

Originalien

Thyroxin-bindendes Globulin (TBG): Präparation, radioimmunologische Bestimmung und klinisch-diagnostische Bedeutung*

K. Horn**, Th. Kubiczek, C.R. Pickardt und P.C. Scriba

Medizinische Klinik Innenstadt der Universität München (Direktor Professor Dr. med. E. Buchborn)

Thyroxine-Binding Globulin (TBG): Preparation, Radioimmunoassay and Clinical Significance

Summary. In order to establish a direct method for the determination of thyroxine-binding globulin, the preparation of TBG was performed by five sequential chromatographical steps: first, TBG was concentrated 640-fold from pooled human serum by affinity chromatography on agarose to which triiodothyronine was covalently bound over six carbon long spacer groups using the bromine cyanide activation method. The further purification was performed by anion exchange chromatography on QAE- and DEAE-Sephadex A-50, and affinity chromatography for glycoproteins on ConA-Sepharose. The final enrichment of TBG was 4500 fold, the overall yield was approximately 20%. This preparation was shown to be highly purified by disc electrophoresis (three different concentrations of polyacrylamide and two different pH values) and by equimolar binding for T_4 and T_3 . Microheterogeneity was shown by three different protein bands in isoelectric focusing in the pH range from 4.0 to 4.5. The indirectly calculated content of carbohydrates was about 15%.

This TBG preparation was used for immunization of rabbits and for labelling with 125 Iodide by the chloramine T-method. The inter assay precision of the radioimmunoassay was satisfactory, the coefficient of variation being 4.3%. Serum dilution curves were found to be on the standard curve, proving no immunological heterogeneity, also in samples from subjects with quantitative TBG-variations.

The normal range of TBG levels (23.0 ± 4.0 mg/l, $\bar{x} \pm SD$) was shown to be in good agreement with

the literature. But there existed a significant age dependency: The high TBG levels in the neonatal period were found to decrease until the age of 15 years remaining at this low level up to 50 years. Thereafter they increased continuously. After the neonatal period there was a significant correlation between total T_4 and TBG levels in serum. Consequently the T_4 /TBG ratio remained constant (3.2 ± 0.7 , $\bar{x} \pm SD$), eliminating the age dependency of both, T_4 and TBG for diagnostic purposes.

There existed no sex differences in any period of life and no fluctuations during menstrual cycle. The estrogen induced rise of TBG levels could be confirmed quantitatively in females (pregnancy and estrogen therapy), similarly in males TBG increase could be demonstrated during oestrogen therapy. In drug induced states of estrogen deficiency inversely a decrease of TBG levels could be shown in females during danazol therapy. These estrogen influences on TBG seem to be long term effects.

Variations of TBG levels in primary thyroid disorders reported in the literature could not be confirmed by the direct radioimmunological measurement: In hyperthyroidism (20.0 ± 3.5 mg/l), endemic goiter (21.1 ± 4.6 mg/l) and hypothyroidism (21.6 ± 7.0 mg/l) TBG was essentially in the normal range. In these states of thyroid disorders the variations of T_4 /TBG ratio are caused by variations of T_4 -levels, whereas T_4 /TBG ratio was found to be normal in states of TBG excess or TBG deficiency. Consequently this T_4 /TBG ratio was elevated only in hyperthyroidism and decreased only in hypothyroidism.

Key words: Thyroxine-Binding Globulin (TBG) — Estrogen dependency — Danazol — Age dependency — T_4 /TBG ratio.

* Mit Unterstützung des Sonderforschungsbereichs 51 Medizinische Molekularbiologie und Biochemie

** Diese Arbeit wurde mit dem ersten „von Basedow-Forschungspreis Schilddrüse“ 1977 der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie ausgezeichnet

Zusammenfassung. Zum Aufbau einer spezifischen radioimmunologischen Bestimmungsmethode von Thyroxin-bindendem Globulin (TBG) im Serum

wurde eine reine TBG-Präparation hergestellt. Die erste Anreicherung des TBG aus humanem Poolplasma um den Faktor 640 wurde mit einer Affinitätschromatographie über Sepharose 4-B erreicht, an die Trijodthyronin (T_3) kovalent gebunden war. Die weitere Reinigung mit einer Gesamtanreicherung um einen Faktor von 4500 erfolgte über Anionenchromatographie (QAE- und DEAE-Sephadex A-50) und Affinitätschromatographie mit Concanavalin A (ConA-Sepharose). Die Wiederfindung von TBG über alle Schritte lag bei 20%. Das isolierte TBG, das in der Disc-Elektrophorese in drei verschiedenen Polyacrylamidkonzentrationen bei zwei verschiedenen pH-Werten (pH 7,0 und pH 8,9) als eine homogene Bande zur Darstellung kam, band Thyroxin (T_4) oder Trijodthyronin (T_3) äquimolar. Als Zeichen einer „Mikroheterogenität“ kamen beim isoelectric focusing im pH-Bereich von 4,0–4,5 drei Banden zur Darstellung. Der indirekt ermittelte Zuckeranteil der TBG-Präparation betrug 15%.

Diese TBG-Präparation wurde zur Immunisierung von Kaninchen und zur 125 Jod-Markierung mit der Chloramin-T-Methode benutzt. Die Präzision des Radioimmunoassay von TBG von Tag zu Tag war mit einem Variationskoeffizienten von 4,3% gut. Die Verdünnungskurven aller bisher geprüften Serumproben – auch bei quantitativen TBG-Varianten – lagen auf der Kalibrierstandardkurve: Hinweise auf eine immunologische Heterogenität des TBG ergaben sich damit nicht.

Bei Kontrollpersonen mit einem mittleren TBG-Spiegel von $23,0 \pm 4,0$ mg/l ($\bar{x} \pm s$) zeigte sich eine zweigipflige Altersabhängigkeit der TBG-Konzentrationen im Serum: In den ersten vier postnatalen Lebenswochen fanden sich die höchsten TBG-Spiegel, die bis zum generationsfähigen Alter abfielen, um jenseits des 50. Lebensjahres wieder anzusteigen. Nach Abschluß der Perinatalphase bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem Gesamt- T_4 und TBG. Der T_4 /TBG-Quotient war altersunabhängig konstant ($3,2 \pm 0,7$; $\bar{x} \pm s$) und folglich der geeignete diagnostische Parameter.

Ein Geschlechtsunterschied der TBG-Spiegel fand sich in keinem Lebensalter, ebenso konnten keine zyklischen Schwankungen bei Frauen im generationsfähigen Alter nachgewiesen werden. Der bekannte Anstieg der TBG-Spiegel unter Oestrogeneinfluß konnte bei Frauen (Antiovalantien und Gravidität) und bei Männern (Fosfestrol) quantitativ bestätigt werden. Umgekehrt konnte ein Abfall der TBG-Spiegel bei therapeutisch induziertem Oestrogenmangel (Danazol) erstmals aufgezeigt werden.

Bei primären Schilddrüsenfunktionsstörungen fanden sich keine signifikanten Änderungen der TBG-Spiegel, auch nicht bei direktem Vergleich zwischen

Hyperthyreose ($20,0 \pm 3,5$ mg/l) und Hypothyreose ($21,6 \pm 7,0$ mg/l). Veränderte T_4 /TBG-Quotienten spiegeln bei diesen Erkrankungen folglich die von der Norm abweichende Schilddrüsenfunktion wider. Von diesen Schilddrüsenfunktionsstörungen lassen sich an Hand der normalen T_4 /TBG-Quotienten alle Zustände mit erhöhten bzw. erniedrigten Gesamt- T_4 -Spiegeln abgrenzen, die primär auf einer quantitativen Änderung der TBG-Spiegel beruhen.

Schlüsselwörter: Thyroxin-bindendes Globulin (TBG) – Oestrogenabhängigkeit – Danazol – Altersabhängigkeit – T_4 /TBG-Quotient.

1. Einleitung

Die Schilddrüsenhormone Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3) zirkulieren im Blut nur zu einem geringen Anteil in freier Form, mehr als 99% sind als biologisch nicht direkt aktives Reservoir an spezifische Transportproteine gebunden, vor allem an das Thyroxin-bindende Globulin (TBG). Die Beurteilung dieser Serumkonzentrationen von TBG erfolgte bisher vorwiegend mit indirekten Verfahren, wie dem T_3 -in vitro-Test (T_3 U) oder der T_4 -Bindungskapazität des Serums. Schwierigkeiten für die direkte Bestimmung des TBG bereitete bis jetzt vor allem die Herstellung einer reinen TBG-Präparation. In letzter Zeit wurden zuerst von den Arbeitsgruppen um Marshall [25, 28] und Cavalieri [4] über Verfahren für die Isolierung von TBG aus dem Serum mit Hilfe der Affinitätschromatographie [8] berichtet. Mit Hilfe verschiedener Modifikationen der Affinitätschromatographie konnten jetzt reinere TBG-Präparationen hergestellt werden und ferner eine radioimmunologische Bestimmungsmethode aufgebaut und Untersuchungen zur klinisch-diagnostischen Bedeutung des TBG-Gehalts im Serum durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Reagentien

Die stabilen Schilddrüsenhormone L-Trijodthyronin und L-Thyroxin p.a. wurden von der Firma Henning, Berlin, die radioaktiven Verbindungen L-Trijodthyronin- 125 Jod (ca. 500 mCi/mg T_3), L-Thyroxin- 125 Jod (ca. 100 mCi/mg T_4) und Natrium- 125 Jodid (ca. 10 Ci/mg J) von der Firma Hoechst, Frankfurt/M., bezogen. Die Trägergele für die Affinitätschromatographie Sepharose 4B, CH-Sepharose 4B und ConA-Sepharose, die Ionenaustauschergele DEAE-Sephadex A-50, QAE-Sephadex A-50 und A-25 und die Dextranbelegte Sephadex G-25 waren von der Firma Pharmacia, Uppsala/Schweden, das Hydroxylapatit Bio-Gel HTP von der Firma Biorad, München; ferner Gamma-Globulin aus Rinderserum (Firma Serva, Heidelberg), Rinderalbumin (Pentex[®]) und α -Me-

thyl-D-Mannosid (Firma Roth, Karlsruhe), Bromzyan (Firma Fluka, Buchs/Schweiz), Polyäthylenglycol 6000 und die übrigen Chemikalien für die Herstellung der üblichen Pufferlösungen (p.a.-Substanzen der Firma E. Merck, Darmstadt). Das unter Zusatz von Acid-citrate-dextrose (ACD) hergestellte Blutplasma wurde frisch von der Blutbank bezogen und sofort aufgearbeitet.

