

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Thyreotropin-Rezeptor:
Untersuchung von Antikörper
Bindungsstellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Felix Wilhelm Pavenstädt
aus Bielefeld

Mainz, 2022

Tag der Promotion: 12.Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung / Ziel der Arbeit	1
2	Literaturdiskussion	3
2.1	Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen.....	3
2.2	Morbus Basedow	4
2.3	Hashimoto Thyreoiditis.....	5
2.4	Klinische Indikationen für die Erfassung von TSH-Rezeptor-Antikörper....	6
2.5	Der TSH-Rezeptor.....	8
2.5.1	Leucinreiche Wiederholungsdomänen.....	8
2.5.2	Aufbau des TSHR.....	8
2.6	TSHR-Autoantikörper.....	10
2.7	Epitope des TSHR.....	12
2.7.1	TSH Interaktion mit dem TSHR	12
2.8	Interaktion von monoklonalen Antikörpern mit dem TSHR.....	12
2.8.1	M22 mAk Interaktion mit dem TSHR	12
2.9	Computer Epitopen Vorhersage für M22 und K1-70 mAk am TSHR	15
2.10	Zusammenfassung potenzieller Epitope des TSHR.....	17
2.11	Verfügbare Immunoassays und Bioassays zur Messung von TSH- Rezeptor-Antikörpern.....	18
2.11.1	Kompetitive Bindungs-Immunoassays	18
2.11.2	Bioassays.....	18
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Material	20
3.1.1	Peptide	21
3.1.2	Rekombinante Proteine	22
3.1.3	Patientenübersicht.....	23
3.2	Methodik.....	24

3.2.1	Verdünnungsübersicht der Proben	24
3.2.2	Verdünnung der humanen monoklonalen TSHR-Antikörper.....	24
3.2.3	Verdünnung von M22 mAk	25
3.2.4	Verdünnung von K1-18 mAk.....	25
3.2.5	Verdünnung von K1-70 mAk.....	26
3.2.6	Verdünnung von 5C9 mAk.....	26
3.2.7	Verdünnung der Peptide.....	27
3.2.8	Verdünnung der rekombinanten TSHR Proteine	27
3.2.9	Verdünnung von rekombinantem Protein 6 (L1-10).....	28
3.2.10	Bioassay für stimulierende TSH-Rezeptor Antikörper	28
3.2.11	Bioassay für blockierende TSH-Rezeptor Antikörper	29
3.3	Formeln zur Berechnung.....	30
3.4	Titration von den monoklonalen Antikörpern	30
3.5	Allgemeiner Ablauf der Untersuchung von Peptiden und Proteinen im TSI und TBI Bioassay.....	30
3.6	Untersuchung der Peptide im TSI und TBI Bioassay	31
3.7	Untersuchung der Proteine im TSI und TBI Bioassay	31
3.8	Verifizierung und Vergleich von vier Lots von Protein 6 (L1-10) im TSI und TBI Bioassay.....	32
3.9	Untersuchung von Protein 6 (L1-10) mit TSI positiven Patientenseren im TSI Bioassay.....	33
3.10	Statistische Auswertung.....	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Titration von M22 mAk und K1-18 mAk.....	36
4.2	Titration von K1-70 und 5C9 mAk	37
4.3	Zusammenfassung der vier mAk Titrations.....	38
4.4	Untersuchung neun verschiedener Peptide im stimulierenden (TSI) Bioassay	39

4.5	Untersuchung neun verschiedener Peptide im blockierenden (TBI) Bioassay	41
4.6	Untersuchung der Peptide als Kontrolle im TBI und TSI Bioassay in Abwesenheit von M22 mAk	43
4.7	Untersuchung sechs rekombinanter Proteine im stimulierenden (TSI) Bioassay	44
4.8	Untersuchung sechs rekombinanter Proteine im blockierenden (TBI) Bioassay	46
4.8.2	Untersuchung der rekombinanten Proteine als Kontrolle im TBI und TSI Bioassay in Abwesenheit von monoklonalen Antikörpern.....	48
4.9	Vergleich vier verschiedener Lots von Protein 6 (L1-10) im stimulierenden (TSI) Bioassay	49
4.10	Vergleich vier verschiedener Lots von Protein 6 (L1-10) im blockierenden (TBI) Bioassay	50
4.11	Untersuchung von Protein 6 (L1-10) mit TSI positiven Patientenseren im stimulierenden (TSI) Bioassay	51
5	Diskussion.....	62
5.1	Ergebnisdiskussion	62
5.2	Stimulierende TSH Rezeptor Antikörper (TSI)	65
5.3	Blockierende TSH Rezeptor Antikörper (TBI).....	66
5.4	Vergleich der Bindungsstellen von M22 und K1-70 mAk.....	67
5.5	Weitere Epitope außerhalb der LRD	69
5.6	Weiter Epitope von monoklonalen TSHR-Antikörpern.....	70
6.	Zusammenfassung.....	71
6	Anhang.....	72
7	Literaturverzeichnis	75
8	Danksagung.....	80
9	Lebenslauf.....	81

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 LRD-INTERAKTIONEN .	17
TABELLE 2 VERWENDETE REAGENZIEN	20
TABELLE 3 VERWENDETE GERÄTE	20
TABELLE 4 VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN	20
TABELLE 5 HUMANE MONOKLONALE ANTIKÖRPER	21
TABELLE 6 PEPTID-FRAGMENTE	21
TABELLE 7 PROTEINE	22
TABELLE 8 VERWENDETE PATIENTENSEREN	23
TABELLE 9 PROTEIN VERDÜNNUNG	27
TABELLE 10 VIER VERSCHIEDENE LOTS VON PROTEIN 6 (L1-10)	28
TABELLE 11 ÜBERSICHT DER VERSUCHE MIT PATIENTENSEREN UND PROTEIN 6 (L1-10)	34
TABELLE 12 VERWENDETE PATIENTENSEREN IM VERSUCH NR. 4	34

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: TSH-REZEPTOR ÜBERSICHT	10
ABBILDUNG 2 TSHR-ANTIKÖRPER BINDUNGSSTELLEN	11
ABBILDUNG 3 TSHR-ANTIKÖRPER EINFLUSS AUF DEN CAMP LEVEL.....	12
ABBILDUNG 4 VEREINFACHTE DARSTELLUNG DER INTERAKTIONSFELDER VON TSHR UND ANTIKÖRPER.....	14
ABBILDUNG 5: EPITOPEN KALKULATION M22 MAK.....	16
ABBILDUNG 6 EPITOPEN KALKULATION K1-70 MAK.....	16
ABBILDUNG 7 PEPTID-FRAGMENTE IN BEZUG ZUR LRD	21
ABBILDUNG 8 REKOMBINANTE PROTEINE IN BEZUG ZUR LRD.....	22
ABBILDUNG 9 VERDÜNNUNGSVERLAUF DER PROBEN	24
ABBILDUNG 10 VERDÜNNUNGSREIHE VON M22 MAK.....	25
ABBILDUNG 11 VERDÜNNUNGSREIHE VON K1-18 MAK.....	25
ABBILDUNG 12 VERDÜNNUNGSREIHE VON K1-70 MAK.....	26
ABBILDUNG 13 VERDÜNNUNGSREIHE VON 5C9 MAK.....	26
ABBILDUNG 14 VERDÜNNUNGSREIHE DER PEPTIDE.....	27
ABBILDUNG 15 VERDÜNNUNGSREIHE DER PROTEINE.....	28
ABBILDUNG 16 VERSUCHSÜBERSICHT VON DER UNTERSUCHUNG DER PEPTIDE UND PROTEINEN IM TSI UND TBI BIOASSAY	31
ABBILDUNG 17 ÜBERSICHT DER UNTERSUCHUNG VON PROTEIN 6 (L1-10) MIT TSI POSITIVEN PATIENTENSEREN IM TSI BIOASSAY.....	33
ABBILDUNG 18 TITRATIONS-KURVEN VON M22 MAK IM TSI BIOASSAY.....	36
ABBILDUNG 19 TITRATIONS-KURVE VON K1-18 MAK IM TSI BIOASSAY.....	37
ABBILDUNG 20 TITRATIONS-KURVEN VON K1-70 MAK IM TBI BIOASSAY.....	37
ABBILDUNG 21 TITRATIONS-KURVE 5C9 MAK IM TBI BIOASSAY.....	38
ABBILDUNG 22 ERGEBNISSE DER PEPTIDE MIT M22 MAK IM TSI BIOASSAY.....	39
ABBILDUNG 23 ERGEBNISSE DER PEPTIDE MIT K1-70 MAK IM TBI-BIOASSAY.....	41
ABBILDUNG 24 KONTROLLE DER PEPTIDE OHNE M22 MAK IM TSI BIOASSAY.....	43
ABBILDUNG 25 KONTROLLE DER PEPTIDE OHNE K1-70 MAK IM TBI BIOASSAY.....	43
ABBILDUNG 26 ERGEBNISSE DER REKOMBINANTEN PROTEINE IM TSI BIOASSAY.....	44
ABBILDUNG 27 ERGEBNISSE DER REKOMBINANTEN PROTEINE IM TBI BIOASSAY.....	46
ABBILDUNG 28 KONTROLLE VON PROTEIN 1-6 IM TSI BIOASSAY OHNE M22 MAK.....	48
ABBILDUNG 29 KONTROLLE VON PROTEIN 1-6 IM TBI BIOASSAY OHNE K1-70 MAK.....	48
ABBILDUNG 30 VERGLEICH DER ERGEBNISSE VON PROTEIN 6 (L1-10) LOT 1-4 IM TSI BIOASSAY.....	49
ABBILDUNG 31 VERGLEICH DER ERGEBNISSE VON PROTEIN 6 (L1-10) LOT 1-4 IM TBI BIOASSAY.....	50
ABBILDUNG 32 VERSUCH NR. 1: UNTERSUCHUNG VON VIER TSI POSITIVE PATIENTENSEREN (S1 – S4) MIT PROTEIN 6 (L1-10) KONZ. 0,4 - 0,0004 µG/ML.....	51
ABBILDUNG 33 VERSUCH NR. 2: UNTERSUCHUNG VON VIER TSI POSITIVE PATIENTENSEREN (S1 - S4) MIT PROTEIN 6 (L1-10) KONZENTRATIONEN 0,8 - 0,0008 µG/ML IM TSI BIOASSAY.....	52

ABBILDUNG 34 VERSUCH NR. 3 UNTERSUCHUNG VON VIER TSI POSITIVEN PATIENTENSEREN (S2 –S5) MIT PROTEIN 6 (L1-10) KONZENTRATIONEN 1 - 8 µG/ML IM TSI BIOASSAY.	53
ABBILDUNG 35 VERSUCH NR. 4 UNTERSUCHUNG VON SECHS TSI POSITIVEN PATIENTENSEREN (S1, S6 – S10) IN FESTGELEGTEN VERDÜNNUNGEN OHNE UND MIT PROTEIN 6 (L1-10) KONZENTRATIONEN 80 - 0,008 µG/ML IM TSI BIOASSAY	54
ABBILDUNG 36 VERSUCH NR. 5: ZWEI UNTERSCHIEDLICH TSI POSITIVE PATIENTENSEREN (S7 UND S10) MIT ABSTEIGENDEN VERDÜNNUNGEN OHNE PROTEIN 6 (L1-10) UND MIT FESTGELEGTER PROTEIN 6 (L1-10) KONZENTRATION VON 40 µG/ML IM TSI BIOASSAY IM VERGLEICH.....	55
ABBILDUNG 37 VERSUCH NR. 6 S7 (M) MIT PROTEIN 6 (L1-10) KONZENTRATION 80 - 10 µG/ML MIT PBS UND NS ALS VERDÜNNUNGSMITTEL IM VERGLEICH	56
ABBILDUNG 38 VERSUCH NR. 7: S13 UND S14 MIT PROTEIN 6 (L1-10) KONZENTRATIONEN 80 - 5 µG/ML UND PBS ALS VERDÜNNUNGSMITTEL IM TSI BIOASSAY	57
ABBILDUNG 39 VERSUCH NR. 7: S15 (H) UND S16 (M) MIT PROTEIN 6 (L1-10) KONZENTRATIONEN 80 - 5 µG/ML UND PBS ALS VERDÜNNUNGSMITTEL IM TSI BIOASSAY	58
ABBILDUNG 40 VERSUCH NR. 7: SERUM S17 (H) MIT PROTEIN 6 (L1-10) (L1-10) KONZENTRATIONEN 80 - 5 µG/ML UND PBS ALS VERDÜNNUNGSMITTEL IM TSI BIOASSAY	59
ABBILDUNG 41 VERSUCH NR. 8: SERUM S11 (H) MIT PROTEIN 6 (L1-10) KONZENTRATION 100 - 0,02 µG/ML UND OHNE PROTEIN 6	60
ABBILDUNG 42 VERSUCH NR. 8: DIE PROBE S12 (H) MIT PROTEIN 6 (L1-10) KONZENTRATION 100 - 0,02 µG/ML UND OHNE PROTEIN 6	61

Abkürzungsverzeichnis

AITD	Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen
AL	Arbeitslösung
AS	Aminosäure
cAMP	cyclischem Adenosinmonophosphat
EO	endokrine Orbitopathie
EZD	extrazelluläre Domäne
GPCR	G-Protein gekoppelten Rezeptoren
GR	Gelenkregion
HT	Hashimoto Thyreoiditis
LRD	leucinreiche Wiederholungsdomäne
LRW	leucinreiche-Wiederholungen
mAk	monoklonalen Ak
MB	Morbus Basedow
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RP	Reaktionspuffer
RT	Raumtemperatur
S	Serum
SD	Serpentinen Domäne
SR	Spaltungsregion
TBI	blockierende TSHR-Ak
TMD	Transmembrane-Domäne
TSH	Thyreotropin
TSHR	Thyreoidea-stimulierendes Hormon-Rezeptor
TSHR-Ak	TSHR-Antikörper
TSI	stimulierende TSHR-Ak

1 Einleitung / Ziel der Arbeit

Thyreotropin-Rezeptor Antikörper (TSHR-Ak) treten bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (AITD) auf. Die zwei häufigsten Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse sind der Morbus Basedow (MB) und die Hashimoto Thyreoiditis (HT). Beim MB führen stimulierende TSHR-Ak (TSI) zu einer Schilddrüsenüberfunktion (Hyperthyreose). Bei Patienten mit HT können blockierende TSHR-Ak (TBI) gebildet werden, die ein Binden des physiologischen Liganden Thyreotropin (TSH) an den TSHR verhindern. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zunächst zu einer Schilddrüsenüberfunktion, die nach einiger Zeit in eine Schilddrüsenunterfunktion übergeht. AITD zählen zu den häufigsten autoimmunen Erkrankungen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Peptid- und Proteinfractionen der leucinreichen Wiederholungsdomäne (LRD) des TSHR zu identifizieren, die als spezifisches Antigen in einem neuen zell-basierten Bioassay eingesetzt werden können, um entweder stimulierende TSHR-Ak (TSI) oder blockierende TSHR-Ak (TBI) zu messen und zu differenzieren.

Aufbau der Experimente:

1. Zuerst wurden vier humane monoklonale TSHR-Ak (M22 rein stimulierend, K1-18 rein stimulierend, K1-70 rein blockierend und 5C9 rein blockierend mAk) in den zell-basierten TSI und TBI Bioassays getestet, um die optimale Arbeitskonzentration zu bestimmen. Anhand der Dosis-Wirkungskurven wurde sowohl die mittlere effektive (EC50) als auch mittlere inhibitorische (IC50) Konzentration ermittelt.
2. Im nächsten Schritt wurden neun unterschiedliche Peptidfraktionen der LRD des TSHR mit den humanen monoklonalen Ak (mAk) M22 und K1-70 gemischt und anschließend im TSI und TBI Bioassay gemessen, ob diese eine Peptidfraktion spezifisch binden.
3. Des Weiteren wurden sechs verschiedene Proteinfractionen der LRD des TSHR auf ihre Bindungseigenschaft mit M22 mAk und K1-70 mAk untersucht.

4. Für weitere Experimente wurde das Protein 6 (L1-10) ausgewählt. Zunächst wurden mehrere Konzentrationen von Protein 6 (L1-10) mit unverdünnten niedrig, moderat und hoch TSI positiven Patientenseren getestet. Anschließend wurde eine festgelegte Protein 6 (L1-10) Konzentration mit unterschiedlichen Verdünnungen von Patientenseren mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen getestet.

Fragestellungen:

1. Werden Peptidfraktionen identifiziert, die monoklonale TSHR-Ak entweder M22, K1-18 (rein stimulierend) oder K1-70, 5C9 (rein blockierend) binden?
2. Werden Proteinfractionen identifiziert, die monoklonale TSHR-Ak entweder M22 oder K1-70 binden?
3. Binden diese Peptid- oder Proteinfractionen spezifisch an M22 oder K1-70 mAk?
4. Binden diese Peptidfraktionen polyklonale TSHR-Ak aus verschiedenen Patientenseren?
5. Binden diese Proteinfractionen polyklonale TSHR-Ak aus verschiedenen Patientenseren?

2 Literaturdiskussion

2.1 Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen

AITD gehören zu den häufigsten Autoimmunkrankheiten und betreffen 2-5% der westlichen Bevölkerung (1). AITD sind eine Gruppe von zusammenhängenden Erkrankungen. Zu ihnen zählen MB, HT, atrophe autoimmune Hypothyreose, Postpartum -Thyreoiditis und endokrine Orbitopathie (EO) (2). Die zwei häufigsten sind MB und HT (3). AITD entstehen durch eine Fehlleitung des Immunsystems, dass zu einem Angriff auf die Schilddrüse führt. Diese ist organspezifisch und T-Zell / B-Zell vermittelt. Bei erkrankten Patienten ist häufig lediglich die Schilddrüse von der Immunantwort betroffen (4). Des Weiteren bestehen auch Assoziationen zu weiteren organspezifischen (polyglanduläres Autoimmun-Syndrom v.a. Typ 2) oder systemischen Autoimmunerkrankungen (u.a. Sjögren Syndrom, rheumatoide Arthritis, systemische Sklerose) (5). Das Serum (S) von Patienten mit AITD reagiert mit mehreren Antigenen. Die drei Haupt-Antikörper richten sich gegen Thyreoglobulin, Thyreoperoxidase und den TSH-Rezeptor (4). Die Ursache für die Entstehung von AITD ist ein Zusammenspiel aus genetischen und Umweltfaktoren. Folgende Gene gelten als Risikofaktoren und stehen im Zusammenhang mit der Erkrankung: *HLA-DR*, *CD40*, *CTLA-4*, *PTPN22*, *Thyreoglobulin-Gen* und *TSHR-Gen*. Des Weiteren gelten folgende Umweltfaktoren als Risikofaktoren: hohe Jod Aufnahme, Rauchen, Infektionen (HCV), Medikamente (u.a. Amiodaron, CD52-Antikörper), Strahlung und Stress (6-8). Die familiäre Assoziation von MB und die Möglichkeit, dass MB in eine HT übergehen kann und umgekehrt legt nahe, dass pathophysiologisch ein enger Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen besteht (9, 10). Die genaue Entstehung ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (8). Unabhängig von den obengenannten Erkrankungen ist die gemeinsame Pathologie eine Infiltration von Lymphozyten in die Schilddrüse (7). Histologisch charakteristisch für die HT ist die Infiltration zahlreicher T- und B-Zellen, Sekundärfollikel (groß, Tonsillen ähnlich), eine Atrophie der Follikelzellen und Fibrose des Schilddrüsengewebes (4). Hingegen sind beim MB eine Hypertrophie der Follikelzellen und kleinere Sekundärfollikel zu beobachten (4). Diese intrathyreoidalen Sekundärfollikel bilden eine Mantelzone und ein Keimzentrum mit B-Zellen aus, die vermutlich die Hauptbildungsorte von Schilddrüsen Antikörpern sind (4, 7).

2.2 Morbus Basedow

Der MB wurde erstmals im 19. Jahrhundert vollständig von Carl Adolph von Basedow beschrieben als ein Symptomkomplex aus Struma, beschleunigter Herzfrequenz und Exophthalmus, auch bekannt als Merseburger Trias (11). Der MB ist die häufigste Ursache für eine Hyperthyreose (12). Die Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr in der westlichen Bevölkerung liegt bei 20-30 auf 100.000 (13). Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen 30 und 50 Jahren. Frauen haben ein höheres Risiko zu erkranken als Männer. Häufige Symptome sind Gewichtsreduktion, Unruhe, Hitzeintoleranz, Tremor oder Palpitationen. Bei älteren Patienten kommt es häufiger zu Gewichtsverlust, Appetitminderung und Herzbeteiligung, zum Beispiel in Form von Vorhofflimmern. Eine tastbare Struma entwickelt sich meist bei Patienten unter 60 Jahren (14). Eine häufige extrathyreoidale Manifestation ist die EO, sie tritt bei etwa 50% der Basedow Patienten auf (15).

Charakteristisch für die Erkrankung und Verursacher sind stimulierende TSHR-Ak (TSI). TSI mimt TSH am TSHR und regt die Hormonproduktion und Ausschüttung an. Die Hormonachse Thalamus-Schilddrüse wird entkoppelt und es kommt zu einer unkontrollierten Schilddrüsenhormonproduktion (14). Zusätzlich treten auch TSHR-blockierende Ak (TBI) auf, die zu einer Hypothyreose führen können. Abhängig von der jeweiligen Ak-Konzentration kommt es zu einer hyper- oder hypothyreotischen Stoffwechsellage (14). Als Ursache für die EO wird vermutet, dass TSI an den TSHR von orbitalen Fibroblasten binden. Zusätzlich werden Tumornekrosefaktor alpha (α) und Interferon-gamma (γ) von T-Helfer-Zellen ausgeschüttet. Daraus resultiert eine Proliferation und Vergrößerung des retrobulbären Gewebes (16). Die Diagnose basiert auf dem klinischen Erscheinungsbild und Bluttest (14). Bei Verdacht einer Hyperthyreose sollte initial der Serum TSH-Wert ermittelt werden. Wird zusätzlich T4 bestimmt steigt die diagnostische Genauigkeit. Bei einer manifesten Hyperthyreose ist der TSH-Spiegel erniedrigt und der T4-Spiegel erhöht, bei milden Formen kann TSH erniedrigt, T4 normal und T3 erhöht sein (17). TSI sind pathognomisch für MB (15) und können für eine schnelle Diagnose gemessen werden (17). Des Weiteren findet man bei 8% der MB Patienten TBI, vor allem während der Behandlung mit Thyreostatika und nach Radiojodtherapie (18). TPO-Ak und TG-Ak sind ebenfalls messbar, jedoch spielen sie bei Basedow Patienten eine untergeordnete Rolle (15).

Für die Erfassung von TSHR-Ak stehen nach aktuellem Stand zwei Messmethoden zu Verfügung. Zum ersten Verfahren zählen kompetitive Bindungs-Immunoassays, welche im klinischen Alltag weit verbreitet sind (19, 20). Dieses Verfahren kann TSHR-Ak und deren Konzentration ermitteln, jedoch keine Auskunft über die Funktionalität dieser Ak geben, ob es sich dabei um stimulierende und/oder blockierende TSHR-Ak handelt (20-24). Als zweites Verfahren stehen zell-basierte Bioassays zu Verfügung, die die Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in genetisch modifizierten Zellen nach Inkubation mit Serum von Patienten messen (25). Neuere Bioassays verwenden eine CHO Zelllinie, die eine chimäre Form des humanen TSHR und ein Reporter-gen das *Luciferase (Luc)*-Gen exprimieren. Dieser Bioassay ist in der Lage nur TSI zu detektieren (20, 26). Dieselbe genetisch veränderte CHO Zelllinie wird in einem TBI Bioassay eingesetzt, jedoch ist die Verdünnung der zu untersuchenden Proben unterschiedlich in den beiden genannten Bioassays (18, 27-29).

2.3 Hashimoto Thyreoiditis

Die HT wurde erstmals von Dr. Haku Hashimoto 1912 beschrieben. Sie ist die häufigste Ursache für eine Hypothyreose und darüber hinaus eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen (30). Sie zeichnet sich durch eine dauerhafte Entzündung der Schilddrüse aus (31). Die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen liegt bei 100 auf 100.000, dabei ist das Risiko an HT zu erkranken 8-mal höher für Frauen als für Männer (31). Die Ursache für eine HT ist eine Fehlleitung des Immunsystems, wodurch es zu Apoptose und Lyse von Thyreozyten kommt (18). Die Zerstörung von Thyreozyten kann anfänglich zu einer Hyperthyreose führen, im Verlauf kommt es meist zu einer verminderten Synthese und Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen woraus eine Hypothyreose resultiert (3). Die Diagnose einer HT wird auf Grund des klinischen Kontextes, der Serum-Ak und einem Schilddrüsen-Ultraschall gestellt (31). Meist stellen sich die Patienten mit einer festen, unebenen, symmetrischen und schmerzlosen Struma vor (32), dabei können sie sich in einer eu-, hypo- oder hyperthyreoten Stoffwechsellage befinden (20). Die Struma kann Strukturen des Halses komprimieren, wodurch es zu lokalen Beeinträchtigungen in Form von Dysphonie, Dyspnoe und Dysphagie kommen kann. Aufgrund des hypothyreoten Stoffwechsels kommt es zu systemischen Symptomen (31). Das klinische Bild einer hypothyreoten Stoffwechsellage kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Folgende Symptome treten häufig auf: Fatigue, Lethargie,

Kälteintoleranz, Gewichtszunahme, Verdauungsstörungen, Veränderung der Stimme und trockene Haut (33). Bei dem Verdacht auf eine Hypothyreose oder HT sollten initial TSH und freies (f) T4 bestimmt werden (34). Als diagnostische Marker zur Findung der Diagnose dienen TPO-Ak. Bei etwa 95% der HT Patienten sind diese positiv (31). TG-Ak sind bei 50% der HT Patienten zu finden (32). Darüber hinaus findet man bei etwa 11% TBI, die ebenfalls Einfluss auf die Hypothyreose haben (18).

2.4 Klinische Indikationen für die Erfassung von TSH-Rezeptor-Antikörper

Das Messen von TSHR-Ak nimmt bei der Diagnostik von MB und HT einen hohen Stellenwert ein. Eine wesentliche Indikation für die Erfassung von TSI ist der Verdacht auf MB, da TSI pathognomisch für die Erkrankung sind. Dies findet sich auch in den Leitlinien der European Thyroid Association (ETA) wieder (17). Ein frühes Messen von TSI kann Zeit und Kosten sparen (35) und ermöglicht eine frühe Behandlung des Patienten. Des Weiteren ist es hilfreich, während der Behandlung die TSHR-Ak zu kontrollieren. Das Erfassen der Funktionalität der TSHR-Ak mithilfe von zell-basierten Bioassays kann die Diagnostik, Therapie sowie den weiteren Krankheitsverlauf zusätzlich unterstützen (24). Bei der Behandlung von MB mit thyreostatischen Medikamenten sollte vor Absetzen der Medikation der TSHR-Ak-Titer erfasst werden. Bei zu hohen Werten empfiehlt es sich die Medikation zu verlängern oder andere Therapiemaßnahmen in Erwägung zu ziehen. Bei normalen Werten kann die Medikation ausgesetzt werden. Ein Rückfall ist im ersten Jahr am wahrscheinlichsten, weshalb die Patienten in dieser Zeit eng beobachtet werden sollen. Danach sollte jährlich mindestens eine Kontrolle erfolgen (17). Eine weitere Indikation ist die Abgrenzung einer subakuten, schmerzlosen/stillen Thyreoiditis von einem MB (36). Dabei konnte gezeigt werden, dass 99% der Patienten negativ im TSI-Bioassay waren, wohin gegen im Bindungs-Assay 95% negativ waren (37). Bei extrathyreoidalen Manifestationen wie der EO oder einem prätibialen Myxödem ist es ebenfalls hilfreich die TSHR-Ak zu erfassen sowie ihre Funktionalität, insbesondere bei euthyreoten Patienten zu bestimmen (36). Bei MB Patienten mit einer EO konnte gezeigt werden, dass diese höhere TSI Titer aufweisen als MB Patienten ohne systemische Manifestation (24, 38, 39). Eine schwere Komplikation der EO ist die dysthyreote Optikusneuropathie, die mit Sehverlust einhergehen kann (40, 41). Neben der klinischen Untersuchung und Bildgebung kann das Erfassen

der TSI die Diagnostik unterstützen, insbesondere bei Patienten mit atypischer oder fehlender Symptomatik (40). Darüber hinaus können TSI-Verdünnungs-Analysen helfen, eine systemische Manifestation des MB vorherzusagen (39). Bei HT Patienten kann in einigen Fällen ebenfalls eine Orbitopathie auftreten, die mit einer signifikanten Erhöhung von TSI einhergeht (9). Bei schwangeren Patientinnen mit einer Hyperthyreose dient der Test zur Unterscheidung von Gestationshyperthyreose oder MB. Des Weiteren sollten Frauen mit einer AITD in ihrer Vergangenheit vor und während der Schwangerschaft auf Ak getestet werden, auch wenn sie bereits thyreoidektomiert wurden oder sich einer Radiojod Therapie unterzogen haben, da Schilddrüsen-Ak weiterhin vorkommen können, diese Plazenta gängig sind und die Schilddrüse des Kindes ab der 20. Woche aktiv ist (17, 36, 42). Dies kann zu einer neonatalen / fetalen thyreotoxischen Krise führen. Dadurch können insbesondere in der späten Phase der Schwangerschaft lebensbedrohliche Komplikationen für das Kind entstehen (42). MB ist die häufigste Ursache für eine Hyperthyreose in der Kindheit (43, 44). Diese erfordert eine Abgrenzung von weiteren Ursachen, insbesondere von der toxischen Phase der subakuten oder chronischen lymphozytären Thyreoiditis (HT). Zur Differenzierung und Diagnosestellung werden TSI gemessen. Diese geben Aussage über die Schwere und Aktivität der Erkrankung (44).

Die Häufigkeit von TBI bei AITD ist unterschiedlich und noch nicht abschließend geklärt. Die TBI haben durch ihre blockierende Wirkung einen Einfluss auf die Schilddrüse und den Schilddrüsen-Hormonkreislauf. TBI finden sich sowohl bei 8% der MB als auch 11% der HT Patienten (20). Somit kann es hilfreich sein, diese zu bestimmen. Bei MB können TBI insbesondere nach einer Radiojod Therapie oder während der Behandlung mit thyreostatischen Medikamenten auftreten (20). Weitere Indikationen sind eine AITD während der Schwangerschaft, da ebenfalls wie bei TSI das Risiko besteht, dass TBI durch die Plazenta in den Fetus gelangen und dort zu einer hypothyreoten Stoffwechsellage führen. Ebenfalls Indikationen für die Erfassung von TBI sind Postpartum Thyreoiditis, Differenzierung von hypothyreoten Stoffwechsellagen und nicht thyreoidale Autoimmunerkrankungen (18). Insgesamt benötigt es jedoch weiterer Untersuchungen und Studien, um die Häufigkeit und den klinischen Nutzen des Messens von TBI zu evaluieren (18).

2.5 Der TSH-Rezeptor

Der TSHR ist ein wichtiges Element in der Kontrolle und Funktion der Schilddrüse, da dieser die Wirkung von TSH auf die Schilddrüse vermittelt (45). Im Jahr 1966 gab es erstmals Beweise für die Existenz eines Rezeptors an der Zelloberfläche von Schilddrüsenzellen (46). Im Jahr 1973 konnte gezeigt werden, dass das TSH spezifisch an einen Rezeptor auf der Oberfläche von Schilddrüsenzellen bindet (47). 1989 gelang es den humanen TSHR zu sequenzieren und zu klonieren, was neue Möglichkeiten in der Forschung eröffnete (48, 49). Der TSHR gehört zur Klasse A der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (50) und ist Teil der leucinreichen wiederholungshaltigen GPCR Unterklasse gemeinsam mit dem Follikel-Stimulierenden-Hormon (FSH)-Rezeptor und dem Luteinisierenden-Hormon (LH)-Rezeptor (51). Der TSHR kann als Regulator, Trigger und Beschleuniger physiologischer Prozesse dienen (52). Außerhalb der Schilddrüse wird der TSHR u.a. auf Adipozyten, Fibroblasten, Knochenzellen, Nierenzellen und Kardiomyozyten exprimiert (53). Als Hauptbindungsstelle von TSH und TSHR-Ak wird die LRD, die Bestandteil der extrazellulären Domäne (EZD) ist, ausgemacht (52).

