

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Roden

Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie

Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. Matthias Schott

Klinische Evaluation des ersten automatisierten Assays zur Detektion
von stimulierenden TSH-Rezeptor Antikörpern

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sophia May

(2023)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Matthias Schott

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Frederik L. Giesel

Für meinen Papa

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

S. Allelein, M. Ehlers, S. Goretzki, D. Hermsen, J. Feldkamp, M. Haase, T. Dringenberg, C. Schmid, H. Hautzel, M. Schott, (2016), Clinical Evaluation of the First Automated Assay for the Detection of Stimulating TSH Receptor Autoantibodies. *Horm Metab Res* 2016;48: 795-801

Zusammenfassung

Der Morbus Basedow ist die zweithäufigste Autoimmunerkrankung der Schilddrüse und wird durch die Bildung von Autoantikörpern verursacht, die sich gegen den *thyroid stimulating hormone receptor* (TSHR) richten, sogenannte TSH-Rezeptor Autoantikörper (TRAKs). Bislang wurden drei verschiedene Subtypen von TRAKs identifiziert: stimulierende TRAKs, blockierende TRAKs und neutrale TRAKs. Von diesen verursachen nur die stimulierenden TRAKs (sTRAK) durch die Stimulierung der Schilddrüsenhormonsynthese eine Hyperthyreose. Bis vor kurzem war der Nachweis von sTRAK auf einen einzigen mühsamen und zeitaufwändigen *Bioassay* beschränkt. Ein neuartiges Testsystem, mit dem sTRAK schnell und direkt in Patientenseren mittels einer *Bridge*-Technologie nachgewiesen werden können, wurde kürzlich entwickelt und ist nun als automatisierter Chemilumineszenz-*Immunoassay* (*Bridge*) erhältlich. In dieser Arbeit wurde der neuartige automatisierte *Bridge-Assay* für den Einsatz in der klinischen Routine evaluiert und mit dem herkömmlichen automatisierten TRAK-Test (*Competition-Assay*) verglichen. Die Auswertung erfolgte retrospektiv anhand der Daten von 226 M. Basedow-, 57 Autoimmunthyreoiditis-, 74 Struma nodosa- und 49 Schilddrüsenkarzinom-Patienten, sowie 41 schilddrüsengesunden Kontrollpersonen. Die ROC-Plot-Analyse auf der Grundlage von Seren neu diagnostizierter Morbus Basedow-Patienten ergab eine *Area under the curve* von 0,99 (95 % CI: 0,99-1,0), was auf eine hohe Sensitivität und Spezifität des Tests hindeutet. Die höchste Sensitivität (100 %) und Spezifität (99 %) wurde bei einem Grenzwert von 0,55 IU/l festgestellt. Der berechnete positive prädiktive Wert lag bei 94 %, während der negative prädiktive Wert 100 % betrug. Bei Anwendung eines ROC-Plot basierten Grenzwertes von 0,30 IU/l, der aus Seren von Morbus Basedow-Patienten abgeleitet wurde, die bereits seit bis zu sechs Monaten eine thyreostatische Medikation erhalten hatten, betrug die Sensitivität 99 % und die Spezifität 98 %. Ein detaillierter Vergleich der beiden Systeme ergab eine leicht unterschiedliche Verteilung von sTRAK und TRAK. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen sTRAK und freiem Thyroxin (fT4), aber eine noch höhere Korrelation zwischen TRAK und fT4. Die Messung von sTRAK während der Nachbeobachtung ergab einen stetigen Rückgang über ein Jahr der Nachbeobachtung. Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass der Nachweis von sTRAK mit dem neuartigen automatisierten *Bridge-Assay*-System eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Diagnose des Morbus Basedow aufweist bzw. diesen von anderen Schilddrüsenerkrankungen unterscheiden kann. Die Analyse liefert jedoch keinen vollständigen Nachweis für die Spezifität des *Bridge-Assays* exklusiv für sTRAK.

Summary

Graves' disease is the second most common autoimmune thyroid disease and is caused by the formation of autoantibodies targeting the thyroid stimulating hormone receptor (TSHR), commonly known as TSHR autoantibodies (TRAbs). To date, three different subtypes of TRAbs have been identified: stimulating TRAbs, blocking TRAbs and neutral TRAbs. Of these, only the stimulating TRAbs (sTRAb) cause hyperthyroidism through the stimulation of thyroid hormone synthesis. Until recently, the detection of stimulating TSH receptor antibodies was limited to a single laborious and time-consuming bioassay. A novel assay system, with the ability to detect sTRAb rapidly and directly in sera using a bridge technology, has been established and is now available as an automated chemiluminescence (bridge) immunoassay. In this thesis, the novel automated bridge assay was evaluated for its use in clinical routine and compared with the conventional automated TRAb assay (competition assay). The evaluation was performed retrospectively on data from 226 Graves' disease, 57 autoimmune thyroiditis, 74 non autoimmune nodular goiter and 49 thyroid cancer patients, as well as 41 healthy controls subjects. ROC plot analysis based on sera of newly diagnosed Graves' disease patients revealed an area under curve of 0.99 (95 % CI: 0.99-1.0) indicating a high assay sensitivity and specificity. The highest sensitivity (100 %) and specificity (99 %) was seen at a cut-off level of 0.55 IU/l. The calculated positive predictive value was 94 %, whereas the negative predictive value was 100 %. Applying a ROC plot derived cut-off of ≥ 0.30 IU/l, derived from sera of Graves' disease patients already receiving antithyroid drug therapy for up to 6 months, the sensitivity was 99 % whereas the specificity was 98 %. Detailed comparison of both systems revealed a slightly different distribution of sTRAb and TRAb. There was a significant correlation between sTRAb and free thyroxine (fT4), but an even higher correlation between TRAb and fT4. Measurement of sTRAb during follow up revealed a steady decline over one year of follow up.

In summary, this study demonstrates that the detection of sTRAb with the novel automated bridge assay system has a high sensitivity and specificity for diagnosing Graves' disease and can discriminate from other thyroid diseases, respectively. However, the analysis does not provide full evidence for the bridge assay's specificity for sTRAb only.

Abkürzungsverzeichnis

AIT	Autoimmunthyreoiditis
AK	Antikörper
Anti-TG AK	Anti-Thyreoglobulin-Antikörper
Anti-TPO AK	Anti-Thyreoperoxidase-Antikörper
AUC	Area under the Curve
bTRAK	blockierende Thyreotropin-Rezeptor Autoantikörper
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD25	Cluster of differentiation 25
CD40	Cluster of differentiation 40
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DIT	Diiodtyrosin
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbend Assay
EO	Endokrine Orbitopathie
FRTL-5-Zellen	fischer rat thyroid follicle 5-Zellen
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FSHR	Follikelstimulierender Hormonrezeptor
ft ₃	freies T ₃
ft ₄	freies T ₄
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPHR	Glykoproteinrezeptor
HLA	Humane Leukozytenantigene
Immunoglobulin G	IgG
LH	Luteinzierendes Hormon
LRR	Leucin-reiche Repeats
LSHR	Luteinisierender Hormonrezeptor
M.	Morbus
mAK	monoklonaler Antikörper
MIT	Moniodtyrosin
negativ prädiktiver Wert	NPW
positiv prädiktiver Wert	PPW
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22
PTU	Propylthiouracil
RJT	Radiojodtherapie
ROC	Receiver Operating Characteristic
SEAP	sekretorische alkalische Phosphatase
SMANTAG	small molecule „drug like“ Antagonisten
SRR	Sample to reference ratio
sTRAK	stimulierende Thyreotropin-Rezeptor Autoantikörper
T ₃	Triiodthyronin
T ₄	Thyroxin
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TBPA	Thyroxin-bindendes Präalbumin
TG	Thyroglobulin
TMD	Transmembrandomäne
TPO	Thyreoperoxidase
TRAK	TSH-Rezeptor-Autoantikörper
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
TSH	Thyreidea stimulierendes Hormon
TSHR	Thyroid-stimulating Hormone Rezeptor, Thyreidea stimulierender Hormon Rezeptor

Inhalt

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhalt	IV
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeines zum M. Basedow	1
1.2 Physiologie der Schilddrüse	2
1.3 Der Thyroidea-stimulierende Hormon Rezeptor (TSHR)	4
1.4 Die Thyreotropin Rezeptor Autoantikörper	7
1.5 Klinisches Bild des Morbus Basedows	9
1.6 Diagnostik des Morbus Basedows	10
1.7 Therapie des Morbus Basedow	11
1.8 Aktuelle TRAK-Assays und ihre Geschichte	13
1.9 Aufbau des ersten automatisierten <i>Bridge-Assays</i>	15
1.10 Ziele der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Patientenkollektive	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Testkits	21
2.1.4 Geräte	21
2.1.5 Software	22
2.2 Methoden	22
2.2.1 Messung der TRAK und sTRAK Konzentrationen	22
2.2.2 Schilddrüsenfunktionstests und Antikörper-Assays	22
2.2.3 Messung der TSH-Rezeptor Antikörper	23
2.2.4 Statistische Auswertung	24
3 Ergebnisse	25

3.1	Vergleich des vorgeschlagenen und errechneten Grenzwertes des <i>Bridge-Assays</i>	25
3.2	Klinische Evaluation des <i>Bridge-Assays</i> und Vergleich mit dem automatisierten <i>Competition-Assay</i>	29
3.3	TSH Rezeptor Autoantikörper im zeitlichen Verlauf	32
3.4	Zusammenhang zwischen den sTRAK, TRAK und fT4	33
4	Diskussion	35
4.1	Bewertung der errechneten Grenzwerte und Vergleich mit dem <i>Competition-Assay</i>	35
4.2	Stimulierende TRAK in Patienten mit Autoimmunthyreoiditis	38
4.3	Bewertung des zeitlichen Verlaufs der TSH Rezeptor Antikörper	40
4.4	Bewertung des Zusammenhangs zwischen stimulierenden TRAK, TRAK und fT4	42
4.5	Schlussfolgerung	47
5	Literaturverzeichnis	48
6	Anhang	61

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zum M. Basedow

Die Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) ist mit einer Prävalenz von 3-5 % das am häufigsten von Autoimmunkrankheiten betroffene Organ [1]. Durch den chronischen Verlauf und die hohe Prävalenz in der jüngeren Bevölkerung haben autoimmune Schilddrüsenerkrankungen eine hohe klinische Bedeutung [2]. Neben der Hashimoto-Thyreoiditis ist der Morbus Basedow (M. Basedow), im englischen als *Graves' disease* bezeichnet, mit einer weltweiten Inzidenz von 20-50 Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr die zweithäufigste die Schilddrüse betreffende Autoimmunerkrankung [3]. Frauen sind ca. fünfmal häufiger betroffen als Männer [4]. Der M. Basedow kann in jedem Lebensalter auftreten, der Manifestationsgipfel liegt in zweidrittel der Fälle nach dem 35. Lebensjahr [5]. Ähnlich wie bei anderen Autoimmunerkrankungen scheint die Inzidenz in den vergangenen Jahren, vor allem in den Industrienationen, zu steigen. Es liegen deutliche geographische und ethnische Unterschiede in der Ausprägung der Inzidenzen vor. In Kaukasien und Asien scheint eine höhere Prävalenz vorzuliegen als in Afrika [4, 6]. Die Ätiologie des M. Basedow und die Ursachen der steigenden Inzidenz sind bisher nicht vollständig geklärt. Die Erkrankung unterliegt einer multifaktoriellen Genese [7]. Verschiedenste Genloci wurden identifiziert, die bei der Entstehung einer Autoimmunerkrankung der Schilddrüse eine Rolle spielen [8, 9]. Zu den bisher bekannten Genloci gehören u.a. *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA4)*, *Cluster of differentiation 40 (CD40)*, *Cluster of differentiation 25 (CD25)*, *Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22)*, Thyroglobulin (TG) und Thyroidea stimulierender Hormon-Rezeptor (TSHR), die vorwiegend in der Humane Leukozytenantigene-Region DR3 liegen [10]. Von großer Bedeutung ist das für den TSHR kodierende TSHR-Gen [11]. Der TSHR wird als Hauptantigen von Autoantikörpern erkannt, die charakteristisch für den M. Basedow sind. Die beim M. Basedow auftretenden Autoantikörper beeinflussen die Sekretion von T₃ und T₄ und damit die Funktion der Schilddrüse und führen in der Mehrzahl der Fälle zu einer Hyperthyreose [12]. Die bisher identifizierten Gene stellen schätzungsweise etwa 20 % der Vererbung des M. Basedows dar. Weitere Genloci sind Gegenstand aktueller Forschung [13]. Als weitere Einflussfaktoren auf die Entstehung des M. Basedows werden Rauchen, Infektionen, Stress, Bestrahlung, Medikamente und ein Selenmangel diskutiert [1, 14-16]. Durch die multiple Organsysteme betreffende Regulationsfunktion der Schilddrüse sind die

Symptome des M. Basedow vielfältig und beeinträchtigen die Lebensqualität der betroffenen Patienten.

1.2 Physiologie der Schilddrüse

Bei Erwachsenen zählt die Schilddrüse mit 15-20 g zu den großen endokrinen Drüsen des menschlichen Körpers. Makroskopisch besteht die Schilddrüse aus zwei Seitenlappen, die sich dem Ring- und Schildknorpel des Kehlkopfes anlegen und durch einen Isthmus miteinander verbunden sind [17]. Mikroskopisch betrachtet besteht die Schilddrüse aus Follikeln, die spezifische strukturelle und funktionelle Einheiten bilden. In diesen Follikeln vollzieht sich die Hauptfunktion der Schilddrüse, die Bildung der Hormone Triiodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) [18, 19]. Essenziell für die Synthese dieser Hormone ist das Protein Thyroglobulin, welches in den Thyreozyten synthetisiert und über den sekretorischen Weg in das Lumen der Follikel (auch Kolloid genannt) transportiert wird (Abb. 1 A und B) [20, 21]. Ebenso erforderlich für die Synthese ist Iod, welches zunächst in Form von Iodid-Ionen (I^-) über den Natrium-Iodid Symporter aus dem Blut in die Epithelzellen aufgenommen und von dort über den Iodid-Chlorid-Antiporter Pendrin in das Kolloid gepumpt werden muss (Abb. 1 C und D) [22, 23]. Im Kolloid werden die Iodid-Ionen über das Enzym Thyreoperoxidase (TPO) zu Iod (I_2) oxidiert (Abb. 1 E) und anschließend an Tyrosin-Seitenketten von TG gebunden (Abb. 1 F), wodurch Mono - und Diiodtyrosin-Reste entstehen [24, 25]. In einem nachfolgenden Schritt, der Konjugation, werden innerhalb eines TG Moleküls iodierte Tyrosinmoleküle miteinander zu T_3 oder T_4 Seitenketten gekoppelt [26]. Die T_3 - und T_4 -funktionalisierten TG-Proteine werden über die Aktivierung des TSHR in die Epithelzellen endocytisiert [27]. Nach der Fusion der endocytotischen Vesikel mit dem Lysosom werden T_3 und T_4 von TG enzymatisch abgespalten und über einen bisher nicht abschließend geklärten Mechanismus in das Blut sekretiert [18, 28]. In der Schilddrüse entsteht vor allem T_4 , das biologisch aktivere T_3 entsteht zu ca. 80% aus T_4 durch Deiodierung in der Peripherie [29, 30]. Im Blut werden T_3 und T_4 überwiegend an Albumin, Thyroxin-bindendes Präalbumin (TBPA) und Thyroxin-bindendes Globulin (TBG) gebunden und transportiert [31, 32].

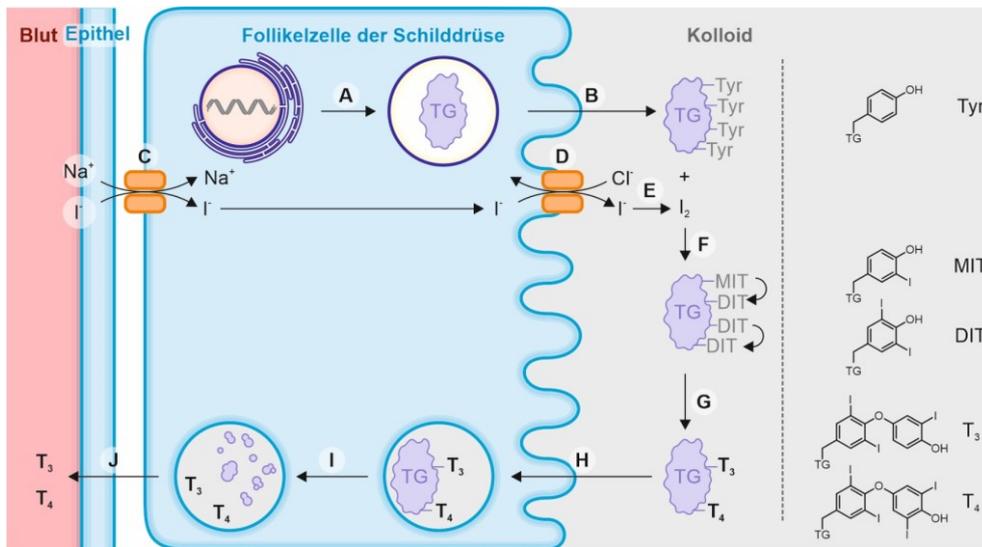


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Bildung und Sekretion von Triiodthyronin (T₃) und Thyroxin (T₄) in einer Follikelzelle der Schilddrüse. (A) Synthese und (B) Sekretion von Thyroglobulin (TG) ins Thyroid Lumen. (C) Aufnahme von Iodid (I⁻) und Natrium (Na⁺) Ionen in die Follikelzelle über den Natrium-Iodid-Symporter. (D) Export von Iodid aus der Follikelzelle ins Kolloid über den Chlorid-Iodid-Antiporter Pendrin. (E) Oxidation von Iodid zu Iod (I₂) und (F) Iodinierung von Tyrosin (Tyr) Seitenketten in TG. Beide Reaktionsschritte werden durch das Enzym Thyreoperoxidase (TPO) katalysiert. (G) TG-katalysierte Konjugation von MIT und DIT zu T₃ und T₄. (H) Thyroid-stimulating Hormone (TSH)-Rezeptor vermittelte Endocytose von T₃- und T₄-TG. (I) Proteolytischer Abbau von TG und Freisetzung von T₃ und T₄ im Lysosom. (J) Sekretion von T₃ und T₄ ins Blut.

Die Regulation der Schilddrüsenhormon Produktion und Sekretion erfolgt über das zentrale Nervensystem. Der im Diencephalon gelegene Hypothalamus steuert das endokrine System, in dem er die hormonregulierten Funktionen peripherer Organe auf das menschliche Verhalten abstimmt [33]. Im Hypothalamus wird u.a. das *Thyreotropin Releasing Hormon* (TRH) produziert, das über Nervenendigungen das Portalblut der Hypophyse erreicht [34]. In der Adenohypophyse stimuliert TRH die Ausschüttung des Thyreidea stimulierenden Hormons (TSH) [35]. Das TSH erreicht über den Blutkreislauf die Schilddrüse und bindet dort an spezifische TSH-Rezeptoren [36]. Die Aktivierung der TSH-Rezeptoren führt über intrazelluläre Signalkaskaden zum Wachstum der Schilddrüse und zur Synthese und Sekretion von T₃ und T₄ [37, 38]. T₃ und T₄ ihrerseits hemmen die Bildung von TRH und TSH [39, 40]. Diese negative Rückkopplung bedingt die Konstanzhaltung der Konzentration der Schilddrüsenhormone im Blut [32].

T₃ und T₄ haben vielfältige und komplexe Wirkungen auf den Organismus und steuern diverse Organfunktionen, indem sie multiple Körperfunktionen regulieren und so zur Aufrechterhaltung der Homöostase des menschlichen Körpers maßgeblich beitragen. Zudem spielen die Schilddrüsenhormone eine wichtige Rolle in der geistigen und körperlichen

Entwicklung [41]. Kinder mit angeborener Hypothyreose erkranken am Kretinismus, der binnen weniger Wochen nach der Geburt zu einer irreversiblen Einschränkung der kognitiven Leistungsfähigkeit und einem verzögerten Längenwachstum führt [42, 43]. Bei Erwachsenen steigern die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 den Grundumsatz, indem sie in verschiedene Stoffwechselprozesse eingreifen [42, 44-47]. Sie fördern den Fettsäurestoffwechsel und steigern den Glucosespiegel im Blut [48-55]. Im Verdauungstrakt fördern die Schilddrüsenhormone die Darmmotilität [56]. Das Herz-Kreislauf-System wird ebenfalls durch die Schilddrüsenhormone beeinflusst. Eine erhöhte Konzentration an T_3 und T_4 hat einen hyperdynamen Kreislauf mit gesteigertem Blutfluss und einem herabgesetzten totalen peripheren Widerstand zur Folge [57-59]. Außerdem wird das Herz durch die Schilddrüsenhormone gegenüber Katecholaminen sensibilisiert [60, 61]. Insgesamt steigern T_3 und T_4 die Lusitropie, Inotropie und Chronotropie am Herzen, wodurch es zu einer erhöhten Herzfrequenz, einem Anstieg des systolischen Blutdrucks und einer Erniedrigung des diastolischen Blutdrucks kommt [62]. An den Nieren steigern die Schilddrüsenhormone die Filtrationsleistung [63, 64]. Bei beiden Geschlechtern führen sowohl hypo- als auch hyperthyreote Stoffwechsellagen zu multiplen teils nicht abschließend geklärten Störungen der Sexualfunktion insbesondere der Reproduktionsfähigkeit [63, 65-69]. Durch die nahezu den gesamten menschlichen Körper betreffende Beeinflussung der Schilddrüsenhormone lassen sich die vielfältigen Symptome des M. Basedows und die hohe klinische Relevanz der autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen erklären.

1.3 Der Thyroidea-stimulierende Hormon Rezeptor (TSHR)

Der TSHR als Hauptregulator der T_3 und T_4 Sekretion steht im Zentrum der molekularen Ursache des M. Basedow. Beim TSHR handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR), welcher zusammen mit dem Follikelstimulierenden Hormon-Rezeptor (FSHR) und dem Luteinisierenden Hormonrezeptor (LSHR) die Untergruppe der Glykoproteinrezeptoren (GPHR) bildet [70-72]. Mittels Röntgenkristallographie sowie Elektronenmikroskopie konnte die Gruppe der GPHRs in den vergangenen Jahren im molekularen Detail strukturell untersucht werden [73]. Das zentrale Element der GPHRs ist eine für GPCRs typische Transmembrandomäne (TMD) aus sieben Transmembranhelices [74]. Auf der zytosolischen Seite der TMD sowie im zytosolischen C-Terminus weisen sie wie andere GPCRs eine Bindungsstelle für G-Proteine auf [75]. Eine strukturelle und funktionelle Besonderheit der GPHRs sind ihre hufeisenförmigen Leucin-reichen-Repeat (LRR) Ektodomänen, die als Bindungsstellen für ihre entsprechenden Hormonliganden (TSH,

Follikelstimulierendes Hormon oder Luteinisierendes Hormon) fungieren [76, 77]. Ebenso ist die Ektodomäne im TSHR für die Bindung von Autoantikörpern verantwortlich [73]. Die Ektodomäne und TMDs der GPHRs sind durch sogenannte *Hinge*-Regionen miteinander verknüpft [73]. Hierbei bildet der C-Terminus der *Hinge*-Region über eine sogenannte p10 Peptid Region essentielle Kontakte mit der ersten Transmembranhelix [78]. Diese *Hinge*-Regionen steuern maßgeblich die Signalweiterleitung, indem sie die Ligandenbindung in der extrazellulären Ektodomäne mit der Aktivierung von G-Proteinen auf der intrazellulären Seite der TMD koppeln [78-80].