2.2. Allgemeine Methoden

Die Schilddrüsenhormonanalytik mit Gesamt- T_4 (T_4 D), radioimmunologische T_3 -Bestimmung (T_3 -RIA) und T_3 -in vitro-Test (T_3 U) wurde nach dem früher beschriebenen Prinzip der simultanen Säulenchromatographie durchgeführt [19]. Der Nachweis von TBG bei den verschiedenen Präparierschritten erfolgte zunächst indirekt mit einem nach dem T_3 -in vitro-Test modifizierten T_4 -Test: Die Auftrennung eines Inkubationsgemisches von unbekannter Probe mit T_4 -Tracer in TBG-gebundene und freie Fraktion erfolgte über kleine Säulen mit 1,5 ml Sephadex G-25 medium (vgl. 2.3.4). Bei späteren Präparationen wurde TBG direkt radioimmunologisch in einem „Kurzassay“ bestimmt (vgl. 2.6). Zur elektrophoretischen Überprüfung der Präparationen wurde die konventionelle Zellulose-Acetat-Elektrophorese mit Tris-Acetatpuffer pH 8,9 durchgeführt, die Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) nach dem von Maurer beschriebenen Verfahren mit Glycin-Acetatpuffer pH 8,9 und Tris-Veronal pH 7,0 [27]. Die Eiweißkonzentrationen in den Säuleneluat wurden als optische Dichte bei 280 nm in einem Zeiss-Spektralphotometer gemessen, der Gesamteiweißgehalt mit der Methode nach Lowry [23]. Die quantitative Aminosäureanalyse erfolgte nach saurer Hydrolyse mit dem Aminosäureanalysator Durrum D 500¹.

¹ Für die Durchführung der Aminosäureanalysen danken wir Herrn Dr. rer. nat. E. Fink, Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München

2.3. Isolierung von TBG

2.3.1. Kopplung von T_3 an Sepharose

Nach dem Prinzip von Cuatrecasas [8] wurden zunächst 50 ml Sepharose 4B mit Bromzyan aktiviert, mit Lysin gekoppelt und nach einer neuerlichen Bromzyan-Aktivierung T_3 kovalent über diesen Lysinspacer an die Sepharose gebunden. Durch Einsatz von CH-Sepharose 4B, einem Trägergel mit freien „six carbon long spacer“ Carboxylgruppen konnte dieses Verfahren vereinfacht werden: 10 g CH-Sepharose 4B wurden in einem Überschuß von 0,5 mol/l NaCl-Lösung gequellt und mit 500 ml 0,5 mol/l NaHCO_3 -Lösung über eine Fritte gewaschen. Diese feuchte Sepharose wurde danach zur Aktivierung in eine Lösung von 10 g Bromzyan in 100 ml Aqua bidest. gegeben. Unter kontinuierlichem Schütteln und pH-Kontrolle wurde in den nächsten 15 min laufend 0,5 mol/l NaOH zugegeben, bis der pH-Wert bei 8,5 nahezu konstant blieb. Dieses Bromzyan-aktivierte Gel wurde wieder mit 500 ml 0,5 mol/l NaHCO_3 über eine Fritte gewaschen. Anschließend wurden 100 mg stabiles T_3 mit einer Tracerdosis von 2 μCi T_3 - ^{125}I in 20 ml 0,1 mol/l NaOH gelöst, mit 0,5 mol/l NaHCO_3 -Lösung ad 100 ml verdünnt und dabei auf einen pH-Wert von 9,4 eingestellt. Mit dieser T_3 -Lösung wurde die aktivierte Sepharose über Nacht geschüttelt. Überschüssige Bindungsstellen der Sepharose wurden durch Ausschütteln mit 1 mol/l Glycinpuffer pH 9,5 4 h inaktiviert. Das nicht kovalent gebundene T_3 wurde durch exzessives Waschen der T_3 -Sepharose mit 10mal alternierend 1 mol/l Glycinpuffer pH 12 und 1 mol/l Natriumacetatpuffer pH 4,0 entfernt. Bei einer Wiederfindung des T_3 -Tracers von insgesamt 20% im Gel errechnete sich ein T_3 -Gehalt der Sepharose von 0,7 mg/ml.

2.3.2. Affinitätschromatographie

Zwei Liter Human-Plasma wurden mit 30 ml T_3 -Sepharose bei 4° C im Kühlraum 60 min ausgeschüttelt. Nach Absaugen des ex-

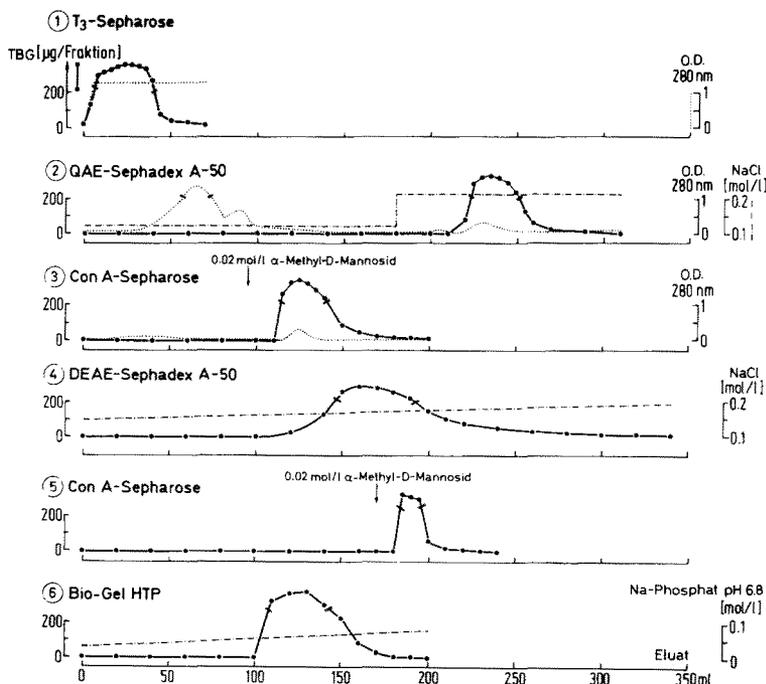


Abb. 1. Schema der säulenchromatographischen Reindarstellung von TBG aus Humanplasma. Der semiquantitative Nachweis der TBG-Peaks (●—●) erfolgte radioimmunologisch mit einem „TBG-Kurzassay“. Die Proteinkonzentrationen (.....) wurden an Hand der optischen Dichte in einer Durchflußküvette bei 280 nm gemessen, die Empfindlichkeit dieser Methode war allerdings ab Schritt 4 (DEAE-Sephadex A-50 Chromatographie) nicht mehr ausreichend zur Identifizierung der Proteinpeaks. Zusätzlich sind die Salzkonzentrationen (---) bei den Stufen- und linearen Gradienten eingezeichnet

trahierten Plasmas über ein Papierfilter in einer Porzellannutsche und Auswaschen der unspezifisch gebundenen Proteine mit 2 l kaltem 0,05 mol/l Veronalpuffer pH 9,0 wurde die T_3 -Sephrose in eine $1,5 \times 30$ cm Glassäule mit Temperiermantel gepackt. Anschließend wurde das extrahierte TBG von der T_3 -Sephrose bei 30°C mit einer T_3 -Lösung pH 9,1 eluiert (Abb. 1). Dazu wurden 12 mg T_3 in 5 ml 0,1 mol/l NaOH gelöst und mit 0,05 mol/l Veronalpuffer pH 8,6 ad 100 ml verdünnt.

2.3.3. Weitere säulenchromatographische Reinigung

QAE-Sephadex A-50 wurde über Nacht in 0,05 mol/l Tris-HCl, 0,1 mol/l NaCl-Pufferlösung pH 8,6 gequellt und in eine Glassäule von $2,5 \times 25$ cm gepackt. Die TBG-Fractionen von der T_3 -Sephrosensäule (Gesamtvolumen 50 ml) wurden direkt im geschlossenen System auf diese QAE-Sephadex-A-50-Säule eluiert und dabei konzentriert. Nach der Elution von Proteinverunreinigungen mit 130 ml 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit einem NaCl-Gehalt von 0,125 mol/l erfolgte die Elution des TBG durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 0,225 mol/l NaCl (Abb. 1). Con A-Sephrose wurde in eine Säule von $1,0 \times 20$ cm gepackt und mit einem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 vorgespült. Der TBG-Peak von der QAE-Sephadex A-50-Säule wurde wiederum im geschlossenen System auf diese ConA-Sephrose eluiert: Das TBG blieb als Glykoprotein gebunden, während Albuminverunreinigungen eluiert und verworfen wurden. Mit 0,02 mol/l α -methyl-D-mannosid in 0,05 mol/l Tris-HCl, 0,1 mol/l NaCl-Puffer pH 8,6 erfolgte die Elution des TBG-Peaks. Dieser wurde auf einer nachfolgenden DEAE-Sephadex A-50-Säule ($1,5 \times 30$ cm), die mit dem Tris-NaCl-Puffer pH 8,6 vorgespült war, wieder konzentriert. Mit einem linearen Gradienten von 0,15 gegen 0,20 mol/l NaCl in 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,6 wurde TBG eluiert und gleich wieder auf ConA-Sephrose konzentriert (Abb. 1). Mit 0,02 mol/l α -methyl-D-mannosid in 0,05 mol/l Tris-HCl, 0,25 mol/l NaCl-Puffer pH 8,9 wurde TBG wieder eluiert und zur Extraktion des gebundenen T_3 über eine $1,5 \times 30$ cm Säule mit QAE-Sephadex A-25 chromatographiert. Nach Konzentrierung und Dialyse gegen Aqua bidest. in einer Kollodiumhülle (Fa. Sartorius, Membranfilter, Göttingen) wurde TBG noch auf eine Bio-Gel HTP-Säule ($1,5 \times 30$ cm) gebracht, mit einem linearen Gradienten von 0,03 gegen 0,08 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 6,8 wieder eluiert (Abb. 1) und in einer Kollodiumhülle mehrfach gegen Aqua bidest. dialysiert und dabei konzentriert. Diese salzfreie TBG-Lösung wurde zum Schluß gefriergetrocknet und bei -60°C aufbewahrt.

2.3.4. Bestimmung der Bindungskapazität des isolierten TBG für T_4 und T_3

Zu 1 μg TBG in 100 μl 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,6 wurden steigende Konzentrationen an stabilem T_4 bzw. T_3 und konstante Tracerdosen von T_4 - ^{125}J bzw. T_3 - ^{125}J gegeben. Nach einer Inkubation von je 15 min bei Zimmertemperatur und anschließend im Kühlraum bei 4°C wurden die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von jeweils 300 μl auf kleine Säulen mit 1,5 ml Sephadex G-25 medium gebracht. Der TBG-Peak mit dem gebundenen T_4 bzw. T_3 (B) wurde mit Tris-HCl-Puffer pH 8,6 eluiert. Der freie, an Sephadex adsorbierte Anteil von T_4 oder T_3 (F) wurde anschließend mit 200 μl Serum ausgewaschen [19]. Die Bindungskapazität und die Assoziationskonstanten des TBG für T_4 und T_3 wurden mit Hilfe des Scatchard-Plots berechnet ([10], vgl. Abb. 4).

