

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

„Ein neuer, schneller Bioassay als Biomarker für Endokrine Orbitopathie“

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

vorgelegt von

Siegmund Michael Alt
aus Nohfelden

Mainz, 2026

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. P. Drees

Tag der Promotion: 30.01.2026

Nachnutzungslizenz: CC-BY-4.0

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Untersuchtes Kollektiv	3
2 Literaturdiskussion	4
2.1 Schilddrüse	4
2.2 Erkrankungen der Schilddrüse	5
2.2.1 Morbus Basedow	5
2.2.2 Hashimoto Thyreoiditis	7
2.2.3 Endokrine Orbitopathie	8
2.2.4 Der neonatale Fc Rezeptor (FcRn)	11
2.3 Thyreoidale Antikörper und ihre Messmethoden	12
2.3.1 Bindungsassay TRAK	12
2.3.2 Thyretain TSI BioAssay	13
2.4 Turbo TSI Bioassay	16
2.5 Klinischer Nutzen von Turbo TSI	18
2.6 Bedeutung eines leicht durchführbaren funktionellen Bioassays	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.2 Methodik	21
3.2.1 Vorläufige Anmerkung und Vorsichtsmaßnahmen	21
3.2.2 Turbo TSI Messung	21
3.2.3 Limitationen der Turbo TSI Messung	22
3.2.4 Luciferase Assay System	22
4 Ergebnisse	23
4.1 Gesamtkollektiv und Studiendesign	23
4.2 Ergebnisse der Proben	25
4.2.1 Placebogruppe	25
4.2.2 Gruppen mit Studienmedikation	29
4.3 Assayverläufe	46
4.3.1 Deskriptive Statistik	46
4.3.2 Vergleich der Gruppen – Mann-Whitney-U Test	49
4.4 Vergleich der Visiten	50
4.4.1 Deskriptive Statistik	50
4.4.2 Vergleich der Gruppen	51
4.5 Korrelationen	53
4.6 Diskordante Proben	55
4.7 Sensitivität	55

5	Diskussion.....	56
5.1	Turbo TSI als Biomarker für Morbus Basedow	56
5.1.1	Verhalten des Turbo TSI auf die Studienmedikation	56
5.1.2	Sensitivität und Diskordanzen.....	58
5.1.3	Korrelation des Turbo TSI zu Thyretain TSI und TRAK.....	58
5.1.4	Verhalten des Turbo TSI zu klinischen Parametern	59
5.1.5	Limitationen der Ergebnisse	60
6	Zusammenfassung.....	61
6.1	Turbo TSI als klinischer Parameter und Biomarker.....	61
6.2	Vorteile und Schwächen des Turbo TSI, klinische Zukunft	62
7	Literaturverzeichnis	63
8	Danksagung.....	66
9	Tabellarischer Lebenslauf	67

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
BL	Baseline
bTSH	Bovines TSH
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAS	Clinical Acitivity Score
CHO	Chinese Hamster Ovary
CRE	cAMP response elements
CREB	cAMP response elements binding protein
CT	Computertomographie
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EO	Endokrine Orbitopathie
EUGOGO	European Group on Graves' orbitopathy
FcRn	Neonataler Fc-Rezeptor
ft3	Freies Triiodthyronin
ft4	Freies Thyroxin
Gs-Protein	Stimulierendes G-Protein
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IU/L	Internationale Units pro Liter
L-T	L-Thyroxin
Luc	Luciferase
mAb	Monoklonaler Antikörper
MB	Morbus Basedow
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
n.s.	nicht signifikant
PKA	Proteinkinase A
RLU	Relative light units
s.c.	study completed
SD,	Schilddrüse
SRR%	Specimen to Reference ratio
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TBG	Thyroxin Bindendes Globulin
TBI	TSH-Rezeptor blockierende Immunglobuline
Tg	Thyreoglobulin
Tg-Ak	Antikörper gegen TG
Thi.	Thiamazol
TPO	Thyreoperoxidase
TPO-Ak	Antikörper gegen TPO
TRAK	TSH-Rezeptor Antikörper
TRH,	TSH Releasing Hormone
TSH	Thyroidea Stimulierendes Hormon
TSH-R	Thyroidea Stimulierendes Hormon Rezeptor
TSI	TSH-Rezeptor stimulierende Immunglobuline

TSI Assay	Thyretain TSI Reporter Bioassay
Turbo TSI Assay	Thyretain Turbo TSI Reporter Bioassay
vs	versus
W1,W13,W20 etc	Woche 1, Woche 13, Woche 20, etc (Studienzeitpunkte)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Regelkreis der Schilddrüse Quelle: Facharztwissen Endokrinologie (van de Loo, 2020).....	5
Abbildung 2 Pathogenese der endokrinen Orbitopathie, Quelle (George, 2021).....	9
Abbildung 3 Funktionsweise des TSI Bioassays 1/2.....	14
Abbildung 4 Funktionsweise des TSI Bioassays 2/2.....	14
Abbildung 5 GloSensor 22F cAMP-Quelle (Binkowski, 2011).....	16
Abbildung 6 Aufbau des GloSensor-22F cAMP-Plasmids.....	17
Abbildung 7 Funktionsweise des Turbo TSI Bioassays 1/2.....	18
Abbildung 8 Funktionsweise des Turbo TSI Bioassays 2/2.....	18
Abbildung 9 Turbo TSI auf 96-well Platte.....	21
Abbildung 10 Turbo TSI Auswertungsschema: gemessene RLU über dem höchsten Standard liefern ungenaue Ergebnisse in IU/l.....	22
Abbildung 11 Luciferasereaktion Quelle (Lyons, 2013).....	22
Abbildung 12 abgeschlossene Studienpatienten pro Gruppe; 0=Placebo; 1=255mg Gruppe; 2=340mg Gruppe; 3=680mg Gruppe.....	24
Abbildung 13 Patient 22 - Placebo - TRAK und Turbo TSI.....	26
Abbildung 14 Patient 22 - Placebo - TSI und Turbo TSI.....	27
Abbildung 15 Mediane Placebogruppe - TRAK und Turbo TSI.....	28
Abbildung 16 Mediane Placebogruppe - TSI und Turbo TSI.....	29
Abbildung 17 Patient 3 - low dose - TRAK und Turbo TSI.....	31
Abbildung 18 Patient 3 - low dose - TSI und Turbo TSI.....	31
Abbildung 19 Patient 16 - mid dose - TRAK und Turbo TSI.....	34
Abbildung 20 Patient 16 - mid dose - TSI und Turbo TSI.....	34
Abbildung 21 Patient 14 - mid dose - TRAK und Turbo TSI.....	35
Abbildung 22 Patient 14 - mid dose - TSI und Turbo TSI.....	36
Abbildung 23 Patient 17 - mid dose - TRAK und Turbo TSI.....	38
Abbildung 24 Patient 17 - mid dose - TSI und Turbo TSI.....	38
Abbildung 25 Patient 29 - mid dose - TRAK und Turbo TSI.....	39
Abbildung 26 Patient 29 - mid dose - TSI und Turbo TSI.....	40
Abbildung 27 Patient 4 - high dose - TRAK und Turbo TSI.....	41
Abbildung 28 Patient 4 - high dose - TSI und Turbo TSI.....	42
Abbildung 29 Patient 12 - high dose - TRAK und Turbo TSI.....	44
Abbildung 30 Patient 12 - high dose - TSI und Turbo TSI.....	44
Abbildung 31 Mediane Medikation - TRAK und Turbo TSI.....	45
Abbildung 32 Mediane Medikationsgruppe - TSI und Turbo TSI.....	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Bioassays im Vergleich	19
Tabelle 2 Verwandte Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 3 Verwandte Geräte	20
Tabelle 4 Demografische Daten der Studienpatienten mit Fisher-Exakt Test auf einem Signifikanzniveau von 0,05	25
Tabelle 5 Patient 22: Assayergebnisse.....	26
Tabelle 6 Patient 22: Assayverläufe	26
Tabelle 7 Patient 22 - klinische Parameter	27
Tabelle 8 Mediane Patienten Placebogruppe	28
Tabelle 9 Patient 3 - Assayergebnisse	30
Tabelle 10 Patient 3 - Assayverläufe	30
Tabelle 11 Patient 3 - low dose – klinische Parameter.....	31
Tabelle 12 Patient 9 - low dose - Assayergebnisse	32
Tabelle 13 Patient 9 - low dose - Assayverläufe	32
Tabelle 14 Patient 9 - low dose - klinische Parameter	32
Tabelle 15 Patient 16 - mid dose - Assayergebnisse	33
Tabelle 16 Patient 16 - mid dose - Assayverläufe	33
Tabelle 17 Patient 16 - mid dose - klinische Parameter	34
Tabelle 18 Patient 14 - mid dose - Assayergebnisse	35
Tabelle 19 Patient 14 - mid dose - klinische Parameter	36
Tabelle 20 Patient 14 - mid dose - Assayverläufe	36
Tabelle 21 Patient 17 - mid dose - Assayergebnisse	37
Tabelle 22 Patient 17 - mid dose - Assayverläufe	37
Tabelle 23 Patient 17 - mid dose - klinische Parameter	37
Tabelle 24 Patient 29 - mid dose - Assayergebnisse	39
Tabelle 25 Patient 29 - mid dose - Assayverläufe	40
Tabelle 26 Patient 29 - mid dose - klinische Parameter	40
Tabelle 27 Patient 4 - high dose - Assayergebnisse	41
Tabelle 28 Patient 4 - high dose - klinische Parameter	42
Tabelle 29 Patient 4 - high dose – Assayverläufe	42
Tabelle 30 Patient 12 - Assayergebnisse.....	43
Tabelle 31 Patient 12- high dose - Assayverläufe.....	43
Tabelle 32 Patient 12 - high dose- klinische Parameter	43
Tabelle 33 Mediane Medikationsgruppe – Assayergebnisse	45
Tabelle 34 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - TRAK Placebo	46
Tabelle 35 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - TRAK Medikation.....	47
Tabelle 36 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - TSI Placebo	47
Tabelle 37 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - TSI Medikation.....	47
Tabelle 38 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - Turbo TSI Placebo	47
Tabelle 39 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - Turbo TSI Medikation.....	47
Tabelle 40 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - Turbo TSI 255mg Gruppe	48
Tabelle 41 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - Turbo TSI 340mg Gruppe	48
Tabelle 42 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - Turbo TSI 680mg Gruppe	48
Tabelle 43 Mann-Whitney-U Test und t-Test Assayverläufe	49
Tabelle 44 Deskriptive Statistik - Visiten – Placebo – TRAK	50
Tabelle 45 Deskriptive Statistik - Visiten - Placebo - TSI	50
Tabelle 46 Deskriptive Statistik - Visiten - Placebo - Turbo TSI	50
Tabelle 47 Deskriptive Statistik - Visiten –Medikation - TRAK	50
Tabelle 48 Deskriptive Statistik - Visiten –Medikation - TSI	51
Tabelle 49 Deskriptive Statistik - Visiten –Medikation - Turbo TSI	51
Tabelle 50 TRAK - Visiten – Friedman Test.....	51
Tabelle 51 TSI - Visiten – Friedman Test.....	52
Tabelle 52 Turbo TSI - Visiten - Friedman Test	52
Tabelle 53 Normalverteilung Assaydaten gesamt.....	53

Tabelle 54 Korrelation TSI vs. Turbo TSI.....	53
Tabelle 55 Korrelationen TRAK vs. Turbo TSI	53
Tabelle 56 Korrelationen - TSI und TRAK.....	53
Tabelle 57 Spearman Korrelation Assays zu klinischen Parametern	54
Tabelle 58 Diskordante Proben	55

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Hinweis: Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im Folgenden bei der Beschreibung der Patienten auf die Verwendung weiblicher und männlicher Sprachformen verzichtet und das generische Maskulinum verwendet. Alle Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für beide Geschlechter.

1.1 Einleitung

Schilddrüsenerkrankungen gehören weltweit zu den häufigsten endokrinologischen Störungen und stellen eine bedeutende Herausforderung für das Gesundheitssystem dar. Insbesondere Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse wie Morbus Basedow und Hashimoto Thyreoiditis spielen aufgrund ihrer Prävalenz und ihres Einflusses auf die Lebensqualität der Betroffenen eine zentrale Rolle. Diese Erkrankungen entstehen durch Fehlregulationen des Immunsystems, bei denen Autoantikörper gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, was zu funktionellen und strukturellen Veränderungen der Schilddrüse führt. (Smith H. , 2016) (Allelein, 2021)

Die Schilddrüse, als größte Hormondrüse des Menschen, reguliert wichtige physiologische Prozesse wie den Energiestoffwechsel, die Thermogenese und das Wachstum. Durch ihre zentrale Rolle in der Homöostase können Funktionsstörungen der Schilddrüse weitreichende systemische Auswirkungen haben. Morbus Basedow ist hierbei die häufigste Ursache für eine Hyperthyreose in Deutschland und weltweit, während Hashimoto Thyreoiditis die häufigste Ursache für eine Hypothyreose darstellt. (Feldkamp S. e., 2013) (Feldkamp, 2021)

Morbus Basedow und Autoimmunthyreoiditis

Klassischerweise findet man beim Morbus Basedow die Merseburger Trias *Exophthalmus, Struma und Tachykardie*. Typische weitere klinische Symptome sind Gewichtsverlust und Nervosität. Die Krankheit kann sich auch mit extrathyreoidalen Manifestationen äußern. Häufig tritt eine endokrine Orbitopathie auf, welche zum besagten Exophthalmus und weiteren Augenbeschwerden führt. Im Gegensatz dazu ist die Hashimoto Thyreoiditis durch eine langsame Zerstörung des Schilddrüsengewebes durch Autoimmunprozesse gekennzeichnet, was schrittweise zu einer Hypothyreose führt. (Leo, 2016) (Smith, 2010)

Die Pathophysiologie der Autoimmunthyreopathien wird maßgeblich durch die humorale Immunantwort geprägt. TSH-Rezeptor-Antikörper (TRAK) spielen vor allem bei Morbus Basedow eine zentrale Rolle, während bei Hashimoto Thyreoiditis die Antikörper gegen die Thyreoperoxidase (TPO-AK) und Thyreoglobulin (Tg-AK) dominieren. Diese Autoantikörper sind nicht nur diagnostische Marker, sondern auch wichtige Mediatoren der Krankheitsentstehung und des -verlaufs. TRAK können in ihrer Funktion stimulierend, neutral oder blockierend sein. Während bei der Hashimoto Thyreoiditis auch blockierende Autoantikörper relevant sind, spielen stimulierende Autoantikörper gegen den TSH-Reptor (TSI) eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des Morbus Basedow und der endokrinen Orbitopathie. (George, 2021) (Diana K. K., 2017)

Diagnostische Verfahren

Für die Diagnostik dieser Erkrankungen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die auf der Messung von TSH-Rezeptor-Antikörpern basieren. Bindungsassays, die TRAK im Serum messen, sind etablierte Verfahren, die die Gesamtmenge der Antikörper erfassen. Zwar sind die TRAK Bindungsassays automatisiert und zeitsparend, sie ermöglichen jedoch keine Differenzierung der Antikörperfunktion. Im Gegensatz dazu ermöglichen Bioassays wie der Turbo TSI-Assay und der Thyretain TSI-Assay die Bestimmung der funktionellen Aktivität der Antikörper. Diese Tests liefern nicht nur Informationen über die Konzentration der Antikörper, sondern auch über deren stimulierende oder blockierende Wirkung, was für die Beurteilung der Krankheitsaktivität von entscheidender Bedeutung ist. (Hötte e. a., 2024)

Therapeutische Ansätze

Die Behandlung des Morbus Basedow erfolgt primär mit thyreostatischen Medikamenten, die die Hormonproduktion der Schilddrüse hemmen. Jedoch sind Rezidive nach der Beendigung der Therapie häufig, sodass alternative Behandlungsstrategien wie die Radioiodtherapie oder die operative Entfernung der Schilddrüse in Betracht gezogen werden können. Neue therapeutische Ansätze wie der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, wie z.B. Anti-FcRn-Antikörpern bieten vielversprechende Möglichkeiten, indem sie den Abbau von Autoantikörpern fördern und somit direkt in den pathophysiologischen Prozess eingreifen. (Akilesh, 2007) (Kabir, 2021)

Relevanz der Forschung

Für die Therapieüberwachung und Prognoseabschätzung von Morbus Basedow und der endokrinen Orbitopathie ist die Messung von TRAK hoch relevant und aus der klinischen Routine nicht mehr wegzudenken. In den letzten Jahren gab es viele Fortschritte in der Forschung über die Nützlichkeit der TSI-Messung, um als Biomarker bessere Ergebnisse und Nutzen in der Behandlung der Autoimmunthyreopathie zu erzielen als bereits etablierte Bindungsassays. Während Bioassays vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer höheren Sensitivität als Bindungsassays bieten, stellt der Turbo TSI-Bioassay, wie der Name schon verrät, eine Nachweismethode dar, die TSI von vielen Proben in kurzer Zeit messen kann. (Hötte d. B., 2024)

Zielsetzung der Dissertation

Ziel dieser Dissertation ist es, den klinischen Nutzen des Turbo TSI-Assays als sensitiven und funktionellen Bioassay für die Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von Morbus Basedow und der endokrinen Orbitopathie zu untersuchen. Dabei sollen die Daten des Turbo TSI anhand eines Kollektivs mit den Ergebnissen eines TRAK Bindungsassays und eines TSI Bioassays verglichen und die Korrelation mit klinischen Parametern analysiert werden. Darüber hinaus wird der Effekt eines Anti-FcRn-Antikörpers auf die Antikörpertiter betrachtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten dazu beitragen, die Diagnostik und Therapie von Autoimmunthyreopathien weiter zu optimieren und die Messung von TRAK mittels Bindungsassay mit einem neuen effizienten Assay, um die Messung von TSI zu ergänzen oder vielleicht sogar in der Zukunft abzulösen.

1.2 Untersuchtes Kollektiv

Zur Beurteilung der Nützlichkeit des Turbo TSI Bioassays dienen Untersuchungen an n=426 Blutproben. Alle Proben entstammen n=31 Patienten, die im Rahmen einer Studie die Medikation RVT-1401 bekamen, welche ein monoklonaler, menschlicher, anti-neonataler Fc-Rezeptor Antikörper ist, welcher zum Abbau der Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor führen und dadurch die Symptomatik lindern soll. Die Studienmedikation wird als subkutane Injektion über 12 Wochen gegeben, danach folgt eine 8-wöchige Follow-Up Phase nach der letzten Spritzengabe. Die Patienten wurden dabei doppelverblindet in vier Gruppen eingeteilt: Placebo, niedrige Dosis (255mg), mittlere Dosis (340mg) und hohe Dosis (680mg). Bei jeder Visite wurde den Patienten u.a. Blut abgenommen und die Seren mit einem Bindungsassay (TRAK), dem Thyretain Reporter BioAssay (TSI Bioassay) und dem Thyretain Turbo TSI Reporter BioAssay (Turbo TSI Bioassay) gemessen. Dabei werden in dieser Arbeit für alle der insgesamt 426 Proben die Ergebnisse der Antikörper im Serum der drei unterschiedlichen Assays verglichen und bewertet. Alle 426 Serumproben wurden zusätzlich mit dem Thyretain TBI Assay auf blockierende Antikörper gegen den TSH-Rezeptor untersucht. Alle Proben waren negativ auf blockierende Antikörper.

Unter den n=31 Patienten haben n=21 die Studienmedikation über die vollen 12 Wochen erhalten. Wegen auftretender Hypercholesterinämien wurde die Studie verfrüht beendet, weshalb das Studiendesign nicht bei allen 31 Patienten komplett abgeschlossen werden konnte. Im Folgenden sollen vor allem die Daten der 21 Patienten, die die Medikation bereits über den gesamten Zeitraum erhalten hatten, betrachtet werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Schilddrüse

Die Schilddrüse ist die größte Hormondrüse im menschlichen Körper und spielt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel. Normalerweise wiegt sie zwischen 18 und 60 Gramm und befindet sich unterhalb des Kehlkopfes vor der Trachea. Aufgrund ihrer wesentlichen Funktionen kann sie Ausgangspunkt zahlreicher Erkrankungen sein, darunter Funktionsstörungen wie Hyperthyreose und Hypothyreose sowie Struma- und Knotenbildungen.

Während der Embryonalentwicklung wandert die Schilddrüse bis zur 7. Schwangerschaftswoche vom Entoderm der Schlundtaschen zu ihrer endgültigen Position vor der Trachea. Entlang dieses Weges können gelegentlich orthotope Schilddrüsenreste zurückbleiben. Ab der 10. bis 12. Schwangerschaftswoche beginnt die Schilddrüse des Fötus eigene Hormone zu produzieren, wobei das benötigte Iod diaplazentar von der Mutter übertragen wird. Hauptaufgaben der Schilddrüse sind die Speicherung von Iod, die Synthese der iodhaltigen Schilddrüsenhormone *Triiodthyronin (T3)* und *Tetraiodthyroxin (T4)* und die Speicherung der Hormone im Kolloid der Follikel.

Ein Schlüsselprozess bei der Hormonbildung ist die Aktivität der Thyreoid-Peroxidase (TPO), einem wichtigen Enzym für die Synthese der Schilddrüsenhormone. An diesem Mechanismus greifen thyreostatische Medikamente wie Thiamazol ein. T3 und T4 wirken als intrazelluläre Liganden für Transkriptionsfaktoren und steuern die Expression bestimmter Gene.

Dies führt zu folgenden Wirkungen:

- Erhöhung von Grundumsatz und Wärmeproduktion
- Steigerung der Aktivität des Glukosestoffwechsels, des Citratzyklus und der Atmungskette
- Regulation des Fett- und Bindegewebsstoffwechsels
- Förderung von Knochenwachstum und Gehirnentwicklung
- Erhöhung der Kontraktionskraft des Herzmuskels und Steigerung des Herzzeitvolumens

Erkrankungen der Schilddrüse wie Funktionsstörungen oder durch Iodmangel verursachte Struma treten häufig auf und erfordern sinnvolle diagnostische und therapeutische Maßnahmen.

(van de Loo, 2020) (Behrends, 2021) (Rassow, 2022)

Pathophysiologie der Schilddrüse

Die Schilddrüsenfunktion wird über den thyreotropen Regelkreis reguliert. Dabei spielt das vom Hypothalamus freigesetzte thyreotrope Releasinghormon (TRH) eine zentrale Rolle. Dieses Hormon gelangt über das Blutsystem zur Hypophyse, wo es die Sekretion von Thyreoidea-stimulierendem Hormon (TSH) anregt. TSH wiederum fördert die Iodaufnahme und die Synthese von Thyreoglobulin (TG) in der Schilddrüse sowie die Freisetzung der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) und Triiodthyronin (T3). Täglich werden etwa 100 µg T4 und 10 µg T3 ausgeschüttet. Über eine negative Rückkopplung hemmen die Schilddrüsenhormone selbst die Freisetzung von TRH und TSH. Die Stimulation am TSH-Rezeptor durch TSI führt zur Unterbrechung des physiologischen Regelkreises.

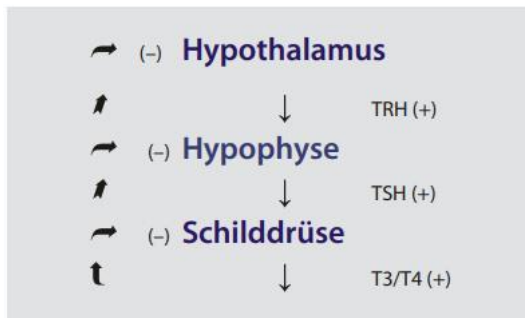


Abbildung 1 Regelkreis der Schilddrüse Quelle: Facharztwissen Endokrinologie (van de Loo, 2020)

T4 ist fast vollständig (99,9 %) an Transportproteine wie das Thyroidea-bindende Globulin (TBG) gebunden und nur 0,03 % zirkulieren frei im Plasma. Diese freie Fraktion, das sogenannte freie T4 (fT4), ist biologisch aktiv. Die Bindung an Transportproteine verlängert die Halbwertszeit von T4 auf 5–8 Tage. Im Vergleich dazu hat T3 eine kürzere Halbwertszeit von etwa 19 Stunden, da es eine geringere Affinität zu den Transportproteinen besitzt. Ein wichtiges Transportprotein ist z.B. Albumin.

Nur die freien Schilddrüsenhormone bestimmen die thyreoidale Stoffwechsellage. Das freie T3 (fT3) ist biologisch deutlich aktiver als fT4. In den Zielzellen wird das meiste T4 zu T3 deiodiert, wobei T3 dann die eigentliche Wirkung an den Rezeptoren, insbesondere im Zellkern und in den Mitochondrien, vermittelt.

Zusätzlich produziert die Schilddrüse in den parafollikulären C-Zellen das Peptidhormon Calcitonin. Dieses Hormon hemmt die Aktivität der Osteoklasten und fördert die Einlagerung von Kalzium und Phosphat in die Knochen, wodurch der Knochenabbau reduziert wird.