Innerhalb der GPHRs weist der TSHR einige Besonderheiten auf. Von den 746 Aminosäuren (84,5 kDA) des TSHR bilden die Aminosäuren 1-397 die aus elf Repeats umfassende LRR-Ektodomäne [81-85]. Durch posttranslationale, intrazelluläre Teilung, die mit dem Verlust von schätzungsweise 50 Aminosäuren aus der *Hinge*-Region einhergeht, formt der Rezeptor zwei Disulfid-verbrückte Untereinheiten [86-89]. Die extrazelluläre Ektodomäne stellt dabei die A-Untereinheit und die TMD zusammen mit den zytosolischen Bereichen des TSHR die B-Untereinheit dar [90, 91]. Die posttranslationale Spaltung des TSHR in A- und B-Untereinheiten steht im Verdacht zur Antigenität des TSHR beizutragen. Diese Theorie wird unter anderem durch die Beobachtung gestützt, dass die nach der Teilung entstandene TSHR Ektodomäne eine höhere Affinität zur Bindung von TSHR Autoantikörpern aufweist als der ungespaltene Holorezeptor [92, 93]. Die bei der Teilung entstandene und in den Blutstrom abgegebene glykosylierte A-Untereinheit, die auch als C-Peptid bezeichnet wird, könnte der primäre Stimulus sein, um bei prädisponierten Menschen eine Autoimmunreaktion auszulösen [89, 93]. Was genau die physiologische Funktion des C-Peptids ist oder wie es in die Signalregulation oder die Pathogenese des M. Basedow eingreift ist ebenso Gegenstand aktueller Forschung wie die Frage, ob die Spaltung für jeden TSHR vollzogen wird und welches Enzym sie durchführt [94-102]. Eine weitere bislang ungeklärte Frage ist der Oligomerisierungsgrad des TSHR [103-108].

Als vermutlich zentraler Akteur in der Ätiologie des M. Basedow ist ein umfassendes Verständnis des molekularen Mechanismus der TSHR-Aktivierung unerlässlich, um auch die molekulare Krankheitsursache zu verstehen und potenziell diagnostizieren sowie behandeln zu können. In einer kürzlich erschienenen Studie von Faust et al. konnte die Struktur des aktivierten sowie des inaktivierten TSHR mittels kryogener Elektronenmikroskopie mit nahezu atomarer Auflösung bestimmt werden und somit neue Einblicke in die Hormonbindung und Konformationsänderung des TSHR geben, welche eine Signalweiterleitung über die

Zellmembran ermöglicht [109]. Der inaktive und aktive Zustand des TSHR unterscheiden sich maßgeblich durch die Orientierung der Ektodomäne, welche selbst durch die Bindung unterschiedlicher Liganden beeinflusst wird. In der inaktivierten Form, d. h. bei Bindung eines blockierenden Antikörpers, nimmt die Ektodomäne die sogenannte *Down*-Konformation ein und ist mit der konkaven Seite in Richtung Zellmembran geneigt. Bei Aktivierung des Rezeptors durch die Bindung von TSH an die konkave Seite der LRR Ektodomäne kommt es zu einem Zusammenstoß zwischen dem glycosylierten ASN52 der α -Kette des TSH und der Doppellipidmembran [110]. Dadurch nimmt die Ektodomäne eine sogenannte *Up*-Konformation ein, in der die Ektodomäne um ca. 38° von der Membran weg rotiert. Die Bindung von TSH an den TSHR führt also zu einer sterischen Verhinderung der inaktivierten Rezeptorkonformation. Die Rotation der TSHR Ektodomäne wirkt sich unmittelbar auf die Orientierung der *Hinge*-Helix in der *Hinge*-Region aus und beeinflusst dadurch die p10 Region und in Folge dessen die Konformation der TMD [109]. Durch die Kaskade an Konformationsänderungen könnte das Aktivierungssignal von der extrazellulären Ektodomäne auf die intrazelluläre Seite der TMD übertragen und somit der Rezeptor aktiviert werden [80, 111-115]. Die Rezeptoraktivierung führt wiederum intrazellulär zu einer G-Protein gekoppelten Signalkaskade, die schließlich eine Erhöhung der cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Konzentration in der Zelle bewirkt [116-120]. Über diesen Mechanismus wird das Schilddrüsenwachstum und die Schilddrüsenhormonproduktion und -Sekretion reguliert [38]. Bemerkenswerterweise scheint im Basalzustand, d.h. im ungebundenen Zustand die TSHR Ektodomäne dynamisch zwischen der *Up*- und der *Down*-Konformation hin- und herzuwechseln, wodurch eine basale Rezeptoraktivität resultiert [109]. Dieses dynamische Gleichgewicht wird somit durch die Bindung von aktivierenden und blockierenden Liganden verschoben.

1.4 Die Thyreotropin Rezeptor Autoantikörper

Die Ursache des M. Basedow ist ein dysreguliertes Immunsystem, das geprägt ist durch eine Dysbalance zwischen ausführenden und regulatorischen Zellen. Die Fehlregulierung des Immunsystems führt zu einer fehlerhaften Elimination und Kontrolle von selbst-reaktiven Lymphozyten, die daraufhin eigenes Gewebe angreifen [121-123]. Im Jahr 1956 beschrieben Adams und Purves erstmals einen Schilddrüsen stimulierenden Faktor im Serum von Patienten mit Hyperthyreoidismus [124]. In den 1960er Jahren wurde der Schilddrüsen stimulierende Faktor als Antikörper gegen den TSH-Rezeptor identifiziert und wird seither als molekulare Ursache sowie als Indikator des M. Basedow gesehen [125].

Mittlerweile sind drei Arten von TSH-Rezeptor-Autoantikörper bekannt, stimulierende TRAK (sTRAK), blockierende TRAK (bTRAK) und so genannte neutrale TRAK, die unterschiedliche intrazellulären Signalkaskaden bewirken und somit unterschiedliche funktionelle Auswirkungen auf die Schilddrüse haben [126]. Gemeinsam ist den bisher bekannten Antikörpern, dass sie in sehr geringen Konzentrationen vorliegen und ihr Hauptantigen der TSHR ist, an den sie mit hoher Affinität binden. Eine biologische Wirkung entfalten die TRAK in einem Konzentrationsbereich von nmol/l [127, 128].

Stimulierende TRAK sind in der Regel oligoklonale IgG Antikörper der Untergruppe IgG1, die entweder aus Lambda oder Kappa- leicht Ketten bestehen [129, 130]. Die sTRAK imitieren die Bindung des physiologischen Hormons TSH, indem sie die *Up*-Konformation des aktivierten TSHR-Zustands stabilisieren [109]. Die dadurch ausgelöste Signalkaskade führt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration und stimuliert die Schilddrüsenhormon Produktion und Sekretion [131]. Die Folge der sTRAK vermittelten TSHR-Stimulierung ist eine Hyperthyreose [126]. Blockierende TRAK sind hingegen typischerweise polyklonal [132]. Die bTRAK wirken antagonistisch am TSHR und kompetitieren mit der Bindung von TSH, sodass sie in hohen Konzentrationen zu einer Hypothyreose führen können [126]. Sowohl sTRAK als auch bTRAK binden an überlappenden Bereichen der konkaven Seite der LRR der Ektodomäne [82, 83]. Der molekulare Mechanismus der Rezeptorinhibierung durch bTRAK ist bislang ungeklärt. Neutrale TRAK, auch als *Cleavage*-Antikörper bezeichnet, binden an lineare Epitope in der für die Signaltransduktion wichtigen *Hinge*-Region des TSHR [126, 133]. Über den genauen Wirkmechanismus der neutralen TRAK ist bisher wenig bekannt. Vermutlich lösen die neutralen TRAK eine Signalkaskade aus, die die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies begünstigt und eine

Apoptose der Zelle induziert. Die neutralen TRAK könnten in der sehr frühen Phase des M. Basedows zur Aufrechterhaltung der Erkrankung beitragen [134-136].

sTRAK und bTRAK können zusammen bei einem Patienten vorliegen [137]. Verschiedene Verlaufsstudien haben gezeigt, dass Patienten mit einer durch bTRAK ausgelösten Hypothyreose nach Jahren eine sTRAK positive Hyperthyreose entwickeln können und *vice versa* [138]. Die Schilddrüsenfunktion von Patienten mit M. Basedow unterliegt häufig deutlichen Fluktuationen. Eine Hyperthyreose ist mit steigender Aktivität von sTRAK assoziiert, während eine Hypothyreose mit steigender Aktivität der bTRAK verbunden ist [139].

Was zu den unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der TRAK führt und an welche Epitope des TSHR die verschiedenen TRAK binden ist Gegenstand intensiver Forschung und bislang noch nicht vollständig geklärt. Nachdem 1989 die ersten Aminosäuresequenzen des TSHR entschlüsselt wurden, wurden erste Rückschlüsse auf die Epitope der TRAK mithilfe chimärer TSH/LH-Rezeptoren gewonnen. In Kombination mit Deletions- und Punktmutanten ließen die TSH/LH-Chimären darauf schließen, dass sTRAK an den N-Terminus der TSHR Ektodomäne binden, während die Bindungsstellen der bTRAK im C-Terminus lokalisiert ist [140]. Eine naheliegende Erklärung für die unterschiedliche biologische Aktivität von sTRAK und bTRAK war demnach die Bindung an unterschiedliche Epitope am TSHR [140, 141]. Die Entwicklung humaner monoklonaler Antikörper (mAK) ermöglichte eine genauere Untersuchung der TRAK Bindung an den TSHR und konnte die Bindestellen sowohl der sTRAK als auch der bTRAK in überlappenden Bereichen auf der konkaven Oberfläche der LRR der Ektodomäne verorten [91, 115, 128, 142-146]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Sanders et al. durch die Bestimmung von Kristallstrukturen der TSHR-Ektodomäne gebunden jeweils an einen stimulierenden monoklonalen Antikörper und an einen blockierenden monoklonalen Antikörper. Auch Sanders et al. konnten zeigen, dass die Bindungsstellen der sTRAK und bTRAK in sehr ähnlichen Regionen der konkaven Oberfläche der LRR liegen und zusätzlich mit der Bindungsstelle der natürlichen Glykoprotein hormone der GPHRs überlappen [82, 83]. Neueste strukturelle Studien, in denen die Struktur des sTRAK M22 und des bTRAK K1-70 gebunden an den TSHR mittels kryogener Elektronenmikroskopie untersucht wurden, unterstützen die bisherigen Beobachtungen, dass sTRAK den TSHR auf eine ähnliche Weise aktivieren wie das physiologische TSH [110]. Folglich ist die funktionelle Aktivität des TRAK davon abhängig, ob dieser sterisch die Konformationsänderung des Rezeptors in die *Down*-Konformation verhindert oder nicht [110]. Sowohl sTRAK als auch TSH verhindern die *Down*-

Konformation durch einen sterischen Zusammenstoß mit der Zellmembran und zwingen den TSHR die *Up*-Konformation einzunehmen, wodurch die Signaltransduktion aktiviert wird [110]. Computergestützte Modellierungen deuten darauf hin, dass bTRAK trotz der ähnlichen Bindemodi in der LRR der Ektodomäne wie sTRAK, sowohl in der *Up*- als auch in der *Down*-Konformation des TSHR binden können, ohne einen sterischen Zusammenstoß zu verursachen. Daher könnte die blockierende Wirkung von bTRAK in der Konkurrenz mit TSH um die Bindungsstelle im TSHR liegen, wodurch der Rezeptor nicht ausschließlich die *Up*-Konformation des aktivierten Zustands, sondern auch die *Down*-Konformation des inaktivierten Zustands einnehmen kann. Der inhibierende Effekt von bTRAKs könnte daher womöglich auf einer Reduktion der Rezeptoraktivität statt auf einer vollständigen Blockierung beruhen. Welche Funktion die *Hinge*-Region in Bezug auf die Antikörperbindung und Rezeptoraktivierung einnimmt ist weiterhin umstritten [133, 147].

1.5 Klinisches Bild des Morbus Basedows

Der M. Basedow ist eine antikörpervermittelte, spezifische Autoimmunerkrankung der Schilddrüse, die durch eine daraus resultierende Störung der Schilddrüsenhormonproduktion vielfältige Auswirkungen auf die durch diese Hormone gesteuerten Organsysteme hat. Neben den auch bei anderen Schilddrüsenerkrankungen vorliegenden Symptomen der Hyperthyreose kennzeichnen den M. Basedow spezifische Symptome: die Struma und die endokrine Orbitopathie (EO) [12, 148]. Die Struma entsteht durch sTRAK vermittelte Wachstumsstimulation der Thyreozyten, wodurch es zu einer diffusen Vergrößerung der Schilddrüse kommt [149]. Durch einen nicht abschließend geklärten Mechanismus kommt es bei der EO assoziiert mit TSHR exprimierenden Fibrozyten zu einer lokalen Inflammation sowie Fett- und Bindegewebsvermehrung [150, 151]. Durch die dadurch veränderte Anatomie des Auges kommt es zu den pathognomonischen Symptomen eines Exophthalmus, einer Lidretraktion und einer Schwellung und Rötung der Augenlider und der Konjunktiven mit z. B. Augenbrennen oder vermehrtem Tränenfluss [2, 152, 153].

Durch die sTRAK kommt es zu einer Überstimulation der Schilddrüsenhormonproduktion und damit zu einer Hyperthyreose. Die betroffenen Patienten konsultieren den Arzt am häufigsten mit Symptomen wie Nervosität, Schlafstörungen, Müdigkeit, Gewichtsverlust und Palpitationen [154-156]. Durch die Effekte der Schilddrüsenhormone am Herzen kommt es zu einer Tachykardie bis hin zu Herzrhythmusstörungen und einem erhöhten systolischen Blutdruck [155, 157, 158]. Vor allem bei älteren Menschen tritt durch die Hyperthyreose

gehäuft ein Vorhofflimmern auf [159, 160]. Eine erhöhte neuromuskuläre Erregbarkeit hat gesteigerte Reflexe und häufig einen Ruhetremor zur Folge [161]. Viele Patienten klagen über ein Schwächegefühl und Muskelschmerzen [162, 163]. Die Hyperthyreose führt des Weiteren zu einer erhöhten Aktivität der Schweiß- und Talgdrüsen. Die Patienten leiden unter einer Wärmetoleranz mit warmer, feuchter Haut [154, 164, 165]. Eine erhöhte Darmmotilität hat häufig Diarrhoen zur Folge [166-168]. Zu einem hohen Leidensdruck der Patienten trägt oftmals auch ein ausgeprägter Haarausfall bei [2]. Bei Frauen führt eine Hyperthyreose durch eine Beeinflussung der Sexualhormone zu Zyklusunregelmäßigkeiten. Meist klagen sie über eine Hypo- und eine Polymenorrhoe und eine reduzierte Fertilität [169]. Männer leiden häufig unter reduzierter Libido, erektiler Dysfunktion und einer Gynäkomastie [170]. Die Symptome der Hyperthyreose sind in ihrem Auftreten und ihrer Intensität individuell sehr unterschiedlich. Bei älteren Menschen sind viele Symptome häufig nur schwach ausgeprägt [155, 171]. Bei ihnen stehen vor allem die Apathie, Tachykardie und der Gewichtsverlust im Vordergrund [172]. Deshalb wird die Hyperthyreose bei alten Menschen auch „*apathetic thyrotoxicosis*“ genannt [173].

Wie bereits erwähnt kommt es in seltenen Fällen durch bTRAK zu einer Unterfunktion der Schilddrüse mit zumeist konträren Symptomen zur Hyperthyreose.

1.6 Diagnostik des Morbus Basedows

Bei klinischem Verdacht auf eine Hyperthyreose jedweder Ursache wird zunächst der TSH-Wert bestimmt, da er für diese Erkrankung die höchste Sensitivität und Spezifität besitzt [149, 174-177]. Ergänzend wird das freie T₃ und das freie T₄ im Serum des Patienten bestimmt [178]. Unterschieden wird zwischen der manifesten Hyperthyreose, bei der die Schilddrüsenhormone erhöht sind und der subklinischen Hyperthyreose, bei der die peripheren Schilddrüsenhormone noch normwertig sind, der TSH-Wert jedoch schon supprimiert ist [175, 179]. Zur weiteren Abklärung der Ursache einer Hyperthyreose ist die Bestimmung der TRAK empfohlen [174]. Die TRAK sind hochspezifisch für einen M. Basedow. Anhand der Konzentration der gemessenen TRAK kann die Diagnose M. Basedow gestellt und eine prognostische Aussage über den Erkrankungsverlauf getroffen werden. Mit steigenden TRAK-Werten nimmt die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs der Erkrankung zu, die festgelegten Grenzwerte differieren je nach Arbeitsgruppe [180-182]. Die Einschätzung des Krankheitsverlaufs ist wichtig, da sie ein wesentliches Kriterium für die Therapieentscheidung darstellt. Des Weiteren sollte eine Sonographie der Schilddrüse erfolgen [12, 183]. Als typisches Bild des M. Basedows zeigt sich ein diffus echoarmes, inhomogenes Parenchym mit deutlicher Hypervaskularisation [2, 184,

185]. Eine Schilddrüsenszintigraphie ist aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität der TRAK in der Regel nicht mehr notwendig [174]. Wird eine Szintigraphie bei einem Patienten mit M. Basedow durchgeführt, zeigt sich charakteristischerweise eine erhöhte globale *Tracer*-Aufnahme von $> 5\%$ [2].

1.7 Therapie des Morbus Basedow

Die Therapie des M. Basedows richtet sich nach der Höhe der Schilddrüsenwerte und dem Ausmaß der Symptome. Liegt eine manifeste Hyperthyreose vor, ist durch die möglichen Komplikationen eine Therapieindikation klar gegeben. Bei einer latenten Hyperthyreose muss der Behandlungsbeginn individuell abgewogen werden [2, 179]. Bei jedem Patienten sollten bei der Therapie Faktoren wie das Alter, das Ausmaß der Hyperthyreose, das Volumen der Schilddrüse, das Vorliegen und der Schweregrad einer EO und natürlich der Willen des Patienten berücksichtigt werden [12, 186-188]. Aktuell gibt es drei verschiedene Therapieoptionen: die medikamentöse Therapie mit Thyreostatika, die Radiojodtherapie (RJT) und die chirurgische Therapie in Form einer Thyreoidektomie [189].

Bei Patienten mit einem neu diagnostizierten M. Basedow ist die medikamentöse Therapie mit Thyreostatika die Therapie der ersten Wahl [190]. Das Ziel ist zunächst das Erreichen einer euthyreoten Stoffwechsellage, die meist nach drei bis vier Wochen eintritt [12]. Als medikamentöse Therapie stehen Thyreostatika vom Thionamidtyp und vom Propylthiouraciltyp (PTU) zur Verfügung. Zu den Thyreostatika vom Thionamidtyp zählen Thiamazol und Carbimazol, wobei es sich bei Carbimazol um eine Prodrug handelt, die in der Leber in Thiamazol umgewandelt wird [191]. Durch die Hemmung der Thyreoperoxidase führen die Thyreostatika zu einer Blockierung der Schilddrüsenhormonsynthese [191]. Meist wird die Therapie mit Thyreostatika gut vertragen, wobei es zu diversen, teils schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen kann [192]. Zu den schweren Nebenwirkungen zählen die Hepatitis und die Agranulozytose, die meist innerhalb von ein bis eineinhalb Monaten nach Therapiebeginn auftreten [193-195]. Aufgrund der höheren Lebertoxizität des PTU gegenüber der Thionamide werden die Thionamide mittlerweile in den meisten Fällen dem PTU bevorzugt [196]. Zu den weniger gefährlichen Nebenwirkungen zählen allergische Hautreaktionen, Pruritus, Athralgien, Vaskulitiden und gastrointestinale Verstimmungen [191, 197]. Bei Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen muss das Thyreostatikum sofort abgesetzt werden und es muss individuell entschieden werden, ob ein Medikamentenwechsel erfolgen soll oder eine definitive Therapie angestrebt wird [191]. Die medikamentöse Therapie wird

zunächst für 12-18 Monate verabreicht [198]. Nach 12-18 Monaten thyreostatischer Therapie liegt die maximale Remissionsrate bei 50-55 % [190]. Vor dem Absetzen der Thyreostatika sollten die TRAK-Konzentrationen im Serum des Patienten gemessen werden [188, 190]. Patienten mit TRAK-Konzentrationen im Normbereich haben eine höhere Wahrscheinlichkeit eine Remission der Erkrankung zu erreichen, sodass bei ihnen die thyreostatische Therapie pausiert werden kann. Anschließend sollten die Patienten weiterhin klinisch und laborchemisch überwacht werden, da ein Rezidiv am häufigsten sechs bis 12 Monate nach Absetzen der medikamentösen Therapie auftritt, aber auch später auftreten kann [190]. Bei Patienten mit weiterhin erhöhten TRAK nach 12-18 Monaten medikamentöser Therapie liegt ein hohes Rezidivrisiko vor, sodass die thyreostatische Therapie für weitere 12 Monate unter Monitoring der TRAK-Konzentrationen fortgeführt werden sollte oder eine definitive Therapie in Form einer Radiojodtherapie oder Thyreoidektomie angestrebt werden sollte. Patienten mit schwerer Hyperthyreose, großer Struma [199, 200] oder persistierend hohen TRAK-Konzentrationen [199-203] haben ebenfalls ein höheres Risiko für das Auftreten eines Rezidivs des M. Basedows. Eine Prognosevorhersage ist zumeist schwer, daher dienen die Messung der funktionellen TRAK der Prognoseeinschätzung [190, 204, 205].

Bei Patienten mit einer mäßig vergrößerten Schilddrüse, fehlender EO und einem Rezidiv nach Absetzen der thyreostatischen Medikation bietet sich als definitive Therapie eine Radiojodtherapie an [12]. Das radioaktive Iod wird nach Erreichen einer Euthyreose appliziert. Das Iod lagert sich im Kolloid der Schilddrüse an und führt über Betastrahlung zu einer Nekrose des Schilddrüsengewebes [206]. Bei Verwendung moderater Dosen führt die RJT bei ca. 80 % der Patienten nach ein bis sechs Monaten zu einer Hypothyreose [207-210]. Potentielle Nebenwirkungen einer Radiojodtherapie sind meist moderat und selbst-limitierend [208]. Es kann zu einer strahlenbedingten Thyreoiditis mit Schmerzen und Schwellung des Halses und zu einem kurzfristigen Wiederauftreten der Hyperthyreose durch Zerstörung der Thyreozyten kommen [208, 211, 212]. Bei bereits bestehender endokriner Orbitopathie sollte eine Radiojodtherapie mit Vorsicht eingesetzt werden, da ein signifikantes Risiko des Neuauftretens oder der Verschlechterung einer vorbestehenden EO besteht [213, 214]. Bei Patienten mit einem großen Schilddrüsenvolumen ist die Radiojodtherapie meist wenig wirkungsvoll. Eine absolute Kontraindikation stellen Schwangerschaft und Stillzeit dar [175].

Bei Patienten mit großer Schilddrüse, zusätzlichem Malignitätsverdacht, schwerer endokriner Orbitopathie und einem Rezidiv nach Absetzen der thyreostatischen Medikation wird eine Thyreoidektomie empfohlen [2, 3, 215, 216]. Zu den Komplikationen einer chirurgischen

Thyreoidektomie zählen der Hyperparathyreoidismus, eine Parese des N. Laryngeus recurrens, Blutungen und Wundinfektionen. Die Komplikationsrate korreliert invers mit der Erfahrung des Chirurgen und der Größe der Schilddrüse [192, 215, 217, 218].

Die aktuell genutzten Therapeutika behandeln die allgemeinen Symptome des M. Basedows. Keine der bislang zur Verfügung stehenden Therapieoptionen richtet sich direkt gegen den Pathomechanismus des M. Basedows. Antagonisten, die an den TSHR binden und dadurch die Aktivierung des Rezeptors inhibieren scheinen vielversprechende neue medikamentöse Therapieoptionen darzustellen und sind aktuell Gegenstand intensiver Forschung [219]. Zwei Molekültypen, die als TSHR Antagonisten, neutrale Antagonisten oder TSHR inverse Agonisten wirken wurden parallel entwickelt, die TSHR-blockierenden Antikörper und die *small molecule „drug like“ Antagonisten (SMANTAG)* [220-222]. Ob die neuen Medikamente das Langzeitrisiko eines Hypothyreoidismus reduzieren, das Entwickeln einer Struma vorbeugen und ein Rezidiv der Hyperthyreose des M. Basedow verhindern können bleibt abzuwarten [223].

