

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.

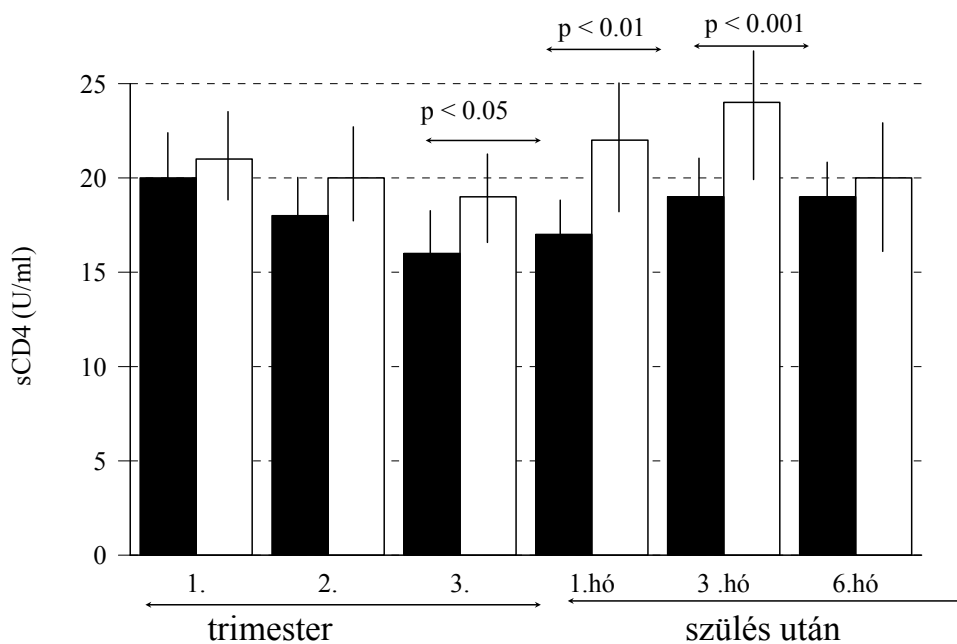
A vizsgálatunk célja: a szolubilis CD4 és CD8 molekulák mennyiségének meghatározása a terhesség alatt és szülést követően azokban, akik korábban poszt-partum thyreoiditisben szenvedtek. A tanulmány további feladata volt, hogy választ adjon arra a kérdésre, hogy ezeknek a molekuláknak van-e jelentőségük 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 gyulladáshoz vezető 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.

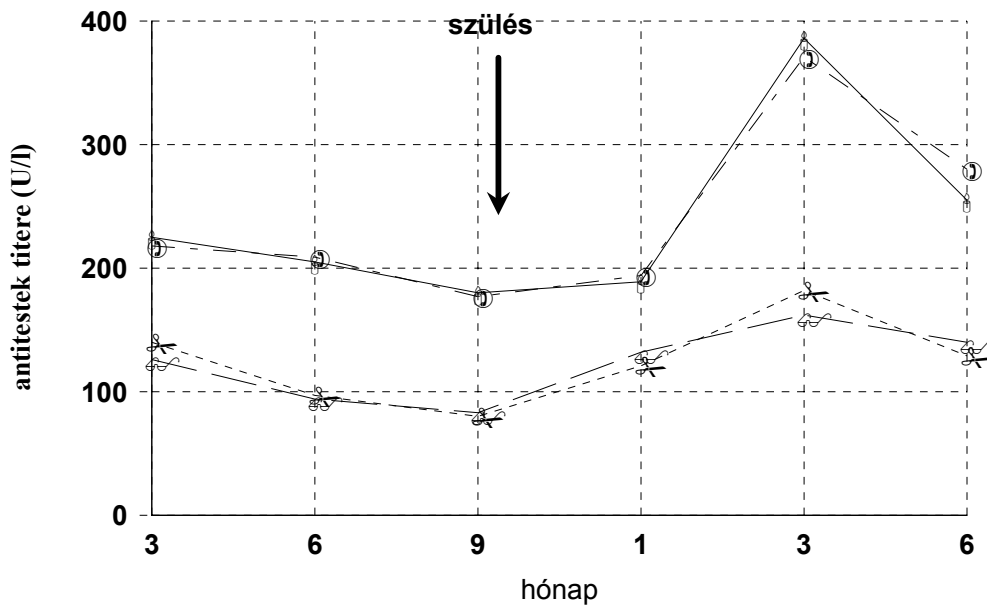
Ezt az eredményünket szabadalomként jegyezték be az Egyesült Királyságban (GB 2376016/2004).



