

OTKA Nyilvántartási szám: T037184
ZÁRÓJELENTÉS

Témavezető neve

Dr. Balázs Csaba.....

A téma címe....."A Basedow-Graves kór immunológiai és molekuláris genetikai vizsgálata"

kutatás időtartama: **2002-2005**

Csatolt szakmai beszámoló

1. A szolubilis CD4 szint változása terhességben és posztpartum thyreoiditisben

A poszt-partum thyreoiditis olyan szervspecifikus autoimmun megbetegedés, amelynek kialakulásában mind celluláris, mind humorális immunpatológiai faktorok szerepet játszanak. Az autoantitestek közül a pajzsmirigy peroxidáz enzim- és a thyreoglobulin elleni antitesteknek tulajdonítanak diagnosztikus jelentőséget. A poszt-partum thyreoiditis az ismételt terhesség után kiújulhat, azonban napjainkig sincsenek megbízható laboratóriumi adatok a betegség recidívájának előre jelzésére.

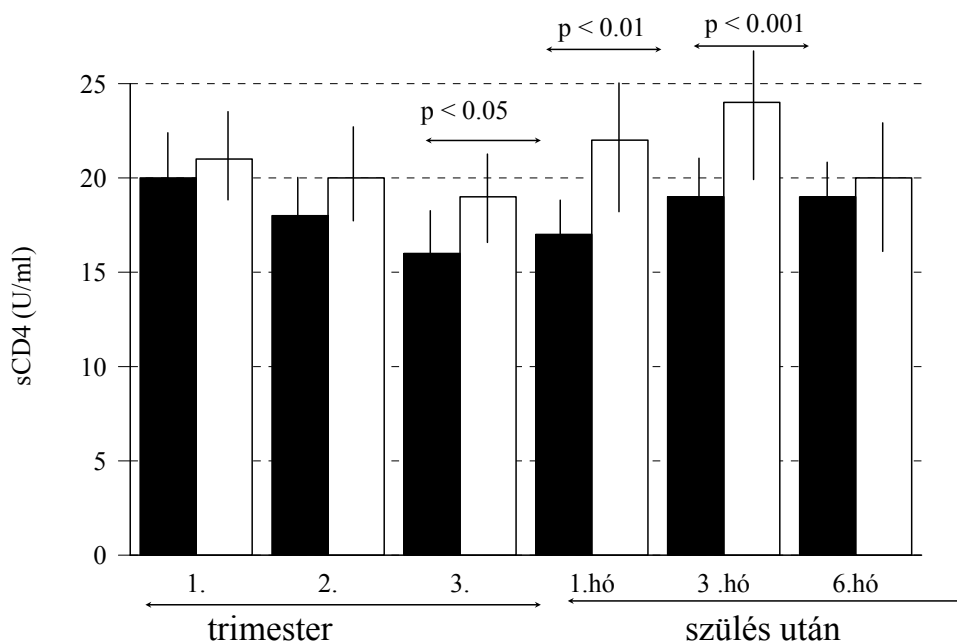
A vizsgálatunk célja: a szolubilis CD4 és CD8 molekulák mennyiségének meghatározása a terhesség alatt és szülést követően azokban, akik korábban poszt-partum thyreoiditisben szenvedtek. A tanulmány további feladata volt, hogy választ adjon arra a kérdésre, hogy ezeknek a molekuláknak van-e jelentőségük a betegség recidívájának előre jelzésében. 48 beteget vontak be a vizsgálatba, akik korábbi szülésük után poszt-partum thyreoiditisben szenvedtek. A szülést követően a 48-ból 24 esetben a betegség kiújult. A 24 esetből 20-ban követték a betegek legfontosabb klinikai és immunológiai laboratóriumi adatait a terhesség első, második és harmadik trimeszterében, majd a szüléseket követő első, harmadik és hatodik hónapban. A szolubilis CD4-, CD8 szintek és a pajzsmirigy elleni antitestek titerének meghatározása ELISA módszerrel történt.

A gyulladásszerű tünetek kiújulásában rizikót jelentett, ha az anya dohányzott és ha az újszülött fiú volt. A szolubilis CD4 és a szolubilis CD8 egészséges nem terhes nőkben $18,4 \pm 2,4$ U/ml, ill. $363 \pm 54,6$ U/ml, volt. A vizsgálat kezdetén az összes egyén euthyreosisos volt és a szérumban pajzsmirigy elleni antitesteket nem lehetett kimutatni. Összehasonlítottuk a szolubilis CD4 és CD8 szinteket azokban az anyákban, akikben a thyreoiditis recidivált és azokban akikben nem. Azt találták, hogy a szolubilis CD8 szintekben nem volt lényeges eltérés betegek ($379 \pm 59,7$ U/ml) és az egészségesek ($364 \pm 58,3$ U/ml) között. Feltűnő volt viszont, hogy azokban a terhésekben, akikben a recidiva nem következett be, a szolubilis CD4 szint a terhesség alatt szignifikánsan csökkent. Ez a csökkenés a 3. trimeszter végén volt a

legjelentősebb ($16,5 \pm 2,1$ U/ml) ($p < 0,001$). A szülést követően a szupprimált szolubilis CD4 szint fokozatosan normalizálódott, az 1. hónap után $19,7 \pm 2,35$ U/ml, a 6. hónap végén $19,2 \pm 2,09$ U/ml volt. A pajzsmirigy peroxidáz- és thyreoglobulin elleni antitestek titerének lényeges emelkedése viszont csak a szülést követő 3. és 6. hónapokban következett be.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a szolubilis CD4 koncentráció változása érzékeny indikátora a poszt-partum thyreoiditis recidívájának.

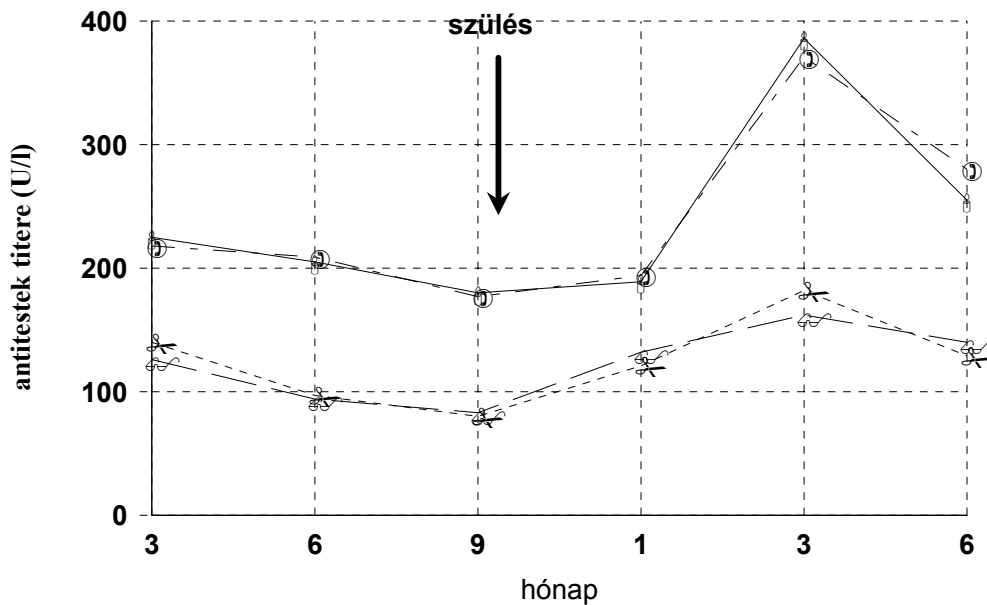
Ezt az eredményünket szabadalomként jegyezték be az Egyesült Királyságban (GB 2376016/2004).