1.8 Aktuelle TRAK-Assays und ihre Geschichte

Die TRAK spielen eine Hauptrolle in der Pathogenese des M. Basedows und der Nachweis der TRAK im Patientenserum ist sowohl für die Diagnosestellung als auch für die Prognoseabschätzung der Erkrankung essenziell. Nach der Entdeckung der TRAK im Jahre 1956 wurden immer spezifischere und sensitivere *Assays* entwickelt, um diese TRAK im Blutserum eines Patienten zu detektieren [224]. Rees Smith und Hall veröffentlichten 1974 erstmals einen Rezeptor-*Assay* zur Messung der TRAK. Über eine einfache *Competition*-Methode konnten sie die Konzentration an TRAK, durch die Hemmung der Bindung von I-125 markiertem TSH an den TSHR, messen [225]. In den 1980er Jahren entwickelten Shewring und Rees Smith den klassischen flüssig-Phase-*Assay* mit aufgereinigtem und in Lösung gebrachtem, porcinen TSHR, der eine gute Spezifität, jedoch auf Kosten einer geringen Sensitivität besitzt [226, 227]. Durch Verbesserung der Herstellung eines rekombinanten humanen TSH-Rezeptors wurden in den frühen 1990er Jahren *Assays* entwickelt, die den porcinen TSHR durch den rekombinanten humanen TSHR ersetzen, was jedoch keinen Vorteil in Bezug auf die Spezifität und Sensitivität zur Folge hatte [228]. In den späten 1990er Jahren wurde die zweite Generation TRAK-*Assays* entwickelt, in denen der TSHR über einen monoklonalen Antikörper an eine feste Phase, ein Plastikröhrchen oder einen *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* gebunden wurde [224]. Die neuen feste-Phase-*Assay* Systeme hatten eine deutlich höhere Sensitivität ohne Verlust an Spezifität [229-231].

Die nächste Revolution erfolgte, als Sanders et al. 2003 die Entwicklung eines schilddrüse-stimulierenden monoklonalen-Antikörpers humanen Ursprungs, namens M22, beschrieben [142]. Der mAK M22 bindet an derselben Stelle an den TSHR wie die TRAK [145, 232]. Das in den bisherigen TRAK-Assays verwendete bovine TSH konnte nun in den drittgenerations Assays durch den mAK M22 ersetzt werden. Laut einer Studie der Entwickler beträgt die Spezifität dieses M22-basierten Assays 100 %, während die Sensitivität bei 95 % liegt [233]. 2009 wurde ein Bericht über den ersten vollautomatisierten Assay, Elecsys® von Roche Diagnostics (Germany), zur Detektion von TRAK veröffentlicht, der ebenfalls den mAK M22 verwendet [234]. In einer großen internationalen multizentralen Studie zeigte der automatisierte Assay eine hohe Sensitivität und Spezifität von jeweils 99 % bei einem Grenzwert von 1,75 IU/l [234, 235]. Dieser Grenzwert für Positivität von 1,75 IU/l wird heute in der klinischen Routine eingesetzt [224]. Großer Vorteil des vollautomatisierten Assays ist die kurze Durchführungszeit von weniger als 30 Minuten und die gute Integrierbarkeit in den Arbeitsalltag eines Routinelabors [236]. Insgesamt kam es durch die Entwicklung der neueren Assays zu einem kontinuierlichen Anstieg der Sensitivität und Spezifität der TRAK Messung [237, 238].

In Studien konnte gezeigt werden, dass ein starker Zusammenhang zwischen der Konzentration an sTRAK und der Aktivität und dem Schweregrad eines M. Basedows und einer EO vorliegen [239, 240]. Ein Nachteil aller Assays, die nach der *Competition*-Methode funktionieren ist, dass sie nicht zwischen stimulierenden und blockierenden TRAK unterscheiden können. Um gezielt die sTRAK messen zu können werden *Bioassays* eingesetzt, für die Zellkulturen benötigt werden, wie z. B. porcine Primärzellen, humane Thyreozyten oder *Fischer rat thyroid follicle-5*-Zellen (*FRTL-5*). In den Zellkulturen wird nach Bindung der TRAK die gesteigerte Produktion von cAMP in den Thyreozyten gemessen. Die *Bioassays* haben ebenso wie die *Competition-Assays* eine hohe Spezifität und Sensitivität [240, 241]. Die Messmethode der *Bioassays* ist allerdings sehr zeit- und arbeitsaufwendig und somit nicht für die diagnostische Routine bei Patienten mit M. Basedow geeignet [242]. Durch diverse Weiterentwicklungen, wie z.B. den chimären TSH-Rezeptor Mc4, konnte eine Vereinfachung der *Bioassays* erfolgen [239]. 2015 beschrieb eine japanische Arbeitsgruppe einen neuen *Bioassay*, der den Vorteil hat unter unsterilen Bedingungen und innerhalb von vier Stunden durchführbar zu sein [243].

1.9 Aufbau des ersten automatisierten Bridge-Assays

Vor dem Hintergrund der vielfältig vorhandenen, aber in der klinischen Routine nicht massenhaft einsetzbaren Testmöglichkeiten für sTRAK sind spezifischere und gleichzeitig in der klinischen Routine verwendbare *Assays* Gegenstand aktueller Forschung. Kürzlich veröffentlichten Frank et al. ein neues *Assay*-System, das eine vollkommen neue Methode zur Messung der Antikörper verwendet und von sich behauptet gezielt die sTRAK messen zu können. Dieser neue *Assay* wird als *Bridge-Assay* bezeichnet, da er auf dem Prinzip basiert, dass die zwei Antigenbindungsstellen eines TRAK eine Brücke zwischen zwei unterschiedlichen TSHR-Molekülen bilden [244]. Mit dem Namen *Immolute TSI assay* von Siemens Healthcare Diagnostics liegt der *Bridge-Assay* als automatisierte, kommerziell erhältliche Version vor. Der *Immolute Assay* besitzt zwei rekombinante humane TSHR, den *Capture*-Rezeptor und den Signalrezeptor (siehe Abb. 3). Der *Capture*-Rezeptor ist ein chimärer humaner TSHR, dessen N-terminaler Teil die sTRAK bindet. Die Aminosäuren 261-370, sind durch eine äquivalente Region des LHCG Rezeptors der Ratte ersetzt [244]. Der *Capture*-Rezeptor ist durch einen Antikörper, der an den zytosolischen Teil des TSHR bindet an eine feste Phase gebunden. Die Dichte des *Capture*-Rezeptors ist so gewählt, dass durch die räumliche Enge nur ein Arm eines Antikörpermoleküls mit ihm interagieren kann. Der Signalrezeptor besteht aus den Aminosäuren 21-261 des N-Terminus der chimären extrazellulären Domäne des TSHR. Er ist mit einer sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) verbunden und befindet sich in der Pufferlösung. Bindet der, mit einem Arm an den *Capture*-Rezeptor gebundene, Antikörper mit dem anderen Arm an den Signalrezeptor, reagiert die SEAP mit einem lumineszierenden Substrat. Die Intensität der Lumineszenz korreliert positiv mit der Konzentration an gebundenen sTRAK. Durch die genetisch konstruierten chimären humanen TSHR wird die Messung der sTRAK durch deren direkte Erkennung der beiden Epitope ermöglicht [244].

Die Voraussetzung dafür, dass dieser *Assay* nur die stimulierenden TRAK misst, liegt in der Annahme, dass stimulierende und blockierende TRAK an unterschiedliche Epitope des TSHR binden. In Studien konnte gezeigt werden, dass stimulierende TRAK an die N-terminale Region der extrazellulären Domäne zwischen Aminosäure 25-165 binden und blockierende TRAK zwischen Aminosäure 261-370 an der C-terminalen Region der extrazellulären Domäne [140]. Durch das Ersetzen der Aminosäuren 261-370 der C-terminalen Region können blockierende TRAK dieser Annahme folgend nicht mehr an den Rezeptor binden und kein Signal auslösen.

Frank et al. führten eine Studie zur analytischen und klinischen Evaluation des *Bridge-Assays* durch. Der *Bridge-Assay* zeigte in der Studie der Arbeitsgruppe einen Messbereich für sTRAK zwischen 0.3 IU/l bis 50 IU/l [244]. Der errechnete Grenzwert für Positivität lag bei 0.54 IU/l, während die funktionelle Sensitivität 0.3 IU/l betrug. Die Sensitivität lag bei 99.8 %, die Spezifität betrug 99.1 %. Die untere Grauzone lag bei 0.3-0.54 IU/l. Damit zeigte der neue *Bridge-Assay* eine bessere Sensitivität und Spezifität, als der zum Vergleich benutzte TRAK *Competition-Assay*. Im Serum von drei Patienten mit M. Basedow und klinischer und biochemisch nachgewiesener Hypothyreose wurden in der Studie von Frank et al. mittels *Competition-Assay* TRAK oberhalb des Grenzwertes für Positivität gemessen, während mittels *Bridge-Assay* nur in einem der drei Patienten sTRAK im niedrigen Konzentrationsbereich gemessen werden konnten. In neu diagnostizierten und noch unbehandelten Patienten mit M. Basedow korrelierten die mittels *Bridge-Assay* gemessenen sTRAK Konzentrationen signifikant mit der T₄ Konzentration. Eine relativ geringe Korrelation zeigte sich zwischen den mittels *Competition-Assay* gemessenen TRAK Konzentrationen und der Höhe der T₄ Konzentration [244]. Frank et al. schlussfolgerten aus den Ergebnissen in der von ihnen durchgeführten Studie, dass der *Bridge-Assay* ausschließlich die sTRAK misst. Dagegen sprach jedoch die Tatsache, dass der humane monoklonale AK K1-70, der blockierende Eigenschaften besitzt, eine Bindungsaktivität im *Bridge-Assay* zeigte, jedoch eine deutlich niedrigere Bindungsaktivität als im *Competition-Assay* [244]. Dieses Phänomen erklären die Autoren durch die in mehreren Studien gezeigte Heterogenität der Epitope der bTRAK, die zeigten, dass bTRAK nicht ausschließlich an den C-Terminus des TSHR binden, sondern auch an den N-Terminus des TSHR binden können [91, 128, 245, 246].

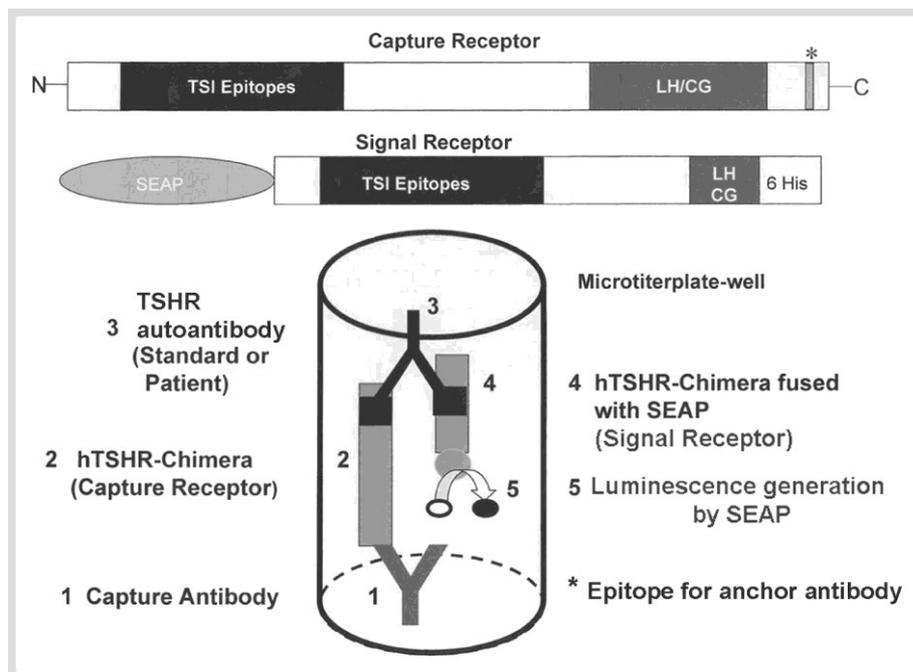


Abb. 1.2: **Schematischer Aufbau des Bridge-Assays (Frank et al. 2015).** Der Capture-Rezeptor (2) ist ein chimerer humaner TSHR, dessen N-terminaler Teil die sTRAK bindet, die Aminosäuren 261-370 des Capture-Rezeptors sind durch eine äquivalente Region des LH/CG Rezeptors ersetzt, er ist über einen Antikörper (1) an eine feste Phase gebunden. Der sTRAK (3) bindet mit einem Arm an den N-Terminus des Capture-Rezeptors und mit dem anderen Arm an den Signalrezeptor (4). Der Signalrezeptor besteht aus den Aminosäuren 21-261 des N-Terminus der chimeren extrazellulären Domäne des TSHR. Er ist mit einer sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) (5) verbunden. Bindet der, mit einem Arm an den Capture Rezeptor gebundene, Antikörper mit dem anderen Arm an den Signalrezeptor, reagiert die SEAP mit einem lumineszierenden Substrat [244]. Reproduktion in freundlicher Genehmigung von Frank et al. *Reproduction in permission from Frank et al., Copyright Georg Thieme Verlag.*

1.10 Ziele der Arbeit

Als zweithäufigste autoimmune Schilddrüsenerkrankung ist der M. Basedow häufiger Gegenstand laborchemischer Untersuchungen. Da die funktionelle Aktivität der TRAK bislang nur durch zeitaufwendige und teure *Bioassays* bestimmbar ist, liegt die Herausforderung in der Entwicklung eines *Assays*, der sowohl in die Routine eines Kliniklabors integrierbar ist als auch die Aktivität der TRAK spezifisch messen kann. Das Ziel dieser Studie ist ein Vergleich des bisher eingesetzten TRAK-*Assays* mit der isolierten Messung der stimulierenden TRAK eines chimeren *Bridge-Assays*. Dabei galt ein besonderes Augenmerk auf der Fragestellung, ob der *Bridge-Assay* in der Lage ist gezielt die stimulierenden TRAK zu messen und auf der Untersuchung der prognostischen Aussagefähigkeit der stimulierenden TRAK über den Krankheitsverlauf bei bestehendem M. Basedow im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv (Autoimmunthyreoiditis- (AIT), Struma nodosa, Schilddrüsenkarzinom-Patienten und schilddrüsengesunde Patienten).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektive

Zur Evaluation des ersten automatisierten *Bridge-Assays* zur Detektion von stimulierenden TRAK wurden Blutproben von Patienten mit M. Basedow zur Bestimmung der TRAK bzw. sTRAK im Serum akquiriert. Als Kontrollgruppe wurden die TRAK bzw. sTRAK im Serum von Patienten mit AIT, Struma nodosa, Schilddrüsenkarzinomen und schilddrüsengesunden Kontrollpersonen gewonnen. Im Rahmen der Routineblutentnahme, die für die klinische Untersuchung von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen notwendig sind, wurde jeweils ein weiteres Serum-Röhrchen Blut (5 ml) entnommen.

Kohorte	Anzahl (n)	Geschlecht (m/f)	Ø Alter (Jahre)	Altersspanne (Jahre)
M. Basedow	226	43/183	46	18-87
AIT	57	9/48	47	17-75
Struma nodosa	74	16/58	58	14-85
Schilddrüsenkarzinome	47	16/31	56	18-78
Schilddrüsengesunde	41	11/30	44	22-67
Kontrollen				

Tabelle 2.1 Metrische Daten der Kohorten Anzahl (n), Geschlechterverhältnis männlich/weiblich (m/f), Durchschnittsalter in Jahren und Altersspanne in Jahren der analysierten Patienten mit M. Basedow, Autoimmunthyreoiditis (AIT), Struma nodosa, Schilddrüsenkarzinomen und schilddrüsengesunden Kontrollen.

Das M. Basedow Kollektiv wurde mittels initial dokumentiertem Hyperthyreoidismus mit erhöhten Serum Konzentrationen von freiem T₄ und T₃, einem erniedrigten basalen TSH Wert und einem Nachweis von TRAK im Patientenserum differenziert. Innerhalb des M. Basedow Kollektivs wurde zwischen Patienten mit der Erstdiagnose eines M. Basedow und Patienten, die bereits eine thyreostatische Therapie erhalten hatten, unterschieden. In der hier durchgeführten Studie hatten 30 Patienten einen neu diagnostizierten M. Basedow, während 196 Patienten bereits eine thyreostatische Medikation erhalten hatten. Von den bereits behandelten Patienten wurden die Blutabnahmen bei 25 Erkrankten innerhalb der ersten drei

Monate nach Erstdiagnose, bei 21 Erkrankten innerhalb von sechs Monaten und bei 30 Erkrankten innerhalb von 12 Monaten nach Erstdiagnose abgenommen. Bei 120 Patienten wurde die Blutprobe nach einer Zeitspanne von mehr als 12 Monaten nach der initialen Diagnose des M. Basedow abgenommen. Im Mittel betrug bei dieser Patientengruppe die Zeit zwischen Erstdiagnose und Blutentnahme 77 Monate.

	Erstdiagnose M. Basedow	Bereits thyreostatisch behandelte Patienten mit M. Basedow			
Anzahl (n)	30	196			
Therapiedauer		< 3 Monate	3-6 Monate	6-12 Monate	> 12 Monate
Anzahl (n)		25	21	30	120

Tabelle 2.2 Metrische Daten der bereits erfolgten Therapiedauer des M. Basedow Kollektivs zum Zeitpunkt der Blutentnahme Anzahl (n) der Patienten mit der Erstdiagnose eines M. Basedow und Anzahl (n) der Patienten mit M. Basedow, die bereits eine thyreostatische Therapie innerhalb der ersten 3 Monate nach Erstdiagnose, innerhalb von 3-6 Monaten, 6-12 Monaten und >12 Monate nach der Erstdiagnose des M. Basedows erhalten hatten.

Das Kriterium für das Patientenkollektiv der Autoimmunthyreoiditis war der Nachweis einer Hypothyreose mit erniedrigtem fT3 und fT4 und erhöhtem TSH Wert und das Vorliegen von positiven Anti-Thyreoperoxidase Antikörpern (Anti-TPO AK) und ggfs. Anti-Thyreoglobulin Antikörper (Anti-TG AK). Als weiteres Kriterium wurde der für eine AIT in der Sonographie typische Befund eines echoarmen, teils inhomogenen Parenchyms mit verminderter Vaskularisierung und kleinem Schilddrüsenvolumen herangezogen.

Als Einschlusskriterium für das Patientenkollektiv Struma nodosa diente der sonographische Nachweis eines Knotens mit funktioneller Darstellung eines warmen Areal in der anschließenden Szintigraphie ohne Anhalt einer autoimmunen Komponente, also ohne Nachweis von Autoantikörpern im Blut.

Einschlusskriterium für das Patientenkollektiv mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom war ein durch eine Feinnadelbiopsie zytologisch oder nach operativer Therapie histologisch gesicherter Befund eines Karzinoms. In dem Kollektiv der Schilddrüsenkarzinome waren 37 Patienten mit der Diagnose eines papillären Schilddrüsenkarzinoms und 12 Patienten mit der

Diagnose eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms. Jeweils ein Patient war an einem anaplastischen und einem schlecht differenzierten Karzinom erkrankt.

Als Kontrollen wurden nach schriftlichem Einverständnis freiwillige Probanden mit bisher blander Schilddrüsenanamnese herangezogen. Der Durchführung dieser Studie wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität zugestimmt, Studiennummer 5380.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Handelsname	Firma	Firmensitz
Serummonovette	BD Vacutainer® SSTTM II Advance Röhrchen	BD	Heidelberg, Deutschland
Blutentnahmeset	BD Vacutainer safety lok	BD	Heidelberg, Deutschland
Desinfektionsmittel	Kodan Tinktur forte farblos	Schülke	Norderstedt, Deutschland
Halter/Vacutainer	Pre-Attached BD Einmalhalter mit Luer-Ansatzstück	BD	Heidelberg, Deutschland
Tupfer, Pflaster, Handschuhe			

Tabelle 2.3 verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Testkits

Handelsname	Messgröße	Hersteller	Firmensitz
Immolute 2000	Anti-TG-AK,	Siemens	Erlangen,
Immunoassays	Anti-TPO-AK	Healthineers	Deutschland
Elecsys [®] Immunoassays	fT ₃ , fT ₄ , TSH,	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Elecsys anti TSHR electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA)	TRAK	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Immolute TSI 2000 Immunoassay	sTRAK	Siemens Healthineers	Erlangen, Deutschland

Tabelle 2.4 verwendete Testkits

2.1.4 Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Immolute 2000 XPi Immunoassay	Immunoassay System	Siemens Healthineers	Erlangen, Deutschland
Elecsys [®] Immunoassays	Immunoassay System	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Cobas E602	Immunoassay System	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland

Tabelle 2.5 verwendete Geräte

2.1.5 Software

Anwendung	Software	Hersteller	Firmensitz
Datenerhebung	MEDICO	CompuGroup Medical	Koblenz, Deutschland
Statistische Auswertung	Microsoft Excel 2016 Prism 6	Microsoft GraphPad	Redmond, USA La Jolla, USA
Abbildungserstellung	CorelDRAW Graphic Suite pyMOL RCSB Proteindatenbank	Corel Corporation Schrödinger LLC PDB, https://www.rcsb.org	Ottawa, Kanada New York, USA

Tabelle 2.6 *Verwendete Software*

2.2 Methoden

2.2.1 Messung der TRAK und sTRAK Konzentrationen

Die in diese Studie eingeschlossenen Patienten stammen aus dem Patientenkollektiv des Funktionsbereiches Spezielle Endokrinologie der Universitätsklinik Düsseldorf. Es erfolgte die periphervenöse Punktion mit Abnahme einer Serummonovette im Rahmen der routinemäßigen Blutabnahmen nach schriftlich erhaltenem Einverständnis. Dem Kollektiv der schilddrüsengesunden Kontrollgruppe wurde ebenfalls nach schriftlichem Einverständnis durch eine periphervenöse Punktion eine Serummonovette entnommen. Anschließend erfolgte die Untersuchung des Serums mittels des neuen automatisierten *Bridge-Assays* auf die Existenz von sTRAK. Diese Untersuchung erfolgte durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf. Parallel hierzu wurden Serumproben einer früheren Antikörperstudie auf die Existenz von sTRAK untersucht (Ethikkommissionsnummer 3354).

2.2.2 Schilddrüsenfunktionstests und Antikörper-Assays

Das Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf führte nach Entnahme der Serummonovetten die Messungen der Serum-Konzentrationen von TSH, fT₄ und fT₃ mittels kommerziell erhältlichem elektrochemilumineszenz *Assay* von *Roche Diagnostics* durch. Die

Anti-TG-AK und die Anti-TPO-AK wurden ebenfalls nach Angaben des Herstellers durch das Zentrallabor mittels kommerziell erhältlichem *Immunoassay* von Siemens gemessen (*Immulite 2000*).

Als Referenzwert für TSH wurden Werte zwischen 0,3-4,1 IU/l mit einem unteren Grenzwert von 0,01 IU/l verwendet. Der Referenzwert für fT4 lag bei 9,1-19,1 pg/ml und für fT3 bei 2,6-5,1 ng/l. Die Anti-TG-AK wurden bei < 40 IU/l und die Anti-TPO AK bei < 35 IU/l als normwertig gewertet.

2.2.3 Messung der TSH-Rezeptor Antikörper

Zum Vergleich des bislang routinemäßig durchgeführten *Competition-Assays* mit dem ersten chimären *Bridge-Assay* zur Detektion der stimulierenden TRAK wurden in den entnommenen Serumproben jeweils die TRAK mittels *Competition-Assay* sowie die sTRAK mittels *Bridge-Assay* gemessen. Auch diese Messungen wurden freundlicherweise durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

Für den neuen und in dieser Studie evaluierten *Bridge-Assay* wurde der automatisierte, zweizyklische, chemilumineszierende *Immunoassay Immulite TSI 2000* von Siemens verwendet. Dieser *Assay* besteht aus einem Paar rekombinanter humaner TSH-Rezeptoren. Der *Capture-Rezeptor* ist an eine feste Phase gebunden (Polystyrol Tropfen), während sich der Signal Rezeptor, der eine alkalische Phosphatase enthält, in einer Puffer Lösung befindet. Im ersten Zyklus wird die Probe für 30 Minuten auf der festen Phase inkubiert, was es den sTRAK aus der Probe erlaubt mit einem Arm an den *Capture-Rezeptor* zu binden. Danach wird durch Spülungen und Zentrifugation die überschüssige Probe entfernt. Im zweiten Zyklus wird der Signal Rezeptor zur Probe hinzugegeben und wieder für 30 Minuten inkubiert. Die sTRAK binden nun mit dem anderen Arm an den Signal Rezeptor und formen so eine Brücke. Erneut wird die Probe gespült und zentrifugiert, um die ungebundenen Signal Rezeptoren zu entfernen. Im letzten Schritt wird das chemilumineszierende Substrat hinzugegeben und somit ein Signal generiert, das in direkter Korrelation mit der Menge der vorhandenen sTRAK steht. Die Inkubationszyklen dauern zweimal 30min. Die Messbreite für sTRAK liegt zwischen 0,1-0,40 IU/l.