2.4. Radioaktive Markierung von TBG

Zu 10 μg TBG und 1 mCi ^{125}J wurden 30 μg Chloramin-T zugegeben und die Reaktion nach 5 s mit 60 μg Natriummetabisulfit abgebrochen [14]. Das Gesamtvolumen von 60 μl wurde auf eine kleine Säule mit 1 ml ConA-Sephrose gebracht. Das überschüssige ^{125}J wurde mit 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 aus-

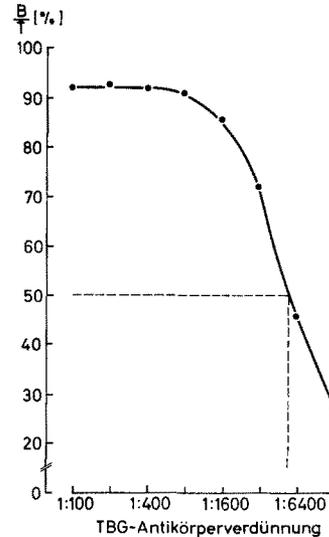


Abb. 2. Prozentuale Bindung des TBG-Tracers in Abhängigkeit von der Verdünnung des TBG-Antiserums. Bei Einsatz von 100 μl 1:5600 verdünntem Antiserum wurden 50% des Tracers gebunden

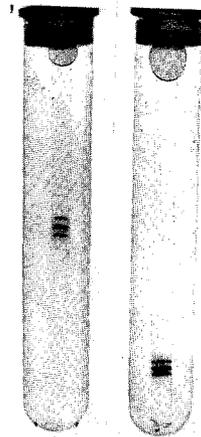


Abb. 3. Untersuchung des isolierten TBG mit Hilfe des isoelectric focusing auf Mikroheterogenität. In zwei verschiedenen Ampholyten mit einem pH-Bereich von 3,5–10,0 (rechte Säule) bzw. 3,5–5,0 (linke Säule) trennt sich das TBG in drei Banden zwischen pH 4,0 und 4,5 auf. Die Anfärbung des Proteins erfolgte mit Bromphenolblau

gewaschen und danach das TBG mit 0,02 mol/l α -methyl-D-mannosid in 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 eluiert. Die Wiederfindung der Radioaktivität im TBG-Peak lag zwischen 25 und 50%. Der TBG-Tracer wurde mit 2 g/l Rinderalbumin in 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf eine Gebrauchslösung von ca. 40000 IpM/100 μl verdünnt und bei 4°C aufbewahrt. Eine zusätzliche Chromatographie über T_3 -Sephrose, DEAE-Sephadex A-50 oder Bio-Gel HTP brachte keine weitere Reinigung des TBG-Tracers.

2.5. Gewinnung eines TBG-Antiserums

Zwei Kaninchen wurden dreimal im Abstand von 3 Wochen mit jeweils 75 μg TBG in inkomplettem Freundschem Adjuvans immunisiert. Zehn Tage nach der letzten Booster-Impfung konnte ein

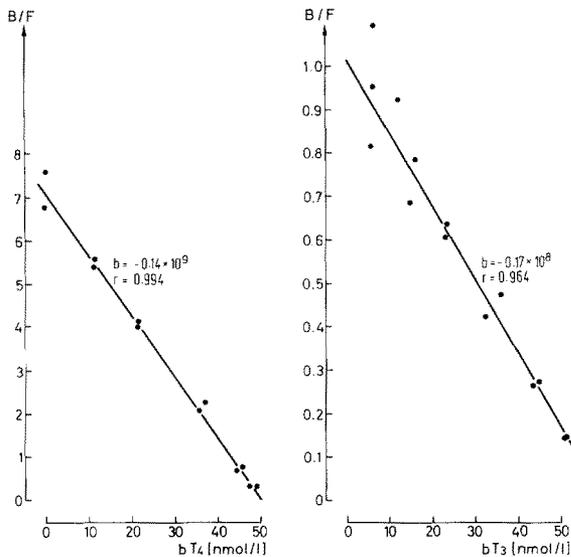


Abb. 4. Bestimmung der Bindung von T_4 und T_3 an das isolierte TBG mit Hilfe des Scatchard-Plots. Die Menge des TBG-gebundenen Schilddrüsenhormons (bT_4 und bT_3 , Abszisse) berechnete sich jeweils als Produkt aus prozentualer Tracerbindung (B/T) und der molaren Konzentrationen der eingesetzten T_4 - bzw. T_3 -Standards, auf der Ordinate sind die entsprechenden B/F -Raten aufgezeichnet. Die Assoziationskonstanten sind dabei die Reziproken der Regressionskoeffizienten

brauchbares TBG-Antiserum gewonnen werden: Die maximale Tracerbindung dieses Antiserums lag über 90%, in einer Verdünnung von 1:5600 wurden 50% des eingesetzten TBG-Tracers gebunden (Abb. 2).

2.6. Radioimmunologische TBG-Bestimmung²

100 μ l Kalibrierstandardlösung oder verdünnte Serumprobe wurden mit 100 μ l TBG-Tracer und 100 μ l Antikörperlösung über Nacht inkubiert. Nach Zusatz von 100 μ l 10 g/l Rinder- γ -Globulin-Lösung erfolgte die Fällung des Antikörper-gebundenen Tracers mit 500 μ l 250 g/l Polyäthylenglycol in 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 [9]. Für einen semiquantitativen TBG-Nachweis in den Säuleneluat bei den Präparierschritten wurde in den Ansätzen mit 10 μ l Probe, 50 μ l TBG-Tracer und 20 μ l Antikörperlösung (1:800 Verdünnung) schon nach einer Inkubationszeit von 30 min die Fällung mit Polyäthylenglycol durchgeführt („TBG-Kurzassay“).

3. Methodische Ergebnisse

3.1. Präparation des TBG

Mit dem ersten Präparierschritt, der Affinitätschromatographie auf T_3 -Sephrose, konnte aus 2 l Humanplasma das TBG gegenüber den übrigen Serumproteinen um den Faktor 640 angereichert werden, die Wiederfindung von TBG betrug 35% (Tabelle 1). Auf den Versuch, bessere Wiederfinderraten zu erzielen, etwa durch Einsatz einer größeren Menge T_3 -Sephrose oder durch Reduzierung

² Mit dieser Arbeit werden frühere, vorläufige Ergebnisse mit P. Livesey (Livesey, P.G., F. Erhardt, K. Horn, P.C. Scriba, Acta endocr. (Kbh.) Suppl. **184** (1974) 81) und P. Wagner (Wagner, P., K. Horn, F. Erhardt, P.C. Scriba, Acta endocr. (Kbh.) Suppl. **199** (1975) 306) zum Teil korrigiert

Tabelle 1. Wiederfindung und Anreicherung des TBG bei den einzelnen chromatographischen Reinigungsschritten. Die Differenz zwischen Abwaage und Proteinbestimmung bei dem reinen TBG ist auf einen Zuckeranteil des TBG von 15% zurückzuführen

	Wiederfindung		TBG : Protein [mg : mg]
	Protein [mg]	TBG [mg]	
Ausgangsmaterial (2 l Nativserum)	143 000	37. 8	1 : 3783
(1) T_3 -Sephrose	78. 6	13. 2	1 : 5.96
(2) QAE-Sephadex A-50	17. 4	11. 4	1 : 1.53
(3) Con A-Sephrose	9. 5	10. 3	1 : 0.92
(4) DEAE-Sephadex A-50	6. 8	8. 1	1 : 0.84
(5) Con A-Sephrose	6. 2	7. 3	1 : 0.85

des mit TBG-Verlusten verbundenen Waschschrittes nach der Serumextraktion wurde verzichtet, um die Kontamination des TBG mit anderen Serumproteinen möglichst gering zu halten. In dem Celluloseacetatelektropherogramm des Proteinpeaks von der T_3 -Sephrose (Abb. 1) fanden sich neben einer TBG-Bande im Inter- α -Globulin-Bereich noch Albumin, sowie β - und γ -Globuline. Von der nachfolgenden QAE-Sephadex A-50 Säule wurden mit Tris-HCl-Puffer pH 7,4 bei einer Kochsalzkonzentration von 0,125 mol/l zunächst die γ - und β -Globuline eluiert und verworfen, nach Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 0,225 mol/l wurde TBG in einem scharfen Peak (Abb. 1) vor den Albuminen eluiert, das TBG war jetzt 2470fach gegenüber den anderen Serumproteinen angereichert (Tabelle 1). Bei der anschließenden Affinitätschromatographie über Con A-Sephrose wurden weitere Verunreinigungen, vor allem Reste von Albumin entfernt. Eine weitere Anreicherung des TBG um einen Faktor von schließlich 4500 (über alles) konnte noch durch eine Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Sephadex A-50 mit einem flachen Kochsalzgradienten von 0,15 auf 0,20 mol/l in Tris-HCl-Puffer pH 8,6 erzielt werden. Zusätzliche chromatographische Schritte, wie nochmalige Affinitätschromatographie auf Hydroxylapatit (Bio-Gel HTP), bewirkten nur mehr Substanzverlust, aber keine weitere Reinigung der TBG-Präparation. Die Wiederfindung des TBG über alle Präparationsschritte war mit 20% sehr zufriedenstellend. Die Differenz zwischen der eingewogenen Substanz (7,3 mg) und dem in ihr ermittelten Proteingehalt (6,2 mg) läßt auf einen Zuckeranteil des TBG von etwa 15% schließen (Tabelle 1).

3.2. Charakterisierung des TBG

Als erstes Reinheitskriterium für das isolierte TBG fanden wir bei der Disc-Elektrophorese in drei verschiedenen Konzentrationen des Polyacrylamidgels (5; 7,5; und 10% T) mit 2 verschiedenen Puffersystemen (Glycin-Acetattuffer pH 8,9 und Tris-Veronalpuffer pH 7,0) jeweils eine homogene Bande.

Außerdem wurde das TBG mit der Technik des isoelectric focusing bei zwei verschiedenen pH-Gradienten überprüft. Dazu wurden Ampholine Träger-Ampholyte (LKB Produkter, Bromma, Schweden) mit den pH-Bereichen 3,5–10,0 bzw. 3,5–5,0 benutzt³.