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.

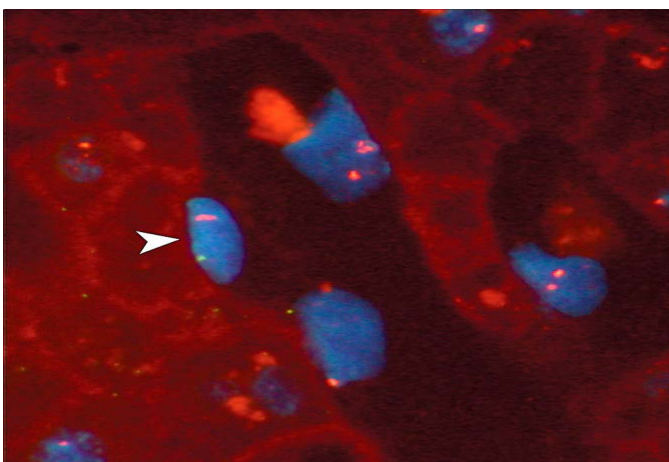


2. Ábra

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 szemtünetek 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 középsúlyos 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 szemtünetek 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 dohányzóknak, 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

	<i>OR (95%)</i>	<i>p</i>
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

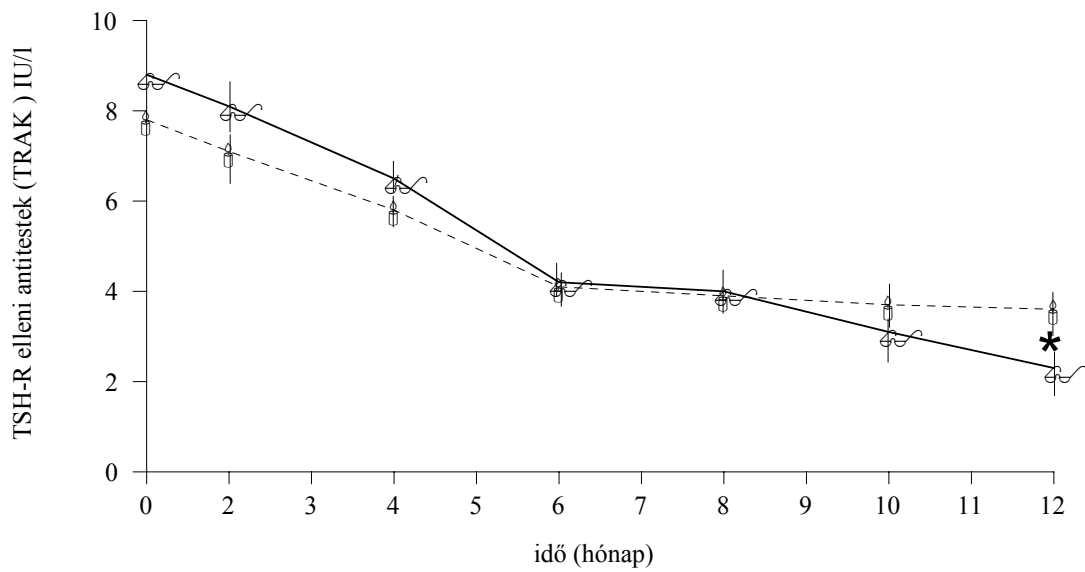
	<i>OR (95%)</i>	<i>p</i>
Dohányzó (n=58)	2,12 (1,5-3,1)	0,037
Dohányzó + FH (n=35)	2,62 (1,5-3,7)	