Als *Competition-Assay* wurde der *Elecsys anti TSHR electrochemilumineszens Immunoassay (ECLIA)* in einem *Cobas e 602 Analyzer* von *Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim, Deutschland, gemessen. Dieser *Assay* wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Im Rahmen der Studienplanung wurde eine retrospektive Analyse der Krankenakten aller in der Studie eingeschlossenen Patienten durchgeführt. Mithilfe der Krankenhaussoftware MEDICO wurde das Alter des Patienten, das Patientengeschlecht, die Diagnose, der Zeitpunkt der Erstdiagnose, der Verlauf der Erkrankung (u. a. EO, Remission, Rezidiv) und die erfolgte Therapie (medikamentöse Therapie, RJT, OP) in einer *Microsoft Excel* Tabelle erfasst. Nach Erhebung der Daten erfolgte die anonymisierte statistische Auswertung mittels *Microsoft Excel* und der *Prism Computer Software* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Mittels einer *Receiver-Operating Characteristic (ROC)* Analyse wurde der Grenzwert für ein positives Ergebnis, bei dem die optimalen Sensitivitäts und Spezifitätswerte erreicht werden, ermittelt [247].

Vergleiche für Ergebnisse mit einer Gauss'schen Standardverteilung wurden mittels ANOVA-test und *Dunnett's multiple comparison test* gezogen. Für Ergebnisse ohne Normalverteilung wurden der *Kruskal-Wallis test* und der *Dunn's multiple comparison test* hinzugezogen. Korrelations-Analysen wurden mittels *Spearman's test* erstellt. Um die Patienten zu überprüfen, die einen sTRAK oder TRAK Wert über- oder unterhalb der zweifachen Positivität hatten, wurden Kontingenztabelle mithilfe *chi-square tests* analysiert. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich des vorgeschlagenen und errechneten Grenzwertes des *Bridge-Assays*

Zur Berechnung des optimalen Grenzwertes wurde anhand der ROC-Plot Analyse die optimale Sensitivität und Spezifität des *Bridge-Assays* ermittelt. Zur Berechnung der Spezifität wurden die Daten der 41 schilddrüsengesunden Patienten und der 180 Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen (Autoimmunthyreoiditis, Struma nodosa und Schilddrüsenkarzinome), mit Ausnahme der Patienten mit M. Basedow, verwendet. Die Berechnung der Sensitivität erfolgte aus den Daten der Patienten mit neu diagnostiziertem M. Basedow. Wie in Abbildung 1a dargestellt betrug die *Area under the Curve (AUC)* für den automatisierten *Bridge-Assay* 0,9994 (95 % KI: 0,9981 bis 1,001). Die optimalen Werte für Sensitivität und Spezifität wurden bei einem Grenzwert von $\geq 0,55$ IU/l erreicht. Bei diesem Grenzwert lag die errechnete Sensitivität bei 100 % (95 % KI: 88,43 bis 100,0 %), während die Spezifität 99 % betrug (95 % KI: 96,80 bis 99,89 %). Der dazugehörige positiv prädiktive Wert (PPW) wurde mit 94 % errechnet, während der negativ prädiktive Wert (NPW) bei 100 % lag. Die errechneten Daten sind in Einklang mit den Angaben des Herstellers, der seinen Grenzwert für positive sTRAK mit 0,55 IU/l angibt. Die Daten sind in Abb. 1b in einem Gerhardt-Plot dargestellt.

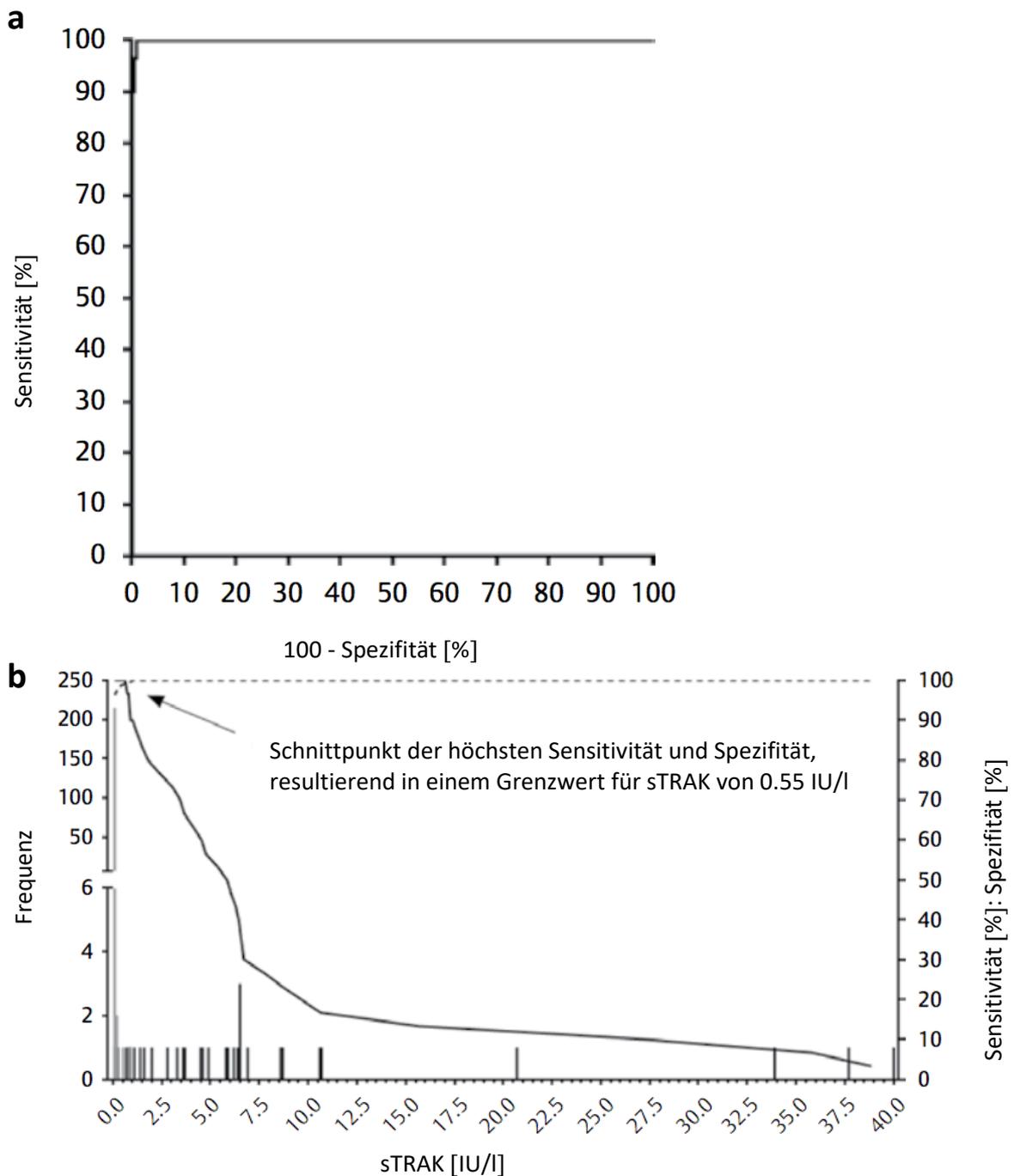


Abb. 3.1a: **ROC Plot Analyse mit Daten von neu diagnostizierten M. Basedow Patienten für die Sensitivität und Daten der Schilddrüsengesunden und Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen, mit Ausnahme der M. Basedow Patienten, zur Errechnung der Spezifität.** Dargestellt ist 100 % - Spezifität auf der x-Achse und die Sensitivität in % auf der y-Achse. Die Area under the curve (AUC) beträgt 0,9994 (95% KI: 0,9981-1,001)

Abb. 3.1b: **Gerhardt Plot mit der Verteilungsfrequenz der Patienten je nach sTRAK Serum-Level.** Graue Balken zeigen schilddrüsengesunde Kontrollen, Patienten mit AIT, Struma nodosa und Schilddrüsenkarzinomen. Schwarze Balken zeigen neu diagnostizierte M. Basedow Patienten. Basierend auf diesen Daten zeigt die durchgehende Linie die Sensitivität, während die gestrichelte Linie die Spezifität darstellt. Der Schnittpunkt beider Linien zeigt den errechneten Grenzwert des Assays. sTRAK Werte > 40 IU/l wurden als 40 festgelegt. [248]

Eine zweite ROC-Plot Analyse wurde durchgeführt, in der die Patienten mit M. Basedow miteingeschlossen wurden, die bereits seit ≤ 6 Monaten eine thyreostatische Therapie erhalten hatten. Wie in Abbildung 2a dargestellt betrug die AUC 0,9987. Der errechnete Grenzwert für positive sTRAK lag bei $\geq 0,30$ IU/l, die Sensitivität für diesen Grenzwert lag bei 99 % (95 % KI: 92,79 bis 99,97 %), während die Spezifität bei 98 % lag (95 % KI: 95,47 bis 99,51 %). Der PPW für positive sTRAK lag bei 95 % und der NPW lag bei 100 %. Diese Daten sind in Abb. 2b ebenfalls in einem Gerhardt Plot dargestellt.

Bei Verwendung des vorher für neu diagnostizierte Patienten mit M. Basedow errechneten Grenzwertes von $\geq 0,55$ IU/l ergab sich für die bereits seit ≤ 6 Monaten thyreostatisch behandelten Patienten eine Sensitivität von 96 % (95 % KI: 88,75 bis 99,17 %) und eine Spezifität von 99 % (95 % KI: 96,80 bis 99,89 %). Der PPW für positive sTRAK wurde hier mit 97 % berechnet, während der NPW bei 99 % lag.

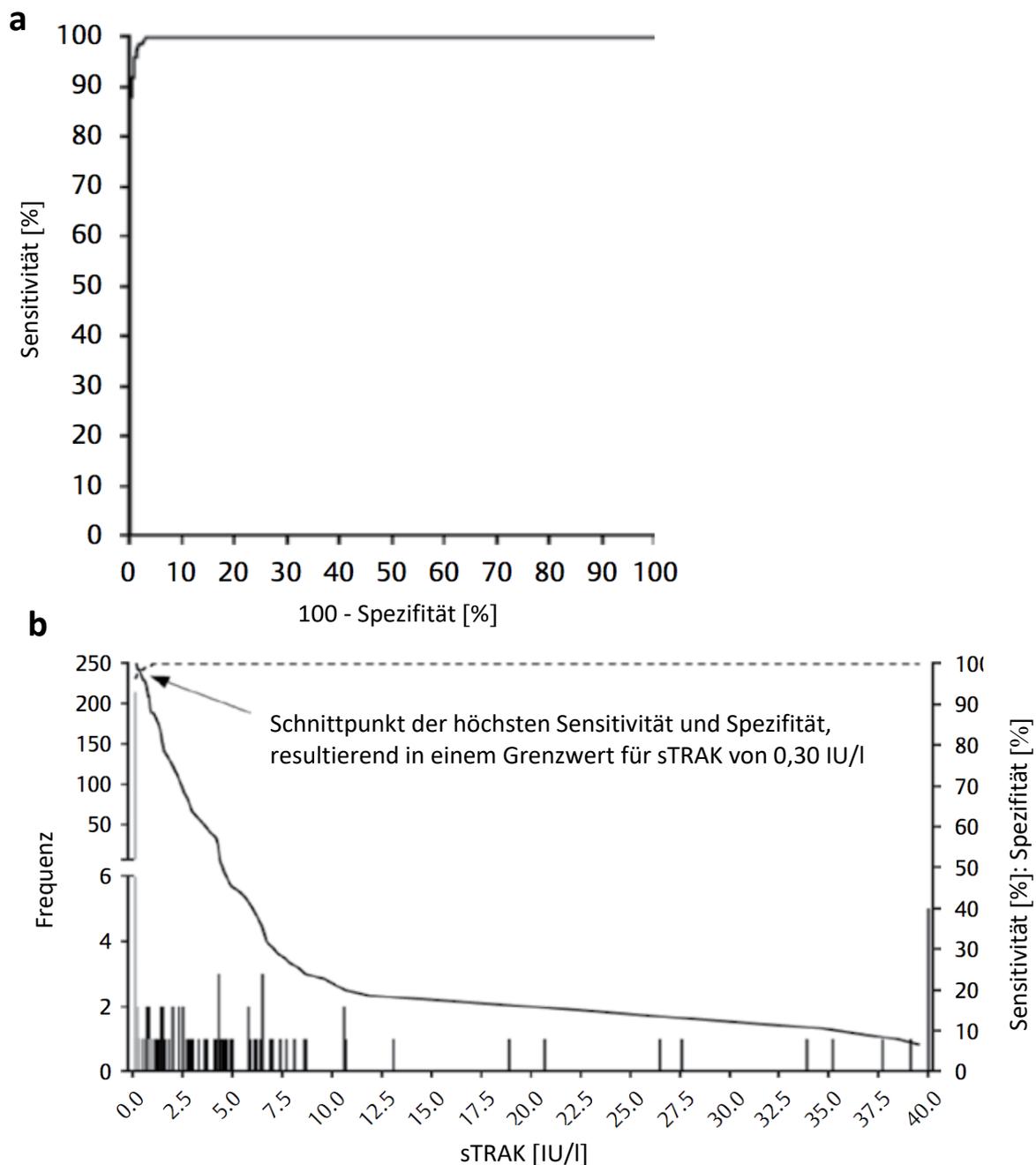


Abb. 3.2a: **ROC-Plot Analyse mit den Daten der Patienten mit M. Basedow, die bereits seit ≤ 6 Monaten eine thyreostatische Therapie erhielten, für die Berechnung der Sensitivität und gesunden Kontrollen, AIT-Patienten, Struma nodosa- und Schilddrüsenkarzinom Patienten zur Berechnung der Spezifität.** Dargestellt ist 100 % - Spezifität auf der x-Achse und die Sensitivität in % auf der y-Achse. Die Area under the curve (AUC) beträgt 0,9987 (95 % KI: 0,9970-1,000)

Abb. 3.2b: **Gerhardt Plot mit der Verteilungsfrequenz der Patienten basierend auf deren sTRAK Serum-Level.** Graue Balken zeigen gesunde Kontrollen, Patienten mit AIT, Struma nodosa und Schilddrüsenkarzinomen. Schwarze Balken zeigen M. Basedow Patienten, die seit ≤ 6 Monaten eine thyreostatische Therapie erhielten. Basierend auf diesen Daten zeigt die durchgehende Linie die Sensitivität, während die gestrichelte Linie die Spezifität darstellt. Der Schnittpunkt beider Linien zeigt den errechneten Grenzwert des Assays. sTRAK Werte > 40 IU/l wurden als 40 festgelegt. [248]

3.2 Klinische Evaluation des *Bridge-Assays* und Vergleich mit dem automatisierten *Competition-Assay*

In der hier vorliegenden Studie wurde eine Messung der TRAK mittels *Competition-Assay* und eine Messung der sTRAK mittels *Bridge-Assay* durchgeführt. Wie in Abbildung 3 dargestellt konnten beide *Assay*-Systeme signifikant Patienten mit M. Basedow erkennen ($p < 0,0001$). Der automatisierte *Bridge-Assay* identifizierte 186 von 226 M. Basedow Patienten, was 82 % entspricht, während der *Competition-Assay* 178 von 226 M. Basedow Patienten identifizierte, entsprechend 79 %. Hierbei zeigte sich keine Signifikanz.

Bezüglich der Messung der TRAK mittels *Competition-Assay* und der sTRAK mittels *Bridge-Assay* zeigten sich Unterschiede in den Patientengruppen mit Schilddrüsenerkrankungen, die nicht an einem M. Basedow erkrankt waren. Im *Competition-Assay* zeigten sich bei vier der 180 Patienten, die an anderen Schilddrüsenerkrankungen als dem M. Basedow litten, positive TRAK, entsprechend 2,2 %. Die TRAK zeigten sich bei einem Patienten mit AIT, einem Patienten mit Struma nodosa und zwei Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen oberhalb des Grenzwertes für Positivität. Im Vergleich dazu konnten im *Bridge-Assay* nur bei zwei Patienten aus der Gruppe der AIT positive sTRAK oberhalb des Grenzwertes für Positivität gemessen werden. In der Gruppe der Patienten mit Struma nodosa und Schilddrüsenkarzinomen zeigten sich im *Bridge-Assay* keine positiven Werte für sTRAK. Der Anteil von positiven sTRAK bei Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen, die nicht an einem M. Basedow erkrankt sind, liegt demnach im *Bridge-Assay* nur bei 1,1 %. Auch in Bezug auf die ermittelten Autoantikörper unterhalb des Grenzwertes für Positivität zeigten sich Unterschiede. Mittels *Bridge-Assay* konnten lediglich bei fünf Patienten der Schilddrüsenerkrankten, die nicht an einem M. Basedow leiden, sTRAK unterhalb des Grenzwertes für Positivität gemessen werden, entsprechend 2,8 %. Unter den fünf Patienten befanden sich drei Patienten aus der Gruppe der AIT und zwei Patienten aus der Gruppe der Schilddrüsenkarzinome. Im Vergleich dazu konnten bei 74 von 180 Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen, die nicht an einem M. Basedow erkrankt sind, mittels *Competition-Assay* TRAK unterhalb des Grenzwertes für Positivität gemessen werden, entsprechend 41 %. Unter den 74 Patienten befanden sich sowohl Patienten mit AIT und Schilddrüsenkarzinomen als auch Patienten mit Struma nodosa. Die Daten sind in Abbildung 3a und 3b dargestellt.

	AIT Anzahl (n)	Struma nodosa Anzahl (n)	Schilddrüsenkarzinome Anzahl (n)	Schilddrüsengesunde Kontrollen Anzahl (n)
Competition				
Assay				
TRAK > 1,75 IU/L	1	1	2	0
TRAK < 1,75 IU/l	30	24	19	1
Bridge Assay				
sTRAK > 0,55 IU/l	2	0	0	0
sTRAK < 0,55 IU/l	3	0	2	0

Tabelle 3.1 Anzahl (n) der nicht an M. Basedow erkrankten Patienten (AIT, Struma nodosa, Schilddrüsenkarzinomen und schilddrüsengesunden Kontrollen) mit TRAK bzw. sTRAK Konzentrationen oberhalb und unterhalb des jeweiligen Grenzwertes für Positivität.

Da beide Assay-Systeme durch Kalibrierung gegen zwei unterschiedliche WHO Standards unterschiedliche Grenzwerte für positive sTRAK und TRAK besitzen, wurde in einer weiteren Berechnung der Grenzwert für Positivität auf 1 festgesetzt und die Abweichungen als Multiplen des Grenzwertes dargestellt. Die Daten sind in Abbildung 3c und 3d dargestellt.

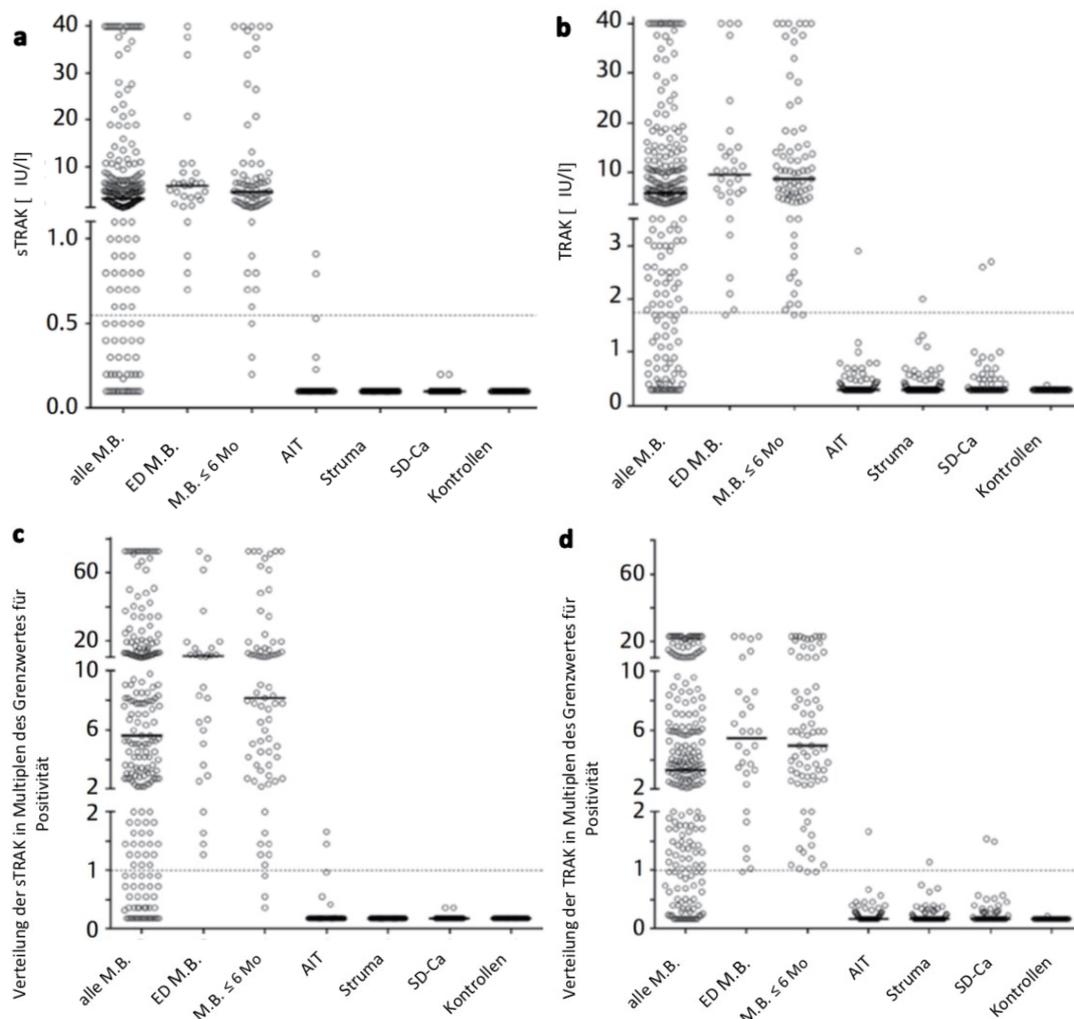


Abb. 3.3: *sTRAK* und *TRAK* Konzentrationen im Verhältnis zu deren Grenzwert für Positivität. Verteilung der gemessenen *sTRAK* und *TRAK* Konzentrationen (a und b) und Verteilung der *sTRAK* und *TRAK* in Multiplen des Grenzwertes für Positivität (c und d) bei Patienten mit M. Basedow (alle M.B.) unabhängig von deren Erkrankungsstadium, neu diagnostizierten M. Basedow Patienten (ED M.B.), M. Basedow Patienten mit thyreostatischer Therapie ≤ 6 Monate (M.B. ≤ 6 Mo), Autoimmunthyreoiditis (AIT), Struma nodosa (Struma), Schilddrüsenkarzinomen (SD-Ca) und schilddrüsengesunden Kontrollen (Kontrollen). Die Grenzwerte für Positivität entsprechen den Empfehlungen der Hersteller: Bridge-Assay zur Detektion der *sTRAK*: 0,55 IU/l, Competition-Assay zur Detektion der *TRAK*: 1,75 IU/l. [248]

Bei beiden Assays zeigte sich ein ähnliches Bild. Durch eine detailliertere Analyse konnten jedoch signifikante Unterschiede im Vergleich beider Assays aufgezeigt werden. Bei Erhöhung des Grenzwertes auf das Zweifache der Positivität zeigte sich eine signifikant höhere Korrelation zwischen positiven und negativen Patienten für *sTRAK* im Vergleich zu *TRAK* (70/30 gegen 59/41 %; $p = 0,0131$).

Zusätzlich wurde eine Korrelationsanalyse zwischen dem *Bridge-Assay* und dem *Competition-Assay* durchgeführt, um beide Assay Systeme miteinander zu vergleichen. Dabei wurde eine

starke Korrelation zwischen sTRAK und TRAK gesehen (*Spearman* $r = 0,8738$; $p < 0,0001$). Die Analyse ist in Abb. 4 dargestellt.

