

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

THYREOTROPINREZEPTOR-ANTIKÖRPER – EIN MULTIZENTRISCHER
VERGLEICH VON 5 IMMUNOASSAYS

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

Vorgelegt von

Augustine George aus Kochi

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

Tag der Promotion: 26. September 2025

Nachnutzungslizenz: CC-BY-4.0

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
2. Literaturdiskussion	2
2.1 Funktionelle Antikörper in AITD.....	2
2.2 Entwicklung verschiedener Zelllinien zur Bestimmung funktioneller Antikörper.....	5
2.3 Blockierende Schilddrüsenantikörper.....	7
2.4 TBI-Präsenz in Patienten mit Morbus Basedow	9
2.5 Plazentagängigkeit von TBI.....	10
2.6 Klinische Indikationen für eine TBI-Bestimmung	12
2.7 Funktionsweise des Turbo™ Bioassays.....	12
2.8 Eigenschaften des GS-22F-Biosensors	14
3. Methodik und Material	16
3.1 Materialien.....	16
3.2 Zusammenstellung des Patientenkollektivs.....	19
3.3 Durchführung des Turbo™ Bioassays.....	20
3.4 Auswertung des Turbo™ TBI Bioassays.....	22
3.5 Auswertung des Turbo™ TSI Bioassays.....	22
3.6 Erhebung klinischer Laborparameter	22
3.7 Herstellung einer Turbo™ TBI Bioassay-Verdünnungsreihe.....	23
3.8 Präzisionsmessung des Turbo™ TBI Bioassays.....	24
3.9 Statistische Auswertung	25
4. Ergebnisse	26
4.1 Demografische und serologische Daten.....	26
4.2 Ergebnisse der Immunoassays	28
4.3 Präzisionsmessung	44
5. Diskussion.....	46
5.1 Demografische Daten.....	46
5.2 Vergleich des Turbo™ und Thyretain® Bioassays.....	47
5.3 Ergebnisvergleich der fünf Immunoassays.....	48
5.4 Qualitativer Assay-Vergleich	53

5.5	Zusammenhang der Schilddrüsenfunktion und serologischen Daten.....	54
5.6	Zusammenhang der Assay-Resultate und klinischen Parameter	57
5.7	Präzisionsanalyse des Turbo™ TBI Bioassays	57
6.	Zusammenfassung	61
7.	Literaturverzeichnis	62
8.	Danksagung	68
9.	Lebenslauf.....	70

Abkürzungsverzeichnis

AAT	
Atrophe autoimmune Thyreoditis	8
Abb.	
Abbildung	13
AITD	
Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen	1
Ak	
Autoantikörper.....	1
AUC	
„area under the curve“	25
BRET	
„bioluminescence resonance energy transfer“	14
bTSH	
bovines TSH	13
cAMP	
Zyklisches Adenosinmonophosphat.....	1
CHO	
„chinese hamster ovary cells“	1
CoV	
Variationskoeffizient.....	44
CRE	
„cAMP responsive element“	7
EO	
Endokrine Orbitopathie	4
FDA	
Food and Drug Administration	7
FRET	
„fluorescence resonance energy transfer“	14
FRTL	
„fisher rat thyroid cell line“	6
ft3	
freies Triiodthyronin	19
ft4	
freies Thyroxin	11
G-Proteine	
Guanosintriphosphat-bindendes Protein.....	4
HCBS-TSHR-Mc4 Zellen	
„homogeneous cAMP biosensor“ TSHR-Mc4 Zellen	14
hCG	
humaner Choriongonadotropin-Rezeptor.....	6
HEK293 Zellen	
„Human Embryonic Kidney“-Zellen 293	14
HLA II	
„human leukocyte antigen“ II.....	3
HT	
Hashimoto Thyreoditis	1
IgG	
Immunoglobulin der Klasse G	5

IL-1	
Interleukin 1	9
LATS	
„long acting thyroid stimulator“	5
LH	
Lutropin	6
MAPK	
Mitogenaktivierte Proteinkinase	3
MB	
Morbus Basedow	1
mTOR	
mechanistisches Zielmolekül von Rapamycin.....	3
MWU	
Mann-Whitney-U Test	25
NF-κB	
Kernfaktor-Kappa-Leichtkettenverstärker von aktivierten B-Zellen	3
P	
Perzentile	26
rh-TSHR	
Rekombinanter Humaner TSH-Rezeptor	6
RIIβ	
„regulatory subunit type IIβ“	14
RLU	
relative Lichteinheiten	23
ROC	
„receiver operating curve“	25
ROS	
Reaktive Sauerstoffspezies.....	3
SD	
Standardabweichung	44
SW	
Shapiro-Wilk.....	26
T3	
Triiodthyronin	3
T4	
Thyroxin	3
Tab.	
Tabelle	17
TAK	
Thyreoglobulin Antikörper	1
TBI	
TSH-Rezeptor Blockierende Immunglobuline	1
Tg	
Thyreoglobulin	3
Th1-Zellen	
Typ-1-T-Helferzellen	9
TPO-Ak	
Thyreoperoxidase Antikörper	1
TRAK	
TSH Rezeptor Autoantikörpern	1

TSH	
Thyreoida stimulierendes Hormon	3
TSH-R	
Thyrotropinrezeptor.....	1
TSI	
TSH-Rezeptor Stimulierende Immunglobuline	1
vgl.	
Vergleiche	13
vs	
versus	6
WT	
Wildtyp	7

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Funktionsweise des Turbo™ TBI Bioassays.	14
Abb. 2 Darstellung des GloSensor™ 22F und 20F Plasmids.	16
Abb. 3 Pipettierschema einer 96-Well-Platte im Turbo™ TBI.	21
Abb. 4 Pipettierschema einer 96-Well-Platte im Turbo™ TSI.	21
Abb. 5 Anzahl positiver Proben in allen serologischen Tests N=212 (131 Patienten).	28
Abb. 6 Dosis-Wirkungs-Kurve durch Messung einer K1-70-Verdünnungsreihe mit dem Thyretain® TBI Bioassay.	34
Abb. 7 Dosis-Wirkungs-Kurve durch Messung einer K1-70-Verdünnungsreihe mit dem Turbo™ TBI Bioassay.	34
Abb. 8 Bland-Altman-Diagramm der Turbo™- und Thyretain® TBI- Ergebnisse.	35
Abb. 9 Passing-Bablok-Regression der Turbo™- und Thyretain® TBI- Ergebnisse.	36
Abb. 10 Passing-Bablok-Regression der Turbo™ TBI- und TRAK- Ergebnisse.	37
Abb. 11 Passing-Bablok-Regression der Thyretain® TBI- und TRAK- Ergebnisse	38
Abb. 12 ROC-Diagramm von 302 Proben (212 AITD, 90 Kontrollen), welche mit dem Turbo™ und Thyretain® TBI getestet wurden.	40
Abb. 13 ROC-Diagramm von 302 hypothyreoten und nicht-hypothyreoten Proben (212 AITD, 90 Kontrollen), welche mit dem Turbo™ und Thyretain® TBI getestet wurden.	41
Abb. 14 Darstellung der Thyretain® TBI- und TSI-Werte von Patient 81 nach Abnahmezeitpunkt.	52
Abb 15. Darstellung der Turbo™ TBI- und TSI-Werte von Patient 81 nach Abnahmezeitpunkt.	52
Abb. 16 Mittelwerte der Turbo™ TBI-Präzisionsmessungen mit dazugehörigem CV, sowie des Thyretain® TBI-Ausgangswertes der jeweiligen Probe.	58
Abb. 17 Ergebnisse der Präzisionsmessung von Anwender 1 Charge 1.	59
Abb. 18 Ergebnisse der Präzisionsmessung von Anwender 2 Charge 1.	59
Abb. 19 Ergebnisse der Präzisionsmessung von Anwender 1 Charge 2.	60
Abb. 20 Darstellung der Turbo™ TBI-Mittelwerte und CV.	60

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Chemikalien.....	17
Tab. 2	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	17
Tab. 3	Verwendete Geräte.	18
Tab. 4	Verwendete Kits.	19
Tab. 5	Verwendete Zelllinien.	19
Tab. 6	Verfahren zur Bestimmung klinischer Parameter.	23
Tab. 7	K1-70 Verdünnungsreihe RB.....	24
Tab. 8	Verwendete Serumproben zur Präzisionsanalyse.....	25
Tab. 9	Demografische Daten des Kontroll- und AITD-Kollektivs.	26
Tab. 10	Klinische Parameter des Kontrollkollektivs.	27
Tab. 11	Überblick über mehrfach positive Proben in den verwendeten Assays.	29
Tab. 12	Qualitative Zusammenfassung der Ergebnisse.	29
Tab. 13	Ergebnisse der Turbo™ TSI Zweitmessung.....	31
Tab. 14	Thyretain® TBI-Ergebnisse der Verdünnungsreihe.....	32
Tab. 15	Turbo™ TBI-Ergebnisse der Verdünnungsreihe.....	33
Tab. 16	Ergebnismatrix Turbo™ TBI und Thyretain® TBI.	36
Tab. 17	Ergebnismatrix Turbo™ TBI und TRAK.....	37
Tab. 18	Ergebnismatrix Thyretain® TBI und TRAK.	38
Tab. 19	Unterschiede in der Testgenauigkeit zwischen Turbo™ TBI, Thyretain® TBI und TRAK.....	39
Tab. 20	Zusammenhang zwischen Turbo™ TBI-, Thyretain® TBI-, TRAK-, TPO-Ak- und TAK- Ergebnissen. Die Assay-Ergebnisse sind nach TBI-Bereichen sortiert. ...	42
Tab. 21	Zusammenhang zwischen Thyretain® TBI-, TRAK-, TPO-Ak- und TAK- Ergebnissen. Die Assay-Ergebnisse sind nach TBI-Bereichen sortiert.	42
Tab. 22	Zusammenhang zwischen Turbo™ TBI und Schilddrüsenfunktion.	43
Tab. 23	Zusammenhang zwischen Thyretain® TBI und Schilddrüsenfunktion.....	43
Tab. 24	Tabellarische Darstellung der Präzisionsmessung von Anwender 1 (Charge 1).	44

Tab. 25 Tabellarische Darstellung der Präzisionsmessung von Anwender 2 (Charge 1).	45
Tab. 26 Tabellarische Darstellung der Präzisionsmessung von Anwender 1 (Charge 2).	45
Tab. 27 Mittelwerte und CV aller Turbo™ TBI-Messungen.	46
Tab. 28 Tabellarischer Vergleich des Turbo™ TBI Bioassays und Thyretain® TBI Bioassays.	48
Tab. 29 Probenanzahl von Turbo™ TSI-positiven Patienten.....	51
Tab. 30 Effektstärken der MWU bezogen auf das Gesamtkollektiv.....	55

1. Einleitung

Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen (AITD) gehören zu den prävalentesten Erkrankungen des Menschen (Davies et al., 2020). Vor allem Frauen mittleren Alters sind häufig von einer AITD betroffen (Sgarbi and Maciel, 2009, Frommer et al., 2023). Zu den bedeutendsten Vertretern dieser Kategorie zählen die Hashimoto-Thyreoiditis (HT) sowie der Morbus Basedow (MB), welche durch vielfältige Symptome das alltägliche Leben stark beeinträchtigen und einen erheblichen Leidensdruck verursachen können (Kahaly, 2020, Buonfiglio et al., 2024). Eine Erfassung klinischer Anzeichen und laborbasierter Parameter ist für eine effektive Betreuung der Patienten von entscheidender Bedeutung. Im klinischen Alltag werden hierbei routinemäßig Thyreoperoxidase-Antikörper (TPO-Ak), Thyreoglobulin Antikörper (TAK) und die Schilddrüsenfunktion zur Diagnostik einer AITD bestimmt. Eine zentrale Rolle spielen hierbei Autoantikörper (Ak) gegen den Thyreotropinrezeptor (TSH-R). Dabei ist zwischen stimulierenden (TSI) und blockierenden Immunoglobulinen (TBI) zu unterscheiden, welche eine unterschiedliche Auswirkung auf den Stoffwechsel von Thyreozyten vorweisen (Kahaly et al., 2020, Lytton and Kahaly, 2010, Diana et al., 2021). In Kombination mit klinischen Symptomen und Abweichen der normalen Schilddrüsenfunktion, ist ein Nachweis von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern (TRAK) beweisend für eine AITD. Die Messung funktioneller Ak zur Betreuung von Patienten mit AITD wird aktuell von wenigen Laboren weltweit durchgeführt und hilft bei der Therapie dieser Patienten. Besonders im Hinblick auf besondere Lebensumstände wie Schwangerschaft oder Radioiodtherapie, ist eine Bestimmung sinnvoll (Kiefer et al., 2017, Decallonne et al., 2020, McLachlan and Rapoport, 2013).

Zur Detektion von Ak in Patientenseren wurde der Thyretain® Bioassay entwickelt, der gentechnisch modifizierte Ovarialzellen des chinesischen Zwerghamsters „chinese hamster ovary cells“ (CHO) verwendet. Allerdings ist dieser Bioassay aufgrund seiner hohen Komplexität umständlich in der Anwendung. Die Gesamtdauer des Tests beläuft sich auf über 20 Stunden, wobei davon 16 Stunden für die Zellkultivierung benötigt werden und die eigentliche Durchführung des Verfahrens weitere 4 Stunden erfordert. Die einzelnen Verfahrensschritte sind äußerst anspruchsvoll und fehleranfällig, sodass geschultes Laborpersonal notwendig ist.

Als Weiterentwicklung zur bisherigen Methodik wird derzeit ein Bioassay basierend auf zyklischen Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP) mit dem Namen "Turbo™" TBI und

TSI Bioassay entwickelt. Dieser Ansatz zeichnet sich durch eine geringere Komplexität aus, verkürzt dadurch die Arbeitszeit erheblich und ermöglicht eine doppelt bis vierfach so hohe Probenkapazität im Vergleich zum Thyretain® Bioassay pro Durchlauf. Die Vorteile dieses neuen Bioassays bergen ein erhebliches Potenzial zur Steigerung der Praktikabilität in der klinischen Diagnostik.

Ziel dieser Untersuchung ist es, die Effektivität des neuen Turbo™ TBI Bioassays im Vergleich zu den bisher verwendeten Assays zu untersuchen. Mit dieser Dissertation analysierten wir 212 multizentrische Proben von 131 Patienten mit AITD mit dem Turbo™ TBI Bioassay, den etablierten Thyretain® TBI/TSI Bioassays und TRAK Immunoassays. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung von TSI mit dem neuen Turbo™ TSI Bioassay. Die Resultate der Assays wurden verglichen und die Beziehung dieser Werte zu klinischen Parametern sowie der Schilddrüsenfunktion untersucht.

2. Literaturdiskussion

2.1 Funktionelle Antikörper in AITD

Die Pathogenese des MB beruht auf der Einwanderung ausdifferenzierter Lymphozyten und T-Zellen in das Schilddrüsengewebe (Lanzolla et al., 2024). Diese Immunzellen induzieren die Produktion von Ak gegen den TSH-R. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Ektodomäne des Transmembranrezeptors, welche die Hauptbindungsstelle der TRAK darstellt. Die Bindung der TRAK an den Rezeptor führt entweder zu einer Stimulation oder Blockade des Signalweges, wobei eine stimulierende Wirkung im Vordergrund steht, wodurch eine unkontrollierte Produktion von Schilddrüsenhormonen verursacht wird. Diese Fehlregulation des TSH-R führt zu den typischen klinischen Symptomen des MB wie Tachykardie, Exophthalmus (George et al., 2020) und Struma. Eine Wirkung der blockierenden Ak auf die Schilddrüse wird diskutiert (Diana et al., 2018).

Die HT hingegen ist die häufigste Ursache für eine Hypothyreose und stellt eine der weitverbreitetsten Autoimmunerkrankungen dar. Im Gegensatz zum MB ist die HT durch eine progressive Zerstörung des Schilddrüsengewebes gekennzeichnet, welche zu einem Funktionsverlust der Schilddrüse führt (Weetman, 2021). Die Pathogenese

basiert auf einer komplexen Interaktion genetischer Faktoren, darunter eine Assoziation mit dem „human leukocyte antigen II“ (HLA II), sowie Umweltfaktoren wie Infektionen, exzessive Iodaufnahme oder Strahlenexposition. Immunologisch ist die HT geprägt durch eine Dysregulation der T-Zell- und B-Zell-Aktivität. Th1-dominante T-Helferzellen setzen proinflammatorische Zytokine frei, welche die Apoptose der Schilddrüsenfollikelzellen fördern, während zytotoxische T-Zellen die Schilddrüsenzellen direkt angreifen. Die anhaltende Entzündungsreaktion führt zu einer fibrotischen Umwandlung des Schilddrüsengewebes. Klinisch manifestiert sich die HT durch Symptome wie Müdigkeit, Gewichtszunahme, Kälteintoleranz und Schilddrüsenatrophie, wobei in frühen Stadien gelegentlich auch Strumae auftreten können. Einige Ak können ebenfalls einen neutralen Effekt ausüben und eine Apoptose der Schilddrüsenzellen auslösen (Morshed et al., 2010, Morshed et al., 2013).

Durch die verschiedenen Effekte können prinzipiell drei Gruppen kategorisiert werden: Stimulierende (TSI), blockierende (TBI) und neutrale Ak (Kahaly and Diana, 2017).

TSI binden an den großen extrazellulären Amino-Terminus und bewirken eine Stimulation des TSH-R (Kahaly et al., 2020). Dies führt zu einem Anstieg des cAMP, welcher die Transkription von Proteinen wie Thyreoglobulin (Tg) und Thyreoperoxidase (TPO) erhöht. Die Synthese von Thyroxin (T4) und Triiodthyronin (T3) wird gesteigert und das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) über einen Rückkopplungseffekt supprimiert. Die gesteigerte Proteinbiosynthese führt zur Proliferation der follikulären Endothelzellen und somit zur Ausbildung einer Struma und einer klinischen Hyperthyreose.

TBI blockieren stattdessen die Signaltransduktion des TSH-R. Die Synthese der Schilddrüsenhormone sinkt und die Proliferation und das Wachstum der Schilddrüsenzellen werden gehemmt (Diana et al., 2018).

Die dritte Gruppe der Schilddrüsenrezeptor Antikörper hat weder einen blockierenden noch einen stimulierenden Effekt, sondern zeigt eine neutrale Wirkung auf den TSH-R. Diese Ak werden als neutrale Ak oder "cleavage"-Ak bezeichnet. Neutrale Ak sind in der Lage, verschiedene Signalkaskaden auszulösen. In vitro kann eine Aktivierung der Proteinkinase C, der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) und des mechanistischen Zielmoleküls von Rapamycin (mTOR) gezeigt werden. Dabei kommt es zum Anstieg der Kernfaktor-Kappa-Leichtkettenverstärker von aktivierten B-Zellen (NF- κ B), verschiedenen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).

Wahrscheinlich steht die Initiierung dieser Signalkaskade mit einer Aktivierung verschiedener Guanosintriphosphat-bindenden Proteine (G-Proteine) in Zusammenhang. Bei Thyreozyten von Ratten kam es nach Exposition von neutralen Ak zur Apoptose. Es kann eine erhöhte Expression von Hitzeschockproteinen (p27, p107), Stressproteinen des endoplasmatischen Retikulums (grp98) und verschiedenen Onkogenen (p53, p73, Retinoblastom-Protein) beobachtet werden. Es ist unklar, ob ausschließlich ROS oder andere Signalkaskaden die Auslöser der Apoptose sind. Ob und in welcher Weise diese Kaskaden in die Pathophysiologie von AITD hineinspielen, ist ebenso unklar (Morshed et al., 2010, Morshed et al., 2013).

TBI stehen im Verdacht durch ihre Präsenz eine autoimmune Hypothyreose herbeiführen zu können (Diana et al., 2018), welche häufig bei der HT beobachtet werden kann. Man schätzt die Prävalenz von TBI in AITD-Patienten bei ungefähr 10 % (Diana et al., 2017), wobei auch ein Anteil von 40,5 % in einem TSI-negativen Kollektiv beschrieben wurde (Takasu et al., 1987). Interessanterweise wurden in MB-Patienten TBI (Diana et al., 2018), sowie TSI in HT-Patienten nachgewiesen (Kahaly et al., 2016). So wird aktuell davon ausgegangen, dass TBI in MB-Patienten eine transiente Hypothyreose und TSI in HT-Patienten eine endokrine Orbitopathie (EO) auslösen können (Kahaly et al., 2016). Die Dominanz einer Antikörpergruppe kann während des Krankheitsverlaufes wechseln und folglich die Schilddrüsenfunktion beeinflussen. In einer Übersichtsarbeit von McLachlan (2013) zeigen sich Hinweise, dass die Konversion bei Einnahme von L-Thyroxin und Thyreostatika auftreten kann. Eine Schwangerschaft kann ebenfalls zu einer Änderung der funktionellen Antikörper führen. Dementsprechend können auch beide Antikörper in einem Patienten mit AITD vorhanden sein (McLachlan and Rapoport, 2013). Es ist anzumerken, dass nicht wahrscheinlich TBI allein, sondern die Zerstörung der Thyreozyten durch zytotoxische T-Zellen zu einer Hypothyreose beitragen. TPO-Ak und TAK spielen bei der Zerstörung der Schilddrüsenzellen eine hintergründige Rolle (Möller, 2023).

Die Bestimmung der Antikörper ist zur klinischen Begleitung und Therapie eines Patienten mit AITD sinnvoll. Aktuell werden dafür häufig TRAK Immunoassays verwendet. Diese können jedoch nicht zwischen TBI und TSI unterscheiden. Hierfür werden zellbasierte Assays verwendet, welche die Aktivität des TSH-R indirekt messen (Li et al., 2013). Die Sensitivität und Spezifität der zellbasierten Assays sind höher als die der Bindungsassays (Allelein et al., 2019, Diana et al., 2016).

2.2 Entwicklung verschiedener Zelllinien zur Bestimmung funktioneller Antikörper

Die Entwicklung unterschiedlicher Zelllinien ist in einer ausführlichen Übersichtsarbeit von Giuliani (2016) beschrieben (Giuliani et al., 2016). Die ersten Hinweise auf Ak wurden in einem Forschungsbericht von Adam und Purves (1965) dokumentiert. In dieser Studie wird die Entdeckung einer bislang unbekannt Substanz, die die Schilddrüse in Meerschweinchen stimuliert, beschrieben. Durch die intravenöse Verabreichung von Serum von Patienten mit Thyreotoxikose, wurde im Vergleich zur Verabreichung einer standardisierten TSH-Lösung eine ungewöhnliche Aktivität der Schilddrüsenfunktion beobachtet. Die Synthese von ^{131}I markierten Schilddrüsenhormonen wurde prolongiert und erreichte ihren Höchstwert nach 16 bis 24 Stunden nach der Verabreichung, während die Gabe von einer standardisierten TSH-Lösung nach drei bis vier Stunden die maximale Syntheseleistung an Schilddrüsenhormonen zeigte. Die unbekannte Substanz, welche diese ungewöhnliche Reaktion in den Meerschweinchen initiierte, wurde „long acting thyroid stimulator“ (LATS) benannt (Adams, 1965). Es wurde angenommen, dass es sich hierbei um TSH handelt, das durch Serumbestandteile gebunden ist und dadurch eine augmentierte Wirkung auf die Schilddrüse der Versuchstiere ausübt. Obwohl die genaue Zuordnung von LATS nicht bekannt war, wurde einer der ersten in vitro-Bioassay von Brown und Munro (1967) beschrieben. In diesem Versuch wurden Mäuse mit einer iodarmen Diät gefüttert und anschließend intraperitoneal radioaktives ^{131}I injiziert. Das Schilddrüsengewebe dieser Mäuse wurde nach drei Stunden in einem Kulturmedium konserviert. Nach der Inkubation mit TSH oder LATS ließ sich eine erhöhte Konzentration von ^{131}I im Medium im Vergleich zum Kontrollmedium beobachten (Brown and Munro, 1967).

LATS zeigte in Bezug auf die Syntheseleistung und histologische Gewebeveränderungen eine Ähnlichkeit zur Wirkung von TSH. Allerdings standen die Beobachtungen im Widerspruch zur Theorie, dass es sich hierbei um eine gebundene Form von TSH handelt (Adams, 1965). Dies wurde in weiteren Forschungsarbeiten bestätigt und die Substanz als Immunglobulin der Klasse G (IgG) kategorisiert (Kriss et al., 1964).

Mit der Anwendung von Bioassays konnte der blockierende oder stimulierende Effekt der funktionellen Antikörper bestimmt werden (Valente et al., 1982). Zunächst wurden Zellkulturen von menschlichen Schilddrüsenzellen verwendet (Toccafondi et al., 1980).