3. táblázat

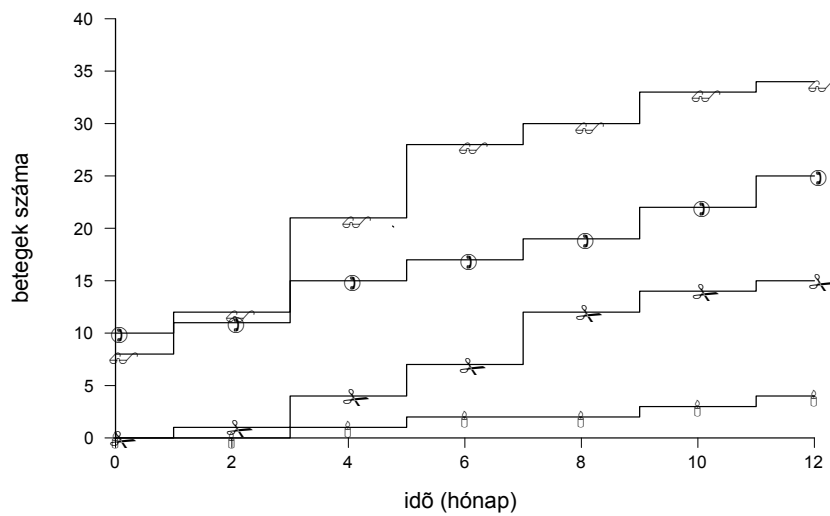
A pentoxifillin hatása a TAO manifesztációjára a pentoxifillin kezelés 6. és 12. hónapja után

	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 jóddhiányban 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 -----MRPADLLQLVLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVT 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 RLERHSFYSLRKITHIEIRNAKSLTYIDPEAFKLNLPNLKYLGI FNTGLTF 141
talpia RLEKHSFYSLRKITHIEIRNAKSLTYIDPEAFKHLPELKYLGIFNTGLTF 140
salmon_A GLQRHSFYNLKIKITHIEIRNAKSLSYIDPEAFKLNLPNLKYLGI FNTGLTL 148
salmon_B RLERHSFYNLKIKITHIEIRNARLSYIDPEAFKLNLPNLKYLGI FNTGLTI 148
*: :***. * :*****.:. *: * :.. * :.*** * :***** .

mullatta FPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
aethiops FPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
homo FPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
catus FPDLTKVYSTDVFFILEITDNPYMTSIPANAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
familiaris FPDVTKVYSTDVFFILEITDNPYMASIPANAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
scofa FPDLTKVYSTDVFFILEITDNPYMTSIPANAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
aries FPDLTKIYSTDVFFILEITDNPYMTSVPANAFQGLSNETLTLKLYNNGFT 190
taurus FPDLTKIYSTDVFFILEITDNPYMTSIPANAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
musculus FPDLTKIYSTDIFFILEITDNPYMTSVPENAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
norvegicus FPDLTKIYSTDVFFILEITDNPYMTSVPENAFQGLCNETLTLKLYNNGFT 190
saxatilis FPDLSNIYSNDMNFILIEIVDHPYITEIPTNSFRGITSDVLTVMLYGNGFR 191
talpia FPDLSNIHSNDMNFILIEIVDHPYITEIPANSFRGITSEALTVMLYGNGFR 190
salmon_A FPDLTNIHSDDMNFILIEIADHPYISEVPANSFRGITNQVLTVMLYSNGFT 198
salmon_B FPDLTNIHSDDMNFVLEITDHPYISEVPANSFRGITNQVLTVMLYSNGFT 198
***:..: * : * :***. * :*****.:. * : * :. * :.*** * :*****

mullatta SIQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSHTSVTA 240
aethiops SIQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSHTSVTA 240
homo SVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSHTSVTA 240
catus SIQGHAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPTLLDVSYTSVTA 240
familiaris SIQGHAFNGTKLDAVYLNKNKYLSAIDKDAFGGVYSGPTLLDVSYTSVTA 240
scofa SVQGHAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPTLLDVSYTSVTA 240
aries SIQGHAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDQDAFAGVYSGPTLLDISYTSVTA 240
taurus SIQGHAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDQDAFAGVYSGPTLLDISYTSVTA 240
musculus SVQGHAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDQDAFAGVYSGPTLLDVSYTSVTA 240
norvegicus SIQGHAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPTLLDVSYTSVTA 240
saxatilis EIQHHAFAFNGTKLDQVDLHRNKYLTVMDEKDAFAGVYSGPTLLDVSLTGITT 241
talpia SVRHHAFNGTKLDQVDLHRNKYLTVMDEKDAFAGVYSGPTLLDVSLTGITTS 240
salmon_A DIQHHAFAFNGTKLDAVYLHRNKHLTKMDEKDAFAGVYSGPTLLDVSLTGIVSS 248
salmon_B DIQHHAFAFNGTKLDAVYLHRNRRLTRMDEKDAFAGVYSGPTLLDVSLTAVSS 248
.: :***** * * :. * : * :. * * . * * . * * * * * : * : * :