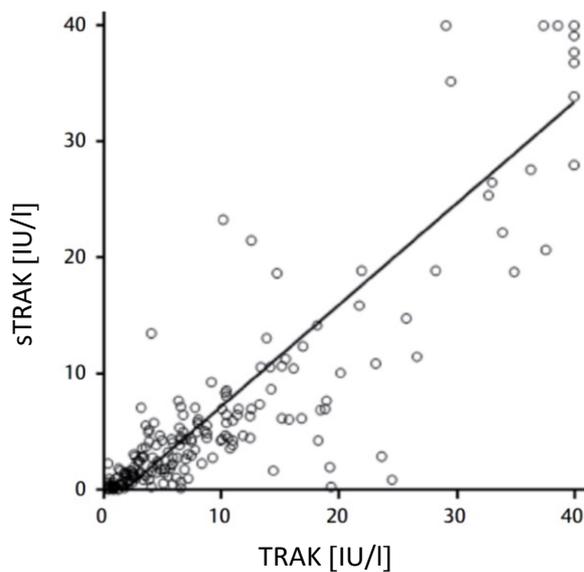


Abb. 3.4: **Korrelation zwischen sTRAK und TRAK.** Auf der x-Achse aufgetragen sind die Konzentration der TRAK in IU/l, auf der y-Achse aufgetragen zeigen sich die sTRAK Konzentrationen in IU/l. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen sTRAK und TRAK-Serum-Konzentrationen bei allen Patienten mit M. Basedow (*Spearman* $r = 0,8738$; $p < 0,0001$) [248].

3.3 TSH Rezeptor Autoantikörper im zeitlichen Verlauf

Um einen Eindruck vom Verlauf der Autoantikörper-Konzentrationen im Serum der Patienten mit M. Basedow während der Therapie zu bekommen, wurden die sTRAK und TRAK Konzentrationen im zeitlichen Verlauf, d.h. zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (ED), bis zu drei Monaten, sechs Monaten, 12 Monaten und länger als 12 Monate nach Erstdiagnose, dargestellt. Es zeigte sich ein deutlicher Abfall der sTRAK im Verlauf von mehr als 12 Monaten nach Erstdiagnose (*Spearman* $r = - 0,2245$, $p = 0,001$). Der Verlauf ist in Abb. 5a dargestellt. Auch für die mittels *Competition-Assay* gemessenen TRAK derselben Patientengruppe zeigte sich ein ähnliches Bild, siehe Abb. 5b. Bei den TRAK bestand sogar ein etwas stärkerer Abfall im Verlauf (*Spearman* $r = - 0,2825$, $p < 0,0001$).

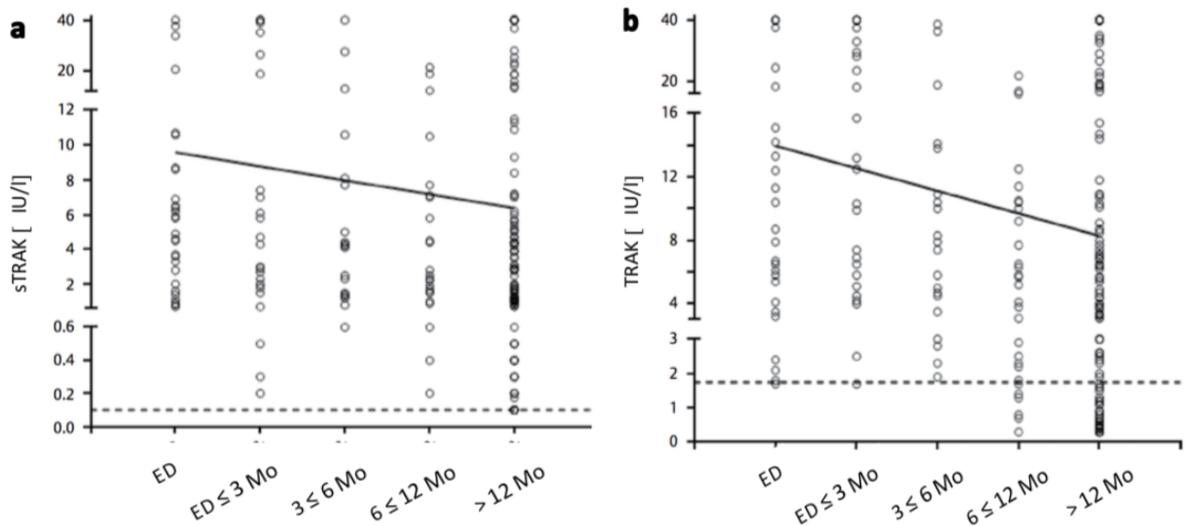


Abb. 3.5: *sTRAK (a) und TRAK (b) Konzentrationen im zeitlichen Verlauf, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Erstdiagnose des M. Basedows.* Auf der x-Achse aufgetragen ist der Zeitpunkt nach Erstdiagnose (ED) des M. Basedows, auf der y-Achse jeweils die *sTRAK (a)* bzw. *TRAK (b)* Konzentration im Patientenserum in IU/l. Je länger das Zeitintervall zwischen Erstdiagnose und Antikörper-Messung, desto niedriger ist die Konzentration der *sTRAK* und *TRAK* (*sTRAK*: Spearman $r = -0,2245$; $p = 0,001$; *TRAK*: Spearman $r = -0,2825$; $p < 0,0001$). [248]

3.4 Zusammenhang zwischen den *sTRAK*, *TRAK* und *fT₄*

Zur Überprüfung des Zusammenhangs zwischen einer Hyperthyreose und den Autoantikörper Konzentrationen im Serum, wurden die *sTRAK* und die *TRAK* Konzentrationen gegen die Konzentration von *fT₄* im Serum der Patienten mit M. Basedow aufgetragen. Sowohl die *sTRAK* als auch die *TRAK* korrelierten signifikant mit der Höhe des *fT₄*. Für die *sTRAK* betrug der *Spearman* Korrelationskoeffizient 0,2070, $p < 0,005$, siehe Abb. 6a. Ein noch stärkerer Zusammenhang zeigte sich zwischen den *TRAK* und dem *fT₄* (*Spearman* $r = 0,2366$, $p < 0,0005$), siehe Abb. 6b.

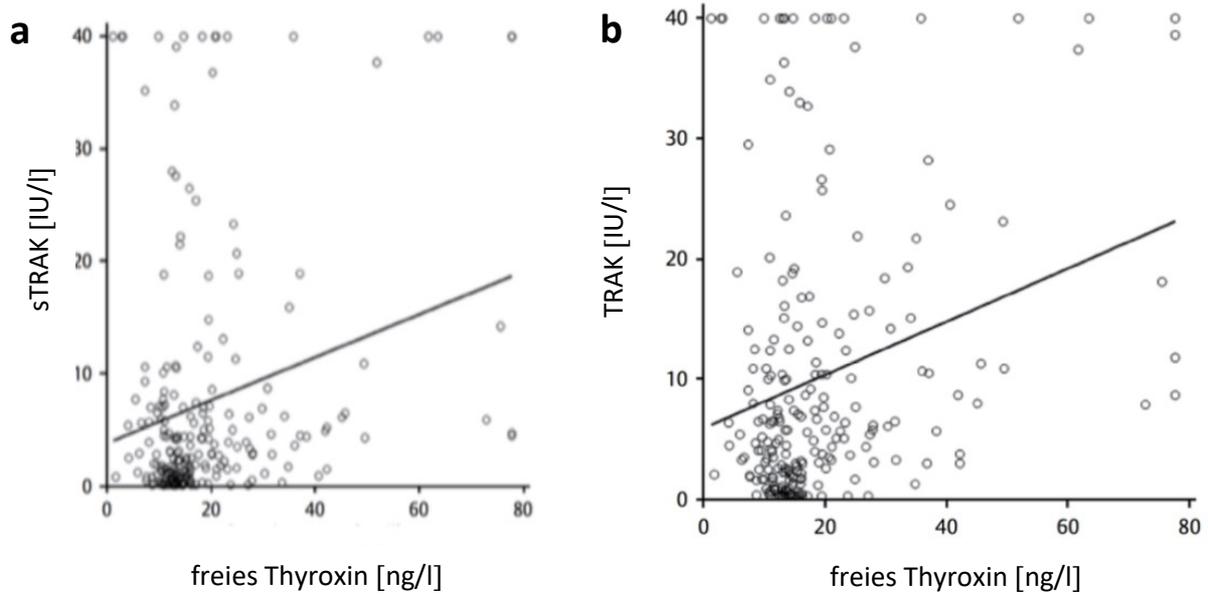


Abb. 3.6: Korrelation zwischen sTRAK (a) bzw. TRAK (b) und fT4 bei allen Patienten mit M. Basedow. Auf der X-Achse aufgetragen zeigt sich jeweils die Konzentration von fT4 in ng/l, auf der y-Achse zeigt sich die Konzentration der sTRAK (a) und bTRAK (b) in IU/l. Sowohl sTRAK als auch TRAK zeigen eine positive Korrelation zu fT4. (sTRAK: Spearman $r = 0,2070$; $p < 0,005$; TRAK: Spearman $r = 0,2366$; $p < 0,0005$) [248].

4 Diskussion

Die Messung der TRAK zur Diagnose eines M. Basedows und zur Unterscheidung von anderen Schilddrüsenerkrankungen wie z. B. der AIT ist ein elementarer Baustein und eine allgemein anerkannte Routinemethode [2, 149]. Nach der Entwicklung des *Competition-Assays* in den 1970er Jahren, kam es in den letzten Jahrzehnten zu Weiterentwicklungen dieses Systems [224, 225]. Eine Schwachstelle bleibt jedoch, dass die *Competition-Assays* nicht zwischen blockierenden und stimulierenden Autoantikörpern unterscheiden können. Nun wurde ein neues *Assay*-System entwickelt, das auf einem vollkommen neuen Prinzip basiert. Die sTRAK formen eine Brücke zwischen zwei chimären, rekombinanten TSHR, wodurch ein lumineszierendes Signal ausgelöst wird [244]. Aufgrund der Bauart wird der *Assay* als *Bridge-Assay* bezeichnet, seit kurzem liegt er als kommerziell erhältlicher, vollautomatisierter *Assay* vor. Das Ziel dieser Studie lag in der Evaluation des neuen automatisierten *Bridge-Assays* für die Detektion von sTRAK in Patienten mit M. Basedow. Dazu wurden die Daten der Patienten mit M. Basedow mit denen von Patienten mit anderen Schilddrüsenerkrankungen und schilddrüsengesunden Kontrollpatienten verglichen. Außerdem wurde ein Vergleich zwischen diesem neu entwickelten *Assay* und dem bisher routinemäßig eingesetzten *Competition-Assay* durchgeführt.

4.1 Bewertung der errechneten Grenzwerte und Vergleich mit dem *Competition-Assay*

Der mittels ROC-plot Analyse errechnete Grenzwert für Positivität für den neuen automatisierten *Bridge-Assay* lag in der hier durchgeführten Studie bei Patienten mit der Erstdiagnose eines M. Basedows bei $\geq 0,55$ IU/l. Bei diesem Grenzwert hatte der *Assay* eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 99 %. Der *Bridge-Assay* erkennt also mit hoher Sensitivität einen Patienten mit M. Basedow und kann ihn mit hoher Spezifität von Patienten mit anderen Schilddrüsenerkrankungen und Schilddrüsengesunden unterscheiden.

Auch Tozzoli et al. veröffentlichten eine Studie, in der sie den ersten vollautomatisierten *Immunassays Immulite TSI* evaluierten. Hierfür untersuchte die Forschungsgruppe 383 Patienten, darunter 72 Patienten mit neu diagnostiziertem M. Basedow, 55 Patienten mit AIT, 36 Patienten mit nicht-autoimmun bedingter Struma, 100 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, die nicht die Schilddrüse betreffen und 120 gesunde Kontrollen. Der von Tozzoli et al. mittels ROC-Plot Analyse errechnete Grenzwert Wert lag bei $\geq 0,54$ IU/l und deckt sich somit nahezu mit dem in dieser Studie errechneten Grenzwert. Auch bezüglich

Sensitivität und Spezifität kam die Forschungsgruppe auf ein sehr ähnliches Ergebnis. In ihrer Stichprobe war der *Bridge-Assay* für alle Patienten mit M. Basedow positiv, während er in allen bis auf drei Patienten der Kontrollgruppen negativ ausfiel. Somit errechneten Tozzoli et al. für den *Bridge-Assay* eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98,7 % [249]. Eine weitere Studie zur Evaluation des *Immulate Bridge Assays* wurde 2017 von Autilio et al. veröffentlicht [250]. Auch Autilio et al. untersuchten das Serum von insgesamt 145 Patienten, darunter 46 Patienten mit unbehandeltem M. Basedow, 36 Patienten mit AIT, drei Patienten mit atrophischer Thyreoiditis, zehn Patienten mit multinodularer nicht-toxischer Struma und 50 schilddrüsengesunde Kontrollpatienten auf das Vorhandensein von sTRAK mittels des *Immulate Bridge Assays* und TRAK mittels *Competition Assay Elecsys*. Die Forschungsgruppe errechneten einen Grenzwert von $\geq 0,57$ IU/l, bei diesem Wert lag die Sensitivität bei 98 % und die Spezifität bei 99 % [250]. Auch die von Autilio et al. ermittelten Werte decken sich in etwa mit den Werten der hier durchgeführten Studie und den Angaben des Herstellers.

Obwohl für die Analyse des Grenzwertes in der hier durchgeführten Studie im Vergleich zur hohen Anzahl an bereits thyreostatisch vorbehandelten Patienten nur 30 Patienten mit der Erstdiagnose eines M. Basedows zur Verfügung standen, sind die Daten statistisch signifikant (AUC = 0,9994) und der errechnete Grenzwert deckt sich mit den Angaben des Herstellers (0,55 IU/l).

Zusammengefasst konnte in der hier durchgeführten Arbeit der vom Hersteller empfohlene Grenzwert von 0,55 IU/l bestätigt werden, ebenso wie die hohe Spezifität und Sensitivität des neuen automatisierten *Bridge-Assays*.

Bei Patienten, die bereits seit ≤ 6 Monaten eine thyreostatische Therapie erhielten, lag der in der hier durchgeführten Studie mittels ROC-Plot Analyse berechnete, optimale Grenzwert für Positivität bei $\geq 0,30$ IU/l. Für bereits medikamentös behandelte Patienten ergibt sich somit in der hier vorgelegten Studie eine Grauzone im Bereich von $\geq 0,30$ IU/l bis $\leq 0,55$ IU/l. Bei der Verwendung des Grenzwertes von 0,55 IU/l liegt die Sensitivität des *Assays* für thyreostatisch vorbehandelte Patienten bei 96 %, während die Spezifität gleichbleibend bei 99 % liegt.

Frank et al. kamen in ihrer Studie zur Evaluation des manuellen *Bridge-Assays* auf eine sehr ähnliche Grauzone von 0,3-0,54 IU/l. Hierfür untersuchte die Forschungsgruppe 599 Blutseren, darunter 274 Patienten mit M. Basedow. Von den 274 Patienten mit M. Basedow waren 248 Patienten bereits thyreostatisch vorbehandelt, während 27 Patienten mit der Erstdiagnose eines M. Basedows noch keine medikamentöse Therapie erhalten hatten. Die Sensitivität des *Assays* lag in der Studie von Frank et al. bei 99,8 %, während die Spezifität 99,1 % erreichte [244].

Zusammenfassend zeigen sowohl die hier durchgeführte Studie als auch die Studie von Frank et al. eine Grauzone im Bereich von $\geq 0,30$ IU/l bis $\leq 0,55$ IU/l für bereits thyreostatisch vorbehandelte Patienten mit M. Basedow, bei immer noch guten Sensitivitäten und Spezifitäten für diese Patientengruppe.

Ziel der Studie war u. a. ein Vergleich des *Bridge-Assays* mit dem bislang eingesetzten *Competition-Assay*. In der hier durchgeführten Studie zeigte der *Bridge-Assay* eine Sensitivität von 100 % bei der Erstdiagnose eines M. Basedows und eine Sensitivität von 96 % bei Patienten, die bereits eine thyreostatische Therapie erhalten hatten. Sowohl bei Patienten mit neu diagnostiziertem M. Basedow als auch bei bereits thyreostatisch behandelten Patienten zeigt der *Bridge-Assay* in der hier vorliegenden Studie eine bessere Sensitivität als der *Competition-Assay* in vergleichbaren Studien bei gleicher Spezifität.

2009 veröffentlichten Schott et. al eine Studie zur klinischen Evaluation des ersten automatisierten *Competition-Assays*. Hierfür untersuchte die Forschungsgruppe 508 Patienten mit M. Basedow, 142 Patienten mit AIT, 107 Patienten mit subakuter Thyreoiditis, 109 Patienten mit nicht-autoimmun bedingter Struma, 23 Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen und 446 gesunde Kontrollen. In der von Schott et al. durchgeführten ROC-plot Analyse erreichte der *Assay* bei einem Grenzwert von $\geq 1,75$ IU/l eine Sensitivität und Spezifität von 99 % für Patienten mit der Erstdiagnose eines M. Basedows. Bei Patienten, die bereits thyreostatisch behandelt wurden, lag die Sensitivität bei gleichem Grenzwert nur noch bei 89 %, während die Spezifität weiterhin 99 % betrug [236]. Auf ähnliche Ergebnisse kamen Kamijo et al., die in ihrer Studie einen Vergleich der M22-biotin basierten ELISA der dritten Generation mit den TSH-biotin basierten porcinen zweitgenerations ELISA verglichen. Bei Kamijo et al. lagen sowohl die Sensitivität, als auch die Spezifität des drittgenerations ELISA bei 99,6 % [251].

Der *Bridge-Assay* weist laut der Ergebnisse dieser Studie somit sogar eine, wenn auch nur dezent, bessere Sensitivität, sowohl bei der Erstdiagnose eines M. Basedows als auch im Verlauf der Therapie eines M. Basedow auf, als der *Competition-Assay*.

4.2 Stimulierende TRAK in Patienten mit Autoimmunthyreoiditis

Die AIT vom Hashimoto Typ ist die häufigste autoimmune Schilddrüsenerkrankung. Patienten mit AIT entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine Hypothyreose, durch lymphozytäre Destruktionsprozesse mit Zerstörung von Schilddrüsengewebe [252]. Anders als beim M. Basedow ist die Autoimmunität bei AIT vorrangig T-Zell-vermittelt. Mit ungeklärter Relevanz für die Pathogenese können TPO und TG Antikörper im Patientenserum nachgewiesen werden [2]. Zudem ist die Existenz sowohl von stimulierenden als auch von blockierenden TRAK bei Patienten mit Autoimmunthyreoiditis bekannt [253-255]. Daher wurden neben Patienten mit Struma nodosa, Schilddrüsenkarzinomen und schilddrüsengesunden Kontrollgruppen auch Patienten mit AIT als Vergleichsgruppe in dieser Studie herangezogen.

In der hier durchgeführten Studie konnten sowohl mittels *Bridge-Assay* als auch mittels *Competition-Assay* sTRAK bzw. TRAK bei Patienten mit AIT nachgewiesen werden. Mittels *Bridge-Assay* wurden in der hier durchgeführten Studie bei zwei von 57 Patienten mit AIT sTRAK oberhalb des Grenzwertes von $\geq 0,55$ IU/l, in drei weiteren Patienten mit AIT wurden sTRAK unterhalb des Grenzwertes gemessen. Im Gegensatz dazu wurden mittels *Competition-Assay* nur bei einem Patienten mit AIT TRAK oberhalb des Grenzwertes von $\geq 1,75$ IU/l gemessen und bei vielen Patienten TRAK unterhalb des Grenzwertes. Während der *Competition-Assay* bei einem von 57 Patienten mit AIT, einem von 74 Patienten mit Struma nodosa und zwei von 47 Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen positive TRAK oberhalb des Grenzwertes zeigte, konnten mittels *Bridge-Assay* nur in zwei von 57 Patienten mit AIT positive sTRAK oberhalb des Grenzwertes nachgewiesen werden. In allen anderen Vergleichsgruppen konnten mittels *Bridge-Assay* keine positiven sTRAK nachgewiesen werden.

In der Vergangenheit wurde schon in diversen Studien der Nachweis von TRAK mittels *Competition-Assay* in Patienten mit AIT beschrieben, meist jedoch ohne zwischen stimulierenden und blockierenden AK zu unterscheiden [236, 256, 257]. Beispielsweise maßen Costagliola et al. in ihrer Studie bei 15 % der Patienten mit AIT TRAK, die jedoch keine Hyperthyreose erzeugten [258]. Auch Tozzoli et al. konnten in ihrer Studie zur Evaluation des ersten vollautomatisierten *Immunassays* zur Messung von stimulierenden Antikörpern in 3,6 % der Patienten mit AIT positive sTRAK messen. Sie warfen die Frage auf, ob dies entweder falsch positive Ergebnisse seien, d. h. dass z. B. bei diesen Patienten mit AIT auch blockierende TRAK an den N-Terminus des chimeren TSHR des *Bridge-Assays* binden oder ob es sich um richtig positive Ergebnisse handele, d. h. dass auch in euthyreoten und hypothyreoten Patienten

sTRAK vorliegen [249]. Auch in der Studie von Autilio et al. konnten in einem Patienten mit AIT sTRAK oberhalb des Grenzwertes gemessen werden [250].

Kahaly et al. veröffentlichten eine Studie, in der die Existenz von sTRAK mittels eines manuellen Thyretain *Bioassays*, in Patienten mit Autoimmunthyreoiditis und einer damit assoziierten endokrinen Orbitopathie, gemessen wurden. Unter allen Patienten mit AIT wurden in 9 % sTRAK gemessen, unter denen mit AIT ohne EO waren in 5,5 % sTRAK nachweisbar. Bei den Patienten mit AIT und endokriner Orbitopathie waren in mehr als zweidrittel der Fälle positive sTRAK nachweisbar. Die Prävalenz, der mittels konventionellem Rezeptor-*Assay* gemessenen TRAK, war etwas niedriger, dies lässt sich durch die höhere analytische Leistung des *Bioassays* zur Detektion von sTRAK im Vergleich zum konventionellen Rezeptor-*Assay*, erklären [259]. Die Ergebnisse der Studie von Kahaly et al. stützen die Theorie, dass vor allem sTRAK in der Pathogenese einer EO eine wichtige Rolle spielen.

In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte keine direkte funktionelle Bestimmung der TRAK. Es kann entsprechend keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei den mittels *Competition-Assay* gemessenen TRAK bei den Patienten mit AIT um sTRAK oder bTRAK handelt. Ebenso lässt sich nicht beweisen, dass es sich bei den mittels *Bridge-Assay* gemessenen TRAK wirklich um sTRAK handelt. Um diese Frage zu beantworten ist eine Studie geplant, bei der zusätzlich die TRAK mittels eines *Bioassays* gemessen werden.

Die in den oben genannten Studien beschriebene Beobachtung des Auftretens von TRAK und sTRAK in Patienten mit AIT deckt sich mit den in dieser Studie vorliegenden Daten. Der Nachweis von sTRAK bei Patienten mit AIT wirft die Frage auf, ob positive TRAK in diesen Patienten für eine bisher undefinierte „gemischte“ Immunantwort stehen, die Eigenschaften sowohl einer AIT als auch eines M. Basedows aufweist. In Bezug auf das Auftreten und den Verlauf einer EO scheint die Messung der sTRAK für eine gute Prognoseeinschätzung besonders wichtig zu sein, da z. B. der frühe Einsatz von Glukokortikoiden die Effektivität der Therapie deutlich steigert [153]. Ob der *Bridge-Assay* und die *Bioassays* eine höhere Aussagekraft zur Vorhersage des Auftretens und Verlaufs einer endokrinen Orbitopathie aufweist, als die herkömmlichen *Competition-Assays*, die unspezifisch TRAK messen, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

4.3 Bewertung des zeitlichen Verlaufs der TSH Rezeptor Antikörper

Um zu sehen, wie sich die Autoantikörper im zeitlichen Verlauf während einer thyreostatischen Therapie verhalten, wurden die sTRAK und TRAK Serum Konzentrationen in der hier durchgeführten Studie zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Erstdiagnose graphisch dargestellt. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des M. Basedows zeigten alle Patienten positive sTRAK und der Großteil der Patienten positive TRAK. Wie erwartet kam es in dieser Studie im Verlauf der thyreostatischen Therapie zu einem stetigen Abfall sowohl der sTRAK als auch der TRAK. Entgegen der Erwartungen kam es zu einem etwas stärkeren Abfall der TRAK im Vergleich zu den sTRAK im Verlauf der Therapie.