2.5.1 Leucinreiche Wiederholungsdomänen

Leucinreiche Wiederholungen (LRW) sind kurze Aminosäure (AS) Sequenzmotive, die in sehr vielen Proteinen auftreten und an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind (54). Die meisten LRW bestehen aus 20-30 AS pro Wiederholung. Jede Wiederholungs-Sequenz beinhaltet 11 konservierte AS mit der Konsensus-Sequenz: LxxLxLxx(N/C)xL¹. Die Anzahl der Wiederholungen variiert je nach Protein von 2-52 (55). Häufig faltet sich diese Domäne zu einer unterschiedlich geschwungenen Form mit parallel angeordneten beta (β)-Faltblättern an der konkaven Oberfläche (55).

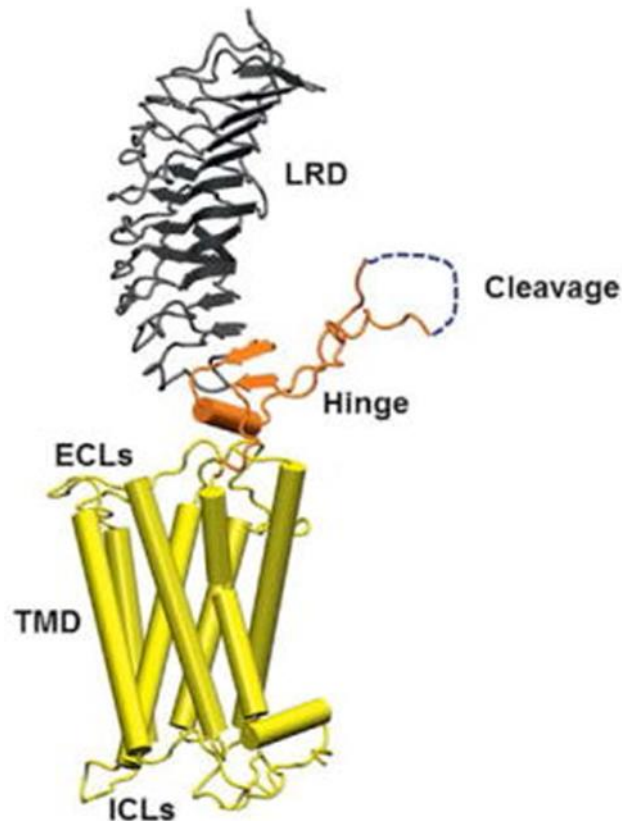
2.5.2 Aufbau des TSHR

Der Holorezeptor besteht aus 764 AS (vollständige AS Sequenz s. Anhang) welcher posttranslational in eine A und B Untereinheit geschnitten wird. Dabei wird die aus 50 AS bestehende Spaltungsregion ((SR); engl. cleavage region) (Position 316-366) entfernt (56). Ein Hauptmerkmal des Rezeptors ist eine große EZD, welche den überwiegenden Anteil der A-Untereinheit ausmacht. Die B Untereinheit

¹ L=Leucin/Valin/Isoleucin/Phenylalanin; C=Cystein; N=Asparagin; x=jede beliebige andere AS

beinhaltet den transmembranen Anteil, welcher als Serpentina Domäne (SD) bezeichnet wird, bestehend aus sieben Transmembranen Helices (56, 57). Die beiden Untereinheiten werden durch Disulfidbrücken zusammengebunden (56). Gemeinsam mit der Gelenkregion ((GR); engl. hinge-region) bildet die LRD die A-Untereinheit des Rezeptors und stellt das Amino (N)-terminale Ende des extrazellulären Rezeptorteils dar mit einer Länge von etwa 350-400 AS (57). Diese lässt sich in mehrere Abschnitte unterteilen: die Ektodomäne beginnt mit einem N-terminalen Schwanz gefolgt von einer cysteinreichen Region mit der ersten LRW-Schleife (loop). Daran schließen sich die restlichen zehn Schleifen der LRW an, die über die GR mit der SD verbunden sind (55). Die LRD des TSHR besteht insgesamt aus 11 LRW-Schleifen, die eine sensenartige Form annehmen mit einer leichten Drehung vom N-Terminus zum Carboxy (C)-Terminus. Der Kern wird durch hydrophobe Seitenketten stabilisiert (52). Zusätzlich stabilisieren aromatische Wechselwirkungen das Rückgrat (52). An die GR schließt sich die Transmembrane-Domäne (TMD) an. Diese wird durch die SD gebildet, bestehend aus sieben Transmembranen-Helices, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen verbunden sind. Daran schließt sich eine achte parallel zur Membran verlaufende Helix an mit einem C-terminalen Schwanz (58). Für die Weiterleitung eines extrazellulären Signals ist das Zusammenspiel der unterschiedlichen Domänen in unterschiedlichen Membranabschnitten von großer Bedeutung. Durch Binden eines extrazellulären Liganden an der EZD kommt es zur einer strukturellen Veränderung der SD, wodurch innere Effektoren aktiviert werden können (52).

Abbildung 1: TSH-Rezeptor Übersicht



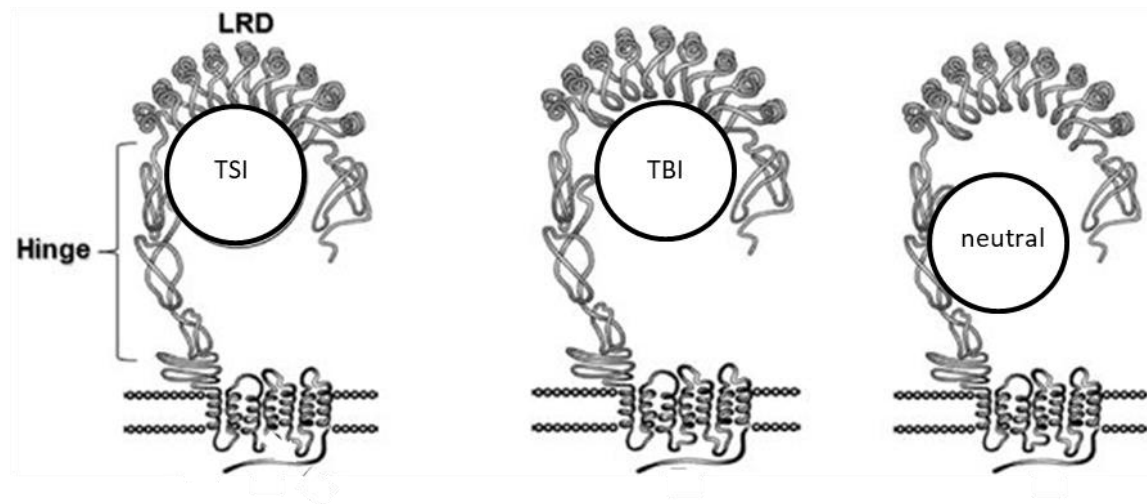
Die Grafik zeigt den Aufbau des TSHR: Die extrazelluläre Domäne (EZD) bestehend aus der leucinreichen Wiederholungsdomäne (LRD), der Spaltungsregion (engl. cleavage region) und Gelenksregion (engl. hinge-region). An die Gelenksregion schließt sich die Transmembrane Domäne (TMD) an. Diese besteht aus der Serpentina-Domäne, welche aus sieben Transmembran-Helices und deren verbindenden Schleifen besteht, gefolgt von einer achten Helix, parallel zur Membran verlaufend. Modell des Thyreotropin-Rezeptors nach Morshed *et al.* (59).

2.6 TSHR-Autoantikörper

TSHR-Autoantikörper sind eine heterogene Gruppe und spielen eine wichtige Rolle in der Pathologie von AITD (36). TSI konnten erstmals von Adam und Pauls 1956 nachgewiesen werden und wurden als lang-wirksame-Schilddrüsen-Stimulatoren bezeichnet. In den 70er Jahren wurde der TSHR als Zielstruktur der Autoantikörper nachgewiesen (36). Die meisten TSHR-Ak binden an der EZD des TSHR an ähnlicher Stelle wie TSH (60). Sie werden abhängig von ihrer Funktionalität in drei Klassen unterteilt: stimulierend, blockierend und neutral. TSI führen zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase. Diese induziert die Bildung von cAMP und führt somit zu einer vermehrten Synthese von Schilddrüsenhormonen (T3 und T4). TBI blockieren den TSHR, sodass TSH nicht binden kann. Dies verhindert die Bildung von cAMP oder induziert sogar eine Abnahme (61, 62). Neutrale TSHR-Ak binden im Gegensatz zu TSI und TBI in der Nähe von der GR des TSHR (63). Diese Ak

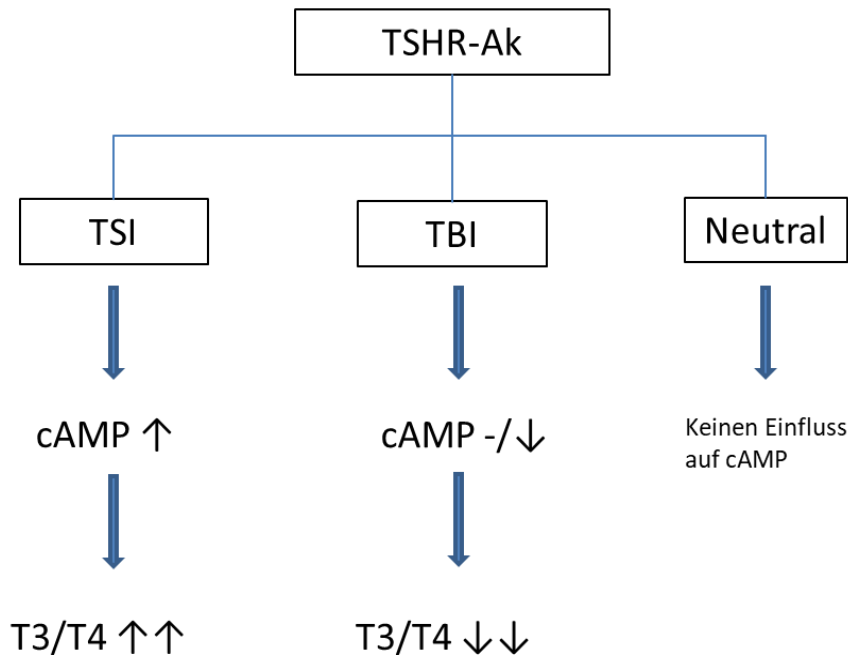
scheinen keinen Einfluss auf das intrazelluläre cAMP Level zu haben. Ferner wird vermutet, dass sie durch verschiedene Signalkaskaden die Apoptose von Thyreozyten induzieren, was den Prozess der chronischen Entzündung verstärkt (64).

Abbildung 2 TSHR-Antikörper Bindungsstellen



Die Abbildung zeigt, dass TSI und TBI überwiegend an der LRD binden, wohin gegen die neutralen TSHR-Ak in der Nähe der Gelenksregion (engl. hinge-region) binden. Übersicht der Bindungsstellen der TSHR Antikörper nach Morshed *et al.* (59).

Abbildung 3 TSHR-Antikörper Einfluss auf den cAMP Level



Übersicht der unterschiedlichen TSHR-Ak und deren Einfluss auf den cAMP-Spiegel in den Thyreozyten der Schilddrüse. Diagramm nach Kotwal *et al.* (36).

2.7 Epitope des TSHR

Der TSHR bildet Konformationsepitope an denen TSI als auch TBI binden (59). Durch u.a. Kristallisierung, Homologie-Modelling und Computer Programme wurden in den letzten Jahren nähere Details zur TSH-TSHR und TBI/TSI-TSHR Interaktion herausgefunden.

2.7.1 TSH Interaktion mit dem TSHR

Zurzeit gibt es keine Daten über die Kristallisierung eines TSH-TSHR Komplexes, jedoch wurde 2009 durch Homologie-Modelling die Bindungen von TSH an TSHR modelliert. Dem Modell zufolge bindet die TSH alpha (α)-Kette an den zentralen LRW (1-7) auf der konkaven Seite, die β -Kette an den N-terminal (LRW 1,2,4) und an C-terminal (LRW 6-10) gelegenen LRWs auf der konkaven Seite (65).

2.8 Interaktion von monoklonalen Antikörpern mit dem TSHR

2.8.1 M22 mAk Interaktion mit dem TSHR

M22 ist ein mAk der Klasse IgG und seine Eigenschaften entsprechen dem eines stimulierenden Autoantikörpers gegen den TSHR. Er bindet mit hoher Affinität an den TSHR (66). Der mAk wurde aus Lymphozyten eines 19 Jahre alten Mannes mit MB und hoher TSHR-Ak Konzentration gewonnen, indem die isolierten Lymphozyten mit einer Mensch/Maus Hybrid-Zelllinie fusioniert wurden. Dadurch

gelang es M22 mAk zu bilden und zu vervielfältigen (66). Im Jahr 2007 gelang es einen Komplex aus einem extrazellulären Teil des TSHR (AS 1-260) und M22 mAk zu kristallisieren. M22 mAk bindet an der konkaven Seite der EZD. Dabei interagiert M22 mAk mit den β -Faltblättern der LRW 1-10. Für die Bindung zwischen dem TSHR und M22 mAk sind Wasserstoffbrücken, Salz-Brücken-Netzwerke, nicht hydrogene Bindungen sowie polare Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich. M22 mAk bindet einzeln am Rezeptor (67).

2.8.1.1 K1-70 Interaktion mit dem TSHR

K1-70 ist ein mAk der Klasse IgG und entspricht den Eigenschaften eines TBI gegen den TSHR. Ähnlich wie M22 mAk wurde K1-70 mAk aus Lymphozyten gewonnen, die mit einer Maus-Mensch-Hybridzelllinie fusioniert wurden. Die Lymphozyten stammen von einer 54-jährigen Frau mit hohem Ak-Titer und einer Hypothyreose. Gleichzeitig wurde der stimulierende mAk K1-18 vom selben Serum isoliert. Dies war der Beweis für die Koexistenz von TSI und TBI im Serum (68). 2011 gelang es, einen Komplex ebenfalls aus einem extrazellulären Teil des TSHR (AS 1-260) und K1-70 mAk zu kristallisieren. K1-70 mAk bindet an den LRW 1-8, dabei wird die N-terminale LRW ausgelassen. Ähnlich wie bei M22 mAk sind Wasserstoffbrücken, Salz-Brücken-Netzwerke, Wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindung, polare Wechselwirkungen und hydrophobe Kontakte für die Interaktion zwischen K1-70 mAk und TSHR verantwortlich (69).

2.8.1.2 Ladungs-Analyse von M22 / K1-70 mAk in Interaktion mit dem TSHR

Eine Analyse der Kristallstruktur von TSHR LRD mit K1-70 mAk oder mit M22 mAk zeigt, dass mehrere geladene Felder auf der Oberfläche von mAk komplementär mit geladenen Feldern auf der konkaven Oberfläche der LRW des TSHR interagieren. Diese Felder dienen als Verbindungsstelle und haben ähnliche elektrische Potentiale. Sie bestehen aus einem positiv geladenen inneren Feld umgeben von einem negativen äußeren Ring (oder umgekehrt) und interagieren mit einem komplementären Feld auf der LRW des TSHR (70).

Abbildung 4 Vereinfachte Darstellung der Interaktionsfelder von TSHR und Antikörper

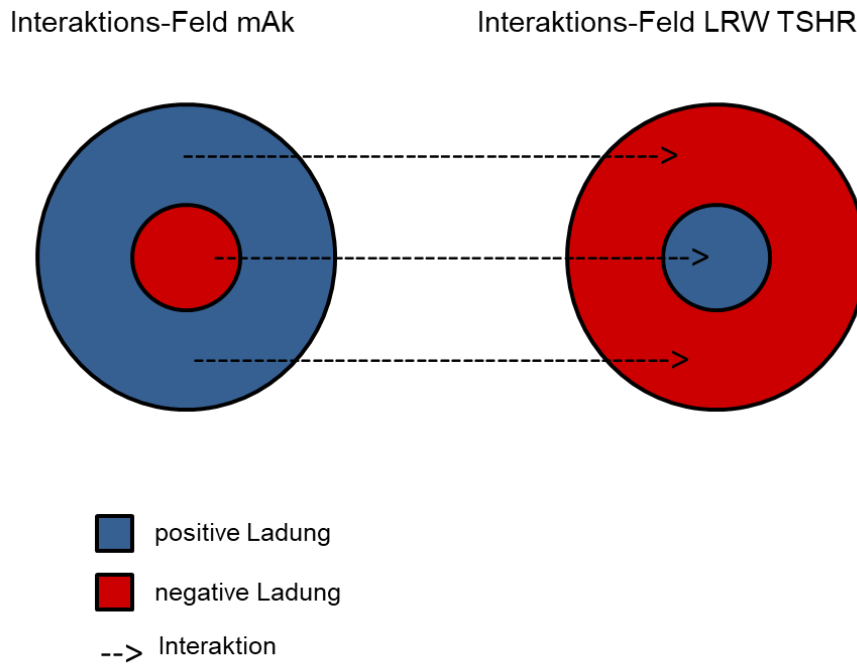


Abbildung nach Miguel *et al.* 2012 (70) vereinfacht und modifiziert

K1-70 und M22 mAk scheinen zum Teil mit den gleichen geladenen Feldern auf den TSHR LRW zu interagieren. Des Weiteren zeigen sich Ähnlichkeiten bei der Verteilung des elektronischen Potentials auf der Oberfläche von M22 und K1-70 mAk verglichen mit TSH. Im TSH -TSHR-LRW Modell zeigt sich darüber hinaus, dass TSH zum Teil ähnliche Bindungsfelder wie M22 mAk mit TSHR, beziehungsweise K1-70 mAk mit TSHR nutzt. Einige Felder mit ähnlicher Ladung können auf der Oberfläche von TSH, M22 mAk und K1-70 mAk gefunden werden, die mit den gleichen Feldern auf der LRW interagieren. Einige TSH Felder sind komplementär zu den gleichen Feldern auf der LRW, die K1-70 mAk beziehungsweise M22 mAk nutzt (70).

2.8.1.3 Bindungsprognose von K1-18 mAk und 5C9 mAk

Auf Grundlage der oben genannten Ladungsbeziehungen wurden die Interaktionsstellen der mAk K1-18 und 5C9 prognostiziert und durch AS Mutations-Studien weiter validiert. Laut Vorhersage bindet K1-18 mAk an LRW 1-10 auf der konkaven Seite, die C-terminale Seite der LRD eingeschlossen. Die Bindungsregionen sind ähnlich wie die von M22 mAk (70). 5C9 ist ein mAk, der blockierend auf den TSHR wirkt, jedoch weniger potent ist als K1-70 mAk (61). Er

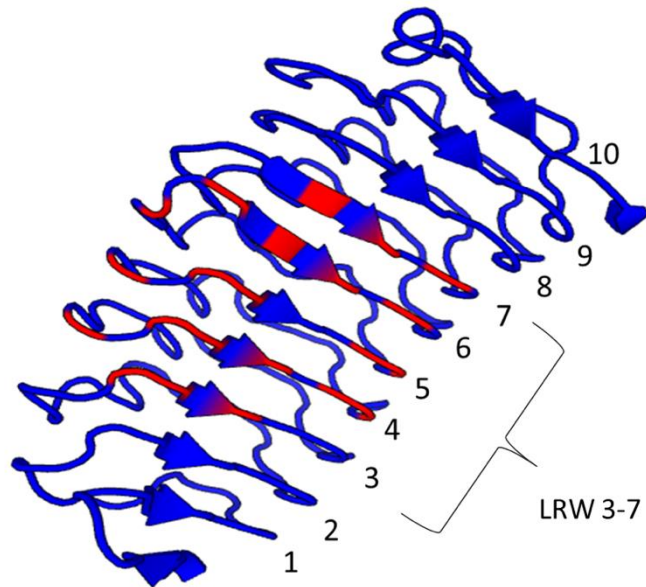
wurde aus Lymphozyten einer 27-jährigen Patientin mit einer Postpartum-Hypothyreose sechs Monate nach Geburt und einem hohen TSHR Autoantikörper Titer isoliert (19). 5C9 mAk blockiert die Bindung von TSH sowie von TSI. Darüber hinaus ist 5C9 mAk im Unterschied zu K1-70 mAk ein inverser Agonist und in der Lage die basale Aktivität des TSHR zu inhibieren (61). Laut Mutations-Studien bindet 5C9 mAk im Gegensatz zu K1-70 mAk an LRW 1-10, sowie möglicherweise am C-terminalen Ende der LRD (71).

Insgesamt kann man sagen, dass die stimulierenden Ak an allen LRW binden inklusive C-terminales Ende. Dagegen interagiert K1-70 mAk mit LRW 1-8, aber nicht mit dem C-terminalen Ende (71).

2.9 Computer Epitopen Vorhersage für M22 und K1-70 mAk am TSHR

2016 wurde ein Programm für die Vorhersage von Ak-Epitopen und Paratopen veröffentlicht. Dieser sogenannte „structure based antibody prediction server“ (72) verwendet für die Vorhersage von Ak-Epitopen den EpiPred Algorithmus (73), der 2014 entwickelt wurde. Dieser Algorithmus errechnet eine Liste potenzieller Bindungsfelder und sortiert sie nach Wahrscheinlichkeit, ein Epitop zu bilden. Der Algorithmus nutzt für die Vorhersage die Struktur des Antigens (TSHR) und die Struktur oder das verfügbare Modell des zu testenden Aks (M22 / K1-70) (72). Das Programm wurde von Jason Sun (Quidel, San Diego, CA, USA) genutzt, um mögliche Epitope des TSHR für M22 und K1-70 mAk vorherzusagen. Das Programm sagt voraus, dass LRW 3-7 und möglicherweise LRW 5-10 potenzielle Epitope für M22 mAk sind, dargestellt in der nachfolgenden Abbildung.

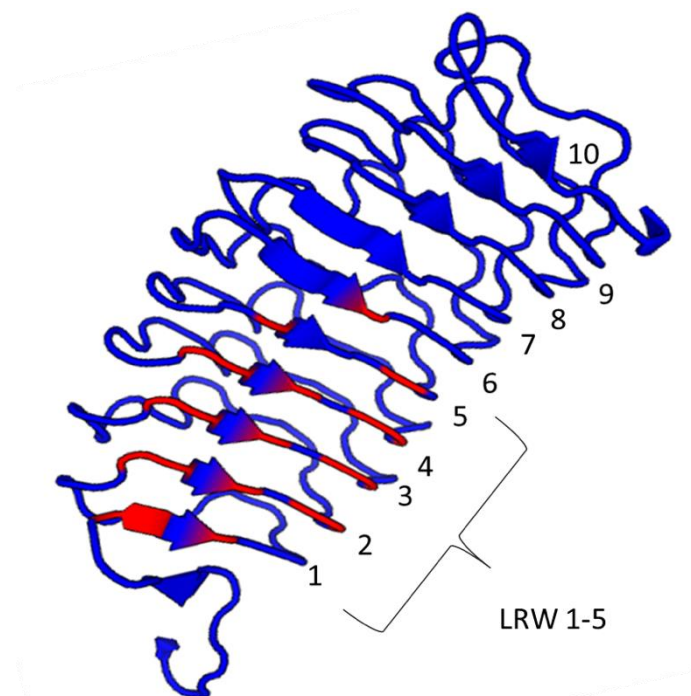
Abbildung 5: Epitopen Kalkulation M22 mAk



Die Abbildung zeigt die konkave Oberfläche der LRD des TSHR mit potenziellen Epitopen (LRW 3-7 in rot), die mit **M22 mAk** interagieren. Zur Verfügung gestellt von J. Sun (Quidel, San Diego, CA, USA).

Für K1-70 mAk wurde LRW 1-5 und möglicherweise LRW 3-7 prognostiziert, dargestellt in der nachfolgenden Abbildung.

Abbildung 6 Epitopen Kalkulation K1-70 mAk



Die Abbildung zeigt die konkave Oberfläche der LRD des TSHR mit potenziellen Epitopen (LRW 1-5 in rot), die mit K1-70 mAk interagieren. Zur Verfügung gestellt von J. Sun (Quidel, San Diego, CA, USA).

2.10 Zusammenfassung potenzieller Epitope des TSHR

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die bisher bekannten interagierenden AS der LRD mit TSH, M22 mAk, K1-18 mAk, 5C9 mAk und K1-70 mAk (AS Abkürzungen siehe Anhang 1).

Tabelle 1 LRD-Interaktionen (52); im Anhang 1 sind die Abkürzungen der AS verzeichnet.

Leucinreiche-Wiederholungsschleifen	TSH (TSH-TSHR LRD komparatives-Model (65))	M22 mAk (M22-TSHR LRD Kristallographie (67))	K1-18 mAk (Mutationsstudien (70))	5C9 mAk (Mutationsstudien) (74)	K1-70 mAk (K1-70-TSHR LRD Kristallographie (69))
N-terminus		E34			
1		E35			E35
		D36			D36
	R38	R38			R38
					K42
	D43				
2					Q55
		T56			
	K58	K58			K58
					I60
	E61				E61
3	R80	R80			R80
		Y82			Y82
					S84
	I85				
	V87				
4					T104
	H105	H105			H105
	E107	E107			E107
	R109	R109			R109
	N110	N110			N110
	T111				
	R112				
5		K129		K129	K129
	F130	F130			F130
	F134				
	N135				
	D151	D151			D151
6	I152	I152			
	F153	F153			F153
	I155	I155			I155
	E157	E157	E157		E157
	D160	D160	D160		
	P162				
7				E178	
					T181
	K183	K183	K183	K183	K183
	Y185	Y185	Y185		
8	D203			D203	D203
			Y206		
		N208			
	K209	K209			
9	S229				
			D232		
	Q235	Q235			

10	K250				
	E251	E251		E251	
		R255	R255		
		N256			
		W258	W258		
11			R274		

2.11 Verfügbare Immunoassays und Bioassays zur Messung von TSH-Rezeptor-Antikörpern

2.11.1 Kompetitive Bindungs-Immunoassays

Bei dieser Assay Variante konkurrieren die TSHR-Ak aus dem Serum mit einem hinzugefügten markierten Protein (z. B. markiertes bovines TSH oder M22 mAk) um die Bindung an dem TSHR. Die zweite Generation dieser Assays nutzt TSHR, die durch C-Terminal-Bindung an Antikörper auf einer Kunststoffoberfläche fixiert werden. Die TSHR-Ak werden durch das gehemmte Binden von markiertem TSH enzymatisch durch ein Kolorimeter oder durch ein Chemilumineszenz Reagenz ermittelt (Iod 125 oder biotinyliertes TSH) (75). Die dritte Generation nutzt anstelle von markiertem TSH den M22 mAk, um die Bindungshemmung zu erfassen (76-79). Die weiterentwickelte automatisierte Variante nutzt lediglich das Antigenbindende Fragment (Fragment antigen binding, Fab) von M22 mAk, welches markiert ist. Es wird nach der Inkubation mit dem Patienten Serum hinzugefügt und bindet an den freien TSHR (75, 77). Das Bridge-Assay Verfahren ist ebenfalls für automatisierte Messungen geeignet. Dieses beruht darauf, dass die beiden Bindungsstellen des Antikörpers eine Brücke zwischen zwei TSHR Molekülen bilden. Das erste TSHR Molekül ist auf der Oberfläche fixiert und bindet einen Arm des Ak. Nach Bindung des TSHR-Ak aus dem Patientenserum wird das zweite TSHR-Molekül hinzugefügt, welches an den freien Arm des Ak bindet. Das Molekül ist mit einem Enzym verbunden, welches das Lumineszenz Substrat in Chemilumineszenz umwandelt (80). Die automatisierten Immunoassays haben eine Sensitivität und Spezifität von über 98% (75). Ein großer Nachteil der Bindungs-Immunoassays ist, dass diese sowohl TSI als auch TBI binden können und aus diesem Grund die Funktionalität der TSHR-Ak nicht differenziert werden kann. Dies kann zu falsch positiven Testergebnissen führen (21-23).

2.11.2 Bioassays

Im Jahr 2009 wurde das erste FDA geprüfte kommerzielle Reporter gen Bioassay für die Messung von TSI veröffentlicht (81). Für das TSI Bioassay werden

Chinesische-Hamster-Ovarien (CHO) Zellen verwendet, die eine chimäre Form (mutant chimeric „MC“ 4) des humanen TSHR exprimieren, bei dem die AS 262 bis 368 durch AS Sequenzen des LH-R 262 bis 334 der Ratte ersetzt worden sind (81). Des Weiteren enthalten sie ein *Luciferase*-Gen, welches abhängig von cAMP aktiviert wird und somit TSI gemessen werden kann (81). Der genaue Ablauf des Assays wird im Methodenteil beschrieben. Die Daten werden in relativen Lichteinheiten gemessen und um sie zu vergleichen wird die Prozentzahl zum Proben - Referenz Verhältnis in SRR% angegeben (81). Der Test ist ab einem SRR-Wert über 140% als positiv zu werten. Die gemessenen Patientenserumproben werden anhand des TSI Wertes in niedrig (140-279 SRR%), moderat (280-420 SRR%) und hoch positive (>420 SRR%) eingeteilt. In einem weiteren Schritt wurde der TSI Bioassay mit dem zweiten internationalen Standard für TSI (08/204) standardisiert (82).

Für die Messung von TBI gibt es einen CE gekennzeichneten Reportgen Bioassay (27), welcher ebenfalls die CHO MC4 Zellen nutzt. Für diesen TBI Bioassay wurde die analytische Performance charakterisiert und der Assay validiert (28). Der Ablauf ist annähernd gleich zum TSI Bioassay, jedoch wird bei der 1:11 Verdünnung der Patienten Serumprobe eine Arbeitslösung, welche bovines TSH enthält, hinzugefügt. Der genaue Ablauf wird im Methodenteil erläutert. Blockierende Aktivität wird in diesem Assay durch die Prozent-Inhibition der Luciferase-Expression im Verhältnis zur alleinigen Induktion von bovinem TSH als Referenz definiert (28). Ab einer Prozent-Inhibition größer 40% ist das Testergebnis als positiv zu werten (27). Bioassays sind empfindlicher, arbeits-, und zeitaufwendiger als kompetitive Bindungs-Immunoassays und es gibt derzeit keine automatisierte Form (83).

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 2 Verwendete Reagenzien

Material	Hersteller	Ort
CHO MC4 Zellen	Quidel	San Diego, CA, USA
Luciferase Assay Pufferlösung	Quidel	San Diego, CA, USA
Luciferase Substrat	Quidel	San Diego, CA, USA
Thyretain Reaktionspuffer (RP)	Quidel	San Diego, CA, USA
Thyretain Arbeitslösung	Quidel	San Diego, CA, USA
Thyretain Wachstumsmedium	Quidel	San Diego, CA, USA
Thyretain Zelladhäsions-Lösung	Quidel	San Diego, CA, USA
Thyretain Kontrollen (Positiv- (PC), -Referenz- (RC) und Negativkontrolle(NC))	Quidel	San Diego, CA, USA
Neun Peptide	Quidel	San Diego, CA, USA
Sechs rekombinante Proteine	Quidel	San Diego, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem,	Darmstadt, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich Corporation	St. Louis, MI, USA

Tabelle 3 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
Sicherheitswerkbank Holten Laminair	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
CO ₂ Inkubationsschrank	Sanyo	Moriguchi, Präfektur Osaka, Japan
Mikroskop Primovert	Carl Zeiss GmbH	Jena, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH	Uetze, Deutschland
Glomax Luminometer	Promega Corporation	Madison, WI, USA
Orbital Schüttler	Grant Instruments	Shepreth, Cambridgeshire, England

Tabelle 4 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Ort
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Fisher	Frankfurt, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Costar® 96-well schwarze Multiwellplatte, durchsichtiger Boden	Corning Inc.	Corning, New York, USA
Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich

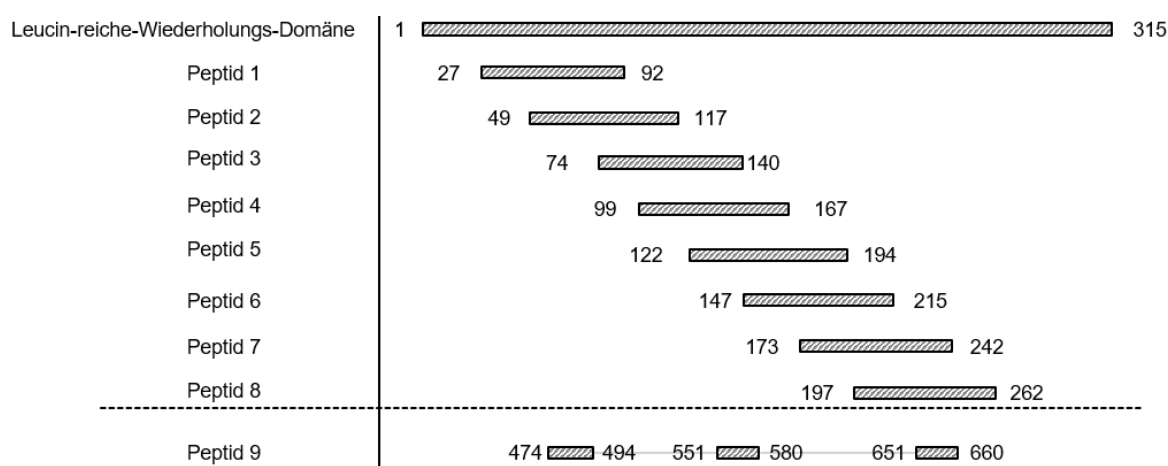
Tabelle 5 Humane monoklonale Antikörper

Humane monoklonale TSHR-Ak	Eigenschaft	Hersteller	Ort
M22	rein stimulierend	Quidel	San Diego, CA, USA
K1-18	rein stimulierend	Quidel	San Diego, CA, USA
K1-70	rein blockierend	Quidel	San Diego, CA, USA
5C9	rein blockierend	Quidel	San Diego, CA, USA

3.1.1 Peptide

Es wurden neun unterschiedliche Peptide getestet. Acht der einzelnen Peptide bestehen jeweils aus drei Schleifen der LRD der EZD des TSHR, an der die Ak binden. Ein weiteres Peptid besteht aus drei AS-Abschnitten, die in der TMD enthalten sind. Folgende Abbildung und Tabelle gibt eine Übersicht über die jeweilige Aminosäuresequenz, Ausgangskonzentration und Lösungsmittel. Die Peptide wurden freundlicherweise von Jason Sun, Quidel, San Diego, CA, USA bereitgestellt.