mullatta LPSKGLEHLKELIARNTWTLKPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
aethiops LPSKGLEHLKELIARNTWTLKPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
homo LPSKGLEHLKELIARNTWTLKPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
catus LPSKGLEHLKELIARNTWTLKPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
familiaris LPSKGLEHLKELIARNTWTLKPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
scofa LPPKGLEHLKELIARNTWTLKPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
aries LPSKGLEHLKELIARNTWTLKPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
taurus LPSKGLEHLKELIARNTWTLRKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
musculus LPSKGLEHLKELIAKDTWTLKPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
norvegicus LPSKGLEHLKELIAKNTWTLKPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQK 290
saxatilis LPTTGMDSLRELKARNAWALKKLPPIKTFKHLTIANLTYPRHCCGFKNLK 291
talpia LPTTGMDSVRELKARDAWALKKLPPIKTFKHLTVANLTYPSHCCGFKNLK 290
salmon_A LPTAGLESRLRELARNAWNLKLPPIKTFKHLVTADLTYPSLCCGFKNLK 298
salmon_B LPTAGLESRLRELIARSAWNLKLPPIKTFKHLTTADLTYPSHCCGFKNLK 298
* * . * :. : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

mullatta KIRGIPESLMCNESSMQSLRQR-----KS 314
aethiops KIRGILESMLCNESSMQSLRQR-----KS 314
homo KIRGILESMLCNESSMQSLRQR-----KS 314
catus KIRGILESFCNDSSIRSLRQR-----KS 314
familiaris KIRGILESMLCNESSIRSLRQR-----KS 314
scofa KIRGILESMLCNESSIRSLRQR-----KS 314
aries NIRGILQSLCNESSIWGLRQR-----KS 314
taurus KIRGILQSLCNESSIRGLRQR-----KS 314
musculus KIRGILESMLCNESSIRNLRQR-----KS 314
norvegicus KIRGILESMLCNESSIRNLRQR-----KS 314
saxatilis KKRGFLEYIICNLTAFYDQHHK-----RS 315
talpia KKRGFLEYIICNLTAFYDQHOK-----RS 314
salmon KKRGFLEYIICNLTAFYDQHOKTSVGLRVPVSLQIDPASDTAADRHQKRS 348
salmon_B KKRGFLEYIICNLTAFYDQQQK-----RS 322
: * * : : * * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : :

mullatta VNALNSPLHQ-----EYEENLDDGIVGYKEKSKFQ-DAHNNAHY 352
aethiops VNALNSPLHQ-----EYEENLDDGIVGYKEKSKFQ-DAHNNAHY 352
homo VNALNSPLHQ-----EYEENLDDGIVGYKEKSKFQ-DTHNNAHY 352
catus VNALNGPFDQ-----EYEEYLGDSHAGYKDNSKFQ-DTRSNSHY 352
familiaris VNTLNGPFDQ-----EYEEYLGDSHAGYKDNSQFQ-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 VGPLRIPSLQGESV VETIPDQEP----NDGGHRESQQDWRRGDFHGLSHY 361
talpia VGPLRMPSLQGDGVVETLPDREL----KDDGGHRESQQDWSGDFHGLSHY 360
salmon_A VGPLTVPSLQEDPMDAADQQPSEVGF RDGVSRD TQGDPRR-DFQSSPHY 397
salmon_B VGPLTVPSLQGDPTADTADQEPSEEGRDGVFKDTQGD PWR-DFHSSLNY 371
.. : * * * * * . . : . : .. :*