1. Ábra

A szolubilis CD4 szint alakulása terhesség alatt és a szülést követően poszt-partum thyreoiditises és egészséges nőkben

A kitöltött oszlopok a kontroll, az üresek a poszt-partum thyreoiditises nők szolubilis CD4 értékeit mutatják.

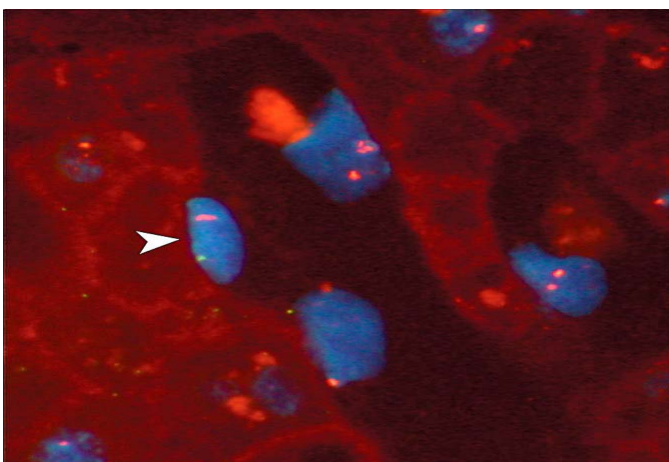


2. Ábra

A pajzsmirigy eredetű peroxidáz (TPO) és a thyreoglobulin (Tg) elleni antitestek titerének alakulását mutatja a terhesség alatt és a szülést követően.

A pontok a TPO elleni, a háromszögek a Tg elleni antitestek szintjét jelzik a recidivált poszt-partum thyreoiditises betegekben. A körök és csillagok pedig a TPO és a Tg elleni antitestek titerét jelzik az egészségesekben. A nyíl a szülés időpontját mutatja.

Azt is kimutattuk, hogy a PPT-ben szenvedőkben és a pajzsmirigy betegséghez társult orbitopathiás betegekben az Y kromoszóma lényegesen gyakoribb, mint a nem autoimmun pajzsmirigybetegekben.



- Y kromoszóma: zöld
- X kromoszóma: vörös

Y chromosoma kimutatása XX karitypusú anya pajzsmirigyében (FISH)

2. A pajzsmirigy betegséghez társult orbitopathia (endokrin ophthalmopathia) megelőzése pentoxifillinnel

Prospektív, kontrollált vizsgálatunkban arra kerestek választ, hogy a pentoxifillin képes-e a pajzsmirigy betegséghez társult orbitopathia (TAO) kialakulásának megelőzésére. Ebből a célból összehasonlították a tünetek alakulását a metimazol+ placebóval, ill. a metimazol + pentoxifillinnel kezelt Basedow-Graves kóros betegekben. A kontroll csoportot 112 hyperthyreosisos, kezeletlen Basedow-Graves kóros beteg (átlagos életkor $44 \pm 12,4$ év, 83 nő és 29 férfi) képezte, akik metimazol + placebó kezelést kaptak. A pentoxifillin + metimazzal kezelt csoport szintén 112 betegből állott (átlagéletkor $47,7 \pm 10,2$ év, 83 nő és 29 férfi). A tanulmány kezdetén nem észleltünk lényeges különbséget sem a klinikai tünetekben, sem a laboratóriumi adatokban a két csoport között, ugyanakkor a pentoxifillin kezelés 6. és 12. hónapjában a közép- és súlyos orbitopathiás betegek száma lényegesen kevesebb volt. Az orbitopathia patomechanizmusában szerepet játszó kockázati tényezőket is vizsgálták. Kiderült, hogy a dohányzás önmagában, genetikai háttér nélkül is jelentősen növelte az orbitopathia kialakulásának kockázatát (OR: 7,1 CI 95% 5,4-9,3, $p < 0,003$), a dohányzás genetikai hajlammal együtt pedig tovább fokozta a tünetek manifesztációját, ill. progresszióját (OR: 9,2 CI 95%, 6,9-12,1, $p < 0,0001$). A pentoxifillin kezelés kedvező preventív hatását figyelték meg mind a dohányzóknál, mind azokban, akik a dohányzás mellett kedvezőtlen örökletes háttérrel is rendelkeztek (OR: 2,62 CI 95%, 1,5-3,7, $p < 0,001$; 2,12 CI 95% 1,5-3,1, $p < 0,001$). A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a 12 hónapos pentoxifillin kezelés gátolta az orbitopathia kialakulását, ill. megakadályozta súlyos, infiltratív formák manifesztációját. Ezért előnyösnek tartják a gyógyszer alkalmazását preventív céllal Basedow-Graves kóros betegekben a thyreosztatikus kezeléssel egyidőben, főként azokban, akik nem hajlandók lemondani a dohányzásról.

1. táblázat: A laboratóriumi adatok összehasonlító vizsgálata a tanulmány kezdetén és végén

Kezelés	Kontroll csoport		PTX csoport	
	előtt	után	előtt	után
TRAK (U/l)	$7,1 \pm 0,41$	$3,6 \pm 0,23$	$8,9 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,14^*$
FT4 (pmol/l)	$4,1 \pm 0,16$	$1,13 \pm 0,03$	$4,2 \pm 0,16$	$1,19 \pm 0,03$

FT3 (pmol/l)	6,5±0,23	2,23±0,07	6,3±0,48	2,29±0,14
TSH (mU/l)	0,15±0,01	2,9±0,04	0,12±0,01	3,2±0,08

* p<0.05)

2. táblázat

A pentoxifillin hatása a szemtünetek kialakulásának valószínűségére

(FH= familiáris háttér ,OR:odds ratio

Kontroll csoport

	OR (95%)	p
Dohányzó (n= 54)	7,1 (9,3-5,4)	< 0,003
Dohányzó+ FH (n=39)	9,2 (6,9-12,1)	< 0,001