(van de Loo, 2020) (Behrends, 2021) (Rassow, 2022)

2.2 Erkrankungen der Schilddrüse

2.2.1 Morbus Basedow

Morbus Basedow ist nach der Schilddrüsenautonomie die zweithäufigste Ursache einer Hyperthyreose in Deutschland, mit einer Inzidenz von ca. 40 pro 100.000 Einwohner. Die Altersgruppe zwischen 20 und 50 Jahren ist am häufigsten betroffen. Pathophysiologisch spielen TSH-Rezeptor-Antikörper (TRAK) eine zentrale Rolle, da sie den TSH-Rezeptor stimulieren und eine Hyperthyreose verursachen. Blockierende Antikörper, die zu Hypothyreose führen, sind seltener. (Duan, 2022) (Allelein, 2021) (Feldkamp, 2021) Frauen sind etwa fünfmal häufiger betroffen als Männer und die Ursache ist multifaktoriell und nicht genau geklärt. Neben genetischen Faktoren in der HLA-Region können Umweltfaktoren wie Stress, virale Infektionen und Rauchen zur Entwicklung beitragen. (Allelein, 2021) (Feldkamp, 2021)

Die Erkrankung tritt häufiger mit zunehmendem Alter auf, zwei Drittel der Erkrankungen beginnen erst nach dem 35. Lebensjahr. Seltener Ursachen einer Hyperthyreose sind eine iatrogene Genese. Diese entsteht beispielsweise durch exogene Zufuhr von Schilddrüsenhormonen oder iodhaltigen Medikamenten wie Amiodaron oder iodhaltige Röntgenkontrastmittel. Meist äußert sich die Erkrankung

mit Symptomen einer Hyperthyreose, z.B. Gewichtsverlust, Herzrasen oder Nervosität. Bei Patienten mit einem Morbus Basedow zeigt sich oft eine Trias aus prominenten Symptomen, die als Merseburger Trias beschrieben wird: *Struma, Exophthalmus und Tachykardie*. (Allelein, 2021) Eine *endokrine Orbitopathie (EO)* tritt bei über einem Viertel der Patienten auf und ist die häufigste extrathyreoidale Manifestation. (Allelein, 2021)

Pathophysiologisch spielen Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor eine zentrale Rolle. Diese können eine stimulierende, neutrale oder blockierende Funktion haben. Beim Morbus Basedow sind vor allem die stimulierenden Antikörper relevant, welche die Schilddrüse zur Überproduktion von Hormonen stimulieren. (Diana K. W., 2019) Neben den genetischen Faktoren können auch Umweltfaktoren wie zum Beispiel Stress, Rauchen oder Infektionen Ursachen der Erkrankung sein. Zusätzlich sieht man einen Zusammenhang mit anderen Autoimmunerkrankungen: Morbus Basedow häuft sich mit Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, rheumatoider Arthritis oder Zöliakie.

Antikörper vom Typ IgG (Krzystof, 2009) stimulieren über Aktivierung von Gs-Proteingekoppelten Rezeptoren die Adenylcyclase und sorgen für einen chronischen Wachstumsreiz, der zum Struma führen kann und eine vermehrte Sezernierung von T3 und T4 bedingt. Weitere Symptome, die aus der hyperthyreoten Stoffwechsellage folgen können, sind Gewichtsabnahme, Unruhe oder eine verminderte Leistungsfähigkeit. Die Aktivierung der stimulierenden TSI führt also zu einer Überproduktion von Schilddrüsenhormonen und begünstigt inflammatorische Prozesse in der Schilddrüse, aber auch in orbitalen und subkutanen Geweben. (Diana K. , 2018) Dies bedingt extrathyreoidale Manifestationen wie die endokrine Orbitopathie, das prätibiale Myxödem oder eine Akropachie.

Gefürchtete Komplikation des Morbus Basedow ist die thyreotoxische Krise, welche eine akute lebensbedrohliche Exazerbation darstellt. Gefährdet für eine solche Krise sind insbesondere Patienten mit nicht oder nur unzureichend behandelter Hyperthyreose. Sie kann spontan auftreten oder durch Faktoren wie schwere Erkrankungen oder iatrogene Ursachen bei Schilddrüsenoperationen oder Iodexposition mittels Röntgenkontrastmittel erfolgen. Zwar tritt eine thyreotoxische Krise eher selten auf, die Letalität liegt aber bei über 20%, weshalb eine gute Behandlung der Hyperthyreose und des Morbus Basedow für die Prävention dieser Komplikation wichtig ist. (Karger, 2008)

Bei der Diagnostik spielen Laboruntersuchungen, die Bildgebung und die Abgrenzung zu anderen Ursachen einer Hyperthyreose eine wichtige Rolle. Bei der Laboruntersuchung ist das basale TSH, fT3 und fT4 zu bestimmen. Eine manifeste Hyperthyreose äußert sich mit einem erniedrigten basalem TSH und erhöhten freien Schilddrüsenhormonen im Blut. Bei einer latenten Hyperthyreose ist nur das TSH erniedrigt, die Hormone sind noch normwertig. Eine latente Hyperthyreose ist vor allem vor Einnahme iodhaltiger Medikamente wie beispielsweise Kontrastmittel zu beachten.

Wie zuvor erwähnt, sind Antikörper gegen den TSH-R für die Diagnostik unabdingbar. (George, 2021) (Diana K. , 2018) (Allelein, 2021) TSH-Rezeptor-Autoantikörper (TRAK) sind in über 90% der Fälle nachweisbar. Antikörper gegen den Thyreoperoxidase-Antikörper (TPO-AK) sind in etwa 70% der Fälle nachweisbar. In etwa 20% der Fälle sind Antikörper gegen Thyreoglobulin nachweisbar. Ein normaler TSH-Spiegel schließt eine manifeste Hyper- oder Hypothyreose mit hoher

Wahrscheinlichkeit aus. Bei einem Verdacht auf Hyperthyreose müssen allerdings auch immer T3 und T4 bestimmt werden, da es auch isolierte T3-Erhöhungen gibt.

Typische sonographische Befunde bei Morbus Basedow sind eine vergrößerte Schilddrüse (bei Männern über 25ml, bei Frauen über 18ml), eine vermehrte Vaskularisation des Schilddrüsengewebes und ein homogenes echoarmes Muster typisch. Typischerweise ist sonographisch ein sogenanntes vaskuläres Inferno sichtbar. (Allelein, 2021)

Zentraler Bestandteil der Therapie stellt die thyreostatische Therapie über 12 bis 18 Monate dar. In der Regel geschieht dies mit Thioamiden, die die Thyreoperoxidase hemmen. (Allelein, 2021) In der Regel erfolgt danach ein Auslassversuch, der eine strenge Überwachung der Stoffwechsellage erfordert. Bei einem Rezidiv oder einer persistierenden Erkrankung kann die Entscheidung zur definitiven Behandlung mittels Operation oder Radioiodtherapie erfolgen. (Allelein, 2021) Kompressionssymptome durch eine große Struma oder Malignomverdacht bei einem kalten Knoten sprechen zugunsten einer operativen Therapie. Postoperativ muss eine lebenslange Substitution mit L-Thyroxin erfolgen. In der symptomatischen Therapie und supportiven Behandlung der Symptome einer Hyperthyreose ist der Einsatz von unselektiven Betablockern wie Propranolol indiziert, welcher die Konversion von T4 zu T3 hemmt und die Sympathikusaktivität dämpft. (van de Loo, 2020) Bei der Behandlung der endokrinen Orbitopathie werden auch Glukortikoide zur Behandlung akuter Schübe eingesetzt. Generell gilt, dass eine engmaschige klinische und laborchemische Überwachung der Patienten essenziell ist.

Innovative Ansätze der Behandlung stellen den Einsatz von monoklonalen Antikörpern wie zum Beispiel Teprotumumab (Douglas, 2020) bei refraktären Fällen dar. Die Studienmedikation des untersuchten Kollektivs ist ein Anti-FcRn-Antikörper, der in den Recyclingsmechanismus der Immunglobuline eingreift und so den Abbau der TRAK bzw. TSI begünstigen soll. (Pyzik R. e., 2015) (Pyzik S. e., 2019)

2.2.2 Hashimoto Thyreoiditis

Die Hashimoto Thyreoiditis ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen und stellt eine der Hauptursachen für eine Hypothyreose dar. Epidemiologisch zeigen etwa 6–8% der Bevölkerung subklinische Verläufe, während 1–2% klinisch manifeste Symptome entwickeln. Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer. Die Krankheit kann in allen Altersgruppen auftreten, wobei ein Häufigkeitsgipfel während der Pubertät, im Klimakterium und in der Postpartum-Phase zu beobachten ist.

Pathophysiologisch beruht die Erkrankung auf einer genetischen Disposition, häufig mit HLA-Assoziation, die die Bildung von Autoantikörpern gegen Oberflächenantigene der Thyreozyten begünstigt. Dies führt zu einer schmerzlosen Entzündung der Schilddrüse, die in irreversiblen Follikeldestruktionen resultiert und einen Funktionsverlust des Organs mit sich zieht. Der Krankheitsverlauf ist schubweise und kann variabel in der Dauer sein. Während akuter Entzündungsschübe kann es durch die Freisetzung gespeicherter Schilddrüsenhormone kurzfristig zu einer hyperthyreoten Stoffwechsellage kommen, die jedoch oft klinisch unauffällig bleibt. Im weiteren Verlauf entwickelt sich meist schleichend eine Funktionsminderung der Schilddrüse, die von einer Euthyreose über eine subklinische bis hin zu einer manifesten Hypothyreose fortschreitet. (van de Loo, 2020)

Die Diagnosestellung der Hashimoto Thyreoiditis basiert auf einem Zusammenspiel klinischer, laborchemischer und bildgebender Befunde. Laborchemisch zeigt sich meist der Nachweis einer latenten oder manifesten Hypothyreose, oft begleitet von positiven Antikörpern gegen Thyreoperoxidase oder Thyreoglobulin. Auch ist bei Hashimoto die Prävalenz von blockierenden Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor (TBI) erhöht. (Diana K. K., 2017) Die Sonographie zeigt typischerweise ein echoarmes und inhomogenes Schilddrüsenparenchym. (van de Loo, 2020) Ergänzend können Befunde wie eine verminderte Schilddrüsengröße oder ein reduzierter Technetium-Uptake in der Szintigraphie hilfreich sein.

Von der Hashimoto Thyreoiditis müssen mehrere Differenzialdiagnosen abgegrenzt werden. Neben anderen Ursachen für Thyreoiditiden sind auch der Morbus Basedow oder Zustände nach einer Radioiodtherapie, oder etwa eine Bestrahlung im Halsbereich zu berücksichtigen. Bei der Differenzierung zum Morbus Basedow ist die Serologie von Nutzen.

Die Therapie der Erkrankung erfolgt in erster Linie durch die Substitution von Schilddrüsenhormonen mit L-Thyroxin, wobei die Dosierung individuell angepasst wird. In der Anfangsphase sind engmaschige Laborkontrollen notwendig, um die optimale Dosis zu ermitteln. Nach Erreichen einer stabilen Euthyreose werden die Kontrollen auf einen 6–12-monatigen Rhythmus ausgedehnt. Hyperthyreote Phasen, die selten auftreten, erfordern meist keine spezifische Therapie und können bei Bedarf symptomatisch mit Betablockern behandelt werden. (van de Loo, 2020)

Der Verlauf der Krankheit ist sehr variabel. In den meisten Fällen lässt sich die Erkrankung durch eine sorgfältige Einstellung mit L-Thyroxin gut kontrollieren. Aufgrund des erhöhten Malignitätsrisikos, insbesondere für Schilddrüsenlymphome und papilläre Karzinome, wird eine jährliche Sonographie empfohlen. Zudem zeigen Studien, dass das Risiko für Depressionen und Angststörungen bei Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung deutlich erhöht ist. (Kotkowska, 2022) Ein frühzeitiges Erkennen und eine konsequente Therapie sind essenziell, um Symptome zu lindern und Komplikationen zu vermeiden.

Darüber hinaus besteht eine mögliche Assoziation der Hashimoto Thyreoiditis mit anderen Autoimmunerkrankungen wie Morbus Addison, Diabetes mellitus Typ 1, rheumatoider Arthritis, Zöliakie, systemischem Lupus erythematodes oder Vitiligo.

Im Krankheitsverlauf können hypothyreote Zustände durch blockierende und wachstumshemmende TSH-Rezeptorantikörper (TBI) auftreten. Diese TBIs sind bei Hashimoto Patienten zwar weniger häufig als TSI bei Morbus Basedow, spielen jedoch ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese. (Umar, 2010)

2.2.3 Endokrine Orbitopathie

Die endokrine Orbitopathie (EO) ist eine immunvermittelte Erkrankung, die häufig mit Morbus Basedow einhergeht und durch entzündliche Veränderungen der Orbita gekennzeichnet ist. Sie stellt die häufigste Ursache für Augenbeschwerden bei Patienten mit Morbus Basedow dar und betrifft häufig die Augenmuskulatur, das Fettgewebe und andere die Orbita umgebende Strukturen. (van de Loo, 2020)

Zu den klinischen Symptomen zählen Exophthalmus, Lidretraktion, Diplopie, Einschränkungen der Augenbeweglichkeit sowie visuelle Veränderungen. (Kabir, 2021) Die Pathogenese der EO ist multifaktoriell; TSI spielen eine zentrale Rolle bei den pathophysiologischen Vorgängen in der Orbita. (Diana K. , 2018). Es besteht eine positive Korrelation zwischen den TSI-Werten im Serum und der klinischen Aktivität und Schwere der Endokrinen Orbitopathie. (Diana K. , 2018) (George, 2021)

Ein Schlüsselmechanismus in der Pathogenese ist die Aktivierung von T-Lymphozyten und orbitalen Fibroblasten, die eine übermäßige Produktion von Glykosaminoglykanen induzieren. Diese Substanzen führen zu lokaler Schwellung und Expansion des orbitalen Gewebes, was schließlich zur Entwicklung eines Exophthalmus und weiterer Augenbeschwerden beiträgt. (George, 2021) Die Diagnose basiert auf einer Kombination aus klinischer Untersuchung, bildgebenden Verfahren wie CT oder MRT der Orbita sowie immunologischen Tests auf TRAK oder TSI.

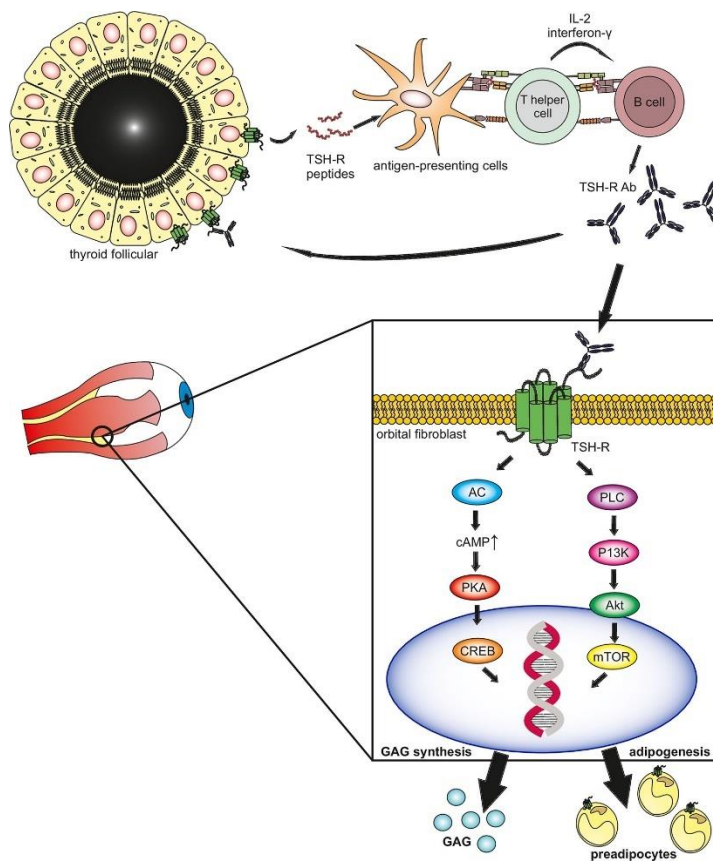


Abbildung 2 Pathogenese der endokrinen Orbitopathie, Quelle (George, 2021)

Die EO ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen immunologischen, endokrinen und strukturellen Faktoren, wobei viele Aspekte ihrer Pathogenese weiterhin Gegenstand intensiver Forschung sind. (Kahaly B. e., 2021) Die Symptome können zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität der Patienten führen, weshalb gute Diagnostik und Therapie entscheidend sind.

2.2.3.1 Behandlung der endokrinen Orbitopathie

Die Behandlung der EO hängt von ihrem Stadium und ihrer Aktivität ab und umfasst sowohl medikamentöse als auch chirurgische Ansätze. Bei aktiver, mittelschwerer bis

schwerer EO sind intravenöse Glukokortikoide wie Methylprednisolon eine Therapieoption. Diese wirken entzündungshemmend und immunmodulatorisch und führen in vielen Fällen zu einer Stabilisierung der Krankheitsaktivität und Verbesserung der Symptome. (Kahaly L. K., 2020) Wenn die Glukokortikoidtherapie nicht ausreichend wirksam ist, können alternative Immunmodulatoren wie Rituximab oder zielgerichtete Therapien eingesetzt werden. Ein vielversprechender Ansatz ist der Einsatz von Teprotumumab, einem IGF-1-Rezeptor-Inhibitor, der in klinischen Studien eine deutliche Reduktion des Exophthalmus und anderen EO-Symptomen gezeigt hat. (Kabir, 2021) (Kahaly B. e., 2021)

Ein weiteres Beispiel für neue Therapieansätze ist die im untersuchten Kollektiv eingesetzte Studienmedikation, die gezielt den FcRn-Rezeptor hemmt und so die Zirkulation pathogener Antikörper reduziert. Diese innovative Behandlungsstrategie könnte in Zukunft eine bedeutende Rolle im Management der EO spielen. (Akilesh, 2007) (Sokolosky, 2015) (Pyzik R. e., 2015)

Wenn die EO trotz medikamentöser Therapie nicht ausreichend kontrolliert werden kann oder in einem fortgeschrittenen Stadium vorliegt, sind chirurgische Eingriffe wie Orbita-Dekompressionen oder Lidoperationen erforderlich. Diese können dazu beitragen, den Exophthalmus zu reduzieren und visuelle Einschränkungen zu lindern. (Kahaly B. e., 2021)

Zusammenfassend bleibt die EO eine herausfordernde Erkrankung, deren Management eine individuelle Anpassung der therapeutischen Ansätze erfordert. Sowohl medikamentöse als auch chirurgische Interventionen tragen zur Verbesserung der Lebensqualität der Patienten bei.

2.2.3.2 *Klinische Parameter der EO*

Die endokrine Orbitopathie (EO) ist eine entzündliche Erkrankung, die häufig mit Morbus Basedow assoziiert ist und eine erhebliche Beeinträchtigung der Lebensqualität verursachen kann. In der Dissertation werden der **Clinical Activity Score (CAS)**, die **Lidretraktion** und der **Exophthalmus** als Parameter zur Beurteilung der Krankheitsaktivität betrachtet.

2.2.3.2.1 CAS

Der CAS gilt als eines der besten Scoresysteme zur Einschätzung der EO-Aktivität, da er gezielt auf entzündungsbedingte Symptome eingeht. Der Score umfasst sieben Kategorien:

1. Spontaner Retrobulbärschmerz
2. Schmerz bei versuchtem Auf- oder Abblick
3. Lidrötung (Inspektion, Spalllampe)
4. Lidödem
5. Bindehautrötung
6. Bindehautödem
7. Karunkel- oder Plicaentzündung (Anamnese, Provokation)

Nach dem Konsensusstatement der European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) wird eine EO als aktiv bezeichnet, wenn der CAS bei ≥ 3 von 7 liegt. Allerdings bleibt die Festlegung dieser Grenze umstritten, da auch ein CAS von 1/7

eine entzündliche Erkrankung anzeigen kann. Um die Einschätzung der Aktivität der EO zu verbessern, können neben dem CAS unter anderem folgende Kriterien in Betracht gezogen werden: Dauer der Erkrankung, Höhe und Trend der TRAK, kürzlich erfolgte klinische Verschlechterung. (Beisse, 2011). (Kahaly B. e., 2021)

2.2.3.2.2 Lidretraktion

Die Lidretraktion ist ein weiteres typisches Merkmal der EO und wird mithilfe der Inspektion bewertet. Besonders auffällig ist der sogenannte „lateral flare“ sowie das „lid lag“ und der Lagophthalmus. Zur Quantifizierung misst man die Distanz zwischen Hornhautreflex und Oberlidkante. Eine ausgeprägte Lidretraktion kann sowohl diagnostisch als auch prognostisch von Bedeutung sein. (Beisse, 2011)

2.2.3.2.3 Exophthalmus

Der Exophthalmus, das Hervortreten des Augapfels, wird mit der Hertel-Exophthalmometrie gemessen und stellt ein zentrales diagnostisches Kriterium der EO dar. Ein Fortschreiten des Exophthalmus kann sowohl auf eine aktive Entzündung als auch auf eine fortschreitende strukturelle Veränderung hinweisen (Beisse, 2011) (Kabir, 2021)

Zusammenfassend liefern der CAS, die Lidretraktion und der Exophthalmus wertvolle Einblicke in die Krankheitsaktivität der EO. Die Kombination dieser klinischen Parameter mit serologischen Markern wie TRAK und TSI kann die Diagnosestellung und Therapieentscheidung wesentlich verbessern. (Park S. K., 2024)

2.2.4 Der neonatale Fc Rezeptor (FcRn)

TSH-R-AK gehören zum Immunglobulin (Ig) Subtyp G (IgG). Mit 21 Tagen haben IgG die längste Halbwertszeit unter den Immunglobulinen. Diese lange Halbwertszeit basiert auf einem hocheffektiven Recyclingsmechanismus. Dabei ist das Schlüsselenzym der FcRn Rezeptor, der im menschlichen Körper an vielen Geweben von den Zellen exprimiert wird. Für den Recyclingsmechanismus ist die Exprimierung an Epithel- und Endothelzellen am relevantesten. Immunglobuline und andere lösliche extrazelluläre Strukturen werden mittels Pinozytose in die Zellen aufgenommen und zu den Endosomen transportiert, die den FcRn Rezeptor tragen. Nach der Aufnahme bindet der FcRn an IgG, ungebundene Strukturen werden zum Lysosom gebracht und abgebaut. Der FcRn-Ig-Komplex allerdings wird zurück zur Zelloberfläche gebracht, wo sich bedingt durch den neutralen pH-Wert die Strukturen vom Komplex ablösen und erneut in den Zellkreislauf gelangen. (Pyzik S. e., 2019) (Pyzik R. e., 2015) (Leblanc, 2019) (Sokolosky, 2015) (Akilesh, 2007)

Monoklonale Antikörper, die an den FcRn angreifen, verhindern somit den Recyclingmechanismus der IgG und führen zum verfrühten Abbau, was die TSI im Serum verringern soll.

2.3 Thyreoidale Antikörper und ihre Messmethoden

2.3.1 Bindungsassay TRAK

2.3.1.1 Assay

Antikörper gegen den TSH-Rezeptor können mit einem Bindungsassay gemessen werden. Dies wird über international standardisierte Bindungsimmunoassays durchgeführt, die sich die kompetitiven Vorgänge am TSH-R zunutze machen, um die Höhe der TRAK im Serum zu messen. Als konkurrierender Ligand an den TSH-Rezeptor wird ein humaner, thyroidea-stimulierender, monoklonaler Antikörper (M22) benutzt, der durch einen Rutheniumkomplex markiert ist. In der Vergangenheit wurde oft bovines TSH (bTSH) als Kompetitor genutzt, dank der erfolgreichen Isolation des M22 hat dieser den bTSH ersetzt. (Zöphel, 2010) (Sanders, 2003) TSH-Rezeptor-Antikörper (TRAK) inhibieren die Bindung des M22 an den TSH-Rezeptor. Durch die Bindung des mit Biotin versehenen M22 an enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) Platten kann der M22 nachgewiesen werden und so eine Messung der TRAKs im Patientenserum ermöglichen. Bindungsassays sind gut verfügbar, automatisiert und haben eine internationale Standardisierung mit Referenzmaterial. (Diana K. , 2018) Der Cut-off des TRAK Bindungsassay liegt bei 1,75 IU/L. (Kahaly O. D., 2020)

TRAK können dabei unterschiedliche funktionelle Eigenschaften haben. Unterschieden werden stimulierende, blockierende oder neutrale Antikörper, je nach ihrem Effekt auf die Schilddrüse. (Kahaly D. , 2017). Eine Differenzierung, ob sich bei den TRAKs dabei um stimulierende, blockierende oder neutrale Antikörper handelt, ist durch den Bindungsassay nicht möglich. Die Hauptursache des Morbus Basedow sind stimulierende Antikörper (TSI), deren Bestimmung für die Diagnostik somit von hoher Relevanz ist. (Kahaly D. e., 2019) Patienten mit Morbus Basedow können während des Krankheitsverlaufs zwischen stimulierenden und blockierenden Antikörper wechseln und umgekehrt und dabei zwischen hypo- und hyperthyreoter Stoffwechsellage liegen. Meist führen allerdings stimulierende Antikörper gegen den TSH-Rezeptor mit der Folge einer Überaktivierung des TSH-Rezeptors zu den Krankheitssymptomen. (Smith H. , 2016)

2.3.1.2 TRAK im klinischen Setting

Morbus Basedow ist trotz des häufigen Auftretens nicht leicht zu diagnostizieren. Ein Grund dafür ist die Vielzahl unspezifischer Symptome, die eine klare Differenzierung erschweren. (Kahaly, 2020). Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der endokrinen Orbitopathie nimmt der TSH-Rezeptor ein, der von Autoantikörpern (TRAK) stimuliert wird. (Smith, 2010) (Duan, 2022) Bei den meisten Patienten mit Morbus Basedow lassen sich TRAK im Serum nachweisen. (Menconi, 2014)

Studien unterstreichen die Bedeutung erhöhter TRAK-Werte als Risikofaktor für die Entwicklung einer endokrinen Orbitopathie. Kho et al untersuchten 100 Nichtraucher mit Morbus Basedow und fanden heraus, dass Patienten mit TSH-Rezeptor-Antikörpern oberhalb des Medians eine erhöhte Odds Ratio für das Auftreten einer Orbitopathie aufwiesen. (Khoo, 1999) Ähnlich zeigte eine Untersuchung von Gerding et al. (2000) mit 159 Patienten, dass hohe TRAK-Werte mit einer schwereren Orbitopathie assoziiert sind. (Gerding, 2000) Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass TRAK nicht nur als diagnostischer Marker, sondern auch als Verlaufsparemeter für die Voraussage ob eine EO entwickelt werden könnte, nützlich sein können. (Diana K. W., 2019)

Darüber hinaus erleichtert die Laborbestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern die Diagnose und Therapieentscheidung bei Morbus Basedow. (Kahaly, 2020) Insbesondere die stimulierenden Antikörper (TSI) gelten als spezifischer Biomarker für die Erkrankung. Ein Hyperthyreoidismus zeichnet sich durch erhöhte Konzentrationen der Schilddrüsenhormone T3 und T4 sowie erniedrigte TSH-Spiegel aufgrund des negativen Rückkopplungsmechanismus aus.