³ Untersuchungen mit Herrn Dr. med. M. Jensen, Kinderpoliklinik der Universität München

Tabelle 2. Aminosäureanalyse zweier verschiedener TBG-Präparationen. Bei Annahme eines Molekulargewichts von 57000 ist in den linken Spalten die Zahl der Aminosäurereste pro mol TBG aufgetragen. Bei einem Kohlehydratanteil von 15% ergibt sich ein Molekulargewicht des Proteinanteils von 48500. Die rechten Spalten geben den Anteil der einzelnen Aminosäuren auf Gewichtsbasis am Polypeptidrest der TBG-Präparationen wieder

Aminosäuren: Präparation	mol pro mol TBG		g pro 100 g Polypeptid	
	I	II	I	II
Lysin	28	28	8.4	8.4
Histidin	12	13	3.8	4.1
Arginin	6	8	2.2	2.7
Asparaginsäure	36	40	10.0	11.1
Threonin	24	27	6.0	6.7
Serin	30	31	6.5	6.8
Glutaminsäure	44	47	13.3	14.1
Prolin	16	wenig	3.9	—
Glycin	19	21	2.9	3.3
Alanin	28	30	5.1	5.5
Cystein	wenig	wenig	—	—
Valin	23	24	5.5	5.9
Methionin	20	10	6.0	3.2
Isoleucin	19	20	5.1	5.5
Leucin	39	42	10.6	11.3
Tyrosin	9	10	3.2	3.7
Phenylalanin	22	23	7.6	7.8

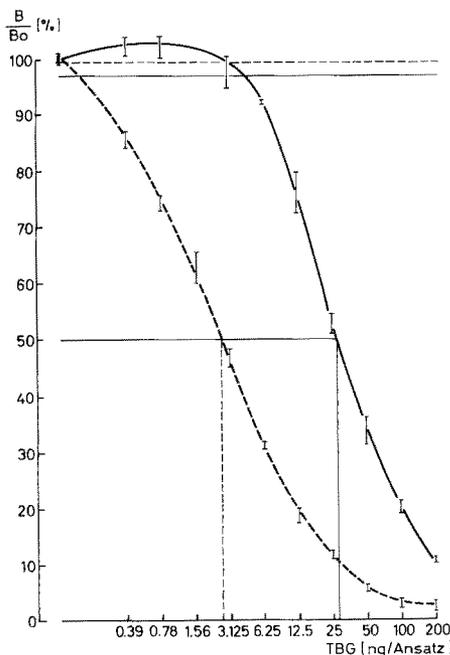


Abb. 5. Steilheit der Kalibrierstandardkurve für TBG bei Einsatz von TBG-Antiserum in Verdünnungen von 1:5600 (linke, gestrichelte Kurve) und 1:800 (rechte, durchgezogene Kurve). Die Berechnung ($\bar{x} \pm s$) erfolgte aus 3fach Analysen der einzelnen auf der Abszisse angegebenen TBG-Konzentrationen nach dem Spline-Approximationsverfahren [24]. Eingezeichnet sind ferner die untere Nachweisgrenze und der 50% Intercept der beiden Kalibrierkurven

In beiden Systemen bildete die TBG-Präparation nur drei scharf voneinander getrennte Banden im pH-Bereich von 4,0–4,5 (Abb. 3). Bei Einsatz von ^{125}I -Thyroxin-beladenem TBG fand sich die Radioaktivität in einem gleich breiten, noch nicht aufgetrennten Peak im gleichen pH-Bereich. Diese vorläufigen Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der schon von Marshall [26] postulierten, noch größeren Mikroheterogenität. Mögliche Unterschiede in der Struktur dieser drei Banden und deren Bindungsfähigkeit für Schilddrüsenhormone müssen noch weiter untersucht werden. Ein weiteres Reinheitskriterium für die TBG-Präparation war die äquimolare Bindung von T_4 oder T_3 : Mit Hilfe des Scatchard-Plot berechnete sich für 1 μg eingesetztes TBG eine maximale Bindungskapazität von 12 ng T_4 oder 10 ng T_3 . Die verglichen mit der Literatur zu niedrig gefundenen Assoziationskonstanten des TBG für T_4 (7×10^{-9} L/M) und T_3 (6×10^{-8} L/M) sind methodisch durch die Störung des Äquilibrium bei der Abtrennung des TBG-gebundenen vom freien T_4 und T_3 auf Sephadex G-25 bedingt (Abb. 4). Das Ergebnis der quantitativen Aminosäureanalyse des TBG, die in zwei verschiedenen Präparationen nahezu identische Resultate ergab, ist in Tabelle 2 aufgeführt.

3.3. Radioimmunologische Bestimmung des TBG

Bei einer Verdünnung des gewonnenen TBG-Antiserums von 1:5600 wurden ohne Einsatz von kaltem TBG 50% des Tracers gebunden (B_0 -Bindung, vgl. Abb. 2). Die Kalibrierstandardkurve war mit einer unteren Nachweisgrenze von weniger als 0,2 ng TBG pro Ansatz (3fache Standardabweichung der B_0 -Bindung) und einem 50% Intercept (50% der B_0 -Bindung) bei 2,8 ng TBG pro Ansatz sehr empfindlich (Abb. 5). Für die Bestimmung von Serumproben war der so erzielte Meßbereich allerdings unpraktisch, da für hinreichend exakte Messungen Vorverdünnungen der Seren bis 1:1000 erforderlich waren. Durch Einsetzen des Antiserums in einer Verdünnung von 1:800 wurde deshalb die Empfindlichkeit der Methode soweit reduziert, daß praktisch alle Serumproben nach einer Vorverdünnung von 1:50 bestimmt werden konnten (Abb. 5).

Die Präzision der Methode von Tag zu Tag wurde mit einem gepoolten Kontrollserum bestimmt, sie war mit einem Variationskoeffizienten von 4,3% ($16,6 \pm 0,7$ mg/l TBG, $\bar{x} \pm s$, $N=31$) sehr zufriedenstellend. Die Wiederfinderraten von TBG-Kalibrierstandards im Serum lagen bei 100%.

Ein Einfluß der verschiedenen Konzentrationen des Serums an T_4 und T_3 konnte ausgeschlossen werden. Auch bei Zugabe eines zehnfachen Überschusses der Normalkonzentrationen von T_4 und T_3 zum Ansatz konnte keine Verdrängung des TBG-Tracers vom TBG-Antiserum beobachtet werden. Auch die sogenannten TBG-blockenden Substanzen wie 8-Anilino-1 Naphthalensulfonsäure (ANS), Thimerosal, Natriumsalicylat zeigten keine Kreuzreaktion mit dem TBG-Antiserum.

Die Meßwerte verschiedener Verdünnungen der Serumproben lagen jeweils auf der Kalibrierstandardkurve, Hinweise auf eine immunologische Heterogenität von TBG ergaben sich damit nicht, sie wurden bisher auch nicht bei quantitativen TBG-Varianten (TBG-Mangel und TBG-Exzess) gefunden.

4. Diagnostische Ergebnisse

4.1. TBG-Spiegel im Serum von schilddrüsengesunden Personen

4.1.1. Altersabhängigkeit

Bei 233 schilddrüsengesunden Probanden vom Neugeborenenalter bis zum Senium (männlich: $N=109$;

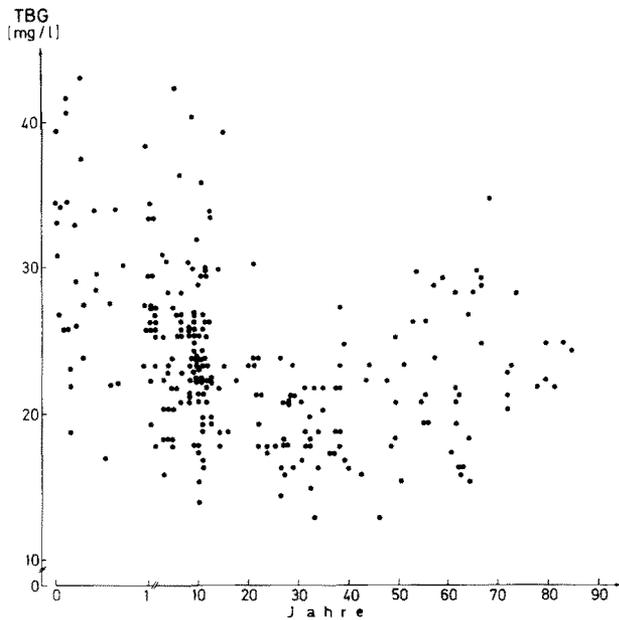


Abb. 6. Altersabhängigkeit der TBG-Spiegel bei gesunden Kontrollpersonen ($N=233$)

weiblich: $N=124$) zeigten die T_4 -Spiegel mit $73,7 \pm 17,8 \mu\text{g/l}$ ($\bar{x} \pm s$) und der T_3 -in vitro-Test mit $33,3 \pm 4,8\%$ eine gute Übereinstimmung mit den früher in unserem Labor ermittelten Normalbereichen [20]. Dementsprechend war der Index der freien Schilddrüsenhormone mit $25,4 \pm 6,2$ normal. Die TBG-Spiegel lagen in dem Gesamtkollektiv im Mittel bei $23,0 \pm 4,0 \text{ mg/l}$.

Bei graphischer Darstellung der TBG-Konzentrationen gegen das Lebensalter dieser Probanden wurde eine deutliche Altersabhängigkeit des TBG erkennbar (Abb. 6): Die höchsten TBG-Spiegel wurden in der Perinatalphase gefunden, sie fielen bis etwa zum 15. Lebensjahr kontinuierlich ab, blieben dann bis zum 50. Lebensjahr auf einem Niveau, um im höheren Lebensalter wieder anzusteigen. Aus diesem Grund wurde das Gesamtkollektiv in fünf Altersgruppen unterteilt (Tabelle 3). Diese Unterteilung deckte eine

parallele Altersabhängigkeit der Gesamtthyroxinspiegel zum TBG auf. Die TBG- und T_4 -Spiegel aller anderen Altersgruppen waren im Vergleich zu den Erwachsenen zwischen 16 und 49 Jahren jeweils statistisch (t-Test nach Student) signifikant höher ($p < 0,001$). Entsprechend korrelierten die T_4 - und TBG-Spiegel des Gesamtkollektivs signifikant ($r = 0,5739$; $p < 0,001$). Der T_3 -in vitro-Test zeigte als indirekter Parameter für TBG erwartungsgemäß ein zu TBG und T_4 umgekehrt proportionales Verhalten. Während der Index der freien Schilddrüsenhormone noch eine signifikante Altersabhängigkeit aufwies, blieb der T_4 /TBG-Quotient nach der Perinatalphase altersunabhängig konstant mit $3,2 \pm 0,7$ ($\bar{x} \pm s$). In der Perinatalphase waren die T_4 -Spiegel erwartungsgemäß auf Grund des postnatalen, TSH-induzierten T_4 -Anstiegs disproportional zum TBG erhöht. Der mittlere T_4 /TBG-Quotient betrug $4,94 \pm 1,45$ ($\bar{x} \pm s$) (Tabelle 3).

4.1.2. Geschlechtsunterschiede

Wegen des bekannten Einflusses von Oestrogenen auf die Serumkonzentrationen von TBG und damit auch auf die Gesamtschilddrüsenhormone mußten die bei den Kontrollpersonen gemessenen TBG-Spiegel auf Geschlechtsunterschiede überprüft werden. Im Gesamtkollektiv war der mittlere TBG-Spiegel der Männer mit $22,6 \pm 4,0 \text{ mg/l}$ nicht von dem der Frauen mit $23,2 \pm 4,0 \text{ mg/l}$ ($\bar{x} \pm s$) verschieden. Auch bei Unterteilung in die 5 verschiedenen Altersgruppen ergab sich kein statistisch signifikanter Geschlechtsunterschied. Selbst im generationsfähigen Alter (Gruppe von 16–49 Jahren) war der mittlere TBG-Spiegel der Frauen mit $20,0 \pm 3,5 \text{ mg/l}$ nicht höher als der der Männer mit $19,8 \pm 2,8 \text{ mg/l}$.