PTX-el kezelt csoport

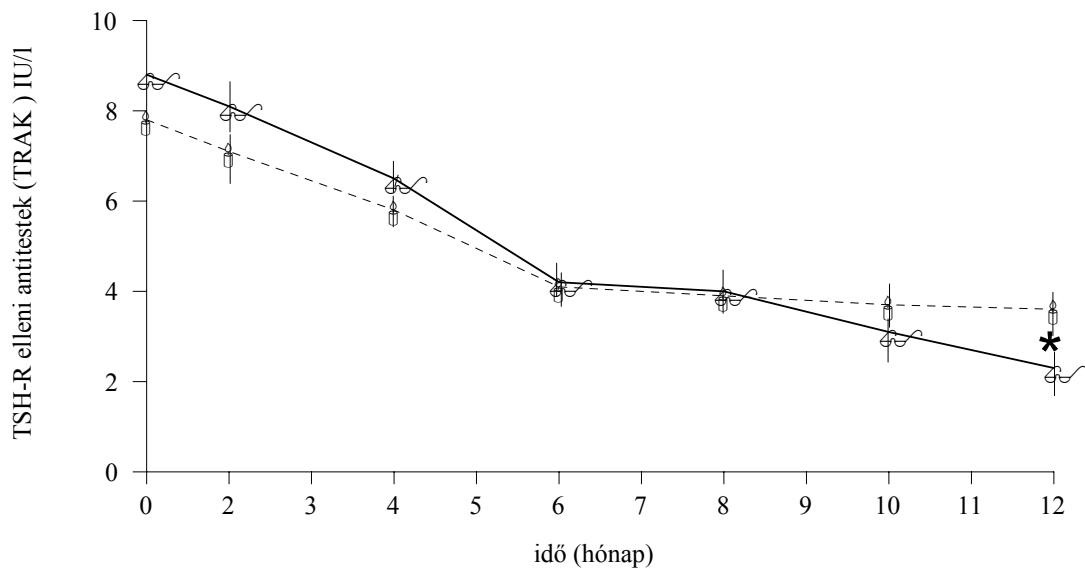
	OR (95%)	p
Dohányzó (n=58)	2,12 (1,5-3,1)	0,037
Dohányzó + FH (n=35)	2,62 (1,5-3,7)	

3. táblázat

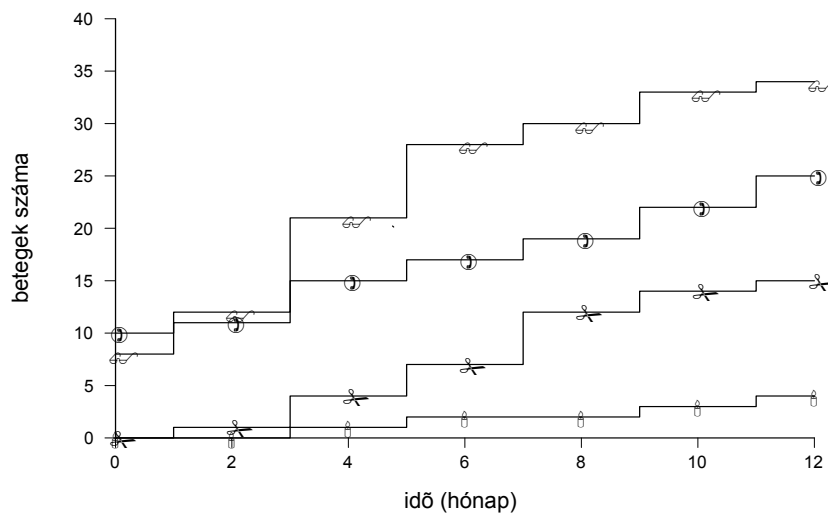
A pentoxifillin hatása a TAO manifesztációjára a pentoxifillin kezelés 6. és 12. hónapja után

	Kezelés kezdete		6 hónap		12 hónap	
	Kontroll	PTX	Kontroll	PTX	Kontroll	PTX
TAO jelek	30	35	50	41	37	24
középsúlyos	8	10	34	25*	34	18*
Súlyos	0	0	7	2**	15	4**

* = p < 0.01 ** p< 0.001



1. ábra : A TSH-R elleni antitestek szintje a kontroll és a pentoxifillinnel kezelt betegekben
háromszögek = TSH-R elleni antitestek a kontroll csoportban
üres négyzetek = TSH-R elleni antitestek a pentoxifillinnel kezelt csoportban
* $p < 0.05$



2. ábra : A TAO manifesztációja a placebó és pentoxifillinnel kezelt csoportban

négyszögek = betegek közepsúlyos TAO-val a kontroll csoportban

csillagok = betegek súlyos TAO-val a kontroll csoportban

pontok = betegek közepsúlyos TAO-al a pentoxifillinnel kezelt csoportban

háromszögek = betegek súlyos TAO-val a pentoxifillinnel kezelt csoportban

3. TSH receptor evolúciójára, genetikai polimorfizmusára vonatkozó vizsgálataink.

Kimutattuk, hogy a TSH-R magas spontán mutációs rátával rendelkezik. A jódihiányban a TSH-R főleg konstitutív típusú mutációnak száma jelentősen magasabb. A terhességben és fiatal felnőtt korban adott jódpótlás lényeges a nem immun típusú TSH-R mutációk prevenciójában. A TSH-R strukturális plaszticitásának vizsgálata céljából szekvenáltuk az ember és két majom species (Macaca mulatta és a Cercopithecus aethiops) génjeit és analizáltuk az evolúciós trendeket. A két főemlős TSH-R génjei egy 764 aminosavból álló fehérjét kódolnak, amelyek 99% homológiát egymással. Ugyanakkor az ember TSH-R strukturális hasonlósága a C. aethiops esetében 97%-osnak, a M.mulatta esetében pedig 96%-osnak bizonyult. Az összehasonlító vizsgálatainkat kiterjesztettük még további 8 emlősre is. Az aminosavak szekvenciája a vizsgált 14 TSH receptorban hasonló volt. Megállapítottuk, hogy a leginkább variábilis szekvenciák az intracelluláris farki részen és a ciszteinben gazdag C részen figyelhetők meg, míg a receptor membránban lévő szakasz viszonylag konzervatív. Lényeges különbségeket találtunk az egyes fajok TSH-R-ainak glikozilációs helyeiben és számaiban. Ez egyben azt is jelenti, hogy a humán TSH-R külön epitopokkal rendelkezik, amelyek képesek a TSH-R elleni antitestek indukálására és kötésére. Vizsgálataink azt támasztották alá (elsőként az irodalomban), hogy a TSH-R elleni antitest egyedül emberben keletkezik és csak emberben okoz betegséget (BG kórt) nem a receptor mutációival, hanem azon sajátosságával áll összefüggésben, hogy képes a dimerizációra és oligomerizációra egyaránt.