Die Schilddrüsenzellen wurden hierfür aus Thyreodektomien von Patienten mit monofokalen Schilddrüsenkarzinomen bezogen. Das Gewebe wurde aufgereinigt, auf Krebsfreiheit kontrolliert und die Zellverbände mit Trypsin aufgespalten. Die vorliegende Suspension wurde in einem Nährstoffmedium in einem Inkubator unter 37 °C und 10 % CO₂ Luftanteil aufbewahrt.

Es folgten einfachere Bioassays mit Schilddrüsenzellen aus der Fischer Ratte (FRTL), welche keine aufwendige Aufarbeitung von menschlichen Schilddrüsenzellen benötigten (Ambesi-Impiombato et al., 1980). Eine Präsenz von Antikörpern wurde dabei anhand der cAMP-Konzentration durch einen Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Durch die Patentierung bahnte die FRTL-Zellreihe die kommerzielle Nutzung von funktionellen Bioassays.

1989 führte die Klonierung des rekombinanten humanen TSH Rezeptors (rh-TSH-R) zu weiteren Fortschritten (Parmentier et al., 1989, Akamizu et al., 1990). So wurde der rh-TSH-R in CHO-Zellen eingebracht und in Bioassays verwendet (Kim et al., 1997, Vitti et al., 1993). Ähnlich wie die FRTL-Zellen zeigen sich die Klone der CHO-Zellen auch nach langjähriger Kultivierung stabil. Die Verdopplungszeit der CHO-Zellen ist wesentlich kürzer (15h – 20h versus (vs.) 5 – 7 Tage für FRTL-Zellen), wodurch die Vorbereitungsdauer des Assays verkürzt werden konnte. Zusätzlich zeigte der rekombinante TSH-R in diesen Forschungsarbeiten eine höhere Sensitivität im Vergleich zu FRTL-Zellen (93% vs. 75,5%) und (92,2% vs. 74,5%).

Die Sequenzierung des TSH-R in den späten 80er Jahren ebnete den Weg für die Herstellung verschiedener TSH-R-Chimären. Kohn und Tahara (1991) entwickelten die ersten Chimären des TSH-R mit Bestandteilen des Lutropin- (LH) und humanen Choriongonadotropin- (hCG) Rezeptors, von denen der Mc4 TSH-R heute in den meisten Bioassays Verwendung findet. Der Mc4 TSH-R wurde an Position 262 bis 368 mit Bestandteilen des LH-/hCG-Rezeptors ersetzt und zeigte in den ersten Untersuchungen eine hohe Spezifität für TSI. Die Spezifität der Mc4-Chimäre wurde auf die unterschiedlichen Bindungsdomänen der TSI und TBI zurückgeführt (Tahara et al., 1991). TSI bindet primär am N-Terminus an Position 8 – 165 und TBI am C-Terminus an Position 261 – 370 (Tahara et al., 1997). In weiteren Experimenten wurde die Spezifität der Mc4 TSH-R für TSI jedoch widerlegt (Diana et al., 2018).

Die bisherige Messung der cAMP Konzentration in FRTL- und CHO-Zellen erfolgte durch die Verwendung eines RIA. Die Herstellung eines Luciferase-basierten Bioassays erfolgte mittels Transfektion des Luciferase-Gens aus dem Leuchtkäfer

Photinus pyralis nach einem „cAMP responsive element“ (CRE). Die Aktivität eines G_s-gekoppelten Rezeptors konnte dadurch anhand von Lichtsignalen des Luciferase-Enzyms quantifiziert werden (Himmler et al., 1993). Die Forschung von Himmler (1993) bezog sich auf Dopaminrezeptoren, jedoch wurde die Technik für die Messung funktioneller Ak genutzt. Im neuen Bioassay werden Lichtsignale mithilfe eines Luminometers gemessen, welche bei Anwesenheit von TSI emittiert werden. Die Stimulation des chimären Mc4 TSH-R durch TSI führt hierbei in den CHO-Zellen zu einer Expression der Luciferase, dessen Gen im Verlauf des Erbgutes nach dem CRE eingebracht wurde (Watson et al., 1998).

In späteren Vergleichen von Mc4 TSH-R mit dem Wildtyp- (WT) Rezeptor zeigten CHO-Zellen mit dem chimären Rezeptor eine höhere Sensitivität und Spezifität, sowie einen größeren linearen Bereich der Sättigungskurve (Diana et al., 2020).

Bioassays, welche die Mc4 Chimäre nutzen, stellen heute die bevorzugte Methode zur Messung funktioneller Ak dar. 2009 wurde der Thyretain® TSI Bioassay für die diagnostische Anwendung von der Food and Drug Administration (FDA) freigegeben. Der Thyretain® TBI Bioassay findet für die Erkennung von blockierenden Ak heute als Goldstandard seine Verwendung (Li et al., 2013).

2.3 Blockierende Schilddrüsenantikörper

In einer ausführlichen Übersichtsarbeit wurden die folgenden Erkenntnisse zu blockierenden Schilddrüsenantikörpern diskutiert (Diana et al., 2018). TBI werden definiert als Antikörper, die an den TSH-Rezeptor binden und als Gegenspieler zu TSH wirken. Anders als ihre stimulierenden Gegenspieler TSI, beschränken sich diese nicht auf die IgG1-Subklasse, sondern zeigen ähnlich wie TPO-Ak und TAK, einen polyklonalen Ursprung (Kraiem et al., 1992). Konishi et al. (1983) analysierten die Effekte von IgG-Fractionen bei Patienten mit primärem Myxödem und HT. Es wurde erforscht, inwieweit die isolierten Immunglobuline die Erhöhung des cAMP-Spiegels in menschlichen Schilddrüsenadenomzellen beeinflussen können, die zuvor mit TSH oder TSI angeregt wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass IgG von Patienten mit primärem Myxödem den cAMP-Anstieg signifikant blockierten, während IgG aus Patienten mit HT keine Wirkung zeigten. Gleichzeitig wurde die cAMP Synthese von Prostaglandin E1 stimulierten Zellen nicht gehemmt. Diese Ergebnisse stützten die Existenz von Antikörpern mit blockierenden Eigenschaften. Spätere Untersuchungen konnten TBI

in diversen Krankheitsbildern durch verschiedene in vitro Diagnostik nachweisen. Patienten mit primärem Myxödem zeigen bis zu 33,3% und bei Patienten mit HT bis zu 20% TBI Positivität (Takasu et al., 1987). TBI wurden in einer weiteren AITD, der atrophen autoimmunen Thyreoditis (AAT), nachgewiesen. Hier wurde mithilfe von Schilddrüsenzellen aus Schweinen in 16 von 64 (25%) Probanden mit AAT TBI dokumentiert. In derselben Studie zeigten 17 von 172 (10%) der HT Patienten eine Präsenz von TBI (Takasu et al., 1992). In einer weiteren Studie wurden blockierende IgG in 12 von 26 (46%) Patienten mit AAT und in 20 von 55 (36%) in hypothyreoten HT-Patienten nachgewiesen. Interessanterweise wurden in HT-Patienten mit subklinischem Hypothyreodismus nur 3 von 32 (9,4%) und in euthyreoten HT-Patienten nur 1 von 27 (4%) Patienten TBI Aktivität festgestellt. Die blockierenden Ak wurden mithilfe von FRTL-Zellen bestimmt (Chiovato et al., 1990). In CHO-Zellen mit humanem TSH-R wurden TBI in 16 von 47 (34%) AAT-Patienten dokumentiert, während 7 von 30 (23,3%) Patienten mit klinischer Hypothyreose und 1 von 8 (12,5%) HT-Patienten mit subklinischer Hypothyreose TBI-Aktivität zeigte (Chiovato et al., 1994).

In der Literatur finden sich Beispiele für die Rückbildung von TBI im Verlauf der Erkrankung. In einer Langzeitstudie (Takasu et al., 1992) wurden Antikörpertiter und die Schilddrüsenfunktion von 21 hypothyreoten TBI-positiven Probanden über zehn Jahre verfolgt. 15 der 21 Probanden zeigten nach L-Thyroxin-Therapie eine Remission der TBI-Titer, wovon 6 Patienten auch nach einem Jahr nach Beendigung der Hormonsubstitution euthyreot verblieben. Die restlichen 9 Patienten zeigten nach spätestens drei Monaten nach Therapieende eine Hypothyreose. 6 der initialen 21 Patienten zeigten weder eine Normalisierung der TBI-Titer noch Schilddrüsenfunktion. In einer Studie von Nobuyuki et al. (2012) wurde der Krankheitsverlauf von 34 hypothyreoten TBI und 98 hyperthyreoten TSI-positiven Patienten über einen Zeitraum von zehn Jahren verfolgt. Nach Therapie der Hypothyreose mit L-Thyroxin wurden 15 der 34 TBI-positiven Patienten im Verlauf TBI negativ. 13 der 15 Patienten erlangten daraufhin eine Remission der Hypothyreose (Takasu and Matsushita, 2012). Durch diese Studien wurde eine Änderung der Antikörpertiter durch Schilddrüsentherapie und ein Zusammenhang zwischen Ak und Schilddrüsenfunktion vermutet.

In einer Studie von Evans et al. (2010) konnte gezeigt werden, dass blockierende und stimulierende Ak in einem Patienten mit AITD vorhanden sein können (Evans et al., 2010). Aus dieser Erkenntnis wurde postuliert, dass sich die Schilddrüsenfunktion in

Abhängigkeit zum Verhältnis der TSI und TBI hypo- bzw. hyperthyreot zeigt. Während jedoch die Schilddrüsenüberfunktion bei MB hauptsächlich durch TSI bedingt wird, unterliegt die Schilddrüsenunterfunktion bei HT verschiedenen Mechanismen. Die wichtigste pathologische Grundlage einer verminderten Schilddrüsenhormonproduktion hängt mit der immunvermittelten Apoptose von Schilddrüsenzellen zusammen. Normale Schilddrüsenepithelzellen exprimieren eine Vielzahl von Todesrezeptoren, einschließlich Fas, sodass eine Aktivierung dieser Zerstörung von Follikelzellen beiträgt. Darüber hinaus kann die Zytokinstimulation mittels Interleukin 1 (IL-1) durch Antigen-präsentierende Zellen und Typ-1-T-Helferzellen (Th1-Zellen) Fas auf der Zelloberfläche induzieren. Aktivierte T-Zellen, welche den Fas-Liganden exprimieren, können dadurch die Apoptose von Schilddrüsenzellen induzieren. Histologische Aufarbeitungen von Schilddrüsenngewebe von Patienten mit Hashimoto Thyreoditis zeigten eine erhöhte Anzahl von Lymphfollikeln und lymphozytären Infiltrationen. Jedoch ist zu beachten, dass eine Hypothyreose basierend auf der Präsenz von TBI nicht ausgeschlossen ist (Diana et al., 2018).

2.4 TBI-Präsenz in Patienten mit Morbus Basedow

Der Nachweis von TBI in MB-Patienten unterliegt in Studien einer hohen Varianz. So zeigten 34 von 86 (40%) TSI-negativen MB-Patienten eine TBI-Aktivität (Wallaschowski and Paschke, 1999). In einer weiteren Studie konnten in 24 TSI-negativen MB-Patienten 4 Patienten (17%) mit TBI identifiziert werden (Morgenthaler et al., 1998). Der Nachweis von TBI in diesen Studien gelang durch JP09-Zellen, wobei es sich um CHO-Zellen mit humanem TSH-R handelt. In einem Assay mit porcinen Schilddrüsenmembranen und Messung der cAMP-Aktivität mittels RIA konnte TBI in 9 von 30 (30%) Patientenseren detektiert werden (Tada et al., 2001). In einer Studie mit 1079 AITD-Patienten konnte durch Mc4-CHO-Zellen in 15 von 357 MB-Patienten (4,2%) TBI nachgewiesen werden (Diana et al., 2017). Tada et al. (2003) beobachtete in seiner Forschungsarbeit eine Präsenz von TBI in 8 von 28 (28,6%) Patienten mit MB (Tada et al., 2003).

Patienten mit TBI-Präsenz zeigten eine signifikant schnellere Normalisierung ihrer T4-Werte unter Methimazol-Therapie als TBI-negative Patienten (Tada et al., 2003). 7 der 8 (87,5 %) TBI-positiven, aber nur 6 der 20 (30 %) TBI-negativen Patienten erlangten in einem Zeitraum von unter 4 Wochen eine Normalisierung ihrer T4-Werte. Jedoch

zeigten TBI-positive Patienten eine längere Zeit bis zur vollständigen Remission. So zeigte nur ein Patient von 6 TBI-positiven eine Remission nach 5 Jahren, während in der Gruppe mit TBI-negativen MB-Patienten 12 von 17 (70,6%) eine Remission im gleichen Zeitraum erlangten. Die Autoren konkludieren einen Einfluss von TBI auf MB-Patienten und schlagen, unter Vorbehalt weiterer Studien, invasivere Therapien wie Thyreodektomien oder eine Radioiodtherapie für Patienten mit TBI vor.

2.5 Plazentagängigkeit von TBI

Aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur Klasse der IgG können TBI-Antikörper während einer Schwangerschaft die Plazentaschranke durchdringen und somit Einfluss auf die Schilddrüsenfunktion des Neugeborenen nehmen.

Die erste dokumentierte Berichterstattung über einen möglichen transplazentaren Transfer von TBI stammt von Iseki et al. im Jahr 1983. In dieser Studie wurde über drei Geschwister berichtet, welche bei ihrer Geburt erniedrigte T4-Spiegel mit erhöhtem TSH-Titer aufwiesen. Eines der Neugeborenen zeigte zudem einen hypothyreoten Phänotyp mit Gelbsucht, Verstopfung und einer Nabelhernie. Die Mutter der Kinder erhielt ihre Diagnose einer AITD im Alter von 24 Jahren. Bei allen Neugeborenen und bei der Mutter wurden Schilddrüsenantikörper nachgewiesen, sodass auf einen transplazentaren Transfer von TBI geschlossen wurde (Iseki et al., 1983).

Weiterführend konnten Takasu et al. (1984) beobachten, dass IgG-Antikörper einer hypothyreoten Mutter mit HT die cAMP-Synthese und Iodaufnahme im Schilddrüsengewebe ihres Säuglings hemmten (Takasu et al., 1984).

Ein Fallbericht beschreibt eine mögliche semipermanente Veränderung der Schilddrüsenfunktion aufgrund von TBI-Exposition während der Schwangerschaft (Evans et al., 2004). Ein Neugeborenes, welches eine angeborene Hypothyreose aufgrund transplazentarer Übertragung von TBI aufwies wurde mit einem Luciferase Bioassay untersucht. Anfangs wiesen sowohl die Mutter als auch das Neugeborene hohe TBI-Spiegel auf. Die TBI-Titer des Kindes normalisierten sich innerhalb von 3 bis 4 Monaten. Die Hypothyreose blieb jedoch auch nach Absetzen der L-Thyroxintherapie nach 16 Monaten bestehen. Eine Übertragung der Antikörper über die Muttermilch wurde aufgrund des niedrigen Antikörperspiegels des Kindes ausgeschlossen.

Ein von Castellnou (2021) veröffentlichter Fallbericht (Castellnou et al., 2021) dokumentierte den Fall eines zehn Tage alten Säuglings, bei dem erhöhte TPO-Ak-

Titer von 81 IU/mL (Grenzwert <34 IU/mL) beobachtet wurden. Gleichzeitig wurden TSH-Werte von 817 mIU/L (Referenzbereich 0,4 – 3,1 mIU/L) und freies Thyroxin (fT4) von 1,8 pmol/L (Referenzbereich 12 – 22 pmol/L) gemessen. Der TRAK-Titer befand sich im oberen Referenzbereich 1,7 IU/L (Grenzwert <1,75 IU/L). Die Mutter und das Neugeborene wiesen in diesem Zeitraum einen TBI-Wert von 89% auf (Grenzwert < 10%). Bei der Diagnosestellung zeigte das Neugeborene Symptome wie Ikterus, Gewichtsverlust und Antriebsarmut. Nach Beginn der Therapie mit 30µg L-Thyroxin besserten sich die Symptome innerhalb von 3 Tagen. Die vollständige Remission der Schilddrüsenfunktion nach Absetzen der L-Thyroxin-Therapie wurde erst nach 6,5 Monaten erreicht, später als die Remission der TBI.

2.6 Klinische Indikationen für eine TBI-Bestimmung

Eine Empfehlung für eine TBI-Diagnostik bei Patienten mit erhöhten TSH-Werten und Neugeborenen mit Verdacht auf AITD bleibt in den aktuellen AMWF-S2k-Leitlinien aus. Eine europäische Leitlinie für das Management der Basedow-Hyperthyreose und der mit MB assoziierten extrathyroidalen Manifestationen empfehlen jedoch eine genaue Bewertung der klinischen Manifestationen und serologischen Parameter, z. B. der schilddrüsenbezogenen Hormone und Autoantikörper (Bartalena et al., 2021, Kahaly et al., 2018). Diana et al. gibt in einer Übersichtsarbeit potentielle Indikationen zur Testung von TBI (Diana et al., 2018).

Indikationen zur Messung von TBI

1. MB-Patienten nach Radioiodtherapie oder thyreostatischer Therapie
2. HT-Patienten
3. Schwangere Patientinnen mit AITD
4. Neonatale Hypothyreose
5. Schilddrüsenerkrankungen Post partum
6. Bestehender Verdacht einer Thyreoditis
7. Laborchemisch nachgewiesene Hypothyreose unklarer Genese
8. Trisomie 21
9. Andere Autoimmunerkrankungen (Systemischer Lupus erythematodes, Diabetes mellitus Typ I, Myasthenia gravis)

2.7 Funktionsweise des Turbo™ Bioassays

Derzeit wird im molekularen Schilddrüsenlabor der Universitätsmedizin Mainz ein TBI Bioassay basierend auf CHO/Mc4-Luciferase-Zellen genutzt. Mit diesem Assay konnte bei der Analyse von Serumproben von über 2000 Patienten mit AITD eine Prävalenz von TBI von 8% bei MB und 11% bei HT-Patienten festgestellt werden (Diana et al., 2018).

Aufgrund seiner Komplexität ist der Thyretain® Bioassay umständlich und nicht standardisiert. Für den gesamten Assay werden bis zu 20 Stunden benötigt. Davon entfallen 16 Stunden auf die Zellkultivierung und 4 Stunden auf die Durchführung des Verfahrens. Die einzelnen Schritte sind äußerst anspruchsvoll und anfällig für Fehler, weshalb Fachpersonal zwingend erforderlich ist.

Angesichts dieser Nachteile befindet sich derzeit ein neuer cAMP-basierter Bioassay in Entwicklung, bekannt als der Turbo™ TBI und TSI Bioassay. Dieser Ansatz nutzt vorgefertigte Zellen und reduziert die Komplexität des Bioassays. Dadurch verkürzt sich die Gesamtdauer des Verfahrens auf nur 2 Stunden. Zusätzlich ermöglicht dieser Bioassay die Analyse von 90 Proben im TBI- und 39 Proben im TSI Bioassay auf einer 96-Well-Platte, im Vergleich zu 21 bis 22 Proben pro Durchlauf, wie es beim handelsüblichen Thyretain® Bioassay der Fall ist.

Die kürzere Dauer, die geringere Komplexität und die Möglichkeit, mehr Proben in einem Durchlauf zu analysieren, bergen ein erhebliches Potenzial, die Bestimmung von Antikörpern in der klinischen Anwendung wesentlich praktikabler zu gestalten.

Der Turbo™ Bioassay ist ein cAMP-basierter Bioassay. Bei den verwendeten „homogenous cAMP biosensor“ (HCBS-TSH-R-Mc4) Zellen handelt es sich um CHO-K1 Zellen, ausgestattet mit dem pGloSensor™-22F cAMP Sensor (GS-22F; Promega, Madison, WI), sowie dem Mc4 TSH-R Plasmid. Die Zellen sind im kultivierten, gefrorenen Zustand bei -80°C stabil, sodass sie nicht vor jeder Durchführung erneut kultiviert werden müssen.

Bei Anwesenheit von TSI kommt es zum Anstieg des intrazellulären cAMP (Abbildung (Abb.) 1). Dies führt zu Konformationsänderung des GS-22F und der Umsatz des Luciferase-Substrats beginnt. Dabei kommt es durch die chemische Reaktion zur Freisetzung von Lichtsignalen, welche durch ein Luminometer in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen werden.

Zur Messung von TBI werden die Zellen zusätzlich mit bovinem TSH (bTSH) inkubiert. Aufgrund des bTSH findet eine Grundstimulation der HCBS-TSH-R-Mc4 Zellen statt. Dies führt über den G_s-gekoppelten TSH-R zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Ist TBI im Patientenserum präsent, blockieren diese die Stimulation der TSH-R. Es kommt zu einer verminderten Konformationsänderung und somit zur Senkung der emittierten Lichtsignale. Anhand des Vergleichs der Lichteinheiten mit einer Referenzkontrolle (Vergleiche [vgl.] Formel 1) kann die Menge der TBI im Patientenserum in Prozent berechnet werden.

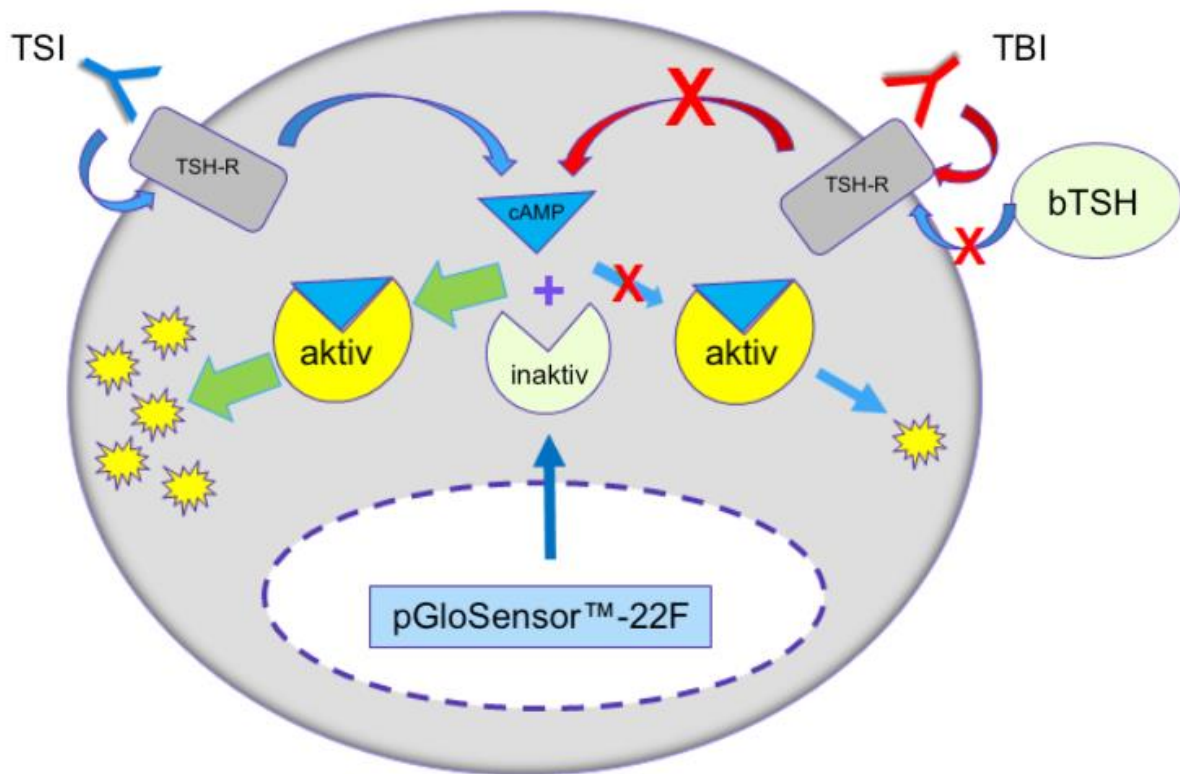


Abb. 1 Funktionsweise des Turbo™ TBI Bioassays (Olivo, 2023).

2.8 Eigenschaften des GS-22F-Biosensors

Die Herstellung des im Turbo™ TBI und TSI Bioassays verwendeten Biosensor GS-22F erfolgte als Weiterentwicklung aus den bisher verwendeten „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) und „bioluminescence resonance energy transfer“ (BRET) cAMP-Biosensoren. Die folgende Entwicklung des Biosensors wurde in einer Übersichtarbeit von Binkowski et al. (2011) ausführlich beschrieben (Binkowski et al., 2011).

