

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier)

**Aufbau und Evaluierung eines Chemilumineszenz-Immunoassays zur
Bestimmung von 17α -Hydroxyprogesteron im Serum mittels eines
 7α -biotinylierten 17α -Hydroxyprogesteron-Tracers**

Verena Petzold

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Privatdozent Dr. P.B. Lupp
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch - Schmidtke

Die Dissertation wurde am 27.06.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.12.2000 angenommen.

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Grundlagen der Immunoassay-Techniken

1.2. Das Biotin-(Strept-)Avidin-System

1.3. Chemilumineszenz als Detektionssystem

1.4. Steroidhormone

1.5. 17α -Hydroxyprogesteron

1.6. Das Adrenogenitale Syndrom

2. Problemstellung

2.1. Konzept für einen kompetitiven 17α -Hydroxyprogesteron-Immunoassay

2.2. Evaluierung des 17OHP -Chemilumineszenz-Immunoassays

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Steroide

3.1.2. Antikörper

3.1.3. Peroxidase

3.1.4. Tracer

3.1.5. Chemikalien

3.1.6. 17α -Hydroxyprogesteron-Standards

3.1.7. Serumproben

3.1.8. Geräte

3.1.9. Sonstiges Zubehör

3.1.10. Beschichtung der Testwells

3.2. Methoden

3.2.1. Vorversuche

3.2.1.1. Antikörperbindungsversuche

3.2.1.2. Verdrängungsversuche

3.2.2. Adaptation an das Mikrotiterplatten-System

3.2.2.1. Antikörper- und Tracerverdünnung

3.2.2.2. Serumvorbehandlung

- 3.2.2.3. Herstellung der 17OHP-Standards
 - 3.2.3. Evaluierung des Chemilumineszenz-Immunoassays
 - 3.2.3.1. Präzision
 - 3.2.3.2. Analytische Sensitivität
 - 3.2.3.2.1. Untere Nachweisgrenze
 - 3.2.3.2.2. Untere Diskriminationsfähigkeit des Assays
 - 3.2.3.3. Richtigkeit
 - 3.2.3.3.1. Linearität
 - 3.2.3.3.2. Wiederfindung nach Aufstockung
 - 3.2.3.3.3. Messung von Proben mit bekanntem 17OHP-Gehalt
 - 3.2.3.3.4. Messung von Ringversuchseren
 - 3.2.3.4. Spezifität
 - 3.2.4. 17OHP-Messungen mit dem Chemilumineszenz-Immunoassay
 - 3.2.4.1. Methodenbezogener Referenzbereich
 - 3.2.4.2. Messung von 17OHP in Serumproben von Kindern mit Adrenogenitalem Syndrom
 - 3.2.4.3. Methodenvergleiche
 - 3.2.5. Statistische Methoden
- 4. Ergebnisse
 - 4.1. Vorversuche
 - 4.2. Optimierung der Bedingungen für das Mikrotiterplatten-System
 - 4.2.1. Serumvorbehandlung
 - 4.2.2. Assayprotokoll
 - 4.2.3. Korrekturfaktor für die 17OHP-Standards
 - 4.2.4. Standardkurve des 17OHP Chemilumineszenz-Immunoassays
 - 4.3. Evaluierung des Chemilumineszenz-Immunoassays
 - 4.3.1. Präzision
 - 4.3.2. Analytische Sensitivität
 - 4.3.2.1. Untere Nachweisgrenze
 - 4.3.2.2. Untere Diskriminationsfähigkeit des Assays
 - 4.3.3. Richtigkeit
 - 4.3.3.1. Linearität
 - 4.3.3.2. Wiederfindung nach Aufstockung
 - 4.3.3.3. Messung von Proben mit bekanntem 17OHP-Gehalt

4.3.3.4. Messung von Ringversuchseren

4.3.4. Spezifität

4.3.4.1. Kreuzreaktivität

4.4. 17OHP-Messungen mit dem Chemilumineszenz-Immunoassay

4.4.1. Methodenbezogener Referenzbereich

4.4.2. Messung von klinischen Proben

4.4.3. Methodenvergleich mit einem Radioimmunoassay

4.4.4. Methodenvergleich mit einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

8. Anhang

8.1. Lebenslauf

8.2. Danksagung

8.3. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ag	Antigen
AGS	Adrenogenitales Syndrom
AK	Antikörper
%B	Bindungsprozentwert
7 α -Bio-17OHP	17 α -hydroxy-pregn-4-en-3-on-7 α (Biotinyl-6- <i>N</i> -undecylamid)
BrMg(CH ₂) ₁₁ OTBDMS	Undecanol-1-Magnesium-bromid-11-t-Butyl-Dimethyl-silyl-ether
BSA	Bovines Serumalbumin
CBG	Corticosteroid-binding globulin
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CLEIA	Chemilumineszenz Enzym Immunoassay
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
CYP21	Genlokus für das 21-Hydroxylase Gen
CYP21P	Pseudogen für 21-Hydroxylase
DGKC	Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
³ H-17OHP	Tritium-markiertes 17 α -Hydroxyprogesteron
IA	Immunoassay
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
LDP	Untere Diskriminationsfähigkeit (<i>low discriminatory power</i>)
MeOH	Methanol
Mg	Magnesium
MS	Massenspektrometrie
MG	Molekulargewicht
MW	Mittelwert
NSB	Nicht-spezifische Bindung
17OHP	17 α -Hydroxyprogesteron

PBS	Phosphate buffered saline
PCOS	Syndrom der polyzystischen Ovarien (<i>polycystic ovary syndrome</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
R	Wiederfindung (<i>recovery</i>)
RV	Ringversuch
rel %B	Relativer Bindungsprozentwert
RIA	Radioimmunoassay
RLU	Relative <i>light units</i>
sAv/7 α -C ₁₁ -Bio-T	7 α -C ₁₁ -biotinyliertes Testosteron gebunden an Streptavidin
sAv-HRP	Streptavidin gekoppelt an Meerrettichperoxidase
SD	Standardabweichung (<i>standard derivation</i>)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFS	Steroidfreies Serum
SHBG	Sex hormone-binding globulin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
THF	Tetrahydrofuran
VK	Variationskoeffizient

1. Einleitung

1.1. Grundlagen der Immunoassay-Techniken

Das Prinzip des Immunoassays beruht auf der spezifischen Bindung des Analyten an einen Antikörper und dem quantitativen Nachweis des gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexes.

Der erste Immunoassay wurde 1959 von YALOW und BERSON [89, S.1157-75] entwickelt. Es handelte sich dabei um einen Radioimmunoassay (RIA) zur Messung von Insulin im Serum. Dieses neue analytische Prinzip machte es möglich, Substanzen in geringsten Mengen exakt, schnell und kostengünstig zu bestimmen. Von diesem Zeitpunkt an wurden viele neue Assays in der Klinischen Chemie eingeführt [26, S.1408].

Zur Klassifizierung von Immunoassays gibt es neben der Einteilung nach ihrem Detektionsprinzip noch einige weitere Ansätze. Assay-Systeme, die eine Trennung von gebundenem und freiem Antigen erfordern, werden als heterogen bezeichnet; solche, die keinen Trennschritt benötigen, als homogen [57, S.895]. Außerdem werden Immunoassays in sechs Gruppen eingeteilt, wenn man den Aufbau des Antigen-Antikörper-Komplexes berücksichtigt (je nachdem, ob Antigen oder Antikörper im Überschuß vorliegt, und welcher Reaktionspartner an eine feste Phase gebunden ist). Ausführliche Übersichten wurden in den letzten Jahren publiziert [26, S.1409-12].

RIAs zur Bestimmung von Steroiden im Serum wurden erstmals 1969 veröffentlicht [2, S.262], nachdem ERLANGER *et al.* Ende der 50er Jahre die Konjugation von Steroiden mit bovinem Serumalbumin (BSA) zur Gewinnung von Anti-Steroid-Antikörpern beschrieben hatten [16, S.713-27; 17, S.1090-4]. Dies ist notwendig, da Steroide sehr kleine Moleküle darstellen, die selbst nicht immunogen wirken.