mullatta YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFD SHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 402
aethiops YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFD SHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 402
homo YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFD SHYDYTCGDSEDMVCTPKS 402
catus YVFFEEQ-DEILGFGQELKNPQEETLQAFD SHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 401
familiaris YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFD SHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 402
scofa YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFD SHYDYTVCGSEDMVCTPKS 402
aries YVFFEDQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFD SHYDYTVCGGSEEMVCTPKS 402
taurus YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFD SHYDYTVCGSEDMVCTPKS 401
musculus YVFFEEQEDEVVGFQELKNPQEETLQAFESHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 402
norvegicus YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFD SHYDYTVCGDNEDMVCTPKS 402
saxatilis HAYFGGQPDEVDVGFGETLKNPQEDTSQDFDSRYDYVVC EEEVSCAPVP 411
talpia HAYFGGHPDEVDVGFGETLKNPQEDNSQEFDSRYDYVVC EEEVACAPAP 410
salmon HAYFGGQPDDVDVGFGETLKNPQEDTSQDFDSRYDYVVC EEEVTCAPAP 447
salmon_B HVYFGGQPDDVDVGFGEMLKNPQEDTSQNF DNRYDYVVC EEEVTCAPAP 421

..:* : * :***: *****: . * * :.***:* .* : * : * .
mullatta DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFV SLLALLGNV FVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
aethiops DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFV SLLALLGNV FVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
homo DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFV SLLALLGNV FVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
catus DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFV SLLALLGNV FVLIILLTSHYKLVNPRFL 451
familiaris DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFV SLLALLGNV FVLIILLTSHYKLVNPRFL 452
scofa DEFNPCEDIMGYRFLRIVVWFV SLLALLGNV FVLVILLTSHYKLVNPRFL 452
aries DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFV SLLALLGNV FVLVILLTSHYKLVNPRFL 452
taurus DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFV SLLALLGNV FVLVILLTSHYKLVNPRFL 451
musculus DEFNPCEDIMGYRFLRIVVWFV SLLALLGNV FVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
norvegicus DEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFV SPMALLGNV FVLLILLTSHYKLVNPRFL 452
saxatilis DEFNPCEDIMGFGLRVSVVWFV SLLAVLGNV VVLLVLLTSHYKLSVSRFL 461
talpia DEFNPCEDIMGFGLRVSVVWFV SLLAVLGNV VVLLVLLTSHYKLSVSRFL 460
salmon_A DEFNPCEDIMGFSFLRVSVVWFV SLLAVVGNM VVLLVLLTSHYKLSVSRFL 497
salmon_B DEFNPCEDIMGFSFLRVSVVWFV SLLAVVGNM VVLLVLLTSHYKLSVSRFL 471
*****: ***: ***** :* :***: . . . :***** . * .***

mullatta MCNLAFADFCMGMYLLLIASVDLYTHSEY YNHAI DWQTGPGCNTAGFFT V 502
aethiops MCNLAFADFCMGMYLLLIASVDLYTHSEY YNHAI DWQTGPGCNTAGFFT V 502
homo MCNLAFADFCMGMYLLLIASVDLYTHSEY YNHAI DWQTGPGCNTAGFFT V 502
catus MCNLAFADFCMGMYLLLIASVDLYTHSEY YNHAI DWQTGPGCNAAGFFT V 501
familiaris MCNLAFADFCMGMYLLLIASVDLYTHSEY YNHAI DWQTGPGCNTAGFFT V 502
scofa MCNLAFADFCMGMYLLLIASVDLYTQSEY YNHAI DWQTGPGCNTAGFFT V 502
aries MCNLAFADFCMGLYLLLIASVDLYTQSEY YNHAI DWQTGPGCNTAGFFT V 502
Taurus MCNLAFADFCMGLYLLLIASVDLYTQSEY YNHAI DWQTGPGCNTAGFFT V 501
Musculus MCNLAFADFCMGVYLLLIASVDLYTHSEY YNHAI DWQTGPGCNTAGFFT V 502
norvegicus MCNLAFADFCMGVYLLLIASVDLYTHTEY YNHAI DWQTGPGCNTAGFFT V 502
saxatilis MCHLAFADLCMGIYLLLIASVDLHTRAEY FNHAI DWQTGPGCGLAGFFT V 511
talpia MCHLAFADLCMGIYLLLIASVDLHTRAEY FNHAI DWQTGPGCGLAGFFT V 510
salmon_A MCHLAFADLCMGIYLLLIASVDLHTRAEY YNHAI DWQTGPGCGLAGFFT V 547
salmon_B MCHLAFADLCMGIYLLLIASVDLHTKMEY YNHAI EWQTGPGCRLAGFLT V 521
** :*****:***:*****: * : ** :*****:***** ** :**