Zusammenfassend zeigen aktuelle Studien, dass TRAK ein wertvoller Biomarker für die Diagnose und das Management von Morbus Basedow, sowie ein hilfreicher Indikator für das Risiko und den Verlauf einer endokrinen Orbitopathie ist.

2.3.2 Thyretain TSI BioAssay

2.3.2.1 Assay

Der Thyretain TSI Reporter BioAssay (TSI Assay) ist ein Bioassay, der nach einem von der FDA anerkannten Protokoll zum Nachweis von stimulierenden TSH-Rezeptor Antikörpern (engl: thyroid stimulating immunoglobulines (TSI)) durchgeführt wird. (Lytton, 2010) Chimäre Eierstock Zellen des chinesischen Hamsters (engl.: chinese hamster ovary (CHO)), die den humanen TSH-Rezeptor (MC4) auf ihrer Zelloberfläche tragen werden gesät und über 15h bis 18h inkubiert. Die Patientenseren (pro Platte 20 Patientenproben, in Duplikaten gemessen) und Kontrollen (positiv, negativ und Referenzkontrolle) werden mit Reaction Buffer (1:11) verdünnt und nach der Inkubationszeit der CHO-Zellen auf die Platte gegeben. Nach 3h Reaktionszeit können die stimulierenden Antikörper gemessen werden.

Der Messmechanismus beruht auf einer cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) Signalkaskade. (Diana O. K., 2020) Die Bindung der TSI an den TSH-Rezeptor der Zellen führt über eine stimulierende G-Protein gekoppelte Kaskade zur Aktivierung der Proteinkinase A, welche AMP mittels Adenylatcyclase in cAMP umwandelt. cAMP bindet in der Zelle daraufhin an das PKA-cAMP-response element-binding protein (CREB), welches als Transkriptionsfaktor dient und an das PKA-cAMP response element (CRE) im Promoterbereich des CRE-luc Exons bindet. Dadurch wird mRNA zur Proteinsynthese der Luciferase (Enzym des Leuchtkäfers) transkribiert. (Baldwin, 1996)

Durch Zugabe des Luciferase Substrats entsteht bei der Reaktion mit der gebildeten Luciferase Licht, welches 10min nach Zugabe mittels Luminometer gemessen wird. Dies ist proportional zur exprimierten Luciferase, deshalb kann aus dessen Menge auf die Menge der Antikörper im Serum geschlossen wird. Bioassays wie der TSI ermöglichen dadurch die funktionelle Unterscheidung zwischen stimulierenden und blockierenden Antikörpern. (Diana K. , 2018) Um die im Luminometer gemessenen Daten zu quantifizieren, werden sie in Verhältnis zu einer bTSH-Referenzkontrolle gesetzt und als SRR% (specimen to reference ratio) angegeben. Der Cut-off des TSI Bioassays für die Positivität einer Probe ist bei 140% SRR. (Diana K. e., 2015)

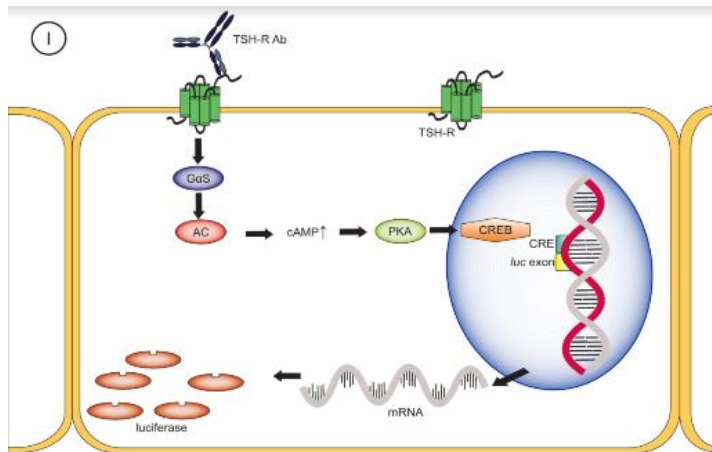


Abbildung 3 Funktionsweise des TSI Bioassays 1/2

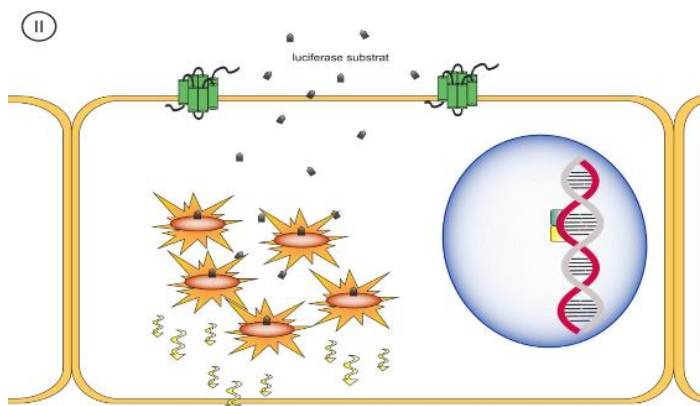


Abbildung 4 Funktionsweise des TSI Bioassays 2/2

2.3.2.2 TSI im klinischen Setting

Der TSI Bioassay zeigt potenziell eine bessere Korrelation zur Krankheitsaktivität der Patienten als Bindungsassays. (Lytton, 2010) Aktuelle Studien belegen, dass die Höhe der TSI bei Patienten mit Morbus Basedow positiv mit der Schwere der Erkrankung und der Entwicklung einer endokrinen Orbitopathie (EO) korreliert (Kahaly D. G., 2016) (Kahaly D. e., 2019)

Verglichen mit TRAK-Bindungsassays scheinen TSI-Bioassays sensitivere Ergebnisse zu liefern. So werden niedrigere Mengen an TSI im Serum erkannt. In Seren, die in beiden Assays positiv getestet wurden, konnte der Bioassay selbst bei Verdünnungen noch positive Ergebnisse liefern, während der Bindungsassay diese verdünnten Proben als negativ bewertete. (Leschik, 2013) Bioassays bieten somit durch ihre Sensitivität und die Möglichkeit der Funktionsbewertung der Antikörper einen klinischen Vorteil gegenüber Bindungsassays (Diana W. K., 2016). Zudem könnte eine frühe Diagnostik mittels TSI-Bioassays die Zeit bis zur Erstdiagnose verkürzen somit zu einer besseren Therapie als auch zu Kostenersparnissen führen. (McKee, 2012)

Die Messung von TRAK (insbesondere TSI) ist zur Diagnose und zum Management von Patienten mit Morbus Basedow und endokriner Orbitopathie also sehr wichtig. (Kahaly, 2020)

2.3.2.3 Korrelation von TSI mit der Krankheitsaktivität

Aktuelle Studien zeigen eine signifikante Korrelation zwischen TSI und der Krankheitsaktivität bei endokriner Orbitopathie (EO). (Hötte e. a., 2024) (Diana K. W., 2019) Eine Behandlung mit intravenösem Methylprednisolon bei moderater bis schwerer EO führt zur Reduktion des TSI-Titers, was eine Verbesserung der Krankheitsaktivität zur Folge hat. Dabei scheinen initial niedrigere TSI-Spiegel eine schnellere Normalisierung zu ermöglichen als hohe Ausgangswerte. (Park S. e., 2024) Ein verkürzter Zeitraum zwischen Diagnose und Beginn der Therapie begünstigt ebenfalls die Normalisierung der TSI-Werte. (Kabir, 2021) So beschreiben manche Studien, dass TSI eine stärkere Korrelation mit der klinischen Aktivität der EO hat als Bindungsassays. Hohe TSI-Titer korrelieren mit dem Auftreten einer EO und mit der Krankheitsaktivität. (George, 2021). (Diana K. W., 2019) (Diana K. , 2018)

2.3.2.4 Bedeutung von TSI für das Therapiemanagement

Der TSI-Spiegel ist ein potenzieller Marker zur Überwachung der Krankheitsprogression und zur Evaluierung der Wirksamkeit von Therapien wie IVGC oder anderen immunkorrigierenden Medikamenten. Persistierende oder ansteigende TSI-Werte können auf die Notwendigkeit zusätzlicher oder alternativer Therapieansätze hinweisen, wie z. B. Rituximab oder Teprotumumab, insbesondere wenn konventionelle Therapien nicht ausreichend wirksam sind. Ein Rückgang der TSI-Spiegel korreliert oft mit einer Stabilisierung der Krankheitsaktivität und gilt als Indikator für eine erfolgreiche Therapie. (Kabir, 2021) (Kahaly B. e., 2021) (Kahaly D. e., 2019)

Bisher gibt es keine Studien, die belegen konnten, dass die Behandlung mit L-Thyroxin oder Thyreostatika zu einer signifikanten Verringerung der TSH-Rezeptor-Antikörper (TRAK) oder der Thyroid-stimulierenden Immunglobuline (TSI) führt. Beide Substanzen haben ihre Hauptwirkung auf die Regulation der Schilddrüsenhormonspiegel und die Kontrolle der Hyperthyreose oder Hypothyreose, während sie die zugrunde liegende Autoimmunreaktion auf den TSH-Rezeptor nicht direkt beeinflussen. Daher bleibt die Konzentration dieser Autoantikörper unter der Therapie mit diesen Medikamenten in der Regel stabil, was darauf hindeutet, dass für eine gezielte Reduktion der Antikörperspiegel andere therapeutische Ansätze erforderlich sind.

2.3.2.5 Kontroverse zur Nutzung von TSI vs. TRAK

Einige Studien zeigen, dass sowohl TRAK als auch TSI für die Diagnose und das Management der Krankheitsaktivität hilfreich sind. Höhere TRAK-Werte korrelieren mit einer erhöhten Inzidenz von EO. Allerdings ist die direkte Korrelation zwischen klinischen Parametern und Serologie weiterhin strittig. Während manche Autoren wie oben beschrieben dem TSI eine bessere Korrelation zur Klinik zuschreiben, zeigen manch untersuchte Kollektive keinen signifikanten Vorteil des TSI-Bioassays gegenüber dem TRAK-Bindungsassay im klinischen Management. (Khamisi. Lundqvist, 2023) Beide Assays sind hilfreich zur Einschätzung des Risikos für die Entwicklung einer EO. Ob Bioassays besser zu klinischen Parametern korrelieren bleibt jedoch noch umstritten.

2.4 Turbo TSI Bioassay

Auch der Turbo TSI ist ein Bioassay und misst die TSI im Serum. Auch hier werden Eierstockzellen des chinesischen Hamsters genutzt, diese unterscheiden sich allerdings zu denen des Thyretain TSI Assays. Auch sie exprimieren den MC4-TSH-Rezeptor. Zusätzlich dazu enthalten sie das GloSensor-22F cAMP-Plasmid, das die zellfreie in vitro Expression des GloSensors, welcher eine mutante Form der Luciferase des Photinus pyralis ist, ermöglicht. Die enthaltene Form der Luciferase konnte durch Einbringen des Plasmids (GloSensor-22F cAMP-Plasmid) entstehen. Binkowski et al. nutzten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2011 die cAMP-Bindungsdomäne der Proteinkinase A und verbanden sie mit einer zirkulären umgebenen Form der Photinus pyralis Luciferase. Nach Stimulierung des TSH-R entstandenes cAMP bindet an die Luciferase und führt zur Konformationsänderung, welches in Licht messbar ist. (Binkowski, 2011). (Wang, 2022) (Baldwin, 1996)

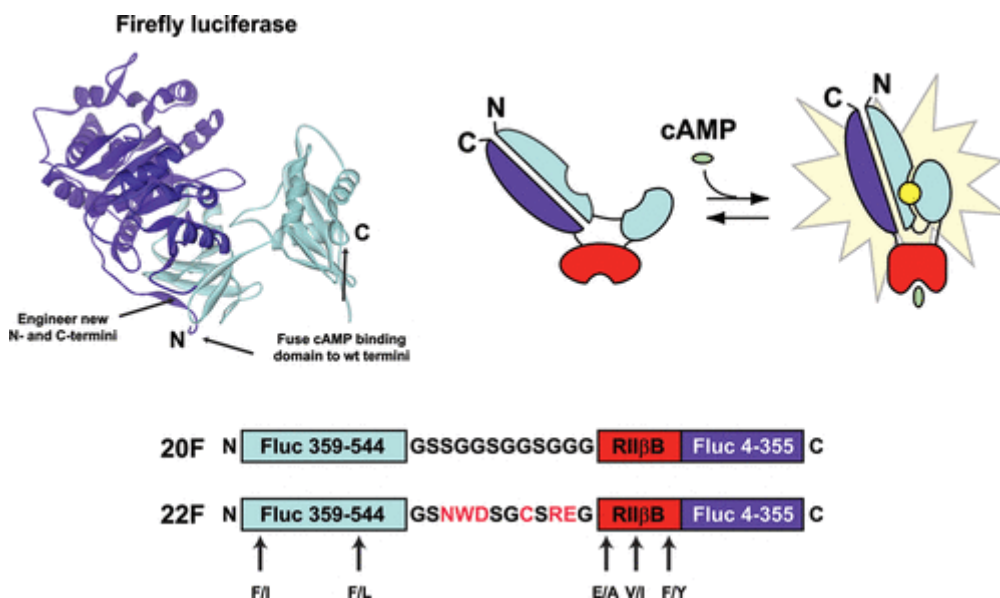


Abbildung 5 GloSensor 22F cAMP-Quelle (Binkowski, 2011)

Abbildung 4 zeigt das Konstrukt der Plasmide GloSensor-20F cAMP und GloSensor-22F cAMP im Vergleich. Das GloSensor-20F cAMP Plasmid wurde sowohl an der N-terminalen Einheit des Luciferase-Fragments als auch im Verbindungspeptid durch Veränderung von Aminosäuren modifiziert, sodass das GloSensor-22F cAMP Plasmid entstehen konnte, welches bessere Ergebnisse liefert. (Binkowski, Butler et al. 2011).

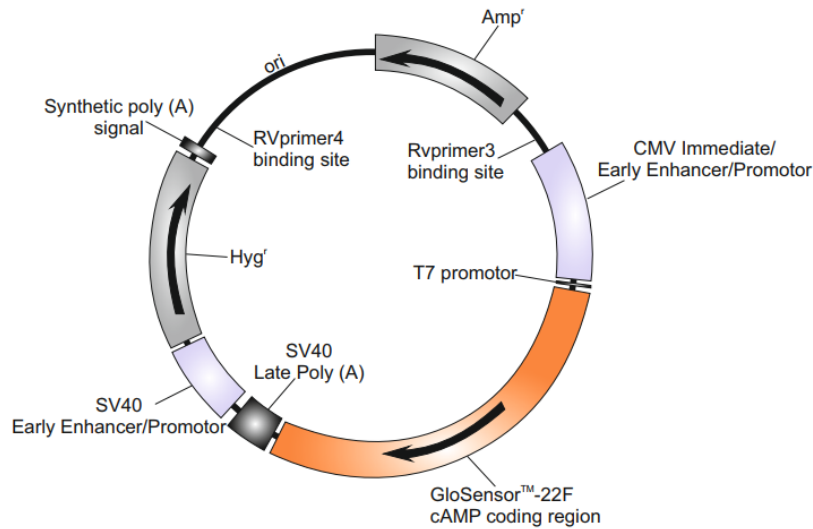


Abbildung 6 Aufbau des GloSensor-22F cAMP-Plasmids

Das Vorhandensein von Luciferase in den Zellen ermöglicht den Zellen, dass sie direkt bereit zum Reagieren mit den TSI im Patientenserum sind. Somit bietet der Turbo TSI eine enorme Zeitersparnis gegenüber dem Thyretain TSI. Die Inkubationszeit der Zellen entfällt, ebenso die dreistündige Reaktion der Zellen mit TSI, die für die Transkription und Translation der Luciferase benötigt wird. Die Zellen sind nach dem Auftauen direkt bereit um mit den Patientenseren (pro Platte 39 Patienten (in Duplikaten gemessen)) zu reagieren. Die Reaktionszeit beträgt hier eine Stunde. Die TSI in den Seren erhöhen, wie oben erörtert die intrazelluläre Menge an cAMP. Dieses wird vom GloSensor Reporter gebunden und führt zu einer Konformationsänderung des GloSensors, wodurch Licht entsteht, welches dann im Luminometer gemessen werden kann. Das Licht, vom Luminometer gemessen als relative light units (RLU), gibt Auskunft über die Menge der TSH-Rezeptor stimulierenden Immunglobuline (TSI) im Serum. Der Cut-off des Turbo TSI Bioassays liegt bei 0,024IU/L. (Miao, 2022) (Olivo, 2023)

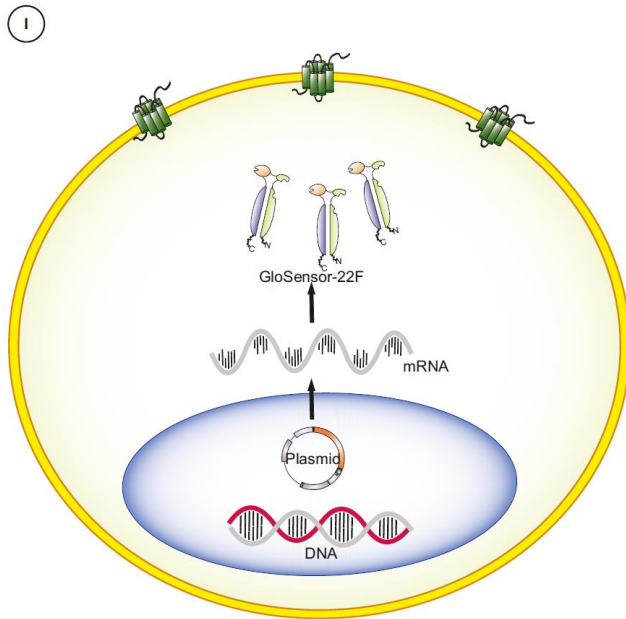


Abbildung 7 Funktionsweise des Turbo TSI Bioassays 1/2

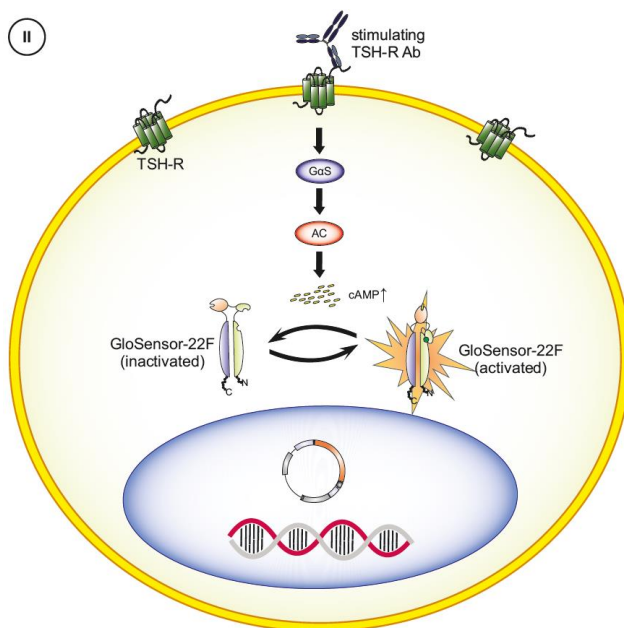


Abbildung 8 Funktionsweise des Turbo TSI Bioassays 2/2

2.5 Klinischer Nutzen von Turbo TSI

Über den Turbo TSI Bioassay gibt es bisher noch kaum veröffentlichte Studien. Die besprochenen Vorteile von Bioassays im Vergleich zu Bindungsassays sind potenziell auch dem Turbo TSI Bioassay zuzuschreiben. Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Nützlichkeit des Turbo TSI im klinischen Setting die der Bindungsassays übertreffen könnte. So gilt hier zu prüfen, ob die Fähigkeit des Bioassays die Funktionalität der Antikörper zu differenzieren, eine präzisere Beurteilung der Krankheitsaktivität und eine effektivere Überwachung des Therapieansprechens ermöglicht. (Hötte e. a., 2024)

Eine Publikation von Hötte et al (Hötte d. B., 2024) zeigt gute Korrelation des Turbo TSI Assays zu einem TRAK Bindungsassay und deutet daraufhin, dass der Turbo TSI

Assay eine bessere Korrelation zur Krankheitsaktivität bietet als der Bindungsassay. Beide Assays waren bei Patienten mit aktiver EO höher in ihren Werten als bei denen ohne aktive Erkrankung.

Potenzielle Vorteile des Turbo TSI in der Diagnostik

Höhere Sensitivität als Bindungsassays

Wie der TSI Bioassay könnte auch der Turbo TSI Bioassay durch eine höhere Sensitivität als etablierte Bindungsassays mehr erkrankte Patienten entdecken. (Hötte d. B., 2024)

Bessere Korrelation mit der Krankheitsaktivität und klinischer Nutzen

Wie zuvor beschrieben, haben Bioassays in der Vergangenheit in mehreren Studien eine bessere Korrelation mit der Krankheitsaktivität bei EO, sodass sie dadurch eventuell eine überlegene klinische Aussagekraft haben könnten. (Lytton, 2010) Die überlegene Sensitivität und die Fähigkeit stimulierende Antikörper spezifisch zu erkennen, machen Bioassays zu einem wertvollen Werkzeug für die Überwachung des Krankheitsverlaufs und des Therapieerfolgs im klinischen Alltag. Funktionelle Bioassays liefern somit präzisere Informationen zur Krankheitsaktivität und Therapieevaluation. (Winter, 2013)

2.6 Bedeutung eines leicht durchführbaren funktionellen Bioassays

Die untersuchten Bioassays bieten somit Vorteile gegenüber dem routinierten Einsatz der Bindungsassays. Allerdings sind sie im klinischen Alltag schwerer durchzuführen, da sie mehr Zeitaufwand und Planung benötigen als der TRAK Bindungsassay, dessen Durchführung in der Routine automatisierter, zeitsparender und kosteneffektiver ist. Durch die fehlende Zellwachstums- und Inkubationszeit bietet der Turbo TSI Assay eine schnelle Alternative (Ergebnisse in 2h) zu bereits bekannten Bioassays und hat somit Potential zum Routineeinsatz in der Klinik.

Den Turbo TSI Assay hinsichtlich seiner Sensitivität, Korrelation zu TRAK und TSI und klinischen Parametern zu testen, ist Ziel dieser Arbeit und wird im Ergebnisteil genauer erörtert. Vorneweg bieten Turbo TSI und Thyretain TSI Bioassay hinsichtlich der Effektivität entscheidende Unterschiede in ihrer Durchführung, die den Routineeinsatz von Turbo TSI denkbar machen könnten.

Thyretain TSI BioAssay	Turbo TSI BioAssay
20 Patientenproben pro Platte	39 Patientenproben pro Platt
Sähen und Inkubieren der Zellen über 15-18h	Zellen direkt nach dem Auftauen verwendbar
3h Reaktionszeit Zellen mit Seren	1h Reaktionszeit Zellen mit Seren

Tabelle 1 Bioassays im Vergleich

Der Turbo TSI Assay ermöglicht fast doppelt so viele Proben pro Platte und deutlich schnellere Ergebnisse als der Thyretain TSI Assay. Die Zeitersparnis des Turbo TSI ist also ein deutlicher Vorteil gegenüber dem Thyretain TSI. Zu klären bleibt, ob die Ergebnisse auch zuverlässig sind und der Turbo TSI somit als guter Biomarker für Diagnose und klinischen Verlauf eines Patienten im klinischen Alltag gebraucht werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Verwandte Chemikalien

TSI Turbo Kit Panel (Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA)

- Turbo TSI negative Kontrolle
- Turbo TSI niedrige positive Kontrolle
- Turbo TSI mittlere positive Kontrolle
- Turbo TSI hohe positive Kontrolle
- Turbo TSI cAMP Reagenz (6:100) (Promega, USA)
- Turbo TSI Standards A, B, C, D und E
- Turbo TSI Zellen (verwandte Zelllinien: CHO Mc4 Zellen mit pGloSensor™-22F cAMP Plasmid (Promega (USA)))

Verwandte Verbrauchsmaterialien

Costar® 96-well weiße Multiwellplatte	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reagenzreservoir (50 ml, 100 ml)	VistaLab™ Technologies, Brewster, New York, USA
Cellstar® Serologische Pipetten (10 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gamma Wipe® 67 Sterile Tücher	Berkshire Corporation, Surbiton, Surrey, England

Tabelle 2 Verwandte Verbrauchsmaterialien

Verwandte Geräte

Einkanal- und Multikanalpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
GloMax® 96 Microplate Luminometer	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Inkubator	Sanyo, Moriguchi, Präfektur Osaka, Japan
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau, Deutschland
Sicherheitswerkbank Holten Laminair	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland

Tabelle 3 Verwandte Geräte

3.2 Methodik

3.2.1 Vorläufige Anmerkung und Vorsichtsmaßnahmen

Für genaue Ergebnisse ist es wichtig sich an die empfohlenen Volumina und Zeiten zu halten. Zusätzlich sollten die Gefäße so im Wasserbad zum Auftauen schwimmen, dass das Wasser nicht die Verbindung zum Deckel erreicht, um zu verhindern, dass sich Wasser mit dem Inhalt vermischt.

3.2.2 Turbo TSI Messung

Zu Beginn müssen die gefrorenen, zu messenden Blutproben, das cAMP Reagent (6:100), die Standards A bis E und die Kontrollen für zwei bis fünf Minuten in ein 35°C bis 37°C Wasserbad, bis sie aufgetaut sind. Um sie wieder zu homogenisieren werden die Proben, Standards und Kontrollen für 10 bis 15 Sekunden gevortext. Mittels einer elektrischen Pipette (5µl bis 20µl) werden dann jeweils 5µl in die untere Ecke eines Wells in Duplikaten auf die weiße 96-well Platte nach folgendem Schema pipettiert.