Aufgrund des gesundheitsgefährdenden Aspekts der Radioaktivität, der damit verbundenen zahlreichen Strahlenschutzvorschriften, der Kurzlebigkeit einiger radioaktiv markierter Substanzen, der Problematik der notwendigen Abfallbeseitigung und der damit verbundenen hohen Kosten wurde nach alternativen Markersubstanzen gesucht [26, S.1408]. Wichtige Qualitätsmerkmale bei der Entwicklung neuer Methoden sind Sensitivität und Spezifität. Beide müssen bei der Suche nach besser geeigneten Tracersubstanzen möglichst hoch sein und sollten, wenn möglich, die Sensitivität und Spezifität von Radioimmunoassays übertreffen [53, S.289; 62, S.1869-90].

1971 veröffentlichten ENGVALL und PERLMAN [15, S.871] ein neues Assayschema, das sie als *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bezeichneten. Anstelle von Radioisotopen

werden Enzyme zur Signalgenerierung eingesetzt. Enzymimmunoassays stellen heute die am weitesten verbreitete Methode aller nicht-radioaktiven Immunoassays bei der Bestimmung von Steroiden dar [53, S.298].

Weitere Detektionsmöglichkeiten sind Fluoreszenz und (Chemi-/Bio-) Lumineszenz. Abgesehen von der höheren Sensitivität im Vergleich zu ELISAs verfügen die Fluorometrie und die Luminometrie noch über die Fähigkeit, Konzentrationen über einen sehr weiten dynamischen Meßbereich zu bestimmen [53, S.300]. Durch Kombination amplifizierender Markersubstanzen (beispielsweise eines Enzyms) mit einer ultrasensitiven Detektionstechnik wurden einige sehr leistungsfähige Assaytechniken entwickelt [35, S.73-88; 47, S.140-8; 43, A113; 44, S.564-70]. Der verstärkte Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) mit einem Luminolderivat und Phenol-Enhancern, stellt den sensitivsten Assay für Meerrettichperoxidaseaktivität dar [37, S.327].

In den letzten Jahren bestimmten vor allem zwei Ziele die Weiterentwicklung der Immunoassay-Technologie: Automatisierung und Verbesserung der Assay-Performance [86, S.1137].

1.2. Das Biotin-(Strept-)Avidin-System

D(+)-Biotin, auch Vitamin H genannt, ist ein sehr kleines Molekül mit einem Molekulargewicht von 244,31 Da (Dalton). Im Organismus wird es als Co-Faktor carboxylierender Enzyme benötigt, so beispielsweise bei der Kondensation von Pyruvat und CO₂ zu Oxalacetat mittels der Pyruvatcarboxylase [10, S.627].

Avidin, ein 67 kDa Glykoprotein, besteht aus 4 identischen Untereinheiten mit jeweils 128 Aminosäuren und kommt im Hühnereiweiß vor. Streptavidin wird von *Streptomyces avidinii* gebildet und unterscheidet sich funktionell kaum vom Avidin. Beide binden mit sehr hoher Affinität an Biotin. Streptavidin wird häufig an Stelle von Avidin verwendet, da es beim Einsatz in heterogenen Immunoassays eine geringere nicht-spezifische Bindung aufweist [28, S.85-133; 25, S.291-4].

Die Bindung von (Strept-)Avidin zu Biotin ist hochspezifisch und sehr stark. Die Affinitätskonstante ist die höchste bekannte, nicht-kovalente Bindung und 10³-10⁶- fach höher als die Affinitätskonstanten von Antikörpern zu ihren jeweiligen spezifischen Liganden. Die Bindung ist daher auch unempfindlich gegenüber den verschiedensten physikochemischen Einflüssen wie extreme pH-Änderungen, Temperaturschwankungen, drastischen Änderungen der Ionenstärke z.B. bei Waschschrinen.

Ein weiterer Vorteil ist die Tatsache, daß Avidin und Streptavidin jeweils vier Bindungsstellen aufweisen. Da Biotin ein kleines Molekül ist, beeinträchtigt es auch nicht die biologische Aktivität der Makromoleküle, an die es für analytische Zwecke gekoppelt wird. Andererseits können sowohl Avidin als auch Streptavidin an andere Biomoleküle gekoppelt werden. Die Bindungseigenschaften zu Biotin werden durch die Derivatisierungs-Schritte nicht beeinträchtigt [10, S.625].

Diese Eigenschaften führen dazu, daß das Biotin-(Strept-)Avidin-System in der biochemischen Analytik vielfältige Einsatzmöglichkeiten findet. Neben seiner Bedeutung bei Immunoassays wird es auch für Nukleinsäurehybridisierungs-Techniken und zur Produktion von monoklonalen Antikörpern aus Hybridomazellen verwendet [73, S.80]. Das Biotin-Avidin-System wurde beispielsweise für DNA-Sequenzierungen, Zell-Hybridisierungen oder Immunoassays wie z. B für die Bestimmung von Angiotensin I verwendet [10, S.625-36; 32, S.445-453]. Neuerdings findet es auch Anwendung bei der Messung von Steroiden im Plasma [7, S.1161-6; 48, S.211-9; 44, S.564-70].

Eine neuere Anwendung in der Immunoassay-Technologie stellt die Koppelung von Streptavidin mit Meerrettichperoxidase (HRP) dar [7, S.1161-6; 48, S.211-9]. HRP katalysiert unter anderem die Oxidation von Luminolderivaten. Dabei wird Licht freigesetzt. Diese Chemilumineszenz kann man dann mit Hilfe eines Detektors messen.

1.3. Chemilumineszenz als Detektionssystem

Chemilumineszenz entsteht, wenn angeregte Moleküle in einen stabilen Zustand zurückkehren und die dabei freiwerdende Energie in Form von Licht aussenden. Die energetische Ausbeute ist jedoch sehr gering, sie liegt maximal bei 30 % [29, S.17-9]. Deshalb verwendet man Verstärker, wie z.B. p-Jodophenol, um die Signalausbeute zu verbessern [78, S.1335].

Licht kann dabei auf zweierlei Arten entstehen: durch einen Single-Elektron-Übertragungsprozeß, bei dem ein radikales Ionenpaar entsteht, und durch eine Energieübertragung durch Singulett-Sauerstoff [29, S.17-9].

Vorteilhafte analytisch nutzbare Eigenschaften der Chemilumineszenz sind, daß i) viele Analyten markiert werden können, ii) die Geschwindigkeit der Chemilumineszenzreaktion kontrolliert werden kann – im Gegensatz zur Radioaktivität, wo man immer abhängig von der Halbwertszeit der Radionuklide ist, und iii) mit Chemilumineszenz markierte Substanzen sehr stabil sind [87, S.907]. Für die Signalgenerierung bei Immunoassays bietet sie außerdem

die Vorteile hoher Sensitivität (es kann im günstigsten Fall bis in den attomolaren Bereich gemessen werden), Geschwindigkeit (Signalerzeugung innerhalb von Sekunden, die darüber hinaus häufig stundenlang anhält), Ungefährlichkeit der Substanzen und einfacher Handhabbarkeit [36, S.1472].

Als Nachteil der Chemilumineszenz kann man Matrixstöreffekte anführen, die dadurch entstehen, daß Serumkomponenten die Freisetzung von Licht bei der Chemilumineszenzreaktion löschen (Quensch-Effekt). Dieser Effekt läßt sich durch Verwendung eines Festphase-Immunoassays oder durch Extraktion der Serumproben minimieren [88, S.349-56; 35, S.73-88].

Verwendung finden vor allem Luminol (*Abb.1*), Isoluminol und Acridiniumester. Luminol wurde erstmals 1853 synthetisiert, seine chemilumineszierende Eigenschaft jedoch erst 1928 von ALBRECHT publiziert [4, S.321-30].