Table 1. The PCR primers used to amplify TSHR cDNAs from Cercopithecus aethiops aethiops and Macaca mulatta

Primer designation	TSHR sequence	Primer Sequence (5' → 3')	Strand
1a	882-991	TCCTTGAGTCCTTGATGTGT	Sense
1b	1961-1941	TGAGAGGCTTGTTTCAGAATT	Antisense
3a	1505-1530	TTTGCAAGCGAGTTATCGGTGTA TA	Sense

3b	1927-1903	TAGAATGAGATTGGGGCCATGCA TA	Antisense
5a	-47 - -24	TGAGGCGATTTTCGGAGGATGGAG A	Sense
5b	1295-1274	ATTGCCCAGGAGAGCCAGCAGA	Antisense
6a	-6- 16	TGGAAAATGAGGCCGGCGGACT	Sense
2b	1024-999	TGGACTTTTCCTTGTACCCAACA AT	Antisense
7b	2302-2274	ACTTACAAAAC(T/C)GTTTGC(G/C) TATACTCT	Antisense

The numbering of nucleotides is based on hTSHR coding sequence .

Combinations of various primers were used to amplify overlapping PCR fragments of the following sizes:

5a/5b: 1342 bp; 3a/3b:422 bp; 3a/7b:796 bp; 1a/1b: 1079 bp and 6a/2b:1030 bp.

Both strands were sequenced from at least two independent clones; for most 3 clones were sequenced.

Figure 1 Multiple sequence alignment of TSH receptors from 14 vertebrates

```

Mullatta_ -----MRPADLLQLVLLLVLPRLDGGKGCSSPPCECQQEEDFRVT 40
Aethiops_ -----MRPADLLQLVLLLVLPRLDGGKGCSSPPCECQQEEDFRVT 40
Homo -----MRPADLLQLVLLLDLPRDLGGMGCCSSPPCECHQEEDFRVT 40
catus -----MRQTPLLQLALLLSLPRSLGGKGCPSPPCECHQEEDFRVT 40
Familiaris -----MRPPLLHLALLLALPRSLGGKGCPSPPCECHQEEDFRVT 40
scofa -----MSLTPLLQLALLLALPRSLRGKGCPSPPCECHQEEDFRVT 40
aries -----MRPTPLRLALLLVLPSSLWGERCPSPPECECRQEEDFRVT 40
taurus -----MRPTPLRLALFLVLPSSLGGERCPSPPCECRQEEDFRVT 40
musculus -----MRPGSLLLLVLLLALSRLRGKECASPPCECHQEEDFRVT 40
norvegicus -----MRPGSLLQLTLLLALPRSLWGRGCTSPPECECHQEEDFRVT 40
saxatilis -----MQVITCALFALVSLPVSSTVSGADSCP-AVCECSEWKHTHTIS 41
talpia -----MQVITCALFTLVTLPIE-TASEADSCP-AVCECSEWKTLTIS 40
salmon_A MTENDRHRLQVITCALFTLVTLPIK-TLGD TDSCP-TVCECSEWKTYTIS 48
salmon_B MTENDRHSLQVITCALFTLVTLPIE-TLVDFESCP-TVDCDCSERKTYTIS 48
          :      * : * . :          * . . * : * : .   ::

mullatta CKDIQRI PSLPPSTQTLKLIETRLR TIPSHAFSSLNPNISRIYLSIDATLQ 90
aethiops_ CKDIQRI PSLPPSTQTLKLIETRLR TIPSHAFSSLNPNISRIYLSIDATLQ 90
homo CKDIQRI PSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLNPISRIYV SIDVTLQ 90
catus CKDIHRIPSLPPSTQTLKFIETHLKTIPSR AFSNLNPISRIYLSIDATLQ 90
familiaris CKDIHRIPSLPPSTQTLKFIETHLKTIPSR AFSNLNPISRIYLSIDATLQ 90
scofa CKDIHSIPPLPNTQTLKFIETHLKTIPSR AFSNLNPISRIYLSIDATLQ 90
aries CKDIQRI PSLPPSTQTLKFIETHLKTIPSR AFSNLNPISRIYLSIDATLQ 90
taurus CKDIQSI PSLPPSTQTLKFIETHLKTIPSR AFSNLNPISRIYLSIDATLQ 90
musculus CKELHRIPSLPPSTQTLKLIETHLKTIPSLAFSSLNPNISRIYLSIDATLQ 90
norvegicus CKELHQIPSLPPSTQTLKLIETHLKTIPSLAFSSLNPNISRIYLSIDATLQ 90
saxatilis CFDIDILPRFPASTETLWLFETSLSSVPADAFSSMVNISR IYISVDMTLQ 91
talpia CFDIDILPRFPSTETLWLFETRLSSVPADAFASVNVNISR IYISVDVTLQ 90
salmon CFDIDIVPTFPSTETIWLLETRLTSVPGDVFSNLVNI SR IYISVDVTLV 98
salmon_B CFDIDIVPTFPASTETLWLETRLNSVPGDVFSNLVNI SR IYISVDLTLK 98
* : . . : * : * . * : : * * * : * . : * : . : * * * * : * * *

mullatta QLETHSFYNLNKVTHIEIRNTRSLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKM 140
aethiops_ QLESHSFYNLNKVTHIEIRNTRSLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKM 140
homo QLESHSFYNLSKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKM 140
catus RLESHSFYNLSKMTHIEIRNTRSLTYIDPGALKELPLLKFLGIFNTGLGV 140
familiaris RLESHSFYNLSKMTHIEIRNTRSLTSIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLGV 140
scofa QLESQSFYNLSKMTHIEIRNTRSLTYINPGALKDPLLKFLGIFNTGLRI 140
aries QLESHSFYNLSKVTHIEIRNTRSLTYIDSGALKELPLLKFLGIFNTGLRV 140
taurus QLESHSFYNLSKVTHIEIRNTRSLTYIDSGALKELPLLKFLGIFNTGLRV 140

```


musculus RLEPHSFYNLSKMTHEIRNTRSLTYIDPDALTELPLLKFLGIFNTGLRI 140
norvegicus RLEPHSFYNLSKMTHEIRNTRSLTYIDPDALTELPLLKFLGIFNTGLRI 140
saxatilis RLERHSFYSLRKI THIEIRNAKSLTYIDPEAFKNLPLNKYLGI FNTGLTF 141
talpia RLEKHSFYSLRKI THIEIRNAKSLTYIDPEAFKHLPELKYLGIFNTGLTF 140
salmon_A GLQRHSFYNLKKI THIEIRNAKSLSYIDPEAFKNLPLNKYLGI FNTGLTL 148
salmon_B RLERHSFYNLKKI THIEIRNARSLSYIDPEAFKNLPLNKYLGI FNTGLTI 148
* : :***. * :*****::.* : * . :. * . * :***** .

mullatta FPDLTKVYSTDIFFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
aethiops FPDLTKVYSTDIFFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
homo FPDLTKVYSTDIFFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
catus FPDLTKVYSTDVFFILEITDNPYMTSIPANAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
familiaris FPDVTKVYSTDVFFILEITDNPYMASIPANAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
scofa FPDLTKVYSTDVFFILEITDNPYMTSIPANAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
aries FPDLTKIYSTDVFFILEITDNPYMTSVPANAFQGLSNETLTLKLYNNGFT 190
taurus FPDLTKIYSTDVFFILEITDNPYMTSIPANAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
musculus FPDLTKIYSTDIFFFILEITDNPYMTSVPENAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
norvegicus FPDLTKIYSTDVFFILEITDNPYMTSVPENAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
saxatilis FPDLSNIYSDMNFILEIVDHPYITEIPTNSFRGITSDVLTVMLYGNGFR 191
talpia FPDLSNIHSDMNFILEIVDHPYITEIPANSFRGITSEALTVMLYGNGFR 190
salmon_A FPDLTNIHSDMNFILEIADHPYISEVPANSFRGITNQVLTVMLYSNGFT 198
salmon_B FPDLTNIHSDMNFVLEITDHPYISEVPANSFRGITNQVLTVMLYSNGFT 198
:..: * : * :. * :*****::.* : * . :. * . * :*****

mullatta SIQGYAFNGTKLDAVYLNKKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSHTSVTA 240
aethiops SIQGYAFNGTKLDAVYLNKKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSHTSVTA 240
homo SVQGYAFNGTKLDAVYLNKKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSHTSVTA 240
catus SIQGHAFNGTKLDAVYLNKKNKYLTAIDQDAFGGVYSGPTLLDVSYTSVTA 240
familiaris SIQGHAFNGTKLDAVYLNKKNKYLTAIDQDAFGGVYSGPTLLDVSYTSVTA 240
scofa SVQGHAFNGTKLDAVYLNKKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPTLLDVSYTSVTA 240
aries SIQGHAFNGTKLDAVYLNKKNKYLTVIDQDAFAGVYSGPTLLDISYTSVTA 240
taurus SIQGHAFNGTKLDAVYLNKKNKYLTVIGQDAFAGVYSGPTLLDISYTSVTA 240
musculus SVQGHAFNGTKLDAVYLNKKNKYLTAIDNDAFGGVYSGPTLLDVSSTSVTA 240
norvegicus SIQGHAFNGTKLDAVYLNKKNKYLTAIDKDAFGGVYSGPTLLDVSSTSVTA 240
saxatilis EIQHHAFAFNGTKLDQVDLHRNKYLTKMDERAFAGTISGPMLLDVSLTGITT 241
talpia SVRHHAFNGTKLDQVDLHRNKYLTEMDDGCFVGTISGPILLDVSQTGITS 240
salmon_A DIQHHAFAFNGTKLDAVYLHRNKHLTKMDERTFAGTVSGPMLLDVSLTGIVSS 248
salmon_B DIQHHAFAFNGTKLDAVYLHRNRRLTRMDEDMFSGTVSGPMLLDVSLTAVSS 248
.:. :***** * * :*: * : * : * * * * * :* : * : * : * : *

mullatta LPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
aethiops LPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
homo LPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
catus LPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
familiaris LPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
scofa LPPKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
aries LPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
taurus LPSKGLEHLKELIARNTWTLRKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
musculus LPSKGLEHLKELIAKDTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
norvegicus LPSKGLEHLKELIAKNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
saxatilis LPSTGMDSLRELKARNAWALKKLPPIKTFKHLTIANLTYPRHCCGFKNLK 291
talpia LPTTGMDSVRELKARDAWALKKLPPIKTFKHLTVANLTYPSHCCGFKNLK 290
salmon_A LPTAGLESRELKARNAWNLKPLPPIKTFKHLVTADLTYPSCCGFKNLK 298
salmon_B LPTAGLESRELIARSAWNLKPLPPIKTFKHLTADLTYPSCCGFKNLK 298
** . * : : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

mullatta KIRGIPESLMCNESSMQSLRQR-----KS 314
aethiops KIRGILESMLCNESSMQSLRQR-----KS 314
homo KIRGILESMLCNESSMQSLRQR-----KS 314
catus KIRGILESFMCNDSSIRSLRQR-----KS 314
familiaris KIRGILESMLCNESSIRSLRQR-----KS 314
scofa KIRGILESMLCNESSIRSLRQR-----KS 314
aries NIRGILQSLMCNESSIWGLRQR-----KS 314
taurus KIRGILQSLMCNESSIRGLRQR-----KS 314
musculus KIRGILESMLCNESSIRNLRQR-----KS 314
norvegicus KIRGILESMLCNESSIRNLRQR-----KS 314
saxatilis KKRGFLEYIICNLTAFYDQHHK-----RS 315
talpia KKRGFLEYIICNLTAFYDQHQK-----RS 314
salmon KKRGFLEYIICNLTAFYDQHQKTSVGPLRVPSLQIDPASDTAADRHQKRS 348
salmon_B KKRGFLEYIICNLTAFYDQQQK-----RS 322
: * * : : * * : : * : * : * : * : *

mullatta VNALNSPLHQ-----EYEENLDDGIVGYKEKSKFQ-DAHNNAHY 352
aethiops VNALNSPLHQ-----EYEENLDDGIVGYKEKSKFQ-DAHNNAHY 352
homo VNALNSPLHQ-----EYEENLDDGIVGYKEKSKFQ-DTHNNAHY 352
catus VNALNGPFDQ-----EYEEYLGDSHAGYKDNSKFO-DTRSNSHY 352
familiaris VNTLNGPFDQ-----EYEEYLGDSHAGYKDNSQFO-DTDSNSHY 352

scofa VNAVNGPFYQ-----EYEEEDLGDSSVGNKENS KFQ-DTHSNSHY 352
aries ASALNGPFYQ-----EYEEEDLGDGSAGYKENS KFQ-DTHSNSHY 352
taurus ASALNGPFYQ-----EYED-LGDGSAGYKENS KFQ-DTQNSHY 351
musculus VNILRGPIYQ-----EYEEEDPGDNSVGYKQNS KFQ-ESPSNSHY 352
norvegicus VNVMRGPVYQ-----EYEEGLGDNHVGYKQNS KFQ-EGPSNSHY 352
saxatilis VGPLRIPSLQGESVVETIPDQEP---NDGGHRESQDWRRGDFHGLSHY 361
talpia VGPLRMPSLQGDGVVETLPDREL---KDDGGHRESQDQWKS GDFHGLSHY 360
salmon_A VGPLTVPSLQEDPMGDAADQQPSEVGFVRDQVSRDTQGDPRR-DFQSSPHY 397
salmon_B VGPLTVPSLQGDPTADTADQEPSEEGRDGVFKDTQGDPRR-DFHSSLNY 371
.. : * * * * * . . : . : .. :*

mullatta YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSDHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 402
aethiops YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSDHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 402
homo YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSDHYDYTCGDSEDMVCTPKS 402
catus YVFFEEQ-DEILGFGQELKNPQEETLQAFDSDHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 401
familiaris YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSDHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 402
scofa YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSDHYDYTVCGSEDMVCTPKS 402
aries YVFFEDQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDNHYDYTVCGGSEEMVCTPKS 402
taurus YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSDHYDYTVCGSEDMVCTPKS 401
musculus YVFFEEQEDEVVGFQELKNPQEETLQAFESHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 402
norvegicus YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSDHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 402
saxatilis HAYFGGQPEDVGFGETLKNPQEDTSQDFDSRYDYVVCEE GEEVSCAPVP 411
talpia HAYFGGHPDEDVGFGETLKNPQEDNSQEFDSRYDYVVCEE GEEVACAPAP 410
salmon HAYFGGQPDDDVGFGETLKNPQEDTSQDFDSRYDYVVCEE GEEVTCAPAP 447
salmon_B HVYFGGQPDDDVGFGEMLKNPQEDTSQNFDRYDYVVCEE GEEVTCAPAP 421