Abbildung 7 Peptid-Fragmente in Bezug zur LRD



Die Abbildung zeigt die verwendeten Peptid-Fragmente und deren AS Größenverhältnis, sowie den Abschnitt in Bezug zur leucinreichen Wiederholungsdomäne (LRD). Das Peptid 9 enthält Abschnitte außerhalb der LRD.

Tabelle 6 Peptid-Fragmente

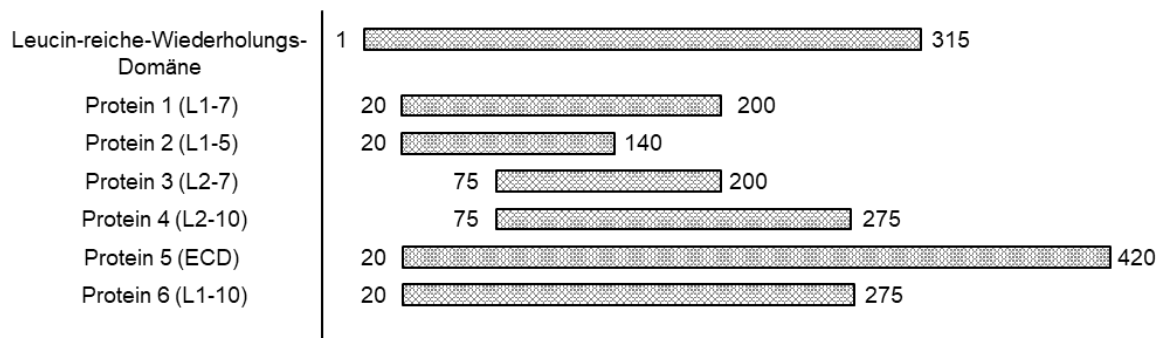
Peptid-Nummer	LRD Schleifen	Ausgangskonzentration (µg/ml)
1	L1-3 (AS 27-92)	2000 µg/ml, in DMSO
2	L2-4 (AS 49-117)	2000 µg/ml, 50 % in DMSO
3	L3-5 (AS 74-140)	2000 µg/ml, 60% in DMSO
4	L4-6 (AS 99-167)	2000 µg/ml, 60% in DMSO
5	L5-7 (AS 122-194)	2000 µg/ml, in PBS

6	L6-8 (AS 147-215)	2000 µg/ml, in PBS
7	L7-9 (AS 173-242)	2000 µg/ml, in PBS
8	L8-10 (AS 197-262)	2000 µg/ml, 30% in DMSO
9	3 TMD (AS 474-494 551-580 651-660)	2000 µg/ml, in PBS

3.1.2 Rekombinante Proteine

Für die Versuche wurden sechs rekombinante Proteine verwendet, bestehend aus unterschiedlichen Abschnitten der LRD des TSHR. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über Aminosäuresequenz, Konzentration und welche LRD Schleifen das jeweilige Protein beinhaltet.

Abbildung 8 Rekombinante Proteine in Bezug zur LRD



Die Abbildung zeigt die AS-Längenverhältnisse der rekombinanten Proteine und die verwendeten Abschnitte im Bezug zu LRD.

Tabelle 7 Proteine

Protein-Nummer	LRD Schleifen	Ausgangskonzentration (µg/ml) in TBS²
1	L1-7 (AS 20-200)	280
2	L1-5 (AS 20-140)	530
3	L2-7 (AS 75-200)	550
4	L2-10 (AS 75-275)	280
5	ECD (AS 20-420)	200
6	L1-10 (AS 20-275)	180

² : Tris-buffered saline_(TBS)

3.1.3 Patientenübersicht

Die untersuchten Serumproben stammen von Patienten mit Morbus Basedow, die in der Endokrinologischen Ambulanz der I. Medizinischen Klinik der Johannes Gutenberg Universitätsmedizin (JGU) Mainz vorstellig waren.

Tabelle 8 Verwendete Patientenseren

Serum (S) Nr.	TSI Wert unverdünnt (SRR%)	Einteilung
S1	173	niedrig positiv (pos.)
S2	414	moderat pos.
S3	217	niedrig pos.
S4	315	moderat pos.
S5	509	hoch pos.
S6	293	moderat pos.
S7	343	moderat pos.
S8	247	niedrig pos.
S9	433	hoch pos.
S10	488	hoch pos.
S11	423	hoch pos.
S12	768	hoch pos.
S13	419	moderat pos.
S14	829	hoch pos.
S15	714	hoch pos.
S16	350	moderat pos.
S17	509	hoch pos.

Einteilung der Serumproben anhand der gemessenen unverdünnten TSI Werte im TSI Bioassay: Niedrig positiver TSI Wert 140-279 SRR%, moderat positiver TSI Wert 280-420 SRR% und hoch positiver TSI Wert >420 SRR%.

3.2 Methodik

3.2.1 Verdünnungsübersicht der Proben

Abbildung 9 Verdünnungsverlauf der Proben

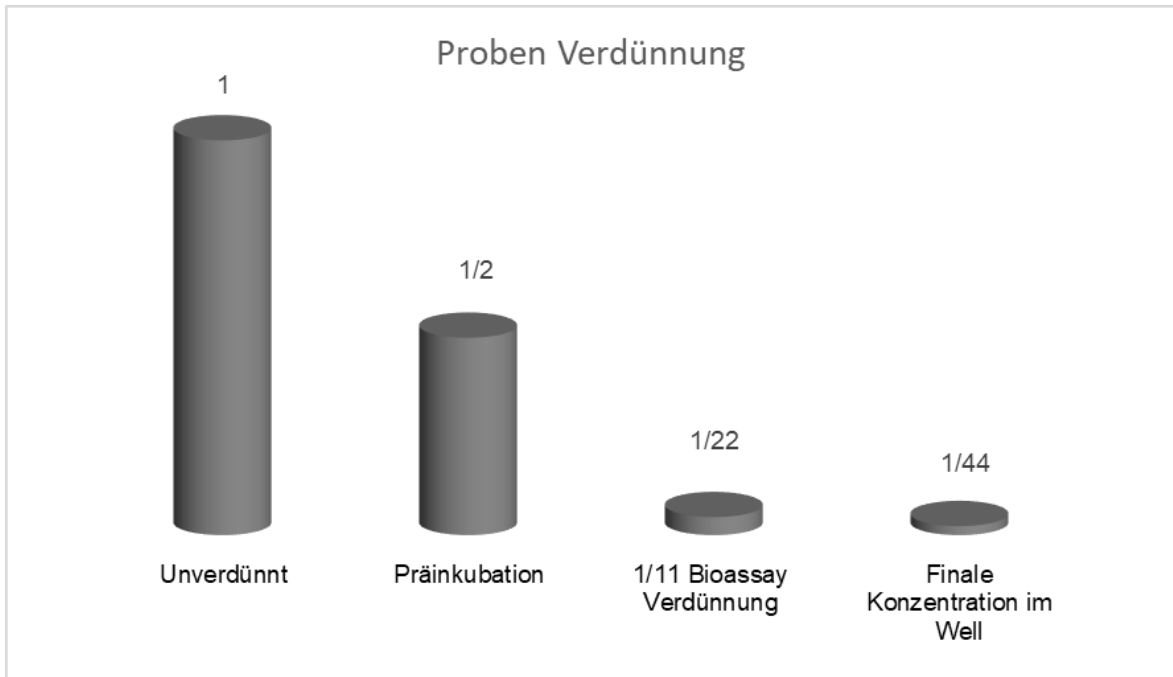


Abbildung 9 zeigt die Verdünnungsstufen der verwendeten Proben im TSI- und TBI Bioassay. Zunächst ist die Probe unverdünnt und hat beispielsweise eine Protein- oder Peptid-Konzentration von $4 \mu\text{g/ml}$. Anschließend werden $100 \mu\text{l}$ der Probe mit $100 \mu\text{l}$ mAk oder Patientenserum gemischt. Die Ausgangskonzentration halbiert sich und liegt nun bei $2 \mu\text{g/ml}$. Im nächsten Schritt, dem Protokoll für das TSI/TBI-Bioassay folgend, wird die Probe 1:11 verdünnt. Die Ursprungskonzentration liegt nun bei $0,18 \mu\text{g/ml}$. Im letzten Schritt wird in jedes Well $100 \mu\text{l}$ der Probe und $100 \mu\text{l}$ Thyretain Reaktionspuffer (RP) gefüllt. Die auf die Zellen wirkende Konzentration beträgt nun 1:44 der Ausgangskonzentration der Probe. Die effektive Konzentration beträgt im Beispiel $0,1 \mu\text{g/ml}$.

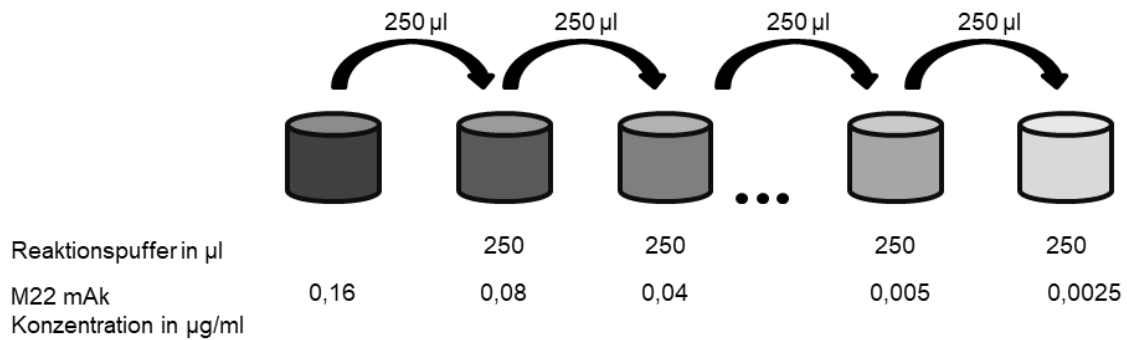
3.2.2 Verdünnung der humanen monoklonalen TSHR-Antikörper

Als Verdünnungsmittel für die Ausgangslösungen der monoklonalen TSHR-Ak wurde PBS verwendet. Für alle weiteren Verdünnungen wurde der RP eingesetzt.

3.2.3 Verdünnung von M22 mAk

Die Ausgangskonzentration von M22 mAk betrug 7,1 mg/ml und wurde auf eine Konzentration von 0,16 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Anschließend wurde eine zwei-fache Verdünnungsreihe mit einer Konzentration von 0,16 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Der Vorgang ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

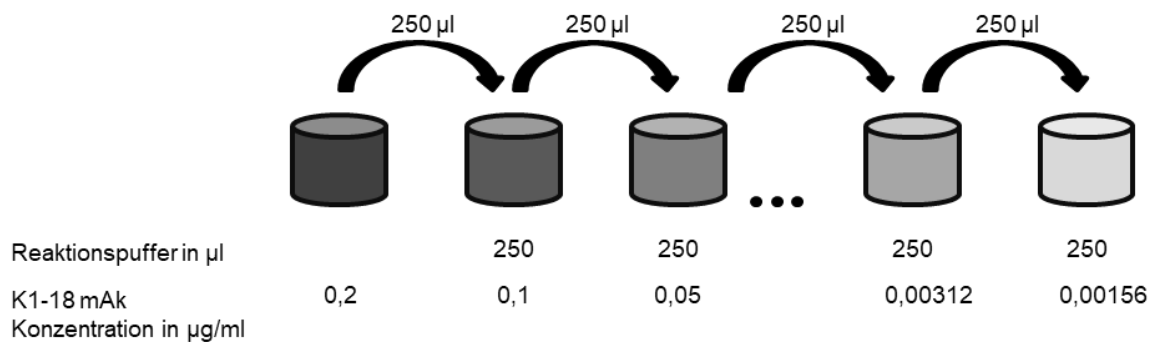
Abbildung 10 Verdünnungsreihe von M22 mAk



3.2.4 Verdünnung von K1-18 mAk

Die Ausgangskonzentration von K1-18 mAk betrug 2,28 mg/ml. Es wurde eine zweifache Verdünnungsreihe mit einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,00156 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Der Vorgang ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

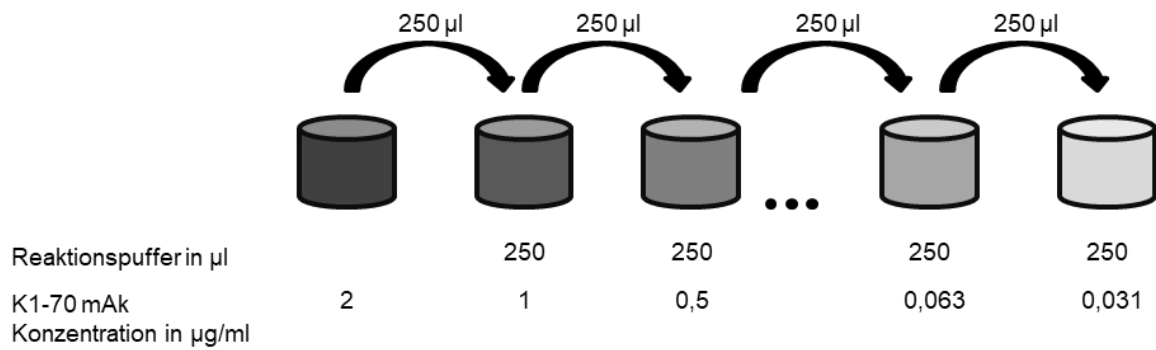
Abbildung 11 Verdünnungsreihe von K1-18 mAk



3.2.5 Verdünnung von K1-70 mAk

Die Ausgangskonzentration von K1-70 mAk betrug 6,6 mg/ml und wurde auf eine Konzentration von 2 µg/ml verdünnt. Anschließend wurde eine zweifache Verdünnung hergestellt mit einer Konzentration von 2 µg/ml bis 0,03125 µg/ml. Der Vorgang ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

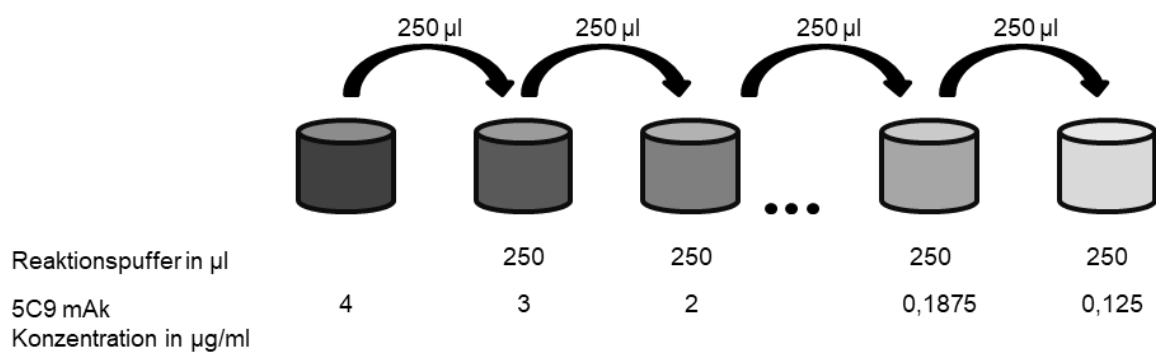
Abbildung 12 Verdünnungsreihe von K1-70 mAk



3.2.6 Verdünnung von 5C9 mAk

Die Ausgangskonzentration von 5C9 mAk betrug 2,51 mg/ml und wurde auf eine Konzentration von 4 µg/ml und 3 µg/ml verdünnt. Anschließend wurde eine zweifache Verdünnung hergestellt mit einer Konzentration von 4 µg/ml bis 0,125 µg/ml. Der Vorgang ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

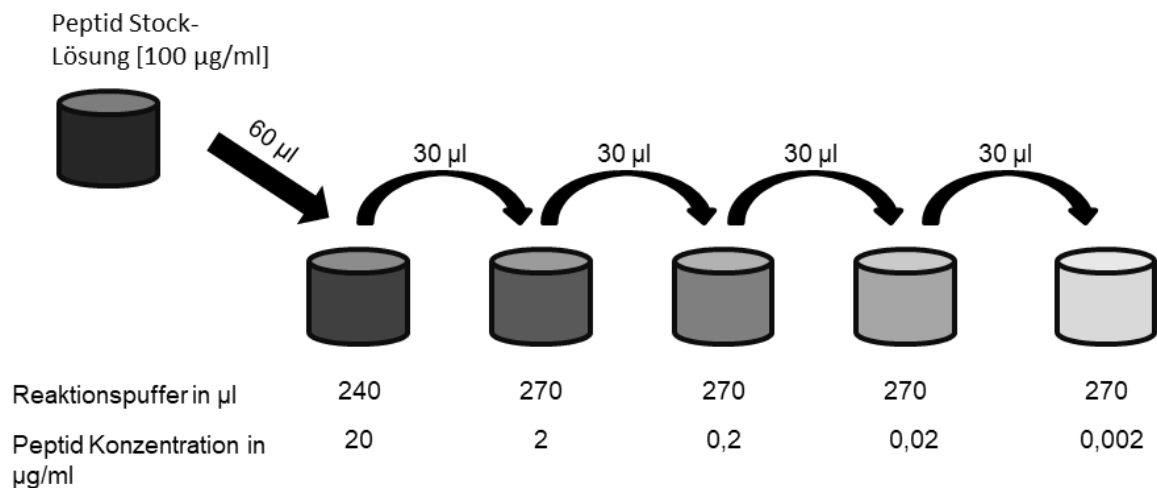
Abbildung 13 Verdünnungsreihe von 5C9 mAk



3.2.7 Verdünnung der Peptide

Alle Peptide wurden mit RP auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Konzentration von 20 µg/ml bis 0,002 µg/ml hergestellt. Der Vorgang ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

Abbildung 14 Verdünnungsreihe der Peptide



3.2.8 Verdünnung der rekombinanten TSHR Proteine

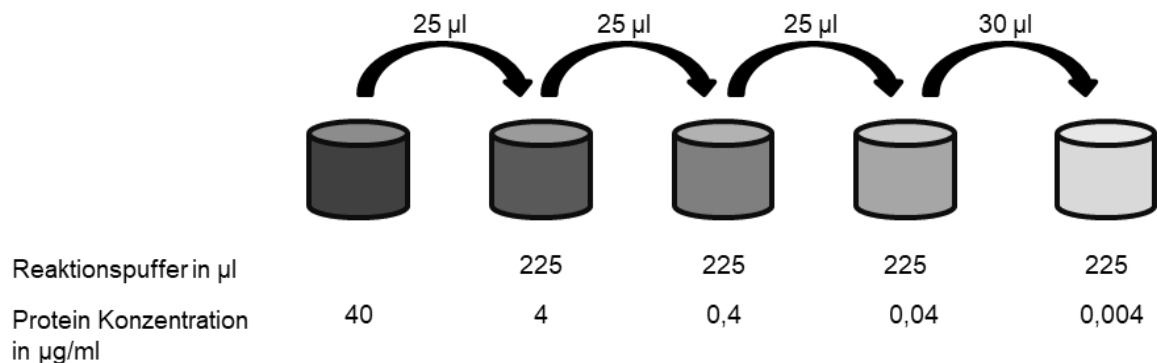
Alle Proteine wurden mit RP auf eine Konzentration von 40 µg/ml verdünnt, dargestellt in der nachfolgenden Tabelle:

Tabelle 9 Protein Verdünnung

1. L1-7	40 µg/ml = 36 µl (280 µg/ml Stammlösung (SL) L1-7) + 214 µl RP
2. L1-5	40 µg/ml = 19 µl (530 µg/ml Stammlösung (SL) L1-5) + 231 µl RP
3. L2-7	40 µg/ml = 18 µl (550 µg/ml Stammlösung (SL) L2-7) + 232 µl RP
4. L2-10	40 µg/ml = 36 µl (280 µg/ml Stammlösung (SL) L2-10) + 214 µl RP
5. ECD	40 µg/ml = 50 µl (200 µg/ml Stammlösung (SL) L2-10) + 200 µl RP
6. L1-10	40 µg/ml = 56 µl (180 µg/ml Stammlösung (SL) L1-10) + 194 µl RP

Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Konzentration von 40 µg/ml bis 0,004 µg/ml hergestellt. Der Vorgang ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

Abbildung 15 Verdünnungsreihe der Proteine



3.2.9 Verdünnung von rekombinantem Protein 6 (L1-10)

Tabelle 10 Vier verschiedene Lots von Protein 6 (L1-10)

Protein 6 (L1-10) Lot	Stock-Konz. (µg/ml)	Verdünnung der Stock-Lösung auf 40 µg/ml
Lot 1	180	56 µl + 194 µl RP
Lot 2	160	62,5 µl + 187,5 µl RP
Lot 3	1130	Um Faktor 10 verdünnt → 113 µg/ml 88,5 µl + 160 µl RP
Lot 4	1370	Um Faktor 10 verdünnt → 137 µg/ml 73 µl + 177 µl RP

Für die Verifizierung und Untersuchung der vier unterschiedlichen Lots von Protein 6 (L1-10) wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Konzentration von 40 µg/ml bis 0,004 µg/ml hergestellt. Der Vorgang ist dem Kapitel der Protein Verdünnung zu entnehmen.

3.2.10 Bioassay für stimulierende TSH-Rezeptor Antikörper

Das TSI Bioassay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (81). Die Durchführung des Assays gliedert sich in drei Abschnitte:

3.2.10.1 Schritt eins: Zellen aussäen

Das Aussäen der Zellen findet unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank statt. Zunächst werden 48 Wells einer schwarzen 96 Well Platte mit jeweils 100 µl der Zell-Adhäsionslösung (Cell Attachment Solution) befüllt. Das Wachstumsmedium wird im Wasserbad vorgewärmt und anschließend werden fünf ml in ein Röhrchen

pipettiert. Pro Platte wird ein Röhrchen mit Zellen benötigt, welches ebenfalls im Wasserbad aufgetaut und im nächsten Schritt zum Wachstumsmedium im Röhrchen hinzugefügt wird. Durch Resuspendieren des Mediums mit der Pipette werden die Zellen mit dem Wachstumsmedium gut durchgemischt. Die vorgelegte Zell-Adhäsionslösung wird entfernt. Die Zellsuspension wird in ein Reagenz-Reservoir überführt. Mit einer Multikanal Pipette werden die inneren 48 Wells mit jeweils 100 µl pro Well der Zelllösung befüllt. Anschließend wird die Platte bei 37°C, 5% CO₂ für 16-18 Stunden inkubiert.

3.2.10.2 Schritt zwei: Durchführung des Bioassays

Die Proben werden wie im obigen Teil beschrieben vorbereitet. Anschließend wird der Zelllösungsüberstand aus der Platte verworfen. Diese wird mit RP (Thyretain) gewaschen, welcher ebenfalls verworfen wird. Danach werden 100 µl RP in jedes der 48 Wells vorgelegt. Jeweils zu zwei Wells werden 100 µl der Probe hinzugefügt, da die Proben in Duplikaten gemessen werden. Die Platte wird auf dem Orbitalschüttler für 10 Sekunden gemischt, um das Durchmischen der Proben mit dem RP zu optimieren. Anschließend wird die Platte für drei Stunden im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

3.2.10.3 Schritt 3: Luciferase und Auswertung

Dreißig Minuten vor Ende der Inkubationszeit, wird der Luciferase Puffer und das Substrat aufgetaut. Im Anschluss wird der Puffer zu dem Lyophilisat hinzugegeben und fünfmal invertiert. Nach Ende der dreistündigen Inkubationszeit wird der Überstand erneut verworfen. Pro Well werden jeweils 75 µl der Luciferase-Lösung pro Well in die 48 Wells gefüllt. Die Platte wird exakt für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in einer Styroporkiste inkubiert und danach in Luminometer (Tecan, Infinite M200, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die ausgelesenen Rohdaten werden in einer Excel Tabelle ausgewertet und analysiert.

3.2.11 Bioassay für blockierende TSH-Rezeptor Antikörper

Der Ablauf des TBI Bioassays ist annähernd der gleiche wie der des TSI Bioassays. Der einzige Unterschied liegt in der Vorbereitung der Probenverdünnung (27, 28). Diese werden nicht mit RP (Thyretain) verdünnt, sondern mit der Arbeitslösung (AL) aus dem Kit, welche bovines (b) TSH enthält. Im Assay konkurrieren bTSH und TBI gegeneinander, um die Bindung an den TSHR. Das Ergebnis wird als Prozent-Inhibition berechnet und angegeben.

3.3 Formeln zur Berechnung

TSI:

$$SRR\% = \frac{\text{Mittelwert der Probe}}{\text{Mittelwert Referenkontrolle}} 100$$

SRR%= Prozentzahl zum Proben - Referenz Verhältnis („percentage of specimen-to-reference ratio“)

TBI:

$$\text{Prozentinhibition} = \frac{(\text{Mittelwert Referenkontrolle} - \text{Mittelwert der Probe})}{\text{Mittelwert Referenkontrolle}} 100$$

Alle Proben und die drei Kit Kontrollen (Positiv,- Referenz und Negativ) werden im TSI und TBI Bioassay in Duplikaten gemessen. Der Probenmittelwert ist der Mittelwert von zwei Replikaten aus der gemessenen Lumineszenz, welche in relativen Lichteinheiten / „relative light units“ (RLU) gemessen wird.

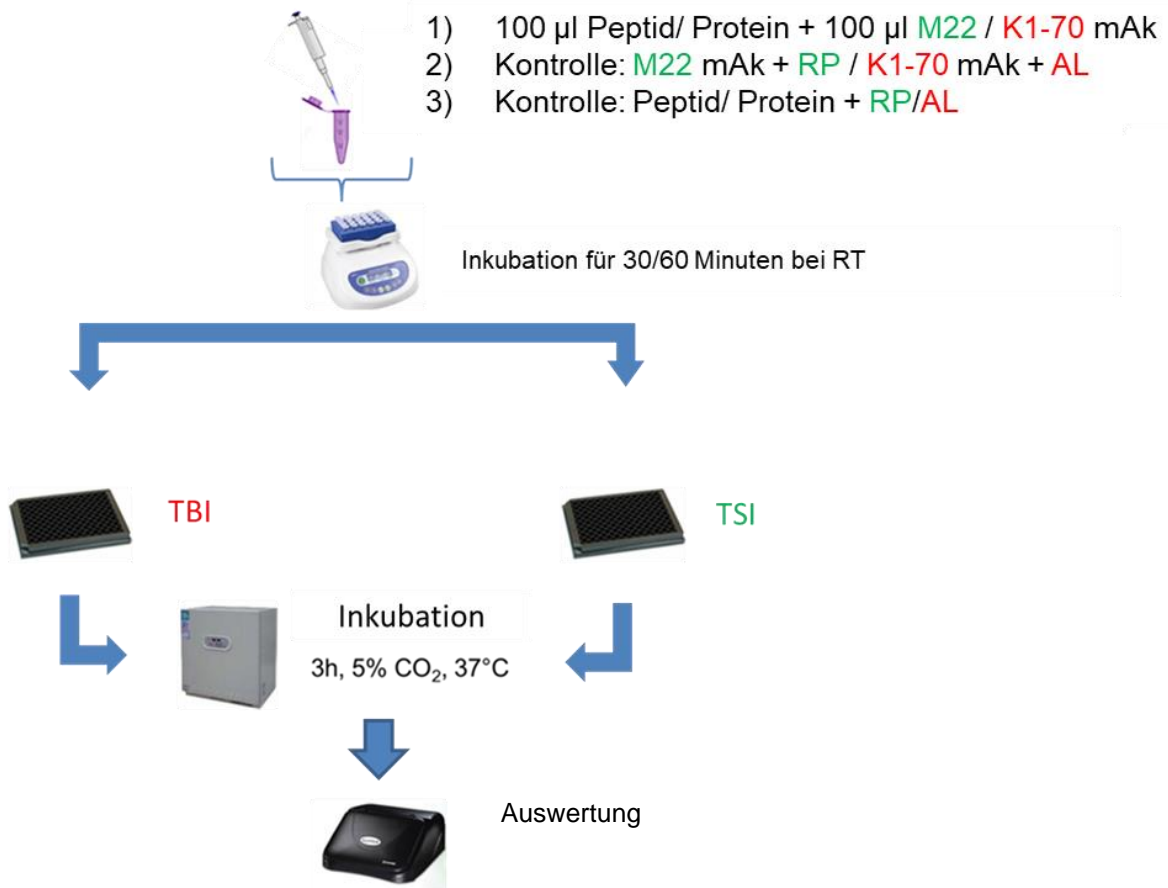
3.4 Titration von den monoklonalen Antikörpern

M22 und K1-18 mAk wurden im TSI Bioassay, K1-70 und 5C9 mAk wurden im TBI Bioassay gemessen. Beide Bioassays für TSI und TBI wurden nach Herstellerangaben mit den jeweiligen vorbereiteten mAk Konzentrationen durchgeführt. Die verwendeten mAk Konzentrationen wurden 1:11 verdünnt, indem 50 µl der jeweiligen Probe mit 500 µl RP vermischt wurden.

3.5 Allgemeiner Ablauf der Untersuchung von Peptiden und Proteinen im TSI und TBI Bioassay

Die Abbildung zeigt den allgemeinen Ablauf der im folgendem erläuterten Versuche mit Peptiden und Proteinen.

Abbildung 16 Versuchsübersicht von der Untersuchung der Peptide und Proteinen im TSI und TBI Bioassay



3.6 Untersuchung der Peptide im TSI und TBI Bioassay

100 µl von jeder Verdünnung der Peptide wurde mit 100 µl eines stimulierenden mAk (M22) oder mit einem blockierenden mAk (K1-70) mit einer Konzentration entsprechend des berechneten EC₅₀ oder IC₅₀ gemischt. Für die Kontrolle wurden 100 µl des verwendeten mAk mit 100 µl RP gemischt. Als weitere Kontrolle, um die Auswirkung der Peptide auf das Assay zu prüfen, wurden jeweils 50 µl von den unverdünnten Peptiden mit 50 µl RP gemischt. Anschließend wurden die Proben für **30 Minuten** auf dem Orbital Schüttler bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 1:11 verdünnt. Als Medium für TSI wurde RP verwendet, für TBI die AL. Danach wurde das TSI oder TBI Bioassay den Herstellerangaben folgend durchgeführt. Von der 96 Well Mikrotiterplatte wurden die inneren 48 Wells für jeweils zwei Peptide verwendet. Insgesamt wurden fünf Platten gemessen.