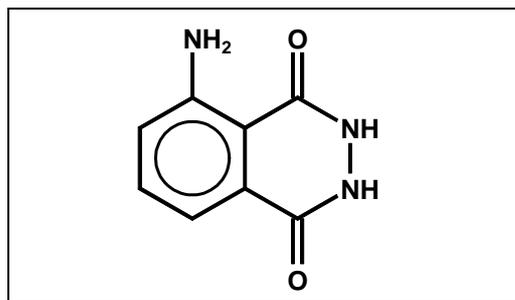


Abb.1: Strukturformel von Luminol

Eine große Vielfalt an Enzymen ist in der Lage, die Luminolreaktion zu katalysieren. Es handelt sich dabei um Cytochromoxidasen und Peroxidasen, wie z.B. die Meerrettichperoxidase [63, S.131-6]. Dieses System ist sehr sensitiv und die Lichtemission hält lange an, wenn man dabei verstärkende Substanzen (Enhancer), wie p-Jodophenol verwendet.

Die Reaktion wird durch folgende Gleichung beschrieben:



Die Intensität der Lichtemission wird dabei um einige Größenordnungen verstärkt und die Hintergrund-Lichtemission (blank) deutlich reduziert [36, S.1477].

Das ausgesandte Licht wird von einem Luminometer gemessen und in relative Lichteinheiten (RLUs) umgerechnet. Aus diesen kann die Konzentration des Analyten in der Serumprobe ermittelt werden. Die entstandene Lichtmenge ist dabei bei einem kompetitiven Immunoassay

der Menge des gebundenen Tracers proportional, also umgekehrt proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen Steroids.

Verstärkte Chemilumineszenz eignet sich gut für den Einsatz in vollautomatischen Immunoassay-Systemen, die ein wichtiges Kriterium für den Einsatz in einem klinisch-chemischen Routinelabor darstellen [77, S.100].

1.4. Steroidhormone

Steroide sind Hormone, d.h. sie beeinflussen als Signalmoleküle Richtung und Geschwindigkeit verschiedenster Stoffwechselwege durch Bindung an spezifische Rezeptoren in hormonabhängigen Geweben. Sie wirken bereits in geringsten Mengen (10^{-9} - 10^{-6} mol/l). Ihre Wirkung kommt durch Transkriptionsaktivierung spezifischer Gene zustande, die wiederum zu einer gesteigerten oder gehemmten Biosynthese eines bestimmten Proteins (Enzyms) oder einer Gruppe bestimmter Proteine (Enzyme) führen [39, S.644].

Beim Menschen spielen Steroide eine wichtige Rolle als Gluco- und Mineralocorticoide der Nebennierenrinde, als Geschlechtssteroid (Androgene, Estrogene, Gestagene) der Gonaden, als Gallensäuren und als D-Vitamine. Pharmakologisch interessante Pflanzensteroid sind z.B. das Herzglykosid Ouabain [41, S.63].

Gemeinsamer Vorläufer aller Steroide ist, wie aus *Abb.2* hervorgeht, das Cholesterin, das in allen Geweben des Säugers, außer im Gehirn, gebildet werden kann [81, S.24]. Die niedermolekulare Vorstufe des Cholesterins ist Acetat, welches als Acetyl-CoA in den Syntheseweg aufgenommen wird [81, S.13]. Am häufigsten wird jedoch das mit der Nahrung aufgenommene Cholesterin, welches zum überwiegenden Teil mit den *Low Density* Lipoproteinen (LDL) im Blut transportiert wird, zur Synthese der Steroide verwendet [50, S.721].

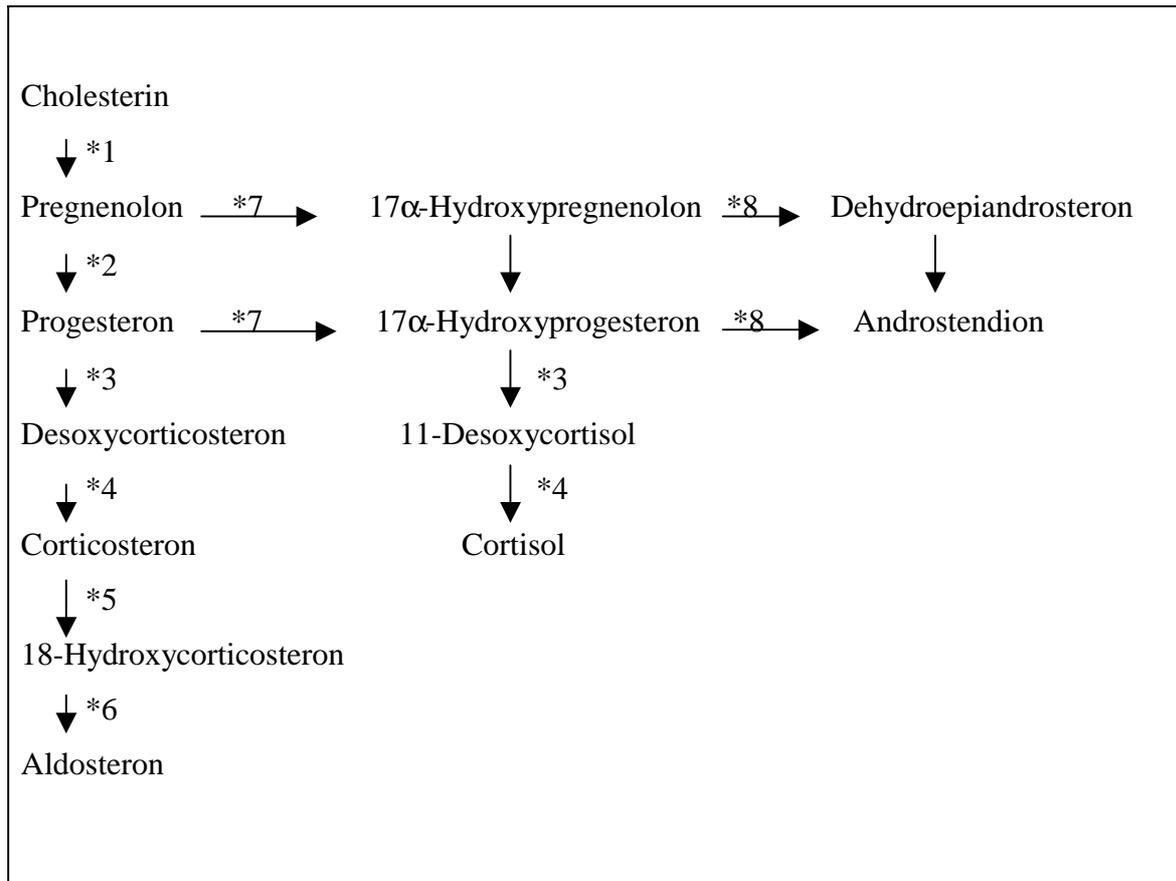


Abb. 2: Syntheseweg der Steroidhormone in der Nebennierenrinde

1= 20,22-Lyase (Desmolase); 2= 3 β -Hydroxydehydrogenase/ Isomerase; 3= 21-Hydroxylase;
 4= 11 β -Hydroxylase; 5= 18-Hydroxylase; 6= 18-Hydroxydehydrogenase; 7= 17-Hydroxylase;
 8= 17,20-Lyase (Desmolase)

Die meisten Enzyme, die an der Steroidsynthese beteiligt sind, gehören zur Gruppe der Cytochrom P450-Oxidoreductasen, so auch die 21-Steroid-Hydroxylase, die 17 α -Hydroxyprogesteron (17OHP) in 11-Desoxycortisol umwandelt. Ihren Namen verdanken die Cytochrom P450-Enzyme der Tatsache, daß sie Licht der Wellenlänge 450 nm absorbieren, wenn sie mit Kohlenmonoxid reduziert werden. Allen gemeinsam ist, daß sie eine prosthetische Eisengruppe enthalten [50, S.723].

Es gibt eine große Vielfalt an Steroidhormonen und deren Metaboliten, die alle dasselbe Grundgerüst, das Perhydrocyclopentanaphenantren (Gonan) (Abb.3), aufweisen.