Der GS-20F Sensor setzt sich aus der cAMP-Bindungsdomäne „regulatory subunit type IIβ“ (RIIβB) der Proteinkinase A (PKA) und dem aktiven Zentrum der Luciferase aus *Photinus pyralis* zusammen und zeigt eine hohe Sensitivität (Abb. 2). Jedoch konnte in Experimenten mit „human embryonic kidney“-Zellen 293 (HEK293 Zellen) eine schnelle Sättigung der Reaktionskurve beobachtet werden. Für eine genaue Messung des intrazellulären cAMP verwendet der Turbo™ Bioassay HCBS-TSH-R-Mc4 Zellen, welche mit dem GS-22F (Promega, Madison, WI) Biosensor ausgestattet

sind. Im Unterschied zum GS-20F-Sensor sind fünf Aminosäuren am N-Terminus der Luciferase-Einheit und sechs Aminosäuren des Bindungspeptids unterschiedlich (Abb. 2). Diese Veränderungen zeigten *in vitro* eine vierfach reduzierte Sensitivität, jedoch einen größeren linearen Messbereich. In Experimenten zeigte sich eine bessere Differenzierung zwischen Voll- und Partialagonisten, sowie ein größerer Messbereich in verschiedenen Zelltypen. In einem Vergleichsexperiment zeigte der GS-22F-Sensor eine vergleichbare Signalstärke und Reaktionskinetik wie ein hochsensibler, enzymgekoppelter Immunoassay (Binkowski et al., 2011).

Die Messungen von bTSH- und TSI-positiven Seren zeigten ein unterschiedliches Ansprechen zwischen HCBS-TSH-R-Mc4 Zellen und TSHR-Wt- CHO-K1-Zellen, welche jeweils mit dem GS-22F-Sensor ausgestattet wurden (Miao et al., 2022). Die Substanzen wurden mit einer nichtstimulierenden Kontrollsubstanz („reaction buffer“ [RB]) verglichen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass bTSH bei HCBS-TSH-R-Mc4 Zellen ein geringeres Ansprechen im Vergleich zu TSHR-Wt-Zellen zeigte (Signal/Kontroll Quotient HCBS-TSH-R-Mc4= 12,1 vs. Wt= 24,7). In Versuchen mit TSI-positiven Seren ergab sich jedoch ein höherer Quotient für HCBS-TSH-R-Mc4 Zellen (Signal/Kontrolle Quotient HCBS-TSH-R-Mc4 = 40,6 vs. TSHR-Wt = 28,0).

Die gleiche Studie (Miao et al., 2022) berichtet über eine vergleichbare analytische Leistung zwischen Turbo™ TSI und Thyretain® TSI mit EC₅₀-Werten von 4,7 ng/ml bzw. 5,5 ng/ml unter Verwendung von M22 bei hoher Präzision (Variationskoeffizient < 15%). Der Turbo™ TSI zeigte in dieser Studie eine hohe Sensitivität (98,7%) und Spezifität (93,5%). Bei der Untersuchung von 22 Substanzen, darunter Hormone, Medikamente und Antikörper, wies der Turbo™ TSI keine Kreuzreaktivität auf. Auch der blockierende monoklonale Antikörper K1-70 zeigte bei hohen Dosen (1000 ng/ml) keine falsch-positiven Ergebnisse, verursachte jedoch eine Reduzierung der durch bTSH induzierten Lichtsignale. Die Autoren schlussfolgerten eine mögliche Anwendung der Zellen für die Herstellung des Turbo™ TBI Bioassays.

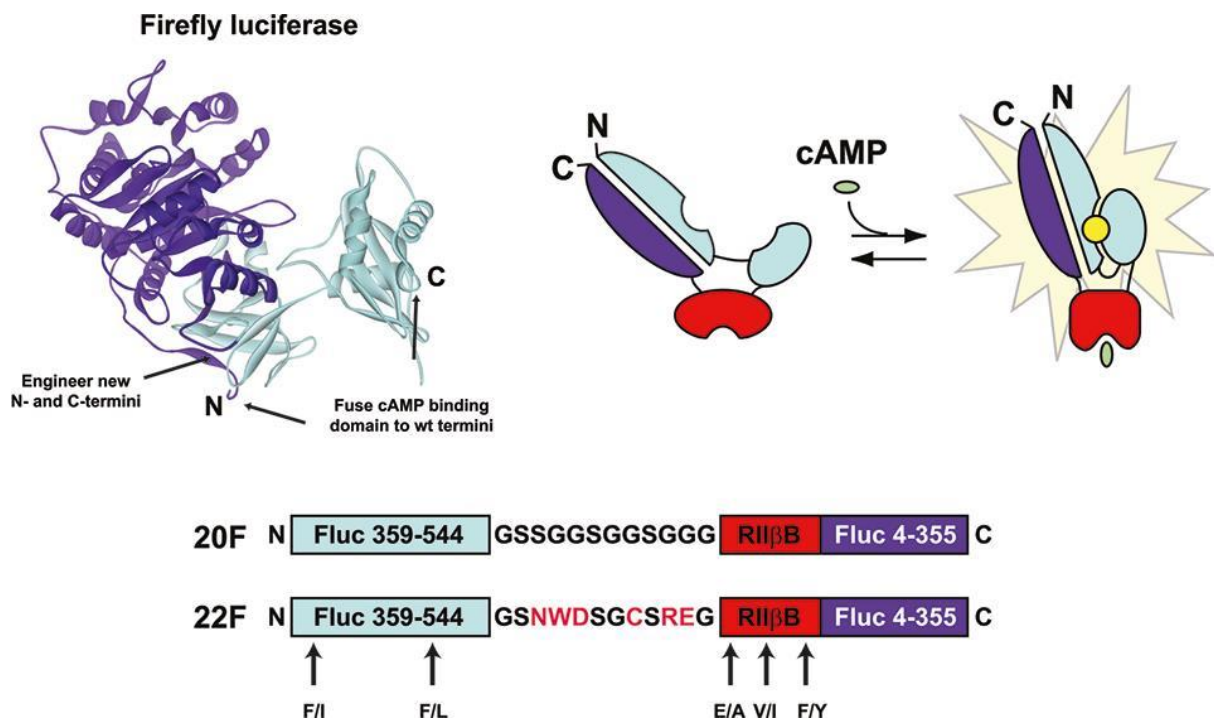


Abb. 2 Darstellung des GloSensor™ 22F und 20F Plasmids. Das GloSensor™ 22F stellt eine Weiterentwicklung des 20F Plasmids dar. Die veränderten Eigenschaften lassen sich auf die Veränderung von Aminosäuren am N-Terminus der Luciferase und des Verbindungspeptid (Binkowski et al., 2011).

3. Methodik und Material

3.1 Materialien

Cell Attachment Solution (CAS)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
GloSensor™ cAMP Reagent	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Thyretain® Growth Medium (GM)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Thyretain® Reaction Buffer (RB)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Thyretain® Controls	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TBI Working Solution	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TBI cAMP Reagent	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TBI Negative, Positive and Reference Control	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA

Turbo™ TSI Cells	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI Negative Control (Neutral Cap)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI Low Positive Control (White Cap)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI Mid Positive Control (Brown Cap)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI High Positive Control (Black Cap)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI cAMP Reagent (6:100)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI Negative Control (Neutral Cap)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI Standard A (Red Cap)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI Standard B (Orange Cap)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI Standard C (Yellow Cap)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI Standard D (Blue Cap)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA
Turbo™ TSI Standard E (Purple Cap)	Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA

Tabelle (Tab.) 1 Verwendete Chemikalien.

Costar® 96-well schwarze Multiwellplatte, durchsichtiger Boden	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Costar® 96-well weiße Multiwellplatte, weißer Boden	Mediomics, LLC, St. Louis, Missouri, USA
Pipettenspitzen Dual Filter T.I.P.S.	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Reagenz Reservoir (50ml, 100ml)	VistaLab™ Technologies, Brewster, NY, USA
Gamma Wipe® 67 Sterile Tücher	Berkshire Corporation, Surbiton, Surrey, England
Cellstar® Serologische Pipetten (10ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

Tab. 2 Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Cobas e411 analyzer	Roche Diagnostics, Mannheim
ALINITY i Immunoassay-System	Abott, Wiesbaden, Deutschland
Inkubator	Sanyo, Moriguchi, Präfektur Osaka, Japan
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Holten Laminair	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau, Deutschland
GloMax 96 Microplate Luminometer	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Multikanalpipette 20 - 200µL	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Einkanalpipette 5 - 20µL	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Einkanalpipette 100 - 1000µL	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Elektrische Pipetten 1-10µL Eppendorf Xplorer®	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Wärmebad	Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen, Deutschland

Tab. 3 Verwendete Geräte.

Turbo™ TBI Bioassay (Thyretain®)	Quidel, Athens, Ohio, USA
TBI Bioassay (Thyretain®)	Quidel, Athens, Ohio, USA
TSI Bioassay (Thyretain®)	Quidel, Athens, Ohio, USA
Elecsys® Anti-TPO Testkit, Calibrators and Controls	Roche Diagnostics, Mannheim
Elecsys® TSH Testkit, Calibrators and Controls	Roche Diagnostics, Mannheim
Elecsys® Anti-Tg Testkit, Calibrators and Controls	Roche Diagnostics, Mannheim
Elecsys® FT4 III Testkit, Calibrators and Controls	Roche Diagnostics, Mannheim
Elecsys® FT3 III Testkit, Calibrators and Controls	Roche Diagnostics, Mannheim
Elecsys® Anti-TSH-R Testkit, Calibrators and Controls	Roche Diagnostics, Mannheim

Alinity i Anti-TPO Reagent Kit 200, Calibrators and Controls	Abott Ireland Diagnostics Limited, Sligo, Ireland
Alinity i TSH Reagent Kit 200, Calibrators and Controls	Abott Ireland Diagnostics Limited, Sligo, Ireland
Alinity i Anti-Tg Reagent Kit 200, Calibrators and Controls	Abott Ireland Diagnostics Limited, Sligo, Ireland
Alinity i Free T4 Reagent Kit 200, Calibrators and Controls	Abott Ireland Diagnostics Limited, Sligo, Ireland
Alinity i Free T3 Reagent Kit 200, Calibrators and Controls	Abott Ireland Diagnostics Limited, Sligo, Ireland
Alinity i TRAb Reagent Kit 200, Calibrators and Controls	Abott Ireland Diagnostics Limited, Sligo, Ireland

Tab. 4 Verwendete Kits.

FreshFrozenCells® CHO Mc4 Zellen	Quidel, Athens, OH, USA
HCBS-TSH-R-Mc4 Zellen	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA

Tab. 5 Verwendete Zelllinien.

3.2 Zusammenstellung des Patientenkollektivs

212 Serumproben von 131 Patienten mit einer AITD (MB oder HT) wurden als Kollektiv verwendet. Die Proben wurden aus dem Fachbereich Endokrinologie der I. Medizinischen Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität ab 2002 selektiert. Das Kollektiv stammt aus der täglichen Laborroutine, welches sich aus hausinternen sowie externen Proben zusammensetzt. Die Patienten wurden entweder zuvor positiv auf blockierende Antikörper getestet oder wiesen klinische Anzeichen für eine AITD auf. Es wurden klinische Parameter wie fT4, freies Triiodthyronin (fT3), TSH, TPO-Ak und TAK bei Abnahme oder Ankunft der Proben bestimmt. Ausgebliebene Laborwertbestimmungen wurden bei ausreichendem Serumvolumen nachbestimmt. Die dafür verwendeten Messverfahren und Zellen sind tabellarisch dargestellt (Tab. 6). Zur Erstellung eines Kontrollkollektivs wurden Serumproben von 90 freiwilligen, gesunden Probanden gesammelt. Der Gesundheitsstatus wurde anhand eines Fragebogens erhoben. Durch Bestimmung des fT4, fT3, TSH, TPO-Ak und TAK wurde eine unerkannte AITD ausgeschlossen und eine Euthyreose sichergestellt (Cobas e

411, Roche Diagnostics, Mannheim). Die Proben des Kontrollkollektivs wurden mit dem Turbo™, Thyretain® Bioassay und einem TRAK Immunoassay (Cobas e411, Roche, Mannheim, Deutschland) gemessen.

Die Thyretain® TBI- und TSI-Werte des AITD-Kollektivs wurden bei Ankunft bzw. Abnahme der Probe gemessen und ausgewertet. Die Turbo™ TSI- und TBI-Werte in sämtlichen Proben wurden ermittelt.

Aufgrund der hohen Anzahl an Turbo™ TSI-positiven Proben im AITD-Kollektiv wurden diese erneut vom ursprünglichen Anwender (Anwender 1) und einem zweiten Anwender (Anwender 2) gemessen. Insgesamt ergibt sich aus dem Patienten- und Kontrollkollektiv ein Gesamtkollektiv von 302 Serumproben von 221 Patienten.

3.3 Durchführung des Turbo™ Bioassays

Für den Turbo™ Bioassay wurden Materialien und Chemikalien von Quidel (Quidel, Athens, OH, USA) zur Verfügung gestellt (Tabelle (Tab.) 1 - Tab. 5). Der Turbo™ TBI Bioassay verwendet weiße 96-Well-Platten mit weißem Boden. Im Gegensatz zum Thyretain® Bioassay werden alle 96 Vertiefungen der Platte für die Messung verwendet. Sechs Vertiefungen sind für Duplikate der Positiv-, Negativ- und Referenzkontrolle reserviert. Für den Turbo™ TSI sind zusätzlich standardisierte Konzentrationen (Standard A bis E) in Duplikaten auf der 96-Well Platte anzulegen. Im Turbo™ TBI können 90 Serumproben, mit dem Turbo™ TSI 39 in einer Sitzung gemessen werden (Abb. 3 und Abb. 4). Im Gegensatz zum Thyretain® sind für die Durchführung des Turbo™ TBI/TSI Bioassays keine aseptischen Bedingungen erforderlich. Im ersten Schritt wird mit Hilfe einer elektrischen Pipette (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) 10µl Blutserum in die Ecke jeder Vertiefung pipettiert. Im nächsten Schritt werden 50µl der Arbeitslösung mit einer 20µl-200µl Mehrkanalpipette in die Vertiefungen gegeben. Die Lösung wird dann durch leichtes Schütteln der Platte auf der Arbeitsfläche homogenisiert. Anschließend werden 5ml der cAMP-Reagenz zur Turbo™ TBI-Zellsuspension gegeben und 50µl dieser Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wird dann 60 Minuten lang bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht inkubiert. Nach der Inkubation werden die Lichtsignale mithilfe des GloMax® 96 Microplate Luminometers (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) quantifiziert. Die Durchführung des Turbo™ TSI Bioassays geschieht analog zum Turbo™ TBI Bioassay. Im Gegensatz zum Turbo™ TBI werden im TSI Bioassay 5 µl benötigt und nach dem Schema in Abb. 3 ohne Zugabe von Arbeitsmedium pipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde werden die Lichtsignale analog zum Turbo™ TBI im GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) ausgemessen und ausgewertet. Duplikate mit einem Variationskoeffizienten von >15% werden für die weitere Auswertung verworfen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Neg Ctrl	Neg Ctrl	Pat 11	Pat 19	Pat 27	Pat 35	Pat 43	Pat 51	Pat 59	Pat 67	Pat 75	Pat 83
B	Pos Ctrl	Pos Ctrl	Pat 12	Pat 20	Pat 28	Pat 36	Pat 44	Pat 52	Pat 60	Pat 68	Pat 76	Pat 84
C	Ref Ctrl	Ref Ctrl	Pat 13	Pat 21	Pat 29	Pat 37	Pat 45	Pat 53	Pat 61	Pat 69	Pat 77	Pat 85
D	Pat 1	Pat 6	Pat 14	Pat 22	Pat 30	Pat 38	Pat 46	Pat 54	Pat 62	Pat 70	Pat 78	Pat 86
E	Pat 2	Pat 7	Pat 15	Pat 23	Pat 31	Pat 39	Pat 47	Pat 55	Pat 63	Pat 71	Pat 79	Pat 87
F	Pat 3	Pat 8	Pat 16	Pat 24	Pat 32	Pat 40	Pat 48	Pat 56	Pat 64	Pat 72	Pat 80	Pat 88
G	Pat 4	Pat 9	Pat 17	Pat 25	Pat 33	Pat 41	Pat 49	Pat 57	Pat 65	Pat 73	Pat 81	Pat 89
H	Pat 5	Pat 10	Pat 18	Pat 26	Pat 34	Pat 42	Pat 50	Pat 58	Pat 66	Pat 74	Pat 82	Pat 90

Abb. 3 Pipettierschema einer 96-Well-Platte im Turbo™ TBI.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD A	STD A	NPC	NPC	Pat 8	Pat 8	Pat 16	Pat 24	Pat 24	Pat 30	Pat 32	Pat 32
B	STD B	STD B	Pat 1	Pat 1	Pat 9	Pat 9	Pat 17	Pat 25	Pat 25	Pat 31	Pat 33	Pat 33
C	STD C	STD C	Pat 2	Pat 2	Pat 10	Pat 10	Pat 18	Pat 26	Pat 26	Pat 32	Pat 34	Pat 34
D	STD D	STD D	Pat 3	Pat 3	Pat 11	Pat 11	Pat 19	Pat 27	Pat 27	Pat 33	Pat 35	Pat 35
E	STD E	STD E	Pat 4	Pat 4	Pat 12	Pat 12	Pat 20	Pat 28	Pat 28	Pat 34	Pat 36	Pat 36
F	HPC	HPC	Pat 5	Pat 5	Pat 13	Pat 13	Pat 21	Pat 29	Pat 29	Pat 35	Pat 37	Pat 37
G	MPC	MPC	Pat 6	Pat 6	Pat 14	Pat 14	Pat 22	Pat 22	Pat 30	Pat 30	Pat 38	Pat 38
H	LPC	LPC	Pat 7	Pat 7	Pat 15	Pat 15	Pat 23	Pat 23	Pat 31	Pat 31	Pat 39	Pat 39

Abb. 4 Pipettierschema einer 96-Well-Platte im Turbo™ TSI.

3.4 Auswertung des Turbo™ TBI Bioassays

In beiden Assays wird die Potenz der TBI in % Inhibition gemessen. Die prozentuale Hemmung im Turbo™ TBI Bioassay wird aus den arithmetischen Mittelwerten (\bar{x}) der Duplikate errechnet (Formel 1).

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\bar{x}_{\text{Referenz}} - \bar{x}_{\text{Patientenserum}}}{\bar{x}_{\text{Referenz}}} \times 100$$

Formel 1 Berechnung der % Inhibition.

Die Grenze für Positivität liegt für den Thyretain® TBI bei ≥ 34 % Inhibition, während eine Probe mit ≥ 40 % Inhibition im Turbo™ TBI Bioassay als positiv gilt. Die Grenzwerte sind vom Hersteller vorgegeben. Die Berechnung der Messwerte findet mit Microsoft Excel Version 16.77.1 statt (Microsoft Cooperation, Redmond Washington, USA, <https://www.microsoft.com/de-de/microsoft-365/excel>, 2023).

3.5 Auswertung des Turbo™ TSI Bioassays

Die RLU-Werte werden in IU/L umgerechnet. Hierbei werden die gemessenen RLU-Werte mit der Verdünnungskurve verglichen, welche sich aus den Standards A bis E ergibt. Aus den 5 Parametern wird eine logistische Regression erstellt, wodurch die Konzentration von TSI in den Proben berechnet wird (Miao et al., 2022). Der Cut-off liegt für den Turbo™ TSI bei 0,024 IU/L. Die Berechnung der Messwerte findet mit Microsoft Excel Version 16.77.1 statt (Microsoft Cooperation, Redmond Washington, USA, <https://www.microsoft.com/de-de/microsoft-365/excel>, 2023).

3.6 Erhebung klinischer Laborparameter

Die Erhebung klinischer Parameter wurde hauptsächlich mithilfe des Cobas e411 (Roche, Mannheim, Deutschland) und des Alinity I-Moduls (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) bewerkstelligt. Eine Anzahl der Proben wurde extern durch den Absender unter Weitergabe der Grenzwerte bestimmt. Tab. 6 gibt Aufschluss über die Nutzung der verschiedenen Verfahren. Vereinzelt musste aufgrund des mangelnden Serumvolumens auf die Bestimmung einiger Parameter verzichtet werden.

	Cobas e 411 (Roche)	Alinity I Modul (Abott)	Extern	Nicht erhoben	Gesamt
ft4	115	46	46	5	207
ft3	111	47	39	15	197
TSH	103	51	54	4	208
TPO-Ak	125	31	25	31	181
TAK	124	32	27	29	183
TRAK	149	54	9	0	212

Tab. 6 Verfahren zur Bestimmung klinischer Parameter.

3.7 Herstellung einer Turbo™ TBI Bioassay-Verdünnungsreihe

Für die Herstellung einer Verdünnungsreihe wurde eine K1-70 Ausgangslösung mit einer Konzentration von 1,3 mg/ml zu einer Konzentration von 10 µg/ml in RB verdünnt. Mit dieser Konzentration wurden 17 Verdünnungsstufen nach Tab. 7 hergestellt. Für Thyretain® TBI wurden 16 Verdünnungen mit einer Konzentration von 363,63 ng/ml und 0,011 ng/ml verwendet.

Die Verdünnungsstufen wurden durch den Turbo™ TBI gemessen die RLU graphisch unter Verwendung von GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Boston,

Massachusetts, <https://www.graphpad.com/company>, 2024) dargestellt. Der IC₅₀- und IC₈₀-Wert wurden bestimmt.

K1-70 (in ng/ml)		RB
8000	80 µl (10 µg/ml K1-70)	+ 20 µl
4000	50 µl	+ 50 µl
2000	50 µl	+ 50 µl
1000	50 µl	+ 50 µl
500	50 µl	+ 50 µl
250	50 µl	+ 50 µl
125	50 µl	+ 50 µl
62,5	50 µl	+ 50 µl
31,25	50 µl	+ 50 µl
15,63	50 µl	+ 50 µl
7,81	50 µl	+ 50 µl
3,9	50 µl	+ 50 µl
1,95	50 µl	+ 50 µl
0,98	50 µl	+ 50 µl
0,49	50 µl	+ 50 µl
0,245	50 µl	+ 50 µl
0,1225	50 µl	

Tab. 7 K1-70 Verdünnungsreihe RB.

3.8 Präzisionsmessung des Turbo™ TBI Bioassays

Zur Messung der Präzision des Turbo™ TBI Bioassays wurden fünf Proben auf fünf separaten Platten in jeweils vier verschiedenen Durchläufen gemessen (Anwender 1). Die Messung wurde von einem zweiten Anwender (Anwender 2) wiederholt. Bei beiden Messungen wurde eine gemeinsame Charge verwendet (Charge 1) und der Durchlauf von geübten Anwendern durchgeführt. Die ausgewählten Proben beinhalten zwei niedrig-positive, zwei mittel-positive und ein hoch-positives Serum (Tab. 8). Zusätzlich wurde der Versuch mit einer neuen Charge (Charge 2) des Turbo™ TBI Bioassays wiederholt.

Serumprobe	Thyretain® TBI in % Inhibition
1	39
2	44
3	48
4	64
5	95

Tab. 8 Verwendete Serumproben zur Präzisionsanalyse.

3.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse des Turbo™ TBIs, Thyretain® TBIs und den TRAK Immunoassays wurden anhand des Spearman-Korrelationskoeffizienten verglichen. Die Resultate wurden in einer linearen Regression visualisiert. Die Sensitivität und Spezifität des Thyretain® TBIs und Turbo™ TBIs wurden in einer „receiver operating curve“ (ROC) aufgetragen und die „area under the curve“ (AUC) berechnet. Die Messung der Turbo™ TBI-positiven Proben wurde mittels gepaartem t-Test auf Signifikanz geprüft. Der Zusammenhang der Assay Resultate und Schilddrüsenfunktion wurde anhand des Mann-Whitney-U-Tests (MWU) untersucht (Nachar, 2008). Die Effektstärken r des MWU wurden mittels Z-Wert ermittelt und nach den Richtlinien von Cohen interpretiert (Fritz et al., 2012).

Die Präzision des TBI Bioassays wurde anhand des Mittelwertes und des Variationskoeffizienten bestimmt und in einem Diagramm aufgetragen. Die Mittelwerte der Messtage und Variationskoeffizienten von beiden Anwendern wurden mittels gepaartem t-Test verglichen. Alle Mittelwerte der Charge 1 wurden mit den Mittelwerten der Charge 2 durch einen ungepaarten t-Tests geprüft.