4.2. Einfluß von Oestrogen auf die TBG-Spiegel

Der aus indirekten Verfahren bekannte Anstieg der TBG-Spiegel unter Oestrogen- und in der Gra-

Tabelle 3. Serumspiegel von TBG, Gesamt-Thyroxin, T_3 -in vitro-Test, Index der freien Schilddrüsenhormonspiegel und T_4 /TBG-Quotient bei schilddrüsen gesunden Kontrollpersonen in den verschiedenen Altersgruppen. Die Signifikanz wurde jeweils gegen die Gruppe der Erwachsenen zwischen 16 und 49 Jahren berechnet ($p < 0,001$)

	N	TBG (mg/l)		T_4 D ($\mu\text{g/l}$)		T_3 U (%)		Index f T_4		T_4 /TBG-Quotient	
		\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Neugeborene bis 4 Wochen	13	34,3	4,1	147,7	23,5	26,8	4,7	44,7	12,8	4,94	1,45
Säuglinge bis 1 Jahr	19	29,4	6,9	92,4	15,5	29,5	4,6	28,5	5,9	3,39	0,69
Kinder 1–15 Jahre	105	25,5	5,4	75,4	16,2	31,7	5,6	23,8	6,7	3,04	0,75
Erwachsene 16–49 Jahre	50	20,1	4,4	60,2	13,0	36,3	6,0	22,5	7,2	3,17	0,88
Erwachsene älter als 49 Jahre	30	22,9	6,0	80,4	16,6	35,7	7,3	27,9	8,3	3,55	0,95

Tabelle 4. Ergebnisse der TBG-Bestimmung und Schilddrüsenlaboratoriumsdiagnostik bei graviden und Oestrogen-behandelten Frauen, bei Patienten mit primären Schilddrüsenfunktionsstörungen und bei Probanden mit quantitativen TBG-Varianten

	N	TBG (mg/l)		T ₄ D (µg/l)		T ₃ U (%)		Index fT ₄		T ₄ /TBG-Quotient	
		\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Gravidität	31	40,4	12,0	93,3	33,3	20,8	5,0	19,0	7,2	2,42	0,87
Antioovulantien	80	31,4	5,2	89,4	27,2	26,3	4,1	23,4	7,6	2,92	1,04
Hypothyreose	20	21,6	7,0	25,1	9,3	29,8	7,1	7,3	3,9	1,18	0,63
Struma	64	21,1	4,6	58,5	16,2	34,2	5,3	19,9	6,4	2,86	0,90
Hyperthyreose	42	20,0	3,5	160,2	57,0	62,5	15,5	102,0	59,0	7,85	2,85
TBG-Mangel	30	9,0	4,3	28,5	11,1	54,4	11,3	14,9	5,3	3,61	1,20
TBG-Überschuß	6	42,2	1,7	104,0	35,1	23,1	4,5	25,3	12,2	2,49	0,86

vidität mußte mit der spezifischen TBG-Bestimmung quantitativ überprüft werden.

4.2.1. Gravidität

Bei 66 graviden Frauen lagen die TBG-Spiegel im Mittel mit $40,4 \pm 12,9$ mg/l signifikant höher als bei Kontrollpersonen vergleichbaren Alters (Tabelle 4, vgl. Tabelle 3). Im Verlauf der Gravidität zeigte sich nach den ersten 8 Wochen ein mittlerer Anstieg des TBG auf $24,1 \pm 6,2$ mg/l (Abb. 7). Im weiteren Verlauf stiegen die TBG-Spiegel kontinuierlich bis zum Beginn des 3. Trimenon an und blieben dann auf einem Plateau ($51,3 \pm 10,8$ mg/l). Parallel zum TBG-Anstieg fand sich erwartungsgemäß ein Anstieg des T₄ auf $107,8 \pm 42,0$ µg/l im 3. Trimenon und des Gesamt-T₃ auf $2,13 \pm 0,77$ µg/l (Normalbereich: $1,15 \pm 0,18$ µg/l). Auffälligerweise war der T₄/TBG-Quotient bei den Graviden im Mittel mit $2,42 \pm 0,87$ signifikant niedriger als der der Kontrollgruppe entsprechenden Alters ($p < 0,0005$, Abb. 8), ebenso der Index der freien Schilddrüsenhormone ($19,0 \pm 7,2$, $p < 0,025$). Dies kann als ein Hinweis auf einen nicht adäquaten Anstieg des T₄ mit dem TBG bei kompensatorischer „T₃-Mehrsekretion“ [20] gedeutet werden.

4.2.2. Oestrogenbehandlung bei Frauen

Bei 80 schilddrüsengesunden Frauen, die langfristig unter Kontrazeptiva standen oder im Klimakterium mit Oestrogen behandelt wurden, lagen die mittleren TBG- und T₄-Spiegel mit $31,4 \pm 5,2$ mg/l bzw. $89,0 \pm 26,8$ µg/l signifikant höher als bei Unbehandelten ($p < 0,0005$, vgl. Tabelle 4).

4.2.3. Oestrogentherapie bei Männern

Der Einfluß von pharmakologischen Oestrogendosen auf die TBG-Spiegel bei Männern konnte bei zehn Patienten überprüft werden, bei denen wegen eines Prostatacarcinoms eine Behandlung mit täglich zwi-

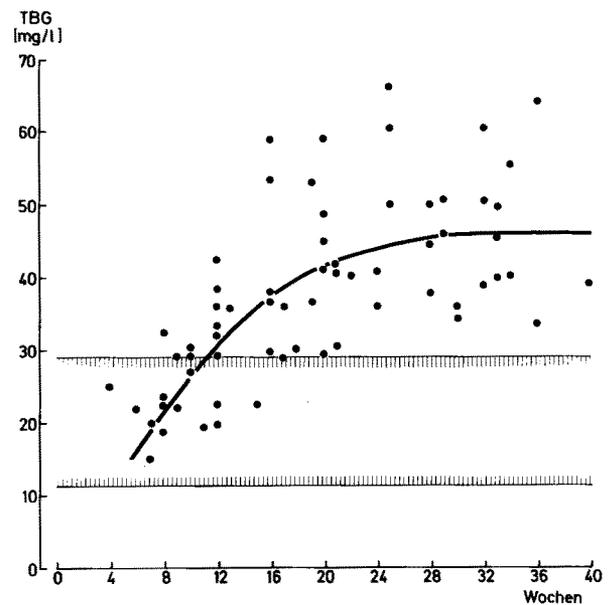


Abb. 7. TBG-Anstieg im Verlauf der Gravidität: Aufgetragen sind die individuellen TBG-Spiegel von 66 schwangeren Frauen gegen die jeweilige Schwangerschaftswoche. Die beiden waagrechten Balken markieren den für weibliche Kontrollpersonen zwischen 16 und 49 Jahren berechneten Normalbereich für TBG (vgl. Tabelle 3)

schen 0,5 und 1,5 g Fosfestrol (Honvan®) eingeleitet wurde⁴. Während des beobachteten Behandlungszeitraumes zwischen 7 und 18 Tagen war es bei 7 Patienten zu einer deutlichen, bei 3 Patienten zu keiner Veränderung der TBG-Spiegel gekommen. Der Anstieg des TBG, der besser mit der applizierten Gesamtdosis als mit der Behandlungsdauer korrelierte, war signifikant nach Überschreiten einer Gesamtdosis von 4,5 g Fosfestrol. Diese Befunde zeigen, daß auch bei Männern die TBG-Spiegel unter Oestrogenwirkung innerhalb von Tagen ansteigen und etwa die Höhe der TBG-Spiegel Oestrogen-behandelter Frauen erreichen (Tabelle 5, vgl. Tabelle 4).

⁴ Wir danken Herrn Dr. med. F.J. Marx, Urologische Klinik der Universität München, für die Überlassung der Serumproben

Tabelle 5. Änderung der TBG-Spiegel, des Gesamt-T₄, des T₃-in vitro-Tests, Index der freien Schilddrüsenhormone und des T₄/TBG-Quotienten bei 10 Männern unter einer parenteralen Behandlung mit täglich 0,5–1,5 g Fosfestrol (Honvan®) über einen Zeitraum von 7–18 Tagen. Gegenübergestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der gemessenen Parameter und die jeweiligen zwischenzeitlich erreichten Gesamtdosen von Fosfestrol

	Fosfestrol-Behandlung (Gesamtdosis)								
	Vor Fosfestrol		4,5 g		9,0 g		15 g		
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	
TBG (mg/l)	17,4	5,9	18,2	5,7	25,8	3,8	27,5	8,2	
T ₄ D (µg/l)	89,1	24,8	82,4	16,5	97,6	22,0	113,7	23,5	
T ₃ U (%)	39,2	9,7	39,7	10,1	28,9	4,6	27,4	6,3	
fT ₄ -Index	32,5	7,1	31,1	5,3	28,1	10,3	31,0	11,5	
T ₄ /TBG-Quotient	5,3	1,6	4,7	1,1	3,8	1,0	4,4	1,6	

Tabelle 6. Änderung der TBG-Spiegel und der Ergebnisse der Schilddrüsenlaboratoriumsdiagnostik bei 7 Frauen unter einer Behandlung mit täglich 400 mg Danazol über einen Zeitraum von 12–20 Wochen

	400 mg Danazol täglich								
	Vor Danazol		4		8		> 12 Wochen		
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	
TBG (mg/l)	17,6	3,1	8,8	2,5	6,9	1,8	6,8	1,6	
T ₄ D (µg/l)	63,7	5,5	52,8	22,1	37,6	9,1	34,6	8,6	
T ₃ U (%)	36,3	5,1	57,0	11,5	62,7	8,4	63,4	8,7	
fT ₄ -Index	23,1	4,3	23,9	4,2	23,1	4,4	23,4	3,4	
T ₃ -RIA (µg/l)	1,22	0,29	0,81	0,25	0,78	0,16	0,75	0,16	
T ₄ /T ₃ -Quotient	54,6	12,3	51,3	6,7	54,5	16,7	49,6	12,6	
T ₄ /TBG-Quotient	3,7	0,7	5,1	1,1	5,5	0,7	5,7	1,5	

4.2.4. Behandlung mit dem „Antigonadotropin“ Danazol

Dem 2,3-Isoxazol-Derivat des 17- α -Äthinytestosteron (Danazol, Fa. Winthrop, Gießen) wird eine antigonadotrope Wirkung zugeschrieben, es soll zu einem Abfall der endogenen Oestrogenspiegel führen [1, 12, 13, 35]. Bei chronischer Applikation kommt es zu einer sekundären Amenorrhoe. Bei 7 Frauen, die wegen Endometriose oder Mastopathia cystica mit 400 mg Danazol täglich behandelt wurden, wurden die TBG-Spiegel und die Laborparameter für die Beurteilung der Schilddrüsenfunktion über einen Behandlungszeitraum 12–20 Wochen verfolgt⁵ (Tabelle 6): In allen Fällen fielen die TBG-Spiegel innerhalb der ersten vier Wochen signifikant ab, im Mittel auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Das Gesamt-T₄ und T₃ im Serum fiel ebenfalls ab, der T₃-in vitro-Test stieg an. Auffälligerweise stieg unter der Danazol-Behandlung der T₄/TBG-Quotient signifikant an,

während der Index der freien Schilddrüsenhormone konstant blieb (Umverteilung auf andere bindende Serumproteine?). Bei zwei Patientinnen konnten die Änderungen der TBG-Spiegel nach Absetzen der Medikation kurzfristig verfolgt werden. Dabei zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des TBG, nach sechs Wochen waren die Ausgangsspiegel vor Danazol wieder erreicht.