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

Abbildung 9 Turbo TSI auf 96-well Platte

Auch die Turbo TSI Zellen (Volumen 1ml) müssen dann im 35°C bis 37°C Wasserbad für zwei bis fünf Minuten auftauen und danach mittels einer Transferpipette in die 5ml cAMP Reagenz Flasche pipettiert werden. Um die Zellen mit dem cAMP Reagenz zu vermischen wird das geschlossene Fläschchen einige Male invertiert und danach in ein Reagenzreservoir gegeben. Danach wird mittels einer 20 bis 200-µL (oder 50 bis 300-µL) Mehrkanalpipette jeweils 50µl in jedes Well gegeben. Dabei soll darauf geachtet werden, dass die Zeit zwischen Mischen der Zellen mit cAMP Reagenz und Hinzufügen der Zellsuspension auf die Platte 30 Minuten nicht überschreitet. Vor dem Inkubieren über 60 Minuten bei Raumtemperatur wird die Platte noch fünf bis sechsmal leicht nach rechts und links geschüttelt um den Inhalt der Wells zu vermischen. Nach der Inkubationszeit von 60 Minuten wird die Platte in einem GloMax Luminometer gemessen. Die Rohdaten müssen in das Turbo TSI Analysis Tool kopiert werden, das die TSI-Konzentration der Proben in IU/L basierend auf einem proprietären Algorithmus ausrechnet.

Um als valides Ergebnis zu zählen, muss der Variationskoeffizient der Duplikate weniger als 15% sein. Bei invaliden Ergebnissen müssen die jeweiligen Proben wiederholt werden, um die stimulierenden TSH-Rezeptor-Antikörper zu quantifizieren.

Die Negativ-, Hochpositiv-, Mittelpositiv- und Niedrigpositivkontrolle dienen zur Qualitätskontrolle und sind auf jeder Platte notwendig, um die Performance des Assays

zu prüfen. Dabei gibt es bei jedem Kontrollset ein Minimum und ein Maximum von akzeptierten Werten (siehe Abschnitt 3.2.3. Limitationen).

3.2.3 Limitationen der Turbo TSI Messung

Limitationen das Turbo TSI Assays: Da unter dem Cut-off von 0,024IU/L keine Quantifizierung möglich ist, wurden negative Turbo TSI Ergebnisse mit 0,010 IU /L quantifiziert, dies musste bei den Gesamtproben von n=426 n=18 mal durchgeführt werden. RLU-Werte über denen des höchsten Standards liefern ungenauere Werte im oberen Bereich. Das höchst ausrechenbare Ergebnis ist 11,383. Werte darüber (>11,383) wurden hier auf 20 IU/L gesetzt. (n=12mal).

Label	n	Mean RLU	%CV	Comment	d Concentrat
STD A	2	17195	0,53		0,010
STD B	2	25845	6,27		0,061
STD C	2	79270	0,91		0,313
STD D	2	577200	0,12		3,050
STD E	2	936700	1,18		11,383
HPC	2	880050	0,06		8,336
LPC	2	26415	1,37		0,064
MPC	2	541100	3,40		2,757
NC	2	13370	3,70	Negative	
V1	2	1000000	0,00		20,204
V2	2	1010000	0,00		23,421
V3	2	1020000	0,00		28,201
V4	2	1030000	0,00		36,303
V5	2	1040000	0,00		54,279
V6	2	1050000	0,00		170,546
V7	2	1060000	0,00		>11,383
V8	2	1070000	0,00		>11,383
V9	2	1080000	0,00		>11,383
V10	2	1090000	0,00		>11,383
V11	2	1100000	0,00		>11,383

Abbildung 10 Turbo TSI Auswertungsschema: gemessene RLU über dem höchsten Standard liefern ungenaue Ergebnisse in IU/

3.2.4 Luciferase Assay System

Die Luciferase des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) ist ein Enzym, welches zur Messung der Antikörper im GloMax Luminometer benötigt wird. Das Substrat Luciferin wird durch die Übertragung von Elektronen zu Oxyluciferin oxidiert. Dabei benutzt das Protein ATP und Mg^{2+} als Kosubstrate und katalysiert dadurch die Reaktion, bei der die chemische Energie als Licht frei wird. Die Menge an exprimierter Luciferase, welche proportional zur Stimulation des TSH-Rezeptors ist, korreliert mit der Produktion von Licht, welches dann gemessen werden kann.

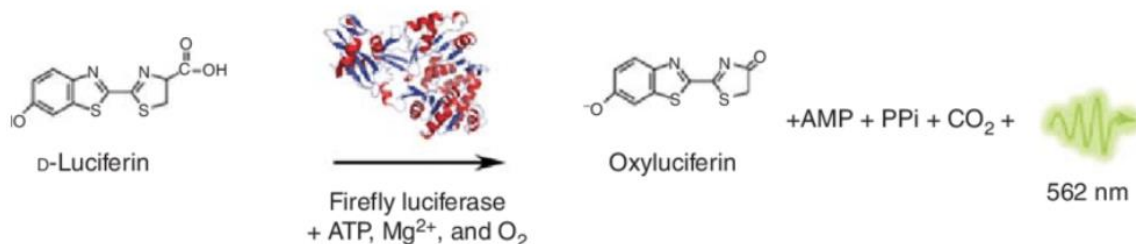


Abbildung 11 Luciferasereaktion Quelle (Lyons, 2013)

4 Ergebnisse

4.1 Gesamtkollektiv und Studiendesign

Untersuchungen wurden an n=426 Blutproben durchgeführt, welche von n=31 Patienten stammen. Die Patienten wurden im Rahmen einer randomisierten, verblindeten, prospektiven Studie rekrutiert. Wie zuvor erwähnt, wurde die Studie aufgrund von Nebenwirkungen frühzeitig beendet, sodass nur bei n=21 Patienten die Studie im kompletten Design abgeschlossen wurde. Die untersuchten Blutproben stammen alle aus Visiten des Kollektivs der Studie.

Wie zuvor schon genauer erläutert ist die Studienmedikation ein monoklonaler, menschlicher, anti-neonataler Fc-Rezeptor Antikörper, welcher zum Abbau der Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor führen soll und dadurch die Symptomatik der Autoimmunerkrankung lindern soll. Nachdem die Patienten beim Screening waren, bei welchem auch eine Blutentnahme erfolgte, wurde die Studienmedikation über 12 Wochen als subkutane Injektion gegeben. Während der Spritzengabe wurde den Patienten bis auf Woche 9 und Woche 11 wöchentlich Blut abgenommen und deren Augenparameter und klinische Symptome aufgenommen. In einer darauffolgenden 8-wöchigen Follow-Up Phase nach der letzten Spritzengabe wurden die Antikörper im Patientenserum in Woche 13, 14, 16 und 20 bestimmt. So gibt es von Patienten, die die Studie im vollen Umfang durchgeführt haben, pro Patient 15 Blutproben (inkl. Screening), bei denen die Antikörper mittels Bindungsassay TRAK, Thyretain TSI, Thyretain TBI und Turbo TSI bestimmt wurden. Da alle im Kollektiv untersuchten Seren negativ im Thyretain TBI Assay auf blockierende Antikörper waren, werden diese nicht weiter besprochen. Als Schlüsselvisiten, um den Effekt der Studienmedikation auf die Serologie zu betrachten, werden dabei die Baseline (BL), Woche 7 (W7), Woche 13 (W13) und Woche 20 (W20) gewählt. In der Auswertung sind zum einen die absoluten Werte der Visiten relevant, um den Verlauf der Parameter darzustellen, wird die prozentuelle Veränderung der Titer von einer zur nächsten Visite herangezogen. So wird das Verhalten der Werte von der Baseline in Woche 1, bei der die Blutentnahme noch vor der ersten Medikationsgabe erfolgte, bis Woche 13, dem primary endpoint, bei der die Blutentnahme eine Woche nach der letzten Injektion erfolgte, betrachtet. Ebenso von Interesse ist das Verhalten der Assayergebnisse über die Hälfte der Medikationsgabe (BL vs. W7); zwischen Beginn und Ende der Studie (BL vs. W20) und zwischen Beginn und Ende der Follow Up Phase (W13 vs. W20).

Die Studienpatienten wurden doppelverblindet in vier Gruppen eingeteilt. Besprochen werden die Patienten, die die Studie vollständig durchlaufen haben:

- Placebo: n=12, study completed (s.c.) n=9
- Niedrige Medikationsdosis (255mg): n=5, study completed n=3
- Mittlere Medikationsdosis (340mg): n=8, study completed n=5
- Hohe Medikationsdosis (680mg): n=6, study completed n=4

So kommt man auf n=12 (s.c. n=9) Patienten in der Placebogruppe, während n=19 (s.c. n=12) Patienten eine Medikation in unterschiedlichen Dosen erhalten haben.

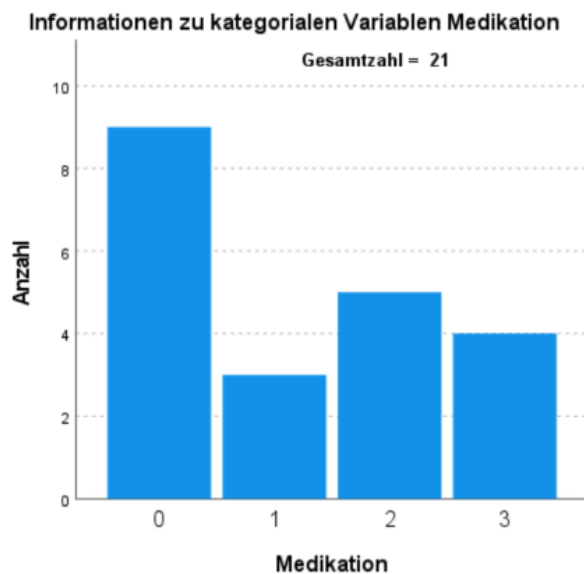


Abbildung 12 abgeschlossene Studienpatienten pro Gruppe; 0=Placebo; 1=255mg Gruppe; 2=340mg Gruppe; 3=680mg Gruppe

Die folgende Tabelle liefert einen Überblick zu den demographischen Daten des Kollektivs.

	Placebo Gruppe [n= 12]	Medikation Gruppe [n= 19]	p-Wert
Geschlecht [n]			>0.9999
weiblich	9 (75%)	13 (68.42%)	(ns)
männlich	3 (25%)	6 (31.58%)	
Alter [a]	48.08 (±12.04)	48.65 (±11.02)	0.8971 (n.s.)
Gewicht [kg]	70.90 (±13.44)	78.15 (±15.22)	0.0438 (*)
Größe [m]	1.68 (±0.11)	1.73 (±0.06)	0.1541 (n.s.)
Rauchgewohnheiten			>0.9999
Nicht-Raucher [n]	10 (83.33%)	15 (78.95%)	(n.s.)
Raucher [n]	2 (16.67%)	4 (21.05%)	
Erkrankungen			>0.9999
Morbus Basedow [n]	12 (100%)	18 (94.74)	(n.s.)
Hashimoto Thyroiditis [n]	0	1 (5.26%)	
Dauer der EO Erkrankung [Monate]	5.25 (±2.14)	4.37 (±2.34)	0.2997 (n.s.)
Schilddrüsenmedikation			0.0361 (*)
Keine SD Medikation [n]	0	7 (36.84%)	
SD [n]	12 (100%)	12 (63.16%)	
Thyreostatische Medikation [n]	9 (75%) 3 (25%)	7 (36.84%) 5 (26.32%)	0.6668 (ns)

Schilddrüsenhormonsubstitution [n] Block and replace treatment [n]	0	0	
Serologie			
Baseline Serum TSH [0,55-4,78 mIU/l]	4.88 (± 6.31) 4.96 (± 0.69)	1.50 (± 1.77) 5.49 (± 1.89)	0.0669 (n.s.)
Baseline Serum freies T3 [3,5-6,5 pmol/l]	14.29 (± 4.23)	16.64 (± 5.95)	0.7682 (n.s.)
Baseline Serum freies T4 [11,5-22,7 pmol/l]			0.6700 (n.s.)

Tabelle 4 Demografische Daten der Studienpatienten mit Fisher-Exakt Test auf einem Signifikanzniveau von 0,05

Die Tabelle enthält Informationen zu den Studienpatienten zu Beginn der Studie. Es gibt nur wenige signifikante Unterschiede in den Gruppen Placebo und Medikation. So hat die Medikationsgruppe zur Baseline mehr Körpergewicht als die Patienten der Placebogruppe. In der Medikationsgruppe haben ein paar Teilnehmer keine Schilddrüsenmedikation zusätzlich zur Studie bekommen, während alle Patienten der Placebogruppe in irgendeiner Form thyreoidale Medikation bekommen haben. Darunter zählen Schilddrüsenhormone ebenso wie Antithyreostatika. Die Medikationsgruppe startet mit einem insgesamt niedrigeren Baseline Serum TSH als die Placebogruppe, der Fisher-Exakt Test liefert aber einen p-Wert von 0,067, was gegen einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen spricht.

4.2 Ergebnisse der Proben

Bei allen Patienten, die im Ergebnisteil besprochen werden, ist in den jeweiligen Tabellen die Medikation vermerkt, falls die Patienten antithyreoidale Medikation oder weitere Immunsuppressiva während des Studienzeitraums zusätzlich erhalten haben.

Exemplarisch werden im Ergebnisteil einzelne Patienten aus jeder Randomisierungsgruppe besprochen, um einen Einblick zu bekommen. Um die Gruppen in einer Gesamtheit darzustellen, dienen die Mediane der jeweiligen Gruppe, welche zur statistischen Auswertung genutzt werden.

4.2.1 Placebogruppe

Patienten der Placebogruppe haben keine Medikation erhalten, dementsprechend sind während der Medikationsgabe keine deutlichen Änderungen der Antikörper zu erwarten. Zwar haben alle Patienten der Placebogruppe thyreoidale Medikation in Form von Thyreostatika oder Hormonsubstitution erhalten, dazu gibt es aber keine Belege, dass diese Medikation die Antikörperlevels direkt beeinflusst. Allerdings ist durchaus denkbar, dass sie durch den positiven Einfluss auf die Krankheitsentwicklung einen Rückgang der TSI fördert.

Visite Patient 22	TRAK (<1,75 IU/L)	Thyretain TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0.024 IU/L)	Medikation Tagesdosis Thiamazol
W1	11,65	936	5,263	10mg
W2	10,9	901	5,039	10mg
W3	10,67	990	4,400	10mg
W4	10,15	1032	4,708	10mg
W5	9,83	951	5,011	10mg
W6	9,31	958	5,195	5mg
W7	10,05	931	4,717	7,5mg
W8	9,36	1285	3,845	7,5mg
W10	9,15	775	4,658	10mg
W12	9,19	1155	3,809	10mg
W13	9,24	1019	4,758	10mg
W14	9,11	830	4,684	15mg
W16	9,05	798	4,375	15mg
W20	8,3	884	4,732	10mg

Tabelle 5 Patient 22: Assayergebnisse

Patient 22 bietet ein Beispiel für die Placebogruppe, bei welchem sich die Antikörperkonzentrationen wie zu erwarten über die 20 Wochen kaum verändert haben. In allen drei Assays zeichnen sich hochpositive Werte ab, prozentual gesehen hat der TSI Bioassay die größten Wertschwankungen. So gibt es hier auch Sprünge von 1285 SRR% in Woche 8 auf 775 SRR% in Woche 10. Beide Werte sind allerdings als hoch positive Ergebnisse auf stimulierende Antikörper zu bewerten. Ebenso zu bewerten sind die Sprünge des TRAK und Turbo TSI, welche zwar nicht so groß wie die des TSI Bioassays sind, dennoch aber vorkommen. So sind bei Patient 22 über die Gesamtdauer der Studie alle drei Assays übereinstimmend hoch positiv.

Assay Pat 22	BL bis W7	BL bis W13	BL bis W20	W13 bis W20
TRAK	-13,73%	-20,69%	-28,76%	-10,17%
TSI	-0,53%	+8,87%	-5,56%	-13,25%
Turbo TSI	-10,37%	-9,60%	-10,09%	-0,55%

Tabelle 6 Patient 22: Assayverläufe

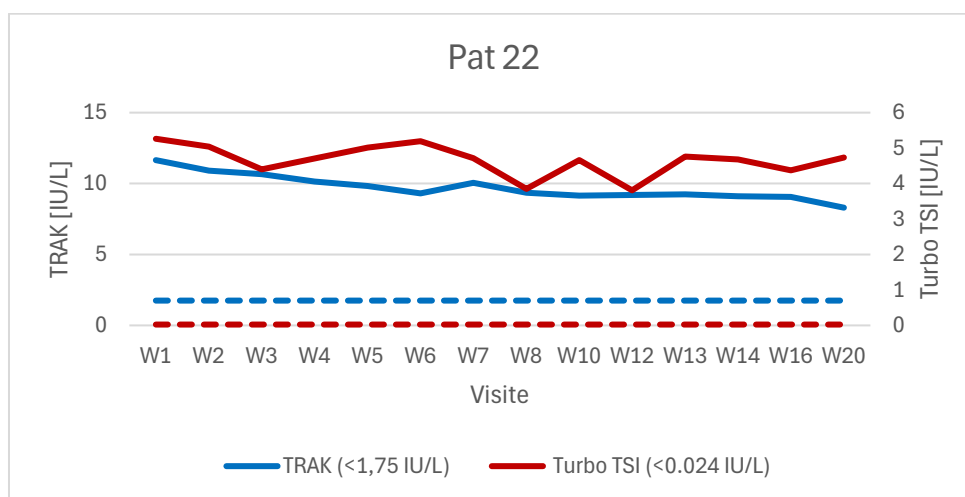


Abbildung 13 Patient 22 - Placebo - TRAK und Turbo TSI

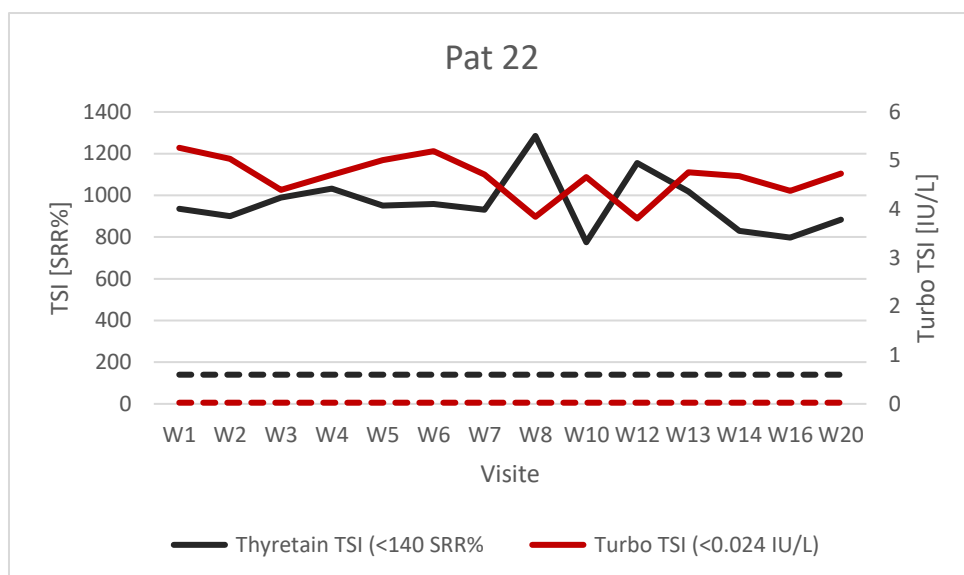


Abbildung 14 Patient 22 - Placebo - TSI und Turbo TSI

Die graphische Auftragung des Turbo TSI gegenüber TRAK und Thyretain TSI bestätigt die schon zuvor besprochenen konstant hohen Messwerte des Patienten 22. In der graphischen Darstellung zeigt sich, dass der Verlauf des TRAK und Turbo TSI ähnlicher ist als der der Assays gegenüber des TSI.

Patient 22	W1 bis W13	W13 bis W20
CAS	4 → 2	2 → 1
Lidretraktion	10mm → 11mm	11mm → 10mm
Exophthalmus	21mm	21mm

Tabelle 7 Patient 22 - klinische Parameter

Betrachtet man die klinischen Parameter, zeigt sich ein Rückgang des CAS über den Studienzeitraum. Zwar fallen die Parameter in allen drei Assays etwas ab, eine gute Korrelation zum CAS ist hier aber nicht gegeben. Bei der Lidretraktion und dem Exophthalmus wiederum zeigen sich konstante Werte, was mit der Serologie korreliert.

Um die Placebogruppe als Gesamtheit darstellen zu können, dienen die Mediane der jeweiligen Ergebnisse der Visiten der Placebogruppe. Nicht alle Patienten haben so konstante Werte wie Patient 22, doch insgesamt zeigt die Placebogruppe nur geringfügige Änderungen der Antikörper im Blutserum. Die nachfolgende Tabelle und Graphen zeigen die Mediane der Placebo Patienten.

Visite Mediane Placebo	TRAK (<1,75 IU/L)	Thyretain TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0,024 IU/L)
W1	11,65	911	0,493
W2	11,49	964	0,469
W3	11,19	888	0,449
W4	10,16	923	0,441
W5	9,83	844	0,415
W6	10,39	692	0,394
W7	10,05	759	0,401
W8	9,31	995	0,412
W10	9,15	775	0,365
W12	9,24	943	0,314
W13	8,81	655	0,305
W14	9,11	830	0,417
W16	9,05	975	0,436
W20	8,30	786	0,312

Tabelle 8 Mediane Patienten Placebogruppe

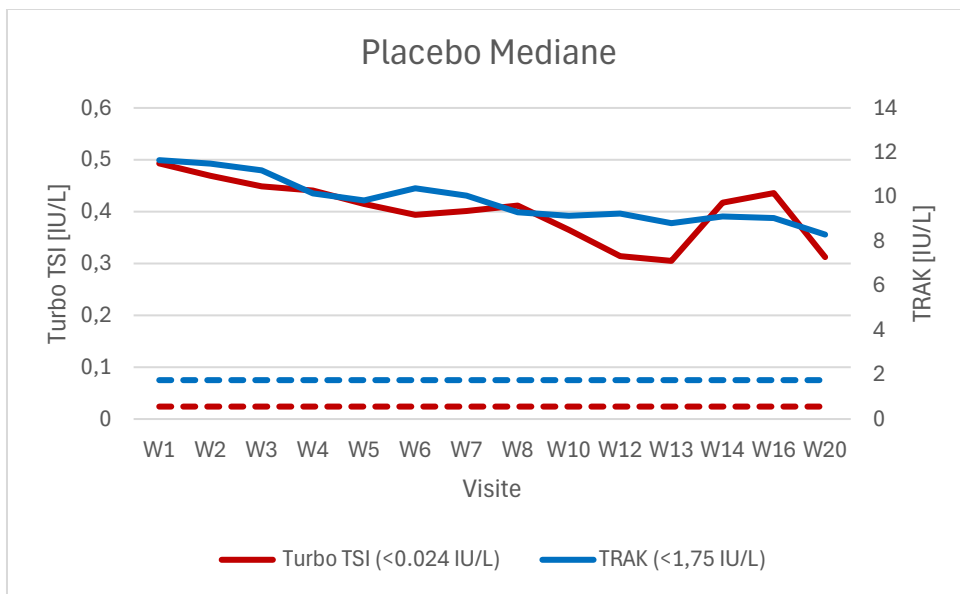


Abbildung 15 Mediane Placebogruppe - TRAK und Turbo TSI

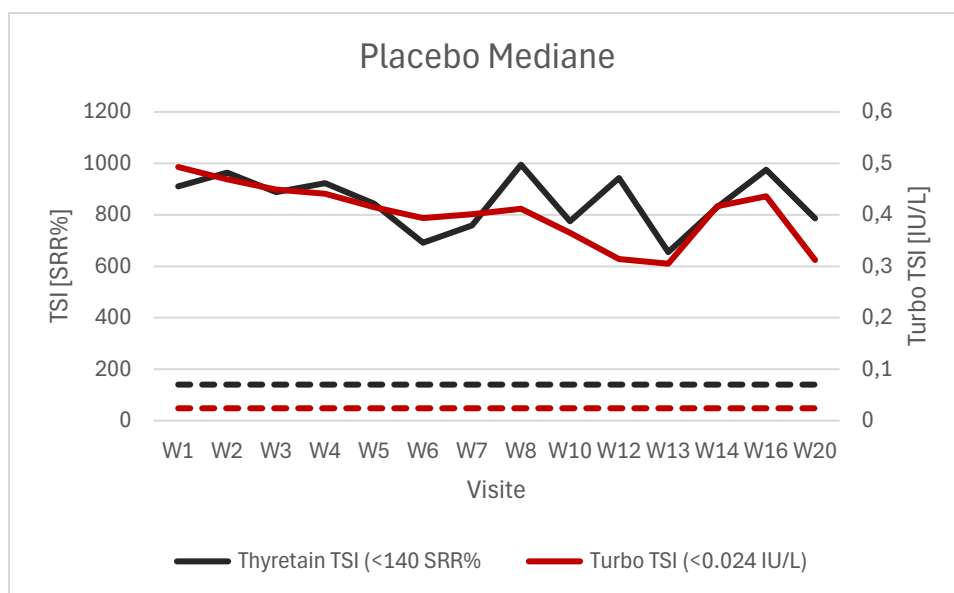


Abbildung 16 Mediane Placebogruppe - TSI und Turbo TSI

Die Mediane in tabellarischer als auch graphischer Darstellung zeigen in allen drei Assays eine weitgehend im gleichen Bereich bleibende Menge der Antikörper im Serum. Über die 20 Wochen der Studie sinken die Mediane der Patienten im Wert, bleiben aber alle deutlich positiv. Ob die Abnahme auf die medikamentöse Behandlung, eine spontane Besserung der Patienten oder auf Schwankungen der Titer zurückzuführen ist, ist nicht ganz klar. Alle drei Assays stimmen aber im Groben überein.

4.2.2 Gruppen mit Studienmedikation

Fast ausnahmslos ist hier eine Abnahme der Antikörpertiter in allen drei Assays über die Zeit der Spritzengabe zu beobachten. Ebenso kann man einen Wiederanstieg der Antikörpertiter in der Follow Up Phase von Woche 13 bis Woche 20 beobachten.

Da die Patienten unterschiedliche Dosen der Medikation bekamen, ist es interessant zu sehen, inwiefern die Abnahme der Antikörper sich zum einen zur Placebogruppe, als auch zwischen den Gruppen unterschiedlicher Dosis unterscheidet.