Die hier vorliegenden Ergebnisse decken sich mit vielen Studien, in denen der Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines M. Basedows positive TRAK bzw. sTRAK aufweisen [238]. Während der Therapie mit thyreostatischen Medikamenten kommt es in der Regel zu einem stetigen Abfall der TRAK Konzentrationen [260]. Diverse Studien konnten zeigen, dass hohe TRAK Titer zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Erkrankung das Risiko eines Rezidivs erhöhen, während niedrige TRAK Konzentrationen eher für einen positiven Verlauf der Erkrankung, einhergehend mit einer Remission, sprechen [199, 201-203]. Dauksiene et al. führten eine retrospektive Studie durch, in der sie hohe TRAK Konzentrationen und ein großes Schilddrüsenvolumen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als unabhängige Vorhersagefaktoren für ein Versagen der thyreostatischen Therapie bestimmten [261]. Die Arbeitsgruppe von Schott et al. konnte zeigen, dass bei TRAK-Spiegeln ≥ 10 IU/l sechs Monate nach Krankheitsbeginn eine Remission weitestgehend ausgeschlossen werden kann [202]. In einer Studie von Laurberg et al. entwickelten 89 % der nach thyreostatischer Therapie weiterhin TRAK positiven Patienten ein Rezidiv, während nur 29 % der Patienten, die am Ende der Therapie TRAK negativ waren, ein Rezidiv entwickelten [260]. Giuliani et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen der gezielten Messung von sTRAK mittels eines *Bioassays*, der den chimere TSHR Mc4 verwendet und der Vorhersagbarkeit einer Remission bzw. eines Rezidivs bei Patienten mit M. Basedow, die eine thyreostatische Therapie erhielten. Die Arbeitsgruppe von Giuliani et al. konnte zeigen, dass sTRAK Konzentrationen nur in der Gruppe der Patienten mit einer Remission der Erkrankung am Ende der thyreostatischen Therapie signifikant abnahmen. Der Mc4 Assay zeigte einen Trend in Richtung verbessertem PPW, Spezifität und Testgenauigkeit im Vergleich zum M22 basierten *Competition-Assay*, auch wenn der Unterschied sich als nicht signifikant herausstellte. Insgesamt folgerten Giuliani et al. aus der Studie, dass die Messung der sTRAK mittels Mc4 Assay ein klinisch brauchbarer Parameter ist, um eine Remission oder ein Rezidiv bei Patienten mit M. Basedow vorherzusagen [239].

Der von Guiliani et al. aufgeworfenen Frage, ob sTRAK Konzentrationen eine stärkere Korrelation mit der Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs aufweisen als TRAK und ob sich durch die Bestimmung der sTRAK eine bessere Prognoseabschätzung treffen lässt, gingen Stöhr et al. nach [239, 262]. Die Arbeitsgruppe führte eine retrospektive Studie an 117 Patienten mit M. Basedow und EO durch, in der sie die TRAK und sTRAK Werte drei, sechs, zehn und 15 Monate nach Beginn einer thyreostatischen Therapie mittels *Competition Assay Elecsys*, *Bridge Assay Immulite* und *Bioassay Thyretain* maßen. Ziel der Studie von Stöhr et al. war ein Vergleich der verschiedenen *Assay*-Systeme bezüglich der Vorhersagbarkeit einer Remission oder eines Rezidivs der Hyperthyreose [262]. Stöhr et al. konnten eine hohe Korrelation zwischen den gemessenen TRAK und sTRAK Werten des *Competition Assays Elecsys* und des *Bridge Assays Immulite* zeigen. Eine weniger gute Korrelation zeigte sich zwischen den Ergebnissen des *Thyretain Bioassays* und des *Immulite Bridge Assays*. Mittels *Bridge-Assay* zeigten sich in 24 % falsch positive Werte bei Patienten, die im *Bioassay* negative Werte zeigten und neun falsch negative Werte bei Patienten, die im *Bioassay* positive Werte zeigten. Das Ergebnis der Studie von Stöhr et al. stellt die Behauptung, der *Bridge-Assay* messe ausschließlich sTRAK, in Frage. Mit 50-60 % ließ sich eine Vorhersagbarkeit für ein Rezidiv oder eine Remission treffen unabhängig der *Assay* Technologie. Der *Bioassay* zeigte sich insgesamt am sensitivsten und blieb bei 90 % der Patienten nach 15 Monaten nach Beginn der thyreostatischen Therapie weiterhin positiv. Die Studie von Stöhr et al. konnte nicht zeigen, dass die Messung der sTRAK mittels *Bioassay* oder *Bridge-Assay* eine bessere Vorhersagbarkeit der Remissions- oder Rezidivrate zulässt als die Messung der TRAK mittels *Competition-Assay* [262]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Struja et al. in einer retrospektive Kohortensudie mit 332 Patienten [263]. Sie verglichen fünf verschiedene TRAK-*Assays* (*Immulite Bridge Assay*, *Brahms TRAK Assay*, *EliA anti TSH-R Assay*, *RSR TRAb Fast Assay*, *RSR-bioassay Stimulation*) auf ihre Fähigkeit einen M. Basedow zu diagnostizieren und die Rezidivwahrscheinlichkeit vorherzusagen. Alle fünf getesteten *Assays* zeigten eine hohe Sensitivität und Spezifität zur Diagnose eines M. Basedow. Der *Bridge-Assay* zeigte in der Studie von Struja et al. eine schlechtere Vorhersagbarkeit eines Rezidivs als die vier anderen *Assays* [263].

In der hier durchgeführten Studie wurde kein Vergleich des *Bridge-Assays* mit einem *Bioassay* durchgeführt, sondern nur der Vergleich des *Bridge-Assays* mit dem *Competition-Assay*. Durch den Vergleich des *Bridge-Assays* mit einem *Bioassay* wäre eine genauere Aussage darüber möglich gewesen, ob es sich bei den via *Bridge-Assay* gemessenen Autoantikörper ausschließlich um stimulierende TRAK handelt. Außerdem wurden keine weiteren

Berechnungen zur Vorhersagbarkeit der Rezidivwahrscheinlichkeit anhand der Konzentration der sTRAK angestellt.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit bei allen Patienten mit der Erstdiagnose eines M. Basedow positive sTRAK nachgewiesen. Im Verlauf der thyreostatischen Therapie zeigte sich ein stetiger Abfall der sTRAK Konzentrationen. Es konnte nicht bestätigt werden, dass es zu einem stärkeren Abfall der sTRAK Konzentrationen im Vergleich zu den TRAK Konzentrationen im Verlauf der Therapie kommt. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie decken sich mit den Ergebnissen der oben aufgeführten Studien und deuten ebenfalls darauf hin, dass sich durch die Bestimmung der sTRAK keine bessere Vorhersagbarkeit eines Rezidivs treffen lässt als durch die Bestimmung der TRAK.

Wünschenswert sind weitere Studien zur Evaluation einer Überlegenheit der sTRAK Messung in Bezug auf die Vorhersagbarkeit des Krankheitsverlaufes.

4.4 Bewertung des Zusammenhangs zwischen stimulierenden TRAK, TRAK und fT₄

Um der Frage nachzugehen, ob der *Bridge-Assay* tatsächlich nur die sTRAK misst, die für die Auslösung einer Hyperthyreose verantwortlich gemacht werden, wurde in dieser Studie der Zusammenhang zwischen der Höhe der sTRAK bzw. TRAK Konzentrationen und der fT₄ Konzentration im Serum der Patienten gemessen. In der hier durchgeführten Studie konnte zwar ein starker Zusammenhang zwischen den gemessenen sTRAK und fT₄ gefunden werden, es bestand jedoch ein noch stärkerer Zusammenhang zwischen den durch den *Competition-Assay* gemessenen TRAK und fT₄. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der *Bridge-Assay* nicht ausschließlich die sTRAK misst.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Tozzoli et al. in ihrer Studie zur Evaluation des ersten automatisierten *Bridge-Assays*. Auch die Arbeitsgruppe von Tozzoli et al. maßen die Korrelation zwischen den mittels *Bridge-Assay* gemessenen sTRAK und fT₄ und den mittels den verschiedenen anderen *Assay*-Systemen gemessenen TRAK und fT₄. Hierbei zeigten sich akzeptable, aber keine guten Korrelationen zwischen den mittels *Bridge-Assay* gemessenen sTRAK und fT₄ und den mittels *Competition-Assay* gemessenen TRAK und fT₄. Die Arbeitsgruppe führt die partielle Korrelation darauf zurück, dass mittels *Bridge*-Technologie immer noch ein kleiner Teil der blockierenden TRAK mitgemessen wird [249].

Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Studienergebnissen und den Ergebnissen von Tozzoli et al. konnte die Arbeitsgruppe von Frank et al. in ihrer Studie zur Evaluation des ersten manuellen *Bridge-Assays* eine signifikant stärkere Korrelation zwischen den gemessenen

sTRAK und fT_4 messen als zwischen den TRAK und fT_4 . Daraus schloss die Arbeitsgruppe von Frank et al., dass es sich bei den durch den *Bridge-Assay* gemessenen Antikörpern um stimulierende TRAK handelt [244]. Um zu widerlegen, dass der *Bridge-Assay* auch bTRAK erkennt, führten Frank et al. in derselben Studie eine Messung der TRAK im Serum von drei Patienten mit M. Basedow und klinischer und biochemischer Hypothyreose durch. Mittels *Competition-Assay* und mittels eines *Bioassays*, der bTRAK misst, waren bei den Patienten mit Hypothyreose TRAK nachweisbar. Der *Bridge-Assay* konnte diese bTRAK wie erhofft nicht nachweisen. Die Beobachtung stützt die Behauptung, dass der *Bridge-Assay* nur stimulierende TRAK misst. Allerdings zeigte der blockierende monoklonale AK K1-70 eine Bindungsaktivität im *Bridge-Assay*, die jedoch geringer war als im *Competition-Assay* [244]. Die Bindung des mAK K1-70 spricht wiederum dafür, dass zu teilen auch bTRAK durch den *Bridge-Assay* gemessen werden.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Lytton et al. in einem 2018 veröffentlichten *Review* über die technischen und analytischen Fähigkeiten der führenden kommerziell erhältlichen *Assays* zur Messung der TRAK und eine Metaanalyse der klinischen Leistungsfähigkeiten der *Assays* [264]. Sie verglichen die analytische Sensitivität und Spezifität der sTRAK und bTRAK Messung im Mc4 *Bioassay* mit der TRAK Messung im *Competition-Assay* und der sTRAK Messung im *Bridge-Assay*. Durch Hinzugabe der in unterschiedlichen Konzentrationen verdünnten stimulierenden Autoantikörper KSab1 und M22 und des blockierenden Autoantikörper K1-70 in das Serum eines euthyreoten Individuums konnten konzentrationsabhängige Kurven der *Sample to reference ratio (SRR)*, U/I Bindung und Hemmung der bTRAK in Prozent errechnet werden. Sowohl im *Competition-Assay* als auch im *Bridge-Assay Immulite 2000* konnte eine starke Bindung des blockierenden mAK K1-70 gemessen werden. Im Gegensatz dazu zeigte K1-70 keinerlei Bindung im Mc4 *Bioassay* [264]. Dieses Ergebnis spricht gegen die Aussage, dass es sich bei den im *Bridge-Assay* gemessenen TRAK nur um sTRAK handelt.

In einer 2019 veröffentlichten Studie von Allelein et al. wurde anhand von Blutproben von 229 Patienten, darunter 151 Patienten mit M. Basedow, 35 Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis, 32 Patienten mit Struma nodosa und 11 Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen, ein Vergleich des *Bridge-Assays* mit zwei *Bioassays* durchgeführt [265]. Allelein et al. verwendeten einen *Bioassay* zur Messung der sTRAK und einen anderen *Bioassay* zur Messung der bTRAK. Alle drei *Assays* zeigten eine hohe Sensitivität zur Erkennung der TRAK. In zwei von 35 Patienten mit AIT ließen sich positive sTRAK mittels *Bridge-Assay* nachweisen, während sich mittels *Bioassay* bei fünf von 35 Patienten positive sTRAK messen ließen. Mittels *Bioassay* zur

Erkennung der bTRAK ließen sich in einem Patienten mit AIT und in zwei Patienten mit M. Basedow positive bTRAK nachweisen. In den zwei Patienten mit M. Basedow und positiven bTRAK im *Bioassay* zeigten sich jedoch auch positive Ergebnisse für sTRAK im *Bridge-Assay*, während sich die *Bioassays* zum Nachweis von sTRAK negativ zeigten [265]. Das Ergebnis von Allelein et al. widerspricht ebenfalls der Theorie, dass der *Bridge-Assay* ausschließlich die sTRAK misst und ist damit in Einklang mit dem in dieser Arbeit vorliegenden Studienergebnis. Die hier vorliegende Arbeit hat zwei Schwachpunkte. Der erste Schwachpunkt liegt in der geringen Anzahl an Patienten mit der Erstdiagnose eines M. Basedows. Die hohe Anzahl an Patienten, die bereits eine thyreostatische Therapie erhalten hatte, könnte den Zusammenhang zwischen den gemessenen sTRAK und fT4 beeinflusst haben.

Der zweite Schwachpunkt in der hier durchgeführten Studie liegt darin, dass nicht mittels eines *Bioassays* untersucht wurde, ob es sich bei den mittels *Bridge-Assay* gemessenen TRAK tatsächlich um sTRAK handelt. Um mit Sicherheit beurteilen zu können welche Antikörper durch den *Bridge-Assay* gemessen werden ist es wichtig die Epitope für die Bindung der funktionell unterschiedlichen TRAK zu kennen und deren Funktionsweise zu verstehen. Bezüglich der Bindungsstellen der sTRAK und bTRAK ist sich die Studienlage uneinig. Der Aufbau des *Bridge-Assays* basiert auf der Studie von Tahara et al., die einen Verlust der Aktivität der stimulierenden TRAK in chimären TSHR/LH-CGR-Rezeptoren feststellten, in denen die Aminosäurereste 8-165 durch vergleichbare LH-CGR-Rezeptor Aminosäurereste ersetzt wurden. In chimären TSHR/LH-CGR-Rezeptoren, in denen die Aminosäurereste 261 bis 370 ersetzt wurden, konnten Tahara et al. keinen vergleichbaren Verlust der Aktivität feststellen, während hier die bTRAK ihre Aktivität verloren. Daraus schloss die Arbeitsgruppe, dass die Epitope der sTRAK im Bereich des N-Terminus des TSHR liegen, während sie die Epitope der bTRAK im Bereich des C-Terminus verorteten [140]. Won Bae Kim et al. nutzten ebenfalls mutierte Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, in denen die Aminosäuren 90-165 durch äquivalente Aminosäuren des LH/CG Rezeptors der Ratte ersetzt wurden (Mc2 Chimerer Assay) und untersuchten die Aktivität der sTRAK zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf der Behandlung. In der von Kim et al. durchgeführten Studie zeigte sich bei 19 von 39 Patienten initial keine Aktivität im Mc2 chimären Assay, bei denen es im Verlauf nach acht Monaten Therapie zu einer positiven Aktivität im gleichen Assay kam. Daraus schloss die Arbeitsgruppe, dass funktionelle sTRAK Epitope von der Aminosäureregion 90-165 zu einer anderen außerhalb dieses Bereichs liegenden Region gewechselt haben mussten [266]. Grasso et al. nutzten mutierte Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, in denen die Aminosäurereste acht bis 165 des TSHR durch die Aminosäurereste zehn bis 166 des LH/CGR Rezeptors ersetzt

wurden und verglichen die Bindung von bTRAK an diesen chimären TSHR mit der Bindung von bTRAK an einen Wild-Typ Rezeptor. Sie konnten bei 47 % der M. Basedow Patienten eine Aktivität der bTRAK in den Wild-Typ Zellen messen, nicht aber in den chimären TSHR-Zellen. Daraus schlossen sie, dass es sich bei den bTRAK, die nicht an den chimären TSHR banden, um eine Untergruppe handelt, die an den N-terminalen Teil der extrazellulären Domäne des TSHR bindet. Bei 25,6 % der Patienten konnten sie eine Aktivität der bTRAK in beiden Zelllinien messen und in 28 % konnten sie gar keine bTRAK Aktivität messen. Ihre Ergebnisse deuten darauf hin, dass Patienten mit M. Basedow unterschiedliche bTRAK besitzen, die an unterschiedliche Epitope binden und evtl. unterschiedliche intrazelluläre Mechanismen auslösen [246]. Ando et al. konnten in einer Studie zeigen, dass bTRAK mit hoher Affinität zwei konformative Epitope erkennen, eines davon war nicht vom Epitop der sTRAK zu unterscheiden. Auch bei Ihnen lag die konformative Bindungsstelle für sTRAK in der A Untereinheit des N-Terminus des TSHR [91]. Sanders et al. gelang es die Kristallstrukturen der TSHR Ektodomäne gebunden an den stimulierenden mAK M22 und gebunden an den blockierenden mAK K1-70 darzustellen [82, 83]. Die Arbeitsgruppe von Sanders et al. konnte zeigen, dass die Bindungsstellen der sTRAK und bTRAK in sehr ähnlichen Regionen der konkaven Oberfläche der LRR liegen und mit der Bindungsstelle des natürlichen Glykoproteinormons TSH überlappen (siehe Abbildung 4.1.) [82, 83]. Die Beobachtungen von Sanders et al. konnten durch eine neue Studien von Faust et al., die die Struktur des sTRAK M22 und des bTRAK K1-70 gebunden an den TSHR mittels kryogener Elektronenmikroskopie untersuchten, bestätigt werden [109].

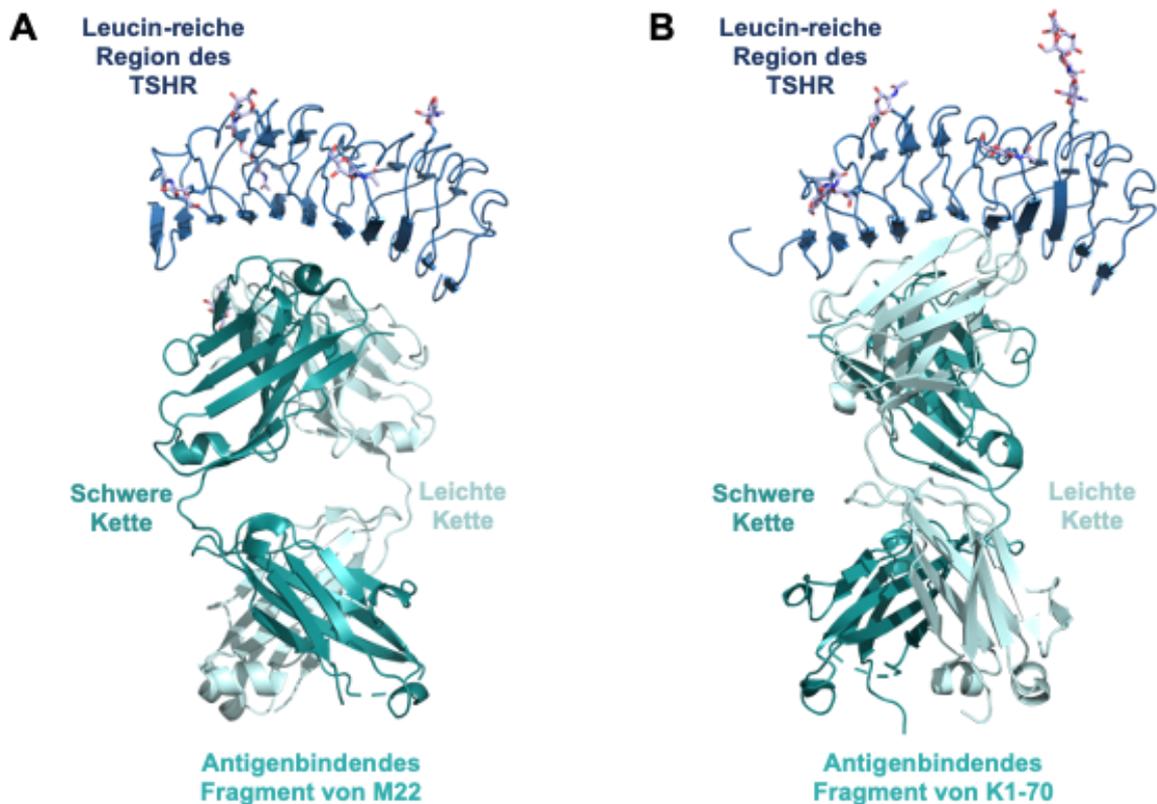


Abb. 4.1. Kristallstruktur des TSH-Rezeptors₂₆₀ gebunden an den stimulierenden monoklonalen Antikörper M22 (A) und gebunden an den blockierenden monoklonalen Antikörper K1-70 (B). (Sanders et al. 2007 und 2011). Der TSH-Rezeptor ist jeweils in blau, die leichten Ketten der antigenbindenden Fragmente von M22 bzw. K1-70 sind in hell türkis, während die schweren Ketten in dunkel türkis dargestellt sind. Sowohl der stimulierende mAK M22 als auch der blockierende mAK K1-70 binden in überlappenden Bereichen der konkaven Seite der Leucin-reichen-Region des TSHR [82, 83].

Letztlich lässt sich zusammenfassen, dass die Epitope der verschiedenen TRAK am TSHR weiterhin Gegenstand der Forschung sind. Die exakte Struktur des TSHR zu kennen und die Funktionsweise wie die Antikörper den Rezeptor aktivieren oder blockieren zu verstehen sind essentielle Bausteine, um den Pathomechanismus des M. Basedow zu verstehen. Die Theorie, dass sTRAK an den N-Terminus des TSHR binden und bTRAK an den C-Terminus des TSHR scheint überholt zu sein und spricht gegen die Behauptung, dass die mittels *Bridge-Assay* gemessenen TRAK ausschließlich stimulierende Eigenschaften besitzen. Vielmehr scheinen sTRAK und bTRAK an ähnliche Epitope zu binden und die Aktivität der jeweiligen TRAK von deren struktureller Orientierung in Bezug zur Doppellipidmembran abzuhängen [109].

Die hier vorliegenden Ergebnisse sprechen in Zusammenschau mit den oben genannten Studien eher dafür, dass der *Bridge-Assay* nicht ausschließlich sTRAK misst, sondern zu Teilen auch bTRAK. Um zu klären, ob die TRAK, die mittels *Bridge-Assay* gemessen werden alle stimulierende Aktivität besitzen oder ob auch Antikörper mit blockierender Aktivität mitgemessen werden, sollten weitere Studien durchgeführt werden.

4.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der neue automatisierte *Bridge-Assay* mit hoher Sensitivität Patienten mit M. Basedow detektiert und sie mit einer hohen Spezifität von Patienten mit anderen Schilddrüsenerkrankungen unterscheidet. Als Grenzwert für Positivität sollte eine Konzentration von $\geq 0,55$ IU/l verwendet werden.

Bisher konnten nur durch *Bioassays* gezielt stimulierende TRAK gemessen werden. Diese manuellen *Bioassays*, die die Erhöhung von cAMP in der Zelle messen, haben eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität, benötigten allerdings einen hohen Arbeitsaufwand von mehreren Stunden [239, 243, 267]. Ein großer Vorteil des neuen vollautomatisierten *Bridge-Assays* ist seine kurze Durchführungszeit von ca. einer Stunde, ohne die Notwendigkeit mehrere Proben zu sammeln und zusammen zu bearbeiten, wie es für die *Bioassays* empfohlen wurde. Damit braucht der *Bridge-Assay* nur ein Viertel der Zeit des von Araki et al. entwickelten *Bioassays* [243]. Durch den geringen zeitlichen Aufwand kann der automatisierte *Bridge-Assay* gut in den Arbeitsalltag eines Routinelabors integriert werden. Der *Bridge-Assay* könnte sich unabhängig davon, ob er nur stimulierende TRAK misst, dank seiner hohen Sensitivität und Spezifität und der schnellen Durchführbarkeit mit geringem Arbeitsaufwand, in Zukunft als Routineassay für die Diagnose eines M. Basedows durchsetzen.