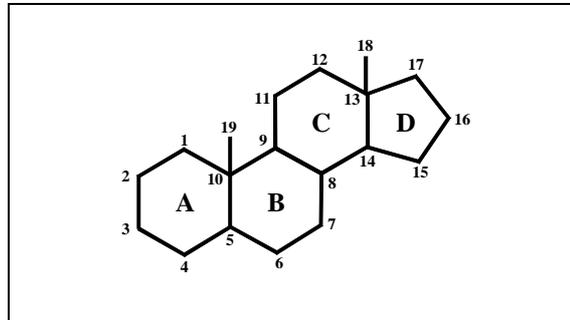


Abb.3: Steroidgrundgerüst und Bezeichnung der Kohlenstoffatome

Die C-Atome in Position 10 und 13 sind häufig methyliert. Charakteristisch für die einzelnen Steroidhormone sind Hydroxyl- und Ketogruppen an den Positionen 3, 11 und 17, Doppelbindungen an der Position 4 oder 5 (Δ^4 , Δ^5) sowie eine Seitenkette am C-Atom 17. Bei den Östrogenen ist der Ring A aromatisiert.

Die Steroidringe A-C liegen vorwiegend in der Sesselkonfiguration vor, da diese den energieärmeren und damit stabileren Zustand darstellt. Die nach oben aus der Zeichenebene herausragenden Liganden werden mit dem Buchstaben β , die unterhalb der Zeichenebene liegenden Reste mit α gekennzeichnet [81, S.4-12].

Steroide haben ein niedriges Molekulargewicht, und sind als solche nicht immunogen. Sie können jedoch als Hapten funktionieren, wenn sie an einen makromolekularen Träger, wie beispielsweise bovines Serumalbumin gebunden werden. Wenn dieselbe reaktive Gruppe für die Koppelung an BSA zu Immunisierungszwecken und für die Koppelung an eine Markersubstanz verwendet wird, spricht man von einem homologen System; verwendet man dabei unterschiedliche reaktive Gruppen, so spricht man von einem heterologen System [53, S.294-5].

Da Steroidhormone im Blut in nanomolaren Konzentrationen vorkommen, sind bereits kleinste Konzentrationsänderungen physiologisch relevant. Aus diesem Grund ist es wichtig, analytisch sensitive Methoden zu ihrer Bestimmung zu entwickeln, um diese geringen Konzentrationsunterschiede erfassen zu können. Eine besondere Bedeutung kommt der Bestimmung von Steroiden mittels Immunoassay bei endokrinen Erkrankungen, wie beispielsweise der Bestimmung von 17OHP beim Adrenogenitalen Syndrom, zu.

1.5. 17 α -Hydroxyprogesteron

17 α -Hydroxypregn-4en-3,20-dion (17 α -Hydroxyprogesteron/17OHP) (*Abb.4*), ein lipophiles Steroid, ist, wie aus *Abb.2* hervorgeht, als Intermediärprodukt eine direkte Vorstufe des Cortisols.

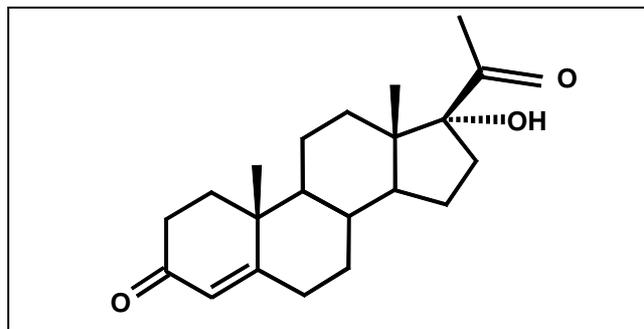


Abb. 4: 17 α -Hydroxyprogesteron

Nur ein geringer Teil des 17OHP zirkuliert frei im Blut. Bei Männern sind 55% an Albumin und 41% an Corticosteroid bindendes Globulin (CBG) gebunden [13, S.58-68]. Da zirkadian die Cortisol-Plasmaspiegel am Abend in nennenswertem Umfang absinken [66, S.439-43], stehen am CBG mehr Bindungsstellen zur Verfügung, wodurch die an CBG gebundene Fraktion des 17OHP an Bedeutung gewinnt.

Der Plasmaspiegel von 17OHP hängt von Tageszeit, Alter, Geschlecht, Menstruationszyklus und Vorliegen einer Schwangerschaft ab. Die Schwankungen sind unter anderem darauf zurückzuführen, daß es durch Veränderungen anderer Hormonspiegel (z.B. Progesteron, Testosteron) aus seiner Bindung an Albumin und CBG verdrängt wird.

17OHP ist auch im Speichel nachweisbar; man geht davon aus, daß es dort den ungebundenen Anteil des Plasma-17OHP reflektiert [64, S.367-95].

Bei gesunden Männern stammt das zirkulierende 17OHP hauptsächlich aus dem Hoden [74, S.930-9] und kann daher neben Testosteron im Serum bestimmt werden, um auf die endokrinologische Funktion der Testes mit Hilfe eines hCG-Stimulationstests rückzuschliessen [54, S.251].

Die Bestimmung von 17OHP spielt auch aufgrund der Dysregulation des P450c 17 α -Enzymkomplexes eine Rolle bei der Diagnose des Syndroms der polyzystischen Ovarien (PCOS) [45, S.280-8].

Die größte Bedeutung kommt jedoch der Bestimmung von 17OHP bei Verdacht auf Adrenogenitales Syndrom (AGS) mit 21-Hydroxylase-Defekt und dessen Verlaufsbeurteilung in der Perinatalphase zu. Für die Diagnosestellung des AGS bei Kindern ist es wichtig, den physiologischen 17OHP-Plasmaspiegel bei unterschiedlichen Altersgruppen zu kennen. SIPPELL *et al.* [68, S.39-46] fanden für das Steroidhormon einen sehr hohen Wert zwei Stunden nach der Geburt (1,55-23,1 ng/ml), der bereits in der ersten Lebenswoche mehr als siebenfach abnahm und bis etwa zum dritten Lebensmonat konstant blieb. Dann kam es zu einem zweiten starken Abfall auf nur 3–5 % des Ausgangswertes. Der Spiegel änderte sich bis zum siebten Lebensjahr nicht, dann war ein langsamer pubertätsbedingter Anstieg zu bemerken. Zwischen Mädchen und Jungen gab es außer in der Pubertät, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten einsetzt, keinen signifikanten Unterschied.

Die Referenzwerte bei erwachsenen Männern liegen bei 1,5-5,4 nmol/l. Bei prämenopausalen Frauen liegen die 17OHP-Werte in der Follikelphase bei 0,9-3,0 nmol/l und in der Lutealphase bei 2,1-10,5 nmol/l [40, S.1035].

1.6. Das Adrenogenitale Syndrom

Das Adrenogenitale Syndrom resultiert aus einem erblichen Defekt eines der fünf Enzyme, die für die Synthese von Cortisol aus Cholesterin verantwortlich sind [85, S.1519-24]. Es handelt sich dabei um die Enzyme Desmolase, 3 β -Dehydrogenase, 21-Hydroxylase, 11-Hydroxylase und 17-Hydroxylase. Zu 99% handelt es sich dabei um einen Defekt der 21-Hydroxylase oder der 11-Hydroxylase, wobei 90-95% auf einem 21-Hydroxylasemangel beruhen [55, S.973-1000; 52, S.371-93; 30, S.1044-8].

Der Erbmodus ist autosomal rezessiv. Das Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, zwischen HLA I und II [14, S.1309-11]. Normalerweise gibt es zwei 21-Hydroxylase Gene, CYP21P und CYP21, die sich zu 98 % gleichen [84, S.5111-5]. CYP21P ist das Pseudogen, während CYP21 für das aktive Enzym codiert. Der Genlokus für 21-Hydroxylase zeigt eine ungewöhnliche interindividuelle Variabilität (Polymorphismen). Fehlt das CYP21 Gen ganz, resultiert daraus die Salt-Wasting-Form des AGS. Bei den anderen Defekten handelt es sich vorwiegend um Punktmutationen, wobei diese veränderten Sequenzen interessanterweise auf dem Pseudogen vorkommen. Man erklärt sich diese Veränderungen auf dem CYP21 Gen durch Rekombinations- und Konversionsereignisse beim *crossing-over* während der Meiose. Neun dieser bekannten Punktmutationen der 21-Hydroxylase werden für 95 % aller AGS-Fälle verantwortlich gemacht. Anhand dieser

Mutationen läßt sich die Diagnose Adrenogenitales Syndrom stellen [83, S.160]. Die genetischen Grundlagen des 21-Hydroxylasemangels wurden von MILLER *et al.* [51, S.241-6] genau definiert und mehr als 80% der Fälle mit der schweren Form des AGS können einer großen Deletion von CYP21 und des benachbarten C4B Gens oder aufgrund von ein oder zwei definierten Punktmutationen (A/C655G in Intron 2, T999A in Exon 4) zugeschrieben werden. Eine dritte Mutation (G1683T) tritt mit hoher Frequenz bei Patienten mit der Late-Onset-Form des Adrenogenitalen Syndroms auf [71, S.584-95; 58, S.210]. Auch läßt sich anhand des Genotyps eine Aussage über den Schweregrad der Ausprägung machen [21, S.285].