..:* : * :***: *****: . * * :.***:* .* : * : * .
mullatta DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFVSLALLGNVFLVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
aethiops DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFVSLALLGNVFLVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
homo DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFVSLALLGNVFLVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
catus DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFVSLALLGNVFLVLIILLTSHYKLVNPRFL 451
familiaris DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFVSLALLGNVFLVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
scofa DEFNPCEDIMGYRFLRIVVWFVSLALLGNVFLVILLTSHYKLVNPRFL 452
aries DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFVSLALLGNVFLVILLTSHYKLVNPRFL 452
taurus DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFVSLALLGNVFLVILLTSHYKLVNPRFL 451
musculus DEFNPCEDIMGYRFLRIVVWFVSLALLGNVFLVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
norvegicus DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFVSPMALLGNVFLVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
saxatilis DEFNPCEDIMGFGLRVSVVWFVSLAVLGNVFLVLLILLTSHYKLVNPRFL 461
talpia DEFNPCEDIMGFGLRVSVVWFVSLAVLGNVFLVLLILLTSHYKLVNPRFL 460
salmon_A DEFNPCEDIMGFSFLRVSVVWFVSLAVVGNMVALVLLILLTSHYKLVNPRFL 497
salmon_B DEFNPCEDIMGFSFLRVSVVWFVSLAVVGNMVALVLLILLTSHYKLVNPRFL 471
*****: ***: ***** :* :***: . . . :***** . * .***

mullatta MCNLAFAFDFCMGYLLLIASVDLYTHSEYNNHAIDWQTGPGCNTAGFFTV 502
aethiops MCNLAFAFDFCMGYLLLIASVDLYTHSEYNNHAIDWQTGPGCNTAGFFTV 502
homo MCNLAFAFDFCMGYLLLIASVDLYTHSEYNNHAIDWQTGPGCNTAGFFTV 502
catus MCNLAFAFDFCMGYLLLIASVDLYTHSEYNNHAIDWQTGPGCNAAGFFTV 501
familiaris MCNLAFAFDFCMGYLLLIASVDLYTHSEYNNHAIDWQTGPGCNTAGFFTV 502
scofa MCNLAFAFDFCMGYLLLIASVDLYTQSEYNNHAIDWQTGPGCNTAGFFTV 502
aries MCNLAFAFDFCMGLYLLLIASVDLYTQSEYNNHAIDWQTGPGCNTAGFFTV 502
Taurus MCNLAFAFDFCMGLYLLLIASVDLYTQSEYNNHAIDWQTGPGCNTAGFFTV 501
Musculus MCNLAFAFDFCMGVYLLLIASVDLYTHSEYNNHAIDWQTGPGCNTAGFFTV 502
norvegicus MCNLAFAFDFCMGVYLLLIASVDLYTHTEYNNHAIDWQTGPGCNTAGFFTV 502
saxatilis MCHLAFADLCMGIYLLLIASVDLHTRAEYFNHAIDWQTGPGCGLAGFFTV 511
talpia MCHLAFADLCMGIYLLLIASVDLHTRAEYFNHAIDWQTGPGCGLAGFFTV 510
salmon_A MCHLAFADLCMGIYLLLIASVDLHTRAEYNNHAIDWQTGPGCGLAGFFTV 547
salmon_B MCHLAFADLCMGIYLLLIASVDLHTRAEYNNHAIEWQTGPGCRLAGFLTV 521
** :*****:***:*****:***: * : * :*****:***** * :***

mullatta FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHACAIMVGGWVCCFLL 552
aethiops FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHACAIMVGGWVCCFLL 552
homo FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHACAIMVGGWVCCFLL 552
catus FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKMLRHAYAIMVGGWVCCFLL 551
familiaris FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYAIMVGGWVCCFLL 552
scofa FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYAIMAGGWVCCFLL 552
aries FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMHLDRKIRLRHAYVIMLGGWVCCFLL 552
taurus FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYVIMLGGWVCCFLL 551
musculus FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYIMAGGWVSCFLL 552
norvegicus FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYIMAGGWVSCFLL 552
saxatilis FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYVIMLGGWVFCFLL 561
talpia FASELSVYTLTAITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYVIMLGGWVFCFLL 560
salmon_A FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYVIMLGGWVFCFLL 597
_salmon_B FASELSVYTLTMITLERWYAITFALRLDRKIRLRHAYVIMLGGWVFCFLL 571
*****: * :*****:*****:***: * : * :*****:***** * :***

mullatta ALLPLVGISSYAKVSIPLPMDTETPLALAYIVFVLTNLIVAFVIVCCCYV 602

aethiops ALLPLVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIVFVLTNLNIVAFVIVCCCYV 602
homo ALLPLVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIVFVLTNLNIVAFVIVCCCYV 602
catus ALLPLVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIILVLLLNIVAFIIVCSCYV 601
familiaris ALLPLVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIILVLLLNIVAFIIVCSCYV 602
scofa ALLPLVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIILVLLLNIVAFIIVCSCYV 602
aries ALLPLVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIILVLLLNIIAFIIVCACYV 602
taurus ALLPLVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIILVLLLNIIAFIIVCACYV 601
musculus ALLPMVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIVLVLLLNIVAFVIVCSCYV 602
norvegicus ALLPMVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIALVLLLNIVAFVIVCSCYV 602
saxatilis ALLPLVGVSSYQKVSICLPMDTQSTVAQVYILSVLVNIIAFVIVCACYF 611
talpia ALLPLVGVSSYQKVSICLPMDTESTAAQIYIMSVLVNIIAFIIVCACYF 610
salmon_A AMLPLVGVSSYQKVSICLPMDTQSTVAQVYIVSVLILNIIAFVIVCACYI 647
salmon_B AMLPLVGVSSYQKVSICLPMDTKSTMAQVYIISVLILNIIAFVIVCACYV 621
::*:*:*:*****:..* ** ** *:*:*:* ::* **.