Das Signifikanzniveau α wurde auf 5% gesetzt. Korrelationen und Diagramme wurden mit IBM® SPSS® Statistics 23 (Armonk, New York) und MedCalc 20.118 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2021) erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Demografische und serologische Daten

Tab. 9 beschreibt die erhobenen Daten des Gesamtkollektivs. Von 302 Proben wurden anteilig fT4-, fT3- und TSH- Werte bestimmt. Die Schilddrüsenfunktion der Proben wurde anhand der Schilddrüsenhormone, TSH und der medikamentösen Therapie festgestellt. TSH-, fT3- und fT4-Werte sind nach Shapiro-Wilk (SW) parametrisch verteilt ($TSH_{psw}=0,348$; $fT3_{psw}=0,555$; $fT4_{psw}=0,522$), während TRAK-, Thyretain® TBI/TSI- Werte nicht normalverteilt sind ($psw < 0,05$). Das Alter, TAK, TPO-Ak und zeigen ebenso eine nichtparametrische Verteilung ($psw < 0,05$). Tab. 10 zeigt die Durchschnitte (\bar{x}) bzw. Mediane des Kontrollkollektivs, mit Standardabweichungen (SD) bzw. Perzentilen (P).

		AITD-Kollektiv	Kontrollkollektiv
Proben n= 302 / Probanden n= 221		212/ 131	90 / 90
Alter		Median: 33 (25. P 13; 75. P 47,5)	Median: 24 (25. P 23; 75. P 25,25)
Geschlecht (weiblich/ männlich) Verhältnis (weiblich : männlich)		97 (74,0%) / 34 (26,0%) 2,9 : 1	54 (60%) / 36 (40%) 3 : 2
Diagnose (Proben/ Probanden)	Morbus Basedow Hashimoto Thyroiditis Neonatale Hypothyreose	87 (41,0%) / 24 (18,3%) 65 (30,7%) / 52 (39,7%) 9 (4,2%) / 6 (4,6%)	-
Schilddrüsenfunktion	hypothyreot euthyreot hyperthyreot	149 (70,3%) 47 (22,2%) 16 (7,5%)	0 (0%) 90 (100%) 0 (0%)

Tab. 9 Demografische Daten des Kontroll- und AITD-Kollektivs.

Kontrollkollektiv (N=90)	
Geschlecht (weiblich/ männlich)	54 (60%) / 36 (40%)
Geschlechterverhältnis	3 : 2
Alter Median	24 (25% P 23,00; 75% P 25,25)
TSH \bar{x}	2,06 IU/ml (SD 0,717 IU/ml)
fT3 \bar{x}	3,3 pmol/L (SD 0,390 pmol/L)
fT4 \bar{x}	1,25 pmol/L (SD 0,179 pmol/L)
TAK Median	11,2 IU/ml (25% P 10 IU/ml; 75% P 15,91 IU/ml)
TPO-Ak Median	9,76 IU/ml (25% P 7,26 IU/ml; 75% P 12,90 IU/ml)

Tab. 10 Klinische Parameter des Kontrollkollektivs.

4.2 Ergebnisse der Immunoassays

Das Balkendiagramm in Abb. 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse aller Assays. Unter den Proben zeigen sich mehrere mehrfach positive Proben (Tab. 11). Tab. 12 stellt eine qualitative Zusammenfassung der Ergebnisse dar. Die Prüfung der Turbo™ TSI Zweitmessung ist in Tab. 13 aufgeschlüsselt. Aufgrund des mangelnden Serumvolumens konnten nicht alle Seren erneut mit dem Turbo™ TSI Bioassay bestimmt werden.

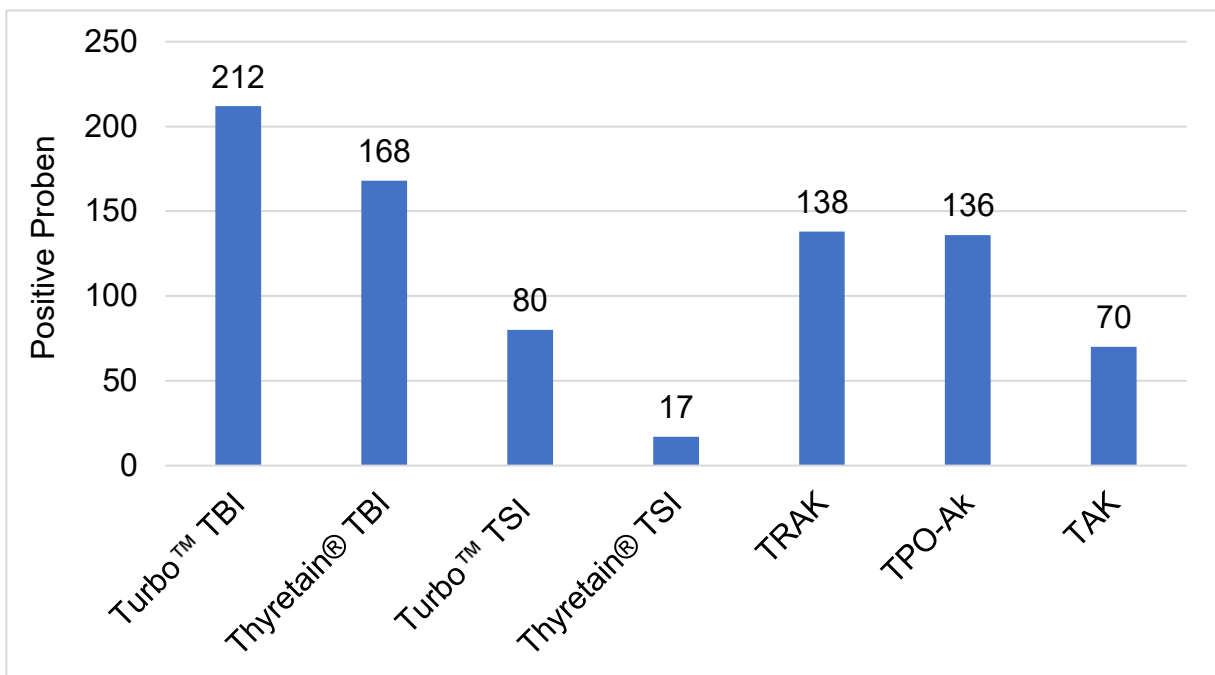


Abb. 5 Anzahl positiver Proben in allen serologischen Tests N=212 (131 Patienten). Grenzwerte Turbo™ TBI > 40 % Inhibition; Thyretain® TBI > 34 % Inhibition; Turbo™ TSI > 0,024 IU/L; Thyretain® TSI > 140 % SRR; TRAK Cobas e114; TRAK Alinity; TPO-Ak; TAK.

Turbo™ TBI	Thyretain® TBI	Turbo™ TSI	Thyretain® TSI	TRAK	Proben (N=212)	Patienten (N=131)
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	9 (4,25%)	8 (6,11%)
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	2 (0,94%)	1 (0,76%)
(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	61 (28,77%)	20 (15,27%)
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	5 (2,36%)	3 (2,29%)
(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	2 (0,94%)	2 (1,53%)
(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	62 (29,25%)	36 (27,48%)
(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	27 (12,74%)	23 (17,56%)
(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	1 (0,47%)	1 (0,76%)
(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	1 (0,47%)	1 (0,76%)
(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	1 (0,47%)	1 (0,76%)
(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	3 (1,42%)	3 (2,29%)
(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	38 (17,92%)	38 (29,01%)

Tab. 11 Überblick über mehrfach positive Proben in den verwendeten Assays.

302 Proben / 221 Patienten	Werte in % Inhibition
Turbo™ TBI Bioassay Median	58 (25% P 17,73; 75% P 73,43)
Thyretain® TBI Bioassay Median	48 (25% P 7,75; 75% P 79)
Turbo™ TSI Bioassay Median	0,001 IU/L (25% P 0,001 IU/L; 75% P 0,033 IU/L)
Thyretain® TSI Bioassay Median	51,50 (25% P 38,00; 75% P 81,00)
TRAK Immunoassays Median	0,8 IU/L (25% P 0,3 IU/L; 75% P 24,6 IU/L)

Tab. 12 Qualitative Zusammenfassung der Ergebnisse.

Probe	1. Messung Anwender 1 in (IU/L)	2. Messung Anwender 1 in (IU/L)	3. Messung Anwender 2 in (IU/L)
21	0,075	0,160	0,110
26	0,058	0,084	0,074
27	0,420	0,646	0,545
35	0,091	0,130	0,130
38	0,051	-	-
39	0,032	0,034	0,056
40	0,025	-	-
43	0,024	0,028	0,056
44	0,028	Negativ	0,050
46	0,145	0,236	0,512
47	0,036	0,092	0,164
49	0,051	0,083	0,079
54	0,063	0,071	0,075
64	0,256	0,343	0,089
70	0,082	0,084	0,236
75	0,132	0,151	0,079
76	0,059	0,090	0,145
78	0,183	0,307	0,075
80	0,045	0,079	0,204
81	0,056	0,041	0,063
82	0,090	0,171	0,070
83	0,046	0,116	0,155
84	0,041	0,044	0,069
89	0,099	0,081	0,046
90	0,028	0,112	0,085
91	0,041	0,086	0,078
92	0,100	0,130	0,055
93	0,104	-	-
94	0,064	-	-
97	0,099	0,179	0,113
98	0,116	0,173	0,092
99	0,117	0,233	0,113
103	0,090	-	-
104	0,091	0,153	0,097
106	0,107	0,194	0,109
107	0,099	-	-
108	0,025	0,063	0,119
110	0,043	0,080	0,060
111	0,066	0,099	0,121
113	0,046	0,182	Negativ

114	0,037	Negativ	0,095
115	0,062	0,164	0,058
117	0,092	0,162	0,086
121	0,108	0,170	0,100
124	0,065	0,128	0,113
125	0,114	0,154	0,125
126	0,098	0,147	0,107
127	0,063	0,156	0,095
128	0,086	0,129	0,125
129	0,109	0,188	0,073
132	0,090	0,145	0,100
134	0,095	0,148	0,082
138	0,180	0,305	0,114
139	0,096	0,150	0,245
141	0,081	0,161	0,149
144	0,074	0,117	0,120
145	0,075	0,187	0,096
146	0,099	0,171	0,090
151	0,095	0,178	0,087
158	0,265	0,406	0,114
159	0,117	Negativ	0,262
163	0,109	0,147	0,059
164	0,096	0,128	Negativ
170	0,098	0,148	0,080
172	0,071	0,174	0,116
173	0,046	0,090	0,161
174	0,099	0,169	0,098
177	0,040	0,077	0,069
178	0,112	0,171	0,141
181	0,100	-	-
182	0,099	-	-
183	0,103	-	-
186	0,037	0,121	0,169
190	0,072	0,156	0,071
193	0,115	0,223	0,095
194	0,052	0,103	0,142
195	0,091	0,177	0,182
196	0,102	-	-
203	0,044	-	-
238	0,027	-	-

Tab. 13 Ergebnisse der Turbo™ TSI Zweitmessung.

K1-70 Konzentration (ng/ml)	RLU	
	Replikat 1	Replikat 2
363,63	61	65
181,81	83	75
90,91	125	212
45,45	247	286
22,72	473	455
11,36	953	996
5,68	1796	1530
2,84	2494	2401
1,42	2694	2734
0,71	2203	2964
0,35	2527	2935
0,18	2626	2906
0,09	2589	2918
0,045	3143	3322
0,02	3273	3401
0,011	3063	2971

Tab. 14 Thyretain® TBI-Ergebnisse der Verdünnungsreihe.

Die Ergebnisse der Verdünnungsreihe mit RB sind in Tab. 14 und Tab. 15 abgebildet und grafisch in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellt. Die IC_{50} - und IC_{80} -Werte für den Turbo™ TBI betragen $IC_{50}= 1,55$; $\log (IC_{50})= 0,19$; $IC_{80}= 3,48$; $\log (IC_{80})= 0,54$) und für den Thyretain® TBI $IC_{50}= 6,76$, $\log (IC_{50})= 0,83$; $IC_{80}= 18,45$; $\log (IC_{80})= 1,72$.

Im Bland-Altman-Diagramm (Abb. 8) streuen die Werte mit leichter systemischer Abweichung zwischen TBI-Mittelwerten von 10 % bis 50 % Inhibition. Turbo™ TBI-Ergebnisse sind in diesem Bereich höher als Thyretain® TBI-Ergebnisse, sodass sich der Mittelwert der Differenz der Ergebnispaaere auf -6,705 % beläuft.

K1-70 Konzentration (ng/ml)	RLU	
	Replikat 1	Replikat 2
727,27	5330	5160
363,64	5250	4930
181,82	5480	5970
90,91	5780	6150
45,45	6660	7010
22,73	8510	8670
11,36	11300	13000
5,68	29300	29500
2,84	101000	99600
1,42	201000	183000
0,71	280000	276000
0,35	323000	326000
0,18	349000	326000
0,09	350000	350000
0,04	360000	347000
0,02	363000	356000
0,01	357000	337000

Tab. 15 Turbo™ TBI-Ergebnisse der Verdünnungsreihe.

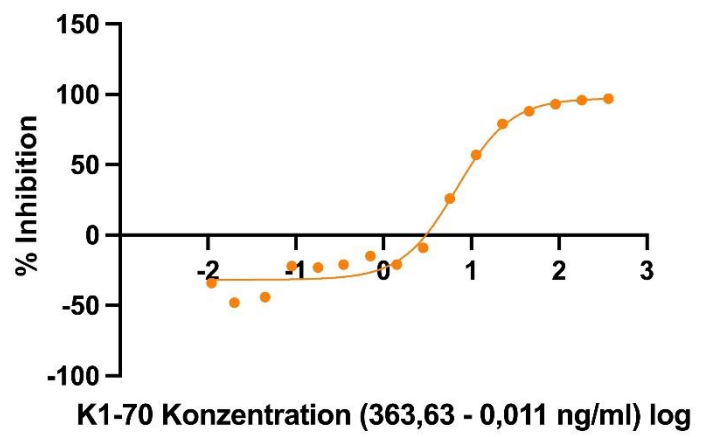
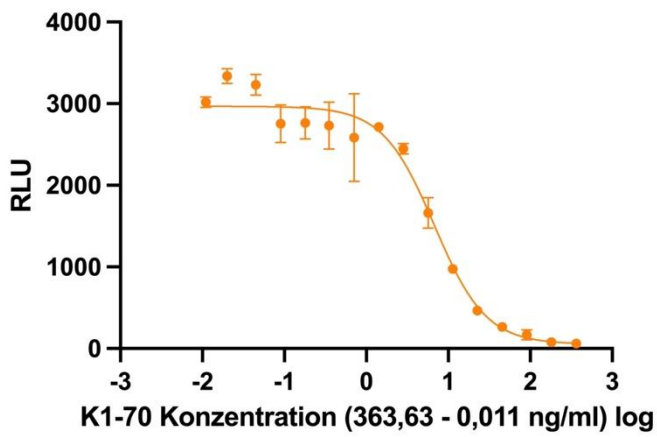


Abb. 6 Dosis-Wirkungs-Kurve durch Messung einer K1-70-Verdünnungsreihe mit dem Thyretain® TBI Bioassay
 $IC_{50} = 6.76$; $\log(IC_{50}) = 0.83$; $IC_{80} = 18.45$; $\log(IC_{80}) = 1.72$.

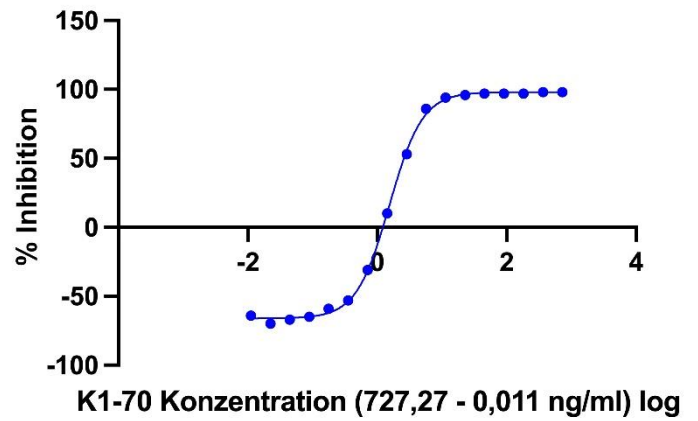
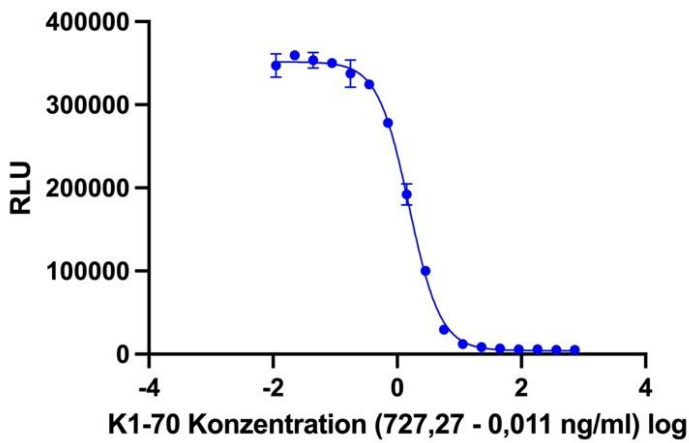


Abb. 7 Dosis-Wirkungs-Kurve durch Messung einer K1-70-Verdünnungsreihe mit dem Turbo™ TBI Bioassay
 $IC_{50} = 1.55$; $\log(IC_{50}) = 0.19$; $IC_{80} = 3.48$; $\log(IC_{80}) = 0.54$.

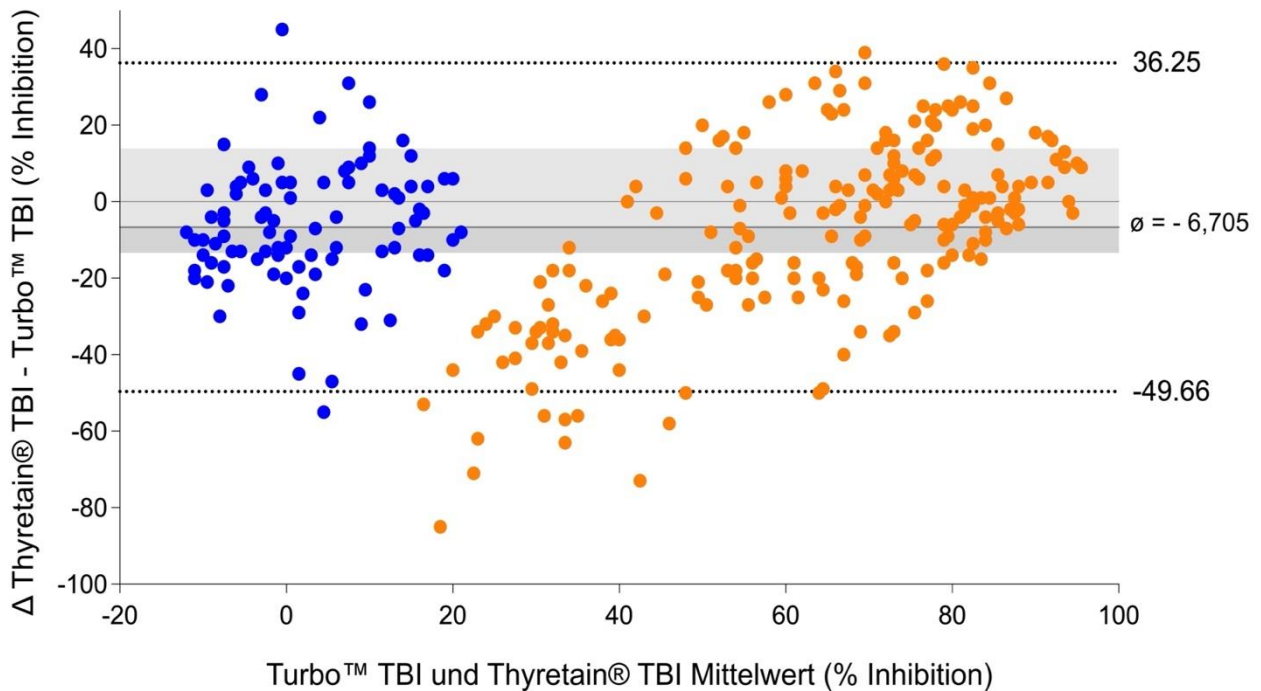


Abb. 8 ● AITD ● Kontrollkollektiv. Bland-Altman-Diagramm der Turbo™- und Thyretain® TBI-Ergebnisse.

Es folgt der Vergleich der Immunoassays mithilfe des Spearmans' Korrelationskoeffizienten. Die Ergebnisse des Thyretain® TBIs und Turbo™ TBIs korrelieren stark miteinander, die Korrelation ist signifikant (Spearman's $Rho_{\text{Turbo}^{\text{TM}}\text{Thyretain}^{\text{®}}}$ = 0,80; 95% CI 0,75 – 0,84; $p < 0,001$). Ähnliche Korrelationswerte lassen sich zwischen den Ergebnissen des TRAK Immunoassays und den beiden TBI Bioassays berechnen (Spearman's $Rho_{\text{Turbo}^{\text{TM}}\text{TRAK}}$ = 0,74; 95% CI 0,69 – 0,79; $p < 0,001$; Spearman's $Rho_{\text{Thyretain}^{\text{®}}\text{TRAK}}$ = 0,78; 95% CI 0,69 – 0,79; $p < 0,001$). Die Ergebnisse der TRAK-, Thyretain®- und Turbo™- Assays wurden anhand einer Passing-Bablok-Regression verglichen (Abb. 9 Abb. 11). Abb. 12 veranschaulicht den Vergleich der diagnostischen Leistungsfähigkeit anhand eines ROC-Diagramms. Der Turbo™ TBI zeigt eine Sensitivität (95% CI 98,28% – 100%) und Spezifität (95% CI 95,98 % – 100%) von 100 %. TRAK und Thyretain® TBI erreichen eine Sensitivität von 65,09 % (95% CI 58,27% – 71,49%) bzw. 79,25% (95% CI 73,9% – 84,5%) bei einer Spezifität von 100 % (95% CI 95,98% – 100% für TRAK und 95% CI 95,98% – 100% für Thyretain® TBI) (Tab. 16 - Tab. 19). Die AUC des Turbo™ TBI und Thyretain® TBI Bioassays im ROC-Diagramm (Abb. 12) betragen 1,0 (95% CI 0,986 – 1,000) und 0,95 (0,919 – 0,972). Die AUC der TRAK Immunoassays beträgt 0,952 (95% CI 0,921 – 0,973).

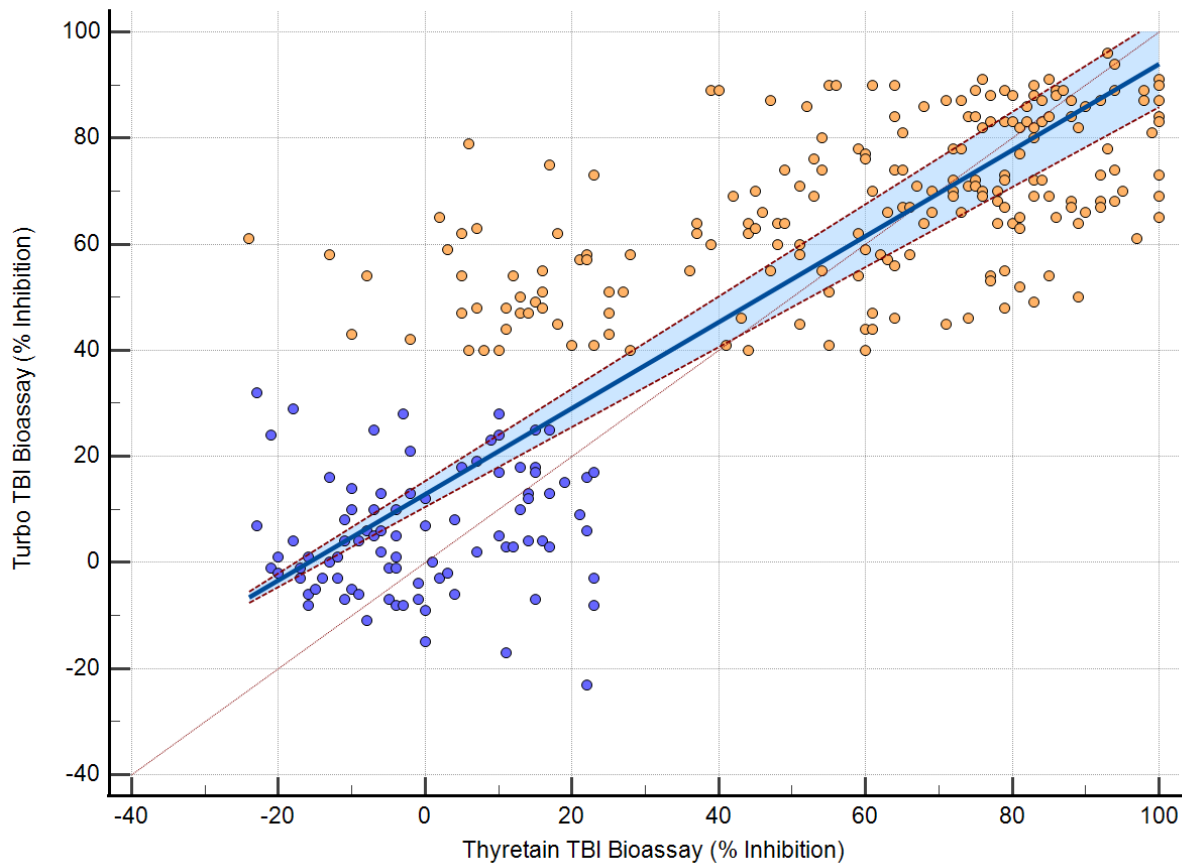


Abb. 9 ● AITD ● Kontrollkollektiv. Passing-Bablok-Regression der Turbo™- und Thyretain® TBI-Ergebnisse. Der blaue Bereich markiert das 95%-Konfidenzintervall. N= 302 (221 Patienten) Spearman's Rho = 0,80 (95 CI 0,75 - 0,84); $p < 0,001$; $y = 12,878378 + 0,810811x$.

n= 302	Thyretain® TBI	Thyretain® TBI
Turbo™ TBI negativ	90 (29,8%)	0 (0%)
Turbo™ TBI positiv	44 (14,6%)	168 (55,6%)

Tab. 16 Ergebnismatrix Turbo™ TBI und Thyretain® TBI.