3.7 Untersuchung der Proteine im TSI und TBI Bioassay

100 µl von jeder Verdünnung der sechs Proteine wurden mit 100 µl eines stimulierenden TSHR mAk (M22) oder mit einem blockierenden TSHR mAk (K1-70) mit einer Konzentration entsprechend der berechneten EC₅₀ oder IC₅₀ Werte

gemischt. Für die Kontrolle wurden jeweils 100 µl des verwendeten mAk mit 100 µl RP (Thyretain) gemischt. Als weitere Kontrolle um die Auswirkung der Peptide auf das Assay zu prüfen, wurden jeweils 50 µl von den unverdünnten Proteinen mit 50 µl RP gemischt. Anschließend inkubierten die Proben für **60 Minuten** auf dem Orbital Schüttler bei RT. Im Anschluss wurden die Proben 1:11 verdünnt. Als Medium für TSI wurde RP verwendet, für TBI die AL. Danach wurde das TSI oder TBI Bioassay nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Von der 96 Well Platte wurden die inneren 48 Wells für jeweils zwei Proteine verwendet. Insgesamt wurden drei Platten gemessen.

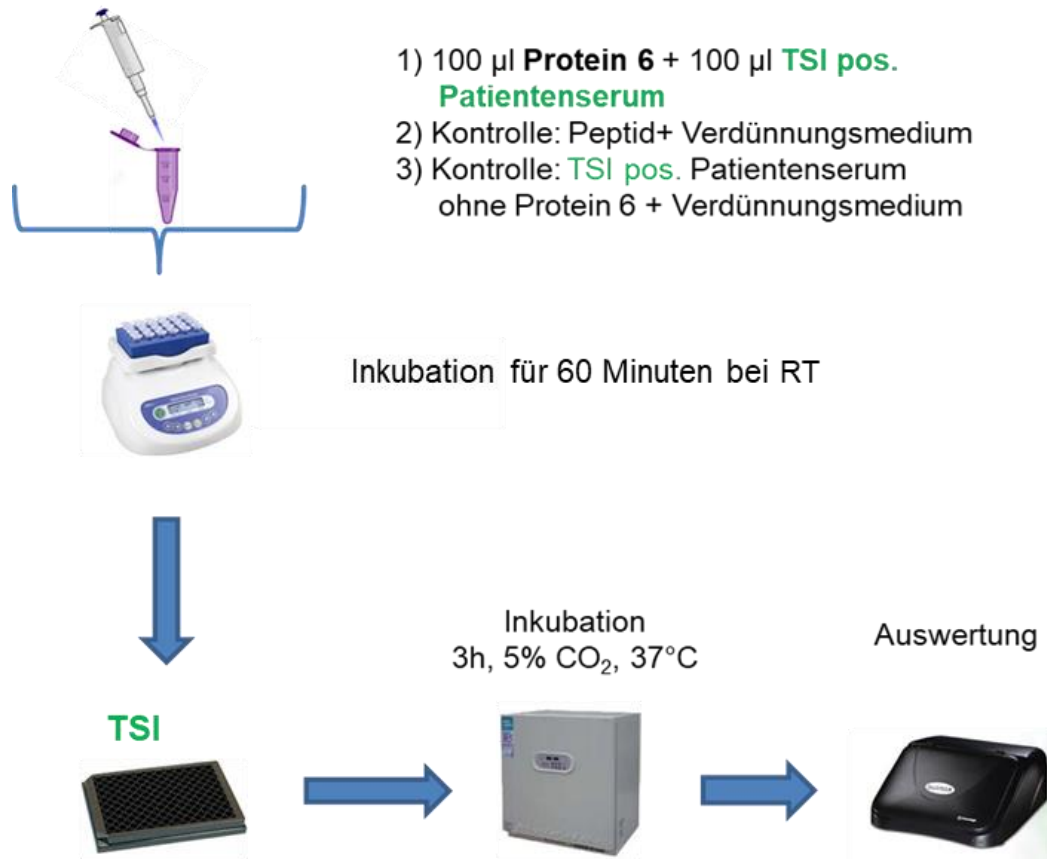
3.8 Verifizierung und Vergleich von vier Lots von Protein 6 (L1-10) im TSI und TBI Bioassay

Die Untersuchung im TSI und TBI Bioassay wurde nach dem gleichen Protokoll der Proteinuntersuchung durchgeführt mit einer Probeninkubationszeit von 60 Minuten.

3.9 Untersuchung von Protein 6 (L1-10) mit TSI positiven Patientenseren im TSI Bioassay

Für die weiteren Versuche mit Patientenseren wurde Lot 4 von Protein 6 (L1-10) ausgewählt.

Abbildung 17 Übersicht der Untersuchung von Protein 6 (L1-10) mit TSI positiven Patientenseren im TSI Bioassay



Insgesamt wurden acht Versuchsansätze mit Patientenseren und dem Protein 6 (L1-10) durchgeführt. Für die einzelnen Versuche wurden insgesamt 17 unterschiedlich niedrig (n), moderat (m) und hoch (h) TSI positive Patientenseren ausgewählt. Es wurden 100 µl der Patientenseren mit jeweils 100 µl der verwendeten Protein 6 (L1-10) Konzentration gemischt. Als Verdünnungsmedium wurden RP, PBS und NS verwendet. Die hergestellten Proben inkubierten für 60 Minuten auf dem Orbitalschüttler bei RT. Anschließend wurde das TSI Bioassay entsprechend nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Übersicht über die einzelnen Versuche ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11 Übersicht der Versuche mit unterschiedlichen Patientenseren und Protein 6 (L1-10)

Versuchs Nr.	Protein 6 Konz.	Verdünnungsmedium	Serum Nr. und Einteilung in n, m, h ³	Serum-Verdünnung
1	0,4-0,0004 µg/ml	RP	S1 (n), S2 (m), S3 (n), S4 (m)	unverdünnt
2	0,8-0,0008 µg/ml	RP	S1 (n), S2 (m), S3 (n), S4 (m)	unverdünnt
3	8-1 µg/ml	RP	S5 (h), S2 (m), S3 (n), S4 (m)	unverdünnt
4	80-0,008 µg/ml	RP	S6 (m), S7 (m), S8 (n), S9 (h), S10 (h), S1 (n)	gleichbleibend (siehe Tabelle 12)
5	40 µg/ml	RP	S7 (m), S10 (h)	1, 1:2, 1:4
6	80-10 µg/ml	Vergleich PBS mit NS	S7 (m)	unverdünnt
7	80-5 µg/ml	PBS	S13 (m), S14(h), S15(h), S16 (m), S17(h)	unverdünnt
8	100-0,02 µg/ml	PBS	S11 (h), S12(h)	unverdünnt

Versuch Nr. 4 wurde mit vorverdünnten Patientenseren durchgeführt. Die Tabelle gibt eine detaillierte Auskunft über die verwendeten Patientenseren

Tabelle 12 Verwendete Patientenseren im Versuch Nr. 4

Serum (S) Nr.	TSI Wert unverdünnt (SRR%)	Einteilung ³	Verwendete Verdünnung	TSI Wert verdünnt (SRR%)
S1	173 SRR%	n	unverdünnt	-
S6	293 SRR%	m	1:3	243
S7	343 SRR%	m	1:9	191
S8	247 SRR%	n	1:3	154
S9	433 SRR%	h	1:9	169
S10	488 SRR%	h	1:27	207

³ Niedrig (n), moderat (m), hoch (h) TSI positiv

3.10 Statistische Auswertung

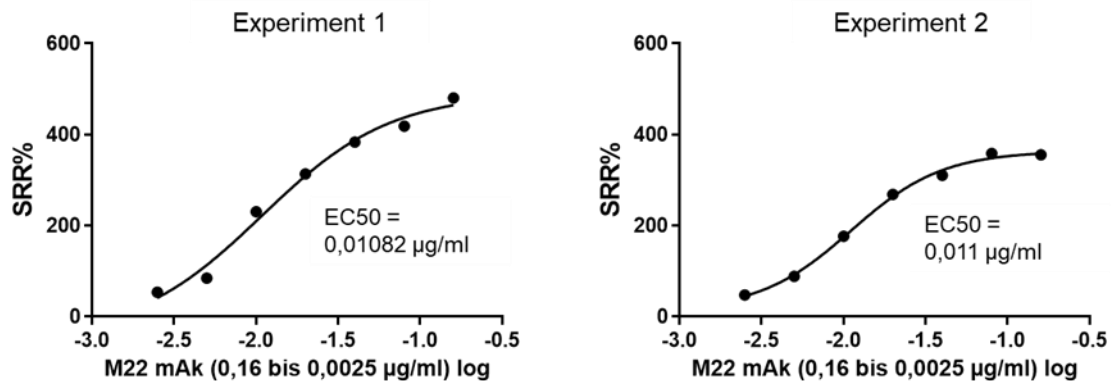
Die ermittelten Daten wurden mit Excel Version 2013 (Excel, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) kalkuliert. Die verwendeten Diagramme wurden mit Excel Version 2019 und GraphPad Prism Version 9.0.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) erstellt. Die Auswertung der gezeigten Diagramme erfolgte rein deskriptiv.

4 Ergebnisse

4.1 Titration von M22 mAk und K1-18 mAk

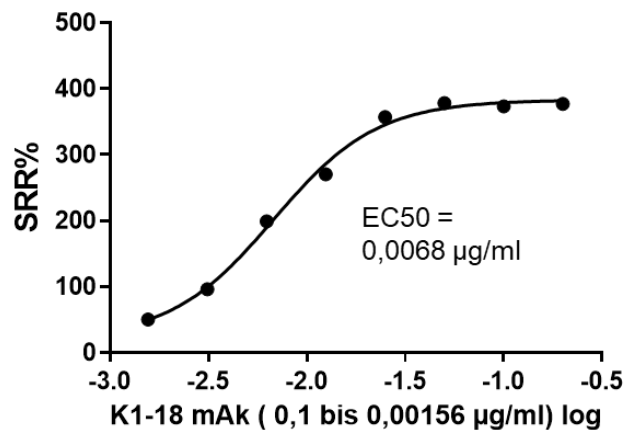
In der nachfolgenden Abbildung werden der Titrationskurvenverlauf für die stimulierenden mAk M22 und K1-18 gezeigt.

Abbildung 18 Titrationskurven von M22 mAk im TSI Bioassay. Zwei unabhängige Verdünnungsreihen wurden von M22 mAk (0,16 – 0,0025 µg/ml) angesetzt und gemessen.



Auf der X-Achse sind die Konzentrationen von M22 mAk in einer logarithmischen (log) Skalierung aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die TSI Werte in SRR Prozent (%). Im Experiment 1 liegt der lineare Bereich bei einer Konzentration von 0,005 µg/ml bis 0,04 µg/ml mit SRR Werten von 80% bis 380 %. Die berechnete mittlere effektive Konzentration (EC50) liegt bei 0,01082 µg/ml. Der höchste SRR% Wert von 480 SRR% wird mit einer Konzentration von 0,16 µg/ml erreicht. Im 2. Experiment liegt der lineare Bereich bei einer Konzentration von 0,005 bis 0,4 µg/ml mit SRR Werten von 90% bis 310 %. Die berechnete EC50 Wert liegt bei 0,011 µg/ml. Ein Plateau mit dem höchsten Signal wird ab einer Konzentration von 0,08 µg/ml mit 358 SRR% erreicht.

Abbildung 19 Titrationskurve von K1-18 mAk im TSI Bioassay

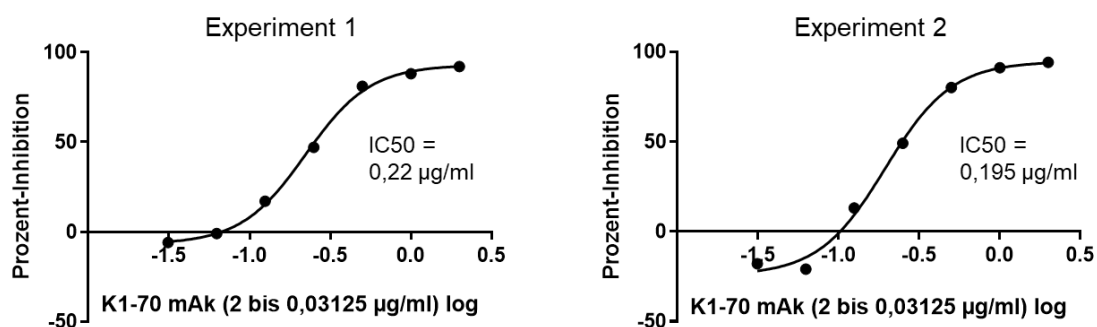


Auf der X-Achse sind die Konzentrationen von K1-18 mAk in einer logarithmischen (log) Skalierung aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die TSI Werte in SRR Prozent. Der lineare Bereich liegt bei einer Konzentration von 0,003 µg/ml bis 0,025 µg/ml mit TSI Werten von 100% bis 350 %. Der berechnete EC50 Wert liegt bei 0,0068 µg/ml. Der höchste SRR% Wert ist 380 SRR% mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml K1-18 mAk.

4.2 Titration von K1-70 und 5C9 mAk

In der nachfolgenden Abbildung werden die Titrationskurven für die blockierenden mAk K1-70 und 5C9 gezeigt.

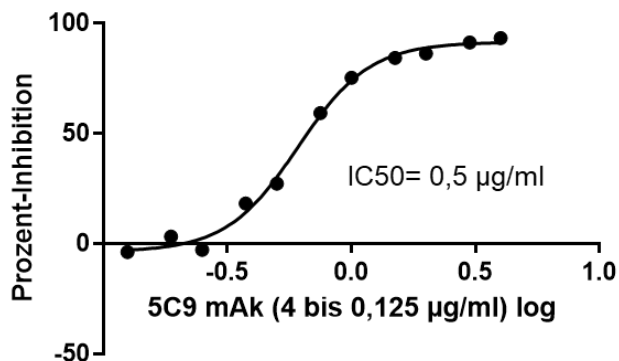
Abbildung 20 Titrationskurven von K1-70 mAk im TBI Bioassay. Zwei unabhängige Verdünnungsreihen wurden von K1-70 (2 – 0,03125 µg/ml) angesetzt und gemessen.



Auf der X-Achse sind die Konzentrationen von K1-70 mAk in einer logarithmischen (log) Skalierung aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die Inhibition in Prozent für den TBI Bioassay an. Im ersten Experiment liegt der lineare Bereich bei 0,1 µg/ml bis 0,5 µg/ml mit einer Prozentinhibition von 15% bis 80 %. Die berechnete mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) liegt bei 0,2226 µg/ml. Ein Plateau mit zunehmender Inhibition wird ab einer Konzentration von 1 µg/ml erreicht mit einer

Inhibition von 88% bis 92%. Im zweiten Experiment liegt der lineare Bereich bei einer Konzentration von 0,1 bis 0,5 µg/ml mit einer Prozentinhibition von 10% bis 80%. Der berechnete IC50 Wert liegt bei 0,195 µg/ml. Ein Plateau mit zunehmender Inhibition wird ab einer Konzentration von 1 µg/ml erreicht mit einer Inhibition von 91% bis 94%.

Abbildung 21 Titrationskurve 5C9 mAk im TBI Bioassay

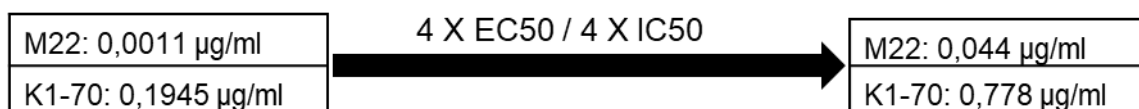


Auf der X-Achse sind die Konzentrationen von 5C9 mAk in einer logarithmischen (log) Skalierung aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die Inhibition in Prozent im TBI Bioassay an. Der lineare Bereich reicht von 0,375 µg/ml bis 1 µg/ml mit einer Prozentinhibition von 20% bis 75 %. Der berechnete IC50 Wert liegt bei 0,5 µg/ml. Ein Plateau mit zunehmender Inhibition wird ab einer Konzentration von 1 µg/ml erreicht mit einer Inhibition von 75% bis 93%.

4.3 Zusammenfassung der vier mAk Titrationsen

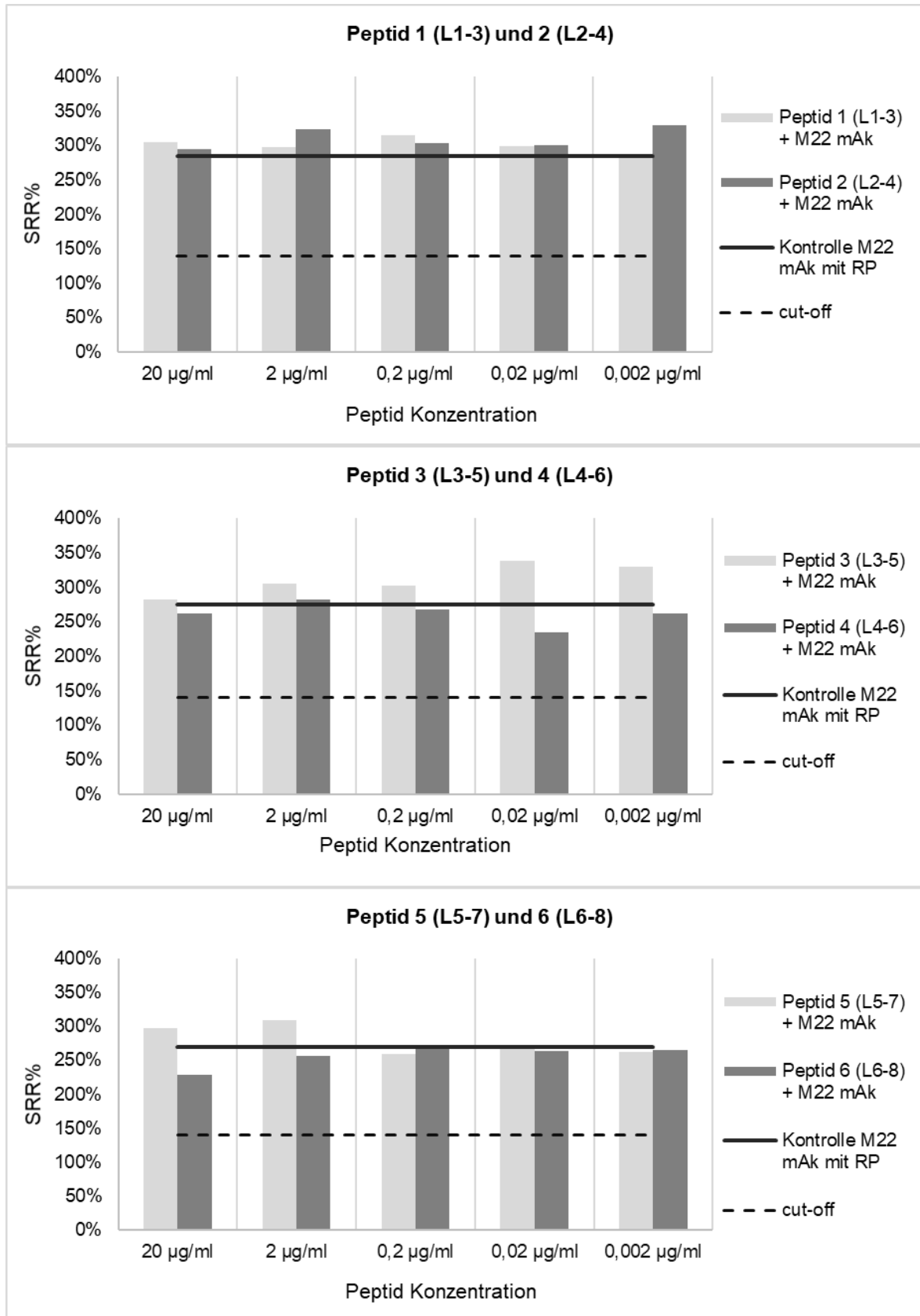
	M22 mAk (µg/ml) EC50 (stimulierend)	K1-18 mAk (µg/ml) EC50 (stimulierend)	K1-70 mAk (µg/ml) IC50 (blockierend)	5C9 mAk (µg/ml) IC50 (blockierend)
1. Messung	0,0108	0,0068	0,222	0,5
2. Messung	0,011	n.a.	0,195	n.a.

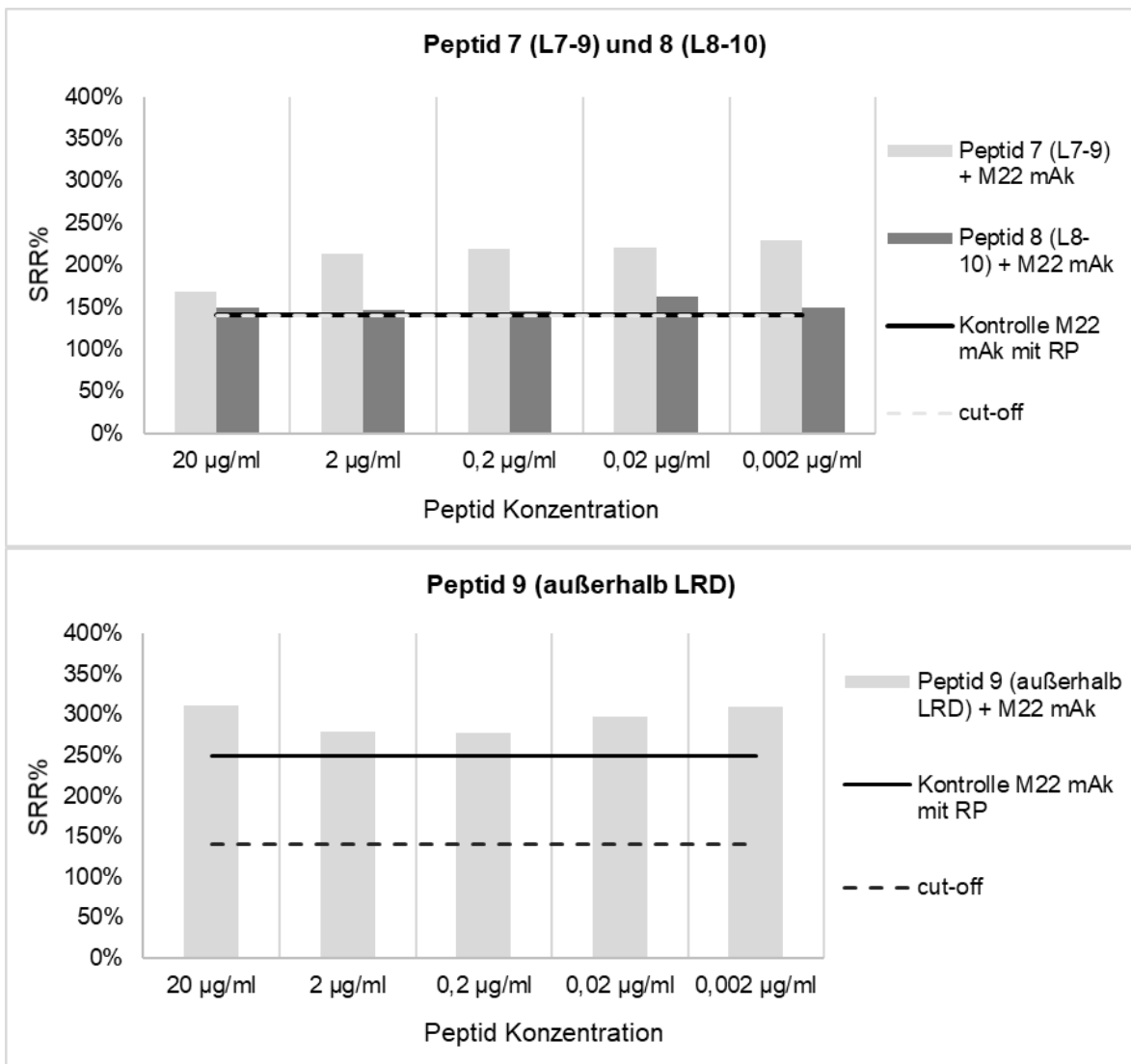
Für alle weiterführenden Untersuchungen wurden M22 mAk und K1-70 mAk ausgewählt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine vierfache Konzentration des EC50 und des IC50 Wertes für die folgenden Versuche eingesetzt



4.4 Untersuchung neun verschiedener Peptide im stimulierenden (TSI) Bioassay

Abbildung 22 Ergebnisse der Peptide mit M22 mAk im TSI Bioassay



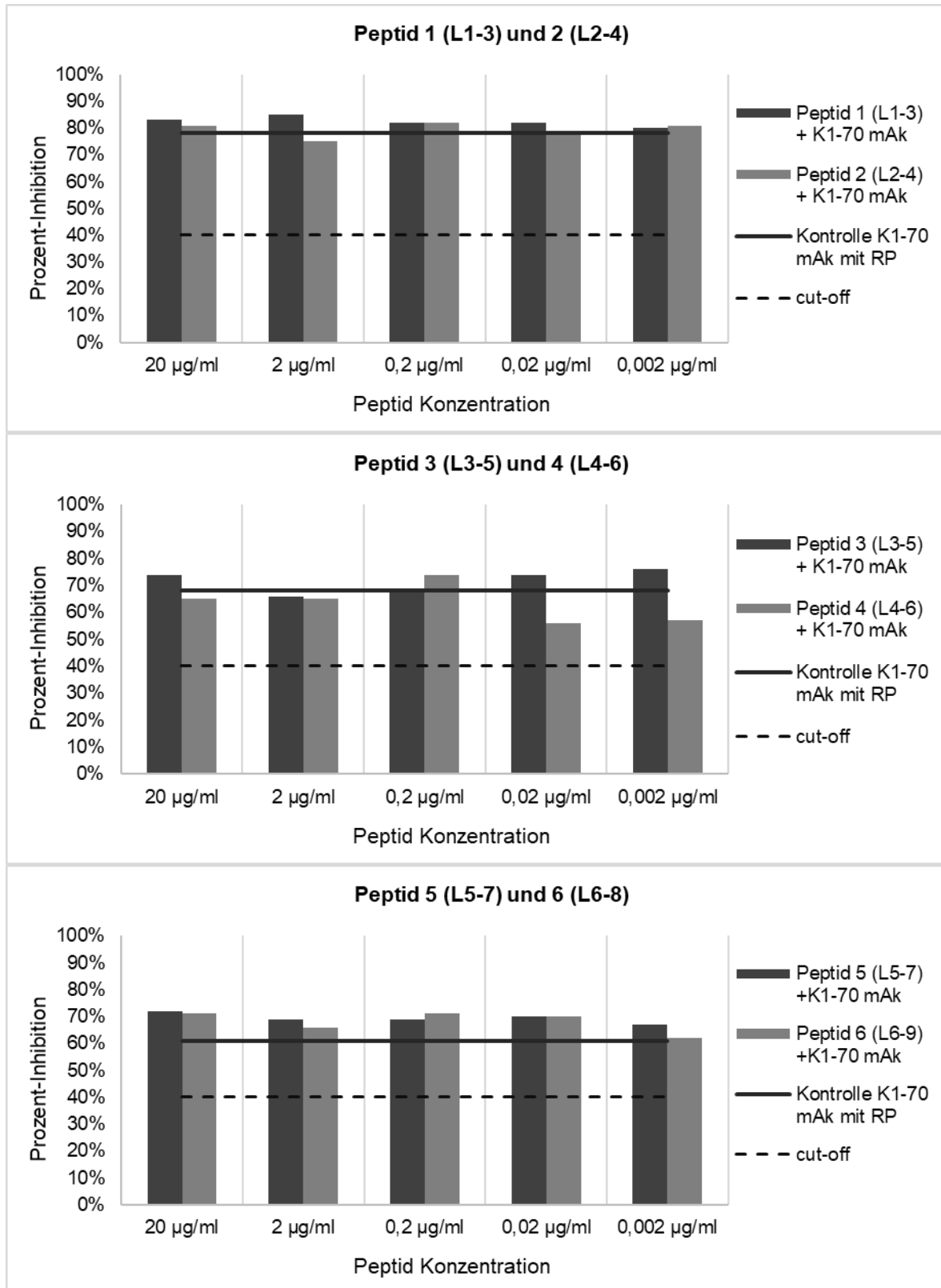


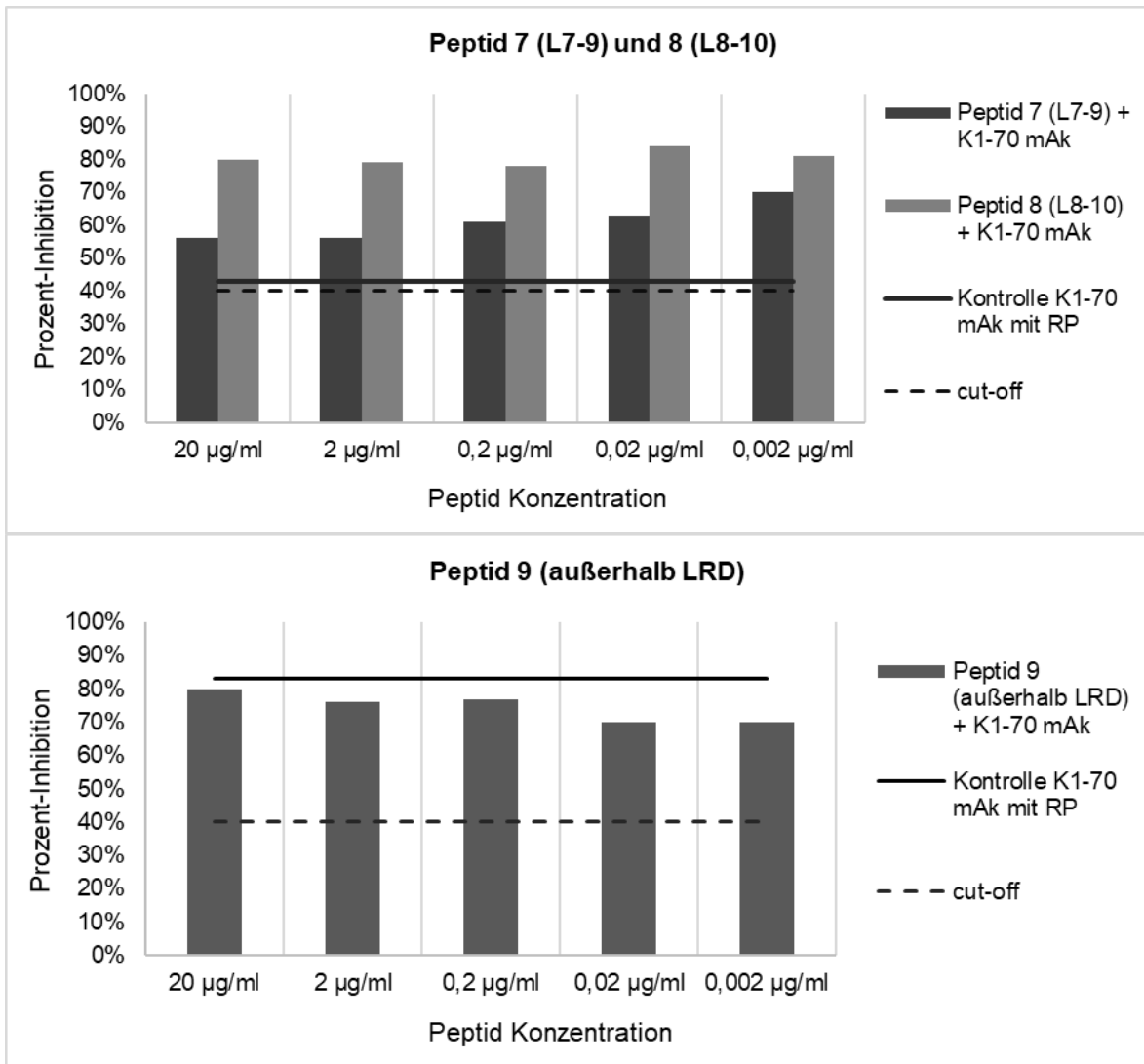
Ergebnisse der neun Peptide im TSI Bioassay: Die angegebenen Konzentrationen geben die Konzentration des jeweiligen Peptids vor der Vermischung mit M22 mAk an. Der cut-off des TSI Bioassays (als gestrichelte Linie dargestellt) liegt bei 140 SRR.%. Als weitere Kontrolle wurde M22 mAk ohne Peptid mit einer Konzentration von 0,044 µg/ml verwendet (als schwarze durchgezogene Linie dargestellt).

Es wurden neun unterschiedliche Peptide im TSI Bioassay getestet. Die genaue Sequenz ist der Tabelle 6 zu entnehmen. Die X-Achse zeigt die verwendeten Konzentrationen (20 µg/ml - 0,002 µg/ml) der Peptide, die Y-Achse zeigt die gemessenen Daten in SRR%. M22 mAk mit einer Konzentration von 0,044 µg/ml ohne Peptid wurde als Kontrolle verwendet und ist als schwarze Linie in den Diagrammen dargestellt. Der cut-off für das TSI Bioassay ist als gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die gemessenen TSI Werte der Peptid Proben mit M22 mAk liegen alle über dem cut-off von 140%. Die Proben von Peptid 1,2,3,7,8, und 9 sind gleich oder höher als die M22 mAk Kontrolle. Die Proben für die Peptide 4 und 5 liegen zum Teil über oder unterhalb der M22 mAk Kontrolle. Die Daten zeigen keine Inhibition von M22 mAk.