mullatta KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYALSAILNKP 652
aethiops KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYALSAILNKP 652
homo KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYALSAILNKP 652
catus KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYALSALMNKP 651
familiaris KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYALSALMNKP 652
scofa KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYALSALMNKP 652
aries KIYITVRNPHYNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYALSALMNKP 652
taurus KIYITVRNPHYNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYALSALMNKP 651
musculus KIYITVRNPQYNPRDKDKTKIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYALSALMNKP 652
norvegicus KIYITVRNPQYNPRDKDKTKIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYALSALMNKP 652
saxatilis KIYCAVHNPHYRSGSKDTNIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYAMSAVLDLP 661
talpia KIYCTVHNPHYRSGSKDTNIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYAMSAVLDLP 660
salmon_A KIYCTVHNPHYRSGSKDTNIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYAMSAVLDLP 697
_salmon_B KIYCAVHNPHYCYSKSGSKDTNIAKRMAVLIFTFDFMCMAPISFYAMSAVLDLP 671
*** :*:** * . .***.*****:*****:*****:*****:***:::**

mullatta LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGICKRQ 702
aethiops LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGICKRQ 702
homo LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGICKRQ 702
catus LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGICKRQ 701
familiaris LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGICKRQ 702
scofa LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGICKRQ 702
aries LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGICKRQ 702
taurus LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGICKRQ 701
musculus LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGICKRQ 702
norvegicus LITVNSGVLLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGLCKHQ 702
saxatilis LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKVGLCQQR 711
talpia LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKVGLCQQR 710
salmon_A LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKVGLCQRR 747
salmon_B LITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKVGLCQRR 721
****.*** :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***:::**

mullatta AQAYRGQRVPPKNSTDIQVQKVTHEMRQD-----LHNMQDVEYEL 742
aethiops AQAYRGQRVPPKNSTDIQVQKVTHEMRQD-----LHNMEDVEYELI 742
homo AQAYRGQRVPPKNSTDIQVQKVTHEMRQD-----LHNMEDVEYELI 742
catus AQAYRGQRVSPKNSGTGIQVQKVTNRMRQS-----LPNMQDDYEL 741
familiaris AQAYRGQRVSPKNSGTGIQVQKVTNRMRQS-----LPNMQDEYEL 742
scofa AQAYRGQRVSPKNSGTGIQVQKVTNRMRQS-----LPNMQDDYEL 742
aries AQAYRGQRVSPKNSGTGIRVQKVPDVRQS-----LPNVQDDYEL 742
taurus AQAYRGQRVSPKNSGTGIRVQKVPDVRQS-----LPNVQDDYEL 741
musculus AQAYRGQRVCPNNSTGIQIQKIPQDTRQS-----LPNMQDTEYEL 742
norvegicus AQAYQQRVCPNNSTGIQIQKIPQDTRQS-----LPNVQDTEYEL 742
saxatilis AQLFRGQTVSSKGSSTGTSQVRR--DKDKVRRKGGSGQEEVPIHLKMGCSG- 758
talpia AQLFRGQTVSSKGSSTGTSQVRR--DKDKSRKGGSIGQEEVPIHLKRSAG- 757
salmon_A AQLFRGQTVSSKGSSTGTSQVRR--DKDKSRKGGSIGQEEVPIHLQDR--- 794
salmon_B AQLFRGQAVSSKGSSTGTSQVRR--DKDKSRKGGSIGQEEVPIHLQEYSGS 771
** :*.*** * .:..: . . :

mullatta ENSHLPKKQGQISEEYTQTVL 764
aethiops ENSHLPKKQGQISEEYTQTVL 764
homo ENSHLPKKQGQISEEYMQTVL 764
catus ENSHLPNKQSHISKEYNQTVL 763
familiaris ENSHLPNKQGGQISKEYNQTVL 764
scofa ENSHLTHKKHQISKEYKQPVL 764
aries GNSHLPKQDQTSKEYKQTVL 764
taurus ENSHLPKQDQTSKEYKRTVL 763
musculus GNSQLAPKLQGGQISEEYKQTAL 764
norvegicus GSSHLPKLGRISEEYTQTVL 764
saxatilis -HTYHQAVCQQTNPESQSLNT 779
talpia -HTYHFAIGQKNPEESQRLDT 779
salmon_A -QTYLQPTSQQPSTE-NRSLDT 814
salmon_B GHTYIQLASQQPSPEESRSLET 793

Table 2 Differences in the mature TSHR sequences

between humans and old world Monkeys

Residue	Cercopithecidae	Homo sapiens	
32	Q	H	
63	R	H	
74	S	N	
83	L	V	
87	A	V	
101	N	S	
113	S	N	
192	I	V	
235	H	Q	
331	D	G	
333	G	S	
346	A	T	
389	V	I	
393	N	S	
601*	Y	H	
727	E	D	
759	T	M	

*The placement of H in this position was based on the original hTSHR sequence reported by Nagyama et al (23).Histidine in that position alters the basal activity of the receptor and its coupling to Gq/11, analysis of other clones by the same workers and the results of other investigators affirms a conserved Y in that position in all vertebrates.

Only residues in which Homo differ from both Old World monkeys are considered.

Table 2.Replacement substitutions of residues in the mature TSHR of 10 mammalian species

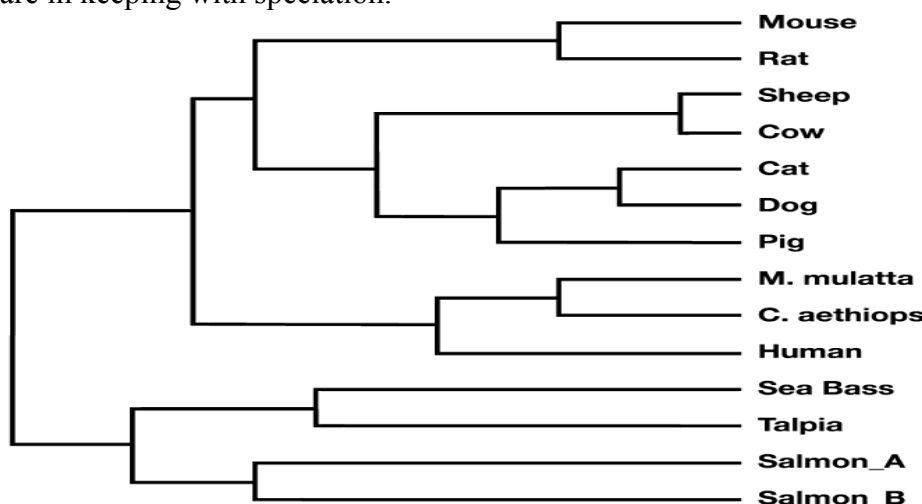
Residue	Region	mull	aethio	homo	cat	dog	pig	Shee p	cow	mus	rat
22		K	K	M	K	K	K	E	E	K	R
23		G	G	G	G	G	G	R	R	E	G
46	NCR	R	R	R	R	R	S	R	S	R	G
70	LLR1	H	H	H	R	R	R	R	R	L	L
116	LLR3	Y	Y	Y	Y	S	Y	Y	Y	Y	Y
139	LLR4	K	K	K	G	G	R	R	R	R	R
169	LLR5	V	V	V	A	A	A	A	A	E	E
235	LLR8	H	H	Q	Y	Y	Y	Y	Y	S	S
296	CFR	P	L	L	L	L	L	L	L	L	L
307	CFR	Q	Q	Q	R	R	R	R	W	R	R
317	CFR	A	A	A	A	T	A	A	A	I	V
323	CFR	H	H	H	D	D	Y	Y	Y	Y	Y
329	CFR	N	N	N	Y	Y	D	D	del	D	G
330	CFR	L	L	L	L	L	L	L	L*	P	L