4.2.2.1 Niedrige Dosis (255mg)

Visite Patient 3	TRAK (<1,75 IU/L)	Thyretain TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0.024 IU/L)	Medikation Tagesdosis Thiamazol
W1	31,9	961	0,398	2,5mg
W2	31,9	1100	0,338	10mg
W3	11,3	1099	0,195	10mg
W4	10,47	1112	0,261	10mg
W5	9,68	939	0,236	10mg
W6	9,91	571	0,250	5mg
W7	12,01	871	0,209	2,5mg
W8	7,32	992	0,202	2,5mg
W10	7,3	843	0,177	2,5mg
W12	7,01	927	0,193	2,5mg
W13	7,24	575	0,158	2,5mg
W14	8,34	1055	0,221	2,5mg
W16	9,82	1042	0,267	2,5mg
W20	11,49	849	0,301	2,5mg

Tabelle 9 Patient 3 - Assayergebnisse

Assay Pat 3	BL bis W7	BL bis W13	BL bis W20	W13 bis W20
TBII	-62,35%	-77,30%	-63,98%	+58,70%
TSI	-9,37%	-40,17%	-11,65%	+47,65%
Turbo TSI	-47,49%	-60,30%	-24,37%	+90,51%

Tabelle 10 Patient 3 - Assayverläufe

Patient 3 hat die Studienmedikation in der niedrigsten Dosis (255mg) bekommen. In allen drei Assays sieht man eine deutliche Abnahme der Antikörperwerte während Medikationsgabe und einen Anstieg in der Follow Up Phase. Bei TRAK und Turbo TSI sind diese Veränderungen stetig ab der ersten Woche. Betrachtet man die Werte des TSI Bioassays, sieht man auch hier wieder deutliche Sprünge, die in diesem Beispiel den Verlauf deutlich stören. Im Vergleich Woche 1 bis 13 ist dies zwar in dem Fall kein Hindernis, im graphischen Verlauf fällt es aber deutlich auf.

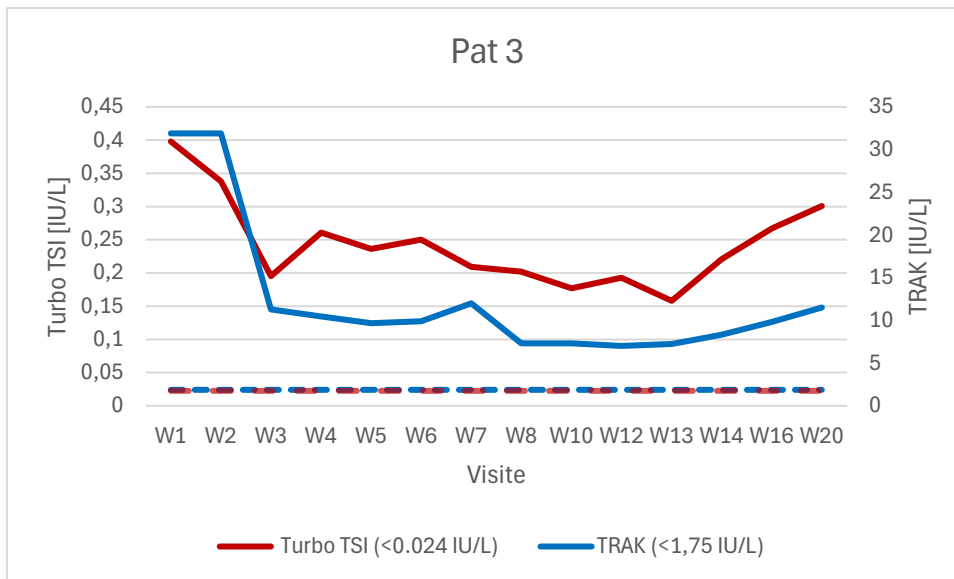


Abbildung 17 Patient 3 - low dose - TRAK und Turbo TSI

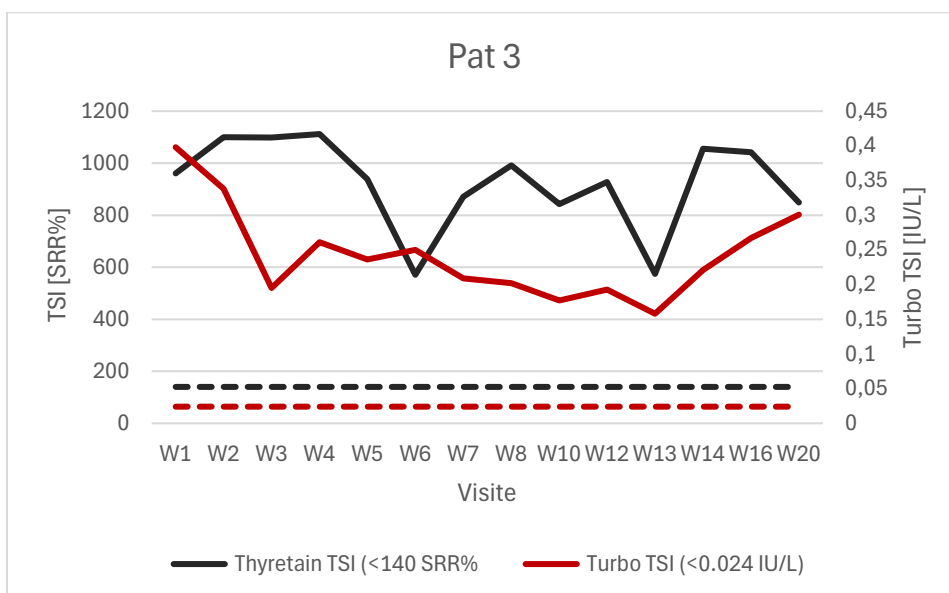


Abbildung 18 Patient 3 - low dose - TSI und Turbo TSI

Bei Patient 3 passt die Abnahme des CAS zu den serologischen Veränderungen (v.a. TRAK und Turbo TSI). Lidretraktion und Exophthalmus bleiben allerdings konstant.

Patient 3	W1 bis W13	W13 bis W20
CAS	4 → 2	2 → 4
Lidretraktion	10mm	10mm → 11mm
Exophthalmus	20mm	20mm

Tabelle 11 Patient 3 - low dose – klinische Parameter

An dieser Stelle ist Patient 9 hervorzuheben. Auch dieser Patient hat die niedrige Dosis bekommen. Alle anderen Patienten, die die Medikation bekommen haben, zeigen eine Abnahme der Titer bis Woche 13 und einen Anstieg bis Woche 20. Bei diesem Patienten zeigt sich während der Spritzengabe keine so deutliche Abnahme wie beim Rest des Kollektivs. Er stellt als einziger Patient, der serologisch nicht auf die Studienmedikation angesprochen hat, eine Ausnahme dar.

Visite Patient 9	TRAK (<1,75 IU/L)	Thyretain TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0.024 IU/L)	Medikation Tagesdosis
W1	36,86	1086	13,708	Thiamazol (Thi) 30mg
W2	33,94	1038	13,921	Thi. 30mg
W3	31,68	1217	22,408	Thi. 30mg
W4	29,49	941	17,299	Thi. 30mg
W5	28,71	990	23,689	Thi. 20mg + L-Thyroxin (L-T) 50ug
W6	28,64	560	19,311	Thi. 20mg + L-T 50µg
W7	32,53	970	10,695	Thi. 15mg + L-T 50µg
W8	28,84	935	13,199	
W10	30,24	996	14,999	
W12	30,29	962	18,836	Thi. 20mg+Methylprednisolon 215mg
W13	26,63	936	14,591	Thi.20mg
W14	23,98	974	12,325	Thi.20mg+Methylprednisolon 108mg
W16	22,09	709	10,472	Thi. 30mg + Myfortic 1080mg

Tabelle 12 Patient 9 - low dose - Assayergebnisse

Die Visite der Woche 13 fand bei Patient 9 krankheitsbedingt nicht statt, deshalb wird hier W14 als primärer Endpunkt gewählt.

Assay Pat 9	BL bis W7	BL bis W14	BL bis W20	W14 bis W20
TRAK	-11,75%	-27,75%	-40,07%	-17,05%
TSI	-10,68%	-13,81%	-34,71%	-24,25%
Turbo TSI	-21,98%	+6,44%	-23,6%	-28,23%

Tabelle 13 Patient 9 - low dose - Assayverläufe

Ab Woche 12 bekam dieser Patient Immunsuppressiva in Form von Methylprednisolon und Myfortic. Das erklärt hier die weitere Abnahme bis Woche 20. Er scheint also auf die Medikation als einziger Patient im Kollektiv weder in Serologie noch in Bezug auf die Klinik angesprochen zu haben. Die Immunsuppression mittels Methylprednisolon und Myfortic ab Woche 12 ist allerdings in allen drei Assays gut zu sehen.

Patient 9	W1 bis W10	W10 bis W20
CAS	5 → 7	7 → 4
Lidretraktion	11mm → 13mm	13mm
Exophthalmus	26mm → 29mm	29mm

Tabelle 14 Patient 9 - low dose - klinische Parameter

Die klinischen Parameter passen zur Serologie. Als Vergleichspunkt ist hier Woche 10 vor der Gabe der Kortikosteroide gewählt. Wie die Serologie hat sich bei Patient 9 die Klinik während der Medikationsgabe nicht gebessert, zumindest der CAS hat sich nach der Gabe von Methylprednisolon gebessert.

4.2.2.2 Mittlere Dosis (340mg)

Patienten der mittleren Dosis sprechen auf die Medikation in Bezug auf ihre Antikörperwerte ähnlich an wie die Patienten der niedrigen Dosis. Die Abnahme der Titer während der Therapie und vor allem der Wiederanstieg fallen ein bisschen stärker aus. Die höhere Dosierung in dieser Gruppe wird durch die Assays bestätigt. Pat 16 ist ein gutes Beispiel.

Visite Patient 16	TRAK (<1,75 IU/L)	Thyretain TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0.024 IU/L)	Medikation Tagesdosis L-Thyroxin
W1	16,19	995	0,347	100µg
W2	12,84	966	0,207	75µg
W3	5,85	914	0,158	75µg
W4	6,89	807	0,111	75µg
W5	3,65	654	0,093	75µg
W6	2,41	395	0,083	75µg
W7	3,06	548	0,073	75µg
W8	2,5	516	0,072	75µg
W10	2,78	530	0,071	75µg
W12	2,4	587	0,077	75µg
W13	2,93	441	0,086	75µg
W14	4,11	673	0,114	75µg
W16	6,08	864	0,185	75µg
W20	8,75	1011	0,250	75µg

Tabelle 15 Patient 16 - mid dose - Assayergebnisse

Assay Pat 16	BL bis W7	BL bis W13	BL bis W20	W13 bis W20
TRAK	-81,01%	-81,90%	-45,95%	+198,63%
TSI	-44,92%	-55,68%	+1,60%	+129,25%
Turbo TSI	-78,96%	-75,22%	-27,95%	+190,70%

Tabelle 16 Patient 16 - mid dose - Assayverläufe

Die starke Abnahme der Assays (bis 81%) und der jeweils über 100%ige Wiederanstieg zeigen sich auch deutlich in der graphischen Darstellung. Die Assays zeigen ähnliche Verläufe.

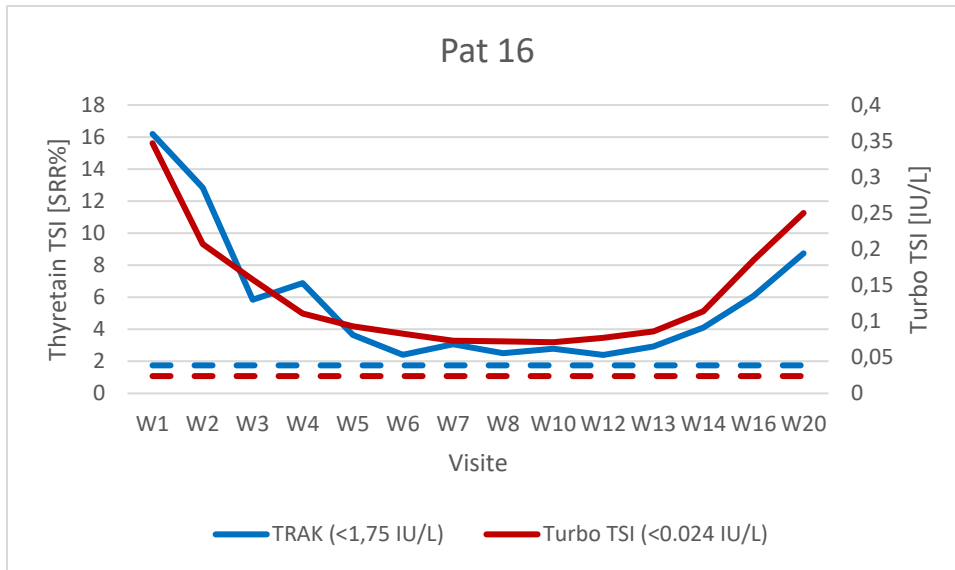


Abbildung 19 Patient 16 - mid dose - TRAK und Turbo TSI

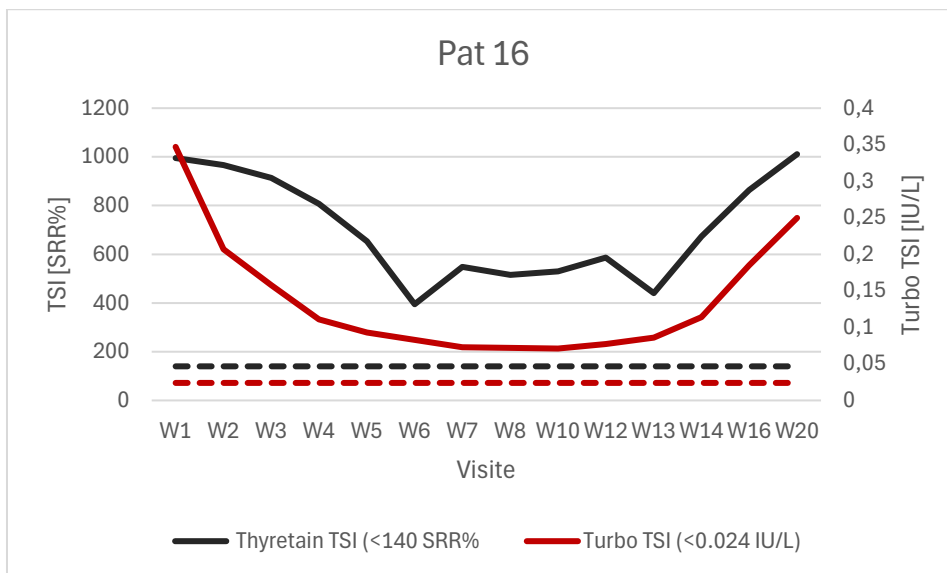


Abbildung 20 Patient 16 - mid dose - TSI und Turbo TSI

Im Vergleich zur Serologie fallen die klinischen Parameter von Patient 16 nicht so stark ab. Gleichzeitig ist die Klinik bei Patient 16 nicht sehr ausgeprägt, vor allem Lidretraktion und der Exophthalmus halten sich in Grenzen.

Patient 16	W1 bis W13	W13 bis W20
CAS	4	4
Lidretraktion	9mm → 8mm	8mm → 9mm
Exophthalmus	19mm → 18mm	18mm

Tabelle 17 Patient 16 - mid dose - klinische Parameter

Auffällige Verläufe gibt es bei mehreren Patienten, die die mittlere Dosis erhielten.

Visite Patient 14	TRAK (<1,75 IU/L)	Thyretain TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0.024 IU/L)
W1	5,07	987	4,050
W2	2,33	1218	1,452
W3	1,57	838	0,926
W4	1,12	547	0,531
W5	1,37	560	0,567
W6	1,1	308	0,390
W7	0,922	475	0,436
W8	0,8	383	0,314
W10	0,837	316	0,301
W12	1,18	287	0,193
W13	1,34	190	0,217
W14	0,8	433	0,334
W16	0,806	514	0,371
W20	1,21	481	0,296

Tabelle 18 Patient 14 - mid dose - Assayergebnisse

Bei Patient 14 fällt der TRAK schon in Woche 3 unter seinen Cut-off von 1,75 IU/L, Turbo und Thyretain TSI bleiben beide positiv und es ist kein Wiederanstieg ab Woche 13 zu erkennen.

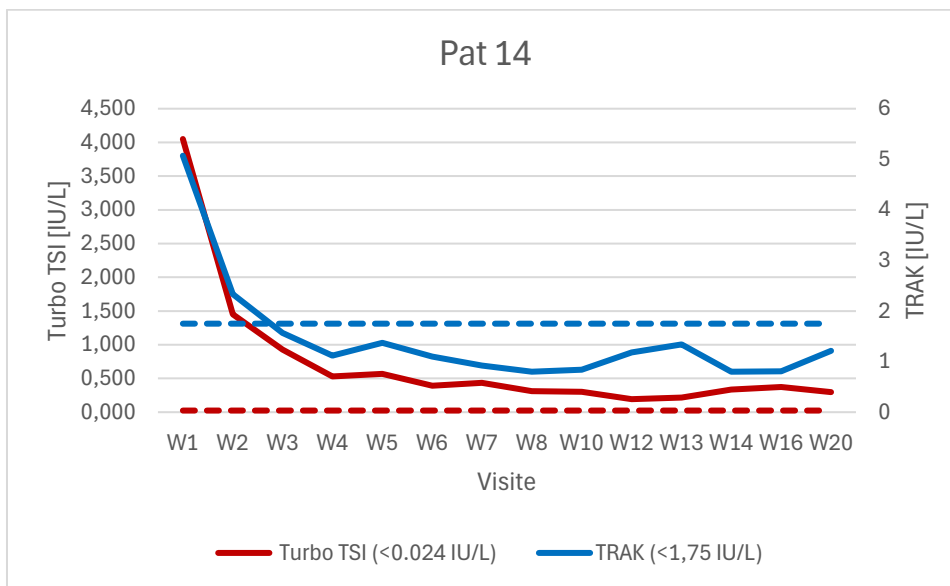


Abbildung 21 Patient 14 - mid dose - TRAK und Turbo TSI

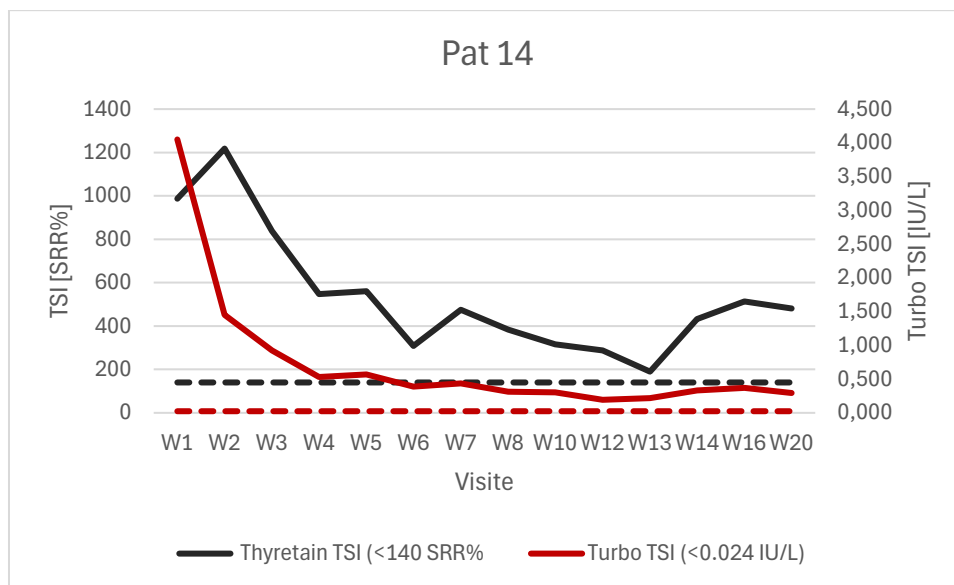


Abbildung 22 Patient 14 - mid dose - TSI und Turbo TSI

Die Klinik von Patient 14 passt sehr gut zur Serologie. Auch hier bessert sich der CAS sehr eindrücklich von 6 auf 1 und fällt sogar auf 0. Patient 14 hat keine antithyroidale Medikation bekommen.

Patient 14	W1 bis W13	W13 bis W20
CAS	6 → 1	1 → 0
Lidretraktion	10mm → 11mm	11mm → 9mm
Exophthalmus	22mm → 18mm	18mm

Tabelle 19 Patient 14 - mid dose - klinische Parameter

Assay Pat 14	BL bis W7	BL bis W13	BL bis W20	W13 bis W20
TRAK	-81,8%	-73,6%	-76,1%	-9,7%
TSI	-51,9%	-80,7%	-60,6%	+153,2%
Turbo TSI	-89,2%	-94,6%	-92,7%	+36,4%

Tabelle 20 Patient 14 - mid dose - Assayverläufe

Patient 17 weist über 20 Wochen sehr hohe Werte in allen drei Assays auf. In der graphischen Darstellung fällt vor allem der TSI auf. Er fällt nicht ab und bleibt konstant hoch. So wird der Verlauf nicht mehr so gut dargestellt. Für die klinische Relevanz ist hier dann eher die Schlussfolgerung zu ziehen, dass alle Werte hoch positiv waren. Sowohl Turbo TSI als auch TRAK zeigen eine Abnahme von Woche 1 bis Woche 20. Patient 17 hat keine antithyroidale Medikation erhalten.

Visite Patient 17	TRAK (<1,75 IU/L)	TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0.024 IU/L)
W1	14,26	1078	7,051
W2	11,86	849	5,505
W3	7,6	959	3,418
W4	6,33	1014	3,234
W5	5,19	999	2,642
W6	5,51	675	2,273
W7	5,82	1023	2,635
W8	5,16	1034	2,772
W10	4,67	1031	2,502
W12	4,14	1115	2,329
W13	3,82	1064	2,140
W14	4,67	895	2,657
W16	5,6	860	3,182
W20	6,88	998	2,797

Tabelle 21 Patient 17 - mid dose - Assayergebnisse

Assay Pat 17	BL bis W7	BL bis W14	BL bis W20	W14 bis W20
TRAK	-59,19%	-73,21%	-51,74%	+80,10%
TSI	-5,10%	-1,30%	-7,43%	-6,21%
Turbo TSI	-62,65%	-69,65%	-60,34%	+30,70%

Tabelle 22 Patient 17 - mid dose - Assayverläufe

Patient 17	W1 bis W13	W13 bis W20
CAS	5 → 7	7 → 6
Lidretraktion	12mm → 11mm	11mm → 9mm
Exophthalmus	26mm → 28mm	28mm

Tabelle 23 Patient 17 - mid dose - klinische Parameter

Interessanterweise zeigen die klinischen Parameter eher eine Übereinstimmung mit der Serologie des TSI Bioassays, während die Serologie des TRAK und Turbo nicht mit dem Anstieg des CAS zusammenpasst. Trotzdem ist zu erwähnen, dass TRAK und Turbo trotz abfallendem Trend hochpositiv bleiben.

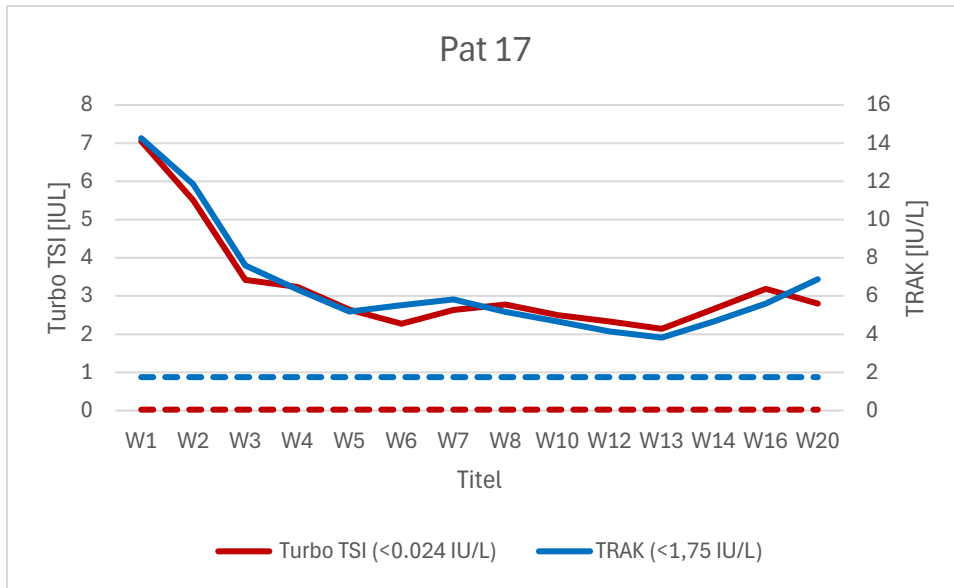


Abbildung 23 Patient 17 - mid dose - TRAK und Turbo TSI

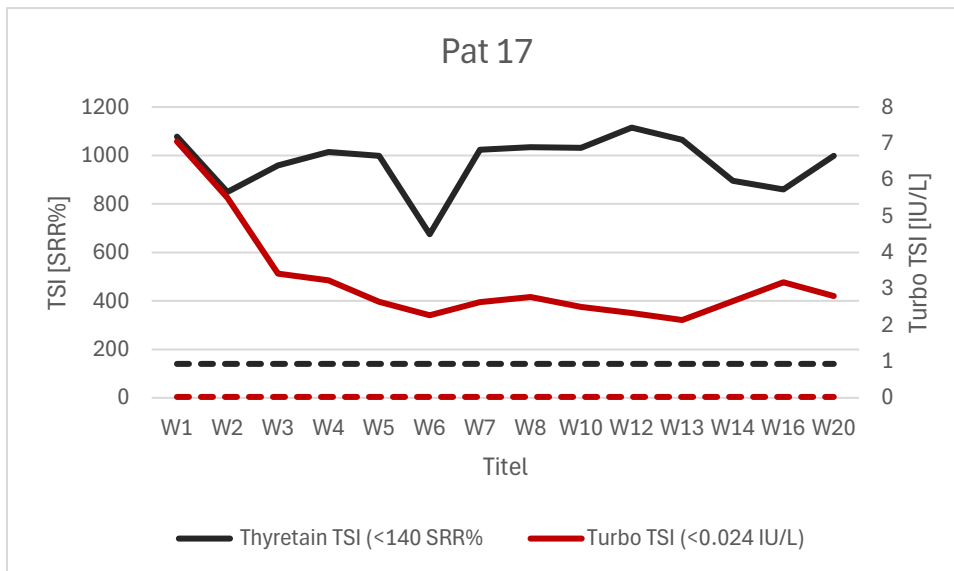


Abbildung 24 Patient 17 - mid dose - TSI und Turbo TSI

Als nächstes folgt Patient 29, auch dieser hat keine antithyroidale Medikation erhalten.