Bedingt durch den 21-Hydroxylasemangel kann 17OHP nicht zu 11-Desoxycortisol und schließlich zu Cortisol umgewandelt werden. Daraus folgt ein Mangel an Cortisol mit konsekutiver ACTH-Mehrsekretion. Dies wiederum führt zu einer Akkumulation von 17OHP, welches in andere Steroidsynthesewege, hauptsächlich in den Syntheseweg für Androgene, umgeleitet wird. 17OHP ist somit ein wichtiger Parameter bei der Diagnosestellung und der Therapieüberwachung des AGS.

Ein weiterer Parameter, der für die Diagnostik des AGS verwendet werden kann ist 21-Desoxycortisol. Es wird durch 11-Hydroxylierung aus 17OHP gebildet. Dieser Syntheseweg spielt bei Gesunden eine untergeordnete Rolle, während er bei Patienten mit Adrenogenitalem Syndrom bei 21-Hydroxylasemangel wichtig wird. Die Werte sind im Falle eines AGS basal und nach ACTH-Stimulation deutlich erhöht, insbesondere auch bei heterozygoten Genträgern, die dadurch ermittelt werden können [20, S.56-64].

Klinisch unterscheidet man drei Formen des AGS: die Simple-Virilizing-Form (unkompliziertes AGS), die Salt-Wasting-Form (AGS mit Salzverlustsyndrom) und die Late-Onset-Form (nicht klassisches AGS). Obwohl diese drei Formen in der Literatur als unterschiedliche Manifestationen beschrieben werden, sollte man betonen, daß es sich um ein kontinuierliches Spektrum handelt. Der klinische Verlauf wird entscheidend dadurch geprägt, wie hoch die verbleibende Enzymaktivität ist, und wieviel Cortisol durch extraadrenales Gewebe gebildet werden kann [50, S.733]. Folgende Symptome werden bei homozygoten Trägern des Enzymdefektes aufgrund des Androgenüberschusses beobachtet: bei Mädchen findet man bereits bei der Geburt eine Klitorishypertrophie, Fusion der Labioskrotalfalten und eine phallische Urethra, während Uterus und Ovarien normal ausgebildet sind. Sowohl bei Jungen als auch bei Mädchen kommt es zu schnellem Wachstum mit fortgeschrittenem Knochenalter, vorzeitigem Schluß der Epiphysenfugen und daraus resultierendem Minderwuchs. Knaben zeigen außerdem oft einen bilateralen Kryptorchismus, Hypospadie

und eine Pseudopubertas praecox. Bei Mädchen können postpubertär eine primäre oder sekundäre Amenorrhoe und ein polyzystisches Ovarsyndrom einen Teil der Symptomatik bilden, bei Frauen fällt eine Virilisierung auf. Infertilität kann bei beiden Geschlechtern resultieren. Bei der Salt-Wasting-Form kommt es durch den Mangel an Aldosteron, der dadurch entsteht, daß bei einem 21-Hydroxylasemangel Progesteron auch nicht in Desoxycorticosteron umgewandelt wird und somit der Syntheseweg zum Aldosteron ebenfalls blockiert ist (*Abb.2*), zu Hyponatriämie und Hyperkaliämie. Heterozygote Genträger zeigen meistens keine Symptome, bei Frauen kann jedoch unter Umständen eine Virilisierung auffallen [85, S.1519-24; 8, S.1806-13].

Da Neugeborene mit Salzverlustsyndrom innerhalb der ersten Lebenswochen akut gefährdet sind, ist ein frühzeitiges Erkennen dringend indiziert. Die Häufigkeit der klassischen Formen wurde in einem Multicenter-Neugeborenencreening mit 1:14000 gefunden; die Heterozygotenfrequenz beträgt in der kaukasischen Population 1:50 [30, S.1044-8; 60, S.866-74]. Dies entspricht etwa der Häufigkeit der Phenylketonurie, der häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankung, für die routinemäßig ein Neugeborenencreening durchgeführt wird [85, S.1519-24]. Aus diesem Grund wird diskutiert, ob auch für das AGS ein Neugeborenencreening eingeführt werden soll [60, S.866-74; 75, S. 583-90; 76, E11; 23, S.830].

Wichtig für Diagnose und Therapie ist auch die pränatale Diagnose eines AGS. Dies wird jedoch nur bei Verdacht auf 21-Hydroxylase-Defekt, also bei Zweitgeborenen (erstes Kind hat ein AGS) und bei Kindern von Müttern mit bekanntem Adrenogenitalen Syndrom durchgeführt, da die pränatale Diagnostik aufwendig, teuer und risikoreich ist. Diese kann entweder durch HLA-Typisierung, Analyse des CYP21 Gens oder durch intrauterine Hormondiagnostik (17OHP), jeweils im Rahmen einer Amniozentese oder einer Chorionzottenbiopsie, ermittelt werden. Die pränatale Diagnose ist von Bedeutung, da nur durch die bereits intrauterin durchgeführte Therapie eine Virilisierung der weiblichen Genitalien verhindert werden kann. Mütter erhalten bereits 4 Wochen post conceptionem täglich 20 µg/kg Körpergewicht Dexamethason, wenn ein erhöhtes Risiko für einen Gendefekt des Kindes besteht, da die Entwicklung der externen Genitalien zwischen der 6. und der 12. Schwangerschaftswoche stattfindet [24, S.451]. Diese Behandlung birgt auch Risiken in sich, insgesamt gilt die Therapie jedoch als sicher. Fortgeführt wird die Therapie nur, wenn der Fetus weiblich ist und sich der Verdacht bestätigt. Dadurch kann in den meisten Fällen die Virilisierung der externen Genitalien und eine falsche Geschlechtsbestimmung bei der Geburt verhindert werden [59, S.866-72; 34, S.445-51; 21, S.284-9; 11, S.24-9].

Durch die bereits intrauterin gestellte Diagnose kann bei Kindern mit AGS sofort nach der Geburt mit der adäquaten Therapie begonnen werden. Diese besteht in der Substitution der fehlenden Mineralo- und Glucocorticoide; die Dosis richtet sich nach dem Schweregrad des Enzymdefektes [59, S.875-7; 23, S.827-31].

2. Problemstellung

2.1. Konzept für einen kompetitiven 17 α -Hydroxyprogesteron-Immunoassay

Basierend auf der Tatsache, daß die Spezifität eines Antikörpers bei Steroiden um so größer ist, je weiter die Kopplungsstelle des Haptens für Albumin von funktionellen Gruppen entfernt ist (Landsteiner's Prinzip) [38, S.240-66], entwickelten LUPPA *et al.* [42, S.2345-52] einen Immunoassay für Testosteron, der einen Steroid-Tracer verwendet, welcher an Position 7 α , also weit entfernt von den funktionellen Gruppen, biotinyliert ist. Biotin wird mittels eines definierten Brückenarms an der gleichen Position am Steroid angeknüpft, wie das Immunogen, welches zur Produktion des spezifischen Antikörpers verwendet wurde. Charakteristisch für diesen Immunoassay ist die Verwendung dieses „near-to-native“-Tracers, der durch den Antikörper nahezu identisch zu Testosteron wiedererkannt wird. Steroid und Steroid-Tracer konkurrieren kompetitiv um die Bindungsstelle am Antikörper. Dies führt zu hoher Spezifität aufgrund der Konformations-Ähnlichkeit von Hapten und Tracer.