334	CFR	I	I	I	H	H	S	S	S*	S	H
337	CFR	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y*	Y	Y
346	CFR	A	A	T	T	T	T	T	T*	S	G
347	CFR	H	H	H	R	D	H	H	Q*	P	P
360	CFR	E	E	E	del	E	E	E	E*	E	E
426	TM1	L	L	L	L*	L	L	L	L*	L	P
539	TM4	C	C	C	Y*	Y	Y	Y	Y*	Y	Y
548	TM4	C	C	C	C*	C	C	C	C*	S	S
588	TM5	T	T	T	L*	L	L	L	L*	L	L
595	TM5	V	V	V	I*	I	T	I	I*	V	V
617	I2	G	G	G	G*	G	G	G	G*	R	R
660	TM7	K	K	K	K*	K	K	K	K*	K	G
712	ICT	P	P	P	S*	S	S	S	S*	C	C
726	ICT	H	H	H	R*	R	Q	P	P*	Q	Q
738	ICT	V	V	V	D*	E	D	D	D*	T	T
741	ICT	L	L	L	L*	L	L	L	L*	L	P
743	ICT	E	E	E	E*	E	E	G	E*	G	G
749	ICT	P	P	P	P*	P	H	P	P*	P	P
751	ICT	K	K	K	K*	K	K	Q	Q*	L	L
755	ICT	I	I	I	I*	I	I	T	T*	I	I
760	ICT	T	T	M	N*	N	K	K	K*	K	T

* Because of respective deletions (del) in residues 329 of cow and 360 of cat, all residue numerically above that position shown by the asterisk should have one subtracted. Numbering of residues is based on 764 residues in 8 mammals including 21 in the leader peptide. NCR=N-terminus cysteine -rich region, LLR= leucine rich repeats, CFR= C-flanking region, I2= second intra-cellular loop, TM= transmembrane helix, ICT= intracellular tail.

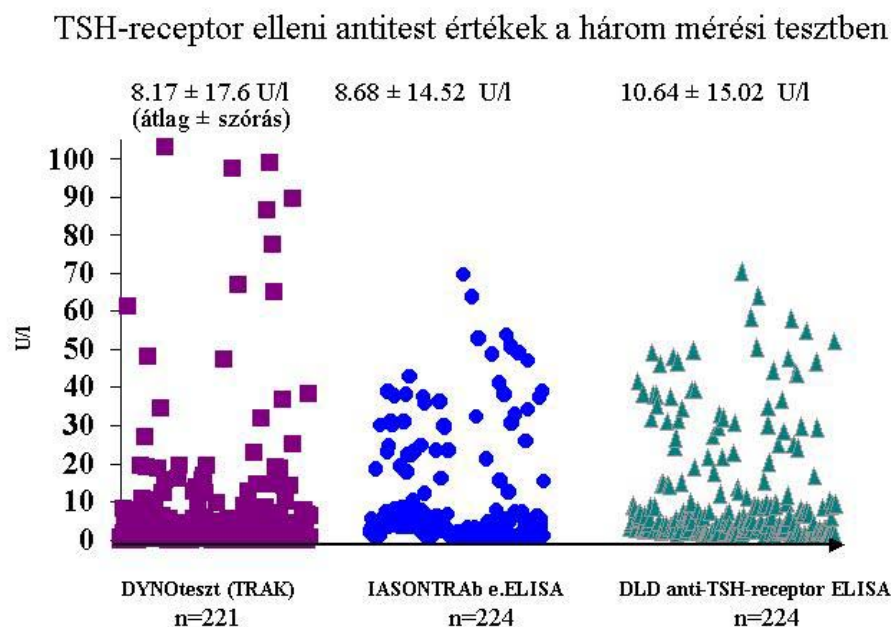
Figure 2 Phylogenetic relationship between the 14 TSH receptor sequences considered in this study.

Two major families are distinguished: teleosts and mammals and within the latter primates show up as a distinct clade. Clustering of other mammals: rodents, ungulates and carnivores are in keeping with speciation.



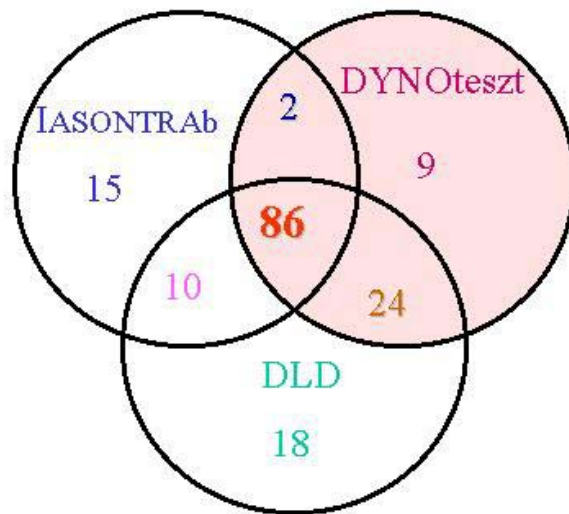
4. A TSH receptor elleni antitestek meghatározása radioreceptor és ELISA módszerrel

A radioreceptor és az enzim-jelzéses receptor immunoassay mérések eredményeit hasonlítottuk össz. 25 kontroll és 224 beteg szérumában. A kontroll csoport eredményeinek értékelésénél kitűnt, hogy a két enzim-jelzéses kit (IASDONTRAb és a DLD) közül a DLD típusú nem korrelált az izotóp-jelzéses DYNO teszt értékekkel. Jóllehet a IASONTRAB kittel való mérésnél az értékek eltolódást mutattak a pozitív tartomány felé, de a DYNO teszttel szoros korrelációt adtak ($r=0.622$, $P<0.001$). Ez az eltolódás a referencia tartomány > 3 IU/l-re emelésével jelentősen csökkenthető volt. 121 TRAK (DYNO teszt) pozitív mintából 86 mindhárom tesztben pozitív volt. Az ELISA módszerek specificitása a DYNO teszt TRAK értékeihez viszonyítva a IASONTRAb-nál 60.7 % és a DLD-nél 50.9 %. A szenzitivitás a IASONTRAb-nál 72.7 % és a DLD-nél 90.9 %. Összegzésként megállapítható, hogy a kompetitív radioreceptor technikával szemben az ELISA módszer előnyösebb (1.2 ábra).



1. ábra

Pozitív esetek száma a három
immunoassay mérésben



pozitív értékhatárok: TRAK >1.5 U/l, Iason >2 U/l, DLD >2 U/l

2.ábra