5 Literaturverzeichnis

1. Banga, J.P. and M. Schott, *Autoimmune Thyroid Diseases*. *Horm Metab Res*, 2015. **47**(10): p. 699-701.
2. Allelein, S., J. Feldkamp, and M. Schott, [*Autoimmune diseases of the thyroid gland*]. *Internist (Berl)*, 2017. **58**(1): p. 47-58.
3. Smith, T.J. and L. Hegedus, *Graves' Disease*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(16): p. 1552-1565.
4. McLeod, D.S. and D.S. Cooper, *The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity*. *Endocrine*, 2012. **42**(2): p. 252-65.
5. Herold, G., *Herold, Gerd et al.: Innere Medizin*. 2014.
6. Weetman, A.P., *Grave's disease 1835-2002*. *Horm Res*, 2003. **59 Suppl 1**: p. 114-8.
7. Brix, T.H. and L. Hegedus, *The complexity of the etiology of autoimmune thyroid disease is gravely underestimated*. *Thyroid*, 2011. **21**(12): p. 1289-92.
8. Villanueva, R., et al., *Sibling recurrence risk in autoimmune thyroid disease*. *Thyroid*, 2003. **13**(8): p. 761-4.
9. Simmonds, M.J., *GWAS in autoimmune thyroid disease: redefining our understanding of pathogenesis*. *Nat Rev Endocrinol*, 2013. **9**(5): p. 277-87.
10. Tomer, Y., *Mechanisms of autoimmune thyroid diseases: from genetics to epigenetics*. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 147-56.
11. Dechairo, B.M., et al., *Association of the TSHR gene with Graves' disease: the first disease specific locus*. *Eur J Hum Genet*, 2005. **13**(11): p. 1223-30.
12. Menconi, F., C. Marocci, and M. Marino, *Diagnosis and classification of Graves' disease*. *Autoimmun Rev*, 2014. **13**(4-5): p. 398-402.
13. Pujol-Borrell, R., et al., *Genetics of Graves' Disease: Special Focus on the Role of TSHR Gene*. *Horm Metab Res*, 2015. **47**(10): p. 753-66.
14. Nagata, K., et al., *Production of thyrotropin receptor antibodies in acute phase of infectious mononucleosis due to Epstein-Barr virus primary infection: a case report of a child*. Springerplus, 2015. **4**: p. 456.
15. Bulow Pedersen, I., et al., *Serum selenium is low in newly diagnosed Graves' disease: a population-based study*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013. **79**(4): p. 584-90.
16. Duntas, L.H., *The Role of Iodine and Selenium in Autoimmune Thyroiditis*. *Horm Metab Res*, 2015. **47**(10): p. 721-6.
17. Zilles, K.T., Bernhard N. , *Anatomie*. 2010.
18. Rousset, B., et al., *Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
19. Carvalho, D.P. and C. Dupuy, *Thyroid hormone biosynthesis and release*. *Mol Cell Endocrinol*, 2017. **458**: p. 6-15.
20. Dunn, J.T. and A.D. Dunn, *The importance of thyroglobulin structure for thyroid hormone biosynthesis*. *Biochimie*, 1999. **81**(5): p. 505-9.
21. Coscia, F., et al., *The structure of human thyroglobulin*. *Nature*, 2020. **578**(7796): p. 627-630.
22. O'Neill, B., D. Magnolato, and G. Semenza, *The electrogenic, Na⁺-dependent I⁻ transport system in plasma membrane vesicles from thyroid glands*. *Biochim Biophys Acta*, 1987. **896**(2): p. 263-74.
23. Scott, D.A., et al., *The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein*. *Nat Genet*, 1999. **21**(4): p. 440-3.
24. Ohtaki, S., et al., *One- and two-electron oxidations of tyrosine, monoiodotyrosine, and diiodotyrosine catalyzed by hog thyroid peroxidase*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(22): p. 13398-403.
25. Nakamura, M., et al., *Iodination and oxidation of thyroglobulin catalyzed by thyroid peroxidase*. *J Biol Chem*, 1984. **259**(1): p. 359-64.
26. Gavaret, J.M., H.J. Cahnmann, and J. Nunez, *Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. The mechanism of the coupling reaction*. *J Biol Chem*, 1981. **256**(17): p. 9167-73.

27. Corvilain, B., et al., *Role of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and the phosphatidylinositol-Ca²⁺ cascades in mediating the effects of thyrotropin and iodide on hormone synthesis and secretion in human thyroid slices.* J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(1): p. 152-9.
28. Dunn, A.D., H.E. Crutchfield, and J.T. Dunn, *Proteolytic processing of thyroglobulin by extracts of thyroid lysosomes.* Endocrinology, 1991. **128**(6): p. 3073-80.
29. Gross, J. and R. Pitt-Rivers, *Unidentified iodine compounds in human plasma in addition to thyroxine and iodide.* Lancet, 1951. **2**(6687): p. 766-7.
30. Bianco, A.C., et al., *Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases.* Endocr Rev, 2002. **23**(1): p. 38-89.
31. Robbins, J., *Thyroxine-binding proteins.* Prog Clin Biol Res, 1976. **5**: p. 331-55.
32. Schmidt, R.F.L., Florian; Heckmann, Manfred, *Physiologie des Menschen* 2010.
33. Jenkins, J.S., *The hypothalamus.* Br Med J, 1972. **2**(5805): p. 99-102.
34. Hollenberg, A.N., *The role of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuron as a metabolic sensor.* Thyroid, 2008. **18**(2): p. 131-9.
35. Sam, S. and L.A. Frohman, *Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2008. **37**(1): p. 1-22, vii.
36. Hershman, J.M. and J.A. Pittman, Jr., *Control of thyrotropin secretion in man.* N Engl J Med, 1971. **285**(18): p. 997-1006.
37. Pirahanchi, Y., F. Toro, and I. Jialal, *Physiology, Thyroid Stimulating Hormone*, in StatPearls. 2020: Treasure Island (FL).
38. Dumont, J.E., et al., *Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors.* Physiol Rev, 1992. **72**(3): p. 667-97.
39. Fonseca, T.L., et al., *Coordination of hypothalamic and pituitary T3 production regulates TSH expression.* J Clin Invest, 2013. **123**(4): p. 1492-500.
40. Bargi-Souza, P., F. Goulart-Silva, and M.T. Nunes, *Novel aspects of T3 actions on GH and TSH synthesis and secretion: physiological implications.* J Mol Endocrinol, 2017. **59**(4): p. R167-R178.
41. Rovet, J.F., *The role of thyroid hormones for brain development and cognitive function.* Endocr Dev, 2014. **26**: p. 26-43.
42. Schmidt, R.F.L., Florian; Heckmann, Manfred, *Physiologie des Menschen.* 2010.
43. Mullinger, M., J. Munn, and A.L. Chute, *Cretinism.* Can Med Assoc J, 1952. **66**(6): p. 560-2.
44. Tata, J.R., et al., *The action of thyroid hormones at the cell level.* Biochem J, 1963. **86**: p. 408-28.
45. Kim, B., *Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate.* Thyroid, 2008. **18**(2): p. 141-4.
46. Liu, Y.Y. and G.A. Brent, *Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation.* Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(3): p. 166-73.
47. Oetting, A. and P.M. Yen, *New insights into thyroid hormone action.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007. **21**(2): p. 193-208.
48. Bartels, P.D., et al., *Development of ketonemia in fasting patients with hyperthyroidism.* Acta Med Scand Suppl, 1979. **624**: p. 43-7.
49. Oppenheimer, J.H., et al., *Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat.* J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 125-32.
50. Menahan, L.A. and O. Wieland, *The role of thyroid function in the metabolism of perfused rat liver with particular reference to gluconeogenesis.* Eur J Biochem, 1969. **10**(1): p. 188-94.
51. Freedland, R.A. and H.A. Krebs, *The effect of thyroxine treatment on the rate of gluconeogenesis in the perfused rat liver.* Biochem J, 1967. **104**(3): p. 45P.
52. Sandler, M.P., et al., *The effect of thyroid hormones on gluconeogenesis and forearm metabolism in man.* J Clin Endocrinol Metab, 1983. **56**(3): p. 479-85.
53. Muller, M.J., et al., *Effect of thyroid hormones on oxidative and nonoxidative glucose metabolism in humans.* Am J Physiol, 1988. **255**(2 Pt 1): p. E146-52.

54. Lamberg, B.A., *Glucose metabolism in thyroid disease*. Acta Med Scand, 1965. **178**(3): p. 351-62.
55. Doar, J.W., et al., *Effects of oral and intravenous glucose loading in thyrotoxicosis. Studies of plasma glucose, free fatty acid, plasma insulin and blood pyruvate levels*. Diabetes, 1969. **18**(9): p. 633-9.
56. Daher, R., et al., *Consequences of dysthyroidism on the digestive tract and viscera*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(23): p. 2834-8.
57. Barreto-Chaves, M.L., P. de Souza Monteiro, and C.R. Furstenau, *Acute actions of thyroid hormone on blood vessel biochemistry and physiology*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2011. **18**(5): p. 300-3.
58. Papaioannou, G.I., et al., *Treating hypothyroidism improves endothelial function*. Metabolism, 2004. **53**(3): p. 278-9.
59. Ojamaa, K., J.D. Klemperer, and I. Klein, *Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle*. Thyroid, 1996. **6**(5): p. 505-12.
60. Levey, G.S. and I. Klein, *Catecholamine-thyroid hormone interactions and the cardiovascular manifestations of hyperthyroidism*. Am J Med, 1990. **88**(6): p. 642-6.
61. Klein, I. and G.S. Levey, *New perspectives on thyroid hormone, catecholamines, and the heart*. Am J Med, 1984. **76**(2): p. 167-72.
62. Osuna, P.M., M. Udovcic, and M.D. Sharma, *Hyperthyroidism and the Heart*. Methodist Debaque Cardiovasc J, 2017. **13**(2): p. 60-63.
63. Dousdampanis, P., et al., *The thyroid and the kidney: a complex interplay in health and disease*. Int J Artif Organs, 2014. **37**(1): p. 1-12.
64. Jimenez, E., et al., *Effects of hyper- and hypothyroidism on the basal levels of angiotensin I and kinetic parameters of renin-angiotensin system in male rats*. Rev Esp Fisiol, 1982. **38**(2): p. 149-54.
65. Vargas, F., et al., *Vascular and renal function in experimental thyroid disorders*. Eur J Endocrinol, 2006. **154**(2): p. 197-212.
66. Carosa, E., A. Lenzi, and E.A. Jannini, *Thyroid hormone receptors and ligands, tissue distribution and sexual behavior*. Mol Cell Endocrinol, 2018. **467**: p. 49-59.
67. Niepomniszcze, H. and R.H. Amad, *Skin disorders and thyroid diseases*. J Endocrinol Invest, 2001. **24**(8): p. 628-38.
68. Safer, J.D., *Thyroid hormone action on skin*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2012. **19**(5): p. 388-93.
69. Ahsan, M.K., et al., *Immunohistochemical localization of thyroid hormone nuclear receptors in human hair follicles and in vitro effect of L-triiodothyronine on cultured cells of hair follicles and skin*. J Med Invest, 1998. **44**(3-4): p. 179-84.
70. Szkudlinski, M.W., et al., *Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 473-502.
71. Ascoli, M., F. Fanelli, and D.L. Segaloff, *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective*. Endocr Rev, 2002. **23**(2): p. 141-74.
72. Dias, J.A., et al., *Molecular, structural, and cellular biology of follitropin and follitropin receptor*. Vitam Horm, 2002. **64**: p. 249-322.
73. Kleinau, G., et al., *Structural-Functional Features of the Thyrotropin Receptor: A Class A G-Protein-Coupled Receptor at Work*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 86.
74. Venkatakrishnan, A.J., et al., *Molecular signatures of G-protein-coupled receptors*. Nature, 2013. **494**(7436): p. 185-94.
75. Gudermann, T., B. Nurnberg, and G. Schultz, *Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function*. J Mol Med (Berl), 1995. **73**(2): p. 51-63.
76. Smits, G., et al., *Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity*. EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2692-703.
77. Jiang, X., J.A. Dias, and X. He, *Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **382**(1): p. 424-451.

78. Mueller, S., et al., *Extended hormone binding site of the human thyroid stimulating hormone receptor: distinctive acidic residues in the hinge region are involved in bovine thyroid stimulating hormone binding and receptor activation.* J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 18048-55.
79. Mizutori, Y., et al., *The thyrotropin receptor hinge region is not simply a scaffold for the leucine-rich domain but contributes to ligand binding and signal transduction.* Mol Endocrinol, 2008. **22**(5): p. 1171-82.
80. Schaarschmidt, J., et al., *Influence of the hinge region and its adjacent domains on binding and signaling patterns of the thyrotropin and follitropin receptor.* PLoS One, 2014. **9**(10): p. e111570.
81. Rapoport, B., et al., *The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies.* Endocr Rev, 1998. **19**(6): p. 673-716.
82. Sanders, J., et al., *Crystal structure of the TSH receptor in complex with a thyroid-stimulating autoantibody.* Thyroid, 2007. **17**(5): p. 395-410.
83. Sanders, P., et al., *Crystal structure of the TSH receptor (TSHR) bound to a blocking-type TSHR autoantibody.* J Mol Endocrinol, 2011. **46**(2): p. 81-99.
84. Kleinau, G., et al., *Defining structural and functional dimensions of the extracellular thyrotropin receptor region.* J Biol Chem, 2011. **286**(25): p. 22622-31.
85. Jiang, X., et al., *Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. 12491-6.
86. Loosfelt, H., et al., *Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(9): p. 3765-9.
87. Chazenbalk, G.D., et al., *Evidence that the thyrotropin receptor ectodomain contains not one, but two, cleavage sites.* Endocrinology, 1997. **138**(7): p. 2893-9.
88. Buckland, P.R., et al., *Affinity-labelling of the thyrotropin receptor. Characterization of the photoactive ligand.* Biochem J, 1985. **225**(3): p. 753-60.
89. Rapoport, B. and S.M. McLachlan, *Withdrawn: TSH Receptor Cleavage Into Subunits and Shedding of the A-Subunit; A Molecular and Clinical Perspective.* Endocr Rev, 2016. **2016**(1): p. 23-42.
90. Kajita, Y., et al., *Analysis of thyrotropin receptors by photoaffinity labelling. Orientation of receptor subunits in the cell membrane.* Biochem J, 1985. **227**(2): p. 413-20.
91. Ando, T., et al., *Dissecting linear and conformational epitopes on the native thyrotropin receptor.* Endocrinology, 2004. **145**(11): p. 5185-93.
92. Chen, C.R., et al., *The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim.* J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1897-904.
93. Chazenbalk, G.D., et al., *Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor.* J Clin Invest, 2002. **110**(2): p. 209-17.
94. Vassart, G. and S. Costagliola, *A physiological role for the posttranslational cleavage of the thyrotropin receptor?* Endocrinology, 2004. **145**(1): p. 1-3.
95. Rapoport, B. and S.M. McLachlan, *TSH Receptor Cleavage Into Subunits and Shedding of the A-Subunit; A Molecular and Clinical Perspective.* Endocr Rev, 2016. **37**(2): p. 114-34.
96. Furmaniak, J., et al., *Photoaffinity labelling of the TSH receptor on FRTL5 cells.* FEBS Lett, 1987. **215**(2): p. 316-22.
97. Chen, C.R., et al., *Evidence that human thyroid cells express uncleaved, single-chain thyrotropin receptors on their surface.* Endocrinology, 2006. **147**(6): p. 3107-13.
98. Russo, D., et al., *A new structural model for the thyrotropin (TSH) receptor, as determined by covalent cross-linking of TSH to the recombinant receptor in intact cells: evidence for a single polypeptide chain.* Mol Endocrinol, 1991. **5**(11): p. 1607-12.
99. Rapoport, B. and S.M. McLachlan, *The thyrotropin receptor in Graves' disease.* Thyroid, 2007. **17**(10): p. 911-22.
100. Couet, J., et al., *Shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. Involvement of a matrix metalloprotease.* J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4545-52.

101. Kaczur, V., et al., *Cleavage of the human thyrotropin receptor by ADAM10 is regulated by thyrotropin*. J Mol Recognit, 2007. **20**(5): p. 392-404.
102. Hartmann, M., A. Herrlich, and P. Herrlich, *Who decides when to cleave an ectodomain?* Trends Biochem Sci, 2013. **38**(3): p. 111-20.
103. Urizar, E., et al., *Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity*. EMBO J, 2005. **24**(11): p. 1954-64.
104. Latif, R., P. Graves, and T.F. Davies, *Ligand-dependent inhibition of oligomerization at the human thyrotropin receptor*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45059-67.
105. Graves, P.N., et al., *Multimeric complex formation by the thyrotropin receptor in solubilized thyroid membranes*. Endocrinology, 1996. **137**(9): p. 3915-20.
106. Latif, R., P. Graves, and T.F. Davies, *Oligomerization of the human thyrotropin receptor: fluorescent protein-tagged hTSHR reveals post-translational complexes*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45217-24.
107. Latif, R., K. Michalek, and T.F. Davies, *Subunit interactions influence TSHR multimerization*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(10): p. 2009-18.
108. Allen, M.D., S. Neumann, and M.C. Gershengorn, *Occupancy of both sites on the thyrotropin (TSH) receptor dimer is necessary for phosphoinositide signaling*. FASEB J, 2011. **25**(10): p. 3687-94.
109. Bryan Faust, I.S., Kaihua Zhang, Nicholas Hoppe, Antonio F. M., Yagmur Muftuoglu, Christian B. Billesbølle, Alan Saghatelian, Yifan Cheng, Aashish Manglik, *Autoantibody and hormone activation of the thyrotropin G protein-coupled receptor*. bioRxiv, 2022.
110. Duan, J., et al., *Structures of full-length glycoprotein hormone receptor signalling complexes*. Nature, 2021. **598**(7882): p. 688-692.
111. Krause, G., A. Kreuchwig, and G. Kleinau, *Extended and structurally supported insights into extracellular hormone binding, signal transduction and organization of the thyrotropin receptor*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52920.
112. Neumann, S., M. Claus, and R. Paschke, *Interactions between the extracellular domain and the extracellular loops as well as the 6th transmembrane domain are necessary for TSH receptor activation*. Eur J Endocrinol, 2005. **152**(4): p. 625-34.
113. Kleinau, G., et al., *From molecular details of the interplay between transmembrane helices of the thyrotropin receptor to general aspects of signal transduction in family a G-protein-coupled receptors (GPCRs)*. J Biol Chem, 2011. **286**(29): p. 25859-71.
114. Jaeschke, H., et al., *The hinge region of the TSH receptor stabilizes ligand binding and determines different signaling profiles of human and bovine TSH*. Endocrinology, 2011. **152**(10): p. 3986-96.
115. Furmaniak, J., et al., *Mechanisms of Action of TSHR Autoantibodies*. Horm Metab Res, 2015. **47**(10): p. 735-52.
116. Nielsen, T.B., et al., *Morphological and biochemical responses of cultured thyroid cells to thyrotropin*. Endocrinology, 1985. **116**(2): p. 788-97.
117. Rapoport, B., *Dog thyroid cells in monolayer tissue culture: adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate response to thyrotropic hormone*. Endocrinology, 1976. **98**(5): p. 1189-97.
118. Roger, P.P., et al., *Stimulation by thyrotropin, cholera toxin and dibutyryl cyclic AMP of the multiplication of differentiated thyroid cells in vitro*. Mol Cell Endocrinol, 1982. **26**(1-2): p. 165-76.
119. Allgeier, A., et al., *The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11*. J Biol Chem, 1994. **269**(19): p. 13733-5.
120. Ledent, C., et al., *The TSH cyclic AMP cascade in the control of thyroid cell proliferation: the story of a concept*. Thyroidology, 1991. **3**(3): p. 97-101.
121. Rosenblum, M.D., K.A. Remedios, and A.K. Abbas, *Mechanisms of human autoimmunity*. J Clin Invest, 2015. **125**(6): p. 2228-33.
122. Bagriacik, E.U. and J.R. Klein, *The thyrotropin (thyroid-stimulating hormone) receptor is expressed on murine dendritic cells and on a subset of CD45RBhigh lymph node T cells:*

- functional role for thyroid-stimulating hormone during immune activation.* J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6158-65.
123. Meffre, E. and H. Wardemann, *B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity.* Curr Opin Immunol, 2008. **20**(6): p. 632-8.
 124. Adams DD, P.H., *Abnormal responses in the assay of thyrotropin.* 1956.
 125. Kriss, J.P., V. Pleshakov, and J.R. Chien, *Isolation and Identification of the Long-Acting Thyroid Stimulator and Its Relation to Hyperthyroidism and Circumscribed Pretibial Myxedema.* J Clin Endocrinol Metab, 1964. **24**: p. 1005-28.
 126. Morshed, S.A. and T.F. Davies, *Graves' Disease Mechanisms: The Role of Stimulating, Blocking, and Cleavage Region TSH Receptor Antibodies.* Horm Metab Res, 2015. **47**(10): p. 727-34.
 127. Jaume, J.C., et al., *Thyrotropin receptor autoantibodies in serum are present at much lower levels than thyroid peroxidase autoantibodies: analysis by flow cytometry.* J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 500-7.
 128. Morgenthaler, N.G., S.C. Ho, and W.B. Minich, *Stimulating and blocking thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor autoantibodies from patients with Graves' disease and autoimmune hypothyroidism have very similar concentration, TSH receptor affinity, and binding sites.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1058-65.
 129. Zakarija, M., *Immunochemical characterization of the thyroid-stimulating antibody (TSAb) of Graves' disease: evidence for restricted heterogeneity.* J Clin Lab Immunol, 1983. **10**(2): p. 77-85.
 130. Knight, J., et al., *Thyroid-stimulating autoantibodies usually contain only lambda-light chains: evidence for the "forbidden clone" theory.* J Clin Endocrinol Metab, 1986. **62**(2): p. 342-7.
 131. Rees Smith, B., et al., *TSH receptor - autoantibody interactions.* Horm Metab Res, 2009. **41**(6): p. 448-55.
 132. Kraiem, Z., et al., *The IgG subclass distribution of TSH receptor blocking antibodies in primary hypothyroidism.* Clin Endocrinol (Oxf), 1992. **37**(2): p. 135-40.
 133. Sun, S., et al., *Antigenic "Hot-Spots" on the TSH Receptor Hinge Region.* Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 765.
 134. Morshed, S.A., et al., *Neutral antibodies to the TSH receptor are present in Graves' disease and regulate selective signaling cascades.* Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5537-49.
 135. Morshed, S.A., et al., *How one TSH receptor antibody induces thyrocyte proliferation while another induces apoptosis.* J Autoimmun, 2013. **47**: p. 17-24.
 136. Morshed, S.A., et al., *Biased signaling by thyroid-stimulating hormone receptor-specific antibodies determines thyrocyte survival in autoimmunity.* Sci Signal, 2018. **11**(514).
 137. Evans, M., et al., *Monoclonal autoantibodies to the TSH receptor, one with stimulating activity and one with blocking activity, obtained from the same blood sample.* Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **73**(3): p. 404-12.
 138. Takasu, N. and M. Matsushita, *Changes of TSH-Stimulation Blocking Antibody (TSBAb) and Thyroid Stimulating Antibody (TSAb) Over 10 Years in 34 TSBAb-Positive Patients with Hypothyroidism and in 98 TSAb-Positive Graves' Patients with Hyperthyroidism: Reevaluation of TSBAb and TSAb in TSH-Receptor-Antibody (TRAb)-Positive Patients.* J Thyroid Res, 2012. **2012**: p. 182176.
 139. Kasagi, K., et al., *Fluctuating thyroid function depending on the balance between stimulating and blocking types of TSH receptor antibodies: a case report.* Thyroid, 1993. **3**(4): p. 315-8.
 140. Tahara, K., et al., *Epitopes for thyroid stimulating and blocking autoantibodies on the extracellular domain of the human thyrotropin receptor.* Thyroid, 1997. **7**(6): p. 867-77.
 141. Kosugi, S., T. Ban, and L.D. Kohn, *Identification of thyroid-stimulating antibody-specific interaction sites in the N-terminal region of the thyrotropin receptor.* Mol Endocrinol, 1993. **7**(1): p. 114-30.
 142. Sanders, J., et al., *Thyroid-stimulating monoclonal antibodies.* Thyroid, 2002. **12**(12): p. 1043-50.