Visite Patient 29	TRAK (<1,75 IU/L)	Thyretain TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0.024 IU/L)
W1	7,58	401	0,048
W2	6,85	254	0,034
W3	4,31	219	0,049
W4	3,7	190	0,042
W5	3,7	228	0,044
W6	3,52	154,5	0,040
W7	3,87	180	0,042
W8	4,65	147	0,044
W10	4,4	227	0,045
W12	3,9	161	0,028
W13	3,71	159	0,051
W14	5,47	240	0,031
W16	7,92	214	0,043
W20	8,74	313	0,045

Tabelle 24 Patient 29 - mid dose - Assayergebnisse

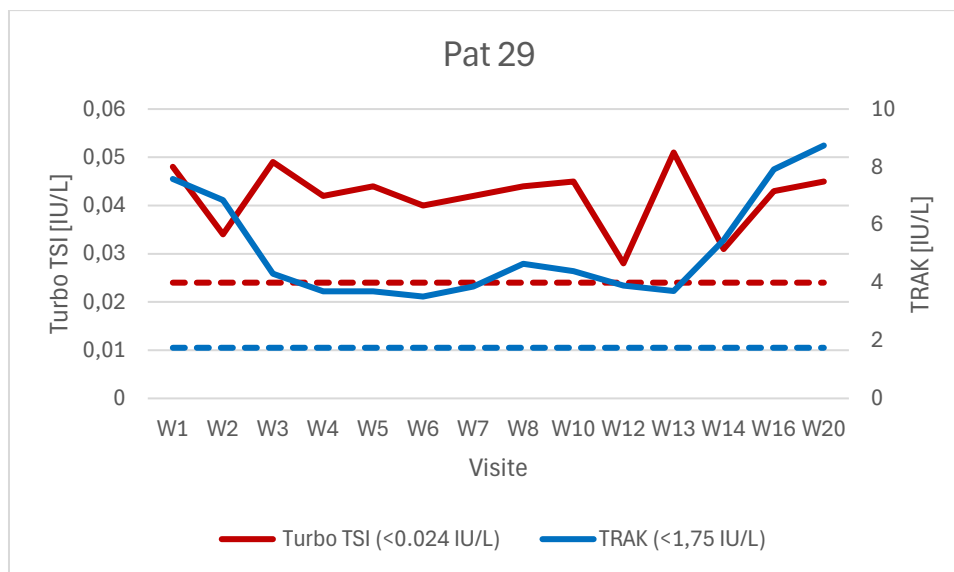


Abbildung 25 Patient 29 - mid dose - TRAK und Turbo TSI

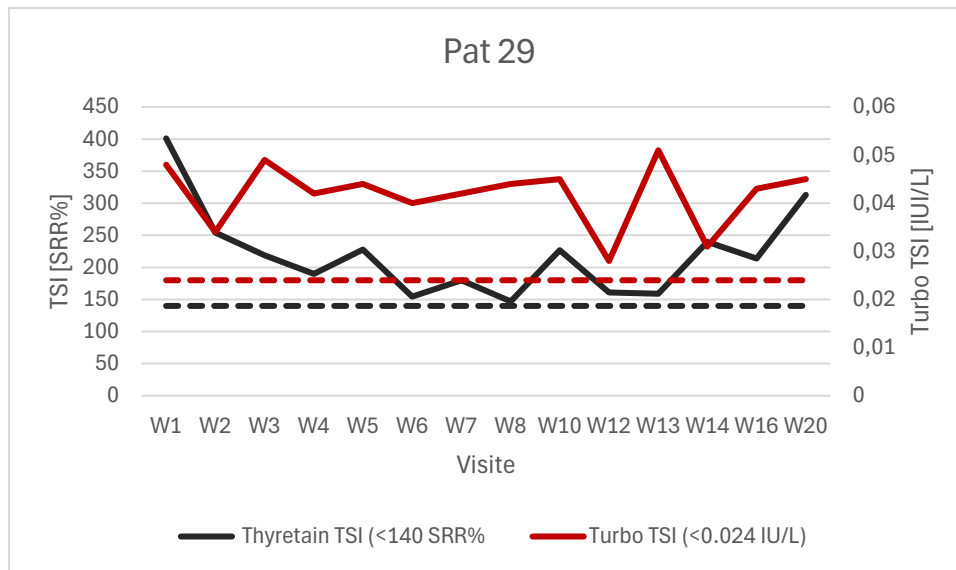


Abbildung 26 Patient 29 - mid dose - TSI und Turbo TSI

Assay Pat 29	BL bis W7	BL bis W13	BL bis W20	W13 bis W20
TRAK	-48,94%	-51,06%	+15,29%	+135,34%
TSI	-55,11%	-60,35%	-21,95%	+96,86%
Turbo TSI	-12,50%	-16,67%	-6,25%	+45,16%

Tabelle 25 Patient 29 - mid dose - Assayverläufe

Bei Patient 29 fällt auf, dass der TRAK hoch positive Werte aufweist, während Turbo und TSI eher niedrige Werte haben, aber auch positiv bleiben. Die klinischen Parameter passen in diesem Fall besser zu den Ergebnissen der beiden Bioassays.

Patient 29	W1 bis W13	W13 bis W20
CAS	4 → 1	1
Lidretraktion	13mm → 12mm	12mm
Exophthalmus	16mm	16mm

Tabelle 26 Patient 29 - mid dose - klinische Parameter

4.2.2.3 Hohe Dosis

Die Patienten, die die hohe Dosis erhalten haben, zeigen die stärksten Veränderungen in ihren Assaywerten.

Visite Patient 4	TRAK (<1,75 IU/L)	Thyretain TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0.024 IU/L)	Medikation Tagesdosis Thiamazol
W1	7,28	948	3,826	15mg
W2	2,63	1161	1,669	15mg
W3	0,8	689	0,558	15mg
W4	1,08	729	0,400	15mg
W5	1,02	604	0,350	15mg
W6	0,862	387	0,300	10mg
W7	1,13	611	0,339	10mg
W8	0,8	585	0,317	10mg
W10	0,8	503	0,313	10mg
W12	0,8	466	0,327	10mg
W13	0,824	309	0,261	10mg
W14	0,8	673	0,449	10mg
W16	2,15	1019	1,727	10mg
W20	2,42	821	2,502	10mg

Tabelle 27 Patient 4 - high dose - Assayergebnisse

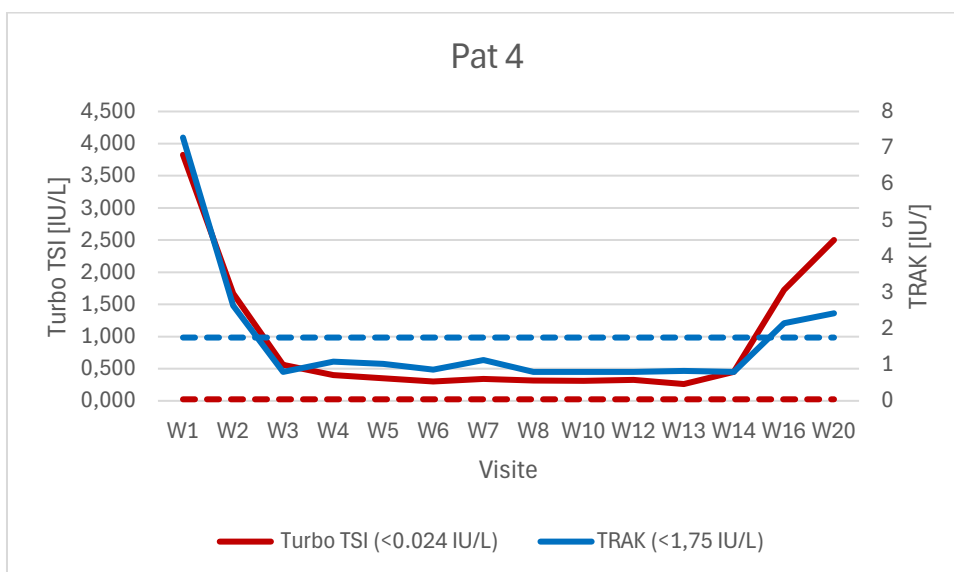


Abbildung 27 Patient 4 - high dose - TRAK und Turbo TSI

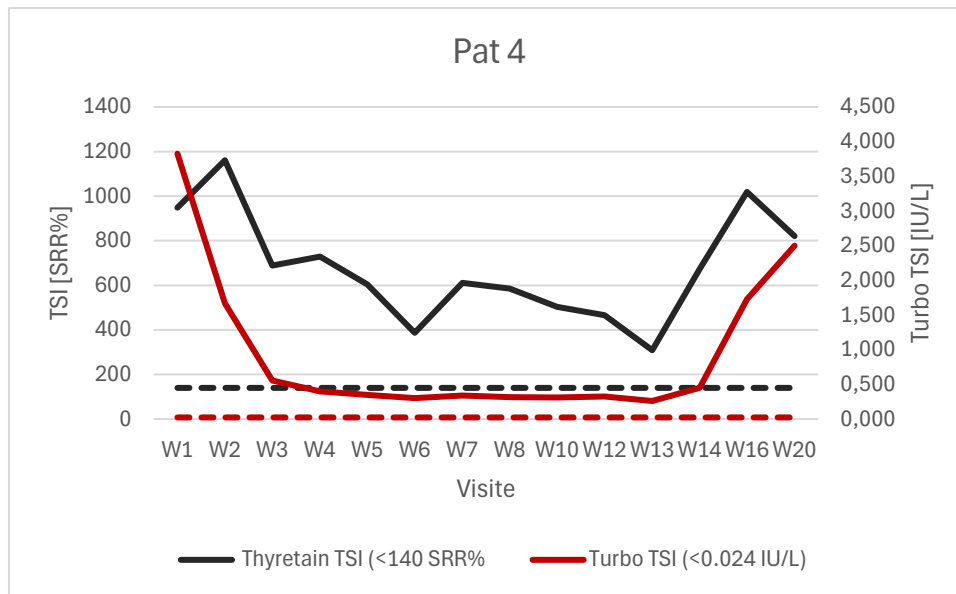


Abbildung 28 Patient 4 - high dose - TSI und Turbo TSI

Patient 4 reagiert stark auf die Medikationsgabe. Der TRAK wird von Woche 3 bis 14 negativ, Thyretain und Turbo sinken auch deutlich, bleiben aber über den kompletten Verlauf positiv.

Die klinischen Beobachtungen zeigen einen Rückgang des CAS während der Medikation. In der Follow Up Phase steigt die klinische Aktivität wieder.

Patient 4	W1 bis W13	W13 bis W20
CAS	5 → 2	2 → 4
Lidretraktion	13mm → 11mm	11mm → 10mm
Exophthalmus	23mm → 22mm	22mm

Tabelle 28 Patient 4 - high dose - klinische Parameter

Assay Pat 4	BL bis W7	BL bis W13	BL bis W20	W13 bis W20
TRAK	-48,95%	-51,06%	+15,32%	135,33%
TSI	-55,11%	-60,35%	-21,95%	+96,86%
Turbo TSI	-12,50%	-16,67%	-6,25%	+45,16%

Tabelle 29 Patient 4 - high dose – Assayverläufe

Ein weiteres Beispiel aus der 680mg Gruppe ist Patient 12. Er hat keine antithyroidale Medikation erhalten.

Visite Patient 12	TRAK (<1,75 IU/L)	TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0,024 IU/L)
W1	2,41	400	0,118
W2	1,5	164	0,043
W3	1,29	107	0,030
W4	1,09	98	0,026
W5	0,8	85	0,010
W6	1,11	55	0,010
W7	1,22	36	0,010
W8	1,05	86	0,010
W10	0,8	76	0,010
W12	0,8	70	0,010
W13	0,8	32	0,010
W14	1,18	99	0,036
W16	1,12	137	0,010
W20	1,83	536	0,039

Tabelle 30 Patient 12 - Assayergebnisse

Bei Patient 12 sinken alle Assays während der Medikationsgabe unter ihren Cut-off und bleiben sogar während eines Teils der Follow Up Phase negativ. Serologisch spricht dieser Patient sehr gut auf den Antikörper an. Wie zuvor beschrieben, wurde für den Turbo TSI, der für die Werte unter dem Cut-off keine Quantifizierung mehr ausrechnet, der Wert auf 0,010 gesetzt.

Assay Pat 12	BL bis W7	BL bis W13	BL bis W20	W13 bis W20
TRAK	-49,37%	-66,80%	-24,06%	+128,75%
TSI	-91,00%	-92,00%	+34,00%	+65,90%
Turbo TSI	-91,53%	-91,53%	-66,95%	+290,00%

Tabelle 31 Patient 12- high dose - Assayverläufe

Auch die klinischen Parameter bessern sich bei Patient 12. Die Entzündungsaktivität geht zurück und bleibt in Woche 20 niedrig. Die Werte der Assays steigen zwar wieder an, die klinischen Parameter bleiben niedriger als das Ausgangsniveau.

Patient 12	W1 bis W13	W13 bis W20
CAS	4 → 1	1
Lidretraktion	12mm → 10mm	10mm
Exophthalmus	17mm → 16mm	16mm → 15mm

Tabelle 32 Patient 12 - high dose- klinische Parameter

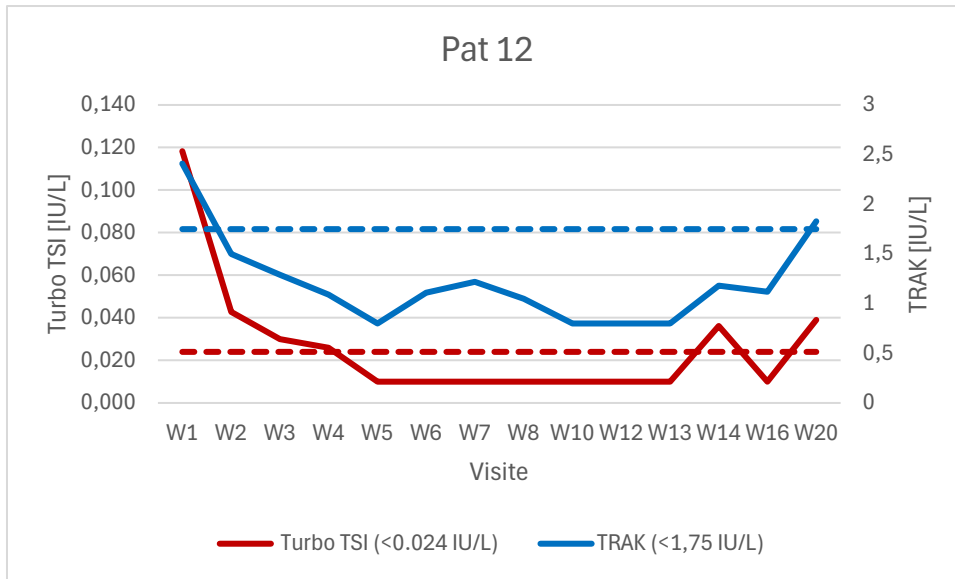


Abbildung 29 Patient 12 - high dose - TRAK und Turbo TSI

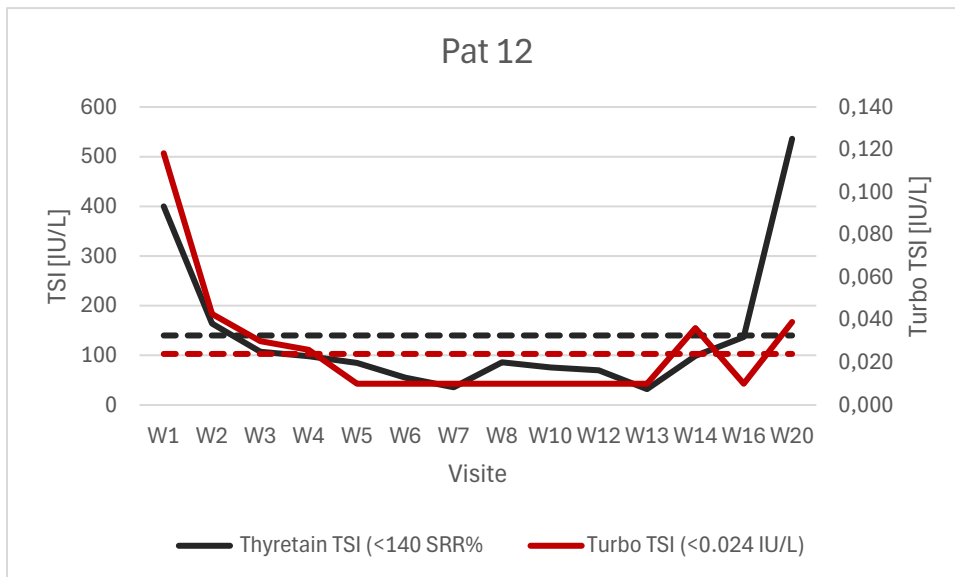


Abbildung 30 Patient 12 - high dose - TSI und Turbo TSI

Auch hier dienen die Mediane der einzelnen Visiten, um die Medikationsgruppe als Gesamtheit darzustellen. Die folgende Tabelle mit zugehörigen Graphen schließt alle Patienten der Medikationsgruppe ein, unabhängig der erhaltenen Dosis.

Visite Mediane Medikation	TRAK (<1,75 IU/L)	Thyretain TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0,024 IU/L)
W1	7,58	961	0,384
W2	6,85	970	0,362
W3	4,31	922	0,261
W4	3,7	823	0,332
W5	3,7	694	0,303
W6	3,52	460	0,284
W7	3,87	566	0,277
W8	4,65	579	0,248
W10	4,21	667	0,226
W12	3,9	703	0,219
W13	3,71	520	0,217
W14	5,47	727	0,334
W16	7,92	866	0,299
W20	8,74	852	0,296

Tabelle 33 Mediane Medikationsgruppe – Assayergebnisse

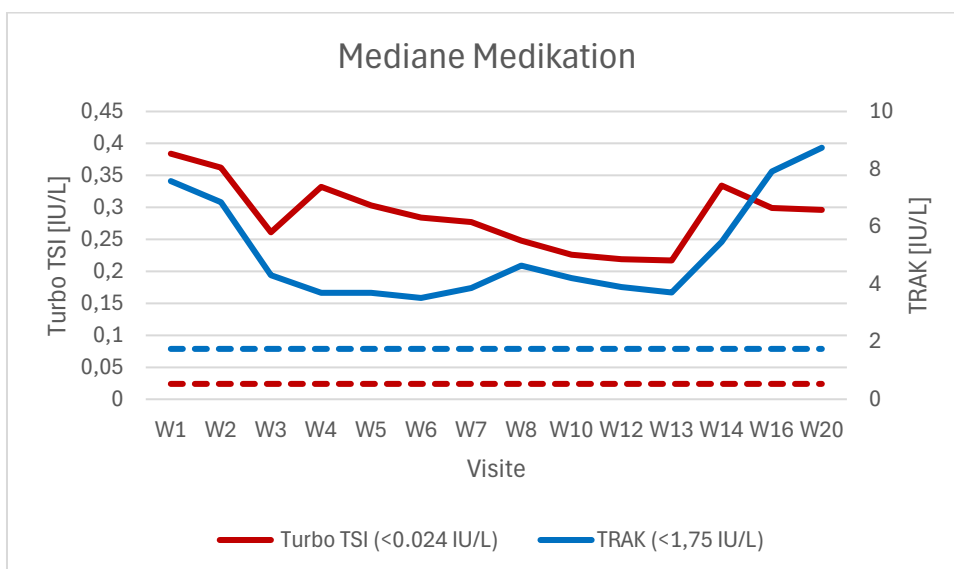


Abbildung 31 Mediane Medikation - TRAK und Turbo TSI

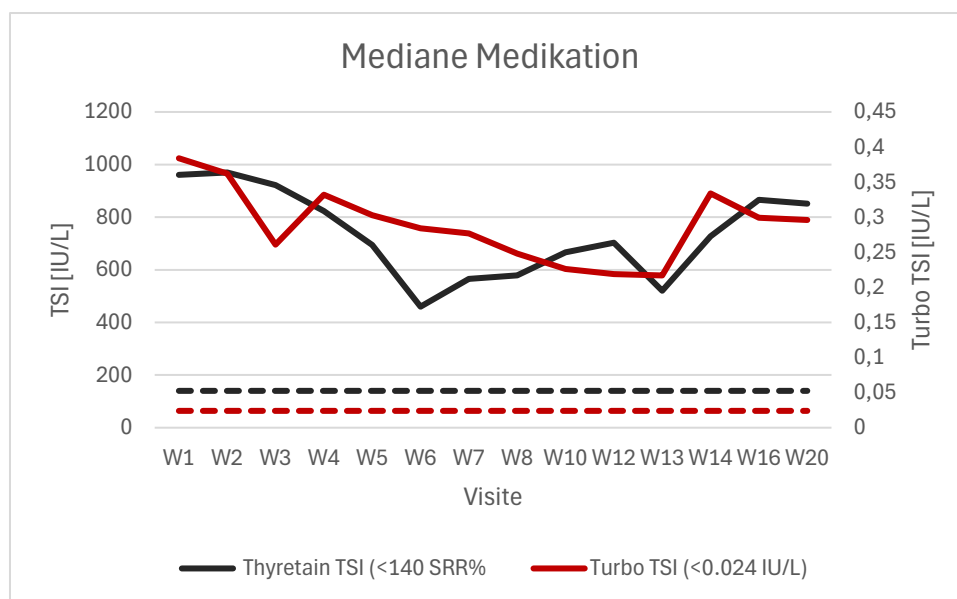


Abbildung 32 Mediane Medikationsgruppe - TSI und Turbo TSI

In der Medikationsgruppe verdeutlichen die Mediane die zuvor beschriebenen Beobachtungen. Alle drei Assays zeigen vergleichbare Ergebnisse. Während der Gabe des monoklonalen Antikörpers bis Woche 13 sinken die Antikörpertiter, nach Absetzen der Studienmedikation steigen sie wieder an.

4.3 Assayverläufe

4.3.1 Deskriptive Statistik

Zum Testen, ob die Gabe der Studienmedikation die Serologie beeinflusst und wie sich dies in den jeweiligen Assays abzeichnet, ist es interessant, sich die prozentuale Veränderung der Assays zwischen zwei Zeitpunkten anzuschauen. Als primärer Endpunkt wird die Woche 13 gewählt, also die Visite nach Gabe der letzten Medikation in Woche 12. Ebenso wird die Baseline im Vergleich zur Woche 7, eine Woche nach Gabe der Hälfte der Medikationsgaben betrachtet. Die prozentuale Änderung zwischen der Baseline und den zwei Zeitpunkten während und nach der Behandlung und der jeweiligen Vergleiche von Baseline zu Ende der Follow Up Phase in Woche 20 und die Änderung von Anfang Follow Up bis Ende Follow Up Phase werden untersucht. Dabei wird das Kollektiv auf die $n=21$ Patienten reduziert, welche die Studie im vollen Umfang abgeschlossen haben.

Die Mediane aller drei Assays zeigen eine Abnahme der Titer sowohl bis Woche 13 als auch bis Woche 20. Das bestätigt die zuvor gesehene graphische Darstellung der Mediane. Die Mediane der prozentualen Wertveränderungen zeigen hier eine leichte Abnahme über die Zeit der Studie. Interessant ist es nun, diese Gruppe mit der Gruppe der Studienmedikation zu vergleichen.

Placebo	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BLW7_TRAK	-13,73	12,13	-23,48	-0,06
BLW13_TRAK	-18,56	40,65	-40,26	-7,9
BLW20_TRAK	-25,1	26,21	-61,02	-9,71
W13W20_TRAK	-8,04	27,53	-28,45	8,49

Tabelle 34 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - TRAK Placebo

Medikation	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BLW7_TRAK	-54,065	26,80	-79,71	-21,77
BLW13_TRAK	-67,95	19,05	-80,06	-46,92
BLW20_TRAK	-39,80	31,01	-60,92	-12,47
W13W20_TRAK	90,75	91,15	26,345	179,1625

Tabelle 35 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - TRAK Medikation

Der TRAK beschreibt in der Gruppe Placebo eine leichte Abnahme der Titer über den Studienzeitraum. Dies wurde zuvor schon beschrieben. In der Medikationsgruppe zeigt sich im Vergleich eine deutlichere Abnahme über die Gabe der Medikation mit einem gleichzeitigen Wiederanstieg der TRAK nach Absetzen der Studienmedikation (W13 zu W20). Trotz Anstieg während der Follow Up Phase sind die Werte in Woche 20 im Median niedriger als die Ausgangswerte.

Placebo	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BLW7_TSI	0	14,48	-7,41	12,19
BLW13_TSI	-44,5	27,54	-48,54	7,52
BLW20_TSI	-13,72	27,68	-39,42	2,105
W13W20_TSI	17,64	51,95	-17,21	45,10

Tabelle 36 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - TSI Placebo

Medikation	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BLW7_TSI	-48,40	30,40	-67,40	-9,70
BLW13_TSI	-63,88	32,05	-80,67	-20,4
BLW20_TSI	-15,64	21,03	-28,39	-7,53
W13W20_TSI	141,20	435,62	7,26	235,80

Tabelle 37 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - TSI Medikation

Der Verlauf des TSI liefert im Median ähnliche Ergebnisse wie TRAK.