4.5 Untersuchung neun verschiedener Peptide im blockierenden (TBI) Bioassay

Abbildung 23 Ergebnisse der Peptide mit K1-70 mAk im TBI-Bioassay



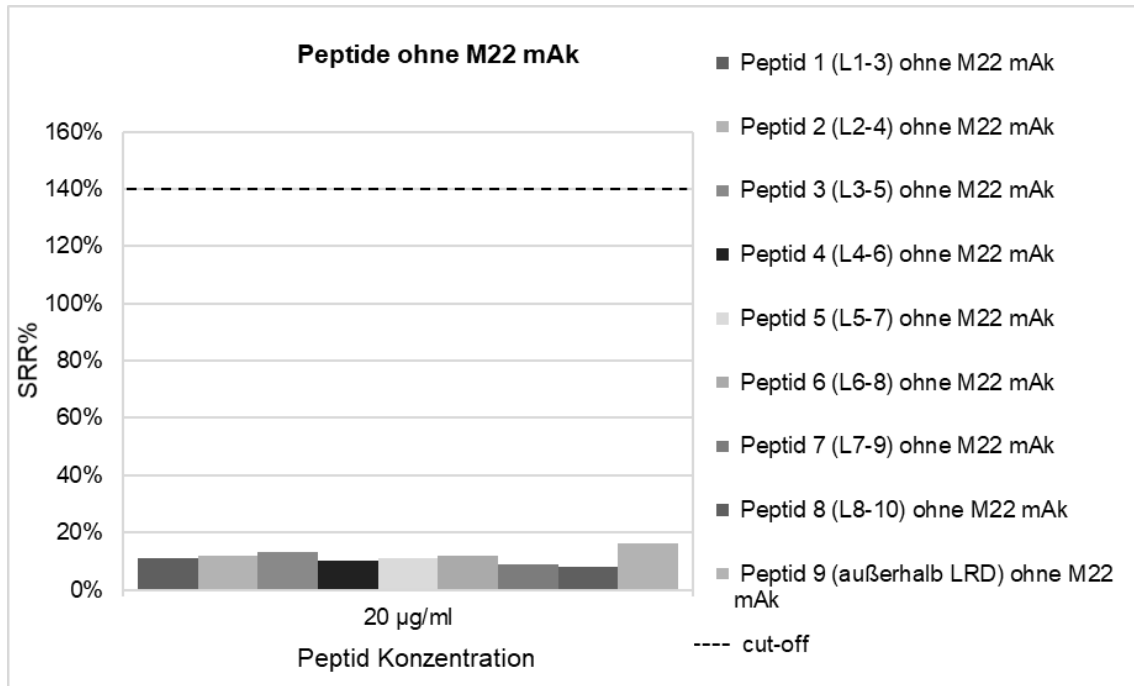


Ergebnisse der Peptide im TBI Bioassay: Die angegebenen Konzentrationen geben die Konzentration des jeweiligen Peptids vor der Vermischung mit K1-70 mAk an. Der cut-off des TBI-Bioassay (als gestrichelte Linie dargestellt) liegt bei einer Prozent-Inhibition von 40 %. Als weitere Kontrolle wurde K1-70 mAk ohne Peptid mit einer Konzentration von 0,778 µg/ml verwendet (als schwarze durchgezogene Linie dargestellt).

Es wurden neun unterschiedliche Peptide im TBI Bioassay getestet. Die genaue Sequenz ist der Tabelle 7 zu entnehmen. Die X-Achse zeigt die verwendeten Konzentrationen (20 µg/ml-0,002 µg/ml) der Peptide, die Y-Achse zeigt die gemessene Prozent-Inhibition. K1-70 mAk mit einer Konzentration von 0,778 µg/ml ohne Peptid wurde als Kontrolle verwendet und ist als schwarze Linie in den Diagrammen dargestellt. Der cut-off für das TBI Bioassay ist als gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die gemessenen Prozent-Inhibitionen der Peptid Proben mit K1-70 mAk liegen bei allen über dem cut-off von 40% Inhibition. Die Peptid Proben 1, 5, 6, 7 und 8 liegen über der K1-70 mAk Kontrolle, die Peptid Proben 2 und 4 zum Teil und alle Proben von Peptid 9 liegen unterhalb der K1-70 mAk Kontrolle in RP. Die Diagramme zeigen keine Minderung der Inhibition durch K1-70 mAk.

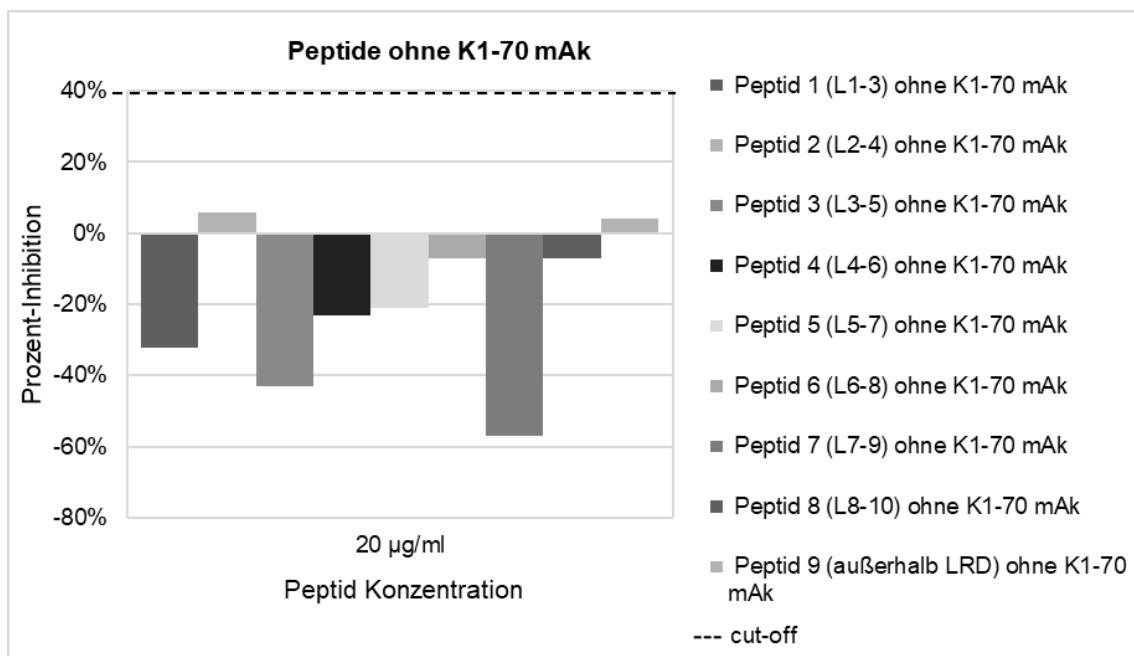
4.6 Untersuchung der Peptide als Kontrolle im TSI und TSI Bioassay in Abwesenheit von M22 mAk

Abbildung 24 Kontrolle der Peptide ohne M22 mAk im TSI Bioassay



Kontrolle von Peptid 1-9 im TSI Bioassay ohne Zugabe von M22 mAk. Als Peptid Konzentration wurden jeweils 20 µg/ml verwendet. Der TSI Assay cut-off ist als gestrichelte Linie dargestellt und liegt bei 140 SRR%.

Abbildung 25 Kontrolle der Peptide ohne K1-70 mAk im TBI Bioassay

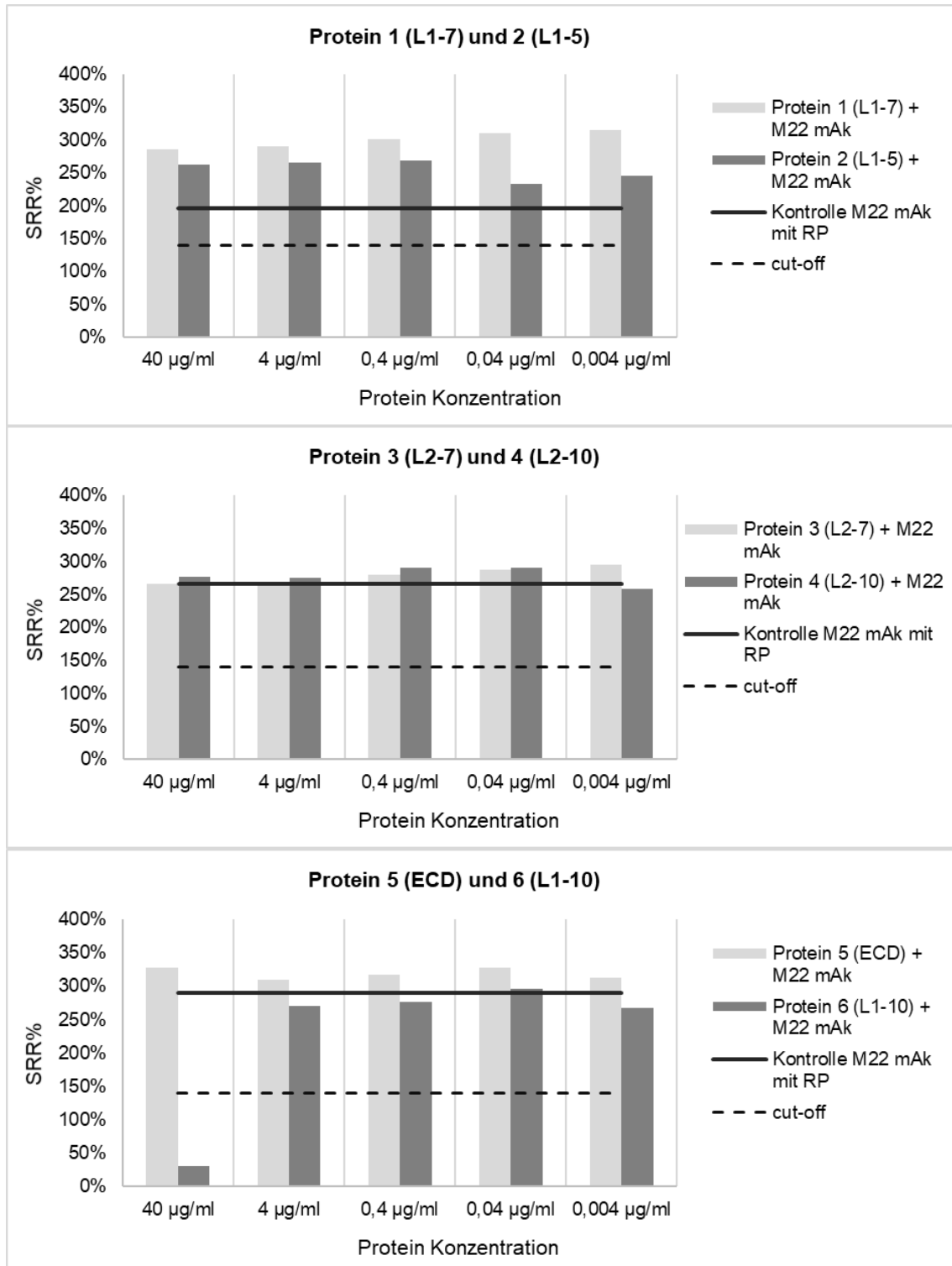


Kontrolle von Peptid 1-9 im TBI Bioassay ohne Zugabe von K1-70 mAk. Als Peptid Konzentration wurden jeweils 20 µg/ml verwendet. Der TBI Assay cut-off ist als gestrichelte Linie dargestellt und liegt bei einer Prozent-Inhibition von 40%.

Alle Peptide sind in der Kontrolle ohne den jeweiligen mAk sowohl im TSI- als auch TBI-Bioassay negativ und liegen unterhalb des jeweiligen Assay cut-offs.

4.7 Untersuchung sechs rekombinanter Proteine im stimulierenden (TSI) Bioassay

Abbildung 26 Ergebnisse der rekombinanten Proteine im TSI Bioassay



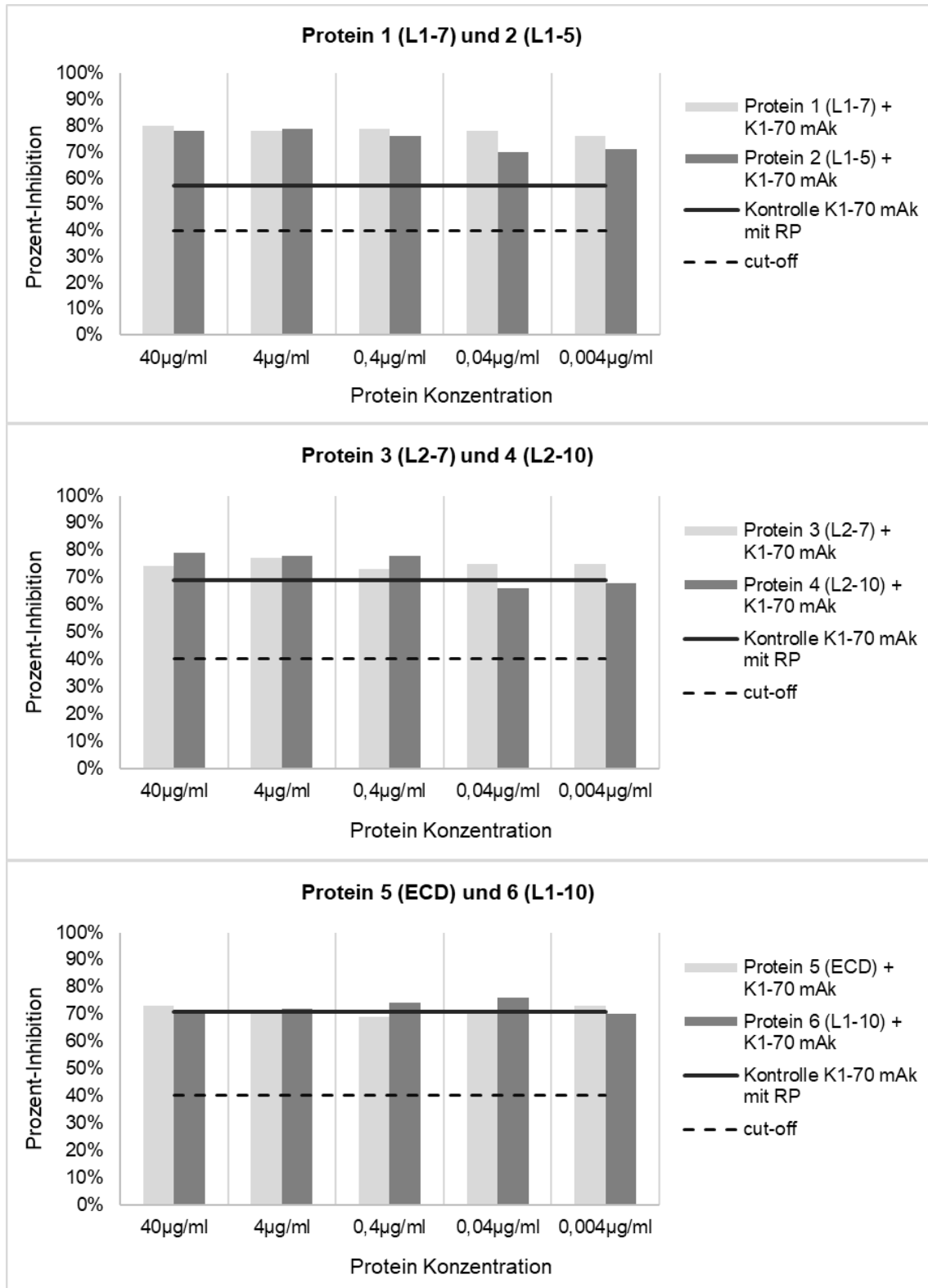
Ergebnisse der sechs rekombinanten Proteine im TSI Bioassay. Die angegebenen Konzentrationen auf der x-Achse geben die Konzentration des jeweiligen Proteins vor der Vermischung mit M22 mAk an. Der cut-off des TSI Bioassay (als gestrichelte Linie dargestellt) liegt bei 140 SRR%. Als weitere Kontrolle wurde M22 mAk mit einer Konzentration von 0,044 µg/ml ohne Protein verwendet (als schwarze durchgezogene Linie dargestellt).

Es wurden sechs rekombinante Proteine im TSI Bioassay gemessen. Die Sequenzen sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Die x-Achse zeigt die verwendeten

Konzentrationen (40 µg/ml - 0,004 µg/ml) der Proteine vor der Vermischung mit M22 mAk an, die y-Achse zeigt die gemessenen Daten in SRR% an. Als Kontrolle wurde M22 mAk mit einer Konzentration von 0,044 µg/ml ohne Protein verwendet und ist als schwarze durchgezogene Linie in den Diagrammen dargestellt. Der cut-off für das TSI Bioassay ist als gestrichelte Linie bei 140% gekennzeichnet. Die gemessenen Werte der Protein-Proben 1, 2, 3, 4 und 5 liegen alle über dem cut-off des TSI Bioassays von 140% sowie über der jeweiligen M22 mAk Kontrolle. Protein 6 (L1-10) zeigt bei einer Konzentration von 40 µg/ml eine Prozent-Inhibition von 90% mit der M22 mAk Kontrolle als Referenz-Wert. Die weiteren Konzentrationen von Protein 6 (L1-10) liegen über dem cut-off (140 SRR%) des TSI Bioassays und zeigen eine geringe Abweichung von der M22 mAk Kontrolle.

4.8 Untersuchung sechs rekombinanter Proteine im blockierenden (TBI) Bioassay

Abbildung 27 Ergebnisse der rekombinanten Proteine im TBI Bioassay



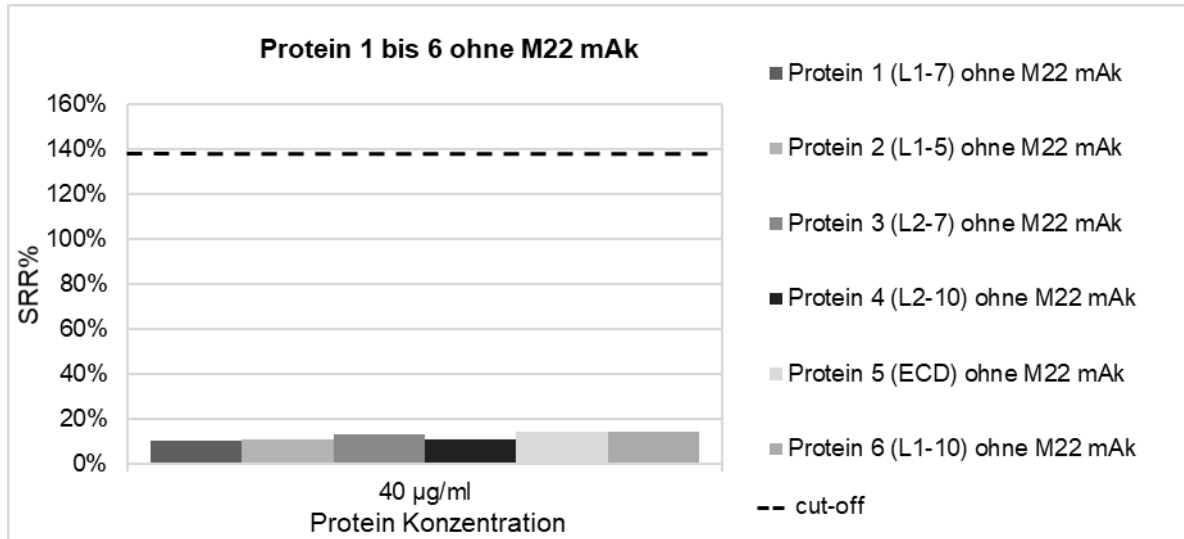
Ergebnisse der 6 rekombinanten Proteine im TBI Bioassay. Die angegebenen Konzentrationen geben die jeweiligen Protein Konzentration vor der Vermischung mit K1-70 mAk an. Der cut-off des TBI Bioassays ist als

gestrichelte Linie dargestellt und liegt bei 40% Inhibition. Als weitere Kontrolle wurde K1-70 mAk mit einer Konzentration von 0,788 µg/ml ohne Protein verwendet (als schwarze durchgezogene Linie dargestellt).

Es wurden sechs rekombinante Proteine im TBI Bioassay getestet. Die Sequenzen sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Die X-Achse zeigt die verwendeten Konzentrationen (40 µg/ml - 0,004 µg/ml) der Proteine vor Vermischen mit K1-70 mAk. Die Y-Achse zeigt die gemessene Prozent-Inhibition. K1-70 mAk mit einer Konzentration von 0,788 µg/ml ohne Protein wurde als Kontrolle verwendet und ist als schwarze durchgezogene Linie in den Diagrammen dargestellt. Der cut-off für das TBI Bioassay ist als gestrichelte Linie bei 40% Inhibition gekennzeichnet. Die gemessenen TBI Werte für die Proteine 1-6 liegen alle über dem cut-off von 40% Inhibition sowie über der jeweiligen K1-70 mAk Kontrolle. Es zeigt sich keine Minderung der Prozent-Inhibition von K1-70 mAk.

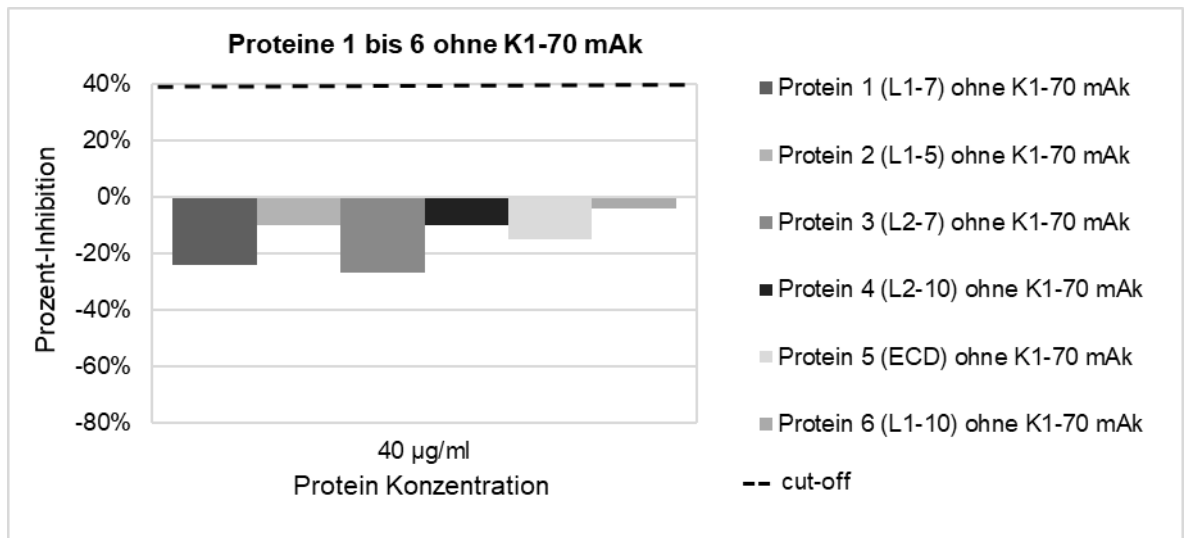
4.8.2 Untersuchung der rekombinanten Proteine als Kontrolle im TBI und TSI Bioassay in Abwesenheit von monoklonalen Antikörpern

Abbildung 28 Kontrolle von Protein 1-6 im TSI Bioassay ohne M22 mAk.



Als Konzentration wurden jeweils 40 µg/ml verwendet, der cut-off ist als gestrichelte Linie dargestellt und liegt bei 140 SRR%.

Abbildung 29 Kontrolle von Protein 1-6 im TBI Bioassay ohne K1-70 mAk



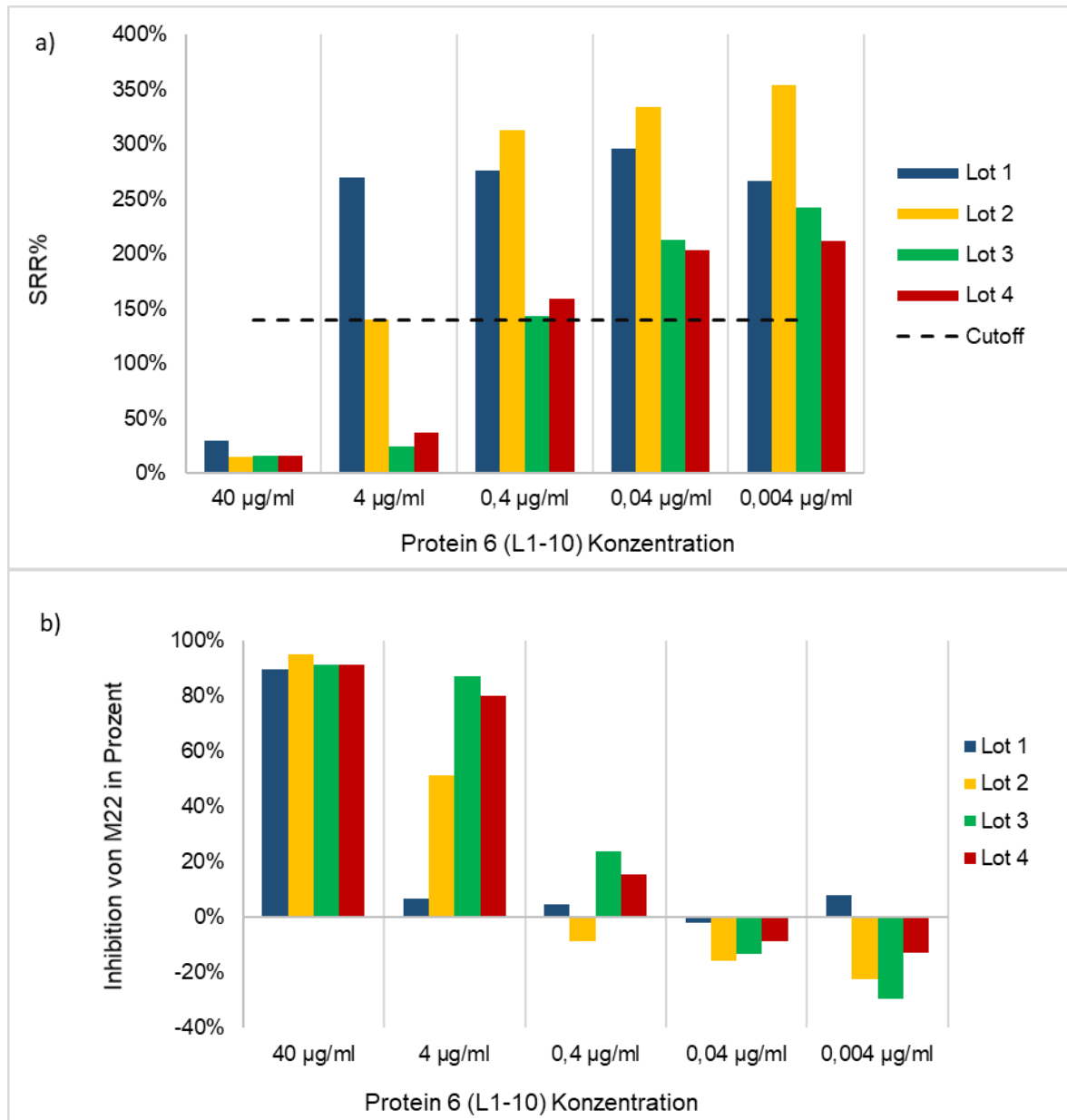
Als Protein Konzentration wurden jeweils 40 µg/ml verwendet. Der Assay cut-off ist als gestrichelte Linie dargestellt und liegt bei einer Inhibition von 40%.

Alle Kontrollen der untersuchten Protein Konzentrationen zeigten ohne die mAk keinen Einfluss auf den TSI / TBI Bioassay und sind alle als negativ einzustufen.

4.9 Vergleich vier verschiedener Lots von Protein 6 (L1-10) im stimulierenden (TSI) Bioassay

Für das weitere Vorgehen wurden vier unterschiedliche Lots von Protein 6 (L1-10) im TSI Bioassay getestet, jeweils mit den Konzentration 40 µg/ml bis 0,004 µg/ml. Lot 1 und Lot 2 wurden auf separaten Platten, Lot 3 und 4 auf einer gemeinsamen Platte gemessen.

Abbildung 30 Vergleich der Ergebnisse von Protein 6 (L1-10) Lot 1-4 im TSI Bioassay a) Ergebnisse in SRR Prozent b) Ergebnisse der Inhibition von M22 mAk in Prozent

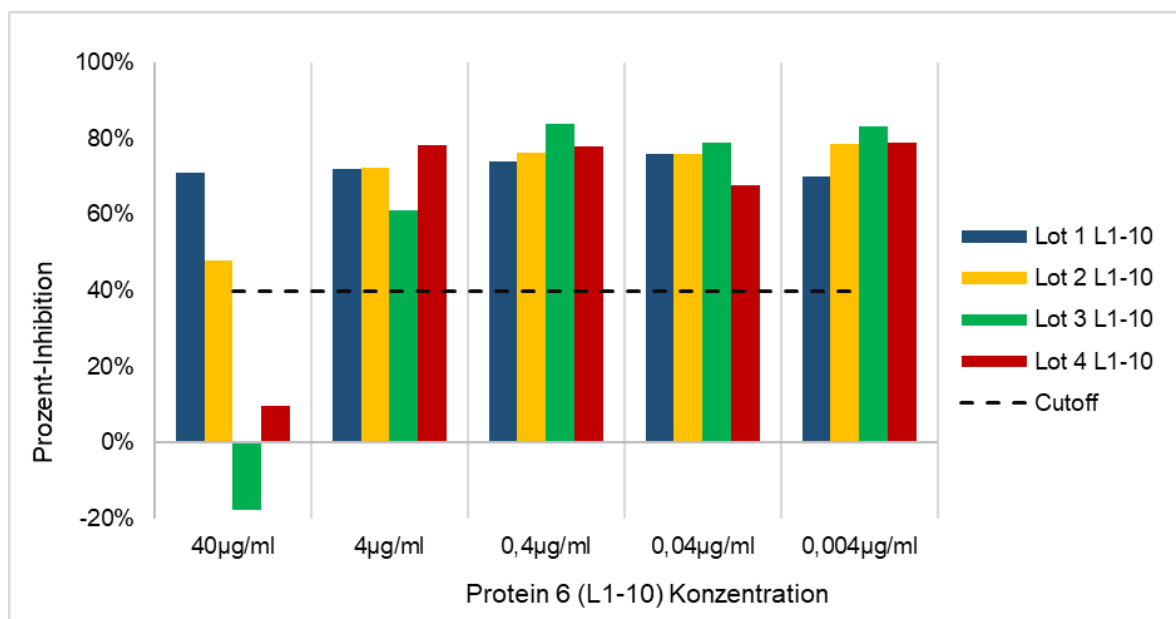


a) Die Werte sind in SRR% angegeben, der cut-off ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% dargestellt. Die verwendete Konzentration bezieht sich auf die Konzentration vor der Vermischung von Protein 6 (L1-10) mit M22 mAk. b) Die Ergebnisse werden als Inhibition von M22 mAk in Prozent dargestellt. Als Referenz dient M22 mAk mit einer Konzentration von 0,044 µg/ml ohne Protein 6 (L1-10) welche bei 188 SRR% liegt.

Die oben dargestellten Diagramme zeigen die gemessenen Daten der verschiedenen Lots von Protein 6 (L1-10). Als Kontrolle wurde M22 mAk mit einer Konzentration von 0,044 µg/ml ohne Protein 6 (L1-10) verwendet und dient als Referenzwert zur Berechnung der Inhibition von M22 mAk durch Protein 6 (L1-10). Alle getesteten Lots zeigen eine Hemmung von 90% oder höher bei einer Konzentration von 40 µg/ml. Lot 1 steigt ab 4 µg/ml stark an und die Werte liegen zwischen 269 - 296 SRR%. Die Hemmung durch Lot 2 liegt bei 2 µg/ml bei 50%, das gemessene Signal liegt bei 140 SRR%. Ab 0,4 µg/ml wird ein Plateau erreicht. Die Werte liegen zwischen 313 - 354%. Lot 3 und 4 zeigen eine konstante Zunahme der SRR% Werte beziehungsweise eine Abnahme der Hemmung. Ab einer Konzentration von 0,04 µg/ml liegen beide deutlich über dem cut-off mit 213 und 204 SRR% und eine negative Inhibition ist zu entnehmen.