143. Ando, T., et al., *A monoclonal thyroid-stimulating antibody*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1667-74.
144. Costagliola, S., et al., *Generation of a mouse monoclonal TSH receptor antibody with stimulating activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **299**(5): p. 891-6.
145. Sanders, J., et al., *Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody*. Lancet, 2003. **362**(9378): p. 126-8.
146. Latif, R., et al., *Antibody protection reveals extended epitopes on the human TSH receptor*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44669.
147. Mueller, S., et al., *The hinge region: an important receptor component for GPCR function*. Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(2): p. 111-22.
148. Bartalena, L. and V. Fatourech, *Extrathyroidal manifestations of Graves' disease: a 2014 update*. J Endocrinol Invest, 2014. **37**(8): p. 691-700.
149. Allelein, S. and M. Schott, *[Thyroid dysfunction]*. MMW Fortschr Med, 2016. **158 Spec No 1**: p. 45-52.
150. Heufelder, A.E., et al., *Detection of TSH receptor RNA in cultured fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy and pretibial dermatopathy*. Thyroid, 1993. **3**(4): p. 297-300.
151. Douglas, R.S., et al., *Increased generation of fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(1): p. 430-8.
152. Bahn, R.S., *Current Insights into the Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy*. Horm Metab Res, 2015. **47**(10): p. 773-8.
153. Eckstein, A., et al., *[Graves' ophthalmopathy]*. Ophthalmologe, 2016. **113**(4): p. 349-64; quiz 465-6.
154. Cooper, D.S., *Hyperthyroidism*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 459-68.
155. Goichot, B., et al., *Clinical presentation of hyperthyroidism in a large representative sample of outpatients in France: relationships with age, aetiology and hormonal parameters*. Clin Endocrinol (Oxf), 2016. **84**(3): p. 445-51.
156. Douglas, M., *Neurology of endocrine disease*. Clin Med (Lond), 2010. **10**(4): p. 387-90.
157. Kahaly, G.J. and W.H. Dillmann, *Thyroid hormone action in the heart*. Endocr Rev, 2005. **26**(5): p. 704-28.
158. Mohr-Kahaly, S., G. Kahaly, and J. Meyer, *[Cardiovascular effects of thyroid hormones]*. Z Kardiol, 1996. **85 Suppl 6**: p. 219-31.
159. Sawin, C.T., et al., *Low serum thyrotropin concentrations as a risk factor for atrial fibrillation in older persons*. N Engl J Med, 1994. **331**(19): p. 1249-52.
160. Cobler, J.L., M.E. Williams, and P. Greenland, *Thyrotoxicosis in institutionalized elderly patients with atrial fibrillation*. Arch Intern Med, 1984. **144**(9): p. 1758-60.
161. Hoffmann, G. and I.D. Dietzel, *Thyroid hormone regulates excitability in central neurons from postnatal rats*. Neuroscience, 2004. **125**(2): p. 369-79.
162. Duyff, R.F., et al., *Neuromuscular findings in thyroid dysfunction: a prospective clinical and electrodiagnostic study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2000. **68**(6): p. 750-5.
163. Ruff, R.L. and J. Weissmann, *Endocrine myopathies*. Neurol Clin, 1988. **6**(3): p. 575-92.
164. Lause, M., A. Kamboj, and E. Fernandez Faith, *Dermatologic manifestations of endocrine disorders*. Transl Pediatr, 2017. **6**(4): p. 300-312.
165. Jabbour, S.A., *Cutaneous manifestations of endocrine disorders: a guide for dermatologists*. Am J Clin Dermatol, 2003. **4**(5): p. 315-31.
166. Ebert, E.C., *The thyroid and the gut*. J Clin Gastroenterol, 2010. **44**(6): p. 402-6.
167. Baker, J.T. and R.F. Harvey, *Bowel habit in thyrotoxicosis and hypothyroidism*. Br Med J, 1971. **1**(5744): p. 322-3.
168. Thomas, F.B., J.H. Caldwell, and N.J. Greenberger, *Steatorrhea in thyrotoxicosis. Relation to hypermotility and excessive dietary fat*. Ann Intern Med, 1973. **78**(5): p. 669-75.
169. Krassas, G.E., *Thyroid disease and female reproduction*. Fertil Steril, 2000. **74**(6): p. 1063-70.
170. Krassas, G.E., K. Poppe, and D. Glinioer, *Thyroid function and human reproductive health*. Endocr Rev, 2010. **31**(5): p. 702-55.

171. Boelaert, K., et al., *Older subjects with hyperthyroidism present with a paucity of symptoms and signs: a large cross-sectional study*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(6): p. 2715-26.
172. Trivalle, C., et al., *Differences in the signs and symptoms of hyperthyroidism in older and younger patients*. J Am Geriatr Soc, 1996. **44**(1): p. 50-3.
173. Mariotti, S., et al., *The aging thyroid*. Endocr Rev, 1995. **16**(6): p. 686-715.
174. Goichot, B., et al., *Diagnostic procedure in suspected Graves' disease*. Ann Endocrinol (Paris), 2018. **79**(6): p. 608-617.
175. Bahn Chair, R.S., et al., *Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists*. Thyroid, 2011. **21**(6): p. 593-646.
176. de los Santos, E.T., G.H. Starich, and E.L. Mazzaferri, *Sensitivity, specificity, and cost-effectiveness of the sensitive thyrotropin assay in the diagnosis of thyroid disease in ambulatory patients*. Arch Intern Med, 1989. **149**(3): p. 526-32.
177. Spencer, C.A., et al., *Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **70**(2): p. 453-60.
178. Dufour, D.R., *Laboratory tests of thyroid function: uses and limitations*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2007. **36**(3): p. 579-94, v.
179. Biondi, B. and D.S. Cooper, *Subclinical Hyperthyroidism*. N Engl J Med, 2018. **379**(15): p. 1485-1486.
180. Quadbeck, B., et al., *Binding, stimulating and blocking TSH receptor antibodies to the thyrotropin receptor as predictors of relapse of Graves' disease after withdrawal of antithyroid treatment*. Horm Metab Res, 2005. **37**(12): p. 745-50.
181. Carella, C., et al., *Serum thyrotropin receptor antibodies concentrations in patients with Graves' disease before, at the end of methimazole treatment, and after drug withdrawal: evidence that the activity of thyrotropin receptor antibody and/or thyroid response modify during the observation period*. Thyroid, 2006. **16**(3): p. 295-302.
182. Eckstein, A., et al., *[Role of TSH receptor autoantibodies for the diagnosis of Graves' disease and for the prediction of the course of hyperthyroidism and ophthalmopathy. Recommendations of the Thyroid Section of the German Society of Endocrinology]*. Med Klin (Munich), 2009. **104**(5): p. 343-8.
183. Cappelli, C., et al., *The role of imaging in Graves' disease: a cost-effectiveness analysis*. Eur J Radiol, 2008. **65**(1): p. 99-103.
184. Lee, S.J., et al., *Diagnostic performance of thyroid ultrasonography screening in pediatric patients with a hypothyroid, hyperthyroid or euthyroid goiter*. Pediatr Radiol, 2016. **46**(1): p. 104-11.
185. Pedersen, O.M., et al., *The value of ultrasonography in predicting autoimmune thyroid disease*. Thyroid, 2000. **10**(3): p. 251-9.
186. Grodski, S., et al., *Surgery versus radioiodine therapy as definitive management for graves' disease: the role of patient preference*. Thyroid, 2007. **17**(2): p. 157-60.
187. Brito, J.P., et al., *Development and Pilot Testing of an Encounter Tool for Shared Decision Making About the Treatment of Graves' Disease*. Thyroid, 2015. **25**(11): p. 1191-8.
188. Ross, D.S., et al., *2016 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis*. Thyroid, 2016. **26**(10): p. 1343-1421.
189. Klein, I., D.V. Becker, and G.S. Levey, *Treatment of hyperthyroid disease*. Ann Intern Med, 1994. **121**(4): p. 281-8.
190. Kahaly, G.J., et al., *2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism*. Eur Thyroid J, 2018. **7**(4): p. 167-186.
191. Cooper, D.S., *Antithyroid drugs*. N Engl J Med, 2005. **352**(9): p. 905-17.
192. Bartalena, L., L. Chiovato, and P. Vitti, *Management of hyperthyroidism due to Graves' disease: frequently asked questions and answers (if any)*. J Endocrinol Invest, 2016. **39**(10): p. 1105-14.

193. Andersohn, F., C. Konzen, and E. Garbe, *Systematic review: agranulocytosis induced by nonchemotherapy drugs*. *Ann Intern Med*, 2007. **146**(9): p. 657-65.
194. Wang, M.T., et al., *Antithyroid drug-related hepatotoxicity in hyperthyroidism patients: a population-based cohort study*. *Br J Clin Pharmacol*, 2014. **78**(3): p. 619-29.
195. Woeber, K.A., *Methimazole-induced hepatotoxicity*. *Endocr Pract*, 2002. **8**(3): p. 222-4.
196. Bahn, R.S., et al., *The Role of Propylthiouracil in the Management of Graves' Disease in Adults: report of a meeting jointly sponsored by the American Thyroid Association and the Food and Drug Administration*. *Thyroid*, 2009. **19**(7): p. 673-4.
197. Meyer-Gessner, M., et al., *[Side effects of antithyroid therapy of hyperthyroidism. A study of 1256 continuously treated patients]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 1989. **114**(5): p. 166-71.
198. Abraham, P., et al., *Antithyroid drug regimen for treating Graves' hyperthyroidism*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(1): p. CD003420.
199. Schleusener, H., et al., *Prospective multicentre study on the prediction of relapse after antithyroid drug treatment in patients with Graves' disease*. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1989. **120**(6): p. 689-701.
200. Vitti, P., et al., *Clinical features of patients with Graves' disease undergoing remission after antithyroid drug treatment*. *Thyroid*, 1997. **7**(3): p. 369-75.
201. Tun, N.N., et al., *Thyrotropin Receptor Antibody Levels at Diagnosis and After Thionamide Course Predict Graves' Disease Relapse*. *Thyroid*, 2016. **26**(8): p. 1004-9.
202. Schott, M., et al., *Levels of autoantibodies against human TSH receptor predict relapse of hyperthyroidism in Graves' disease*. *Horm Metab Res*, 2004. **36**(2): p. 92-6.
203. Feldt-Rasmussen, U., H. Schleusener, and P. Carayon, *Meta-analysis evaluation of the impact of thyrotropin receptor antibodies on long term remission after medical therapy of Graves' disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. **78**(1): p. 98-102.
204. Giuliani, C., et al., *A TSHR-LH/CGR chimera that measures functional thyroid-stimulating autoantibodies (TSAb) can predict remission or recurrence in Graves' patients undergoing antithyroid drug (ATD) treatment*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(7): p. E1080-7.
205. Leschik, J.J., et al., *Analytical performance and clinical utility of a bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins*. *Am J Clin Pathol*, 2013. **139**(2): p. 192-200.
206. Dobyns, B.M., et al., *Functional and histologic effects of therapeutic doses of radioactive iodine on the thyroid of man*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1953. **13**(5): p. 548-67.
207. Brent, G.A., *Clinical practice. Graves' disease*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(24): p. 2594-605.
208. Ross, D.S., *Radioiodine therapy for hyperthyroidism*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(6): p. 542-50.
209. Alexander, E.K. and P.R. Larsen, *High dose of (131)I therapy for the treatment of hyperthyroidism caused by Graves' disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(3): p. 1073-7.
210. Sridama, V., et al., *Long-term follow-up study of compensated low-dose 131I therapy for Graves' disease*. *N Engl J Med*, 1984. **311**(7): p. 426-32.
211. Bonnema, S.J. and L. Hegedus, *Radioiodine therapy in benign thyroid diseases: effects, side effects, and factors affecting therapeutic outcome*. *Endocr Rev*, 2012. **33**(6): p. 920-80.
212. McDermott, M.T., et al., *Radioiodine-induced thyroid storm. Case report and literature review*. *Am J Med*, 1983. **75**(2): p. 353-9.
213. Bartalena, L., et al., *Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' ophthalmopathy*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(2): p. 73-8.
214. Tallstedt, L., et al., *Occurrence of ophthalmopathy after treatment for Graves' hyperthyroidism. The Thyroid Study Group*. *N Engl J Med*, 1992. **326**(26): p. 1733-8.
215. Bartalena, L., *Diagnosis and management of Graves disease: a global overview*. *Nat Rev Endocrinol*, 2013. **9**(12): p. 724-34.
216. Bobanga, I.D. and C.R. McHenry, *Treatment of patients with Graves' disease and the appropriate extent of thyroidectomy*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2019. **33**(4): p. 101319.
217. Sosa, J.A., et al., *A population-based study of outcomes from thyroidectomy in aging Americans: at what cost?* *J Am Coll Surg*, 2008. **206**(6): p. 1097-105.

218. Maurer, E., et al., *Short-Term Outcomes of Surgery for Graves' Disease in Germany*. J Clin Med, 2020. **9**(12).
219. Neumann, S., et al., *Future Prospects for the Treatment of Graves' Hyperthyroidism and Eye Disease*. Horm Metab Res, 2015. **47**(10): p. 789-96.
220. Gershengorn, M.C. and S. Neumann, *Update in TSH receptor agonists and antagonists*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(12): p. 4287-92.
221. Furmaniak, J., J. Sanders, and B. Rees Smith, *Blocking type TSH receptor antibodies*. Auto Immun Highlights, 2013. **4**(1): p. 11-26.
222. Sanders, J., et al., *TSH receptor monoclonal antibodies with agonist, antagonist, and inverse agonist activities*. Methods Enzymol, 2010. **485**: p. 393-420.
223. Lane, L.C., et al., *New Therapeutic Horizons for Graves' Hyperthyroidism*. Endocr Rev, 2020. **41**(6).
224. Zophel, K., D. Roggenbuck, and M. Schott, *Clinical review about TRAb assay's history*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(10): p. 695-700.
225. Smith, B.R. and R. Hall, *Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease*. Lancet, 1974. **2**(7878): p. 427-31.
226. Shewring, G. and B.R. Smith, *An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies*. Clin Endocrinol (Oxf), 1982. **17**(4): p. 409-17.
227. Southgate, K., et al., *A receptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies in unextracted serum*. Clin Endocrinol (Oxf), 1984. **20**(5): p. 539-48.
228. Kakinuma, A., et al., *Comparison of recombinant human thyrotropin receptors versus porcine thyrotropin receptors in the thyrotropin binding inhibition assay for thyrotropin receptor autoantibodies*. Thyroid, 1999. **9**(9): p. 849-55.
229. Kamijo, K., *TSH-receptor antibody measurement in patients with various thyrotoxicosis and Hashimoto's thyroiditis: a comparison of two two-step assays, coated plate ELISA using porcine TSH-receptor and coated tube radioassay using human recombinant TSH-receptor*. Endocr J, 2003. **50**(1): p. 113-6.
230. Hirooka, Y., et al., *Comparison of new different assay systems for thyrotropin receptor antibodies with reference to thyroid-stimulating antibodies and thyroid stimulation-blocking antibodies in Graves' disease*. Int J Clin Pharmacol Res, 2004. **24**(4): p. 111-6.
231. Zophel, K., et al., *Are porcine and human TSH receptor antibody measurements comparable?* Clin Lab, 2008. **54**(1-2): p. 1-8.
232. Sanders, J., et al., *Characteristics of a human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor: sequence structure and function*. Thyroid, 2004. **14**(8): p. 560-70.
233. Smith, B.R., et al., *A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies*. Thyroid, 2004. **14**(10): p. 830-5.
234. Hermsen, D., et al., *Technical evaluation of the first fully automated assay for the detection of TSH receptor autoantibodies*. Clin Chim Acta, 2009. **401**(1-2): p. 84-9.
235. Hermsen, D., et al., *Reproducibility of Elecsys anti-TSHR test results in a lot-to-lot comparison*. Horm Metab Res, 2010. **42**(4): p. 295-7.
236. Schott, M., et al., *Clinical value of the first automated TSH receptor autoantibody assay for the diagnosis of Graves' disease (GD): an international multicentre trial*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(4): p. 566-73.
237. Tozzoli, R., et al., *Accuracy of receptor-based methods for detection of thyrotropin-receptor autoantibodies: a new automated third-generation immunoassay shows higher analytical and clinical sensitivity for the differential diagnosis of hyperthyroidism*. Auto Immun Highlights, 2010. **1**(2): p. 95-100.
238. Tozzoli, R., et al., *TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods. Systematic review and meta-analysis*. Autoimmun Rev, 2012. **12**(2): p. 107-13.
239. Giuliani, C., et al., *A TSHr-LH/CGr chimera that measures functional TSAbs in Graves' disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(7): p. E1106-15.

240. Lytton, S.D., et al., *A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(5): p. 2123-31.
241. Lee, J.I., et al., *Diagnostic value of a chimeric TSH receptor (Mc4)-based bioassay for Graves' disease*. Korean J Intern Med, 2011. **26**(2): p. 179-86.
242. Lytton, S.D. and G.J. Kahaly, *Bioassays for TSH-receptor autoantibodies: an update*. Autoimmun Rev, 2010. **10**(2): p. 116-22.
243. Araki, N., et al., *Rapid bioassay for detection of thyroid-stimulating antibodies using cyclic adenosine monophosphate-gated calcium channel and aequorin*. Eur Thyroid J, 2015. **4**(1): p. 14-9.
244. Frank, C.U., et al., *Bridge Technology with TSH Receptor Chimera for Sensitive Direct Detection of TSH Receptor Antibodies Causing Graves' Disease: Analytical and Clinical Evaluation*. Horm Metab Res, 2015. **47**(12): p. 880-8.
245. Minich, W.B., et al., *A coated tube assay for the detection of blocking thyrotropin receptor autoantibodies*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(1): p. 352-6.
246. Grasso, Y.Z., et al., *Epitope heterogeneity of thyrotropin receptor-blocking antibodies in Graves' patients as detected with wild-type versus chimeric thyrotropin receptors*. Thyroid, 1999. **9**(6): p. 531-7.
247. Zweig, M.H. and G. Campbell, *Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine*. Clin Chem, 1993. **39**(4): p. 561-77.
248. Allelein, S., et al., *Clinical Evaluation of the First Automated Assay for the Detection of Stimulating TSH Receptor Autoantibodies*. Horm Metab Res, 2016. **48**(12): p. 795-801.
249. Tozzoli, R., et al., *Evaluation of the first fully automated immunoassay method for the measurement of stimulating TSH receptor autoantibodies in Graves' disease*. Clin Chem Lab Med, 2017. **55**(1): p. 58-64.
250. Autilio, C., et al., *Stimulating TSH receptor autoantibodies immunoassay: analytical evaluation and clinical performance in Graves' disease*. Ann Clin Biochem, 2018. **55**(1): p. 172-177.
251. Kamijo, K., K. Ishikawa, and M. Tanaka, *Clinical evaluation of 3rd generation assay for thyrotropin receptor antibodies: the M22-biotin-based ELISA initiated by Smith*. Endocr J, 2005. **52**(5): p. 525-9.
252. Ralli, M., et al., *Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation*. Autoimmun Rev, 2020. **19**(10): p. 102649.
253. Takasu, N., et al., *Evidence for thyrotropin (TSH)-blocking activity in goitrous Hashimoto's thyroiditis with assays measuring inhibition of TSH receptor binding and TSH-stimulated thyroid adenosine 3',5'-monophosphate responses/cell growth by immunoglobulins*. J Clin Endocrinol Metab, 1987. **64**(2): p. 239-45.
254. Konishi, J., et al., *Inhibition of thyrotropin-induced adenosine 3'5'-monophosphate increase by immunoglobulins from patients with primary myxedema*. J Clin Endocrinol Metab, 1983. **57**(3): p. 544-9.
255. Endo, K., et al., *Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis*. J Clin Endocrinol Metab, 1978. **46**(5): p. 734-9.
256. Schott, M., et al., *Detecting TSH-receptor antibodies with the recombinant TBII assay: technical and clinical evaluation*. Horm Metab Res, 2000. **32**(10): p. 429-35.
257. Giovanella, L., L. Ceriani, and S. Garancini, *Evaluation of the 2nd generation radio-receptional assay for anti-TSH receptor antibodies (TRAb) in autoimmune thyroid diseases. Comparison with 1st generation and anti-thyroperoxidase antibodies (AbTPO)*. Q J Nucl Med, 2001. **45**(1): p. 115-9.
258. Costagliola, S., et al., *Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(1): p. 90-7.

259. Kahaly, G.J., et al., *Thyroid Stimulating Antibodies Are Highly Prevalent in Hashimoto's Thyroiditis and Associated Orbitopathy*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(5): p. 1998-2004.
260. Laurberg, P., et al., *TSH-receptor autoimmunity in Graves' disease after therapy with anti-thyroid drugs, surgery, or radioiodine: a 5-year prospective randomized study*. Eur J Endocrinol, 2008. **158**(1): p. 69-75.
261. Dauksiene, D., A. Dauksa, and N. Mickuviene, *Independent pretreatment predictors of Graves' disease outcome*. Medicina (Kaunas), 2013. **49**(10): p. 427-34.
262. Stohr, M., et al., *Predicting the Relapse of Hyperthyroidism in Treated Graves' Disease with Orbitopathy by Serial Measurements of TSH-Receptor Autoantibodies*. Horm Metab Res, 2021. **53**(4): p. 235-244.
263. Struja, T., et al., *Comparison of Five TSH-Receptor Antibody Assays in Graves' disease: results from an observational pilot study*. BMC Endocr Disord, 2019. **19**(1): p. 38.
264. Lytton, S.D., A. Schluter, and P.J. Banga, *Functional diagnostics for thyrotropin hormone receptor autoantibodies: bioassays prevail over binding assays*. Front Biosci (Landmark Ed), 2018. **23**: p. 2028-2043.
265. Allelein, S., et al., *Comparison of a Bridge Immunoassay with Two Bioassays for Thyrotropin Receptor Antibody Detection and Differentiation*. Horm Metab Res, 2019. **51**(6): p. 341-346.
266. Kim, W.B., et al., *Changes in epitopes for thyroid-stimulating antibodies in Graves' disease sera during treatment of hyperthyroidism: therapeutic implications*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(6): p. 1953-9.
267. Diana, T., et al., *Standardization of a bioassay for thyrotropin receptor stimulating autoantibodies*. Thyroid, 2015. **25**(2): p. 169-75.

Danksagung

Das Verfassen dieser Dissertation war nur durch die Unterstützung verschiedener Personen möglich, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte. Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Matthias Schott für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas bedanken. Für meine Fragen war er stets ein kompetenter und geduldiger Ansprechpartner.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Stephanie Allelein für die Mitbetreuung dieses Projektes bedanken. Ihr Engagement und ihre Hilfestellungen waren mir eine große Hilfe und der Grundstein zur Verfassung dieser Dissertation.

Besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie für die bedingungslose Unterstützung, vor allem meinem Papa, ohne den ich diese Dissertation nicht begonnen hätte. Außerdem möchte ich mich bei meinem Bruder Benedikt bedanken, dessen wissenschaftliche Begeisterung und Perfektionismus mir ein großes Vorbild waren.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen großartigen, langjährigen Freunden und bei meinem Mann Matthias bedanken, die stets ein offenes Ohr für mich und meine Probleme hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

6 Anhang

Bildrechte für reproduzierte Abbildungen

Abb. 1.2:

Reproduced with permission from Frank et. al., Copyright Georg Thieme Verlag KG. Laut Thieme-connect.com, 7.6.2022 ist die Reproduktion der Bilder im Rahmen einer nichtkommerziellen Dissertation ohne zusätzliche Genehmigung durch den Verlag erlaubt.

Abb. 3.1-3.6:

Eine schriftliche Genehmigung des *Georg Thieme Verlags KG* vom 28.5.2022 zur Reproduktion im Rahmen dieser Dissertation liegt vor.

Abb. 4.1. A und B:

Diese Abbildung wurde mithilfe des Programms PyMOL angefertigt. Die Strukturen der TSHR/M22 und TSHR/K1-70 Komplexe wurden der RCSB Proteindatenbank (PDB, <https://www.rcsb.org>) entnommen: PDB-ID: 3G04 (TSHR/M22) und PDB-ID: 2XWT (TSHR/K1-70).