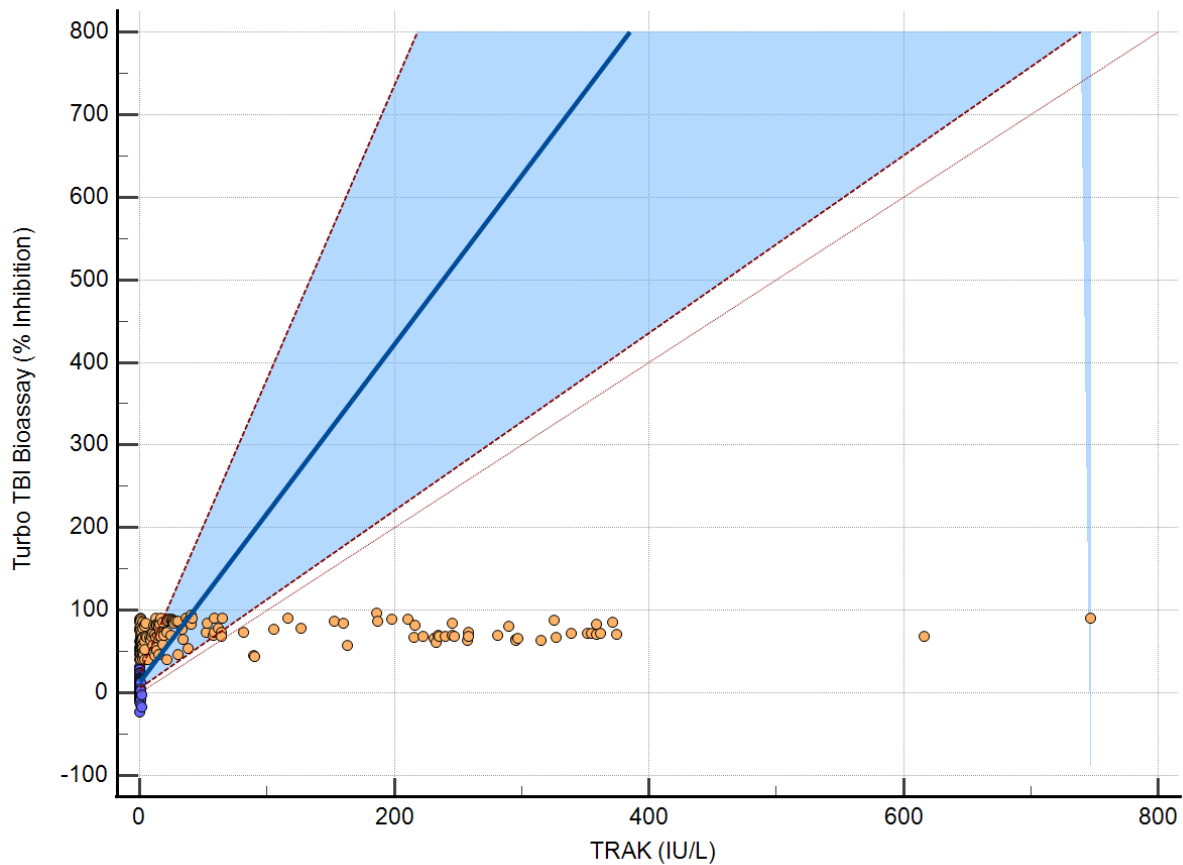


Abb. 10 ● AITD ● Kontrollkollektiv. Passing-Bablok-Regression der Turbo™ TBI- und TRAK-Ergebnisse. Der blaue Bereich markiert das 95%-Konfidenzintervall. N= 302 (221 Patienten) Spearman's Rho= 0,74 (95 CI 0,69 - 0,79); $p < 0,001$; $y = 12,886751 + 2,044164x$.

n= 302	TRAK negativ	TRAK positiv
Turbo™ TBI negativ	90 (29,8%)	0 (0%)
Turbo™ TBI positiv	74 (24,5%)	138 (45,7%)

Tab. 17 Ergebnismatrix Turbo™ TBI und TRAK.

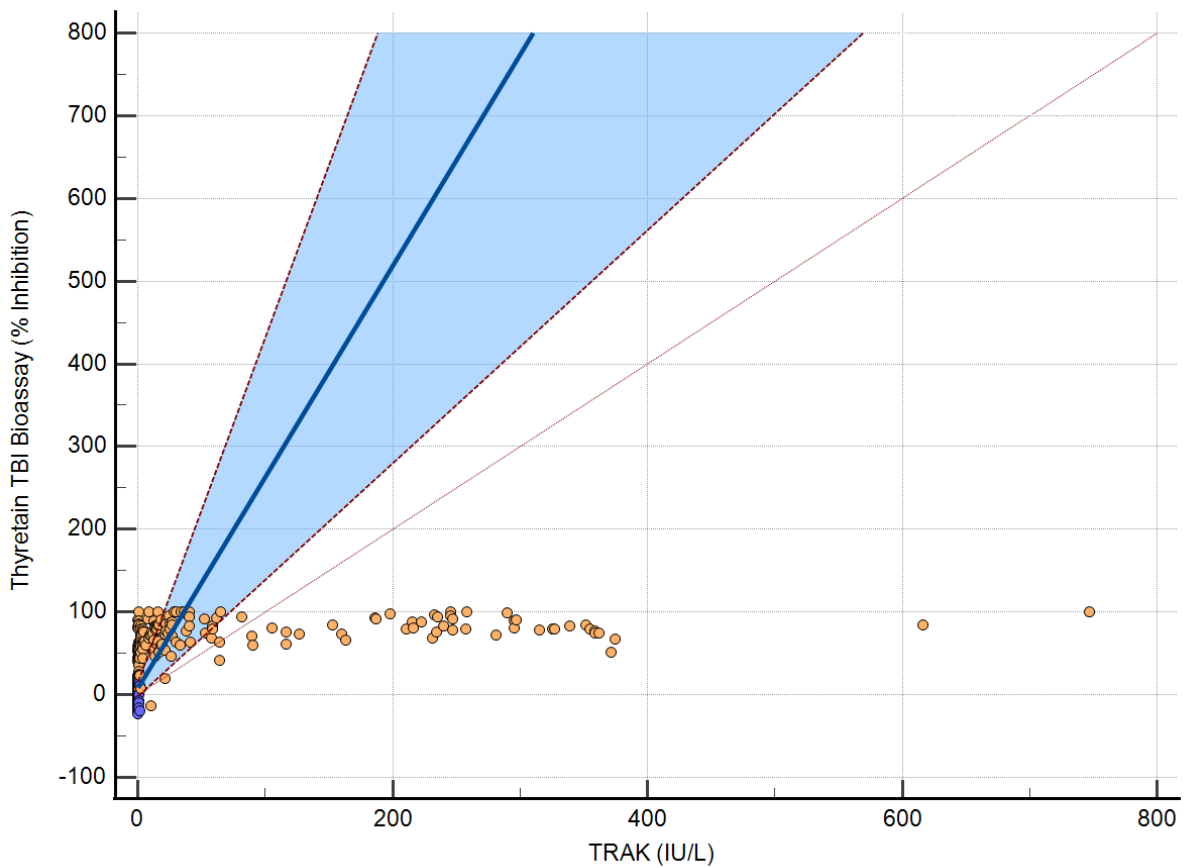


Abb. 11 ● AITD ● Kontrollkollektiv. Passing-Bablok-Regression der Thyretain® TBI- und TRAK-Ergebnisse. Der blaue Bereich markiert das 95%-Konfidenzintervall. N= 302 (221 Patienten) Spearman's Rho= 0,78 (95 CI 0,69 - 0,79); $p < 0,001$; $y = 7,647078 + 2,553518x$.

n= 302	TRAK negativ	TRAK positiv
Thyretain® TBI negativ	130 (43,0%)	4 (0,1%)
Thyretain® TBI positiv	34 (11,3%)	134 (44,4%)

Tab. 18 Ergebnismatrix Thyretain® TBI und TRAK.

	AITD-Seren	Kontrollseren
Turbo™ TBI Bioassay	212 (70,2%)	0
	0	90 (29,8%)
Thyretain® TBI Bioassay	168 (55,6%)	0
	44 (14,6%)	90 (29,8%)
TRAK Immunoassays	138 (45,7%)	0
	74 (24,5%)	90 (29,8%)

Tab. 19 Unterschiede in der Testgenauigkeit zwischen Turbo™ TBI, Thyretain® TBI und TRAK.

Das ROC-Diagramm veranschaulicht die Fähigkeit des Turbo™- und Thyretain®-TBI-Bioassays, zwischen Proben von hypothyreoten und nicht hypothyreoten Patienten zu differenzieren (Abb. 13). Die AUC des Turbo™ TBIs ist größer als die des Thyretain® TBIs (Turbo™ TBI 0,833; 95% CI 0,786 – 0,873 vs. Thyretain® TBI 0,795; 95% CI 0,745 – 0,839). Der Unterschied in AUC zeigt keine Signifikanz ($p=0,0616$).

Im Gesamtkollektiv zeigt der MWU signifikant unterschiedliche Werte des Turbo™ TBIs in Abhängigkeit von positiven oder negativen TRAK-, TAK- und TPO-Ak-Resultaten ($p<0,001$). Die Effektstärke r ist bei TRAK und TPO-Ak stark ausgeprägt ($r_{\text{TRAK}}=0,676$; $r_{\text{TPO}}=0,580$) und bei TAK schwach ($r_{\text{TAK}}=0,262$). Thyretain® TBI weist vergleichbare Assoziationen mit TRAK, TAK und TPO-Ak auf ($p<0,001$) mit ähnlichen Effektstärken ($r_{\text{TRAK}}=0,745$; $r_{\text{TPO}}=0,639$; $r_{\text{TAK}}=0,273$). Bei Betrachtung des Gesamtkollektivs unterschieden sich die Ergebnisse beider Bioassay abhängig davon, ob die Proben hypothyreot oder nicht hypothyreot sind (MWU $p<0,001$). Die Effektstärke des Turbo™ TBIs ist geringfügig höher als die des Thyretain® TBIs ($r_{\text{Turbo™TBI}}=0,576$; $r_{\text{Thyretain®TBI}}=0,51$).

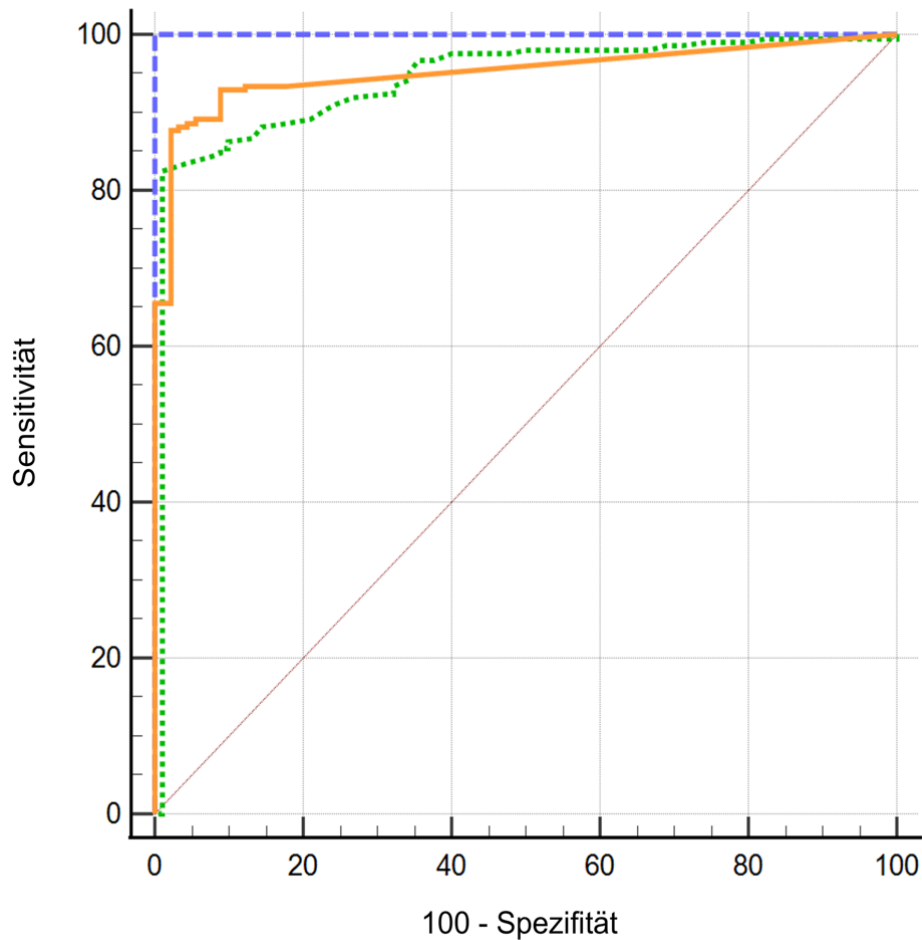


Abb. 12 — Turbo™ TBI ⋯ Thyretain® TBI — TRAK Immunoassays. ROC-Diagramm von 302 Proben (212 AITD, 90 Kontrollen), welche mit dem Turbo™ und Thyretain® TBI getestet wurden. AUC (95% CI): Turbo™ TBI 1,000 (0,988 - 1,000); Thyretain® TBI 0.95 (0.919 – 0.972); TRAK 0.952 (0.921-0.973).

Bei ausschließlicher Betrachtung des AITD-Kollektivs zeigen sich unterschiedliche Turbo™ TBI-Ergebnisse in Abhängigkeit davon, ob die TRAK-Ergebnisse positiv oder negativ sind (MWU $p < 0,001$; $r = 0,43$). Der Vergleich der Turbo™ TBI-Werte mit TAK- und TPO-Ak zeigt keine Signifikanz (MWU $p_{\text{TAK}} = 0,078$; $p_{\text{TPO-Ak}} = 0,147$). Die Ergebnisse des Thyretain® TBI Bioassays zeigen einen signifikanten Zusammenhang mit TRAK und TPO-Ak (MWU $p < 0,001$). Dabei weist TRAK eine starke ($r = 0,61$) und TPO-Ak eine moderate Stärke ($r = 0,33$) auf. TAK zeigt keine Signifikanz im MWU, sowohl mit dem Turbo™ TBI ($p = 0,08$) als auch Thyretain® TBI ($p = 0,5$). Der Unterschied der Turbo™ TBI-Ergebnisse zwischen hypothyreoten und nicht hypothyreoten Proben ist signifikant ($p = 0,03$), während dies im MWU für den Thyretain® TBI nicht erreicht werden kann ($p = 0,08$). Die Effektstärke ist hierbei für den Turbo™ TBI schwach ($r = 0,15$). Tab. 20 und Tab. 21 zeigen die Verteilung der serologischen Daten in verschiedenen %-Inhibitionsbereichen des Turbo™ und Thyretain® TBIs.

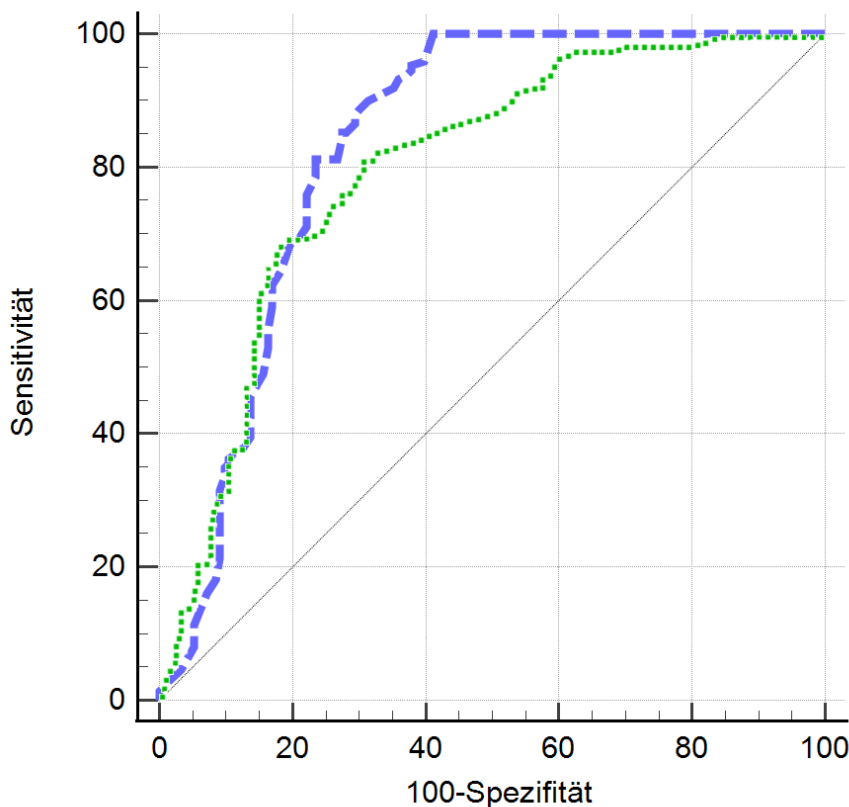


Abb. 13 ■■■ Turbo™ TBI ■■■ Thyretain® TBI. ROC-Diagramm von 302 hypothyreoten und nicht-hypothyreoten Proben (212 AITD, 90 Kontrollen), welche mit dem Turbo™ und Thyretain® TBI getestet wurden. AUC (95% CI): Turbo™ TBI 0.833 (0.786 - 0.873); Thyretain® TBI 0.795 (0.745–0.839); $p=0.0616$.

Die Mehrfelder-Tafeln (Tab. 22 und Tab. 23) zeigen die Verteilung von funktionellen Antikörpern bei hypo- und hyperthyreoten Patientenseren. Der Chi-Quadrat-Test und der exakte Test nach Fisher ergeben einen signifikanten Unterschied zwischen beobachteter und erwarteter Verteilung der Thyretain® TBI-Ergebnisse mit einer moderaten Effektstärke ϕ (ϕ 0,203; $p=0,025$). Der Turbo™ TBI zeigt nach dem exakten Test nach Fisher keine Signifikanz ($p=0,121$).

Eine Assoziation konnte im Gesamtkollektiv zwischen Turbo™ und Thyretain® TSI-positiven Proben und einer hyperthyreoten Schilddrüsenfunktion festgestellt werden (MWU $p_{\text{Thyretain}^{\circledR}\text{TSI}}=0,012$; $p_{\text{Turbo}^{\text{TM}}\text{TSI}}=0,004$), jedoch mit einer schwachen Effektstärke ($r_{\text{Thyretain}^{\circledR}\text{TSI}}=0,145$; $r_{\text{Turbo}^{\text{TM}}\text{TSI}}=0,165$). Im AITD-Kollektiv zeigen weder der Thyretain® TSI noch der Turbo™ TSI signifikante Unterschiede im MWU zwischen hyperthyreoten und nicht hyperthyreoten Serumproben ($p_{\text{Thyretain}^{\circledR}\text{TSI}}=0,08$; $p_{\text{Turbo}^{\text{TM}}\text{TSI}}=0,074$).

Turbo™ TBI (% Inhibition)	40 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 100	Gesamt- anzahl
Thyretain® TBI positiv	15 / 38	19 / 32	48 / 53	86 / 89	168 / 212
	(39,5%)	(59,4%)	(90,6%)	(96,7%)	(79,2%)
TRAK positiv	14 / 38	10 / 32	39 / 53	75 / 89	138 / 212
	(36,8%)	(31,3%)	(73,6%)	(84,3%)	(65,1%)
TPO-Ak positiv	18 / 28	16 / 25	39 / 51	63 / 79	136 / 183
	(64,3%)	(64,0%)	(76,5%)	(79,7%)	(74,3%)
TAK positiv	12 / 37	14 / 32	16 / 42	28 / 68	70 / 179
	(32,4%)	(43,8%)	(38,1%)	(42,2%)	(39,1%)

Tab. 20 Zusammenhang zwischen Turbo™ TBI-, Thyretain® TBI-, TRAK-, TPO-Ak- und TAK-Ergebnissen. Die Assay-Ergebnisse sind nach TBI-Bereichen sortiert.

Thyretain® TBI (% Inhibition)	34 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 100	Gesamt- anzahl
TRAK positiv	7 / 21	14 / 22	20 / 23	93 / 102	134 / 168
	(33,3%)	(63,3%)	(87,0%)	(91,2%)	(79,8%)
TPO-Ak positiv	10 / 19	15 / 22	15 / 23	86 / 96	113 / 139
	(52,6%)	(68,2%)	(65,2%)	(89,6%)	(81,3%)
TAK positiv	7 / 21	6 / 21	8 / 21	32 / 72	53 / 135
	(33,3%)	(28,6%)	(38,6%)	(44,4%)	(39,3%)

Tab. 21 Zusammenhang zwischen Thyretain® TBI-, TRAK-, TPO-Ak- und TAK-Ergebnissen. Die Assay-Ergebnisse sind nach TBI-Bereichen sortiert.

Turbo™ TBI (% Inhibition)	40 - 50	51 – 60	61 – 70	71 – 100	Gesamt- anzahl
Proben	38	32	53	89	212
Hypothyreot	20 (52,6%)	21 (65,6%)	40 (75,5%)	68 (76,4%)	149 (70,3%)
Euthyreot	14 (36,8%)	7 (21,9%)	9 (17,0%)	17 (19,1%)	47 (22,2%)
Hyperthyreot	4 (10,5%)	4 (12,5%)	4 (7,5%)	4 (4,5%)	16 (7,5%)

Tab. 22 Zusammenhang zwischen Turbo™ TBI und Schilddrüsenfunktion.

Thyretain® TBI (% Inhibition)	34 - 50	51 – 60	61 – 70	71 – 100	Gesamt- anzahl
Proben	21	22	23	102	168
Hypothyreot	12 (54,5%)	10 (45,5%)	18 (78,3%)	80 (78,4%)	120 (71,4%)
Euthyreot	6 (28,6%)	10 (45,5%)	4 (17,4%)	16 (15,7%)	36 (21,4%)
Hyperthyreot	3 (14,3%)	2 (9,1%)	1 (4,3%)	6 (5,9%)	12 (7,1%)

Tab. 23 Zusammenhang zwischen Thyretain® TBI und Schilddrüsenfunktion.

4.3 Präzisionsmessung

Die Ergebnisse der Präzisionsmessung sind in Tab. 24 - Tab. 27 detailliert aufgeführt. Der Durchschnittswert für die jeweiligen Anwender beträgt 59,45% Inhibition (SD 16,72% Inhibition) für Anwender 1 und 54,15 % Inhibition (SD 15,34% Inhibition) für Anwender 2. Der Unterschied zwischen den beiden Anwendern ist im gepaarten t-Test signifikant ($p= 0,0008$). Der durchschnittliche Variationskoeffizient (CV) für Anwender 1 und 2 beträgt 6% (SD 0,0492), und 8% (SD 0,0735) mit einem nicht signifikanten Unterschied (gepaarter t-Test $p= 0,32$). Der Durchschnittswert der jeweiligen Chargen beträgt 56,8 % Inhibition (SD 16,06% Inhibition) für Charge 1 und 49,0 % Hemmung (SD 15,69% Inhibition) für Charge 2. Der Unterschied ist im ungepaarten t-Test statistisch nicht signifikant ($p= 0,08$). Der CV für Charge 1 beträgt 7% (SD 0,06) und für Charge 2 4% (SD 0,03) und erreicht keine Signifikanz im ungepaarten t-Test ($p=0,34$). Die Mittelwerte des Thyretain® TBI Bioassays zeigen keine signifikanten Unterschiede im gepaarten t-Test im Vergleich zu den Ergebnissen des Turbo™ TBIs (Mittelwert_{Thyretain®}= 60,8% Inhibition [SD 22,02%]; Mittelwert_{Turbo™}= 54,20% Inhibition [SD 16,92%]; $p= 0,27$).