4.2.5. Zyklusabhängigkeit der TBG-Spiegel

Zur Prüfung der Frage, ob schon die kurzfristigen zyklischen Schwankungen der endogenen Oestrogenspiegel bei Frauen im generationsfähigen Alter zu Änderungen der TBG-Spiegel führen, wurden diese bei 5 gesunden Frauen im Alter von 22–28 Jahren in drei- bis fünftägigen Abständen bestimmt. Zyklusabhängige Veränderungen des TBG ließen sich hierbei nicht erkennen, die Variationskoeffizienten der individuellen Werte waren nicht größer als der Variationskoeffizient der TBG-Bestimmungsmethode in diesem Meßbereich von 4,3% (Tabelle 7). Kurzfristige endogene Änderungen der Oestrogenspiegel führen also nicht zu Änderungen der TBG-Spiegel.

⁵ Wir danken Herrn Priv. Doz. Dr. med. R. Goebel, I. Frauenklinik der Universität München, für die Überlassung der Serumproben

Tabelle 7. TBG-Spiegel im Verlauf eines Menstruationszyklus bei 5 jungen Frauen. Aus den individuellen Werten während des Zyklus wurden jeweils Mittelwert und Variationskoeffizient berechnet

Tag im Zyklus	TBG-Spiegel (mg/l)				
	B.C. 23 J.	M.M. 23 J.	F.R. 28 J.	S.U. 26 J.	B.P. 25 J.
3-7	17,1	20,4	14,5	18,9	20,1
8-11	18,4	19,1	14,4	19,0	—
13-14	16,2	16,9	13,8	20,9	19,7
15-18	17,3	18,4	14,7	20,4	20,1
19-21	17,1	18,7	15,4	20,0	18,4
22-25	17,8	19,8	—	20,0	—
28-29	17,3	19,0	14,3	—	19,8
$\bar{x} \pm s$	17,3 \pm 0,7	18,9 \pm 1,1	14,5 \pm 0,5	19,9 \pm 0,8	19,6 \pm 0,7
VK	3,9%	5,9%	3,6%	4,0%	3,6%

4.3. TBG-Spiegel bei primären Schilddrüsenfunktionsstörungen

Bei 20 Patienten mit primärer, thyreogener Hypothyreose waren im Mittel das Gesamt-T₄ mit 25,0 \pm 9,0 μ g/l ($\bar{x} \pm s$), der T₃-in vitro-Test mit 29,8 \pm 7,1% und folglich der Index der freien Schilddrüsenhormone mit 7,3 \pm 3,9 signifikant gegenüber den schilddrüsengesunden Kontrollpersonen erniedrigt. Die mittleren TBG-Spiegel waren mit 21,6 \pm 7,0 mg/l gegenüber 23,0 \pm 4,0 mg/l bei Normalpersonen jedoch nicht signifikant verschieden (Tabelle 4). Auch bei den 64 untersuchten Patienten mit blander Struma waren die TBG-Spiegel mit einem Mittelwert von 21,1 \pm 4,6 mg/l normal. Bei 42 Patienten mit unbehandelter „klassischer“ Hyperthyreose [20] waren Gesamt-T₄ (160 \pm 57 μ g/l), T₃-in vitro-Test (62,5 \pm 15,5%) und entsprechend der ft₄-Index (102,0 \pm 59) signifikant erhöht, die TBG-Spiegel waren jedoch mit 20,0 \pm 3,5 mg/l normal. Bei primären

Schilddrüsenfunktionsstörungen fanden sich damit keine Veränderungen der TBG-Spiegel im Vergleich zu schilddrüsengesunden Kontrollpersonen, auch der Unterschied zwischen den TBG-Spiegeln bei Hypothyreose und Hyperthyreose war nicht signifikant (Tabelle 4). Die erniedrigten oder erhöhten Werte des T₃-in vitro-Tests zeigen bei diesen Patienten also nicht eine Veränderung der TBG-Spiegel an, sie sind vielmehr darauf zurückzuführen, daß die Bindung des in vitro zugegebenen T₃-Tracers an das endogene TBG von der endogenen T₄-Konzentration im Serum abhängig ist.

4.4. Quantitative TBG-Varianten

Der Verdacht auf eine quantitative Änderung der zirkulierenden TBG-Spiegel ergibt sich aus einer ungewöhnlichen Konstellation der Parameter der konventionellen Schilddrüsenlaboratoriumsdiagnostik: Niedrige T₄-Spiegel bei gleichzeitig erhöhtem T₃-in vitro-Test weisen auf einen TBG-Mangel hin, umgekehrt erhöhte T₄-Spiegel bei erniedrigtem T₃-in vitro-Test auf einen TBG-Exzess.

4.4.1. TBG-Mangel

Bei 30 Patienten war im Mittel das Gesamt-T₄ mit 29,0 \pm 11,0 μ g/l erniedrigt, der T₃-in vitro-Test mit 54,4 \pm 11,3% erhöht und der Mittelwert der TBG-Spiegel mit 9,0 \pm 4,3 mg/l signifikant erniedrigt (Tabelle 4). Der Index der freien Schilddrüsenhormone war mit 14,9 \pm 5,3 gegenüber den Kontrollpersonen signifikant erniedrigt (Umverteilung auf Präalbumin und Albumin); dabei ergaben sich bei diesen Patienten an Hand der Klinik und der in allen Fällen normalen TSH-Spiegel keine Hinweise auf eine Hypothyreose. Dementsprechend war der T₄/TBG-Quotient mit 3,6 \pm 1,2 in Übereinstimmung mit der Klinik nor-

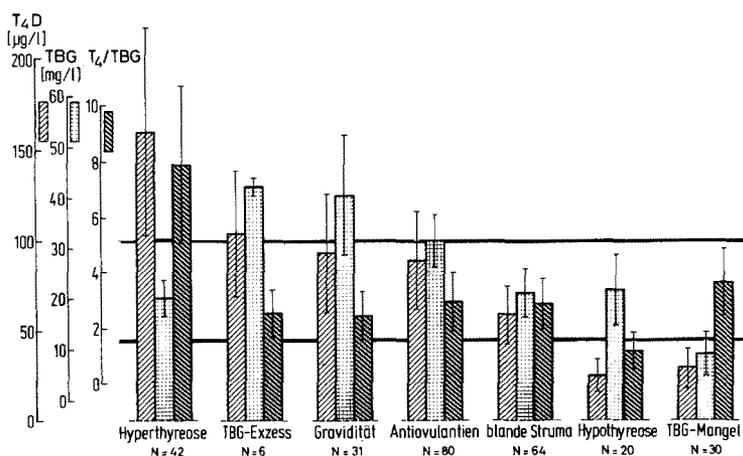


Abb. 8. Gesamt-T₄, TBG und T₄/TBG-Quotient bei Patienten mit primären Schilddrüsenfunktionsstörungen, bei Frauen während einer Gravidität oder Oestrogenbehandlung und bei Probanden mit quantitativen TBG-Varianten. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$) für T₄, TBG und T₄/TBG-Quotienten sind jeweils als Säulen dargestellt. Die beiden waagrechten Balken markieren die bei Kontrollpersonen zwischen 16 und 49 Jahren ermittelten Normalbereiche der 3 Parameter

mal (Tabelle 4, Abb. 8). Die Ursache für den TBG-Mangel war bei 4 Patienten eine Lebercirrhose, bei 2 Patienten ein schwerer kataboler Stoffwechsellzustand bei Colitis ulcerosa und bei 3 Patienten ein nephrotisches Syndrom bzw. Dysproteinämien bei z.B. Plasmozytomen. Ein genetischer TBG-Mangel [2, 21] konnte auf Grund von Familienuntersuchungen bei 6 Probanden nachgewiesen und bei weiteren 8 vermutet werden. Die Ursache des TBG-Mangels bei den übrigen 7 Personen blieb bisher noch unbekannt.

4.2.2. TBG-Überschuß

Bei 6 Probanden waren ohne exogene oder endogene Erhöhung der Oestrogenspiegel und ohne Hinweis auf eine Lebererkrankung die T_4 -Spiegel im Mittel mit $104 \pm 35 \mu\text{g/l}$ erhöht und der T_3 -in vitro-Test mit $23,1 \pm 4,5\%$ erniedrigt. Die TBG-Spiegel lagen individuell zwischen 41 und 45 mg/l, im Mittel bei $42,2 \pm 1,7 \text{ mg/l}$ (Tabelle 4). Extrem hohe TBG-Spiegel von 122 mg/l fanden sich bei einem weiteren männlichen Probanden (K.K.) ohne Hinweis auf eine organische Erkrankung. Bei ihm betrug das Gesamt- T_4 204 $\mu\text{g/l}$, das Gesamt- T_3 (T_3 -RIA Normalbereich: 0,8–1,5 $\mu\text{g/l}$ [20]) 5,8 $\mu\text{g/l}$, der T_3 -in vitro-Test 9,4% und der fT_4 -Index 19,2. Die TSH-Spiegel stiegen 30 min nach 200 μg TRH i.v. von 2,0 auf 15 $\mu\text{E/ml}$ normal an.

5. Diskussion

Die Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 sind im Serum zum überwiegenden Teil an spezifische Transportproteine gebunden, nur weniger als 1% liegt in der direkt biologisch aktiven, freien Form vor. Das quantitativ wichtigste Transportprotein ist das Thyroxin-bindende Globulin (TBG), das nach elektrophoretischen Untersuchungen normalerweise 70–80% des Gesamt- T_4 mit einer hohen Assoziationskonstante von etwa 10^{-10} L/M bindet. Während das Thyroxin-bindende Präalbumin (TBPA) immerhin noch 15% des T_4 mit ca. 10^{-8} L/M bindet, hat die Bindung des T_4 an Albumin (TBA) normalerweise keine große Bedeutung [15, 34]. Die Serumkonzentrationen von TBG wurden bisher überwiegend indirekt mit Hilfe des T_3 -in vitro-Test, der T_4 -Bindungskapazität des Serums oder neuerdings des kompetitiven Radioligandenassays abgeschätzt [7, 19, 31, 33]. Zur näheren Untersuchung der biologischen Bedeutung des TBG und zur quantitativen Überprüfung der mit indirekten Verfahren gewonnenen Kenntnisse über die Beziehung zwischen Gesamtschilddrüsenhormon- und

TBG-Spiegeln mußte zunächst eine spezifische, direkte Bestimmungsmethode für TBG aufgebaut werden. Die Schwierigkeiten liegen hierbei vorwiegend in der Isolierung von reinen TBG-Präparationen, die bisher noch nicht zur Verfügung stehen.