Diesem Prinzip folgend sollte nun ein Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) für 17 α -Hydroxyprogesteron aufgebaut werden. Hierfür wurde ein Tracer verwendet, an dem die Biotin-Gruppe über einen aliphatischen C₁₁-Verbindungsarm an die Position 7 des 17OHP gekoppelt ist.

Der Immunoassay wird in Mikrotiter-Testwells (Cups) durchgeführt, die mit einem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern beschichtet werden. Diese sollen als Fängerantikörper für einen Position 7 α -spezifischen polyklonalen Kaninchen-anti-17OHP-Antikörper dienen. Die sich in Lösung befindenden Zweitantikörper werden von den Fängerantikörpern an ihrem Fc-Teil gebunden (*Abb.5*).

Im nächsten Schritt sollen das Steroid aus der zu messenden Probe und der biotinylierte Tracer um die Bindungsstellen am anti-17OHP-Antikörper konkurrieren. An den Biotinrest des Tracers kann nun wiederum das mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Streptavidin (sAV-HRP) mit hoher Affinität binden, welches im dritten Schritt zugegeben wird. Die Meerrettichperoxidase setzt in einer lichtproduzierenden Reaktion ein Luminolderivat als Substrat um. Die Chemilumineszenz wird dann mittels Luminometer detektiert.

Über die Signale der Lichtreaktion kann anhand einer für kompetitive Immunoassays typischen Standardkurve, die mittels Standards bekannter Konzentrationen festgelegt wird, auf die vorhandene 17OHP-Konzentration in der Probe geschlossen werden.

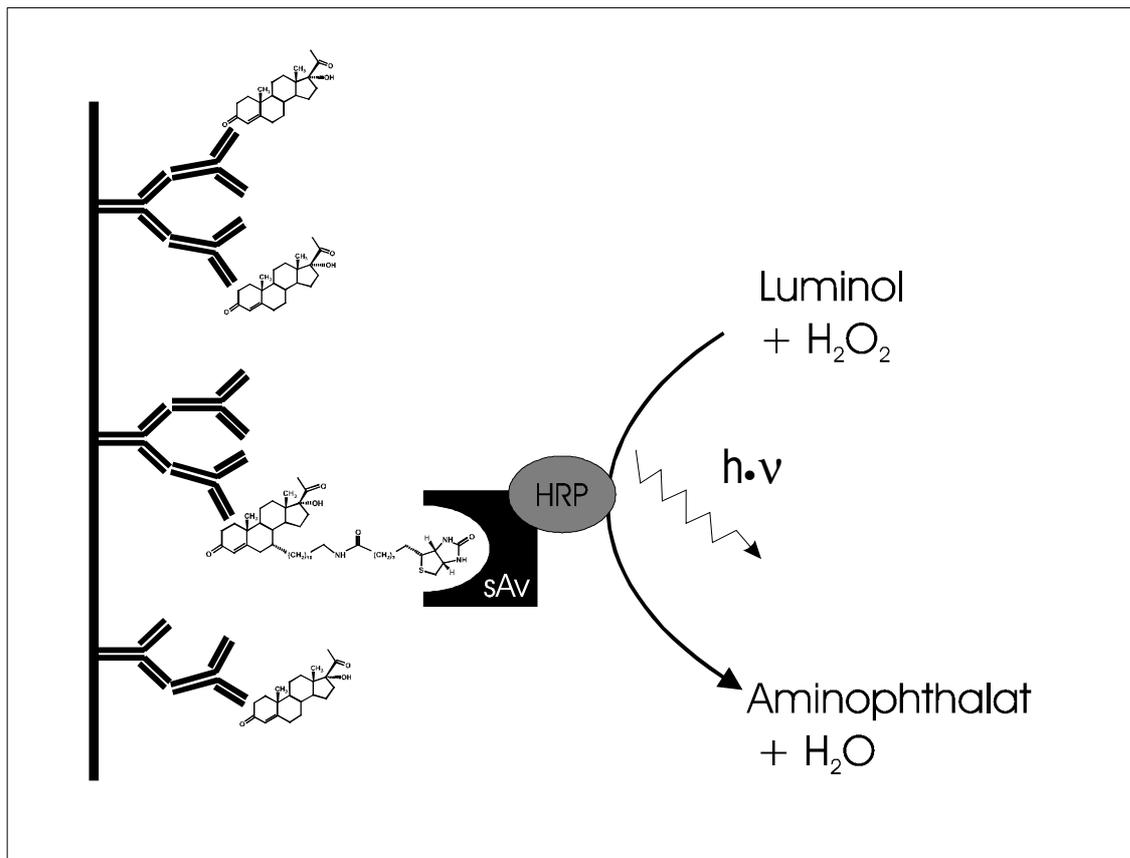


Abb.5: Assayprinzip für den 17OHP-CLIA

2.2. Evaluierung des 17OHP-Chemilumineszenz-Immunoassays

Durch Vergleich mit anderen, bereits etablierten, analytischen Methoden soll nach der Entwicklung des neuen 17OHP-CLIA dessen Güte und Qualität bestimmt werden. Es werden dabei Präzision, analytische Sensitivität und Spezifität, sowie die Richtigkeit des Assays bestimmt. Letztere wird anhand der Linearität, der Wiederfindung nach Aufstockung und der Messung von Richtigkeitskontrollen ermittelt.

Ziel ist es, eine möglichst sensitive und spezifische Methode zur Bestimmung des Hormons zu entwickeln. Anhand der ermittelten Referenzbereiche für Männer und prämenopausale Frauen in verschiedenen Zyklusphasen und der Messung von Seren pädiatrischer AGS-Patienten soll schließlich die klinische Validität des Verfahrens getestet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Steroide

Folgende Steroide wurden verwendet, um Stocklösungen für Standards herzustellen, bzw. um die Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers zu evaluieren:

- 17 α -Hydroxypregn-4-en-3,20-dion (17 α -Hydroxyprogesteron), MG = 330,5 g/mol von Sigma Chemical Co., MO, USA
- 3 α ,17 α -Dihydroxypregnan-20-on (17 α -Hydroxypregnanolon), MG = 334,5 g/mol von Sigma
- Δ^4 -Pregnen-3,20-dion (Progesteron), MG = 314,5 g/mol von Schering AG, Berlin
- 4-Androsten-3,17-dion (Androstendion), MG = 286,4 g/mol von Schering AG
- 17 α ,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion (11-Desoxycortisol), MG = 346,5 g/mol von Schering AG
- 21-Hydroxy- Δ^4 -pregnen-3,20-dion (Desoxycorticosteron), MG = 330,5 g/mol von Schering AG
- 17 β -Hydroxyandrost-4en-3-on (Testosteron), MG = 288,43 g/mol von Merck, Darmstadt
- 3 β ,17 α -Dihydroxy- Δ^5 -pregnen-20-on (17 α -Hydroxypregnenolon), MG = 332,5 g/mol von Research Plus, Inc., Bayonne, N.J.,USA
- 3 β -Hydroxy- Δ^5 -pregnen-20-on (Pregnenolon), MG = 316,5 g/mol von Research Plus, Inc.
- 11 β ,17 α ,21-Trihydroxy- Δ^4 -pregnen-3,20-dion (Cortisol), MG = 362,5 g/mol von Research Plus, Inc.

3.1.2. Antikörper

Als spezifischer 17OHP-Antikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-AK der Firma ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA eingesetzt. Als Immunogen wurde 17 α -Hydroxyprogesteron-7 α -CETE-BSA verwendet.

Für die Beschichtung der Testwells wurde Ziege-anti-Kaninchen Immunglobulin G (H+L) *rabbit*, der Firma Biogenesis, als Fängerantikörper verwendet. Die Beschichtung der Testwells wurde wie unter 3.1.10 beschrieben, durchgeführt.

3.1.3. Peroxidase

Um eine optimale Lichtausbeute im Test zu erreichen, wurde, wie aus Vorversuchen [65, S.40-3] bekannt, die an Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase der Firma Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA verwendet.