4.10 Vergleich vier verschiedener Lots von Protein 6 (L1-10) im blockierenden (TBI) Bioassay

Abbildung 31 Vergleich der Ergebnisse von Protein 6 (L1-10) Lot 1-4 im TBI Bioassay



Die Werte sind als Prozent-Inhibition angegeben. Der Assay cut-off ist als gestrichelte Linie bei 40% Inhibition dargestellt. Die verwendete Protein Konzentration bezieht sich auf die Konzentration vor der Vermischung von Protein 6 (L1-10) mit K1-70 mAk.

Es wurden vier Lots von Protein 6 (L1-10) im TSI Bioassay getestet. Auf der X-Achse stehen die Proteinkonzentrationen (40 - 0,004µg/ml), auf der Y-Achse stehen die Werte für die Prozent-Inhibition. K1-70 mAk mit einer Konzentration von 0,788 µg/ml ohne Protein 6 (L1-10) wurde als Kontrolle verwendet Lot 1 zeigt keinen Einfluss auf die Hemmung von K1-70 mAk. Lot 2 zeigt bei 40 µg/ml eine leichte

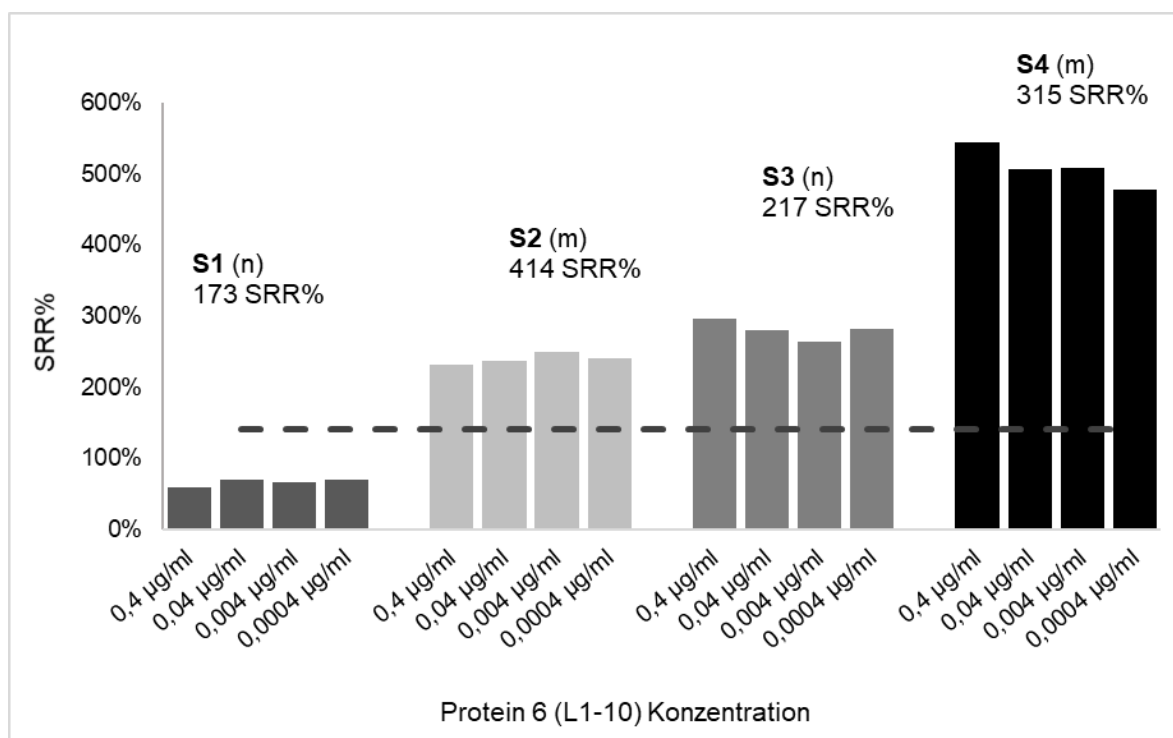
Aufhebung der Hemmung, die noch über dem cut-off von 40% Inhibition liegt. Lot 3 zeigt eine negative Hemmung, Lot 4 liegt bei einer Prozent-Inhibition von 10%. Ab 4 µg/ml ist die Prozent-Inhibition über 70% bei Lot 1, 2 und 4 von Protein 6 (L1-10). Lot 3 liegt bei 60% Inhibition. Bei einer Konzentration von 0,4 µg/ml sind alle Lots über einer Prozent-Inhibition von 70%.

4.11 Untersuchung von Protein 6 (L1-10) mit TSI positiven

Patientenseren im stimulierenden (TSI) Bioassay

In acht Versuchen wurden insgesamt 17 unterschiedlich niedrig (n), moderat (m) und hoch (h) TSI positive Patientenseren verwendet. Nähere Details zu den Patientenseren finden sich in Tabelle 8. Der jeweilige TSI Ausgangswert ist in den Diagrammen aufgeführt.

Abbildung 32 Versuch Nr. 1: Untersuchung von vier TSI positive Patientenseren (S1 – S4) mit Protein 6 (L1-10) Konz. 0,4 - 0,0004 µg/ml

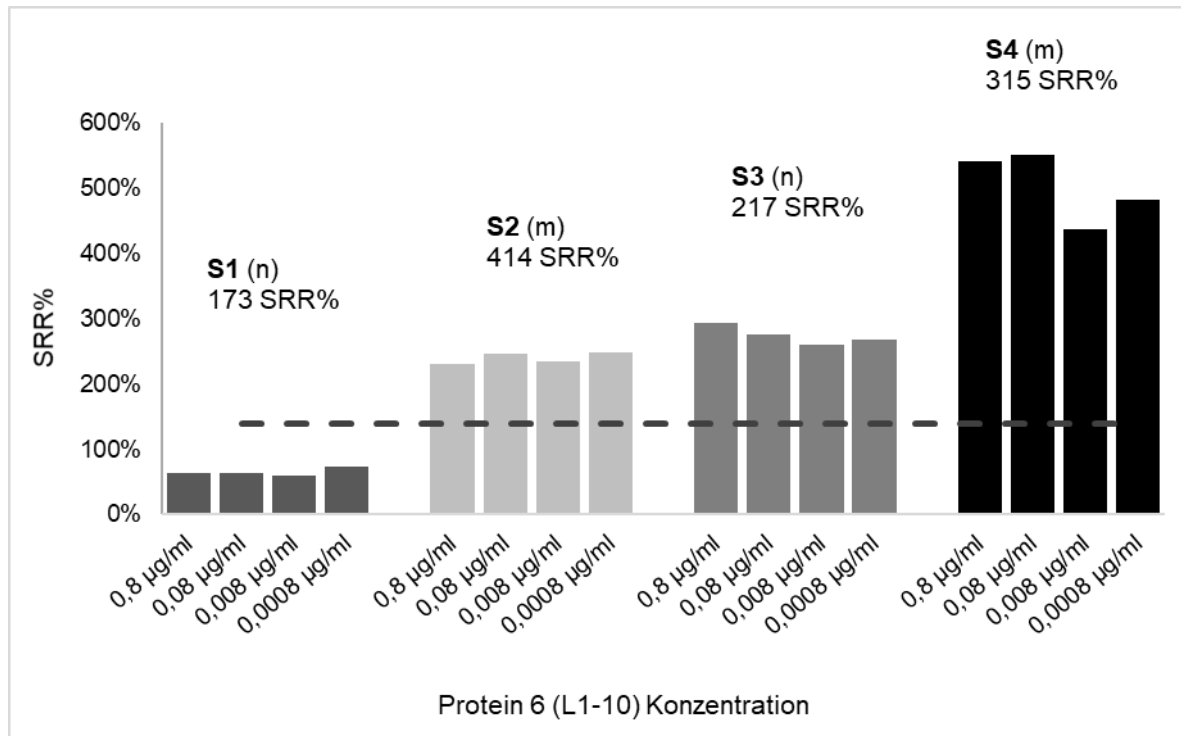


Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der vier verwendeten Seren (S1-4) mit Protein 6 (L1-10). Die Protein 6 Konzentration gibt die Konzentration vor Mischen von Protein 6 (L1-10) und Patientenserin wieder. Der cut-off des TSI Bioassay ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet.

Es wurden Patientenserin S1 (n), S2 (m), S3 (n) und S4 (m) mit verschiedenen Konzentrationen von Protein 6 (L1-10) im TSI Bioassay getestet. Auf der X-Achse stehen die verwendeten Konzentrationen von Protein 6 (L1-10), auf der Y-Achse steht die Höhe des gemessenen TSI Signals in SRR%. Alle TSI Werte von Patientenserin S1 liegen unter dem cut-off und haben ähnliche Werte im Bereich

von 59 - 70 SRR%. Die Seren S2-S4 liegen über dem cut-off. Die Werte bleiben konstant hoch und liegen für S2 von 231 - 249 SRR%, für S3 von 264 - 296 SRR% und für S4 von 478 - 545 SRR%. Die Ergebnisse für Protein 6 (L1-10) sind als negativ zu werten.

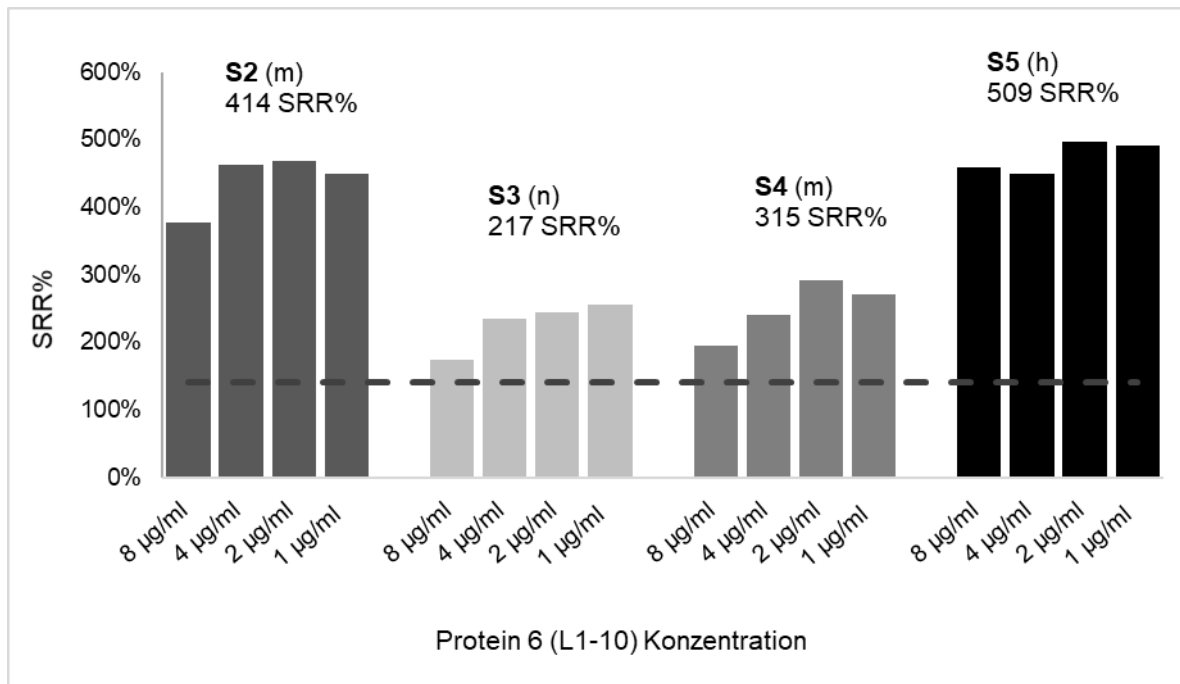
Abbildung 33 Versuch Nr. 2: Untersuchung von vier TSI positive Patientenserum (S1 - S4) mit Protein 6 (L1-10) Konzentrationen 0,8 - 0,0008 µg/ml im TSI Bioassay



Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der vier verwendeten Seren (S1 – S4) mit Protein 6 (L1-10). Die Protein 6 (L1-10) Konzentration gibt die Konzentration vor Mischen von Protein 6 und Patientenserum wieder. Der cut-off des TSI Bioassay ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet.

Es wurden Patientenserum S1 (n), S2 (m), S3 (n) und S4 (m) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Protein 6 (L1-10) im TSI Bioassay getestet. Auf der X-Achse stehen die verwendeten Konzentrationen von Protein 6 (L1-10), auf der Y-Achse steht die Höhe des gemessenen TSI Signals in SRR%. Alle Werte von Serum S1 liegen unter dem cut-off und haben ähnliche TSI Werte im Bereich von 60 - 74 SRR%. Die Serumproben S2-S4 liegen über dem cut-off. Die TSI Werte bleiben konstant hoch und liegen für S2 zwischen 230 und 249 SRR%, für S3 zwischen 260 und 294 SRR% und für S4 zwischen 438 und 551 SRR%. Die Ergebnisse für Protein 6 (L1-10) sind als negativ zu werten.

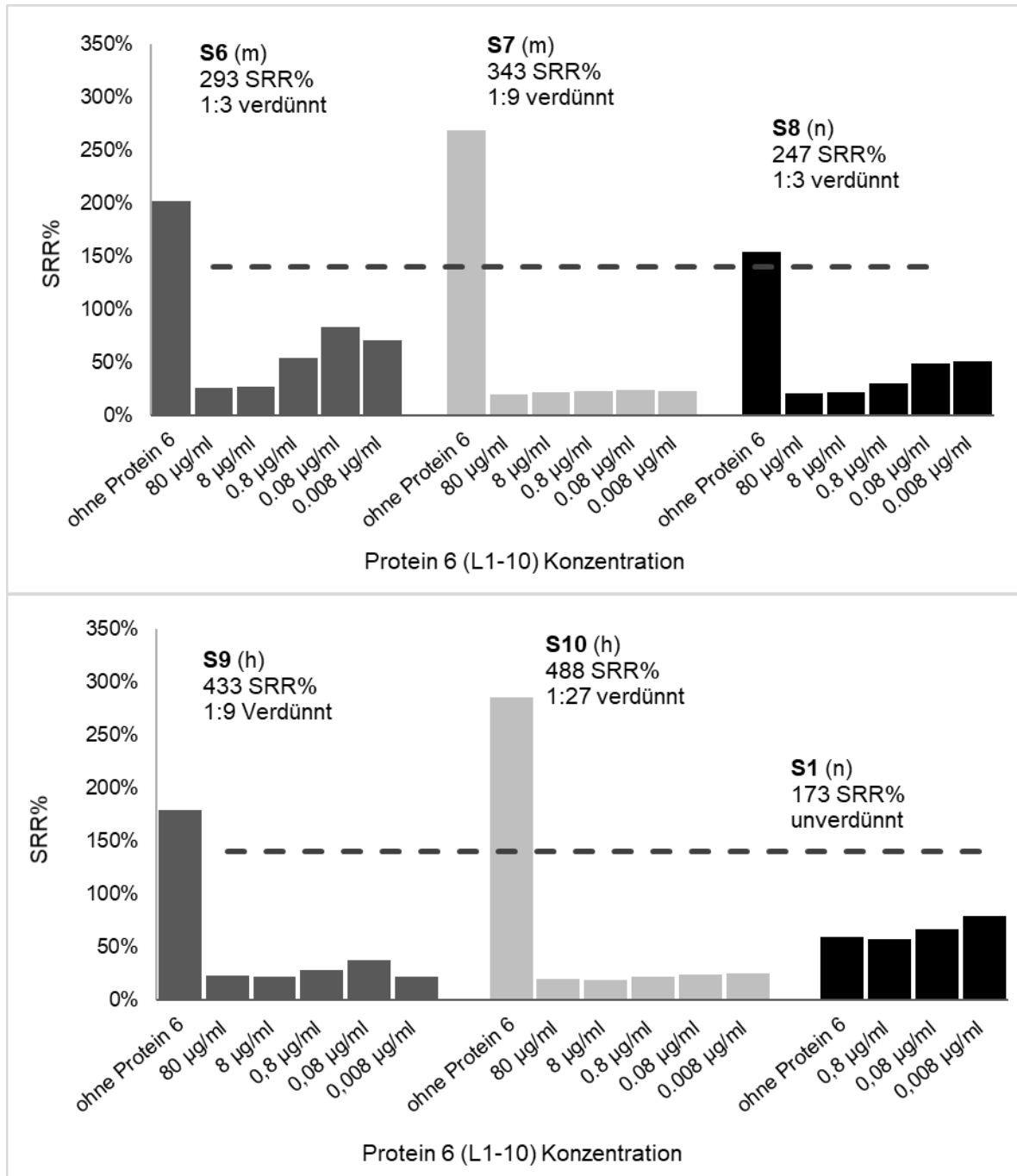
Abbildung 34 Versuch Nr. 3 Untersuchung von vier TSI positiven Patientenseren (S2 –S5) mit Protein 6 (L1-10) Konzentrationen 1 - 8 µg/ml im TSI Bioassay.



Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der vier verwendeten Seren (S2 – S5) mit Protein 6 (L1-10). Die Protein 6 (L1-10) Konzentration gibt die Konzentration vor Mischen von Protein 6 und Patientenserum wieder. Der cut-off des TSI Bioassay ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet.

Es wurden Patientenseren S2 (m), S3 (n), S4 (m) und S5 (h) im TSI Bioassay getestet mit verschiedenen Konzentrationen von Protein 6 (L1-10). Auf der X-Achse stehen die verwendeten Konzentrationen von Protein 6 (L1-10), auf der Y-Achse die Höhe der gemessenen TSI Werte in SRR%. Alle Daten liegen oberhalb des cut-offs von 140 SRR%. Die Proben von Serum S5 liegen in einem Bereich von 450 - 490 SRR%, S2 liegt bei 8 µg/ml bei 380 SRR%, die weiteren Werte liegen zwischen 450 und 470 SRR%. Die Werte von S3 liegen für 8 µg/ml bei 175 SRR%, die weiteren Konzentrationen 4 - 1µg/ml bei 235 - 250 SRR%. Die Werte von S4 sind bei einer Konzentration 8 µg/ml bei 194 SRR% und steigen bis 2 µg/ml auf 291 SRR%.

Abbildung 35 Versuch Nr. 4 Untersuchung von sechs TSI positiven Patientenseren (S1, S6 – S10) in festgelegten Verdünnungen ohne und mit Protein 6 (L1-10) Konzentrationen 80 - 0,008 µg/ml im TSI Bioassay



Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der sechs verwendeten Seren (S1, S6 – S10) mit Protein 6 (L1-10). Die Protein 6 (L1-10) Konzentration gibt die Konzentration vor Mischen von Protein 6 (L1-10) und Patientensermum wieder. Der cut-off des TSI Bioassay ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet.

Es wurden verschiedene Patientenseren S6 (m), S7 (m), S8 (n) S9 (h), S10 (h) und S1 (n) in unterschiedlicher Verdünnung im TSI Bioassay mit verschiedenen Konzentrationen von Protein 6 (L1-10) und ohne Protein 6 (L1-10) getestet. In Abwesenheit von Protein 6 (L1-10) liegt S6 bei 200 SRR%, S7 bei 269 SRR%, S8 bei 154 SRR%, S9 bei 180 SRR%, S10 bei 286 SRR% und S1 unterhalb des cut-offs von 140 SRR%. Die jeweilig untersuchten Proben mit Protein 6 (L1-10) liegen

unterhalb des cut-offs und dem zugehörigen Wert ohne Protein 6 (L1-10). Die Probe S6 zeigt einen leichten kontinuierlichen Anstieg bei Protein 6 (L1-10) Konzentrationen 8 bis 0,08 µg/ml von 20 auf 83 SRR%. S7 zeigt ein Plateau mit Werten von 19 - 24 SRR%. S8 liegt zunächst bei 20 SRR%, ab einer Protein 6 (L1-10) Konzentration von 0,8 µg/ml steigen die Werte leicht von 20 - 51 SRR% an. S9 zeigt ein Plateau mit Werten von 22 - 37 SRR%, S10 zeigt ebenfalls ein Plateau mit Werten von 20 - 25 SRR%. Alle Werte von S1 liegen im Bereich von 57 - 80 SRR%.

Abbildung 36 Versuch Nr. 5: Zwei unterschiedlich TSI positive Patientenserum (S7 und S10) mit absteigenden Verdünnungen ohne Protein 6 (L1-10) und mit festgelegter Protein 6 (L1-10) Konzentration von 40 µg/ml im TSI Bioassay im Vergleich

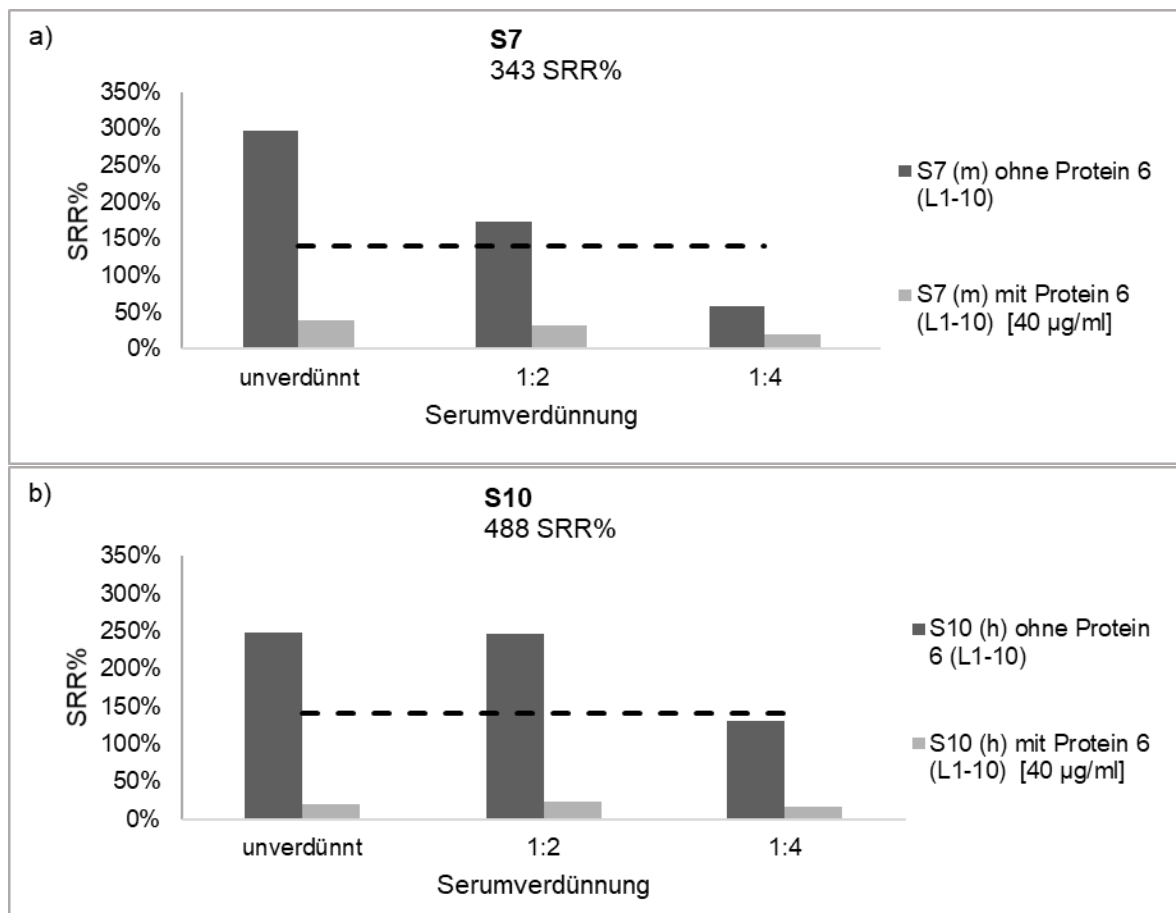
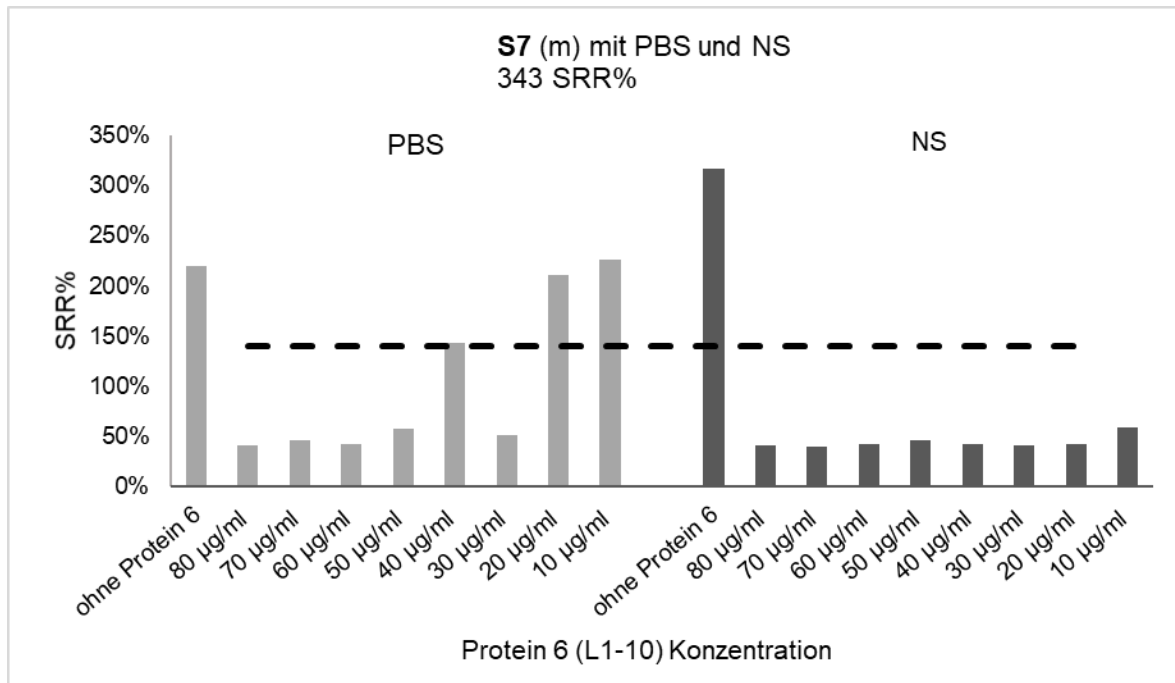


Abbildung 36 a) zeigt die Ergebnisse von S7 (m), Abbildung 36 b) von S10 (h) im TSI Bioassay ohne und mit Protein 6 (L1-10), die Protein 6 (L1-10) Konzentration von 40 µg/ml gibt die Konzentration vor Mischen von Protein 6 (L1-10) und Patientenserum wieder. Der cut-off des TSI Bioassay ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet

Es wurden Patientenserum S7 (m) und S10 (h) verwendet, die x-Achse gibt die Serumverdünnung an, die y-Achse die gemessenen TSI Werte in SRR%. Das Diagramm zeigt die Werte von S7 mit und ohne Protein 6 (L1-10) im Vergleich. Die TSI Werte nehmen kontinuierlich mit zunehmender Verdünnung ab und liegen im Bereich von 295 - 58 SRR%. Mit Protein 6 (L1-10) liegen die Werte konstant niedrig zwischen 20 - 40 SRR% und sind somit negativ.

Die Werte von S10 ohne Protein 6 (L1-10) liegen unverdünnt und bei 1:2 bei 245 SRR%, bei 1:4 fällt der Wert auf 131 SRR%. Mit Protein 6 (L1-10) liegen die Werte konstant niedrig zwischen 17 - 23 SRR%.

Abbildung 37 Versuch Nr. 6 S7 (m) mit Protein 6 (L1-10) Konzentration 80 - 10 µg/ml mit PBS und NS als Verdünnungsmittel im Vergleich

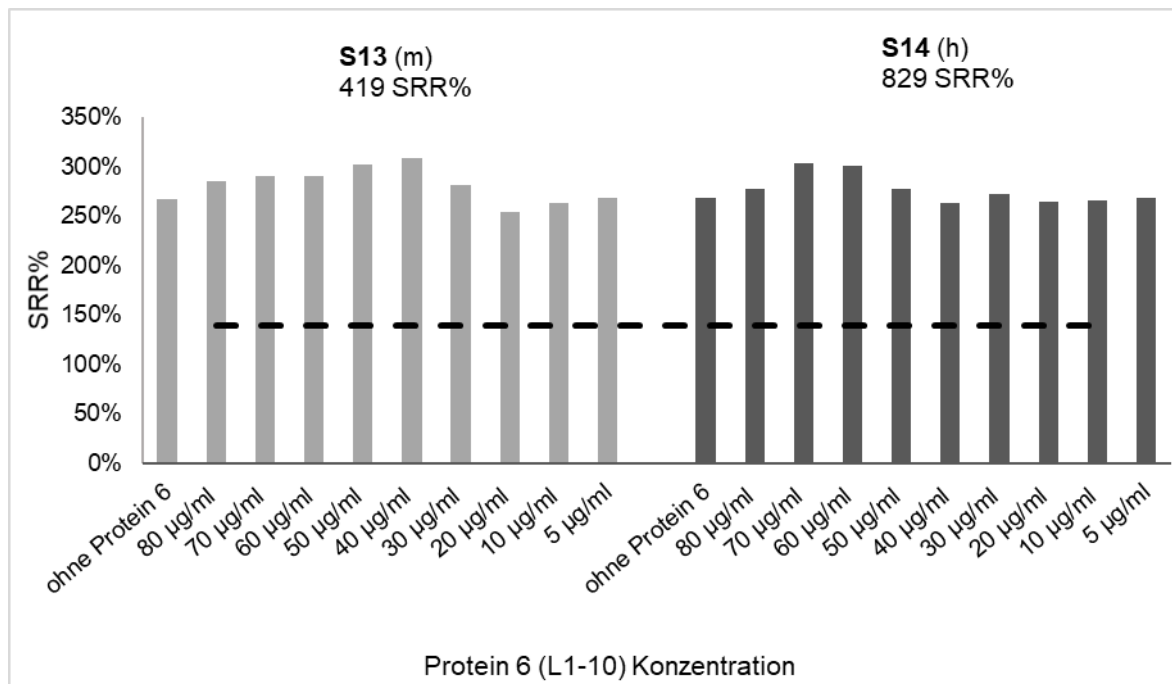


Vergleich der Ergebnisse von S7 (m) mit PBS und Normalserum (NS) als Verdünnungsmittel. Die Protein 6 (L1-10) Konzentrationen geben die Konzentrationen vor Mischen von Protein 6 (L1-10) mit Patientenserum wieder. Der cut-off des TSI Bioassays ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet.

Für diesen Versuch wurde S7 (m) verwendet. Das Diagramm zeigt die erzielten TSI Werte mit PBS und NS als Verdünnungsmittel. Auf der x-Achse sind die verwendeten Protein 6 (L1-10) Konzentrationen eingetragen, die y-Achse zeigt die TSI Werte in SRR%. Die Proben ohne Protein 6 (L1-10) liegen mit PBS bei 220 SRR%. Die weiteren TSI Werte mit Protein 6 (L1-10) Konzentration 80 - 50 liegen bei 40 - 60 SRR%. Ab 40 µg/ml bis 10 µg/ml ist ein Anstieg der TSI Werte zu erkennen von 58 - 227 SRR%, einzige Ausnahme ist die Probe mit einer Protein 6 (L1-10) Konzentration von 30 µg/ml. Diese liegt bei 51 SRR%. Die Probe für NS ohne Protein 6 (L1-10) liegt bei 317 SRR%. Die weiteren Proben mit Protein 6 (L1-10) liegen im Bereich von 40 - 60 SRR%.

Im Folgenden sind die Diagramme für Versuch Nr. 7 dargestellt. Es wurden TSI-positive Patientenserum S13 (m), S14 (h), S15 (h), S16 (m) und S17 (h) mit Konzentrationen von Protein 6 (L1-10) (80 - 5 µg/ml) und PBS als Verdünnungsmittel im stimulierenden (TSI) Bioassay gemessen. Auf der x-Achse stehen die verwendeten Protein 6 (L1-10) Konzentrationen, auf der y-Achse die gemessenen TSI Werte in SRR%.