5.1. Präparation und Radioimmunoassay von TBG

Basierend auf den Verfahren von Marshall [25, 28] und Cavalieri [4] wurde für die erste Anreicherung des TBG aus Humanplasma eine Affinitätschromatographie mit T_3 -Sephadex eingesetzt. Dazu wurde an Sephadex über „six carbon long spacer“-Gruppen nach Bromcyanaktivierung kovalent T_3 gekoppelt. Beide Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 werden spezifisch an das TBG gebunden. Wir gaben für die Affinitätschromatographie dem T_3 den Vorzug, da die Assoziationskonstante von T_3 für die Bindung an TBG mit $2 \times 10^{-9} \text{ L/M}$ um eine Zehnerpotenz niedriger liegt als die des T_4 und daher die nachfolgende Elution des extrahierten TBG unter schonenderen Bedingungen ohne Einsatz von verdünnter Kalilauge möglich war. Zusätzlich zu der von anderen Autoren ebenfalls eingesetzten Anionenaustauschchromatographie auf DEAE- und QAE-Sephadex A-50 wurde von uns zur weiteren Reinigung des TBG die Affinitätschromatographie auf Con A-Sephadex eingeführt. Der besondere Vorzug dieses Schrittes ist die quantitative Extraktion und Konzentrierung von Glykoproteinen auf kleinen Säulen, während andere Proteine, vor allem Albumine, eluiert werden. Die Adsorptionschromatographie auf Hydroxylapatit zeigte sich bei unseren Untersuchungen zur Abtrennung des TBG von anderen Proteinen ebenfalls als geeignet. Nachgeschaltet an die vorausgegangenen Chromatographien brachte diese jedoch bei der erzielten Reinheit der TBG-Präparation keine weitere Anreicherung des TBG mehr.

Die Wiederfindung über alle Präparationsschritte war mit 20% im Vergleich zu anderen Autoren sehr zufriedenstellend. Als ein Kriterium für die Reinheit der Präparation wanderte TBG bei der Disc-Elektrophorese in 3 verschiedenen Acrylamidkonzentrationen mit 2 verschiedenen pH-Werten jeweils in einer homogenen Bande. Ferner berechnete sich beim Scatchard-Plot eine steile Regressionsgerade, die Bindung von T_4 oder T_3 war bei Annahme eines Molekulargewichtes des TBG von 57000 [11] äquimolar. Mit Hilfe des isoelectric focusing fanden sich drei scharfe Banden im Bereich von pH 4,0–4,5. Dieser Befund zeigt in unserer Präparation eine geringere Mikroheterogenität, als die bisher [26] beschriebene (artefizielle?). Zur Frage einer chemischen Mikroheterogenität sind allerdings noch weitere Untersuchungen des Protein- und des Zuckergehalts erforderlich [26].

Die quantitative Aminosäureanalyse von 2 verschiedenen Präparationen war nahezu identisch, der Tyrosinanteil lag bei 3,7% (Tabelle 2). Eine schonende Markierung des TBG mit ^{125}I bereitete daher keine Schwierigkeiten, die Reaktionszeit mit Chloramin-T konnte mit 5 s extrem kurz gehalten werden. Nach einer einzigen Affinitätschromatographie des gewonnenen Tracers über 1 ml Con A-Sephadex war die maximale Tracerbindung des TBG-Antiserums von über 90% sehr zufriedenstellend. Eine weitere chromatographische Reinigung des Tracers, die nach anderen Autoren unerlässlich ist [11, 18], war bei uns nicht erforderlich. Dieses TBG-Radioimmunoassay-System zeigte eine gute Präzision von Tag zu Tag mit einem Variationskoeffizienten von 4,3%. Die Serumverdünnungskurven auch von Probanden mit quantitativen TBG-Varianten lagen sämtlich auf der Kalibrierstandardkurve, Hinweise auf eine Immunoheterogenität von TBG ergaben sich somit nicht. Bei der Ermittlung des Normalbereiches für TBG, der bei uns zwischen 15,0 und 31,0 mg/l lag, fand sich eine sehr gute Übereinstimmung mit anderen Autoren [6, 11, 22, 31].

5.2. Klinisch-diagnostische Ergebnisse der TBG-Bestimmung

Im Vordergrund der klinischen Untersuchungen stand die Bedeutung der TBG-Bestimmung in der Schilddrüsenfunktionsdiagnostik in physiologischen und pathologischen Situationen, da Änderungen der Schilddrüsenhormonspiegel im Serum entweder auf einer Änderung der Schilddrüsenfunktion oder auf einer Änderung der TBG-Spiegel selbst beruhen können.

Altersabhängigkeit

Eine zweigipflige Altersabhängigkeit der Serumkonzentrationen von TBG, die bereits mit Hilfe von indirekten Methoden aufgedeckt worden war [3], konnte von uns bestätigt werden: Die höchsten TBG-Spiegel fanden wir in der postnatalen Lebensphase bis zur vierten Woche. Sie fielen bis zum 15. Lebensjahr kontinuierlich ab, blieben im Erwachsenenalter zwischen 16 und 49 Jahren auf dem Niveau und stiegen mit zunehmendem Alter wieder kontinuierlich an (Abb. 6). Im Gegensatz zu anderen Autoren [18] konnten wir bei Kontrollpersonen eine zum TBG parallele Altersabhängigkeit der T_4 -Spiegel nachweisen. Aus diesem Befund müßte die Forderung abgeleitet werden, daß für die verschiedenen Altersgruppen jeweils eigene Normalbereiche nicht nur für das Gesamt- T_4 , sondern auch für den Index der freien Schilddrüsenhormone zu erstellen sind (Tabelle 3).

Diese diagnostische Schwierigkeit läßt sich mit Hilfe der TBG-Bestimmung umgehen: Zwischen T_4 und TBG besteht eine altersunabhängig signifikante Korrelation ($r=0,574$, $p<0,001$); der T_4 /TBG-Quotient ist daher bei den Kontrollpersonen praktisch altersunabhängig konstant und beträgt im Mittel $3,2 \pm 0,7$ ($\bar{x} \pm s$). Ausgenommen werden müssen natürlich die Neugeborenen, bei denen wegen des bekannten postnatalen TSH-induzierten T_4 -Anstiegs die T_4 /TBG-Quotienten erhöht sind.

Einfluß von Oestrogen

Der Einfluß von Oestrogen auf die TBG-Spiegel ist aus zahlreichen Untersuchungen hinreichend bekannt. Bei Kontrollpersonen fanden wir für die TBG-Konzentrationen im Serum auffälligerweise keine Geschlechtsunterschiede, selbst nicht im generationsfähigen Alter. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit dem bekanntlich fehlenden Geschlechtsunterschied der Gesamtschilddrüsenhormonspiegel. Im Verlauf der Gravidität stiegen die TBG-Spiegel erwartungsgemäß an und zwar bereits signifikant nach der 8. Schwangerschaftswoche; schon zu Beginn des 3. Trimenon wurde ein Plateau erreicht. Unter

Oestrogenbehandlung war der TBG-Anstieg deutlich geringer als in der Schwangerschaft, allerdings wurde die unterschiedliche Oestrogenwirksamkeit der verschiedenen Präparate nicht berücksichtigt. Auch bei Männern konnte die Induzierbarkeit eines TBG-Anstiegs durch Oestrogene gemessen werden: Unter der Behandlung mit Fosfestrol (Honvan®) wegen eines Prostatacarcinoms erreichten die TBG-Spiegel im Mittel Werte der gleichen Größenordnung wie bei Oestrogen-behandelten Frauen. Auch der Anstieg des TBG unter Oestrogentherapie läßt somit quantitativ keinen Geschlechtsunterschied erkennen. Die kurzfristigen endogenen Schwankungen der Oestrogenspiegel im Menstruationszyklus ließen dagegen keinen Einfluß auf die TBG-Spiegel erkennen. Somit scheiden zyklische Anstiege des TBG mit intermittierendem Absinken der freien Schilddrüsenhormone als Erklärung für die deutlich größere Strumahäufigkeit der Frauen aus.

Die TBG-Konzentrationen im Serum sind aber nicht nur durch eine vermehrte, sondern auch durch eine verminderte Oestrogenwirkung manipulierbar: Die Substanz Danazol, ein Derivat des 17- α -Äthinyl-Testosterons, führt bei Frauen morphologisch zu den Zeichen eines Oestrogenmangels am Endometrium [1], es supprimiert als antigonadotrope Substanz die LH- und FSH-Sekretion [12, 13, 32] und führt zu einem Abfall der endogenen Oestrogenspiegel [35]. Jetzt konnten wir bei 7 Patientinnen einen Abfall der TBG-Spiegel – im Mittel auf etwa die Hälfte der Ausgangswerte nach einer vierwöchentlichen Behandlungsdauer mit 400 mg Danazol täglich – nachweisen. Dieser Abfall der TBG-Spiegel muß als indirekter Effekt des Danazols über eine Senkung der endogenen Oestrogenspiegel gedeutet werden. Interessant wäre noch der Einfluß von Danazol auf die TBG-Spiegel bei männlichen Kontrollpersonen; von derartigen Untersuchungen wurde jedoch Abstand genommen, da sich die möglichen Nebenwirkungen dieser Therapie z.B. auf die Fertilität derzeit noch nicht sicher abschätzen lassen.

Im Hinblick auf diese Manipulierbarkeit der TBG-Spiegel mit einem Anstieg unter vermehrter Oestrogenwirkung und einem Abfall bei artifizieller Senkung der Oestrogenwirkung überrascht sowohl der fehlende Geschlechtsunterschied in der Höhe der TBG-Spiegel als auch der Anstieg des TBG im Alter, z.B. in der Postmenopause. Neben einem eindeutigen Oestrogeneffekt müssen somit weitere regulierende Faktoren für die TBG-Spiegel angenommen werden.

TBG-Spiegel bei Schilddrüsenfunktionsstörungen

Nach früheren Untersuchungen mit indirekten Verfahren zur Bestimmung des TBG, – mit der maximalen Bindungskapazität des Serums für T_4 [3] und auch

mit dem kompetitiven Radioligandenassay [7, 31] – wurden für die Hyperthyreose niedrige und für die Hypothyreose höhere TBG-Spiegel im Vergleich zu Normalpersonen angenommen. Eine regulatorische Beziehung zwischen T_3 und TBG wurde diskutiert [5, 17]. Mit der direkten radioimmunologischen TBG-Bestimmung, die unabhängig vom endogenen Schilddrüsenhormongehalt des Serums ist, fanden wir in Übereinstimmung mit anderen Autoren [22] keine überzeugenden Unterschiede der TBG-Spiegel in Abhängigkeit von der Schilddrüsenfunktion, auch nicht bei direktem Vergleich zwischen Hypothyreose und Hyperthyreose. Die veränderten Ergebnisse der T_3 -Bindungstests bei diesen Patienten müssen auf die bekannte Abhängigkeit dieser Tests von der endogenen T_4 -Konzentration bezogen werden: Die Bindung des in vitro zugegebenen T_3 -Tracers in Serumproben wird zwar durch die Höhe der TBG-Spiegel bestimmt, aber darüber hinaus auch durch die endogene Beladung dieses TBG mit T_4 erheblich beeinflusst.