Probe	Thyretain® TBI (% Inhibition)	Turbo™ TBI Anwender 1 (% Inhibition)				\bar{x} (% Inhibition)	CV
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4		
1	39	35	30	29	25	29,75	14%
2	44	55	58	57	63	58,25	6%
3	62	68	61	63	62	63,50	5%
4	64	68	71	69	67	68,75	2%
5	95	76	75	79	78	77,00	2%

Tab. 24 Tabellarische Darstellung der Präzisionsmessung von Anwender 1 (Charge 1).

Probe	Thyretain® TBI (% Inhibition)	Turbo™ TBI Anwender 2 (% Inhibition)				\bar{x} (% Inhibition)	CV
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4		
1	39	23	29	29	35	29,00	17%
2	44	54	41	55	60	52,50	15%
3	62	53	54	52	53	53,00	2%
4	64	66	66	67	62	65,25	3%
5	95	72	69	70	73	71,00	3%

Tab. 25 Tabellarische Darstellung der Präzisionsmessung von Anwender 2 (Charge 1).

Probe	Thyretain® TBI (% Inhibition)	Turbo™ TBI Anwender 1 (% Inhibition)				\bar{x} (% Inhibition)	CV
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4		
1	39	23	23	27	22	23,75	9%
2	44	45	47	47	50	47,25	4%
3	62	45	48	50	50	48,25	5%
4	64	54	56	55	54	54,75	2%
5	95	71	71	71	71	71,00	0%

Tab. 26 Tabellarische Darstellung der Präzisionsmessung von Anwender 1 (Charge 2).

Probe	Thyretain® TBI (% Inhibition)	Turbo™ TBI \bar{x} (% Inhibition)	SD (% Inhibition)	CV
1	39	27,50	4,50	16%
2	44	52,67	6,65	13%
3	62	54,92	6,97	13%
4	64	62,92	6,40	10%
5	95	73,00	3,25	4%

Tab. 27 Mittelwerte und CV aller Turbo™ TBI-Messungen.

5. Diskussion

5.1 Demografische Daten

Aufgrund der überwiegenden Häufung von AITD in Frauen zeigt das AITD-Kollektiv eine signifikante Übergewichtung von Probandinnen. Die geschlechtsspezifische Prävalenz von AITD variiert in diversen Untersuchungen, wobei sie sich jedoch in einem ähnlichen Verhältnis des AITD-Kollektivs bewegt (1– 5 % Männer, 5 – 15 % Frauen) (Juan-Manuel Anaya, 2013). Das Kontrollkollektiv weist ähnliche Geschlechtsanteile auf (siehe Tab. 9). 19 (8,96%) Proben von 15 (11,5%) Patienten sind zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter 18 Jahre alt. Bei 8 (4,8%) Proben von 6 (4,6%) Patienten handelt es sich um Neugeborene. 118 (55,7%) Serumproben von 53 (40,5%) Patienten wurden unter L-Thyroxin Einnahme abgenommen, während 11 (5,2%) Serumproben von 8 (6,1%) Patienten während der Blutentnahme mit Thyreostatika therapiert wurden.

Zusätzlich ist eine beträchtliche Anzahl der Patienten im AITD-Kollektiv mit HT oder MB diagnostiziert (87 [41,0%] MB Patienten; 65 [30,7%] HT Patienten; 6 [4,6%] neonatale Hypothyreose). Frühere Studien haben TBI bei HT-Patienten in bis zu 33,3% (Takasu et al., 1987) und bei TSI-negativen MB Patienten in 40 % der Fälle nachgewiesen (Wallaschofski and Paschke, 1999). Eine Mehrheit der Proben ist TRAK positiv (138 [65,1%] Proben).

Die Mehrheit der Proben zeigt eine Hypothyreose (149 [70,3%] hypothyreot; 47 [22,2%] euthyreot; 16 [7,5%] hyperthyreot) bei einer hohen Inzidenz von blockierenden Ak (212 Proben im Turbo™ TBI und 168 Proben im Thyretain® TBI). Ein Einfluss von blockierenden Ak wurde häufig postuliert (McLachlan and Rapoport, 2013, Takasu et al., 1992, Diana et al., 2017, Morshed and Davies, 2015). Wie zuvor erörtert (siehe 2.3) ist nicht nur eine TBI Präsenz, sondern auch eine immunvermittelte Zerstörung von Thyreozyten, welche histologisch in HT-Patienten nachgewiesen wurde (Diana et al., 2018), für eine klinische Hypothyreose verantwortlich.

5.2 Vergleich des Turbo™ und Thyretain® Bioassays

Der Turbo™ Bioassay zeigt im Vergleich zum Thyretain® Bioassay mehrere wesentliche Vorteile. Beispielsweise können alle Vertiefungen der Assay-Platte für eine Messung verwendet werden. Dadurch können pro Durchlauf 90 Proben im Turbo™ TBI und 39 Proben im Turbo™ TSI gemessen werden. Im Vergleich misst der Thyretain® TBI 21 und der Thyretain® TSI 22 Proben.

Die Zellen des Turbo™ Bioassays sind schon nach dem Auftauen einsatzbereit. Dadurch kann die Inkubationszeit von 16 Stunden im Thyretain® Bioassay übersprungen werden. Ein Inkubator sowie aseptische Bedingungen sind nicht erforderlich. Die Verdünnung der Proben im Thyretain® TBI Bioassay benötigt eine Stunde sowie mehrere dutzend Eppendorf-Gefäße. Im Vergleich können im Turbo™ TBI Bioassay Patientenseren ohne Verdünnung in die Vertiefungen pipettiert werden. Tab. 28 schlüsselt die Vorteile des Turbo™ TBI Bioassays im Vergleich zum Thyretain® TBI Bioassay auf. Bei der Durchführung des Turbo™ TBI Bioassays werden nur 10µl Patientenserum verwendet, während der Thyretain® TBI Bioassay 30µl Serum benötigt. Aufgrund der geringen Probenmenge werden elektronische Pipetten für den Turbo™ Bioassay empfohlen.

	Thyretain® TBI Bioassay	Turbo™ TBI Bioassay
Assay	Zellbasierter, lytischer, Biolumineszenz Assay	Zellbasierter, nicht lytischer Biolumineszenz Assay
Funktionsweise	Luciferase Reporter Gen	cAMP Reporter
Einheit	% Inhibition	% Inhibition
Positiv prädiktiver Wert / negativ prädiktiver Wert	94% / 90%	99% / 95%
Proben pro Durchlauf	21	90
Probenvolumen	30 µL	10 µL
Assay Temperatur	37°C / 5%CO ₂	Raumtemperatur
Zellkultivierung	16 Stunden	Keine Zellkultivierung notwendig
Inkubationszeit	3 Stunden	1 Stunde
Dauer	~ 20 Stunden	~ 2 Stunden
Konformitätsbewertung	CE gekennzeichnet	CE gekennzeichnet
Durchführbarkeit	Hohe Komplexität	Moderate Komplexität

Tab. 28 Tabellarischer Vergleich des Turbo™ TBI Bioassays und Thyretain® TBI Bioassays.

5.3 Ergebnisvergleich der fünf Immunoassays

Die Versuchsergebnisse wurden in einer 2024 publizierten Arbeit diskutiert (George et al., 2024). Von insgesamt 302 Proben erzielte der Turbo™ TBI eine Erfolgsquote von 100% bei der Erkennung der 212 AITD-Proben. Im Kontrollkollektiv wurden alle Proben als negativ erkannt. Im Gegensatz dazu wies der Thyretain® TBI eine Erfolgsquote von 79% bei der Identifizierung der AITD-Proben auf (168/212). Die TRAK-Assays schnitten mit einer Erkennungsrate von 65% im AITD-Kollektiv (138/212) hinter den beiden Bioassays ab.

Betrachtet man die Ergebnisse der verschiedenen Assays (Abb. 5), zeigen sich mehrfach positive Proben (Tab. 11). 9 Proben (8 Patienten) zeigten eine Positivität in allen fünf Assays. Positive TRAK-Resultate in Kombination mit Positivität in TBI- oder TSI- Assays sind häufig und lassen sich durch die ähnlichen diagnostischen Qualitäten der Assays erklären. TBI und TSI Bioassays stellen die sensitivere Methode zum Nachweis von Antikörpern dar (Li et al., 2013, Allelein et al., 2019). Turbo™ TBI und TSI korrelieren im Gesamtkollektiv geringfügig negativ (Spearman's $Rho_{Turbo™} = -0,19$; $p=0,005$). Der Korrelationskoeffizient des Thyretain® TBIs und TSIs ist nicht signifikant (Spearman's $Rho_{Thyretain®} = -0,104$; $p= 0,132$). Der Koeffizient ist für den Turbo™

Bioassay höher, auch wenn der untere Grenzwert des Assays 0,01 IU/L beträgt. Die Gegensätze der beiden Bioassays sind in einzelnen Patientenverläufen zu beobachten. Eine positive Korrelation zwischen der negativen %-Inhibition von TBI-Bioassay und der TSI-Positivität ist in der Literatur vorbeschrieben (Li et al., 2013). Abb. 15 und Abb. 14 zeigen die Turbo™ und Thyretain® TSI- und TBI- Messwerte von Patientin 81, einer 35 Jahre alten Patientin unter L-Thyroxin-Therapie, aus dem Universitätsklinikum Leuven (Leuven, Belgien). Es zeigt sich ein deutlicher Wechsel von TSI und TBI im zeitlichen Verlauf. Eine Fluktuation von TSI und TBI ineinander wurde durch verschiedene Reize oder Lebensumstände wie Schwangerschaft, Radioiod- oder Schilddrüsenhormontherapie in der aktuellen Literatur beschrieben (McLachlan and Rapoport, 2013). Vom 07.01.2014 erfolgte eine Steigerung der L-Thyroxin-Dosis bis zum 17.07.2014 von 200 µg auf 325 µg. Im restlichen Zeitraum folgte eine Reduktion der Dosis auf 200 µg. Zwischen diesen Zeiträumen erfolgte eine Dominanz von blockierenden Antikörpern. Eine Änderung der Schilddrüsenfunktion fand nicht statt, die Patientin zeigte im gesamten Zeitraum eine Hypothyreose und TRAK-Positivität. In beiden Abbildungen zeigt sich eine Senkung der TSI-Messwerte bei steigendem TBI-Titer. In der bisherigen Literatur ist bekannt, dass blockierende und stimulierende Ak kompetitiv auf HCBS-TSH-R-Mc4 Zellen wirken (Miao et al., 2022). Dies könnte einen Hinweis auf eine Koexistenz von TBI und TSI, auch bei fehlender dualer Positivität, hindeuten.

Eine duale Positivität von Proben in TSI und TBI Assays ist beschrieben worden, jedoch erscheint diese äußerst selten (Sarić Matutinović et al., 2022, Diana et al., 2017). 13 Proben (von 11 Patienten) wurden im Thyretain® Bioassay dual positiv gemessen, während 80 Proben (32 Patienten) im Turbo™ Bioassay als dual positiv erkannt wurden. Bei Betrachtung der 13 dual positiven Thyretain® Proben, weisen die 11 Probanden ein mittleres Alter von 45 Jahren auf. Fünf der Proben sind zum Zeitpunkt der Probenentnahme hypothyreot, zwei hyperthyreot und sechs euthyreot. Sieben Proben stammen von Patienten mit MB- und fünf von HT-Patienten. Vier MB-Proben, wurden zum Zeitpunkt der Probenentnahme mit Thyreostatika therapiert, welche eine Änderung der funktionellen Ak und damit eine duale Positivität erklären könnten. Zwei Proben wurden während einer L-Thyroxin-Therapie abgenommen, welche ebenso eine Umstellung der funktionellen Ak provozieren kann. Zusätzlich wurden 4 HT-Proben unter L-Thyroxin-Therapie gesammelt. Als weiterer Faktor zählt

unter anderem eine bestehende Schwangerschaft, welcher für das AITD-Kollektiv nicht erfasst wurde (McLachlan and Rapoport, 2013).

Die Anzahl von dualen Turbo™ TBI- und TSI-positiven Proben ist deutlich höher als im Thyretain® Bioassay (80 Proben vs. 13 Proben). Aufgrund der hohen Anzahl an Turbo™ TSI-positiven Proben wurden die jeweiligen Proben durch denselben Anwender (Anwender 1) sowie durch einen weiteren Anwender (Anwender 2) geprüft. Die Kontrolle der Proben ergab ähnliche Ergebnisse wie bei der ersten Messung durch Anwender 1. Im ungepaarten t-Test konnte kein signifikanter Unterschied der Ergebnisse zwischen beiden Anwendern festgestellt werden ($p=0,0763$). Drei Proben stammen von einem Patienten mit neonataler Hypothyreose (Patient 69), 22 von MB- und 50 von HT-Patienten. Von fünf Patienten fehlt die Diagnose. Sieben Proben wurden während einer Thyreostatikatherapie und 46 Proben während einer Therapie mit L-Thyroxin abgenommen. Ein Großteil der 80 Proben wird durch die zuvor erwähnte Patientin 81 (25 Proben [31,25%]) und Patientin 95 (9 Proben [11,25%]) gestellt. Alle Proben der Patientin sind hypothyreot und sind unter einer Therapie mit einer hohen Dosis L-Thyroxin (200 µg – 325 µg) abgenommen worden. Die Patientin zeigt zu jedem Zeitpunkt eine hohe Turbo™ TBI- und TSI- Positivität, ohne dabei im Thyretain® TSI-positiv zu sein. Auch ihr Sohn (Patient 69) mit neonataler Hypothyreose zeigte in allen drei Proben einen positiven Turbo™ TSI Bioassay während der Thyretain® TSI negativ ist. Patientin 95 ist eine Krankenschwester aus der Universitätsmedizin Mainz mit einer diagnostizierten HT mit einem durchgehend hypothyreoten Schilddrüsenstatus. Auch hier zeigen sich keine Proben Thyretain® TSI-positiv. Weitere dual positive Patienten können in Tab. 29 eingesehen werden. Zusammenfassend kann aufgrund der hohen Anzahl von dual positiven Proben von wenigen Patienten (32/131 Patienten [24,4%]) und der wahrscheinlich hohen Sensitivität des Turbo™ TSI Bioassays (Miao et al., 2022) die große Menge an TSI-positiven Proben in einem TBI positivem Kollektiv erklärt werden. Auch könnte zum Zeitpunkt der Probenentnahme ein Wechsel von TBI in TSI stattfinden, weswegen der sensitive Turbo™ TSI positiv ausfällt.

Patient (n= 32)	Probenanzahl (n= 80)
14	1
20	2
22	1
24	1
35	3
46	6
50	1
55	1
61	1
63	1
64	1
68	4
69	3
71	1
74	1
76	1
77	1
80	2
81	25
83	2
88	1
91	1
95	9
99	1
101	1
106	1
108	1
110	1
112	2
113	1
121	1
152	1

Tab. 29 Probenanzahl von Turbo™ TSI-positiven Patienten.

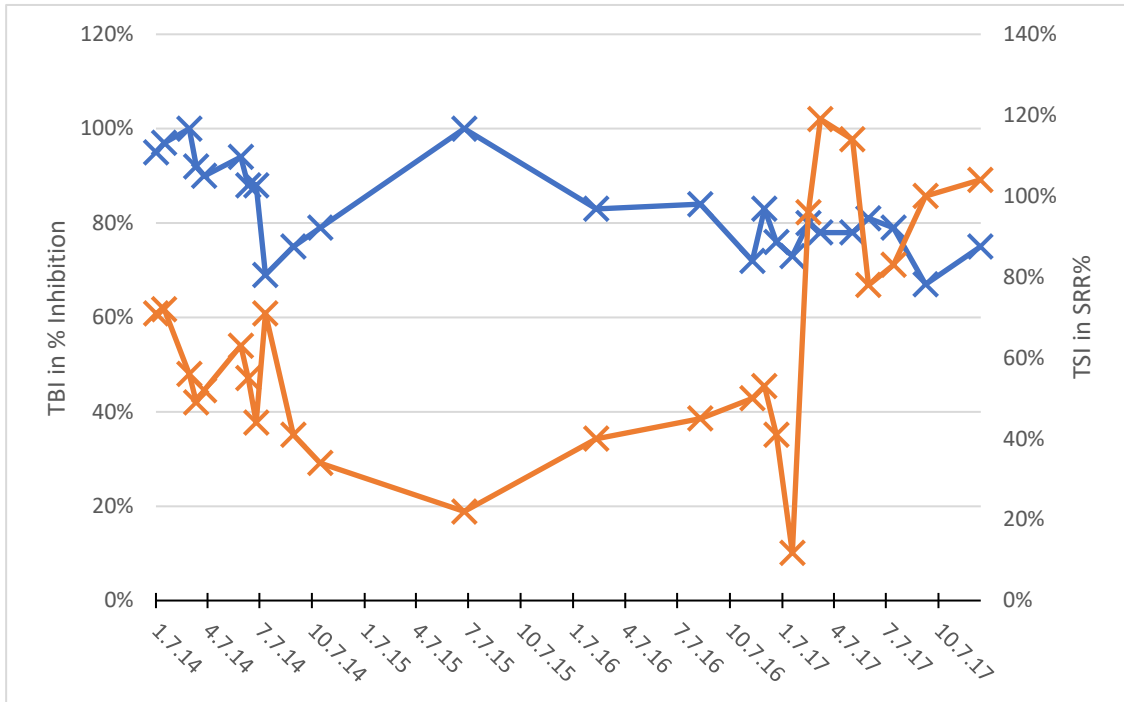


Abb. 14 — Thyretain® TSI — Thyretain® TBI. Darstellung der Thyretain® TBI- und TSI-Werte von Patient 81 nach Abnahmezeitpunkt.

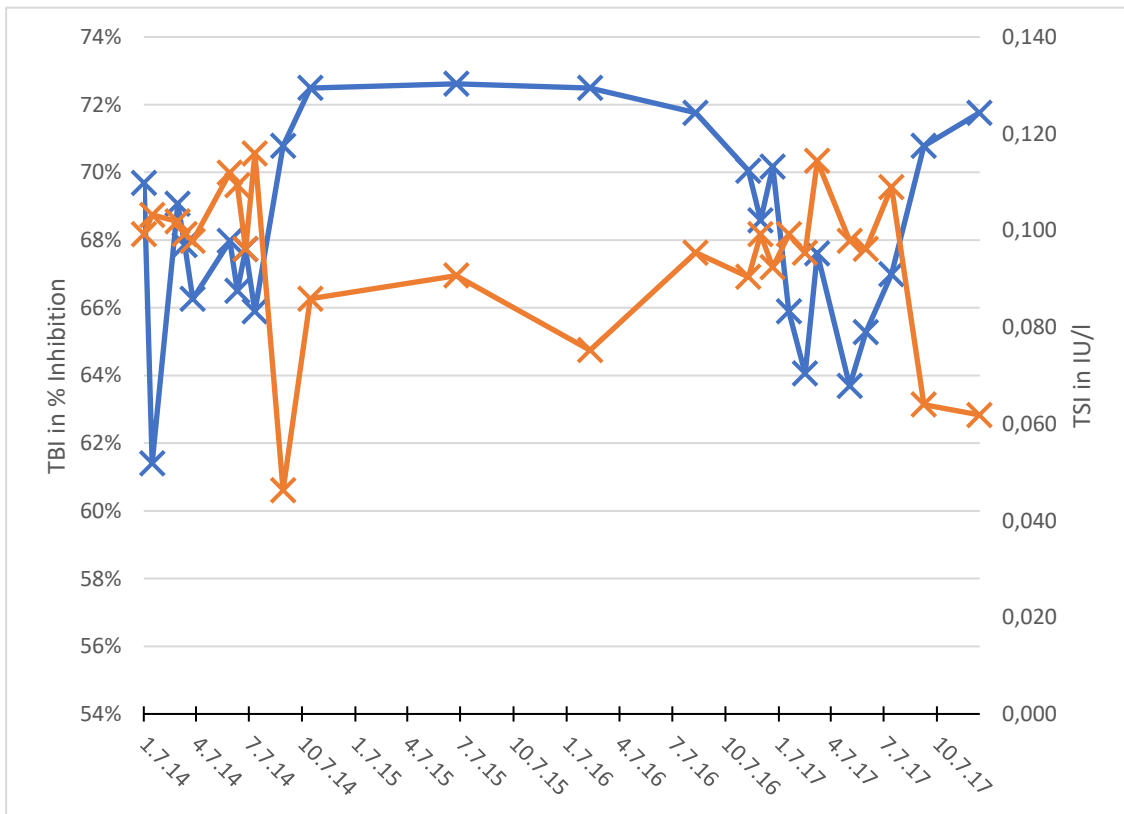


Abb. 15 — Turbo™ TSI — Turbo™ TBI. Darstellung der Turbo™ TBI- und TSI-Werte von Patient 81 nach Abnahmezeitpunkt.

5.4 Qualitativer Assay-Vergleich

Thyretain® TBI und Turbo™ TBI zeigen unter den untersuchten Assays die höchste Übereinstimmung (168 Proben von 93 Patienten). Die zweithöchste Konkordanz präsentiert sich zwischen Turbo™ TBI- und TRAK-Werten (138 Proben von 66 Patienten), welche dicht gefolgt ist von Thyretain® TBI- und TRAK-Ergebnissen (134 Proben von 62 Patienten). Eine hohe Kohärenz zwischen TRAK und funktionellen Antikörpern wurde schon in anderen Studien beobachtet und wird durch diese Ergebnisse bestätigt (Diana et al., 2017, Allelein et al., 2019). Alle fünf Immunoassays wurden mithilfe des Spearmans' Korrelationskoeffizienten verglichen. Die Ergebnisse des Thyretain® TBIs und Turbo™ TBIs korrelieren signifikant miteinander (Spearman's $Rho = 0,80$ (95 CI 0,75 – 0,84); $p < 0,001$). Ähnliche Korrelationswerte lassen sich zwischen den Ergebnissen der TRAK Immunoassays und den beiden TBI Bioassays berechnen (Spearman's $Rho_{Turbo^{TM}TRAK} = 0,74$ (95 CI 0,69 – 0,79); $p < 0,001$ und Spearman's $Rho_{Thyretain^{TRAK}} = 0,78$ (95 CI 0,69 – 0,79); $p < 0,001$). Der hohe und signifikante Korrelationskoeffizient bestätigt die hohe Konkordanz der jeweiligen Ergebnisse in Tab. 11.

Die Turbo™ TBI- und Thyretain® TBI-Ergebnisse des AITD-Kollektivs korrelieren deutlich stärker miteinander (Abb. 9 - Abb. 11) als die Ergebnisse des Kontrollkollektivs (Spearman's $Rho_{AITD} = 0,586$; Spearman's $Rho_{Kontrolle} = 0,192$). Diese Ergebnisse bestätigen sich im Intra- und Interassay-Vergleich. Die Unterschiede zwischen dem Thyretain® und Turbo™ TBI sind hierbei in den niedrigen Inhibitionsbereichen am höchsten (Tab. 27). Die Kohärenz der beiden Assays steigt mit dem %-Inhibitionsbereich. Der Turbo™ TBI Bioassay zeigt durchschnittlich einen höheren %-Inhibitionswert als der Thyretain® TBI (Median $_{Turbo^{TM}TBI} = 58$ % Inhibition [25% P 17,73 % Inhibition, 75% P 73,43 % Inhibition] vs. Median $_{Thyretain^{TBI}} = 48$ % Inhibition [25% P 7,75 % Inhibition, 75% P 79 % Inhibition]). Im Gesamtkollektiv zeigen insgesamt 188 Ergebnispaaare (62%) im Turbo™ TBI einen höheren % Inhibitionswert als im Thyretain® TBI. Die Höhe der % Inhibition des Turbo™ TBIs im Vergleich zum Thyretain® TBI, sowie die hohe Anzahl an Turbo™ TBI- und Turbo™ TSI-positiven Proben weisen auf eine hohe Sensitivität der HCBS-TSH-R-Mc4 Zellen hin.

Der Turbo™ TBI zeigt mit 100% (95% CI 98,28% – 100%) eine höhere Sensitivität als der Thyretain® TBI Bioassay (Sensitivität 79,25%; 95% CI 73,16% – 84,5%). Die TRAK Immunoassays schneiden in diesem Vergleich unter den beiden Bioassays ab (Sensitivität 65,09% [95% CI 58,27% – 71,49%]; Spezifität 100% [95% CI 95,98% –

100%]). Die Überlegenheit von Bioassays zu Bindungsassays wird in der Literatur bestätigt (Adams, 1965, Diana et al., 2016).