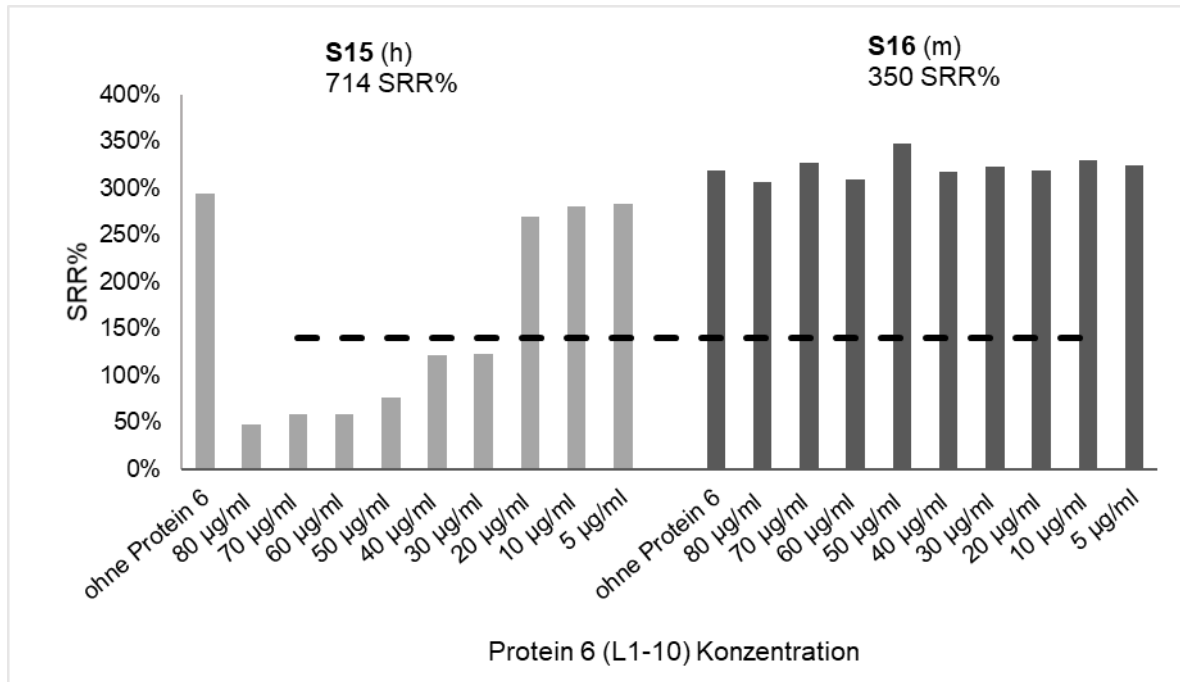
Abbildung 38 Versuch Nr. 7: S13 und S14 mit Protein 6 (L1-10) Konzentrationen 80 - 5 µg/ml und PBS als Verdünnungsmittel im TSI Bioassay



Vergleich der Ergebnisse von Serum S13 (m) und S14 (h) Die Protein 6 (L1-10) Konzentrationen geben die Konzentrationen vor Mischen von Protein 6 (L1-10) und Patientenserum wieder. Der cut-off des TSI Bioassays ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet.

Die gemessenen Werte für S13 (m) und S14 (h) liegen im Bereich der Probe ohne Protein 6 (L1-10). Die Probe S13 ohne Protein 6 (L1-10) liegt bei 270 SRR%, mit Protein 6 (L1-10) liegen die Werte im Bereich von 255 - 310 SRR%. S14 ohne Protein 6 (L1-10) liegt bei 270 SRR%, die Werte mit Protein 6 (L1-10) im Bereich von 265 - 305 SRR%.

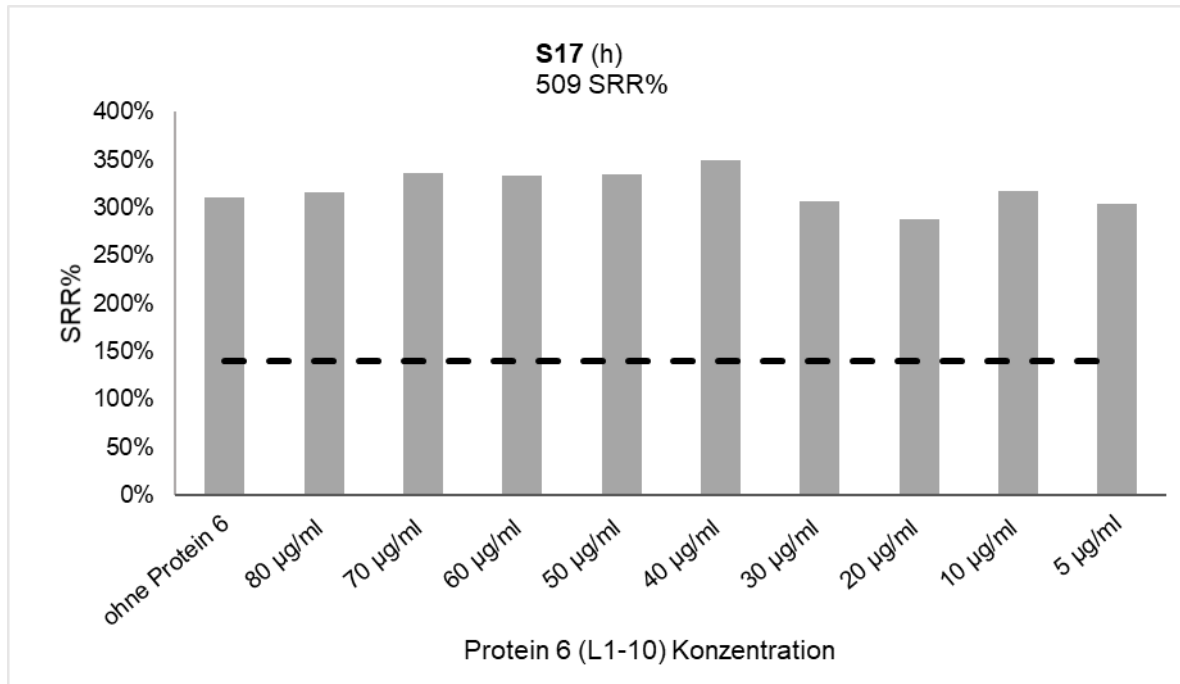
Abbildung 39 Versuch Nr. 7: S15 (h) und S16 (m) mit Protein 6 (L1-10) Konzentrationen 80 - 5 µg/ml und PBS als Verdünnungsmittel im TSI Bioassay



Vergleich der Ergebnisse von S15 (h) und S16 (m). Die Protein 6 (L1-10) Konzentrationen geben die Konzentrationen vor Mischen von Protein 6 (L1-10) und Patientenserum wieder. Der cut-off des TSI-Bioassays ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet.

Die Probe S15 (h) liegt ohne Protein 6 (L1-10) bei 295 SRR%, die Werte mit Protein 6 (L1-10) sind zunächst bei 50 - 75 SRR% bei den Konzentrationen 80 - 50 µg/ml. Von Konzentration 40 µg/ml bis 20 µg/ml steigen die TSI Wert von 75 auf 270 SRR% an, danach erreichen sie ein Plateau. Ohne Zugabe von Protein 6 (L1-10) liegt der Wert von Serum S16 (m) bei 320 SRR%, die Werte mit dem Protein 6 (L1-10) liegen im Bereich zwischen 305 und 350 SRR%.

Abbildung 40 Versuch Nr. 7: Serum S17 (h) mit Protein 6 (L1-10) (L1-10) Konzentrationen 80 - 5 µg/ml und PBS als Verdünnungsmittel im TSI Bioassay

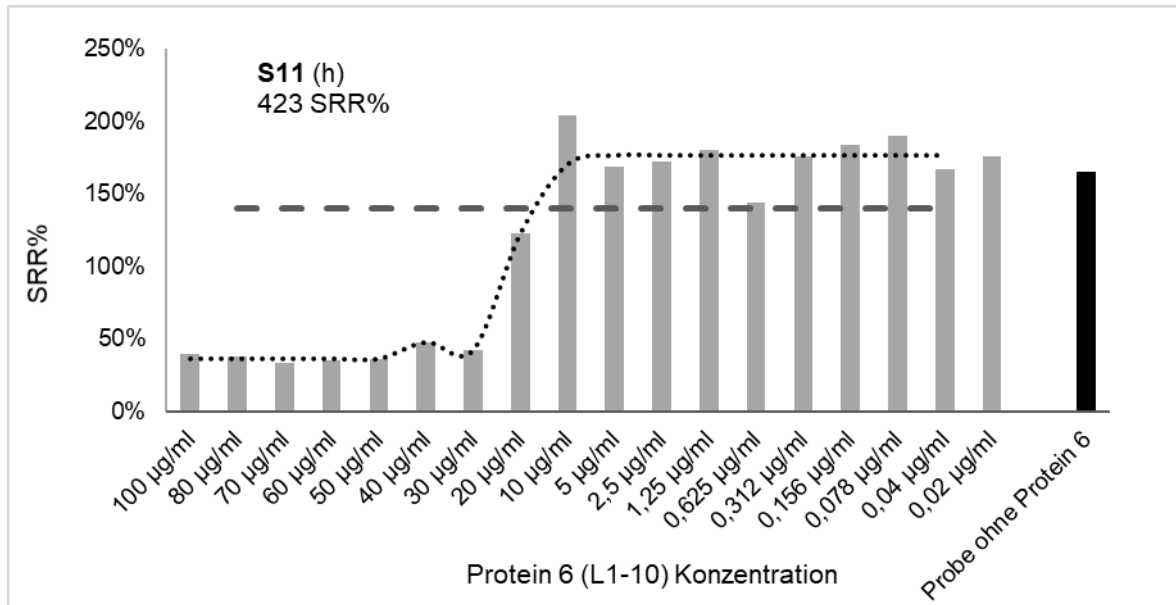


Ergebnisse der Serumprobe S17 (h). Die Protein 6 (L1-10) Konzentrationen geben die Konzentration vor Mischen von Protein 6 (L1-10) und dem Patientenserum wieder. Der cut-off des TSI Bioassays ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet.

Die Serumprobe S17 (h) ohne die Zugabe von Protein 6 (L1-10) liegt bei 310 SRR%, die weiteren TSI Werte mit dem Protein 6 (L1-10) liegen im Bereich zwischen 290 und 350 SRR%.

Im Folgenden sind die Ergebnisse für Versuch Nr. 8 dargestellt. Es wurden die Patientenserum S11 (h) und S12 (h) mit dem Protein 6 (L1-10) in Konzentration von 100 - 0,02 µg/ml und ohne Protein 6 (L1-10) im stimulierenden (TSI) Bioassay mit PBS als Verdünnungsmittel gemessen.

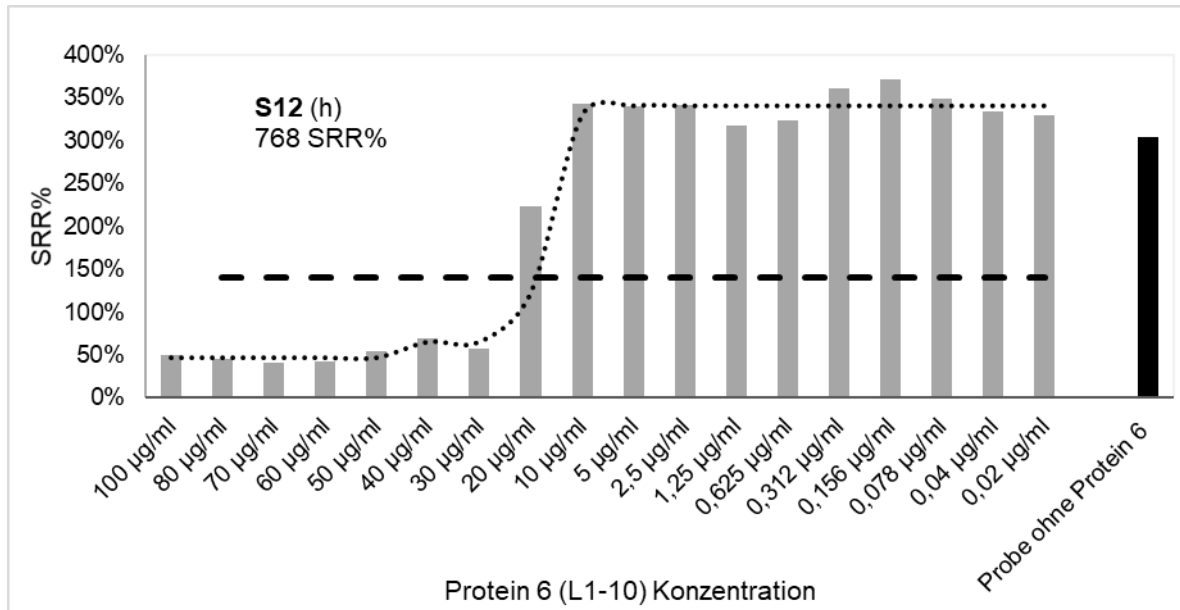
Abbildung 41 Versuch Nr. 8: Serum S11 (h) mit Protein 6 (L1-10) Konzentration 100 - 0,02 µg/ml und ohne Protein 6



Ergebnis von Versuch 8 mit der Serumprobe S11 (h). Die Protein 6 (L1-10) Konzentrationen geben die Konzentrationen vor Mischen von Protein 6 (L1-10) und dem Patientenserum wieder. Der cut-off des TSI Bioassays ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet. Eine Verlaufskurve der Daten mit Protein 6 (L1-10) ist als gepunktete Kurve in das Diagramm eingezeichnet.

Die Serumprobe S11 (h) ohne Zugabe von Protein 6 (L1-10) erreicht einen Wert von 165 SRR%, liegt damit oberhalb des TSI Bioassay cut-offs. Die Proben mit Protein 6 (L1-10) liegen bei den Konzentrationen 100 - 30 µg/ml im Bereich von 33 - 50 SRR%. Ab Konzentration 30 µg/ml bis 10 µg/ml steigen die Werte von 40 auf 204 SRR% an. Die TSI Werte für die Protein 6 (L1-10) Konzentrationen 10 - 0,02 µg/ml liegen zwischen 145 - 205 SRR% und sind in der Nähe der Probe ohne Protein 6 (L1-10).

Abbildung 42 Versuch Nr. 8: Die Probe S12 (h) mit Protein 6 (L1-10) Konzentration 100 - 0,02 µg/ml und ohne Protein 6.



Ergebnis von Versuch 8 mit Serumprobe S12 (h). Die Protein 6 (L1-10) Konzentrationen geben die Konzentrationen vor dem Mischen von Protein 6 (L1-10) und dem Patientenserum wieder. Der cut-off des TSI Bioassays ist als gestrichelte Linie bei 140 SRR% eingezeichnet. Eine Verlaufskurve der Daten mit Protein 6 (L1-10) ist als gepunktete Kurve in das Diagramm eingezeichnet.

Die Probe S12 (h) ohne Zugabe von Protein 6 (L1-10) erreicht einen TSI Wert von 304 SRR%. Die Proben mit Protein 6 (L1-10) liegen bei den Konzentrationen 100 - 30 µg/ml im Bereich von 40 - 70 SRR%. Ab Konzentration 30 µg/ml bis 10 µg/ml steigen die Werte von 40 auf 223 SRR% an. Die TSI Werte für die Protein 6 (L1-10) Konzentrationen 10 - 0,02 µg/ml liegen zwischen 318 - 341 SRR% und sind höher als die Probe ohne Protein 6 (L1-10).

5 Diskussion

5.1 Ergebnisdiskussion

Der MB und die HT gehören zu den häufigsten Autoimmunerkrankungen, weshalb eine gute Diagnostik und Behandlung wichtig ist, um die Erkrankung frühzeitig zu diagnostizieren, zu behandeln und somit Folgeschäden zu vermeiden. In den Leitlinien der amerikanischen und europäischen Schilddrüsengesellschaft über den Umgang von Patienten mit MB wird ein Erfassen der TSHR-Ak stark empfohlen. Dies führt zu einer genauen und schnellen Diagnose von MB. Im Vergleich zu anderen diagnostischen Werkzeugen, wie zum Beispiel einer Ultraschall Untersuchung und/oder einer Schilddrüsen Szintigraphie ist die Messung von Serum TSHR-Ak spezifischer und günstiger. Dies spiegelt den klinischen Nutzen und die Relevanz der TSHR-Ak wider und qualifiziert diese als zuverlässige Marker für MB (23). Ebenfalls ist es wichtig die Funktionalität der TSHR-Ak zu erfassen, um eine gezielte Therapie zu gewährleisten oder anzupassen. Aktuell stehen zellbasierte TSI- und TBI-Bioassays zur qualitativen Differenzierung der TSHR-Ak zu Verfügung, welche in diesem Projekt verwendet worden sind (23, 27, 28, 81). Das verwendete TSI Assay wurde weiterentwickelt und standardisiert. Dies ermöglicht eine Konvertierung der SRR% Werte in IU/L und vereinfacht somit das Vergleichen von gemessenen TSI-Werten in unterschiedlichen Laboratorien (82).

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, Peptid und/oder Protein Strukturen aus der LRD des TSHR zu finden, welche spezifisch entweder nur TSI oder TBI binden. Als Messinstrument wurden sowohl der TSI als auch der TBI Bioassay verwendet. Die gefundenen Peptide/Proteine sollten für zwei neue Bioassays verwendet werden, eines für das Messen von TSI und eines für das Messen von TBI. Insgesamt wurden neun Peptide und sechs Proteine untersucht. Für die Untersuchung der Peptide und Proteine sollten zunächst ein geeigneter TSI und ein geeigneter TBI gefunden werden und mittels Titration die EC50 beziehungsweise der IC50 Wert bestimmt werden. Die Verwendung von mAk ermöglichte eine Überprüfung des Bindungsverhaltens der Peptide und Proteine ohne den Einfluss von polyklonalem Patientenserum. Ein weiterer positiver Aspekt stellte die Wiederholbarkeit dar. Die getesteten mAk (M22, K1-18, K1-70, 5C9) sind zur Zeit die verfügbaren mAk, die eine hohe Affinität zum TSHR aufweisen (71). Beide stimulierenden mAk (M22; K1-18) zeigten im TSI Bioassay eine Dosis-Wirkungs-Kurve. Die Titration von M22 mAk wurde mindestens zweimal durchgeführt, um die

Reproduzierbarkeit der Werte zu testen. Die Titration von K1-18 wurde nicht wiederholt, da die Werte nach dem ersten Versuch nicht deutlich besser waren als die für M22 mAk. Als EC50 ergaben sich für M22 mAk 0,01 µg/ml für K1-18 0,0068 µg/ml. Beide Kurven haben einen ähnlichen Verlauf. Für die weiteren Versuche im TSI entschied man sich für M22 mAk, da dieser der stärkere Stimulator ist (71) und die Bindung von M22 mAk an die LRD kristallographisch bereits mit einer Auflösung von 2,55 Å nachgewiesen werden konnte (67). Diese zeigt Details über die beteiligten LRW der LRD und Bindungseigenschaften. Bezüglich des Komplexes aus K1-18 und der LRD gibt es zur Zeit nur Daten aus Mutationsstudien und Simulationen (70). Zusätzlich sind die Erfahrungswerte mit M22 mAk größer als mit K1-18 mAk. Im TBI Bioassay zeigten die K1-70 mAk und 5C9 mAk beide eine Dosis-Wirkungs-Kurve. Der IC50 Wert für K1-70 lag bei einer Konzentration von 0,222 µg/ml und für 5C9 bei 0,5 µg/ml. Für die weiteren Versuche wurde K1-70 mAk im TBI Bioassay festgelegt, aufgrund der geringen benötigten Konzentration und der besseren Effektivität (61). Die Bindung von K1-70 mAk konnte ebenfalls kristallographisch erfasst werden mit einer Auflösung von 1,9 Å (69). Dies gibt detaillierte Einblicke über die Bindungsstellen und die Bindungsarten. Die Erfahrungswerte für K1-70 mAk sind zudem höher als für 5C9 mAk. An die Sequenz der einzelnen Peptide wurden Biotin und Lysin angehängt. Biotin wurde verwendet, um das jeweilige Peptid zu stabilisieren und zu markieren. Es hat kaum Einfluss auf die biologische Aktivität (84). Lysin (K) wurde an die AS Sequenz der einzelnen Peptide angehängt, um eine bessere Löslichkeit zu gewährleisten. Die Sequenzen von Peptid 1-8 beinhalten jeweils drei zusammenhängende Schleifen der LRD. Die neunte Sequenz beinhaltet Sequenzen der TMD. Die untersuchten Peptide haben weder im TSI noch TBI Bioassay die Signal-Höhe der verwendeten mAk M22 und K1-70 beeinflusst. Es wurden keine Peptide identifiziert, die M22 oder K1-70 mAk binden. Weitere Untersuchungen der Peptide mit Patientenseren wurden nicht durchgeführt. Möglicherweise enthalten die verwendeten Peptide, bestehend aus drei zusammenhängenden LRW-Schleifen der LRD, zu wenig Epitope. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass durch die fehlenden Einflüsse der gesamten Bestandteile des TSHR die Abschnitt-Struktur der Peptide nicht der räumlichen Struktur der LRD des TSHR entspricht und dies somit zu einer Konformationsänderung der Epitope führt. Für die jeweiligen Sequenzen der sechs verwendeten rekombinanten Proteine wurde ein Maltose-Bindendes-Protein (MBP) als Fusionsprotein verwendet. MBP führt zu einer verbesserten Expression in der

Herstellung der Proteine. Als Protein-Affinitäts-Markierung wurde Twin-Strep-Tag® verwendet. MBP in Verbindung mit Twin-Strep-Tag® resultiert in einer verbesserten Aufreinigung des Proteins bei der Herstellung (85, 86). Nach der Fertigstellung wurden das MBP und das Twin-Strep-Tag® von dem jeweiligen rekombinanten Protein getrennt. Das Protein 1-4 beinhaltet jeweils mehrere Schleifen der LRD, Protein 5 beinhaltet die vollständige AS Sequenz der EZD und Protein 6 (L1-10) beinhaltet die Schleifen 1-10 der LRD. Protein 1-5 haben zu keiner Signalminderung von M22 mAk im TSI und K1-70 mAk im TBI Bioassay geführt. Protein 6 (L1-10) zeigte eine deutliche Minderung der Werte von M22 mAk von 90% im TSI Bioassay bei einer Konzentration von 40 µg/ml. Alle weiteren Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf M22 mAk. Das Protein 6 (L1-10) bindet M22 mAk bei Vorliegen einer bestimmten Konzentration. Im TBI Bioassay zeigte Protein 6 (L1-10) zunächst keine Minderung der Prozent-Inhibition von K1-70 mAk. Für die weiteren Versuche wurden drei Lots von Protein 6 (L1-10) zusätzlich hergestellt, um eine höhere Konzentration und Reinheit zu erhalten. Das Lot 4 wurde für die weiteren Versuche ausgewählt, da es auf M22 mAk im TSI Bioassay bis zu einer Konzentration von 0,2 µg/ml einen Einfluss hatte und von allen eingesetzten Lots die höchste Stock-Konzentration und Reinheit aufwies. Darüber hinaus zeigte das Lot 4 von Protein 6 (L1-10) eine Minderung der Prozent-Inhibition von K1-70 mAk im TBI Bioassay. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Protein 6 (L1-10) den blockierenden mAk K1-70 bindet. Es wurde kein Protein, welches spezifisch M22 mAk oder K1-70 mAk bindet, gefunden, dass das Protein 6 (L1-10), die Werte von M22 mAk im TSI und von K1-70 mAk im TBI Bioassay beeinflusst hat. Die beiden Lots 1 und 2 hatten im TBI Bioassay vermutlich aufgrund der geringeren Konzentration der Stock-Lösung und geringeren Reinheit keinen Einfluss auf K1-70 mAk. Das Protein 6 (L1-10) wurde mit 17 verschiedenen Patientenseren untersucht. Es zeigte mit Konzentrationen von 8 - 0,004 µg/ml bei den verwendeten Patientenseren in Versuch 1-3 keine Wirkung. Für die weiteren Versuche wurden bekannte Seren verwendet und in festgelegten Verdünnungen eingesetzt. In Verdünnungs-Studien wurde bereits die Abstufungen von 1:3, 1:9, 1:27 verwendet, diese eignen sich gut für die Verdünnung TSI positiver Patientenseren (87). Vor der Durchführung wurde der jeweilige TSI Wert des Patientenserums mit Hilfe des TSI Bioassays gemessen anhand dessen wurde dann die Verdünnung festgelegt. Alle gemessenen Konzentrationen mit dem Protein 6 (L1-10) lagen unterhalb des cut-offs und waren negativ im TSI Bioassay. Die Höhe der Werte ist vermutlich ein Zusammenspiel aus

der verwendeten Verdünnung und dem Protein 6 (L1-10), welches möglicherweise die restlichen Ak im Serum bindet. Jedoch sind auch die Proben mit sehr geringen Konzentrationen von Protein 6 (L1-10) negativ. Dies spricht dafür, dass die Verdünnung hauptverantwortlich für die Höhe der Werte ist. Darüber hinaus waren die verwendeten Seren mit Ausnahme von S1 und S10 als niedrig positiv einzustufen.

Die Proben S7 und S10 wurden für den Versuch 5 ausgewählt, da sie im Versuch zuvor die höchsten Ausgangswerte (ohne das Protein 6 (L1-10)) hatten. Als Verdünnungsmedium wurde PBS anstelle des zuvor verwendeten RP verwendet. In diesem Versuch wurde das Serum 1, 1:2, 1:4 verdünnt. Eine Konzentration von 40 µg/ml an Protein 6 (L1-10) wurde gewählt, um eine maximale Hemmung zu gewährleisten. Alle Proben wurden positiv für Protein 6 (L1-10) getestet. Die Verdünnung scheint nicht der Grund für die Abnahme der Werte zu sein, da alle Verdünnungen ohne Protein 6 (L1-10) deutlich oberhalb von den Verdünnungen mit Protein 6 (L1-10) lagen. Ein möglicher Faktor scheint PBS als Verdünnungsmittel zu sein. Im Versuch 6 wurden PBS und NS als Verdünnungsmedium verglichen. Von NS versprach man sich, dass es die Reaktion und Bindung der Ak mit Protein 6 (L1-10) unterstützt. Mit NS war die Probe ohne Protein 6 (L1-10) höher und die Inhibition mit Protein 6 (L1-10) stärker. PBS wurde als Verdünnungsmedium belassen, da es eine bessere Dosis-Wirkungs-Beziehung von Protein 6 (L1-10) zeigte. Derzeit gibt es keine Studien mit NS als Verdünnungsmedium für zellbasierte Bioassays. In Versuch 7 war lediglich das Patientenserum S15 positiv mit Protein 6 (L1-10) getestet worden. Abschließend wurden in Versuch 8 zwei Seren getestet mit PBS als Verdünnungsmittel, um eine Dosis-Wirkungskurve von Protein 6 (L1-10) zu erhalten. Beide Seren zeigten einen vergleichbaren Verlauf.

Für die Verwendung von Protein 6 (L1-10) mit Patientenseren lässt sich festhalten, dass sechs Seren positiv mit Protein 6 (L1-10) reagiert haben, jedoch oft keine Bindung der polyklonalen Ak aus den Seren mit dem Protein 6 (L1-10) messbar waren.

5.2 Stimulierende TSH Rezeptor Antikörper (TSI)

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass M22 mAk durch Protein 6 (L1-10) beeinflusst wird. Auf TSI positive Patientenseren zeigte Protein 6 (L1-10) ebenfalls bei einigen Seren eine messbare Wirkung. Essentiell für die Bindung von M22 mAk

an den TSHR sind die AS R80 (LRD Schleife drei), E107 (LRD Schleife vier), R109 (LRD Schleife vier), K129 (LRD Schleife fünf), K183 (LRD Schleife sieben), Y185 (LRD Schleife sieben) und R255 (LRD Schleife zehn) der LRD-Sequenz des TSHRs (71). Veränderungen dieser AS haben einen Einfluss auf die Bindung von M22 mAk an den TSHR (71). Darüber hinaus scheint besonders R255 für alle stimulierenden TSHR-Ak eine wichtige AS in der Sequenz zu sein (71). Die genannten AS und deren Position sind in der Sequenz von Protein 6 (L1-10) enthalten. Weitere interagierende AS der LRD mit M22 mAk verteilen sich auf die Schleifen 1-10. M22 mAk zeichnet sich durch eine sehr hohe Affinität zum TSHR und eine langsame Dissoziationsrate aus (67). Dies könnte begründen, warum Protein 6 (L1-10) zwar positiv mit M22 mAk getestet wurde, jedoch aber nicht vollständig mit Patientenseren. Möglicherweise waren die Bindungen zwischen den polyklonalen TSHR-Ak im Patientenserum und dem Protein 6 (L1-10) zu schwach, so dass diese nach kurzer Zeit wieder dissoziierten und zum Messzeitpunkt die Werte nicht sichtbar beeinflusst wurden. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Messung der Patientenseren ist das Serum selbst, da der Inhalt sehr variabel als auch komplex ist und potenziell Einfluss auf die Bindung der polyklonalen TSHR-Ak mit dem Protein 6 (L1-10) hat. Zum Ansetzen der M22 mAk Stocklösung wurde PBS verwendet und um die weiteren Verdünnungsstufen herzustellen RP. Somit wurde bei den Versuchen mit M22 mAk kein Serum eingesetzt und kann als zusätzlicher Einflussfaktor ausgeschlossen werden. Insgesamt sind die Bindungseigenschaften von TSI am TSHR noch nicht restlos geklärt.

5.3 Blockierende TSH Rezeptor Antikörper (TBI)

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Protein 6 (L1-10) bei einer hohen Konzentration die Werte von K1-70 mAk im TBI Bioassay beeinflussen kann. Als wichtigste AS für die Bindung von K1-70 mAk und dem TSHR in der LRD Sequenz wurden K58 (Schleife zwei), I60 (Schleife zwei), E61 (Schleife zwei), Y82 (Schleife drei), R109 (Schleife vier) und K183 (Schleife sieben) identifiziert (69). In der Kristallisierung von K1-70 mAk mit TSHR260 wurde gezeigt, dass K1-70 mit den Schleifen 1-8 der LRD interagiert (69). Diese sind im Protein 6 (L1-10) enthalten. Die hohe benötigte Konzentration könnte ein Hinweis für eine geringere Affinität von K1-70 mAk zu dem Protein 6 (L1-10) sein. Das Verhalten von Protein 6 (L1-10) mit TBI positiven Patientenseren müssen zukünftige Versuche zeigen.

5.4 Vergleich der Bindungsstellen von M22 und K1-70 mAk

Die Kristallisierung beider Ak im Komplex mit der TSHR-260, Mutationsstudien und Modellierung der Bindungen geben Details über die Bindung von Ak und TSH am TSHR. M22 und K1-70 mAk haben sehr ähnliche Bindungsstellen wie TSH, jedoch sind die Bindungen unterschiedlich. Beide mAk, M22 und K1-70 bilden mehr Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und weniger hydrophobe Wechselwirkungen als TSH mit dem TSHR (67, 69, 71). Dies könnte die hohe Affinität der beiden mAk an die TSH-Rezeptoren erklären, da die Bindungen stärker sind und somit die Dissoziation geringer ist. Des Weiteren ist auffällig, dass M22 mAk sehr ähnliche Bindungsstellen wie TSH hat. Beide binden an den Schleifen 1-10 der LRD. Dagegen interagiert K1-70 nicht mit den Schleifen 9 und 10 der LRD und besitzt lediglich eine Bindungsstelle in der Schleife 8. Zwischen M22 mAk und K1-70 mAk besteht dennoch eine große Überlappung. Beide interagieren mit den Schleifen 1 bis 7 der LRD. Von den herausgefundenen Bindungsstellen der LRD des TSHR interagieren 17 sowohl mit M22 mAk als auch mit K1-70 mAk (71). Die beschriebene Überlappung der Bindungsstellen stellt eine der Schwierigkeiten dar, eine geeignete Struktur (Protein/ Peptid/ Molekül) zu finden, welche spezifisch stimulierende oder blockierende Antikörper bindet. Ebenso ist es ein Erklärungsansatz, warum das Protein 6 (L1-10) sowohl M22 mAk als auch K1-70 mAk bindet, und somit nicht spezifisch mit TSI oder TBI interagiert, da in der Sequenz von Protein 6 LRD 1-10 enthalten sind.