Placebo	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BLW7_Turbo	-23,32	29,29	-40,47	-14,49
BLW13_Turbo	-38,08	18,73	-49,19	-11,35
BLW20_Turbo	-49,49	25,58	-57,67	-8,50
W13W20_Turbo	-12,17	28,60	-32,56	2,14

Tabelle 38 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - Turbo TSI Placebo

Medikation	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BLW7_Turbo	-78,09	32,80	-90,66	-49,82
BLW13_Turbo	-76,26	38,80	-92,77	-52,78
BLW20_Turbo	-30,02	29,88	-55,55	-3,80
W13W20_Turbo	130,25	375,39	32,07	354,01

Tabelle 39 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - Turbo TSI Medikation

Auch die Werte des Turbo TSI stimmen mit den Ergebnissen der anderen beiden Assays überein. Eine leichte Abnahme der Werte in der Placebogruppe und im

Vergleich dazu eine relativ stärkere Abnahme der Werte während Woche 1 bis 13 bzw. sogar bis Woche 20 ist deutlich zu erkennen. Im Vergleich zur Placebogruppe ist auch eindrücklich, wie in der Medikationsgruppe die Werte während der Follow Up Phase wieder steigen. Den Nadir stellt somit die Visite nach 12maliger Gabe des monoklonalen Antikörpers dar.

Da der Turbo TSI das Hauptaugenmerk der Arbeit darstellt wurden hier erneut deskriptive Statistiken für die Aufteilung der Medikationsgruppe in ihre einzelnen Dosierungen durchgeführt.

255mg	Median	Standardabweichung
BLW7_Turbo	-47,61	35,08
BLW13_Turbo	-50,25	45,63
BLW20_Turbo	-2,84	12,67
W13W20_Turbo	90,73	66,45

Tabelle 40 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - Turbo TSI 255mg Gruppe

340mg	Median	Standardabweichung
BLW7_Turbo	-78,79	30,79
BLW13_Turbo	-75,12	38,77
BLW20_Turbo	-41,17	32,72
W13W20_Turbo	36,23	88,92

Tabelle 41 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - Turbo TSI 340mg Gruppe

680mg	Median	Standardabweichung
BLW7_Turbo	-91,34	7,23
BLW13_Turbo	-92,36	7,98
BLW20_Turbo	-33,36	30,48
W13W20_Turbo	616,80	420,88

Tabelle 42 Deskriptive Statistik - Assayverläufe - Turbo TSI 680mg Gruppe

Teilt man die Medikationsgruppe in ihre Einzeldosierungen auf und vergleicht die Verläufe des Turbo TSI, wird sichtbar, wie sich die Steigerung der Dosis scheinbar auf eine stärkere Abnahme der Antikörpertiter auswirkt. Gleichzeitig ist die relative Zunahme Woche 13 bis Woche 20 stärker, je höher die Dosierung und je höher die vorherige Abnahme war.

4.3.2 Vergleich der Gruppen – Mann-Whitney-U Test

4.3.2.1 Wahl des statistischen Tests

Aufgrund der geringen Gruppengröße (Placebo n=9; Medikation n=12) erübrigt sich ein Test auf Normalverteilung. Zum paarweisen Vergleich der Verläufe der Visiten muss ein nicht parametrischer Test, der Mann-Whitney-U Test, erfolgen.

Bei einer Aufteilung in die einzelnen Medikationsdosen ergeben sich so kleine Gruppengrößen ($n < 6!$), dass eine Testung mittels statistischen Tests keine Aussagekraft hat. So muss die Medikationsgruppe in ihrer Gesamtheit erfasst werden und kann in der Dosisaufteilung nur deskriptiv (siehe Tabellen 40-42) betrachtet werden.

4.3.2.2 Statistische Tests

Tabelle 45 zeigt die Ergebnisse des Mann-Whitney-U Tests.

p-Werte	BL-W7	BL-W13	BL-W20	W13-W20
TRAK	<0,001	0,017	0,750	<0,001
TSI	<0,001	0,028	0,820	0,039
Turbo TSI	0,004	0,015	0,656	0,002

Tabelle 43 Mann-Whitney-U Test und t-Test Assayverläufe

Der Mann-Whitney-U Test testet zwei unabhängige Gruppen auf signifikante Unterschiede bei einem gewählten Signifikanzniveau von $p=0,05$.

Dabei gilt folgende **Nullhypothese H₀**: Es gibt *keinen* Unterschied im Verlauf der Werte zwischen den Behandlungsgruppen.

Und folgende **Alternativhypothese**: Es gibt *einen* Unterschied im Verlauf der Werte zwischen den Behandlungsgruppen.

Alle drei Assays liefern passende Ergebnisse unter der Annahme, dass die Studienmedikation zur Abnahme der Antikörpertiter führt. Vergleicht man die Placebogruppe (n=9) mit der Medikationsgruppe (n=12), so zeigen sich deutlich signifikante Unterschiede. Schon nach der Hälfte der Medikationsgabe (Woche 7) zeigt sich eine signifikante Reduktion der Antikörper in TRAK, TSI und Turbo TSI. Dies ist auch im Vergleich Baseline zu Woche 13 nach Erhalt aller 12 Medikationsgaben signifikant. Die Patientengruppe, die die Medikation erhalten hat, zeigt einen signifikant stärkeren Anstieg der TRAK und TSI-Titer während der Follow Up Phase als die Placebogruppe. Vergleicht man Ausgangswert und den Wert am Ende der Studie in Woche 20 miteinander, ist dies nicht signifikant. Insgesamt steigen die Werte im Durchschnitt wieder in Richtung des Ausgangsniveaus.

Im folgenden Abschnitt 4.4 werden erneut die absoluten Werte der Visiten gegeneinander geprüft, um aus einer anderen Perspektive einen möglichen Effekt der Medikation zu zeigen.

4.4 Vergleich der Visiten

Neben dem zuvor gewählten Parameter der prozentualen Veränderung des Assaywerts im Verlauf der Schlüsselvisiten werden die Ergebnisse jetzt wieder mittels direktem Visitenvergleich innerhalb der Gruppe dargestellt. Dabei werden die absoluten Werte der Schlüsselvisiten hier nun innerhalb der gleichen Gruppe miteinander verglichen.

4.4.1 Deskriptive Statistik

4.4.1.1 Placebo

Placebo	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BL_TRAK	9.22	47.03	2,78	20,69
W7_TRAK	7.43	33.10	2,70	16,72
W13_TRAK	5.96	38.34	2,57	13,40
W20_TRAK	3.65	35.47	1,75	11,14

Tabelle 44 Deskriptive Statistik - Visiten – Placebo – TRAK

Placebo	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BL_TSI	936.00	263.09	706.00	1027.50
W7_TSI	931.00	298.95	645.50	1082.50
W13_TSI	582.00	327.97	369.50	1008.00
W20_TSI	786.00	329.08	330.50	922.50

Tabelle 45 Deskriptive Statistik - Visiten - Placebo - TSI

Placebo	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BL_Turbo	0.493	3.35	0.314	3.805
W7_Turbo	0.401	2.81	0.186	3.258
W13_Turbo	0.417	2.95	0.163	3.105
W20_Turbo	0.249	2.68	0.116	3.462

Tabelle 46 Deskriptive Statistik - Visiten - Placebo - Turbo TSI

Betrachtet man den Verlauf des Medians innerhalb der Placebogruppe, ist auch hier ein abnehmender Trend zu beobachten.

4.4.1.2 Medikation

Medikation	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BL_TRAK	7.43	12.59	2.22	24.51
W7_TRAK	2.61	8.98	1.17	6.46
W13_TRAK	2.19	7.23	0.84	4.85
W20_TRAK	4.89	7.32	1.45	10.81

Tabelle 47 Deskriptive Statistik - Visiten –Medikation - TRAK

Medikation	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BL_TSI	974.00	334.01	431.50	1064.50
W7_TSI	511.50	375.49	176.25	945.25
W13_TSI	274.50	377.37	154.50	845.75
W20_TSI	765.00	272.08	415.75	858.75

Tabelle 48 Deskriptive Statistik - Visiten –Medikation - TSI

Medikation	Median	Standardabweichung	25. Perzentile	75. Perzentile
BL_Turbo	0.815	2.44	0.072	3.994
W7_Turbo	0.178	1.73	0.029	0.412
W13_Turbo	0.133	1.92	0.035	0.272
W20_Turbo	0.299	1.61	0.050	2.220

Tabelle 49 Deskriptive Statistik - Visiten –Medikation - Turbo TSI

Die Mediane der Ergebnisse aller drei Assays passen zu einer Reaktion der Antikörper auf die Studienmedikation. Bis Woche 13 nehmen die TRAK bzw. TSI im Serum ab, nach Ende der Medikationsgabe steigen die Werte wieder an.

4.4.2 Vergleich der Gruppen

4.4.2.1 Wahl des statistischen Tests

Auch hier muss aufgrund der geringen Gruppengröße ein nicht parametrischer Test gewählt werden. Um Auswirkungen der Studienmedikation auf die gemessenen Antikörper zu überprüfen, werden innerhalb jeder Gruppe die Visiten W7, W13 und W20 gegen die Baseline auf signifikante Unterschiede getestet. Für die Testung auf Signifikanz der Daten erfolgt der Friedman Test, da die Variablen der gleichen Patienten über mehrere Zeitpunkte miteinander verbunden sind.

4.4.2.1.1 TRAK

Da die Daten des TRAK nicht normalverteilt sind, erfolgt die Testung mittels nicht parametrischem Friedman Test.

TRAK Friedman Test	Medikation	Placebo
BL W7	,009	1,0
BL W13	,000	,064
BL W20	,239	,011
W13 W20	,027	,407

Tabelle 50 TRAK - Visiten – Friedman Test

Die Daten des TRAK liefern signifikante Unterschiede zwischen BL und W7 und W13, wieder als Reaktion auf die Studienmedikation zu werten. Ebenso ist der Vergleich W13 zu W20 signifikant. Das Absetzen der Studienmedikation führt zum Wiederanstieg der Titer. Auch in der Placebogruppe gibt es Signifikanzen. Diese können nicht durch die Studienmedikation bedingt sein, während der Placebogabe zeigen sich auch keine signifikanten Unterschiede, allerdings ist der Vergleich Baseline zu Woche 20 in dieser Gruppe signifikant. Wie zuvor beschrieben, nehmen die Titer der Placebogruppe auch ohne die Studienmedikation ab, was ein Grund dieses Ergebnisses sein könnte.

4.4.2.1.2 TSI

Auch hier erfolgt die Testung mittels Friedman Tests.

TSI Friedman Test	Medikation	Placebo
BL W7	,016	1,000
BL W13	,000	,331
BL W20	,106	1,000
W13 W20	,106	1,000

Tabelle 51 TSI - Visiten – Friedman Test

Der Friedman Test bei den TSI-Daten zeigt keine Signifikanzen im Visitenvergleich der Placebogruppe. Bei der Gruppe, die die Medikation erhalten hat, zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der Baseline und Woche 7 und 13, dies passt zur in den Assayverläufen schon gesehenen Reaktion auf die Studienmedikation.

4.4.2.1.3 Turbo TSI

Auch hier erfolgt die Testung mittels Friedman Test, da die Daten des Turbo TSI nicht normalverteilt sind.

Turbo TSI Friedman Test	Medikation	Placebo
BL W7	,002	,171
BL W13	,003	,021
BL W20	,492	,000
W13 W20	,492	1,000

Tabelle 52 Turbo TSI - Visiten - Friedman Test

In der Medikationsgruppe zeigen sich auch in den Daten des Turbo TSI erwartete Signifikanzen zwischen Woche 7 und 13 zur Baseline. Damit schließt er sich den Ergebnissen der anderen beiden Assays an. Allerdings zeigen sich hier in der Placebogruppe auch Signifikanzen, die durch die Studie nicht erwartet werden. Im Visitenvergleich zeigt sich ein signifikanter Unterschied in den Visiten Woche 13 und 20 zur Baseline. Die Abnahme der Antikörper in der Placebogruppe, die zuvor schon beschrieben wurde, führt hier wahrscheinlich zu dem Ergebnis.

4.5 Korrelationen

Um zu prüfen, inwiefern die Werte des Turbo TSI mit Ergebnissen etablierter Assays korrelieren, dient die Spearman Korrelation. Dabei interessiert der Vergleich der Korrelationen zwischen den Proben der Gruppen alle Patienten, Placebo und Medikationsgruppe.

Test auf Normalverteilung

Test auf Normalverteilung	Shapiro-Wilk-Signifikanz
TRAK, n=426	<0,001
TSI, n=426	<0,001
Turbo TSI, n=426	<0,001
CAS, n=273	<0,001
Exophthalmus, n=273	<0,001
Lidretraktion, n=273	<0,001

Tabelle 53 Normalverteilung Assaydaten gesamt

Die Daten sind nicht normalverteilt, deshalb erfolgt die Korrelation mittels Spearman Test. Getestet werden alle n=426 Daten.

TSI vs. Turbo TSI	Spearman
Korrelationskoeffizient	0,679
p-Wert	<0,001
n	426

Tabelle 54 Korrelation TSI vs. Turbo TSI

TRAK vs. Turbo TSI	Spearman
Korrelationskoeffizient	0,643
p-Wert	<0,001
n	426

Tabelle 55 Korrelationen TRAK vs. Turbo TSI

TSI vs. TRAK	Spearman
Korrelationskoeffizient	0,662
p-Wert	<0,001
n	426

Tabelle 56 Korrelationen - TSI und TRAK

Die Stärke der Korrelation wird bei Spearman oft wie folgt interpretiert:

$|\rho| < 0,2$ = sehr schwach

$0,2 \leq |\rho| < 0,4$ = schwach

$0,4 \leq |\rho| < 0,6$ = mittelstark

$0,6 \leq |\rho| < 0,8$ = stark

$|\rho| \geq 0,8$ = sehr stark

Bei Spearman zeigen alle drei Assays mit einem p-Wert $<0,001$ einen Korrelationskoeffizient im Bereich $0,6 \leq |\rho| < 0,8$, was bei einer Spearman Korrelation als starke Korrelation interpretiert wird. Sowohl die *Bioassays untereinander* als auch *zum Bindungsassay* korrelieren *stark*.

Von den 21 Patienten, die die Studie im vollen Design durchgeführt haben, wird hier die Korrelation zwischen den gewählten klinischen Parametern CAS, Lidretraktion, Exophthalmus untereinander und zu den drei Assays getestet. Verwendet wird hierfür der Spearman Test auf Korrelationen, da die Daten nicht normalverteilt sind. Getestet wird hier die zweiseitige Signifikanz mit einem Signifikanzniveau von 0,05. Getestet wurden n=273 Daten.

n=273	CAS	Lidretraktion	Exophthalmus
TRAK	$\rho=0,273$ $p<0,001$	$\rho=0,124$ $p=0,042$	$\rho=0,356$ $p<0,001$
Thyretain TSI	$\rho=0,418$ $p<0,001$	$\rho=0,024$ $p<0,699$	$\rho=0,506$ $p<0,001$
Turbo TSI	$\rho=0,494$ $p<0,001$	$\rho=-0,064$ $p<0,300$	$\rho=0,654$ $p<0,001$

Tabelle 57 Spearman Korrelation Assays zu klinischen Parametern

So zeigt der **TRAK** eine *schwache* Korrelation mit **CAS** und **Exophthalmus** und eine *sehr schwache* Korrelation mit der **Lidretraktion**.

Der **TSI Bioassay** zeigt eine *mittelstarke* Korrelation mit **CAS** und **Exophthalmus**.

Der **Turbo TSI Bioassay** zeigt eine *mittelstarke* Korrelation mit **CAS** und eine *starke* Korrelation mit dem **Exophthalmus**.

Alle drei Assays zeigen keine gute Korrelation mit der Lidretraktion, allerdings zeigen alle Assays eine Korrelation mit CAS und Exophthalmus. Der Turbo TSI zeigt die stärkste Korrelation mit den klinischen Parametern.

4.6 Diskordante Proben

Von den 426 untersuchten Proben stimmen die Ergebnisse der Assays (positiv oder negativ) in 328 (77,0%) der Proben überein. 98 (23,0%) der Proben zeigen diskordante Ergebnisse. Davon ergeben sich 81 (19,0%) Proben, die im TRAK negativ und in Thyretain und Turbo TSI positiv sind. Dies ergibt sich durch die höhere Sensitivität der Bioassays gegenüber dem Bindungsassay.

Nur 17 Proben (4,0%) sind im Turbo TSI und TSI diskordant.

TRAK (<1,75 IU/L)	Thyretain TSI (<140 SRR%)	Turbo TSI (<0,024 IU/L)	Anzahl der Proben
-	+	+	81 (19,0%)
-	-	+	7 (1,6%)
+	-	+	5 (1,2%)
+	-	-	3 (0,7%)
+	+	-	3 (0,7%)

Tabelle 58 Diskordante Proben

Vor allem interessant sind dabei die Proben, die im TRAK positiv erkannt wurden, in den Bioassays aber negativ waren. Dies passt nicht zu den zuvor beschriebenen Erkenntnissen, da der TRAK nicht so sensitiv wie die Bioassays ist und es nicht ganz erklärbar ist, warum Proben vom Bindungsassay erkannt werden, von den Bioassays aber nicht.

4.7 Sensitivität

Untersucht wurden 426 Proben von Patienten mit einem bekannten Morbus Basedow und EO.

Positiv erkannt wurden von **TRAK 323 Proben = 75,82%**, von **TSI 399 Proben = 93,66%** und von **Turbo TSI 409 Proben = 96,00%**.

Der Turbo TSI Assay hatte in dem Kollektiv mit **96,0%** die höchste Sensitivität, ähnlich dem TSI Bioassay. Beide zeigen einen deutlichen Unterschied zum TRAK, welcher deutlich mehr Proben negativ gemessen hat.

Die 17 Proben, die im Turbo TSI negativ waren, sollen nun genauer betrachtet werden.

Acht Proben von Patient 12 (high dose) während der Gabe der Studienmedikation; weitere acht von Patient 26 (auch high dose während der Medikationsgabe und eine von Patient 27 (low dose). So sind fast alle Proben, die im Turbo TSI negativ gemessen wurden von Patienten, die die höchste Dosis der Studienmedikation bekommen und mit vergleichsweise niedrigem Turbo TSI Ausgangswert gestartet sind. Anhand des getesteten Kollektivs kann man von einer sehr hohen Sensitivität des Turbo TSI Assays ausgehen.

Die Proben, die im TRAK negativ gemessen wurden, stammen alle von Patienten, die die Studienmedikation bekommen haben. Dabei gibt es zwei Patienten (einmal aus der Hochdosis-, ein weiteres Mal aus der Niedrigdosisgruppe), die schon vor Beginn der Studie negative TRAK-Werte hatten, welche im Verlauf der Studie negativ blieben. Die anderen Proben stammen zweimalig von Patienten der 680mg Gruppe, drei

weitere Male aus der 340mg Gruppe, bei diesen sinken die TRAK-Werte ab Woche 2 oder 3 unter den Cut Off von 1,75 IU/l.

5 Diskussion

5.1 Turbo TSI als Biomarker für Morbus Basedow

Ziel dieser Dissertation war es, den Turbo TSI Assay auf seinen klinischen Nutzen zu überprüfen. Betrachtet wird dazu anhand des untersuchten Kollektivs zum einen das Verhalten der Werte aller Patienten im 20-wöchigen Studienzeitraum, wobei die Unterschiede der drei Medikationsdosen und der Placebogruppe als Vergleichskriterium interessant sind. Zusätzlich wurden klinische Parameter wie der CAS oder die Ausprägung des Exophthalmus herangezogen, um den Zusammenhang der Assayergebnisse zum klinischen Befund zu betrachten. Zur weiteren Beurteilung dient der Vergleich mit dem Bindungsassay TRAK, welcher klinisch schon Routine ist, und dem Bioassay Thyretain TSI, welcher im Ablauf Ähnlichkeiten zum Turbo TSI hat und in vergangenen Studien schon gute Ergebnisse vorgewiesen hat.

5.1.1 Verhalten des Turbo TSI auf die Studienmedikation

Während den ersten 12 Wochen der Studie bekamen die Patienten wöchentlich die Medikation mittel subkutaner Injektion. Da diese zum Abbau der Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor führen soll, ist eine Abnahme der gemessenen TSI zu erwarten. Um einen Effekt der Studienmedikation zu beschreiben, sind in dieser Arbeit zwei Ansätze gewählt: 1) das prozentuale Verhalten der Assays zwischen den Schlüsselvisiten 2) die absoluten Werte der Schlüsselvisiten. Um dabei alle Patienten der gleichen Gruppe als Gesamtheit darzustellen, werden die Mediane der jeweiligen Gruppe genutzt.

5.1.1.1 Assayverläufe

Alle drei untersuchten Assays zeigen in der Placebogruppe einen leicht abfallenden Trend während des gesamten Studienzeitraums. Dabei erreicht der Vergleich Baseline zu Woche 20 prozentuale Abnahmen bis zu -49,49% im Turbo TSI Assay. TSI (-13,72%) und TRAK (-25,1%) zeigen eine eher moderatere Reduktion ihrer Titer von Woche 1 bis 20. Im Vergleich zur Medikationsgruppe, bei welcher nach Absetzen der Medikation nach Woche 12 ein deutlicher Wiederanstieg der Titer während der Follow Up Phase zu sehen ist, ist bei der Placebogruppe von Woche 1 bis 20 eine leichte Abnahme der Werte zu betrachten. Der Anstieg der Assaywerte von W13 bis W20 in der Medikationsgruppe zeigt mit bis zu +130,25% im Turbo TSI in etwa eine Verdopplung aller drei Assays in ihren Werten W13 bis W20. Je stärker der Abfall der Titer (siehe 680mg Gruppe Turbo TSI), desto stärker der prozentuale Wiederanstieg. Trotz des Anstiegs bleiben die Titer in Woche 20 in jeder Gruppe und jedem Assay unterhalb des Ausgangsniveaus.

Außer des Wiederanstiegs zeigt die Medikationsgruppe in allen drei Assays eine deutliche Reaktion auf die Studienmedikation. Schon in Woche 7 ist ein signifikanter Abfall der Antikörpertiter zu sehen, ebenso nach Ende der Medikation in Woche 13. Der Paarvergleich Medikation vs. Placebo im Mann-Whitney-U Test zeigt signifikante Unterschiede (auf einem Signifikanzniveau von 0,05) im Vergleich BL zu W7, BL zu

W13 und W13 zu W20. Der Vergleich BL zu Woche 20 ist nicht signifikant, da die Placebogruppe im gesamten leicht sinkt und dieser negative Trend in der Reduktion ähnlich der Medikationsgruppe nach Wiederanstieg in der Follow Up Phase ist.

Die Aufteilung der Medikationsgruppe in ihre drei Einzeldosierungen führt zu geringen Gruppengrößen, was die statistische Aussagekraft so verringert, dass keine Tests auf Signifikanzen sinnvoll sind. Betrachtet man die deskriptive Statistik, ist allerdings erkennbar, dass eine Steigerung der Medikationsdosis scheinbar zu einer stärkeren Abnahme der Antikörpertiter führt. Gleichzeitig steigt mit höherer Dosis der prozentuale Wiederanstieg während der Follow Up Phase.

5.1.1.2 Schlüsselvisiten

Die Betrachtung der absoluten Werte führt zu ähnlichen Beobachtungen wie bei den Assayverläufen. In der Placebogruppe zeigt sich in allen drei Assays ein abnehmender Trend. In der Medikationsgruppe zeigt sich eine starke Abnahme der Titer zwischen BL und Woche 7 und Woche 13 und ein Wiederanstieg von Woche 13 bis Woche 20. Betrachtet man die Standardabweichungen, fällt auf, dass der TSI Bioassay die niedrigsten Standardabweichungen aufweist. Obwohl der Assay bei der Betrachtung der einzelnen Patienten im graphischen Verlauf als eher sprunghaft aufgefallen ist, ist er im Kollektiv der Schlüsselvisiten der Assay mit am wenigsten Variabilität. Bei Betrachtung der jeweiligen Perzentile ist aber bei den Werten von TRAK und Turbo TSI trotz hoher Standardabweichung der Trend in der 25. und 75. Perzentile übereinstimmend mit den beschriebenen Beobachtungen des Medians.

Die Ergebnisse des Friedman Tests zeigen in allen drei Assays in der Medikationsgruppe signifikante Unterschiede zwischen Baseline und Woche 7 und zwischen Baseline und Woche 13. Die Reduktion der Titer durch die Studienmedikation ist somit auch durch den Friedman Test bestätigt, allerdings zeigt sich hier nur beim TRAK Bindungsassay auch ein signifikanter Unterschied im Vergleich Beginn und Ende der Follow Up Phase.

Die Abnahme der TRAK und Turbo TSI-Titer in der Placebogruppe scheint teilweise so stark zu sein, dass der Friedman Test bei TRAK und Turbo TSI Signifikanzen zwischen Baseline und Woche 20 zeigt, obwohl sie keine Medikation erhalten haben, die sich auf die Antikörpertiter auswirkt. Zum einen kommt eine spontane Besserung während der Studienzeit oder z.B. Schwankungen der Assaywerte in Betracht. Ein Abfall der Titer aufgrund thyreostatischer Medikation oder Substitution mit L-Thyroxin ist nicht anzunehmen.

Von allen 21 Patienten spricht nur Patient 9 aus der 255mg Gruppe nicht serologisch auf die Studienmedikation an. Bei diesem kommt es auch klinisch zu einer Verschlechterung, sodass während der Follow Up Phase bei ihm Methylprednisolon und Myfortic eingesetzt wurde. Die Glukokortikoide sind serologisch allerdings eindeutig sichtbar. Eine Besserung der TRAK und TSI-Titer nach Glukortikoidgabe wurde in der Literatur bereits beschrieben, der Turbo TSI schließt sich im hiesigen Beispiel der Reaktion an.

Einige Patienten, vor allem aus der 680mg Gruppe, reagieren so deutlich auf die Studienmedikation, dass der TRAK unter den Cut-off fällt (Pat 4), während die Bioassays positiv bleiben. Andere Patienten (bspw. Patient 12) reagieren mit ihren

Antikörpertitern so stark auf die Medikation, dass sogar der Turbo TSI negative Ergebnisse liefert.