Das Prinzip des Radioligandenassays für TBG ist die Konkurrenz zwischen den endogenen Transportproteinen im Serum und in vitro zugesetztem T_3 -Antikörper um exogenen T_3 -Tracer. Voraussetzung für die exakte Abschätzung der TBG-Spiegel mit dieser Methode ist daher die quantitative Extraktion des endogenen Schilddrüsenhormons aus dem Serum. Die diskrepanten Befunde des Radioligandenassay zum Radioimmunoassay bei Schilddrüsenfunktionsstörungen müssen wohl auf eine quantitativ nicht ausreichende Extraktion von T_4 bezogen werden, da einerseits Bindungsstellen des TBG blockiert bleiben und andererseits das T_4 nicht mit einem T_3 -Antiserum kreuzreagiert. Nach ersten Beobachtungen ist es allerdings möglich, daß bei längerem Verlauf einer schweren Hyperthyreose die TBG-Spiegel auf Grund einer verminderten Syntheseleistung der Leber oder eines erhöhten Eiweißkatabolismus absinken können.

Diagnostische Relevanz des T_4 /TBG-Quotienten

Die Notwendigkeit, zusätzlich zur Bestimmung der Gesamthormonspiegel prinzipiell einen Bindungstest in der Schilddrüsenfunktionsanalytik durchzuführen, ist allgemein unbestritten. Der erste Vorteil des TBG-Radioimmunoassay gegenüber den bisher gebräuchlichen Bindungstests liegt in der besseren Standardisierung und der Möglichkeit der Automatisierung. Der zweite wesentliche Vorteil ist die Spezifität des Radioimmunoassay gegenüber den bisher üblichen indirekten Verfahren: Die Ergebnisse werden nicht durch die Änderungen der endogenen Schilddrüsenhormone beeinflusst. Änderungen der Gesamt- T_4 -Spiegel auf Grund veränderter TBG-Spiegel können durch die Berechnung des T_4 /TBG-Quotienten erkannt werden. In welchem Ausmaß medikamentös

(z.B. Diphenylhydantoin) oder Stoffwechsel-bedingte (Fasten) Änderungen der Bindung von Schilddrüsenhormonen an die Transportproteine, die am T_3 -in vitro-Test erkennbar sind, zu einer Änderung des T_4 /TBG-Quotienten führen, muß durch vergleichende Untersuchungen weiter geprüft werden.

Die diagnostische Bedeutung des T_4 /TBG-Quotienten wurde am Beispiel der Altersabhängigkeit der Normalbereiche von T_4 und TBG, am Oestrogeneinfluß und bei anderen quantitativen TBG-Varianten aufgezeigt (Tabellen 3 und 4). Bei Patienten mit blander Struma und besonders bei TBG-Mangel täuschte der Index der freien Schilddrüsenhormone als Produkt von Gesamt- T_4 -Spiegel und T_3 -in vitro-Test einen peripheren Schilddrüsenhormonmangel vor. Der T_4 /TBG-Quotient dagegen zeigt eine gute Übereinstimmung mit den klinischen Befunden und der TSH-Bestimmung (vgl. [16, 29, 30]).

Auf Grund der hier aufgezeigten Spezifität, Standardisierbarkeit und der Möglichkeit zur Automatisierung ist der TBG-Radioimmunoassay den bisher eingesetzten Bindungstests überlegen und dürfte diese in der Schilddrüsenlaboratoriumsdiagnostik in absehbarer Zeit weitgehend ablösen.

Literatur

1. Andrews, M.C., Wentz, A.C.: The effects of Danazol on gonadotropins and steroid blood levels in normal and anovulatory women. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **121**, 817 (1975)
2. Bode, H.H., Rothman, K.J., Danon, M.: Linkage of thyroxine-binding globulin deficiency to other X-chromosome loci. *J. clin. Endocrinol. Metab.* **37**, 25 (1973)
3. Braverman, L.E., Dawber, N.A., Ingbar, S.H.: Observations concerning the binding of thyroid hormones in sera of normal subjects of varying ages. *J. clin. Invest.* **45**, 1273 (1966)
4. Chavalieri, R.R., McMahon, F.A., Castle, J.N.: Preparation of ^{125}I -labeled human thyroxine-binding alpha globulin and its turnover in normal and hypothyroid subjects. *J. clin. Invest.* **56**, 79 (1975)
5. Camus, M.M., Ermans, A.M.: Interaction of plasma T_3 and TBG as a possible control mechanism of thyroid hormonal activity at the peripheral level. *Excerpta Medica*, 7th International Thyroid Conference, Boston 1975, Abstract No. 149
6. Castro, A., Ugarte, E.: Human thyroxine-binding globulin (TBG) solid phase radioimmunoassay. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* **7**, 453 (1974)
7. Chopra, I.J., Solomon, D.H., Ho, R.S.: Competitive ligand-binding-assay for measurement of thyronine-binding globulin (TBG). *J. clin. Endocrinol. Metab.* **35**, 565 (1972)
8. Cuatrecasas, P.: Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J. biol. Chem.* **245**, 3059 (1970)
9. Desbuquois, B., Aurbach, G.D.: Use of polyethylen glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. clin. Endocrinol. Metab.* **33**, 732 (1971)
10. Feldman, H., Rodbard, D.: Mathematical theory of radioimmunoassay. In: Odell, W.D., and W.H. Daughaday (eds.): *Principles of Competitive Protein-binding Assays*. J.B. Lippincott Comp., Philadelphia 1971, p. 158

11. Gershengorn, M.C., Larsen, P.R., Robbins, J.: Radioimmunoassay for serum thyroxine-binding globulin: results in normal subjects and in patients with hepatocellular carcinoma. *J. clin. Endocrinol. Metab.* **42**, 907 (1976)
12. Greenblatt, R.B., Dmowski, W.P., Mahesh, V.B., Scholer, H.F.L.: Clinical studies with an antigonadotropin Danazol. *Fertil. Steril.* **22**, 102 (1971)
13. Greenblatt, R.B., Borenstein, R., Hernandez-Ayup, S.: Experiences with Danazol (an antigonadotropin) in the treatment of infertility. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **118**, 783 (1974)
14. Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.: The preparation of ^{131}I -labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89**, 114 (1963)
15. Hamada, S., Nakagawa, T., Mori, T., Torizuka, K.: Re-evaluation of thyroxine binding and free thyroxine in human serum by paper electrophoresis and equilibrium dialysis, and a new free thyroxine index. *J. clin. Endocrinol. Metab.* **31**, 166 (1970)
16. Hansen, E., Kirkegaard, C., Truc, T., Siersback-Nielsen, K.: Normal response to thyrotrophin releasing hormone (TRH) in familial thyroxine-binding globulin deficiency. *Acta endocrin. (Kbh.)* **80**, 297 (1975)
17. Harvey, R.F., Williams, E.S., Ellis, S., Ekins, R.P.: Changes in thyroxine-binding globulin levels in thyrotoxicosis and in healthy subjects after triiodothyronine administration. *Acta endocrin. (Kbh.)* **63**, 527 (1970)
18. Hesch, R.-D., Gatz, J., Pape, J., Schmidt, E., von zur Mühlen, A.: Total and free triiodothyronine and thyroid binding globulin concentration in elderly human persons. *Europ. J. clin. Invest.* **6**, 139 (1976)
19. Horn, K., Henner, J., Müller, O.A., Scriba, P.C.: Mechanisierte Hormon-Analytik mittels simultaner Säulenchromatographie. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **13**, 173 (1975)
20. Horn, K.: Trijodthyronin (T_3). Zur Bestimmung und pathophysiologischen Bedeutung. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1976
21. Leiba, S., Landau, B., Ber, A., Adam, A., Sterling, K.: Thyroxine-binding globulin (TBG). Deficiency and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency in the same family. *J. clin. Endocrinol. Metab.* **38**, 569 (1974)
22. Levy, P., Marshall, J.S., Velayo, N.L.: Radioimmunoassay of human thyroxine-binding globulin (TBG). *J. clin. Endocrinol. Metab.* **32**, 372 (1971)
23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.R., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
24. Marschner, I., Dobry, H., Erhardt, F., Landersdorfer, T., Popp, B., Ringel, C., Scriba, P.C.: Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels Spline-Funktionen. *Ärztl. Lab.* **20**, 184 (1974)
25. Marshall, J.S., Pensky, J.: Studies on human thyroxine-binding globulin (TBG). I. Purification of TBG and immunologic studies on the relationship between TBG from normal persons and those with TBG "deficiency". *J. clin. Invest.* **48**, 508 (1969)
26. Marshall, J.S., Pensky, J., Williams, St.: Studies on human thyroxine binding globulin. VIII. Isoelectric focusing evidence for microheterogeneity of thyroxine-binding globulin. *Arch. Biochem. Biophys.* **156**, 456 (1973)
27. Maurer, H.R.: Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. De Gruyter Verlag, Berlin-New York 1971
28. Pensky, J., Marshall, J.S.: Studies on thyroxine-binding globulin (TBG). II. Separation from human serum by affinity chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.* **135**, 304 (1969)
29. Premachandra, B.N., Gossain, V.V., Perlstein, I.B.: Increased free thyroxine in an euthyroid patient with thyroxine-binding globulin deficiency. *J. clin. Endocrinol. Metab.* **42**, 309 (1976)
30. Rosenbaum, J.M., Krieg, A.F., Henry, J.B., Mozley, J.M., McAffe, J.G.: Thyroid function evaluation in patients with increased or decreased thyroxine-binding protein. *Amer. J. clin. Path.* **50**, 336 (1968)
31. Rudorff, K.H., Herrmann, J., Kröll, H.J., Kruskemper, H.L.: Bestimmung des Thyroxin-bindenden Globulins (TBG) mit Hilfe des competitive ligand-binding assay (CLBA): Methodik und Ergebnisse. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **14**, 31 (1976)
32. Sherins, R.J., Gandy, H.M., Thorslund, T.W., Paulsen, C.A.: Pituitary and testicular function studies. I. Experience with a new gonadal inhibitor, 17α -Pregn-4-en-20-yno-(2,3-d) (isoxazol-17-ol (Danazol)). *J. clin. Endocr.* **32**, 522 (1971)
33. Tanaka, S., Starr, P.: Clinical observations on serum globulin thyroxine-binding capacity, using a simplified technique. *J. clin. Endocr.* **19**, 84 (1959)
34. Woeber, K.A., Ingbar, S.H.: The interactions of the thyroid hormones with binding proteins. In: Greer, M.A., and Solomon, D.H.: *Thyroid, Handbook of Physiology*. Washington, American Physiological Society, 1973.
35. Wood, G.P., Wu, C.H., Flickinger, G.L., Mikhall, G.: Hormonal changes associated with Danazol therapy. *Obstet. Gynec.* **45**, 302 (1975)

PD Dr. med. Klaus Horn
 Medizinische Klinik Innenstadt der Universität
 Ziemssenstraße 1
 D-8000 München 2
 Bundesrepublik Deutschland