK mit stimulierender und blockierender Funktion untersucht.

Material und Methode

Es wurde die CHO- Zelllinie JP 26 verwendet. Die Zellen wurden kultiviert mit IMDM-Medium, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 5% FCS in einer 5%igen CO₂- Atmosphäre bei 37°C. Für den cAMP- Assay wurden die Zellen in 96- Well- Platten angezüchtet. 24 Stunden später wurden die CHO- Zellen, nach Entfernung des Kulturmediums, zur Ermittlung funktionsstimulierender TRAK, mit 60 µl hypotonem KRB-Puffer, 20 µl IMBX (Isobutylmethylxanthine) und 20 µl Patientenserum für zwei Stunden inkubiert. Zur Ermittlung funktionsblockierender TRAK wurden 40 µl KRB, 20 µl IMBX, 20 µl Patientenserum und 20 µl TSH (Konz. 0,5 mU/ml) verwendet.

Die cAMP- Konzentration wurde mittels eines kompetitiven Radioimmunoassays (BIOTRAK[®] cAMP) und eines Gamma- Counters gemessen.

Ergebnisse

Mit dieser Methode läßt sich zeigen, dass nicht nur bei Patienten mit M. Basedow signifikant hohe Titer mit funktionsstimulierenden und funktionsblockierenden Antikörpern vorhanden sind.

Funktionsstimulierende TRAK wurden bei 25,7% der Hashimoto- Thyreoiditis- Patienten, bei 5,56% der Patienten mit schilddrüsenunabhängigen Autoimmunerkrankungen (M. Addison, Diabetes mellitus Typ 1) und bei 17,4% der Patienten mit nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen detektiert.

Funktionsblockierende TRAK waren in signifikanter Höhe bei 19,15% der Patienten mit Hashimoto- Thyreoiditis, bei 27,78% mit schilddrüsenunabhängigen Autoimmunerkrankungen und bei 50% mit nicht- autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen aufzufinden.

Die Gruppe der Thyroiditis- de Quervain- Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vorkommen von Antikörpern zur Kontrollgruppe.

In der Gruppe der M. Basedow- Patienten konnten bei 52,1% funktionsstimulierende Antikörper entdeckt werden.

Bei den Patienten, welche weniger als vier Wochen thyreostatisch behandelt wurden, konnten in ca. 10% mehr Antikörper- positive Fälle detektiert werden, als bei Patienten mit einer Behandlungsdauer von mehr als neun Monaten.

Nur 9,62% der M. Basedow- Patienten hatten laut cAMP- Assay TRAK mit blockierender Funktion. Diese verteilen sich ausschließlich auf Patienten, welche seit mindestens neun Monaten in thyreostatischer Behandlung waren.

Der hier verwendete cAMP ist ein geeignetes Verfahren zur Differenzierung unterschiedlicher TRAK- Typen, was mit dem herkömmlichen TRAK- Assay[®] nicht möglich ist.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen den TSH- Rezeptor nicht nur bei Patienten mit M. Basedow vorkommen, sondern auch bei Patienten anderer Schilddrüsen- und Autoimmunerkrankungen.

Es wird außerdem deutlich, dass eine thyreostatische Behandlung mit einer Dauer über neun Monaten bei M. Basedow- Patienten zum gehäuftem Auftreten von funktionsblockierenden Antikörpern führt.

Summary of the dissertation of Anna- Maria Wangler

Title:

TSH receptor antibodies with stimulating and inhibiting function in patients with Graves' disease and with in different thyroid and autoimmune diseases

Introduction

The clinical routine method, TRAK- Assay[®], is used to detect the presence of TSH receptor antibodies (TSHrAB) in patients serum to confirm or to rule out the diagnosis Graves' disease. But there are antibodies with different functions and this method only records the total amount of both stimulating (TSAbs) and inhibiting antibodies (TBABs).

In this study another method, the cAMP- Assay, was used. This bioassay is using chinese hamster ovary (CHO) cells transfected with the human TSH receptor (JP 26), which is able to detect both types of autoantibodies.

The ability to differentiate antibody types is important to explain discrepancies of TSH receptor antibody assay levels and the clinical course of autoimmune thyroid disease.

Large collectives of patients (more than 300) were analysed. The presence of TSHrAB of stimulating and inhibiting function in patients sera were investigated in separate procedures. Besides patients with Graves' disease this study also included patients with Hashimoto thyroiditis, different autoimmune diseases, non autoimmune thyroidal diseases and Thyroiditis de Quervain.

In the Graves' disease group the influence of the duration of thyreostatical treatment on the occurrence of TSHrAB with different functions was additionally investigated.

Material and methods

JP 26 cells were cultivated in IMDM- medium, 100 IU/l penicillin, 100 mg/l streptomycin, 5% fetal calf serum under an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C, and were passaged every 3 to 4 days. Before the cAMP- assay, CHO- cells were transferred into 96- well- plates and incubated for 24 hours. To determine TSAbs the cells were incubated for two hours in a mixture of 60 µl hypotonic KRB buffer, 20 µl of 1 mM isobutylmethylxantine (IMBX) and 20 µl of patient serum per well. To determine TBABs 40 µl of hypotonic KRB buffer, 20 µl of IMBX, 20 µl of patient serum and 20 µl of 0,5 mU/ml TSH were mixed in the wells.

cAMP concentrations were measured using competitive radioimmunoassay (BIOTRAK[®] cAMP).

Results

This study shows that TSAbs and TBABs are not only present in patients with Graves' disease but also appear in other cases.

TSAbs were detected in 25,7% of patients with Hashimoto thyroiditis, in 5,56% of patients with thyroid independent autoimmune diseases (e.g. M. Addison, Diabetes mellitus Type 1) and in 17,4% of patients with non autoimmune thyroidal diseases (e.g. goiter).

Significantly elevated levels of TBABs were found in 19,15% of patients with Hashimoto thyroiditis, in 27,78% in the thyroid independent autoimmune diseases group and in 50% in the group of non autoimmune thyroidal diseases.

Patients with Thyroiditis de Quervain showed no significant differences in comparison with the control group in the occurrence of antibodies.

In the group of patients with Graves' disease TSABs were detected in 52,1%. Patients who were treated less than four weeks with antithyroidal drug therapy showed in 10% more cases TSABs than in those who were treated more than nine month.

Significant high levels of TBABs were found in just 9,62% of the patients who suffered from Graves' disease. All of them were in antithyroidal treatment for more than nine month.

Conclusively it was shown that, in contrast to routinely used TRAK- assay[®], the various antibody types can be differentiated with the use of this CHO- cell based bioassay.

These study shows that TSH receptor antibodies appear in patients sera with Graves' disease but also in cases with different thyroidal and autoimmune diseases.

Furthermore these results clearly demonstrate that antithyroidal treatment for more than nine month leads to a higher frequency of TBABs appearance.