2009 wurde in einer Studie von Rees Smith *et al.* die Interaktion von Fragment TSHR 260 (AS 22-260) mit M22 mAk, K1-70 mAk und Patientenseren getestet. Dieses Fragment besteht aus einer ähnlichen Sequenz wie Protein 6 (L1-10) und wurde für die Kristallisierung von M22 mAk und K1-70 mAk verwendet (88). Für den Versuch mit Fragment TSHR 260 wurde ein Bridge ELISA Ansatz eingesetzt. Auf einer ELISA Platte wurden zunächst Gesamt-TSHR mithilfe von C-Terminal gerichteten TSHR mAk gebunden. Dabei wurde eine geringe Flächendichte an TSHR verwendet, um eine monovalente Bindung von TSHR-Ak zu sichern. Anschließend wurden jeweils M22 mAk, K1-70 mAk und Patientenserum hinzugefügt. Nach dem Waschen der Platte wurde TSHR 260 mit gebundener Alkalischer-Phosphatase hinzugefügt. Die Bindung von TSHR 260 wurde durch Hinzufügen des Substrats P-Nitrophenyl Phosphat durch Messen bei einer Licht-Wellenlänge von 405 nm gemessen. M22 mAk und K1-70 mAk wurden beide mit

TSHR 260 positiv getestet. Weiter wurden 50 TSHR-Autoantikörper positive Patientenseren getestet. Diese wurden nicht nach TSI und TBI unterteilt. 48 Seren wurden positiv getestet. Als Kontrolle wurden 20 TSHR-Autoantikörper negative Patientenseren verwendet, die alle keine messbare Reaktion erzeugten. Die zwei negativen Seren wurden weiter untersucht. Sie inhibierten beide die Bindung von sowohl M22 mAk als auch TSH an TSHR 260. Dies zeigt, dass beide Seren Autoantikörper enthalten, welche jedoch nicht in der Lage sind, TSHR 260 divalent zu binden und eine Brücke zwischen dem immobilisierten TSHR auf der ELISA-Platte und TSHR 260 in der flüssigen Phase zu bilden. Die Autoren sehen eine mögliche Begründung darin, dass die Antikörper beider Seren der IgG4 Klasse angehören. Insgesamt wurde gezeigt, dass die Ergebnisse mit dem TSHR 260 ELISA sehr gut mit der Bindungs-Inhibition von TSH und M22 mAk am vollständigen TSHR korrelieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass stimulierende (M22) und blockierende (K1-70) mAk stark an TSHR 260 binden. Dies zeigt, dass die Epitope sowohl von TSI als auch TBI in der LRD des TSHR liegen und deren Bindungsstellen überlappen. Zusätzlich wurden fünf TSI positive und fünf TBI positive Seren im TSHR 260 ELISA positiv getestet. Dies ist ein weiteres Indiz für die LRD als Haupt-Epitop für TSI und TBI (88).

Eine ähnliche Sequenz wie TSHR 260 besitzt das Protein 6 (L1-10), welches die AS 20-275 beinhaltet. Der Unterschied besteht darin, dass Protein 6 (L1-10) die AS 261-275 des TSHR zusätzlich beinhaltet. In dem Versuchsansatz dieser Studie wurde das Bioassay als Messinstrument für die Bindung von Protein 6 (L1-10) verwendet. Sechs der eingesetzten 17 (35,3%) TSI positiven Patientenseren wurden positiv getestet. Eine mögliche Begründung für die geringere positiv getestete Anzahl an TSI positiven Patientenseren ist die unterschiedliche AS Sequenz. Möglicherweise kann es durch die 15 zusätzlichen AS im Protein 6 (L1-10) zu Strukturveränderungen des Proteins kommen, wodurch es zu Beeinflussung der Interaktion polyklonaler TSHR-Ak aus den Patientenseren mit Protein 6 (L1-10) kommt. Als Folge könnte ein Sinken der Affinität der polyklonalen Ak zu Protein 6 (L1-10) sein und eine Zunahme der Dissoziationsrate. Ein weiterer Einflussfaktor ist das patienteneigene Serum, welches die Bindung von Ak mit dem Protein 6 (L1-10) oder mit dem TSHR beeinflusst. In der Kristallisierung von M22 und K1-70 mAk gab es keine Hinweise auf eine Dimerisierung (Bindung von M22/K1-70 mAk an zwei TSHR 260 Fragmente), jedoch fungiert M22 mAk im ELISA Bridge Ansatz als

Brücke zwischen dem gebundenen TSHR (in voller Länge) und dem Fragment TSHR 260 (67, 69, 88). Es ist nicht auszuschließen, dass im Bioassay Ansatz, Ak sowohl Protein 6 (L1-10) als auch den TSHR an der Oberfläche der CHO MC4 Zellen gebunden haben. Dadurch würde es zu keiner Minderung des Signals kommen.

5.5 Weitere Epitope außerhalb der LRD

Das Wissen über die vollständige Struktur des TSHR mit LRD, TMD, GR und deren Ausrichtung zueinander würde helfen das Binden von Liganden und Ak besser zu verstehen. Dies könnte dazu beitragen, die Aktivierung des Rezeptors besser zu erklären. Durch Fehlen der vollständigen Kristallisierung des TSHR müssen andere Methoden angewandt werden, die Struktur und die Epitope zu ergründen (89). Die beiden Kristallisierungen geben zurzeit die meisten Hinweise auf die Epitope von M22 und K1-70 mAk am TSHR. Für die Kristallisierung wurde das Fragment TSHR 260 verwendet, welches die AS 22-260 beinhaltet. Dies zeigt die Bindungen innerhalb der LRD des TSHR. Die LRD ist unzweifelhaft einer der Hauptbindungsorte von TSH und Ak am TSHR (65, 67, 69, 71, 89). Darüber hinaus gibt es Hinweise über Epitope, die sich außerhalb der LRD in der GR befinden. Diese Region wird von den AS 289-409 gebildet und beinhaltet die SR von AS 316-366 (90, 91). Die Forschungsgruppe um Morshed hat für die Untersuchung der Epitope am TSHR Massenspektroskopie verwendet. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es auch außerhalb der LRD in der GR Epitope gibt, an denen stimulierende als auch blockierende TSHR-Ak binden (59). Für M22 mAk wurden neben LRW 1-5,7 auch die N-Terminale Cystein-Gruppe der EZD und ein großer Teil der GR von den AS 263-291 als Epitop ausgemacht. Neben M22 mAk wurde ein weiterer mAk (MS-1) -vom Hamster stammend- getestet. Dieser bindet an LRW 1,4,7,8,9 und ebenfalls an Teilen des N-terminalen Endes und an der GR (89). Diese Analyse zeigt, dass die Epitope innerhalb der LRD variieren, jedoch am N-terminalen Ende und an der GR überlappen. Für einen blockierenden mAk vom Hamster (Tab-8) konnte gezeigt werden, dass Epitope sich ebenfalls N-Terminal als auch in der GR befinden. Zu kritisieren bleibt, dass in der Analyse kein humaner mAk wie etwa K1-70 verwendet wurde, jedoch kann es als möglichen Hinweis gedeutet werden, dass sich Epitope von blockierenden Ak ebenfalls außerhalb der LRD wiederfinden (89).

5.6 Weiter Epitope von monoklonalen TSHR-Antikörpern

Derzeit gibt es keine weitere Kristallographie von mAk gebunden an TSHR 260. Die Epitope von K1-18 mAk und 5C9 mAk wurden durch Analyse des elektrostatischen Oberflächenpotentials von TSHR und K1-18/5C9 mAk vorhergesagt und durch Mutationsstudien weiter validiert (70). Durch Mutationen wurde gezeigt, dass die stimulierende Wirkung reduziert wurde. Eine mögliche Schwierigkeit an Mutationsstudien ist, dass es durch die Sequenzveränderung auch zu strukturellen Veränderungen des Rezeptors kommen kann. Dies könnte möglicherweise Auswirkungen auf die Struktur oder Ausrichtung der vom TSHR gebildeten Konformationsepitope haben und ebenfalls Grund für eine abgeschwächte Bindung am Rezeptor sein. Dies erschwert die Interpretation von punktuellen Mutationen (89).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Analysen die LRD als Hauptbindungsregion von TSHR-Ak bestätigen. Darüber hinaus sind Epitope von der Ausrichtung des Proteins abhängig und durch Veränderungen in der Sequenz anfällig.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Peptid und/oder ein Protein zu identifizieren, welches spezifisch nur TSI oder nur TBI aus entweder TSI positiven oder TBI positiven Patientenseren bindet. Als Messinstrument wurde ein zell-basiertes TSI- und TBI Bioassay verwendet. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zunächst Titrationen von M22, K1-18, 5C9 und K1-70 mAk in dem jeweiligen zell-basierten Assay durchgeführt. Es ergab sich ein EC50 Wert für M22 mAk von 11 ng/ml, für K1-18 mAk von 6,8 ng/ml und ein IC50 Wert für K1-70 mAk von 194,5 ng/ml, für 5C9 mAk von 609,9 ng/ml. Für alle weiteren Versuche wurden M22 mAk (rein stimulierend) und K1-70 (rein blockierend) mAk ausgewählt. Von den neun Peptiden und sechs untersuchten Proteinen wurde Protein 6 (L1-10) positiv für M22 mAk und K1-70 mAk getestet. Das Protein 6 (L1-10) wurde mit 17 TSI positiven Patientenseren untersucht. Insgesamt wurden acht Versuchsansätze durchgeführt. Es wurden sechs Patientenseren (S7, S10, S11, S12, S15, S17) positiv getestet. Es lässt sich zusammenfassen, dass weder ein Peptid noch ein Protein gefunden werden konnte, welches spezifisch nur M22 mAk oder nur K1-70 mAk bindet. Das Protein 6 (L1-10) zeigt positive Ergebnisse mit M22 und K1-70 mAk. Zusätzlich zeigt das Protein 6 (L1-10) mit einigen TSI positiven Patientenseren eine messbare Reaktion. Es konnte jedoch keine zuverlässige Bindung mit polyklonalen stimulierenden TSHR-Ak nachgewiesen werden. Um zukünftig bessere Ergebnisse zu erzielen, könnten sich weiterführende experimentelle Studien mit der optimalen Protein 6 (L1-10) Konzentration, der Untersuchung verschiedener Verdünnungsmittel zur Unterstützung/Stabilisierung der Bindungen und Optimierung des Messzeitpunktes befassen. Des Weiteren ist die Untersuchung von Protein 6 (L1-10) mit TBI positiven Patientenseren noch ausstehend.

6 Anhang

Table 5. *The One-Letter Symbols*

One-letter symbol	Three-letter symbol	Amino acid
A	Ala	alanine
B	Asx	aspartic acid or asparagine
C	Cys	cysteine
D	Asp	aspartic acid
E	Glu	glutamic acid
F	Phe	phenylalanine
G	Gly	glycine
H	His	histidine
I	Ile	isoleucine
K	Lys	lysine
L	Leu	leucine
M	Met	methionine
N	Asn	asparagine
P	Pro	proline
Q	Gln	glutamine
R	Arg	arginine
S	Ser	serine
T	Thr	threonine
V	Val	valine
W	Trp	tryptophan
X	Xaa	unknown or 'other' amino acid
Y	Tyr	tyrosine
Z	Glx	glutamic acid or glutamine (or substances such as 4-carboxyglutamic acid and 5-oxoproline that yield glutamic acid on acid hydrolysis of peptides)

Anhang 1

Sequenz des humanen TSHR (1-764)

10 20 30 40 50
MRPADLLQLV LLLDLPRDLG GMGCSSPPCE CHQEEDFRVT CKDIQRIPSL

60 70 80 90 100
PPSTQTLKLI ETHLRTIPSH AFSNLPNISR IYVSIDVTLQ QLESHSFYNL

110 120 130 140 150
SKVTHIEIRN TRNLTYIDPD ALKELPLLKF LGIFNTGLKM FPDLTKVYST

160 170 180 190 200
DIFFILEITD NPYMTSIPVN AFQGLCNETL TLKLYNNGFT SVQGYAFNGT

210 220 230 240 250
KLDVAVLNKN KYLTVIDKDA FGGVYSGPSL LDVSQTSVTA LPSKGLEHLK

260 270 280 290 300
ELIARNTWTL KKLPLSLSFL HLTRADLSYP SHCCAFKNQK KIRGILESML

310 320 330 340 350
CNESSMQSLR QRKSVNALNS PLHQEYEENL GDSIVGYKEK SKFQDTHNNA

360 370 380 390 400
HYYVFFEEQE DEIIGFGQEL KNPQEETLQA FDSHYDY TIC GSEDMVCTP

410 420 430 440 450
KSDEFNPCED IMGYKFLRIV VWFVSL LALL GNVFVLLILL TSHYKLVNPR

460 470 480 490 500
FLMCNLAFAD FCMGMYLLLI ASVDLYTHSE YYNHAIDWQT GPGCNTAGFF

510 520 530 540 550
TVFASELSVY TLTVITLERW YAITFAMRLD RKIRLRHACA IMVGGWVCCF

560 570 580 590 600
LLALLPLVGI SSYAKVSICL PMDTETPLAL AYIVFVLT LN IVAFVIVCCC

610 620 630 640 650
YVKIYITVRN PQYNPGDKDT KIAKRMAVLI FTDFICMAPI SFYALSAILN

660 670 680 690 700
KPLITVSNSK ILLVLFYPLN SCANPFLYAI FTKAFQRDVF ILLSKFGICK

710 720 730 740 750
RQAQAYRGQR VPPKNSTDIQ VQKVTHDMRQ GLHNMEDVYE LIENSHLTPK

760
KQGQISEEYM QTVL

Quelle: <https://www.uniprot.org/uniprot/P16473#structure> (17.10.19)

Übersicht der Peptide

ITEM	PEPTIDE SEQUENCE DESCRIPTION
>L1-3	Biotin-gg-PPCE CHQEEDFRVT CKDIQRIPSL PPSTQTLKLI ETHLRTIPSH AFSNLPNISR IYVSIDVTLQ QL-KKK
>L2-4	Biotin-gg-KKK-SL PPSTQTLKLI ETHLRTIPSH AFSNLPNISR IYVSIDVTLQ QLESHSFYNL SKVTHIEIRN TRNLTYI-KKK
>L3-5	Biotin-gg-KKKKK-NLPNISR IYVSIDVTLQ QLESHSFYNL SKVTHIEIRN TRNLTYIDPD ALKELPLLKF LGIFNTGLKM
>L4-6	Biotin-gg-NL SKVTHIEIRN TRNLTYIDPD ALKELPLLKF LGIFNTGLKM FPDLTKVYST DIFFILEITD NPYMTSI-KKK
>L5-7	Biotin-gg-KKK-LKELPLLKF LGIFNTGLKM FPDLTKVYST DIFFILEITD NPYMTSIPVN AFQGLCNETL TLKLYNNGFT SVQG-KKKKKK
>L6-8	Biotin-gg-KKK-VYST DIFFILEITD NPYMTSIPVN AFQGLCNETL TLKLYNNGFT SVQGYAFNGT KLDVYLNKN KYLTV-KKKKKK
>L7-9	Biotin-gg-KKK-QGLCNETL TLKLYNNGFT SVQGYAFNGT KLDVYLNKN KYLTVIDKDA FGGVYSGPSL LDVSQTSVTA LP- KKKKKK
>L8-10	Biotin-gg-FNGT KLDVYLNKN KYLTVIDKDA FGGVYSGPSL LDVSQTSVTA LPSKGLEHLK ELIARNTWTL KK
9 th peptide	Biotin-gg- kkk -DLYTHSE YYNHAIDWQT GPGC-gg-SSYAKVSICL PMDTETPLAL-gg-NKPLITVSNSK- kkk

7 Literaturverzeichnis

1. Simmonds MJ, Gough SC. Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond. *Clin Exp Immunol*. 2004;136(1):1-10.
2. Braverman LE, Utiger RD. Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. 9th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
3. Allelein S, Feldkamp J, Schott M. Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen. *Der Internist*. 2017;58(1):47-58.
4. Orgiazzi J. Thyroid autoimmunity. *La Presse Médicale*. 2012;41(12, Part 2):e611-e25.
5. Weetman AP. Diseases associated with thyroid autoimmunity: explanations for the expanding spectrum. *Clinical Endocrinology*. 2011;74(4):411-8.
6. Fröhlich E, Wahl R. Thyroid Autoimmunity: Role of Anti-thyroid Antibodies in Thyroid and Extra-Thyroidal Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2017;8(521).
7. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmunity Reviews*. 2015;14(2):174-80.
8. Tomer Y, Huber A. The etiology of autoimmune thyroid disease: A story of genes and environment. *Journal of Autoimmunity*. 2009;32(3):231-9.
9. Kahaly GJ, Diana T, Glang J, Kanitz M, Pitz S, König J. Thyroid Stimulating Antibodies Are Highly Prevalent in Hashimoto's Thyroiditis and Associated Orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(5):1998-2004.
10. Ajjan RA, Weetman AP. The Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis: Further Developments in our Understanding. *Horm Metab Res*. 2015;47(10):702-10.
11. Göring HD. Dr. med. Carl Adolph von Basedow – berühmter Arzt und Spross einer angesehenen Familie. *Akt Dermatol*. 2014;40(06):244-50.
12. Vanderpump MPJ. The epidemiology of thyroid disease. *British Medical Bulletin*. 2011;99(1):39-51.
13. Hussain YS, Hookham JC, Allahabadia A, Balasubramanian SP. Epidemiology, management and outcomes of Graves' disease—real life data. *Endocrine*. 2017;56(3):568-78.
14. Smith TJ, Hegedüs L. Graves' Disease. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(16):1552-65.
15. Menconi F, Marcocci C, Marinò M. Diagnosis and classification of Graves' disease. *Autoimmunity Reviews*. 2014;13(4):398-402.
16. Bahn RS. Graves' Ophthalmopathy. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(8):726-38.
17. Kahaly GJ, Bartalena L, Hegedüs L, Leenhardt L, Poppe K, Pearce SH. 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism. *European Thyroid Journal*. 2018;7(4):167-86.
18. Diana T, Olivo PD, Kahaly GJ. Thyrotropin Receptor Blocking Antibodies. *Horm Metab Res*. 2018;50(12):853-62.
19. Smith BR, Sanders J, Furmaniak J. TSH Receptor Antibodies. *Thyroid*. 2007;17(10):923-38.
20. Kahaly GJ, Diana T, Olivo PD. TSH RECEPTOR ANTIBODIES: RELEVANCE & UTILITY. *Endocr Pract*. 2020;26(1):97-106.
21. Diana T, Wüster C, Kanitz M, Kahaly GJ. Highly variable sensitivity of five binding and two bio-assays for TSH-receptor antibodies. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2016;39(10):1159-65.

22. Diana T, Wüster C, Olivo PD, Unterrainer A, König J, Kanitz M, et al. Performance and specificity of 6 immunoassays for TSH receptor antibodies: a multicenter study. *European thyroid journal*. 2017;6(5):243-9.
23. Allelein S, Diana T, Ehlers M, Kanitz M, Hermsen D, Schott M, et al. Comparison of a Bridge Immunoassay with Two Bioassays for Thyrotropin Receptor Antibody Detection and Differentiation. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2019;51(6):341-6.
24. Kahaly GJ, Diana T, Kanitz M, Frommer L, Olivo PD. Prospective Trial of Functional Thyrotropin Receptor Antibodies in Graves Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(4):e1006-14.
25. Barbesino G, Tomer Y. Clinical Utility of TSH Receptor Antibodies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(6):2247-55.
26. Evans C, Morgenthaler NG, Lee S, Llewellyn DH, Clifton-Bligh R, John R, et al. Development of a luminescent bioassay for thyroid stimulating antibodies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(1):374-7.
27. Li Y, Kim J, Diana T, Klasen R, Olivo PD, Kahaly GJ. A novel bioassay for anti-thyrotrophin receptor autoantibodies detects both thyroid-blocking and stimulating activity. *Clinical & Experimental Immunology*. 2013;173(3):390-7.
28. Diana T, Li Y, Olivo PD, Lackner KJ, Kim H, Kanitz M, et al. Analytical performance and validation of a bioassay for thyroid-blocking antibodies. *Thyroid*. 2016;26(5):734-40.
29. Diana T, Krause J, Olivo PD, König J, Kanitz M, Decallonne B, et al. Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol*. 2017;189(3):304-9.
30. Caturegli P, Remigis AD, Chuang K, Dembele M, Iwama A, Iwama S. Hashimoto's Thyroiditis: Celebrating the Centennial Through the Lens of the Johns Hopkins Hospital Surgical Pathology Records. *Thyroid*. 2013;23(2):142-50.
31. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria. *Autoimmunity Reviews*. 2014;13(4):391-7.
32. Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(26):2646-55.
33. Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. *The Lancet*. 2017;390(10101):1550-62.
34. Jameson JL, Mandel SJ, Weetman AP. *Harrisons Innere Medizin: Erkrankungen der Schilddrüse* 2016.
35. McKee A, Peyerl F. TSI assay utilization: impact on costs of Graves' hyperthyroidism diagnosis. *Am J Manag Care*. 2012;18(1):e1-14.
36. Kotwal A, Stan M. Thyrotropin Receptor Antibodies—An Overview. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*. 2018;34(4S):S20-S7.
37. Kamijo K, Murayama H, Uzu T, Togashi K, Olivo PD, Kahaly GJ. Similar clinical performance of a novel chimeric thyroid-stimulating hormone receptor bioassay and an automated thyroid-stimulating hormone receptor binding assay in Graves' disease. *Thyroid*. 2011;21(12):1295-9.
38. Kampmann E, Diana T, Kanitz M, Hoppe D, Kahaly GJ. Thyroid Stimulating but Not Blocking Autoantibodies Are Highly Prevalent in Severe and Active Thyroid-Associated Orbitopathy: A Prospective Study. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:678194-.
39. Kahaly GJ, Wüster C, Olivo PD, Diana T. High Titers of Thyrotropin Receptor Antibodies Are Associated With Orbitopathy in Patients With Graves Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(7):2561-8.

40. Ponto KA, Diana T, Binder H, Matheis N, Pitz S, Pfeiffer N, et al. Thyroid-stimulating immunoglobulins indicate the onset of dysthyroid optic neuropathy. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(7):769-77.
41. Piantanida E, Tanda ML, Lai A, Sassi L, Bartalena L. Prevalence and natural history of Graves' orbitopathy in the XXI century. *J Endocrinol Invest.* 2013;36(6):444-9.
42. Kiefer FW, Klebermass-Schrehof K, Steiner M, Worda C, Kasprian G, Diana T, et al. Fetal/Neonatal Thyrotoxicosis in a Newborn From a Hypothyroid Woman With Hashimoto Thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(1):6-9.
43. Léger J, Carel JC. Hyperthyroidism in childhood: causes, when and how to treat. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2013;5 Suppl 1(Suppl 1):50-6.
44. Diana T, Brown RS, Bossowski A, Segni M, Niedziela M, König J, et al. Clinical relevance of thyroid-stimulating autoantibodies in pediatric graves' disease-a multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):1648-55.
45. Sanders J, Oda Y, Roberts SA, Maruyama M, Furmaniak J, Smith BR. Understanding the thyrotropin receptor function-structure relationship. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1997;11(3):451-79.
46. Pastan I, Roth J, Macchia V. Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1966;56(6):1802.
47. Amir SM, Carraway TF, Jr., Kohn LD, Winand RJ. The binding of thyrotropin to isolated bovine thyroid plasma membranes. *J Biol Chem.* 1973;248(11):4092-100.
48. Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P, Rapoport B. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1989;165(3):1184-90.
49. Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, et al. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science.* 1989;246(4937):1620.
50. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology.* 2003;63(6):1256-72.
51. Hsu SY, Kudo M, Chen T, Nakabayashi K, Bhalla A, van der Spek PJ, et al. The Three Subfamilies of Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptors (LGR): Identification of LGR6 and LGR7 and the Signaling Mechanism for LGR7. *Molecular Endocrinology.* 2000;14(8):1257-71.
52. Kleinau G, Worth CL, Kreuchwig A, Biebermann H, Marcinkowski P, Scheerer P, et al. Structural-Functional Features of the Thyrotropin Receptor: A Class A G-Protein-Coupled Receptor at Work. *Frontiers in Endocrinology.* 2017;8(86).
53. Davies T, Marians R, Latif R. The TSH receptor reveals itself. *The Journal of Clinical Investigation.* 2002;110(2):161-4.
54. Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends in biochemical sciences.* 1994;19(10):415-21.
55. Kleinau G, Krause G. Thyrotropin and Homologous Glycoprotein Hormone Receptors: Structural and Functional Aspects of Extracellular Signaling Mechanisms. *Endocrine Reviews.* 2009;30(2):133-51.
56. Michalek K, Morshed SA, Latif R, Davies TF. TSH receptor autoantibodies. *Autoimmunity Reviews.* 2009;9(2):113-6.
57. Vassart G, Pardo L, Costagliola S. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(3):119-26.

58. Nunez Miguel R, Sanders J, Furmaniak J, Smith BR. Structure and activation of the TSH receptor transmembrane domain. *Auto Immun Highlights*. 2017;8(1):2.
59. Morshed SA, Davies TF. Graves' Disease Mechanisms: The Role of Stimulating, Blocking, and Cleavage Region TSH Receptor Antibodies. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2015;47(10):727-34.
60. Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J. Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocr Rev*. 1988;9(1):106-21.
61. Furmaniak J, Sanders J, Rees Smith B. Blocking type TSH receptor antibodies. *Auto- immunity highlights*. 2012;4(1):11-26.
62. Sanders J, Núñez Miguel R, Furmaniak J, Rees Smith B. Chapter Twenty-Two - TSH Receptor Monoclonal Antibodies with Agonist, Antagonist, and Inverse Agonist Activities. In: Conn PM, editor. *Methods in Enzymology*. 485: Academic Press; 2010. p. 393-420.
63. Ando T, Latif R, Daniel S, Eguchi K, Davies TF. Dissecting Linear and Conformational Epitopes on the Native Thyrotropin Receptor. *Endocrinology*. 2004;145(11):5185-93.
64. Morshed SA, Ando T, Latif R, Davies TF. Neutral Antibodies to the TSH Receptor Are Present in Graves' Disease and Regulate Selective Signaling Cascades. *Endocrinology*. 2010;151(11):5537-49.
65. Miguel RN, Sanders J, Chirgadze DY, Blundell TL, Furmaniak J, Smith BR. FSH and TSH binding to their respective receptors: similarities, differences and implication for glycoprotein hormone specificity. 2008;41(3):145.
66. Sanders J, Evans M, Premawardhana L, Depraetere H, Jeffreys J, Richards T, et al. Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *The Lancet*. 2003;362(9378):126-8.
67. Sanders J, Chirgadze DY, Sanders P, Baker S, Sullivan A, Bhardwaja A, et al. Crystal Structure of the TSH Receptor in Complex with a Thyroid-Stimulating Autoantibody. *Thyroid*. 2007;17(5):395-410.
68. Evans M, Sanders J, Tagami T, Sanders P, Young S, Roberts E, et al. Monoclonal autoantibodies to the TSH receptor, one with stimulating activity and one with blocking activity, obtained from the same blood sample. *Clinical Endocrinology*. 2010;73(3):404-12.
69. Sanders P, Young S, Sanders J, Kabelis K, Baker S, Sullivan A, et al. Crystal structure of the TSH receptor (TSHR) bound to a blocking-type TSHR autoantibody. 2011;46(2):81.
70. Miguel RN, Sanders J, Sanders P, Young S, Clark J, Kabelis K, et al. Similarities and differences in interactions of thyroid stimulating and blocking autoantibodies with the TSH receptor. 2012;49(2):137.
71. Furmaniak J, Sanders J, Nunez Miguel R, Rees Smith B. Mechanisms of Action of TSHR Autoantibodies. *Horm Metab Res*. 2015;47(10):735-52.
72. Dunbar J, Krawczyk K, Leem J, Marks C, Nowak J, Regep C, et al. SAbPred: a structure-based antibody prediction server. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W474-8.
73. Krawczyk K, Liu X, Baker T, Shi J, Deane CM. Improving B-cell epitope prediction and its application to global antibody-antigen docking. *Bioinformatics*. 2014;30(16):2288-94.
74. Sanders J, Evans M, Betterle C, Sanders P, Bhardwaja A, Young S, et al. A Human Monoclonal Autoantibody to the Thyrotropin Receptor with Thyroid-Stimulating Blocking Activity. *Thyroid*. 2008;18(7):735-46.

75. Lytton SD, Schluter A, Banga PJ. Functional diagnostics for thyrotropin hormone receptor autoantibodies: bioassays prevail over binding assays. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23:2028-43.
76. Rees Smith B, Bolton J, Young S, Collyer A, Weeden A, Bradbury J, et al. A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Thyroid*. 2004;14(10):830-5.
77. Gassner D, Stock W, Golla R, Roth HJ. First automated assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(9):1091-5.
78. Hermsen D, Broecker-Preuss M, Casati M, Mas JC, Eckstein A, Gassner D, et al. Technical evaluation of the first fully automated assay for the detection of TSH receptor autoantibodies. *Clin Chim Acta*. 2009;401(1-2):84-9.
79. Schott M, Hermsen D, Broecker-Preuss M, Casati M, Mas JC, Eckstein A, et al. Clinical value of the first automated TSH receptor autoantibody assay for the diagnosis of Graves' disease (GD): an international multicentre trial. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(4):566-73.
80. Frank CU, Braeth S, Dietrich JW, Wanjura D, Loos U. Bridge Technology with TSH Receptor Chimera for Sensitive Direct Detection of TSH Receptor Antibodies Causing Graves' Disease: Analytical and Clinical Evaluation. *Horm Metab Res*. 2015;47(12):880-8.
81. Lytton SD, Li Y, Olivo PD, Kohn LD, Kahaly GJ. Novel chimeric thyroid-stimulating hormone-receptor bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins. *Clinical & Experimental Immunology*. 2010;162(3):438-46.
82. Diana T, Kanitz M, Lehmann M, Li Y, Olivo PD, Kahaly GJ. Standardization of a bioassay for thyrotropin receptor stimulating autoantibodies. *Thyroid*. 2015;25(2):169-75.
83. Ehlers M, Allelein S, Schott M. TSH-receptor autoantibodies: pathophysiology, assay methods, and clinical applications. *Minerva Endocrinol*. 2018;43(3):323-32.
84. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept) avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical chemistry*. 1991;37(5):625-36.
85. Reuten R, Nikodemus D, Oliveira MB, Patel TR, Brachvogel B, Breloy I, et al. Maltose-Binding Protein (MBP), a Secretion-Enhancing Tag for Mammalian Protein Expression Systems. *PLOS ONE*. 2016;11(3):e0152386.
86. Schmidt TGM, Batz L, Bonet L, Carl U, Holzappel G, Kiem K, et al. Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expression and Purification*. 2013;92(1):54-61.
87. Leschik JJ, Diana T, Olivo PD, König J, Krahn U, Li Y, et al. Analytical Performance and Clinical Utility of a Bioassay for Thyroid-Stimulating Immunoglobulins. *American Journal of Clinical Pathology*. 2013;139(2):192-200.
88. Rees Smith B, Sanders J, Evans M, Tagami T, Furmaniak J. TSH receptor - autoantibody interactions. *Horm Metab Res*. 2009;41(6):448-55.
89. Latif R, Teixeira A, Michalek K, Ali MR, Schlesinger M, Baliram R, et al. Antibody protection reveals extended epitopes on the human TSH receptor. *PLoS One*. 2012;7(9):e44669.
90. Kleinau G, Mueller S, Jaeschke H, Grzesik P, Neumann S, Diehl A, et al. Defining structural and functional dimensions of the extracellular thyrotropin receptor region. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(25):22622-31.
91. Sun S, Summachiwakij S, Schneck O, Morshed SA, Ma R, Latif R, et al. Antigenic "Hot- Spots" on the TSH Receptor Hinge Region. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;9(765).

8 Danksagung

Bei meinem Doktorvater bedanke ich mich herzlich für das Anvertrauen dieser Arbeit. Durch den regelmäßigen Austausch und Besprechungen konnte ich wertvolle Erfahrungen im wissenschaftlichen Arbeiten sammeln und Inspiration für diese Arbeit gewinnen.

Ich danke für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank gilt meiner Betreuerin für Ihre außergewöhnliche Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit. Ihr großes Engagement und konstruktive Kritik waren immer eine große Hilfe. Darüber hinaus war es immer eine Freude, mit Ihr im Labor zusammen zu arbeiten.

Bei einem Kollegen möchte ich mich für die Einarbeitung und Unterstützung bei der praktischen Laborarbeit bedanken.

Meiner Vorgängerin danke ich für die anfängliche Einarbeitung und hilfreichen Hinweise.

Zwei Kolleginnen danke ich für die reibungslose Organisation des Labors.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Abschließend danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die mich im Studium und beim Erstellen dieser Arbeit allzeit unterstützt und bestärkt haben.

9 Lebenslauf