mullatta FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHACAIMVGGWVCCFLL 552
aethiops FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHACAIMVGGWVCCFLL 552
homo FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHACAIMVGGWVCCFLL 552
catus FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKMLRHAYAIMVGGWVCCFLL 551
familiaris FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYAIMVGGWVCCFLL 552
scofa FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYAIMAGGWVCCFLL 552
aries FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMHLDRKIRLWHAYVIMLGGWVCCFLL 552
taurus FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLWHAYVIMLGGWVCCFLL 551
musculus FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYIMAGGWVSCFLL 552
norvegicus FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHAYIMAGGWVSCFLL 552
saxatilis FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKLRHAAVVM LGGWIFCLLL 561
talpia FASELSVYTLTAITLERWYAITFAMRLDRKLRHAAVVM LGGWVFCILL 560
salmon_A FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKLRPHAAVVM LAGWVFCILL 597
_salmon_B FASELSVYTLTMITLERWYAITFALRLDRKLRPHATAVMLAGWVFCILL 571
***** ** :*****:*****: * : ** :*****:***** ** :**

mullatta ALLPLVGISSYAKVSI CLPMDTETPLALAYIVFVLT LNIVAFVIVCCCYV 602

aethiops ALLPLVGISSYAKVSIKLPMDTETPLALAYIVFVLTNLNIVAFVIVCCCYV 602
homo ALLPLVGISSYAKVSIKLPMDTETPLALAYIVFVLTNLNIVAFVIVCCCYV 602
catus ALLPLVGISSYAKVSIKLPMDTETPLALAYIILVLLLNLNIVAFIIVCSCYV 601
familiaris ALLPLVGISSYAKVSIKLPMDTETPLALAYIILVLLLNLNIVAFIIVCSCYV 602
scofa ALLPLVGISSYAKVSIKLPMDTETPLALAYIILVLLLNLNIVAFIIVCSCYV 602
aries ALLPLVGISSYAKVSIKLPMDTETPLALAYIILVLLLNLNIAFIIIVCACYV 602
taurus ALLPLVGISSYAKVSIKLPMDTETPLALAYIILVLLLNLNIAFIIIVCACYV 601
musculus ALLPMVGISSYAKVSIKLPMDTDTPLALAYIVLVLLLNVVAFVVVVCSCYV 602
norvegicus ALLPMVGISSYAKVSIKLPMDTDTPLALAYIALVLLLNVVAFVIVCSCYV 602
saxatilis ALLPLVGVSSYQKVSICLPMDTQSTVAQVYILSVLVNLILAFVVICACYF 611
talpia ALLPLVGVSSYQKVSICLPMDTESTAAQIYIMSVLVNLILAFIIICACYF 610
salmon_A AMLPLVGVSSYQKVSICLPMDTQSTVAQVYIVSVLILNLILAFVVICACYI 647
salmon_B AMLPLVGVSSYQKVSICLPMDTKSTMAQVYIISVLILNLILAFVVICACYV 621
::*:*:*:* *:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:*

mullatta KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSAILNKP 652
aethiops KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSAILNKP 652
homo KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSAILNKP 652
catus KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSALMNKP 651
familiaris KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSALMNKP 652
scofa KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSALMNKP 652
aries KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSALMNKP 652
taurus KIYITVRNPQYNPGDKDKTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSALMNKP 651
musculus KIYITVRNPQYNPRDKDKTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSALMNKP 652
norvegicus KIYITVRNPQYNPRDKDKTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSALMNKP 652
saxatilis KIYCAVHNPHYRSGSKDTNIAKRMAVLIFTDFLCMAPISFYAMSAVLDRP 661
talpia KIYITVRNPQYNPHYRSGSKDTNIAKRMAVLIFTDFLCMAPISFYAISAVLDRP 660
salmon_A KIYCTVHNPHYRSGSKDTNIAKRMAVLIFTDFLCMAPISFYAMSAVLDRP 697
_salmon_B KIYCAVHNPHYRSGSKDTNIAKRMAVLIFTDFLCMAPISFYAMSAVVDRP 671
*** :*:* * . .***.*****:*****:*****:*****:*****:*****