Die hohe diagnostische Güte des Turbo™ TBIs spiegelt sich in den ROC-Kurven wider. Der Turbo™ TBI identifiziert AITD-Patienten mit einer höheren Genauigkeit als der Thyretain® TBI ($AUC_{\text{Turbo™ TBI}} = 1,0$ [95% CI 0,986 – 1,000] > $AUC_{\text{Thyretain® TBI}} = 0,95$ [95% CI 0,919 – 0,972]). Der Unterschied ist signifikant ($p=0,0497$). Die AUC der TRAK Immunoassays fallen ähnlich aus wie die AUC des Thyretain®- und niedriger als die des Turbo™ TBIs (0,952; 95% CI 0,921 – 0,973). Der AUC-Unterschied zwischen Thyretain® TBI und der TRAK Immunoassays erreichen in diesem Datensatz keine Signifikanz (0,002; 95% CI -0,0271 – 0,0298; $p= 0,9266$), womit beide Assays im Hinblick auf ihre Genauigkeit in diesem Datensatz als gleichwertig zu erachten sind. Die Differenz zwischen Turbo™ TBI und TRAK AUC liegt bei 0,048 (95% CI 0,0245 – 0,0723), wodurch eine höhere Fähigkeit AITD-Patienten von gesunden Probanden zu differenzieren, interpretiert werden kann ($p= 0,0001$).

Die hohe Sensitivität des Turbo™ TBI Bioassays spiegelt sich in den Ergebnissen der Verdünnungskurve wider. Die IC_{50} - und IC_{80} -Werte des Turbo™ TBIs sind deutlich niedriger als im Thyretain® TBI ($IC_{50} = 1,55$; $IC_{80} = 3,48$ vs. $IC_{50} = 6,76$; $IC_{80} = 18,45$). Die Werte unterscheiden sich im ungepaarten t-Test signifikant ($p < 0,0001$).

5.5 Zusammenhang der Schilddrüsenfunktion und serologischen Daten

Der Turbo™ TBI zeigt eine höhere Genauigkeit bei der Bestimmung hypothyreoter Patientenproben im Vergleich zum Thyretain® TBI ($AUC_{\text{Turbo™ TBI}} = 95\% \text{ CI } 0,833, 0,786 – 0,873$; Thyretain® TBI: 0,795, 0,745 – 0,839). Allerdings ist der Unterschied zwischen den beiden AUC-Werten statistisch nicht signifikant ($p= 0,0616$). In Abb. 13 wird deutlich, dass die ROC-Kurven der beiden Tests im Bereich einer Falsch-Positiv-Rate von 0 – 20 % übereinstimmen. Bei Falsch-Positiv-Raten über 20% zeigt der Turbo™ TBI jedoch eine bessere Fähigkeit, zwischen hypothyreoten und nicht-hypothyreoten Proben zu unterscheiden.

Im MWU zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen des Turbo™ TBIs und den serologischen Ergebnissen positiver und negativer AITD-Proben. Ähnliche Beziehungen werden für die Ergebnisse des Thyretain® TBIs festgestellt. Bei Betrachtung des Gesamtkollektivs liefern beide Bioassays signifikant unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit ob serologische Parameter positiv oder

negativ sind (TRAK, TAK und TPO-Ak) sowie von der vorliegenden Schilddrüsenfunktion des Patienten bei Abnahme ($p < 0,001$). Mit Ausnahme von TAK ($r < 0,30$) sind die Effektstärken überwiegend stark ($r > 0,50$). Die Effektstärke des Turbo™ TBIs für den MWU zwischen hypothyreoten und nicht-hypothyreoten Proben ist höher als die des Thyretain® TBIs ($r_{\text{Turbo™ TBI}} = 0,58$ vs. $r_{\text{Thyretain® TBI}} = 0,51$). Bei ausschließlicher Betrachtung des AITD-Kollektivs zeigt der Turbo™ TBI signifikant unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit von positiven oder negativen TRAK-Ergebnissen ($p < 0,001$) sowie zwischen hypothyreoten und nicht-hypothyreoten Proben ($p = 0,03$). Die Effektstärke für TRAK ist moderat ($r = 0,43$), während sie für hypothyreote und nicht-hypothyreote Fälle schwach ist ($r = 0,149$). Keine signifikanten Unterschiede werden bei positiven oder negativen TAK ($p = 0,078$) und TPO-Ak-Ergebnissen ($p = 0,147$) festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigt der Thyretain® TBI signifikante Unterschiede bei positiven TPO-Ak- ($p < 0,001$) und TRAK-Ergebnissen ($p < 0,001$). Die Effektstärke für TPO-Ak ist moderat ($r = 0,33$), für TRAK hingegen stark ($r = 0,61$). Im Gegensatz zum Turbo™ TBI unterscheiden sich die Ergebnisse des Thyretain® TBIs nicht signifikant zwischen hypothyreoten und nicht-hypothyreoten Proben. Weitere Effektstärken sind in Tab. 30 aufgeführt.

	Turbo™ TBI Bioassay ($p < 0,001$)	Thyretain® TBI Bioassay ($p < 0,001$)
TRAK	$r = 0,676$	$r = 0,745$
TPO-Ak	$r = 0,580$	$r = 0,639$
TAK	$r = 0,262$	$r = 0,273$
Schilddrüsenfunktion (hypothyreot vs. nicht- hypothyreot)	$r = 0,576$	$r = 0,51$

Tab. 30 Effektstärken der MWU bezogen auf das Gesamtkollektiv.

In beiden Bioassays zeigt sich, dass mit zunehmendem Bereich der prozentualen Inhibition der Anteil hypothyreoter Patienten steigt, während der Anteil euthyreoter und hyperthyreoter Patienten sinkt (siehe Tab. 22 und Tab. 23). Die statistische Auswertung der Verteilungen mittels Chi-Quadrat-Test und des exakten Tests nach Fisher zeigt für den Thyretain® TBI einen signifikanten Unterschied zwischen den beobachteten und den erwarteten Ergebnissen. Dieser Unterschied weist eine moderate Effektstärke auf ($\phi = 0,203$; $p = 0,025$). Beim Turbo™ TBI zeigt der exakte Test nach Fisher hingegen keine Signifikanz ($p = 0,121$). Dennoch klassifiziert der Turbo™ TBI mehr Proben als hypothyreot (149 vs. 120). Dabei nimmt die Zahl hypothyreoter Proben im Turbo™ TBI mit jedem Bereich der % Inhibition kontinuierlich zu, während beim Thyretain® TBI die Anzahl hypothyreoter Proben erst im hochpositiven Bereich sprunghaft steigt.

Im Gesamtkollektiv zeigen die Ergebnisse des MWU signifikante Unterschiede zwischen hypothyreoten und nicht-hypothyreoten Proben in allen untersuchten Testverfahren. Sowohl für den Thyretain® TBI ($p < 0,01$; $r = 0,509$), den Turbo™ TBI ($p < 0,01$; $r = 0,576$) als auch für die TRAK Immunoassays ($p < 0,01$; $r = 0,584$) treten starke Effektstärken auf.

Ähnliche Zusammenhänge bestehen auch zwischen hyperthyreoter Schilddrüsenfunktionen und TSI-positiven Proben. Die Unterschiede in den Ergebnissen des Thyretain® TSIs ($p = 0,012$; $r = 0,145$) und des Turbo™ TSIs ($p = 0,004$; $r = 0,165$) sind mit schwacher Effektstärke signifikant. Im AITD-Kollektiv zeigt der MWU einen signifikanten Zusammenhang zwischen hypothyreoten Proben und der Höhe der Turbo™ TBI-Werte ($p = 0,03$), allerdings mit einer geringen Effektstärke ($r = 0,15$). Für den Thyretain® TBI, den Thyretain® TSI und den Turbo™ TSI besteht hingegen kein signifikanter Zusammenhang mit hypothyreoten bzw. hyperthyreoten Proben ($p_{\text{Thyretain®TBI}} = 0,076$; $p_{\text{Thyretain®TSI}} = 0,08$; $p_{\text{Turbo™TSI}} = 0,074$).

5.6 Zusammenhang der Assay-Resultate und klinischen Parameter

Tab. 20 verdeutlicht eine hohe Anhäufung von TRAK- und Thyretain® TBI-positiven Proben (TRAK 84,3 %; Thyretain® TBI 96,7 %) im hoch positiven Turbo™ TBI-Bereich (71 - 100 % Inhibition). Im Vergleich dazu ist im niedrig positiven Bereich (40 – 50 % Inhibitionsbereich) der Anteil an positiven TRAK- (36,8 %) und Thyretain® TBI-Ergebnissen (39,5%) deutlich niedriger. Ähnliche Beziehungen können auch für TPO-Ak beobachtet werden. Der Anteil an positiven TPO-Ak steigt vom niedrig positiven Turbo™ TBI-Bereich mit 64,3 % zu 79,7% im hochpositiven Bereich. Im geringeren Maße kann dieser Anstieg mit dem Anteil TAK positiver Proben beobachtet werden (32,4% niedrig positiver Bereich vs. 42,2% hoch positiver Bereich). Der Anstieg ist hierbei, anders als bei den anderen Parametern, nicht graduell.

Tab. 21 verdeutlicht, dass mit zunehmender Positivität im Thyretain® TBI Bioassay eine höhere Anzahl von Proben positiv auf TPO-Ak getestet werden (52,6% vs. 89,6% bei 34 – 50% Hemmung bzw. 71 – 100% Hemmung). Ähnliche Muster sind im Turbo™ TBI erkennbar (64,3% vs. 79,7% bei 40 – 50% Hemmung bzw. 71 – 100% Hemmung), wobei keine signifikante Korrelation festgestellt werden kann (MWU TPO-Ak $p = 0,147$) (Tab. 20). Im Bereich niedrig positiver Hemmung von 40 – 50% weist der Turbo™ TBI jedoch mehr positive TPO-Ak-Proben auf (64,3% vs. 52,6%) als der Thyretain® TBI. Für TAK hingegen lassen sich weder im Thyretain® TBI noch im Turbo™ TBI Zusammenhänge feststellen (MWU $p_{\text{Thyretain®TBI}} = 0,503$; $p_{\text{Turbo™TBI}} = 0,078$).

5.7 Präzisionsanalyse des Turbo™ TBI Bioassays

Die Ergebnisse des Turbo™ TBIs zeigen eine gute Konkordanz im gepaarten t-Test mit dem Thyretain® TBI. Die Mittelwerte der einzelnen Proben im Turbo™ TBI unterscheiden sich nicht signifikant von den Ausgangswerten des Thyretain® Bioassays (Tab. 27, $p = 0,27$). Probe 7 wird in allen Messungen TBI negativ getestet ($\bar{x}_{\text{Turbo™TBI}} = 27,50$ % Inhibition; SD 4,50). Zwischen den Anwendern kann ein signifikanter Unterschied der Turbo™ TBI-Ergebnisse festgestellt werden ($p = 0,0009$). Dies könnte auf die Fehleranfälligkeit aufgrund des niedrigen Pipettivolumens (10 μ l) zurückzuführen sein. Auch die Technik des Homogenisierens der Proben in der Platte kann sich zwischen den Anwendern unterscheiden. Trotz dieser potenziellen Fehlerquellen liefert der Turbo™ TBI konstante Ergebnisse (vgl. CV Tab. 24 - Tab. 27) mit nicht signifikanten Unterschieden zum Thyretain® TBI. Der CV unterscheidet sich

nicht signifikant zwischen den beiden Anwendern ($p= 0,32$), was für eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in den jeweiligen Anwendern bestätigt. Auch bei Betrachtung beider Chargen zeigt der Turbo™ TBI eine gute Reproduzierbarkeit im ungepaarten t-Test ($p= 0,08$). Der CV beider Chargen hält sich gering (Charge 1= 7% [SD 0,06]; Charge 2= 4% [SD 0,03]; $p= 0,34$). Der CV sinkt stetig mit der Höhe der % Inhibition der Probe (Abb. 16) in beiden Anwendern und Chargen (Abb. 17 - Abb. 19). Dies könnte erneut mit dem niedrigen Pipettiervolumen im Turbo™ TBI Bioassay zusammenhängen. Bei hoch positiven Proben wirkt sich ein minimaler Serumverlust während der Durchführung weniger stark aus als bei niedrig positiven Proben. Trotz der Unterschiede in den CV-Werten zwischen niedrig-positiven und hoch-positiven TBI-Proben überzeugen die Einzelwerte der Präzisionsmessung mit richtig-positiven Ergebnissen (siehe Tab. 24 - Tab. 26).

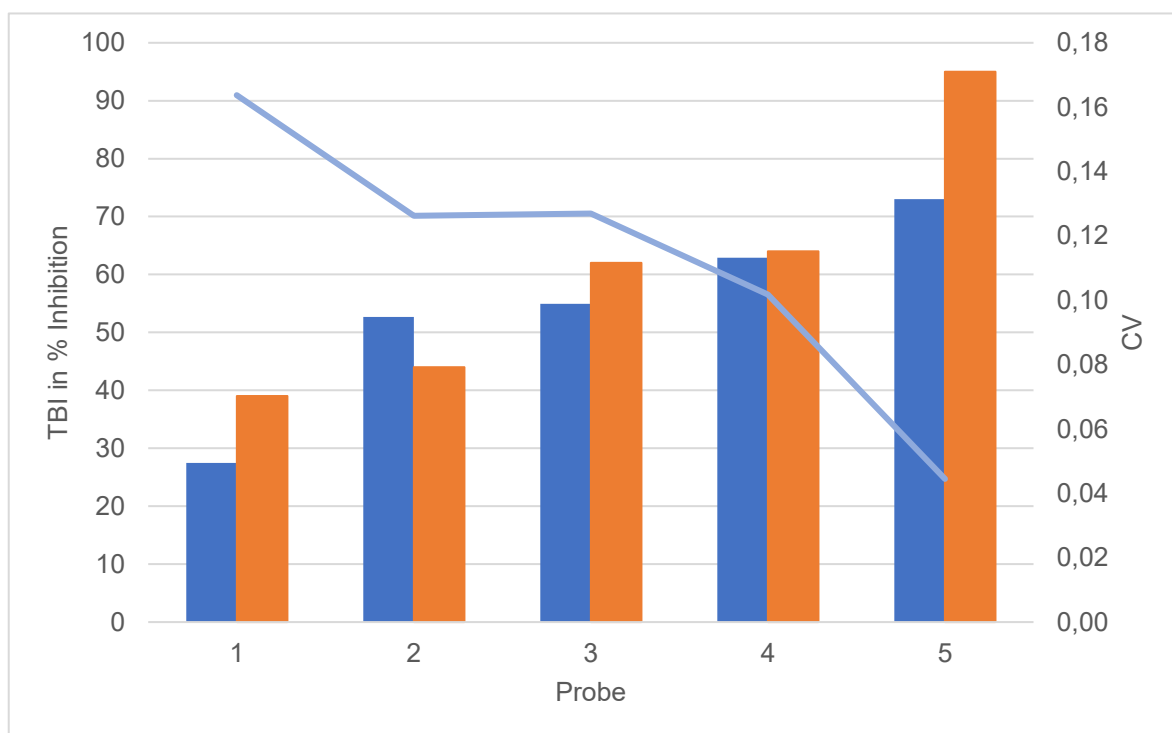


Abb. 16 ■ \bar{x} Turbo™ TBI ■ Thyretain® TBI — CV Turbo™ TBI. Mittelwerte der Turbo™ TBI-Präzisionsmessungen mit dazugehörigem CV, sowie des Thyretain® TBI-Ausgangswertes der jeweiligen Probe.

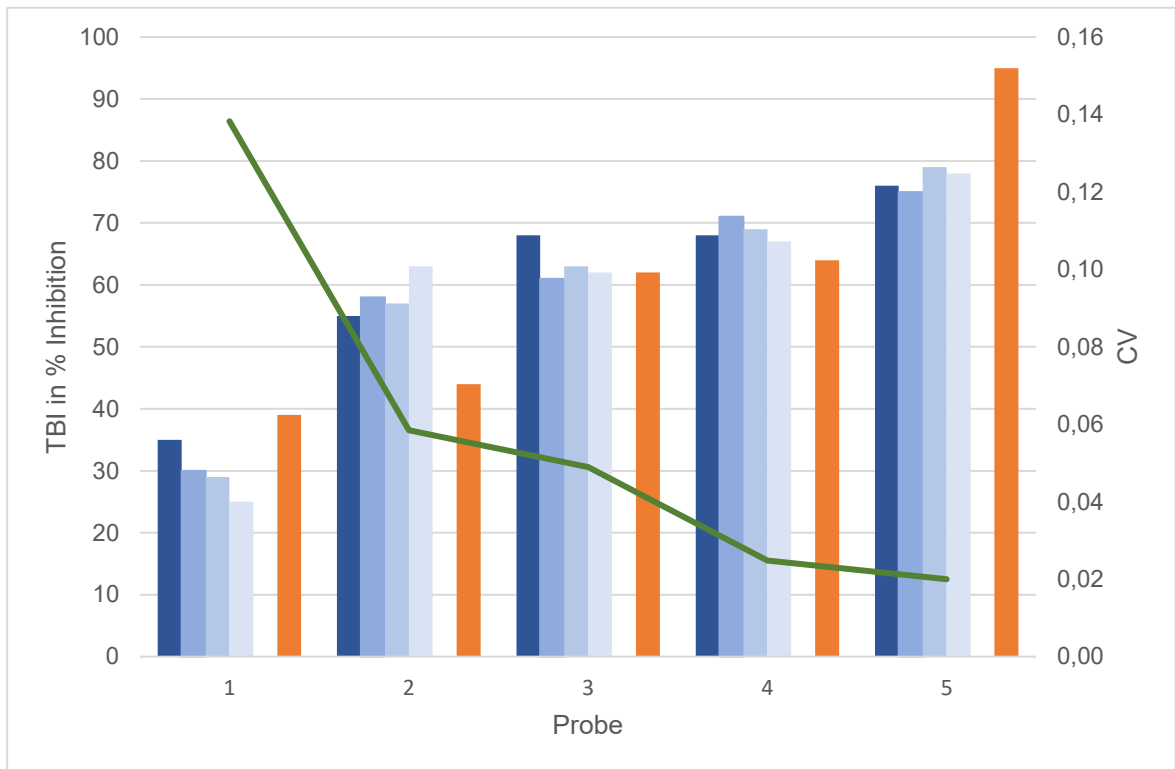


Abb. 17 Tag 1 Tag 2 Tag 3 Tag 4 Thyretain® TBI CV. Ergebnisse der Präzisionsmessung von Anwender 1 Charge 1.

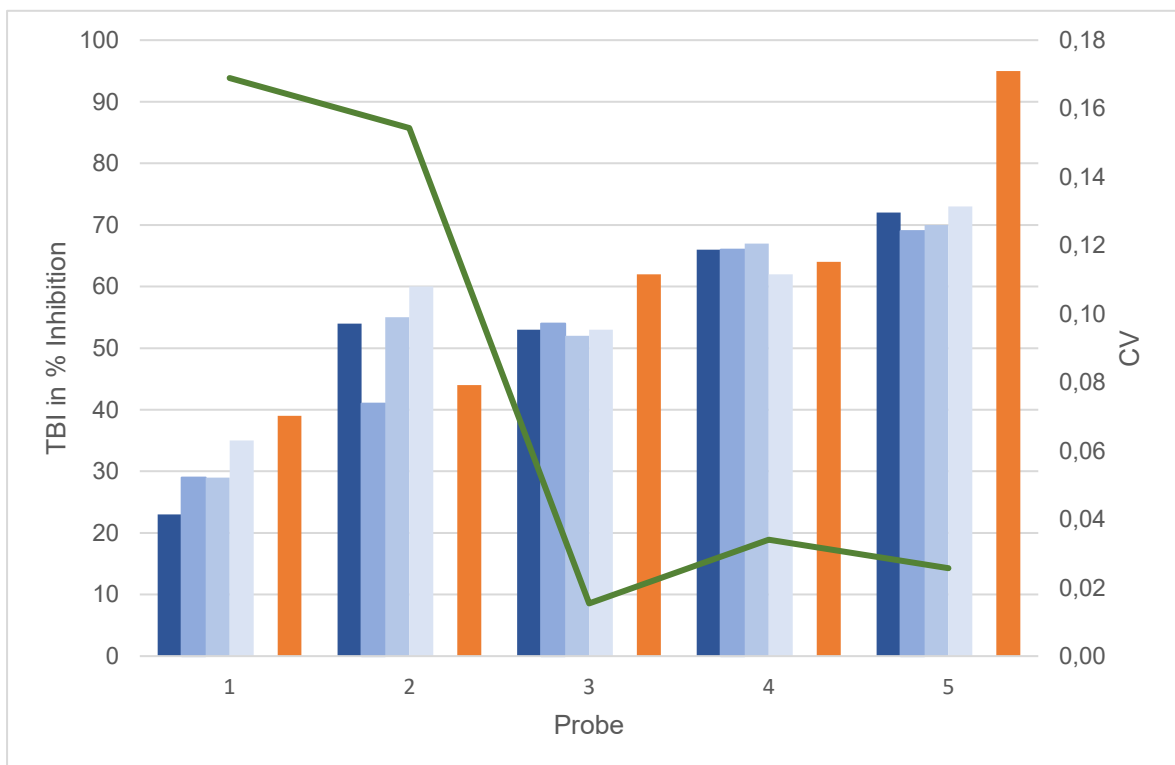


Abb. 18 Tag 1 Tag 2 Tag 3 Tag 4 Thyretain® TBI CV. Ergebnisse der Präzisionsmessung von Anwender 2 Charge 1.

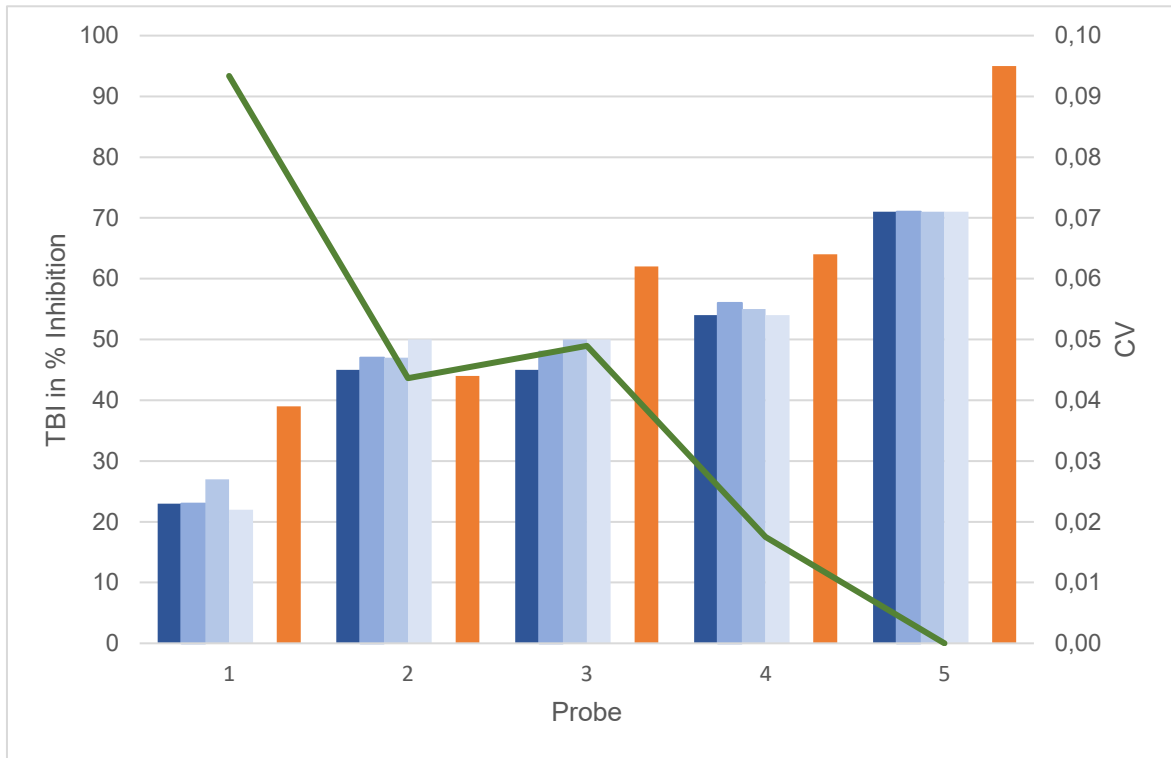


Abb. 19 Tag 1 Tag 2 Tag 3 Tag 4 Thyretain® TBI CV. Ergebnisse der Präzisionsmessung von Anwender 1 Charge 2.

