

Christine Albert
Dr. med.

Entwicklung eines immunoluminometrischen Assays für oxidiertes Human-PTH

Geboren am 19.05.1976 in Aachen
Reifeprüfung am 16.06.1995
Studiengang der Medizin vom WS 1995/96 bis WS 2001/02
Physikum am 16.09.1997 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg, Ludwigshafen, USA
Staatsexamen am 23.10.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Heinrich Schmidt-Gayk

Das Parathormon ist der wichtigste Regulator der Kalzium- und Phosphathomöostase. Zahlreiche, nicht aktive Fragmente des PTH in der Zirkulation erschwerten die Messung und verminderten die diagnostische Aussagekraft des PTH-Wertes. Erst die Einführung der PTH-intakt-Assays ermöglichte durch die Verwendung von 2 Antikörpern hauptsächlich das vollständige Molekül zu erkennen. Jedoch werden besonders bei dialysepflichtigen Patienten mit sekundärem HPT die Messwerte durch ein bisher unbekanntes Molekül, nonPTH(1-84), verzerrt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob es sich bei nonPTH (1-84) um PTH handelt, das an den Methioninen (Position 8 und 18 in der Aminosäurekette) oxidiert ist ([met]-O-PTH). Dazu habe ich zunächst ein Messverfahren für [met]-O-PTH entwickelt. Basierend auf dem vormals in der Routine eingesetzten ILMA für PTH intakt wurden durch schrittweise Veränderung die geeigneten Antikörper und die optimalen Inkubationsbedingungen ermittelt. Darüber hinaus wurden die besten Voraussetzungen für Lagerung und Verwendung der Assaybestandteile bestimmt und die Qualität des Assays überprüft. Im Anschluss wurden die Proben verschiedener Patientenkollektive im Assay gemessen. Ein von der Arbeitsgruppe um Logue 1991 entwickelter, monoklonaler Antikörper (3B3), der hauptsächlich oxidiertes PTH (1-84) erkennt, ergab als Tracer die besten Ergebnisse. Für die Festphase wurde der monoklonale Antikörper D 1.1 der Firma Immundiagnostik verwendet. Bei dem Assay-Protokoll wurden 200 µl Standard bzw. Patientenprobe und 50 µl Puffer (PPNE 2% BSA) über Nacht bei 4 °C mit der Festphase (Polystyrolkugel) inkubiert. Darauf wurden die Kugeln mit aqua dest. gewaschen und mit 250 µl Tracer erneut für 8 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte die Messung im Luminometer. Die Überprüfung der Testqualität ergab für die untere Nachweisgrenze einen Wert von 0,459 pmol/l. Bei Konzentrationen unter 20 pmol/l zeigte sich eine gute Linearität des Assays mit einem Bestimmtheitsmaß, das nahe 1 lag. Bei der Erfassung der Präzision wurden sowohl für Standards, als auch Patienten Variationskoeffizienten von unter oder nur knapp über 10 % ermittelt. Damit ist eine hohe Reproduzierbarkeit gegeben. Die Testung der Recovery ergab eine Wiederfindung von 92 bis 149 % bei Zugabe von

Patientenplasma zu den Standards. Für die Kreuz-reaktivität wurden bei nicht oxidiertem PTH (1-84) Werte zwischen 10-16 %, für PTH (7-84) ca. 10 % ermittelt. Da ich den Oxidations-status dieser Peptide jedoch nicht überprüfen konnte, ist die Aussagekraft der Werte eingeschränkt. Der Referenzbereich des vorliegenden Assays lag unterhalb der Nachweis-grenze. Für das untersuchte Kollektiv von dialysepflichtigen Patienten mit sHPT ergab sich durchschnittlich ein Anteil von 3,7 % [met]-O-PTH verglichen mit dem Wert für PTH intakt (Roche Elecsys). Im Einzelfall fiel dieser Anteil jedoch sehr unterschiedlich aus. Die Korrelation dieser beiden Werte war daher gering, das Bestimmtheitsmaß bei 0,368. Oxidiertes PTH scheint nur einen kleinen Anteil am gemessenen PTH intakt bei Dialysepatienten auszumachen, in Einzelfällen nur 1 %. Interessant wäre, in Zukunft die Proben von Dialysepatienten in einer HPLC zu fraktionieren und die Fraktion des nonPTH (1-84) in diesem Assay zu messen. Eine Untersuchung an Patienten mit chirurgisch gesichertem, primärem HPT, deren Proben 13 Jahre gelagert wurden, bestätigte eine zunehmende Oxidation des PTH durch Lagerung. Individuell war dieser Anteil sehr unterschiedlich, allerdings korrelierten die [met]-O-PTH-Werte hier mit den Ergebnissen für PTH intakt. Das Bestimmtheitsmaß lag bei 0,95 und 0,68.