3.1.4. Tracer

Der Tracer, 17α -Hydroxypregn-4-en-3,20-dion- 7α (biotinyl-6-*N*-undecylamid) (7α -Bio-17OHP), $M_G = 726,08 \text{ g/mol}$, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. Hauptmann, Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg, als Konzentrat von $3543,72 \mu\text{mol/l}$, in Ethanol gelöst, hergestellt (*Abb.6*).

Die Synthese des Tracers in Kürze: Hierfür gibt man zu $3,417 \text{ g}$ ($10,35 \text{ mmol}$) in *n*-Butanol gelöstem 17OHP $10,55 \text{ g}$ ($41,4 \text{ mmol}$) Chloranil. Durch Erhitzen der Mischung wird für 6 Stunden unter Rückfluß gekocht und anschließend nach Filterung das Lösungsmittel abdestilliert. Den trockenen Rückstand extrahiert man mit CH_2Cl_2 . Die organische Phase wurde mit H_2O und 5% NaOH gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Auf diese Weise entsteht 17α -Hydroxypregn-4,6-dien-3-on als Zwischenprodukt. Dies wird mit $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_{11}\text{OTBDMS}$ in THF und Cu(I) zur Reaktion gebracht. Dann wird die Silylgruppe von der Seitenkette mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) entfernt. Der so entstandene Alkohol wird mit Mesylchlorid zu einem Mesylat umgewandelt. Die Abgangsgruppe Mesylat wird mit Natriumazid umfunktionalisiert. Als nächstes erfolgt eine Reduktion mit *n*-Tributylphosphin, wodurch man das freie Amin erhält. Die Biotinylierung erfolgt im letzten Schritt. 34 mg ($100 \mu\text{mol}$) (+)-Biotinyl-*N*-hydroxysuccinimide-Ester und $27 \mu\text{l}$ Et_3N ($200 \mu\text{mol}$) werden zu dem Amin in 2 ml DMF gegeben und 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und das Produkt anschließend mit $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ chromatographiert, um $80 \mu\text{mol}$ (80%) des gewünschten Endproduktes zu erhalten [6, S.44-52].

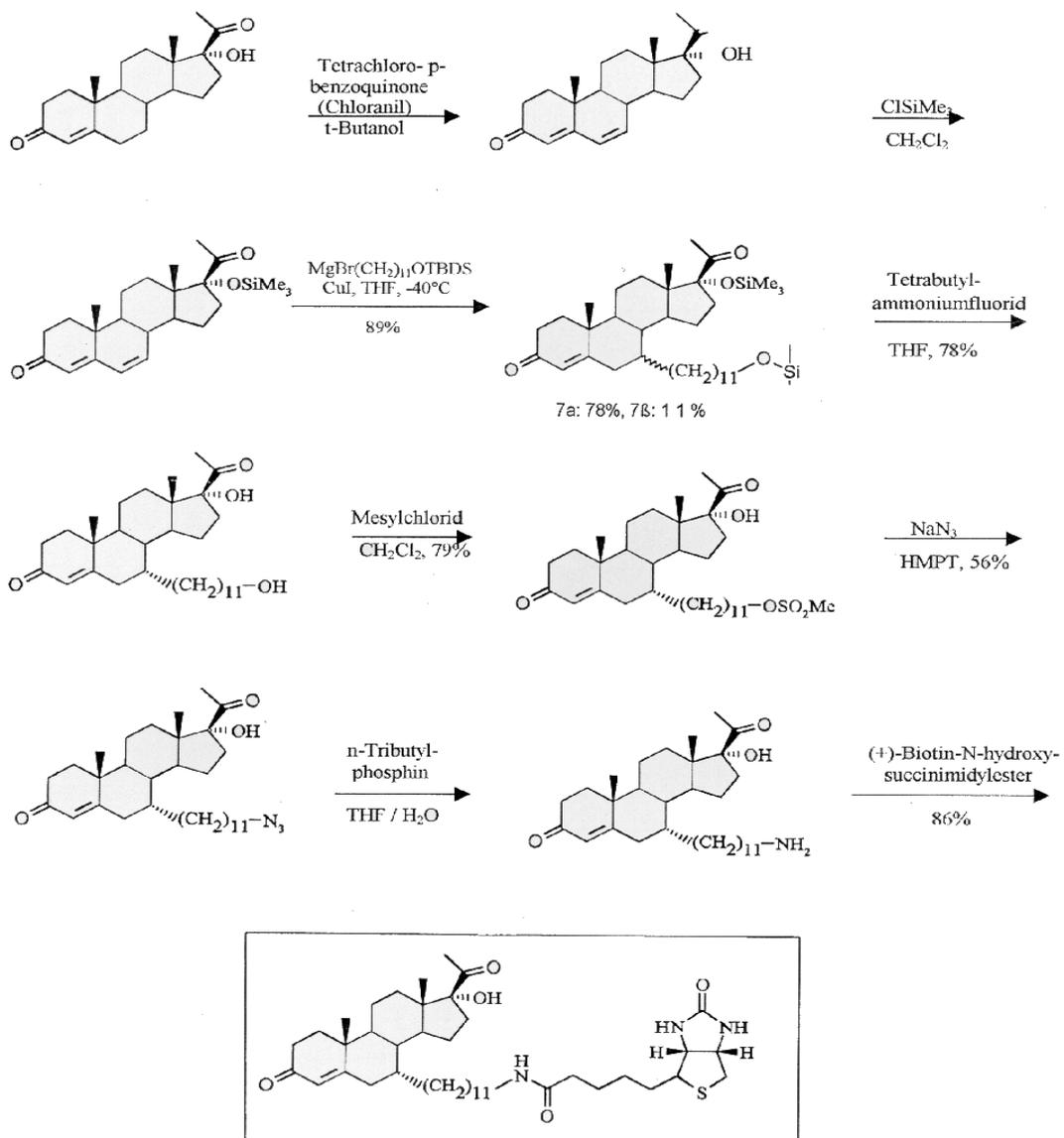


Abb.6: Syntheschema des an Position 7 α -biotinylierten 17OHP-Tracers

3.1.5. Chemikalien

- 0,9% NaCl-Lösung von Delta Pharma GmbH, Pfullingen
- Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), MG = 156 g/mol, von Serva, Heidelberg
- Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), MG = 178 g/mol, von Serva, Heidelberg
- Bovines Serum Albumin (BSA), MG = 66000 g/mol, von Sigma Chemical Co., MO, USA
- Aktivkohle (Charcoal), von Sigma Chemical Co., MO, USA
- Triton X-100, von Merck, Darmstadt
- Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), von Merck
- Methanol (CH_3OH), von Fluka Chemika, Buchs, Schweiz
- Dichlormethan (Cl_2CH_2), von Merck
- Diethylether (C_2H_5)₂O, von Merck
- Acetonitril ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$), von Fluka
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), von Bio-Rad, Anaheim, CA, USA
- Dextran T 500, von Pharmacia, Uppsala, Schweden
- Borat Waschpuffer, Amerlite-System der Firma Johnson & Johnson, Amersham, UK
- Signalreagenz (Luminolreagent mit 6-Hydroxybenzothiazol als Verstärker), Amerlite-System der Firma Johnson & Johnson
- Für Verdünnungs- und Standardreihen wurde steroidfreies Serum (SFS) der Firma Biogenesis verwendet.

3.1.6. 17 α -Hydroxyprogesteron-Standards

Die 17OHP-Standards wurden hergestellt, indem eine 17OHP-Stocklösung von 10 μM (3,3 mg 17OHP in 1 ml Ethanol gelöst) zu den jeweiligen Endkonzentrationen von 0 / 0,3 / 1 / 3 / 5 / 10 / 15 / 30 nmol/l mit steroidfreiem Serum verdünnt wurde.

17OHP-Kalibratoren zur Richtigkeitskontrolle wurden von Prof. Dr. L. Siekmann, Institut für Klinische Biochemie, Universität Bonn, bezogen. Dabei handelte es sich um acht lyophilisierte Serumproben, die mit 3 ml destilliertem Wasser rekonstituiert wurden. Sie waren mit Sollwerten von 2,54 / 3,67 / 5,36 / 7,01 / 9,34 / 11,78 / 15,68 / 22,52 nmol/l ausgewiesen, die mittels einer massenspektrometrischen Referenzmethode bestimmt worden waren [67, S.117-23]. Diese Proben wurden mit Ether extrahiert, bevor sie im 17OHP-CLIA vermessen wurden.