Die Daten des Turbo TSI sind im Verhalten der Serologie auf die Studienmedikation stimmig und im gesamten übereinstimmend mit den Ergebnissen des TRAK Bindungsassays und TSI Bioassays. Es ist anzunehmen, dass der Turbo TSI Assay die Serologie gut widerspiegelt und Steigerung der Dosis zu einer stärkeren Abnahme der Antikörper führt, welche vom Turbo TSI Assay eindeutig detektiert wird.

5.1.2 Sensitivität und Diskordanzen

Im untersuchten Kollektiv hat der Turbo TSI die höchste Sensitivität gezeigt. Im Vergleich zum Thyretain TSI hat er 10 Proben mehr als positiv erkannt als der TSI Bioassay. Er scheint somit in der Sensitivität vergleichbar bis besser als der TSI Bioassay zu sein. Wie zuvor schon erwähnt, wurden Bioassays in der Literatur schon mehrfach als sensitiver im Vergleich zum klassischen Bindungsassay beschrieben. Dies bestätigt sich im untersuchten Kollektiv. Der TRAK hat mit einer Sensitivität von 75,82% mehr als 80 Proben negativ getestet, die im Turbo TSI positiv waren. Die hohe Sensitivität der Bioassays scheint also auch für den Turbo TSI zu gelten. Trotzdem gab es Proben, die in TRAK und/oder Thyretain TSI positiv waren, die der Turbo TSI als negativ gewertet hat. Diese Zahl beschränkt sich auf $n=6$ (1,4%) und ist somit überschaubar. Dennoch garantiert auch Turbo TSI keine 100%ige Sensitivität. Zu erwähnen ist, dass die Proben, die im Turbo TSI negativ gemessen wurden, bis auf eine Ausnahme von Patienten während der Medikationsgabe der *höchsten* Dosierung entstammen.

Die Ergebnisse des untersuchten Kollektivs lassen darauf schließen, dass der Turbo TSI Assay ein hoch sensibler Assay und ebenso sensitiv bis sensitiver als der genutzte TSI Bioassay ist. Beide Bioassays sind in den Ergebnissen des Kollektivs deutlich sensitiver als der Bindungsassay. Die hohe Sensitivität des Turbo TSI bietet einen Vorteil in der Diagnostik, der bislang von etablierten Bioassays bekannt ist, welche in der Durchführung allerdings deutlich aufwendiger als Bindungsassays waren. Der Turbo TSI bietet eine schnell durchführbare Alternative und könnte somit besser in der klinischen Routine eingesetzt werden. So könnten von Turbo TSI auch mildere Verläufe detektiert werden. Dadurch könnten Patienten, die das Risiko einer Exazerbation der Krankheit oder der Entwicklung einer EO, frühzeitig therapiert und die Ergebnisse des Assays zu einer Verbesserung der Therapieentscheidung genutzt werden. Auf der anderen Seite könnte die höhere Sensitivität des Turbo TSI auch zu mehr falsch positiven Ergebnissen führen.

5.1.3 Korrelation des Turbo TSI zu Thyretain TSI und TRAK

Auch TRAK und der TSI Bioassay zeigen eindeutige Reaktionen auf die Studienmedikation. Ebenso zeigen alle drei Assays in der Placebogruppe eine tendenzielle Abnahme der Titer. Die Ergebnisse aller drei Assays sind also im untersuchten Kollektiv mit geringen Unterschieden im Trend übereinstimmend. Dabei ist vor allem die höhere Sensitivität der beiden Bioassays ein relevanter Unterschied. Im Vergleich TSI und Turbo TSI zeigen sich keine großen Unterschiede. Manche Verläufe des TSI Assays sind in der graphischen und tabellarischen Darstellung mit etwas mehr Schwankungen gekennzeichnet als die Daten des Turbo TSI, allerdings stimmen beide Bioassays im gesamten gut überein. Sowohl zum TRAK Bindungsassay als auch zu Thyretain TSI zeigt sich im untersuchten Kollektiv eine starke Korrelation der Ergebnisse im Spearman Test. Der Turbo TSI schließt sich in

seinem Trend beiden Assays an und sticht im Vergleich zum TSI Bioassay positiv durch geringere Wertschwankungen bei Betrachtung der einzelnen Patienten hervor.

5.1.4 Verhalten des Turbo TSI zu klinischen Parametern

Im untersuchten Kollektiv findet man Patientenverläufe, bei denen die hier gewählten klinischen Parameter CAS, Exophthalmus und Lidretraktion gut zur Serologie passen. Die Parameter dienen als Orientierung zum klinischen Befinden des Patienten und beziehen sich auf die Ausprägtheit der endokrinen Orbitopathie. Diese stellen eine Punktaufnahme zum Tag der stattgefundenen Visite dar und sind beim direkten Vergleich von zwei Zeitpunkten anfällig für Verzerrungen. Viele der Verläufe korrelieren gut mit den Ergebnissen der Assays, was annehmen lässt, dass die Ergebnisse sowohl des TRAK als auch der beiden Bioassays im klinischen Setting für Therapieverlauf und Therapieentscheidungen zu Rate gezogen werden können. Allerdings korreliert die Serologie nicht immer fehlerfrei mit dem klinischen Befinden der Patienten.

Um einige Beispiele wieder aufzugreifen, ist z.B. bei Patient 22 aus der Placebogruppe trotz im gesamten hochbleibender Assaywerte ein Rückgang des CAS von 4 auf 1 zu sehen. Der Patient hat während des Studienzeitraums eine thyreostatische Therapie (Thiamazol 10mg) erhalten, was eine Ursache für den Rückgang des CAS sein könnte. Die Werte der Assays nehmen bei diesem Patienten zwar auch ab, bleiben allerdings hochpositiv. Im Trend ist die Korrelation Serologie zu Klinik zwar gegeben, bei Betrachtung der absoluten Werte, könnten die Assaywerte aber den klinischen Zustand falsch widerspiegeln. Bei Patient 16 zeigt die Serologie zwar eine eindeutige Reaktion auf die Studienmedikation und die Titer der Assays fallen, die klinischen Parameter bleiben allerdings auf einem gleichen Niveau. Bei Patient 17 zeigt die Serologie ebenfalls eine Abnahme während der Medikationsgabe, der CAS verschlechtert sich aber sogar.

Die Beispiele, bei denen Serologie und die gewählten klinischen Parameter vor allem aber in Bezug auf den CAS gut miteinander übereinstimmen, überwiegen. So zeigen Patient 3 und 4 eine Abnahme sowohl der Antikörper als auch des CAS während der Medikationsgabe und einen Anstieg beider Parameter während der Follow Up Phase. Patient 9 spricht serologisch nicht auf die Medikation an und verschlechtert sich deutlich in seinem Zustand, nach Gabe von Glukokortikoiden bessern sich sowohl TRAK, TSI als auch CAS. Bei Patient 14 wird der TRAK sogar negativ, Patient 12 fällt mit den Werten in allen drei Assays unter den jeweiligen Cut-off. Beide Patienten reagieren serologisch sehr eindrücklich, auch der CAS sinkt bei beiden Patienten sehr stark und bleibt niedrig.

Im untersuchten Kollektiv zeigt sich kein eindeutiger Vorteil der Bioassays in Bezug auf die klinische Korrelation. Patient 29 ist in diesem Bezug erneut zu erwähnen, da bei diesem Patienten der TRAK hochpositiv bleibt, die Bioassays aber eher niedrigere Werte aufweisen, was mehr mit der mit der Klinik des Patienten übereinstimmt. Bei Patient 17 bleiben zwar TRAK und Turbo TSI auch hochpositiv, im Trend reagieren sie aber deutlich auf die Studienmedikation und sinken. Der TSI Assay bleibt auf einem Niveau, der CAS verschlechtert sich etwas. In dem Beispiel trifft also der TSI Assay etwas besser zu den klinischen Parametern als die anderen beiden Assays.

Alle drei Assays zeigten eine Korrelation mit dem CAS und dem Exophthalmus in mm. Eine Korrelation mit dem Parameter Lidretraktion ist nur bei TRAK mit niedrigem

Korrelationskoeffizienten festzustellen. Der Turbo TSI hat die *stärkste* Korrelation gezeigt.

Ohne den Patienten und seine Klinik zu betrachten, kann allein anhand der Laborchemie keine endgültige Entscheidung getroffen werden. Im untersuchten Kollektiv gibt es mehrere Beispiele, die Differenzen in der Serologie und den gewählten klinischen Parametern, vor allem des CAS, zeigen. In vielen Fällen allerdings gibt es Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen der Assays und dem Verlauf der Krankheitsaktivität der EO. Als Orientierung und im Zusammenspiel mit dem klinischen Befinden der Patienten können die Assays zur Beurteilung und zum Verlauf der Krankheitsentwicklung von großem Nutzen sein. Der Turbo TSI schneidet im Vergleich zu den beiden anderen Assays keinesfalls schlechter ab. Ein großer Vorteil des Turbo TSI Assays bzw. beider Bioassays im Hinblick auf die Korrelation ist im Kollektiv allerdings nicht eindrücklich. Trotzdem zeigt der Turbo TSI in der Spearman Korrelation den höchsten Korrelationskoeffizienten für CAS und Exophthalmus.

5.1.5 Limitationen der Ergebnisse

Manche Rahmenbedingungen der Studie und Ergebniserhebung stellen potenzielle Fehlerquellen dar, die zu einer eingeschränkten Aussagekraft der Ergebnisse führen könnten.

Zum einen ist die eher geringe Zahl der behandelten und ausgewerteten Patienten zu nennen. Höhere Fallzahlen führen zu einer höheren statistischen Aussagekraft und niedrigere Fallzahlen können die Daten anfälliger für Verzerrungen machen. So führt gerade die Aufteilung der Medikationsgruppe in ihre Einzelgruppen der Dosierung zu niedrigen Patientenzahlen, was die Möglichkeit einer statistischen Testung der einzelnen Dosisgruppen im Vergleich zu Placebo nicht ermöglicht. Dadurch musste in der statistischen Auswertung die Medikationsgruppe als Gesamtgruppe zusammengefasst werden. Das Zusammenfassen der Medikationsgruppe kann eine potenzielle Fehlerquelle bieten, da die unterschiedlichen Dosierungen unterschiedlich starke Reduktion der TRAK bzw. TSI hervorrufen. So kann die Zusammenfassung in eine große Medikationsgruppe möglicherweise die Interpretation der Ergebnisse erschweren.

Die erhobenen klinischen Parameter CAS, Exophthalmus und Lidretraktion wurden von zwei ausgebildeten Untersuchern erhoben, ein untersucherabhängiger Bias in Bezug auf die erhobenen klinischen Parameter kann dadurch aber nicht ausgeschlossen werden.

Ebenso gibt es potenzielle Fehlerquellen, die die Ergebnisse der Assays verfälschen könnten. Zwar wurden die Assays von nur einem Untersucher durchgeführt, allerdings bietet die Messung des TSI Bioassay durch die Notwendigkeit der Inkubation der Zellen die Möglichkeit, dass sich die Ergebnisse zwischen den gemessenen Platten unterscheiden könnten. Zwar wird die erfolgreiche Inkubation der Zellen mittels Mikroskop überprüft, trotzdem ist möglich, dass manche Zellen besser oder schlechter inkubiert haben und somit zu leichten Schwankungen der Ergebnisse führen könnten. Unabhängig von der Inkubation ist ebenso nicht auszuschließen, dass die unterschiedlichen Chargen der Zellen Schwankungen in den gemessenen TSI herbeiführen. Dies ist bei beiden Bioassays möglich, da für die Messung aller Proben mehrere Platten notwendig waren und somit unterschiedliche Chargen genutzt wurden.

6 Zusammenfassung

6.1 Turbo TSI als klinischer Parameter und Biomarker

Die demographischen, klinischen und serologischen Daten des Kollektivs sind in Tabelle 4 dargestellt. Bis auf wenige Ausnahmen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen Placebo und Medikation.

Das Ziel dieser Dissertation war die Evaluation des klinischen Nutzens des neuartigen Turbo TSI Assays als sensitiven Biomarker für die endokrine Orbitopathie. Die demographischen, klinischen und serologischen Daten des untersuchten Patientenkollektivs vor Studienbeginn zeigten keine relevanten signifikanten Unterschiede zwischen der Placebo- und der Medikationsgruppe. Erwartete serologische Veränderungen durch die Studienmedikation, einem Antikörper gegen den FcRn, sind in allen drei Assays sichtbar. Während in der Placebogruppe ebenfalls eine tendenzielle Abnahme der Antikörpertiter zu beobachten war, zeigte sich in der Medikationsgruppe eine signifikante und deutliche Reduktion der Antikörpertiter, gemessen in allen drei Assays (TRAK, Thyretain TSI und Turbo TSI). Dieser Effekt war bereits nach sieben Wochen sichtbar und steigerte sich bis Woche 13, eine Woche nach der letzten Spritzengabe. Nach Abschluss der Follow Up Phase stiegen die Antikörpertiter teilweise wieder an, blieben jedoch meist unterhalb des Baselinenniveaus. Sowohl der Bindungsassay und der TSI Bioassay zeigen untereinander als auch zum Turbo TSI Bioassay eine starke Korrelation. Beide Bioassays stechen durch eine deutlich höhere Sensitivität im Vergleich zum TRAK Bindungsassay hervor. Mit einer leicht höheren Rate an positiv getesteten Proben hat der Turbo TSI im untersuchten Kollektiv die höchste Sensitivität, allerdings unterscheidet er sich nicht maßgeblich von den Ergebnissen des bekannten TSI Bioassays. Er glänzt allerdings durch die deutliche leichtere und zeitsparendere Durchführung.

Bei vielen Patienten des Kollektivs zeigt die Serologie eine sehr gute Korrelation zur Klinik der Patienten. Es gibt allerdings auch einige Beispiele in denen dies nicht zutrifft. Von allen drei betrachteten Assays fällt keine der Messmethoden besonders positiv oder negativ im Bezug zu den klinischen Parametern auf. Die Bioassays scheinen im Kollektiv eine etwas bessere Korrelation als der TRAK Bindungsassay aufzuweisen. Der Turbo TSI zeigt die stärkste Korrelation zu Exophthalmus und CAS.

Der Turbo TSI Assay scheint wie die anderen beiden getesteten Assays hilfreich in der Beurteilung des klinischen Verlaufs zu sein und zeigt im untersuchten Kollektiv keine Nachteile im Vergleich zu den anderen beiden Assays. Allerdings scheint es Patienten zu geben, deren Serologie weniger gut zur Klinik passt, während in manchen Fällen eine sehr gute Korrelation besteht. Dies führt dazu, dass für die Beurteilung eines Patienten immer die Betrachtung der Klinik als auch der Laborchemie im Zusammenspiel zwingend erforderlich ist.

In der Gesamtheit zeigte der Turbo TSI keine Nachteile im Vergleich zu den anderen Assays, sondern bewies seine klinische Brauchbarkeit als zuverlässiger und sehr sensitiver Biomarker für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs.

6.2 Vorteile und Schwächen des Turbo TSI, klinische Zukunft

Der Turbo TSI Assay zeichnet sich nicht nur durch seine hohe Sensitivität aus, sondern auch durch eine deutlich vereinfachte und beschleunigte Handhabung. Im Gegensatz zum TSI erfordert der Turbo TSI keine aufwendige Zellkultivierung oder langwierige Inkubationszeiten. Die Zellen des Turbo TSI Assays sind nach dem Auftauen sofort einsatzbereit und benötigen lediglich eine Stunde Reaktionszeit mit den Patientenseren. Dies stellt eine enorme Zeitersparnis dar und erhöht die Flexibilität in der Anwendung. Darüber hinaus erlaubt der Turbo TSI die Bearbeitung von fast doppelt so vielen Proben pro Platte (39 Proben im Vergleich zu 20 Proben beim Thyretain TSI), was seine Effizienz zusätzlich steigert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Turbo TSI eine valide und zukunftsweisende Ergänzung zu bestehenden Assays darstellt. Besonders seine hohe Sensitivität und die vergleichbare oder bessere Leistung gegenüber dem TSI Bioassay machen ihn zu einer vielversprechenden Option für die Diagnostik und Therapieüberwachung von Morbus Basedow und der endokrinen Orbitopathie. Trotz seiner Vorteile garantiert auch der Turbo TSI keine 100%ige Sensitivität, und es gibt Fälle, in denen falsch negative oder falsch positive Ergebnisse auftreten können. Gleichzeitig ist es wichtig zu erwähnen, dass die serologischen Ergebnisse nicht isoliert betrachtet werden können, um die Klinik des Patienten oder den Therapieverlauf zu interpretieren, da die Serologie nicht immer mit der Krankheitsaktivität übereinstimmt. Die Bestimmung von TSI mittels Bioassays wie dem Turbo TSI im Patientenserum kann allerdings als wichtiger Prädiktor und Verlaufsmarker für die Entwicklung und den Krankheitsverlauf der endokrinen Orbitopathie sehr hilfreich sein. Die Limitationen dieser Dissertation, wie die eher geringe Patientenzahl und mögliche Bias durch untersucherabhängige Parameter machen weitere Studien nötig, um den Turbo TSI Assay zu überprüfen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass der Turbo TSI Assay ein sensibler, schneller und einfach durchführbarer Assay ist, der ein großes Potenzial besitzt, bestehende Assays im klinischen Setting zu ergänzen oder sogar zu ersetzen. Seine Fähigkeit, klinische Aktivität und Schweregradparameter bei Morbus Basedow zu detektieren, sowie seine Effizienz in der Durchführung, machen ihn zu einem wertvollen Instrument für die Diagnostik und in der Behandlung von Schilddrüsenerkrankungen.

7 Literaturverzeichnis

- Akilesh, C. e. (2007). Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *Journal of Immunology*, 4580-4588.
- Allelein, S. (2021). Morbus Basedow. *Dtsch Med Wochenschr*, 1337-1343.
- Baldwin. (1996). Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Minireview*, 223-228.
- Behrends, B. D. (2021). *Duale Reihe Physiologie*. Thieme.
- Beisse, P.-B. e. (2011). Klinische und neuroradiologische. *Ophthalmologie 2011 · 108*, 417–424.
- Binkowski, e. a. (2011). A Luminescent Biosensor with Increased Dynamic Range for Intracellular cAMP. *ACS Chemical Biology*, 1193-1197.
- Diana, K. (2018). Thyroid Stimulating Hormone Receptor Antibodies in Thyroid Eye Disease—Methodology and Clinical Applications. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, S13-S19.
- Diana, K. e. (2015). Standardization of a bioassay for thyrotropin receptor stimulating autoantibodies. *Thyroid*, 169-175.
- Diana, K. K. (2017). Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease. *Clinical and Experimental Immunology Vol 189*, 304-309.
- Diana, K. W. (2019). High Titers of Thyrotropin Receptor Antibodies Are Associated With Orbitopathy in Patients With Graves Disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2561-2568.
- Diana, O. K. (2020). TSH RECEPTOR ANTIBODIES: RELEVANCE & UTILITY. *Endocrine Practice*, 97-106.
- Diana, W. K. (2016). Highly variable sensitivity of five binding and two bio-assays for TSH-receptor antibodies. *Journal of Endocrinological Investigation 39*.
- Douglas, K. P. (2020). Teprotumumab for the Treatment of Active Thyroid Eye Disease. *The New England Journal of Medicine Volume 382 No. 4*.
- Duan, X. L. (2022). Hormone- and antibody-mediated activation of the thyrotropin receptor. *Nature*, S. 854-859.
- Feldkamp. (2021). Epidemiologie und Pathophysiologie der Schilddrüse. In B. L. Kreis, *Viszeral- und Allgemein Chirurgie* (S. 1-8). Springer Verlag.
- Feldkamp, S. e. (2013). Schilddrüse. In R. S. Siewert, *Endokrine Chirurgie* (S. 29-227). Springer Verlag.
- George, K. D. (2021). Stimulatory Thyrotropin Receptor Antibodies Are a Biomarker for Graves' Orbitopathy. *frontiers enocrinology*.
- Gerding, e. a. (2000). Association of thyrotrophin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 67-71.
- Goh, K. e. (2004). Thyroid autoantibody profiles in ophthalmic dominant and thyroid dominant Graves' disease differ and suggest ophthalmopathy is a multiantigenic disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 600-607.

- Hötte, d. B. (2024). Clinical performance of a novel and rapid bioassay for detection of thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' orbitopathy patients: a comparison with two commonly used immunoassays. *Frontiers Endocrinology Vol 15*.
- Hötte, e. a. (2024). Thyroid stimulating immunoglobulin concentration is associated with disease activity and predicts response to treatment with intravenous methylprednisolone in patients with Graves' orbitopathy. *Frontiers Endocrinology Vol 15*.
- Kabir, L. H. (2021). Outcome of Teprotumumab Treatment for Graves Orbitopathy After Multiple Attempts at Orbital Decompression Surgery . *Journal of the Endocrine Society*, 945.
- Kahaly. (2020). Management of Graves Thyroidal and Extrathyroidal Disease: An Update . *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Vol 105*, 3704-3720.
- Kahaly, B. e. (2021). The 2021 European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves' orbitopathy. *European Journal of Endocrinology, Volume 185*, G43-G67.
- Kahaly, D. (2017). TSH Receptor Antibody Functionality and Nomenclature (Commentary Article). *Frontiers Endocrinology Vol. 8*.
- Kahaly, D. e. (2019). Prospective Trial of Functional Thyrotropin Receptor Antibodies in Graves Disease . *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, e1006-e1014.
- Kahaly, D. G. (2016). Thyroid Stimulating Antibodies Are Highly Prevalent in Hashimoto's Thyroiditis and Associated Orbitopathy. *J Clin Endocrinol. Metab.* , 1998-2004.
- Kahaly, L. K. (2020). Glucocorticoids in Graves' orbitopathy: mechanisms of action and clinical application. *Sage Journals*.
- Kahaly, O. D. (2020). TSH receptor antibodies: relevance & utility. *Endocrine Practice*, 97-106.
- Karger, F. (2008). Thyreotoxische Krise - ein Update. *Dtsch Med Wochenschrift*, 479-484.
- Khamisi. Lundqvist, e. a. (2023). Comparison Between Thyroid Stimulating Immunoglobulin and TSH-Receptor Antibodies in the Management of Graves' Orbitopathy. *Exp Clin Endocrinol 2023, VOI 131* , 236-241.
- Khoo, e. a. (1999). The Combination of Absent Thyroid Peroxidase Antibodies and High Thyroid-Stimulating Immunoglobulin Levels in Graves' Disease Identifies a Group at Markedly Increased Risk of Ophthalmopathy. *official journal of the American Thyroid Association*, 75-80.
- Kotkowska, S. (2022). Depression and Autoimmune Hypothyroidism. *Pharmaceuticals (Basel)*, 391.
- Krzystof, M. e. (2009). TSH receptor autoantibodies. *Autoimmunity Reviews*, 113-116.
- Leblanc, B. S. (2019). Human serum albumin presents isoform variants with altered neonatal Fc receptor interactions. *Protein Science Vol 28*, 1982-1992.
- Leo, e. a. (2016). Hyperthyreoidism. *The Lancet Band 388*, 906-918.
- Leschik, D. K. (2013). Analytical Performance and Clinical Utility of a Bioassay for Thyroid-Stimulating Immunoglobulins. *American Journal of Clinical Pathology*, 192-200.
- Lyons, P. B. (2013). Imaging Mouse Cancer Models In Vivo Using Reporter Transgenes. *Cold Spring Harbor Protocols*.

- Lytton, P. K. (2010). A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2123-2131.
- McKee, P. (2012). TSI assay utilization: impact on costs of Graves' hyperthyroidism diagnosis. *Am J Manag Care*, e1-14.
- Meiss, F. e. (2004). Morbus Basedow. *Hautarzt 2004 55*, 475-479.
- Menconi, e. a. (2014). Diagnosis and classification of Graves' Disease. *Autoimmun Rev.*, 398-402.
- Miao, K. e. (2022). A rapid homogenous bioassay for detection of thyroid-stimulating antibodies based on a luminescent cyclic AMP biosensor. *Journal Immunology Methods*.
- Olivo. (2023). Bioassays for thyrotropin receptor autoantibodies. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*.
- Park, S. e. (2024). Prognostic factors for thyroid-stimulating immunoglobulin normalization in moderate-to-severe Graves' orbitopathy: a 36-month longitudinal study. *BMC Ophthalmology*, art.nr.361.
- Park, S. K. (2024). Prognostic factors for thyroid-stimulating immunoglobulin normalization in moderate-to-severe Graves' orbitopathy: a 36-month longitudinal study. *BMC Ophthalmology 24*, Art.nr. 361.
- Pyzik, R. e. (2015). FcRn: The architect behind the immune and nonimmune functions of IgG and albumin. *Journal of Immunology*, 4595-4603.
- Pyzik, S. e. (2019). The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *frontiers Endocrinology Vol. 10*.
- Rassow, N. H. (2022). *Duale Reihe Biochemie*. Thieme.
- Sanders, E. e. (2003). Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *Lancet*.
- Smith. (2010). Pathogenesis of Graves' orbitopathy: A 2010 update. *Journal of Endocrinological Investigation Vol 33*, 414-421.
- Smith, H. (2016). Graves' Disease. *N Eng J Med 2016 Vol 375 No 16*, 1552-1565.
- Sockolosky, e. a. (2015). Human serum albumin presents isoform variants with altered neonatal Fc receptor interactions. *Adv Drug Deliv Rev*, 109-124.
- Umar, e. a. (2010). Hashimoto's thyroiditis following Graves' disease. *Acta Med Indonesia*.
- van de Loo, H. (2020). Schilddrüse. In H. van de Loo, *Facharztwissen Endokrinologie und Diabetologie* (S. 73-104). Springer Verlag.
- Wang, D. e. (2022). Luciferase-based GloSensor™ cAMP assay: Temperature optimization and application to cell-based kinetic studies. *Elsevier Science*.
- Winter, J. e. (2013). Thyrotropin Receptor Antibody Assays. *Oxford Academic*.
- Zöphel, R. S. (2010). Clinical review about TRAb assay's history. *Autoimmun Review*, 695-700.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem gesamten Team des molekularen Schilddrüsenlabors der Universitätsmedizin Mainz, ebenso meinen Freunden und vor allem meiner Familie, die mich immer unterstützt haben.

9 Tabellarischer Lebenslauf