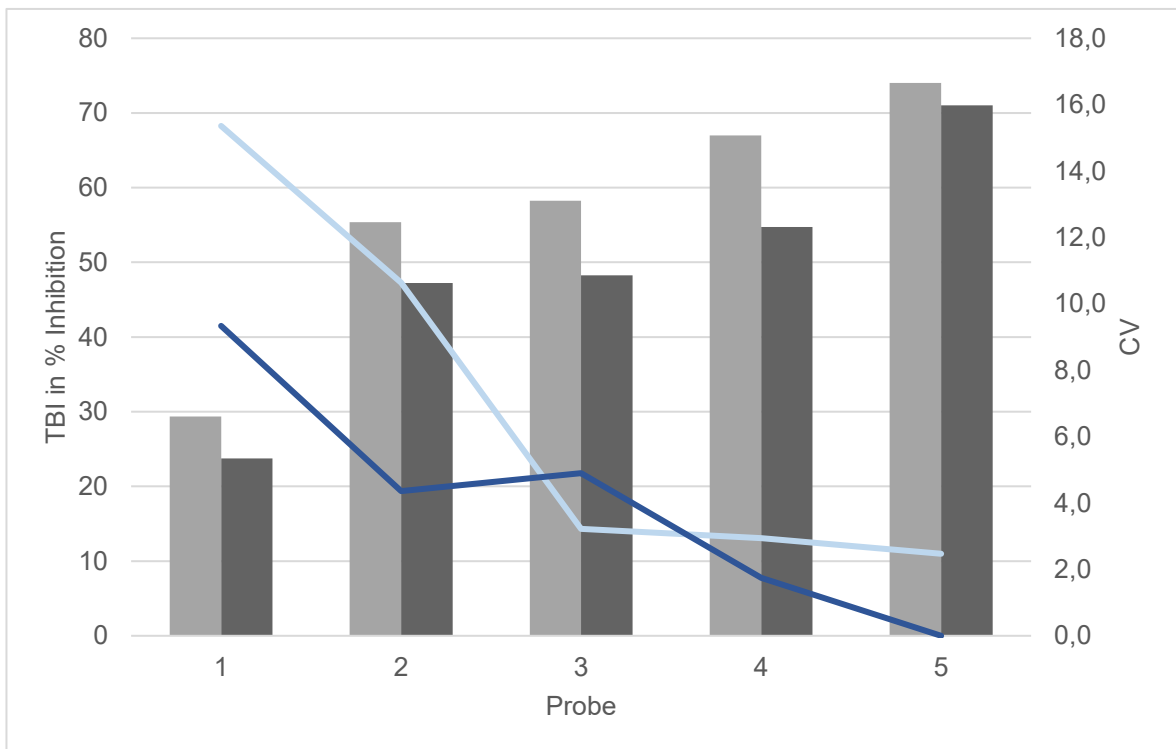


Abb. 20 \bar{x} Charge 1 \bar{x} Charge 2 CV Charge 1 CV Charge 2. Darstellung der Turbo™ TBI-Mittelwerte und CV.

6. Zusammenfassung

Die Implementierung der Turbo™ TBI und TSI Bioassays im klinischen Setting kann sich positiv auf die Diagnostik und Überwachung von AITD-Patienten auswirken. Durch die höhere Probenkapazität und die unmittelbare Einsatzbereitschaft der Zellen im Turbo™ kann nicht nur Zeit, sondern auch finanzielle Ressourcen eingespart werden. Die Verwendung unverdünnter Proben trägt maßgeblich zur Vereinfachung bei und reduziert die Fehleranfälligkeit sowie die Komplexität.

Die Abhängigkeit des Turbo™ Assays mit den serologischen Ergebnissen und der Schilddrüsenfunktion unterstreichen die klinische Relevanz des Tests. Diese Arbeit legt nahe, dass die Ergebnisse des Assays mit der Klinik des Patienten korrelieren.

Die hohe Übereinstimmung des Turbo™ TBI Bioassays mit aktuellen Immunoassays bezeugt seine Sensitivität und Spezifität bei der Identifikation von AITD-Patienten. Diese Ergebnisse unterstützen den Turbo™ TBI als vielversprechende Methode für die Identifikation blockierender Antikörper und heben seine diagnostischen Vorteile hervor. Die Präzisionsanalyse deutet darauf hin, dass für den Turbo™ TBI Bioassay im Bereich niedrig positiver Inhibition eine gewisse Varianz besteht. Dies könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen und Optimierungen sein, um die Anwendbarkeit des Turbo™ TBI Bioassays zu verbessern.

Es besteht eine höhere Sensitivität der Turbo™ Bioassays. Trotz der bisherigen Bevorzugung des TRAK kann der Turbo™ TBI und TSI durch seine einfache Anwendung eine praktikable Alternative bieten. Die potenzielle Integration des Turbo™ Bioassays in klinischen Routinetests könnte zu einer effektiveren und zugänglicheren Diagnostik von AITD führen.

7. Literaturverzeichnis

ADAMS, D. D. 1965. Pathogenesis of the Hyperthyroidism of Graves's Disease. *Br Med J*, 1, 1015-9.

AKAMIZU, T., IKUYAMA, S., SAJI, M., KOSUGI, S., KOZAK, C., MCBRIDE, O. W. & KOHN, L. D. 1990. Cloning, chromosomal assignment, and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5677-81.

ALLELEIN, S., DIANA, T., EHLERS, M., KANITZ, M., HERMSEN, D., SCHOTT, M. & KAHALY, G. J. 2019. Comparison of a Bridge Immunoassay with Two Bioassays for Thyrotropin Receptor Antibody Detection and Differentiation. *Horm Metab Res*, 51, 341-346.

AMBESI-IMPIOMBATO, F. S., PARKS, L. A. & COON, H. G. 1980. Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 3455-9.

BARTALENA, L., KAHALY, G. J., BALDESCHI, L., DAYAN, C. M., ECKSTEIN, A., MARCOCCI, C., MARINÒ, M., VAIDYA, B. & WIERSINGA, W. M. 2021. The 2021 European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves' orbitopathy. *Eur J Endocrinol*, 185, G43-g67.

BINKOWSKI, B. F., BUTLER, B. L., STECHA, P. F., EGGERS, C. T., OTTO, P., ZIMMERMAN, K., VIDUGIRIS, G., WOOD, M. G., ENCELL, L. P., FAN, F. & WOOD, K. V. 2011. A luminescent biosensor with increased dynamic range for intracellular cAMP. *ACS Chem Biol*, 6, 1193-7.

BROWN, J. & MUNRO, D. S. 1967. A new in vitro assay for thyroid-stimulating hormone. *J Endocrinol*, 38, 439-49.

BUONFIGLIO, F., PONTO, K. A., PFEIFFER, N., KAHALY, G. J. & GERICKE, A. 2024. Redox mechanisms in autoimmune thyroid eye disease. *Autoimmun Rev*, 23, 103534.

CASTELLNOU, S., BRETONES, P., ABEILLON, J., MORET, M., PERRIN, P., CHIKH, K. & RAVEROT, V. 2021. Congenital Hypothyroidism due to a Low Level of Maternal Thyrotropin Receptor-Blocking Antibodies. *Eur Thyroid J*, 10, 174-178.

CHIOVATO, L., VITTI, P., BENDINELLI, G., SANTINI, F., FIORE, E., CAPACCIOLI, A., TONACCHERA, M., MAMMOLI, C., LUDGATE, M. & PINCHERA, A. 1994. Detection of antibodies blocking thyrotropin effect using Chinese hamster ovary cells transfected with the cloned human TSH receptor. *J Endocrinol Invest*, 17, 809-16.

CHIOVATO, L., VITTI, P., SANTINI, F., LOPEZ, G., MAMMOLI, C., BASSI, P., GIUSTI, L., TONACCHERA, M., FENZI, G. & PINCHERA, A. 1990. Incidence of antibodies blocking thyrotropin effect in vitro in patients with euthyroid or hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*, 71, 40-5.

DAVIES, T. F., ANDERSEN, S., LATIF, R., NAGAYAMA, Y., BARBESINO, G., BRITO, M., ECKSTEIN, A. K., STAGNARO-GREEN, A. & KAHALY, G. J. 2020. Graves' disease. *Nat Rev Dis Primers*, 6, 52.

DECALLONNE, B., MARTENS, P. J., VAN DEN BRUEL, A., VANHOLE, C. & KAHALY, G. J. 2020. Graves Disease With Thyroid-Stimulating Hormone Receptor-Blocking Autoantibodies During Pregnancy. *Ann Intern Med*, 172, 767-769.

DIANA, T., KRAUSE, J., OLIVO, P. D., KÖNIG, J., KANITZ, M., DECALLONNE, B. & KAHALY, G. J. 2017. Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol*, 189, 304-309.

DIANA, T., LI, Y., OLIVO, P. D., LACKNER, K. J., KIM, H., KANITZ, M. & KAHALY, G. J. 2016. Analytical Performance and Validation of a Bioassay for Thyroid-Blocking Antibodies. *Thyroid*, 26, 734-40.

DIANA, T., OLIVO, P. D., CHANG, Y. H., WÜSTER, C., KANITZ, M. & KAHALY, G. J. 2020. Comparison of a Novel Homogeneous Cyclic Amp Assay and a Luciferase Assay for Measuring Stimulating Thyrotropin-Receptor Autoantibodies. *Eur Thyroid J*, 9, 67-72.

DIANA, T., OLIVO, P. D. & KAHALY, G. J. 2018. Thyrotropin Receptor Blocking Antibodies. *Horm Metab Res*, 50, 853-862.

DIANA, T., PONTO, K. A. & KAHALY, G. J. 2021. Thyrotropin receptor antibodies and Graves' orbitopathy. *J Endocrinol Invest*, 44, 703-712.

EVANS, C., JORDAN, N. J., OWENS, G., BRADLEY, D., LUDGATE, M. & JOHN, R. 2004. Potent thyrotrophin receptor-blocking antibodies: a cause of transient congenital hypothyroidism and delayed thyroid development. *Eur J Endocrinol*, 150, 265-8.

EVANS, M., SANDERS, J., TAGAMI, T., SANDERS, P., YOUNG, S., ROBERTS, E., WILMOT, J., HU, X., KABELIS, K., CLARK, J., HOLL, S., RICHARDS, T., COLLYER, A., FURMANIAK, J. & SMITH, B. R. 2010. Monoclonal autoantibodies to the TSH receptor, one with stimulating activity and one with blocking activity, obtained from the same blood sample. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 73, 404-12.

FRITZ, C. O., MORRIS, P. E. & RICHLER, J. J. 2012. Effect size estimates: current use, calculations, and interpretation. *J Exp Psychol Gen*, 141, 2-18.

FROMMER, L., KÖNIG, J., CHATZIDOU, S., CHIONOS, G., LÄNGERICH, J. & KAHALY, G. J. 2023. Recurrence risk of autoimmune thyroid and endocrine diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 37, 101636.

GEORGE, A., DIANA, T., LÄNGERICH, J. & KAHALY, G. J. 2020. Stimulatory Thyrotropin Receptor Antibodies Are a Biomarker for Graves' Orbitopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 629925.

GEORGE, A., LOTZ, J., LUFFY, M., GANZ, A. L., WOLF, J. & KAHALY, G. J. 2024. A novel bioassay for thyroid-blocking immunoglobulins. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 15, 1463379.

- GIULIANI, C., SAJI, M., BUCCI, I. & NAPOLITANO, G. 2016. Bioassays for TSH Receptor Autoantibodies, from FRTL-5 Cells to TSH Receptor-LH/CG Receptor Chimeras: The Contribution of Leonard D. Kohn. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 7, 103.
- HIMMLER, A., STRATOWA, C. & CZERNILOFSKY, A. P. 1993. Functional testing of human dopamine D1 and D5 receptors expressed in stable cAMP-responsive luciferase reporter cell lines. *J Recept Res*, 13, 79-94.
- ISEKI, M., SHIMIZU, M., OIKAWA, T., HOJO, H., ARIKAWA, K., ICHIKAWA, Y., MOMOTANI, N. & ITO, K. 1983. Sequential serum measurements of thyrotropin binding inhibitor immunoglobulin G in transient familial neonatal hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 57, 384-7.
- JUAN-MANUEL ANAYA, Y. S., ADRIANA ROJAS-VILLARRAGA, ROGER A. LEVY, RICARD CERVERA , EDITORS. 2013. Autoimmunity: From Bench to Bedside. *In: ANAYA, J. M., SHOENFELD, Y., ROJAS-VILLARRAGA, A., LEVY, R. A. & CERVERA, R. (eds.) Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Bogota (Colombia): El Rosario University Press
© 2013 Universidad del Rosario.
- KAHALY, G. J. 2020. Management of Graves Thyroidal and Extrathyroidal Disease: An Update. *J Clin Endocrinol Metab*, 105, 3704-20.
- KAHALY, G. J., BARTALENA, L., HEGEDÜS, L., LEENHARDT, L., POPPE, K. & PEARCE, S. H. 2018. 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism. *Eur Thyroid J*, 7, 167-186.
- KAHALY, G. J. & DIANA, T. 2017. TSH Receptor Antibody Functionality and Nomenclature. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 28.
- KAHALY, G. J., DIANA, T., GLANG, J., KANITZ, M., PITZ, S. & KÖNIG, J. 2016. Thyroid Stimulating Antibodies Are Highly Prevalent in Hashimoto's Thyroiditis and Associated Orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 101, 1998-2004.
- KAHALY, G. J., DIANA, T. & OLIVO, P. D. 2020. TSH Receptor Antibodies: Relevance & Utility. *Endocr Pract*, 26, 97-106.
- KIEFER, F. W., KLEBERMASS-SCHREHOF, K., STEINER, M., WORDA, C., KASPRIAN, G., DIANA, T., KAHALY, G. J. & GESSL, A. 2017. Fetal/Neonatal Thyrotoxicosis in a Newborn From a Hypothyroid Woman With Hashimoto Thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*, 102, 6-9.
- KIM, M. R., FAIMAN, C., HOOGWERF, B. J. & GUPTA, M. K. 1997. Thyroid-stimulating antibody assay using a human thyrotropin receptor transfected cell line: relationship to clinical features of graves' disease. *Endocr Pract*, 3, 337-43.
- KRAIEM, Z., CHO, B. Y., SADEH, O., SHONG, M. H., PICKERILL, P. & WEETMAN, A. P. 1992. The IgG subclass distribution of TSH receptor blocking antibodies in primary hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 37, 135-40.

- KRISS, J. P., PLESHAKOV, V. & CHIEN, J. R. 1964. Isolation and Identification of the Long-Acting Thyroid Stimulator and Its Relation to Hyperthyroidism and Circumscribed Pretibial Myxedema. *J Clin Endocrinol Metab*, 24, 1005-28.
- LANZOLLA, G., MARINÒ, M. & MENCONI, F. 2024. Graves disease: latest understanding of pathogenesis and treatment options. *Nature Reviews Endocrinology*.
- LI, Y., KIM, J., DIANA, T., KLASSEN, R., OLIVO, P. D. & KAHALY, G. J. 2013. A novel bioassay for anti-thyrotrophin receptor autoantibodies detects both thyroid-blocking and stimulating activity. *Clin Exp Immunol*, 173, 390-7.
- LYTTON, S. D. & KAHALY, G. J. 2010. Bioassays for TSH-receptor autoantibodies: an update. *Autoimmun Rev*, 10, 116-22.
- MCLACHLAN, S. M. & RAPOPORT, B. 2013. Thyrotropin-blocking autoantibodies and thyroid-stimulating autoantibodies: potential mechanisms involved in the pendulum swinging from hypothyroidism to hyperthyroidism or vice versa. *Thyroid*, 23, 14-24.
- MIAO, L. Y., KIM, H. J., WHITLATCH, K., JAISWAL, D., NAVARRO, A., EGAN, R. & OLIVO, P. D. 2022. A rapid homogenous bioassay for detection of thyroid-stimulating antibodies based on a luminescent cyclic AMP biosensor. *J Immunol Methods*, 501, 113199.
- MÖLLER, L. 2023. Autoimmunthyreoiditis (Schilddrüse). [Accessed 15.10.2023].
- MORGENTHALER, N. G., PAMPEL, I., AUST, G., SEISSLER, J. & SCHERBAUM, W. A. 1998. Application of a bioassay with CHO cells for the routine detection of stimulating and blocking autoantibodies to the TSH-receptor. *Horm Metab Res*, 30, 162-8.
- MORSHERED, S. A., ANDO, T., LATIF, R. & DAVIES, T. F. 2010. Neutral antibodies to the TSH receptor are present in Graves' disease and regulate selective signaling cascades. *Endocrinology*, 151, 5537-49.
- MORSHERED, S. A. & DAVIES, T. F. 2015. Graves' Disease Mechanisms: The Role of Stimulating, Blocking, and Cleavage Region TSH Receptor Antibodies. *Horm Metab Res*, 47, 727-34.
- MORSHERED, S. A., MA, R., LATIF, R. & DAVIES, T. F. 2013. How one TSH receptor antibody induces thyrocyte proliferation while another induces apoptosis. *J Autoimmun*, 47, 17-24.
- NACHAR, N. 2008. The Mann-Whitney U: A Test for Assessing Whether Two Independent Samples Come from the Same Distribution. *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology*, 4.
- OLIVO, P. D. 2023. Bioassays for thyrotropin receptor autoantibodies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 37, 101744.

- PARMENTIER, M., LIBERT, F., MAENHAUT, C., LEFORT, A., GÉRARD, C., PERRET, J., VAN SANDE, J., DUMONT, J. E. & VASSART, G. 1989. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science*, 246, 1620-2.
- SARIĆ MATUTINOVIĆ, M., DIANA, T., NEDELJKOVIĆ BELESLIN, B., ĆIRIĆ, J., ŽARKOVIĆ, M., KAHALY, G. J. & IGNJATOVIĆ, S. 2022. Clinical value of functional thyrotropin receptor antibodies in Serbian patients with Graves' orbitopathy. *J Endocrinol Invest*, 45, 189-197.
- SGARBI, J. A. & MACIEL, R. M. 2009. [Pathogenesis of autoimmune thyroid diseases]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 53, 5-14.
- TADA, H., IZUMI, Y., WATANABE, Y., TAKANO, T., FUKATA, S., KUMA, K., HIDAKA, Y. & AMINO, N. 2001. Blocking type anti-tSH receptor antibodies detected by radioreceptor assay in Graves' disease. *Endocr J*, 48, 703-10.
- TADA, H., MIZUTA, I., TAKANO, T., TATSUMI, K. I., IZUMI, Y., HIDAKA, Y. & AMINO, N. 2003. Blocking-type anti-TSH receptor antibodies and relation to responsiveness to antithyroid drug therapy and remission in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 58, 403-8.
- TAHARA, K., BAN, T., MINEGISHI, T. & KOHN, L. D. 1991. Immunoglobulins from Graves' disease patients interact with different sites on TSH receptor/LH-CG receptor chimeras than either TSH or immunoglobulins from idiopathic myxedema patients. *Biochem Biophys Res Commun*, 179, 70-7.
- TAHARA, K., ISHIKAWA, N., YAMAMOTO, K., HIRAI, A., ITO, K., TAMURA, Y., YOSHIDA, S., SAITO, Y. & KOHN, L. D. 1997. Epitopes for thyroid stimulating and blocking autoantibodies on the extracellular domain of the human thyrotropin receptor. *Thyroid*, 7, 867-77.
- TAKASU, N. & MATSUSHITA, M. 2012. Changes of TSH-Stimulation Blocking Antibody (TSBAb) and Thyroid Stimulating Antibody (TSAb) Over 10 Years in 34 TSBAb-Positive Patients with Hypothyroidism and in 98 TSAb-Positive Graves' Patients with Hyperthyroidism: Reevaluation of TSBAb and TSAb in TSH-Receptor-Antibody (TRAb)-Positive Patients. *J Thyroid Res*, 2012, 182176.
- TAKASU, N., MORI, T., KOIZUMI, Y., TAKEUCHI, S. & YAMADA, T. 1984. Transient neonatal hypothyroidism due to maternal immunoglobulins that inhibit thyrotropin-binding and post-receptor processes. *J Clin Endocrinol Metab*, 59, 142-6.
- TAKASU, N., YAMADA, T., KATAKURA, M., YAMAUCHI, K., SHIMIZU, Y. & ISHIZUKI, Y. 1987. Evidence for thyrotropin (TSH)-blocking activity in goitrous Hashimoto's thyroiditis with assays measuring inhibition of TSH receptor binding and TSH-stimulated thyroid adenosine 3',5'-monophosphate responses/cell growth by immunoglobulins. *J Clin Endocrinol Metab*, 64, 239-45.
- TAKASU, N., YAMADA, T., TAKASU, M., KOMIYA, I., NAGASAWA, Y., ASAWA, T., SHINODA, T., AIZAWA, T. & KOIZUMI, Y. 1992. Disappearance of thyrotropin-blocking antibodies and spontaneous recovery from hypothyroidism in autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med*, 326, 513-8.

TOCCAFONDI, R. S., ATERINI, S., MEDICI, M. A., ROTELLA, C. M., TANINI, A. & ZONEFRATI, R. 1980. Thyroid-stimulating antibody (TSab) detected in sera of Graves' patients using human thyroid cell cultures. *Clin Exp Immunol*, 40, 532-9.

VALENTE, W. A., VITTI, P., YAVIN, Z., YAVIN, E., ROTELLA, C. M., GROLLMAN, E. F., TOCCAFONDI, R. S. & KOHN, L. D. 1982. Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: stimulating and blocking antibodies derived from the lymphocytes of patients with Graves disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 6680-4.

VITTI, P., ELISEI, R., TONACCHERA, M., CHIOVATO, L., MANCUSI, F., RAGO, T., MAMMOLI, C., LUDGATE, M., VASSART, G. & PINCHERA, A. 1993. Detection of thyroid-stimulating antibody using Chinese hamster ovary cells transfected with cloned human thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 76, 499-503.

WALLASCHOFSKI, H. & PASCHKE, R. 1999. Detection of thyroid stimulating (TSAB)- and thyrotropin stimulation blocking (TSBAB) antibodies with CHO cell lines expressing different TSH-receptor numbers. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 50, 365-72.

WATSON, P. F., AJJAN, R. A., PHIPPS, J., METCALFE, R. & WEETMAN, A. P. 1998. A new chemiluminescent assay for the rapid detection of thyroid stimulating antibodies in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 49, 577-81.

WEETMAN, A. P. 2021. An update on the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Invest*, 44, 883-890.

8. Danksagung

9. Lebenslauf

Schulbildung

Grundschule Heumaden, Stuttgart/	Juni 2001- Juni 2005
Paracelsus Gymnasium Hohenheim, Stuttgart/	Juni 2005 - Juni 2013
Allgemeine Hochschulreife/	Juni 2014

Hochschulstudium

April 2016 - Mai 2022	Johannes Gutenberg-Universität Mainz Studienfach: Humanmedizin
03.04.2018	Erste Ärztliche Prüfung
15.04.2021	Zweite Ärztliche Prüfung
05.05.2022	Dritte Ärztliche Prüfung

Famulaturen

09.08.2018 - 09.09.2018	Rems-Murr Kliniken Winnenden: Abteilung für Gastroenterologie
22.02.2019 - 24.03.2019	Stuttgart, Plieningen: Hausarztpraxis Dr. med. Andreas Altvater
05.08.2019 - 05.09.2019	Klinikum Stuttgart: Abteilung für Endokrinologie, Diabetologie und Geriatric
17.02.2020 - 17.03.2020	Universitätsmedizin Mainz: I. Medizinische Klinik und Poliklinik Schwerpunkt Endokrinologie und Stoffwechselmedizin

Praktisches Jahr

Mai 2021 - August 2021	Diakonie Klinikum Bad Kreuznach Fach: Innere Medizin
------------------------	---

September 2021 - Dezember 2021

Diakonie Klinikum Bad Kreuznach
Fach: Gynäkologie

Januar 2022 - April 2022

Diakonie Klinikum Bad Kreuznach
Fach: Chirurgie

Weiterbildungsstelle

Seit Januar 2023

Diakonie Klinikum Bad Kreuznach
Facharztweiterbildung für Plastische,
Rekonstruktive und Ästhetische
Chirurgie

Publikationen

Februar 2021

George et al. „*Stimulatory Thyrotropin Receptor Antibodies Are a Biomarker for Graves' Orbitopathy*“ *Frontiers in Endocrinology* (2021)

April 2023

Kahaly et al. „*Thyrotropin Receptor Antagonism by a Novel Small Molecule: Preclinical In Vitro Observations*“ *Thyroid* (2023)

Oktober 2024

George et al. „*A novel bioassay for thyroid-blocking immunoglobulins*“ *Frontiers in Endocrinology* (2024)