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

mullatta AQAYRGQRVPPKNSTDIQVQKVTHEMRQD-----LHNMQDVYELL 742
aethiops AQAYRGQRVPPKNSTDIQVQKVTHEMRQD-----LHNMEDVYELI 742
homo AQAYRGQRVPPKNSTDIQVQKVTHDMRQD-----LHNMEDVYELI 742
catus AQAYRGQRVSPKNSTGIQVQKVTRNMRQS-----LPNMQDDYELL 741
familiaris AQAYRGQRVSPKNSTGIQVQKVTRDMRQS-----LPNMQDEYELL 742
scofa AQAYRGQRVSPKNSTGIQVQKVTONMRQS-----LPNMQDDYELL 742
aries AQAYRGQRVSSKNSTGIRVQKVPPDVRQS-----LPNVQDDYELL 742
taurus AQAYRGQRVSPKNSTGIRVQKVPPDVRQS-----LPNVQDDYELL 741
musculus AQAYQQRVCPNNSTGIQIQKIPQDTRQS-----LPNMQDTEYELL 742
norvegicus AQAYQQRVCPNNSTGIQIQKIPQDTRQS-----LPNVQDTEYEL 742
saxatilis AQLFRGQTVSSKGSSTQVRR--DKDKVRKGGSGGQEEVPIHLKMCSSG- 758
talpia AQLFRGQTVSSKGSSTQVRR--DKDKVRKGGSIGQEEVPIHLKRSAG- 757
salmon_A AQLFRGQTVSSKGSSTQVRR--DKDKVRKGGSIGQEEVPIHLQDR--- 794
salmon_B AQLFRGQTVSSKGSSTQVRR--DKDKVRKGGSIGQEEVPIHLQEYSGS 771
** :.* * .:.* : . . : . .

mullatta ENSHLTPKKQGQISEEYTQTVL 764
aethiops ENSHLTPKKQGQISEEYTQTVL 764
homo ENSHLTPKKQGQISEEYMQTVL 764
catus ENSHLTPNKQSHISKEYNQTVL 763
familiaris ENSHLTPNKQGQISKEYNQTVL 764
scofa ENSHLTHKKHQISKEYKQPVL 764
aries GNSHLTPKQDQTSKEYKQTVL 764
taurus ENSHLTPKQDQTSKEYKRTVL 763
musculus GNSQLAPKLQGQISEEYKQTAL 764
norvegicus GSSHLTPKLQGRISEEYTQTVL 764
saxatilis -HTYHQAVCQQTNPPEESQSLNT 779
talpia -HTYHPAIGQKQNPPEESQRLDT 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 Nagayama 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

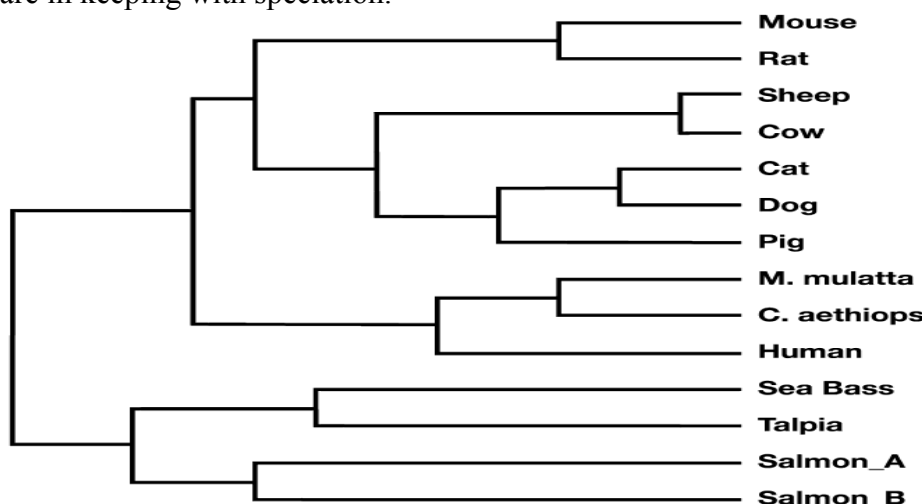
Residue	Region	mull	aethio	homo	cat	dog	pig	Shee p	cow	mus	rat
22		K	K	M	K	K	K	E	E	K	R
23		G	G	G	G	G	G	R	R	E	G
46	NCR	R	R	R	R	R	S	R	S	R	G
70	LLR1	H	H	H	R	R	R	R	R	L	L
116	LLR3	Y	Y	Y	Y	S	Y	Y	Y	Y	Y
139	LLR4	K	K	K	G	G	R	R	R	R	R
169	LLR5	V	V	V	A	A	A	A	A	E	E
235	LLR8	H	H	Q	Y	Y	Y	Y	Y	S	S
296	CFR	P	L	L	L	L	L	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.

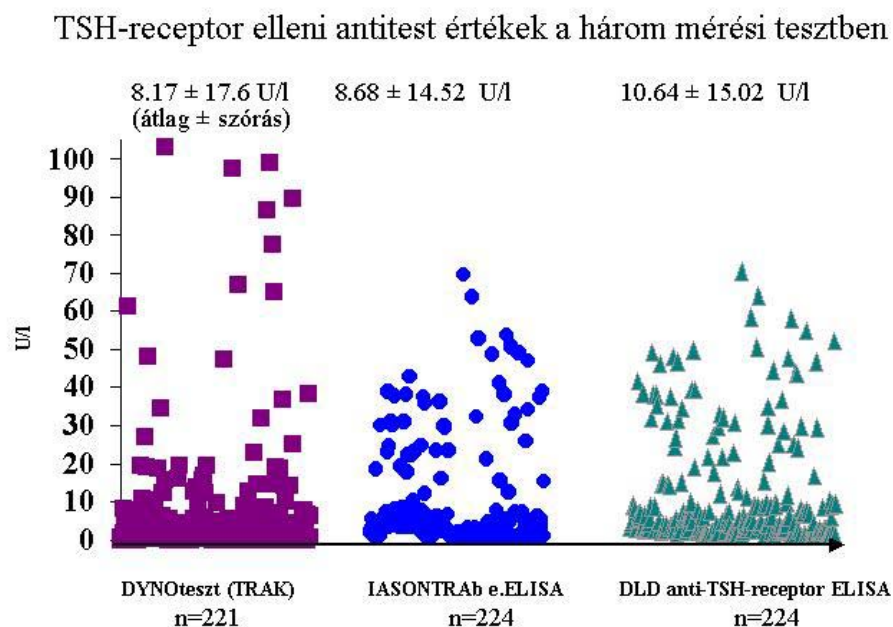
Figure 2 Phylogenetic relationship between the 14 TSH receptor sequences considered in this study.

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.



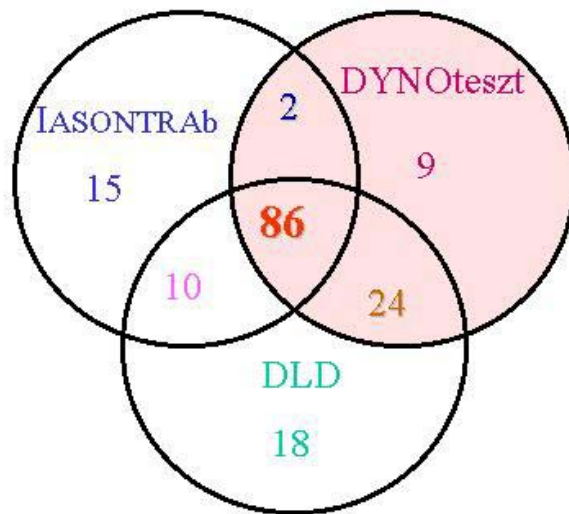
4. A TSH receptor elleni antitestek meghatározása radioreceptor és ELISA módszerrel

A radioreceptor és az enzim-jelzéses receptor immunoassay mérések eredményeit hasonlítottuk össze 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