3.1.7. Serumproben

Es wurde Blut von gesunden Männern und Frauen zwischen 20 und 60 Jahren verwendet. Bei Frauen wurde zwischen der Follikel- und der Lutealphase, und einer bestehenden Schwangerschaft unterschieden, da 17OHP ein zyklusabhängiges Hormon ist. Alle Seren wurden nach Zentrifugation aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C eingefroren.

Die Proben des Ringversuchs HM 1/98 der DGKC wurden zur Richtigkeitskontrolle verwendet.

Es wurde auch versucht, durch selbst hergestelltes steroidfreies Serum die Ergebnisse zu optimieren. Hierzu wurde SFS mit Dextran-beschichteter Aktivkohle (1,25g Dextran und 12,5 g Aktivkohle auf 500 ml Serum) versetzt und über Nacht bei $+4^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die an die Kohle gebundenen Steroide wurden durch 45 min Zentrifugation bei 3000 U/min und $+4^{\circ}\text{C}$ vom restlichen Serum getrennt. Reinigung des Serums von Kohlepartikeln über einen $0,45\ \mu\text{m}$ Filter.

Auch wurden Seren von behandelten/unbehandelten Kindern mit gesichertem AGS bei homozygotem 21-Hydroxylasemangel gemessen, die Prof. Dr. H. G. Dörr, Abteilung für Pädiatrische Endokrinologie, Universität Erlangen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt hatte.

3.1.8. Geräte

Zur Herstellung und Verarbeitung der Reagenzien wurden benötigt:

- Wasserbad Huber Ministat der Firma Huber, Offenburg- Elgersweier
- Thermomixer 5433 von Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz, Hamburg
- Rührer und Heizplatte Ikamag Typ RCT, der Firma Janke & Kunkel, Staufen
- Präzisionswaage Typ Analytic AC 1205, der Firma Sartorius AG, Göttingen
- Amerlite Schüttelinkubator Model ZLE 164,
Amerlite Waschstation Model ZLE 201,
Amerlite Luminometer Model ZLT 100, alle von Johnson & Johnson
- 1219 Rackbeta Flüssigkeitsszintillationszähler, LKB Wallac, Bromma, Schweden
- pH-Meter (WTW STH 600) der Firma WTW, Weilheim
- Filtrationsvorrichtung, der Firma Sartorius, Göttingen
- Speedvac[®] Plus, SC 110 A, der Firma Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA

3.1.9. Sonstiges Zubehör

Neben den oben aufgeführten Substanzen wurde für den Aufbau des Assays weiterhin benötigt:

- 20 ml Polyvials, von Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt
- Opti-Fluor Szintillations-Cocktail von Packard Instruments B.V., Groningen, Niederlande

- Auswertungsprogramm Securia von Packard Instruments, Meriden, CT, USA
- Microtiterstrips (Testwells) der Firma Dynatech Laboratories, Inc. Chantilly, Virginia, USA.
- Coated-Tube Radioimmunoassay für 17OHP der Firma DSL, Sinsheim
- Radioimmunoassay OHP-CT der Firma CIS bio international, Gif-sur-Yvette Cedex, Frankreich
- Enzymimmunoassay für 17OHP von DRG Instruments GmbH, Marburg
- Für die Extraktion wurden Sep Pak C₁₈ Cartridges der Firma Waters, MA, USA, verwendet.
- 17 α -Hydroxy[1,2,6,7-³H]progesteron der Firma Amersham Life Science, Buckinghamshire, England

3.1.10. Beschichtung der Testwells

Für die Beschichtung der Testwells wurde ein Immunglobulin G vom Kaninchen 1:50 mit PBS-Puffer verdünnt und jedes Testwell mit 250 μ l der AK-Lösung versetzt. Diese wurden für 16 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem Amerlite Waschgerät gewaschen und es wurde pro Röhrchen 200 μ l Blockierungspuffer (PBS/2% BSA-Puffer) zugesetzt, 30 Minuten bei 37°C unter Rütteln inkubiert und wieder gewaschen. Die Strips wurden in Gläsern mit Trockenmittel gelagert.

3.2. Methoden

Folgende experimentelle Teilschritte waren zum Aufbau des 17 α -Hydroxyprogesteron-Chemilumineszenz-Immunoassays nötig: Zunächst mußte in Vorversuchen getestet werden, welche optimale Konzentration der polyklonale anti-17OHP-Antikörper für den CLIA haben sollte. Weiterhin, in welcher Tracerverdünnung optimale Ergebnisse erzielt werden. In Verdrängungsexperimenten (*displacement experiments*) mit Tritium-markiertem 17OHP als Tracer sollten darüber hinaus Informationen über die Kompetitionsfähigkeit des verwendeten 7 α -Bio-17OHP-Tracers erhalten werden. Speziell galt es zu prüfen, in welchem Konzentrationsbereich der Äquivalenzbereich des Tracers bezüglich des Tritium-markierten 17OHP liegt. Anschließend sollte die Adaption der Testbedingungen auf die Verhältnisse in den eigentlichen Testwells erfolgen. Hier mußten erneut die Antikörper- und die Tracerverdünnung auf ihre Eignung für den Test geprüft werden. Ermittelt werden mußte weiterhin, in welcher Form das Probenmaterial einzusetzen war und ob eine Serumextraktion notwendig sein würde. Ziel der Anpassung der Komponenten auf das Mikrotitersystem war die optimale Signalausbeute und die Festlegung des am besten geeigneten Probenmaterials.

Im nächsten Schritt mußte der 17OHP-Chemilumineszenz-Immunoassay hinsichtlich seiner Leistungsmerkmale evaluiert werden. Anschließend sollte für den CLIA ein Referenzbereich für 17OHP im Serum erstellt, Proben von Kindern mit Adrenogenitalem Syndrom vermessen und ein Methodenvergleich mit einem routinemäßig verwendeten RIA und einem kommerziellen ELISA durchgeführt werden.

3.2.1 Vorversuche

3.2.1.1. Antikörperbindungsversuche

Für den zur Verfügung stehenden polyklonalen anti-17OHP-Antikörper sollte die Verdünnung mit dem besten Bindungsvermögen mit Hilfe eines Tritium-markierten Antikörpers ermittelt werden. Hierzu wurde das Antiserum mit PBS / BSA-Puffer 1:100 / 1:500 / 1:1000 / 1:2000 / 1: 4000 und 1:6000 verdünnt. Das als Tracer eingesetzte Tritium-markierte 17OHP (^3H -17OHP) wurde 1:2500 verdünnt. Die Konzentration betrug somit 5,2 nmol/l.

100 μl jeder AK-Verdünnung wurden mit je 100 μl ^3H -17OHP und 300 μl Puffer zwei Stunden lang bei 37°C inkubiert [1, S.194]. Anschließend wurden 500 μl eines Aktivkohle / Dextran-Gemisches (10 mg Dextran, 100 mg Aktivkohle und 40 ml Assaypuffer), das über Nacht bei 4°C gerührt worden war, zugegeben und bei 4°C 30 min inkubiert. Die Trennung der freien- und AK-gebundenen Fraktion des ^3H -17OHP gelingt dadurch, daß nur der freie Anteil an Aktivkohle adsorbiert wird [2, S.265; 70, S.119].

Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 2000 U/min und 4°C wurde der Überstand von 800 μl (mit dem AK-gebundenen ^3H -17OHP) aus jedem Röhrchen zu 5 ml Szintillationsgel in ein Szintillationsmeßröhrchen pipettiert und die Radioaktivität im β -Counter vermessen. Die Ausgangsaktivität der eingesetzten Menge an ^3H -17OHP wurde dadurch bestimmt, daß 80 μl der 1:2500 Ausgangsverdünnung des ^3H -17OHP vermessen und als Wert für 100% zugrunde gelegt wurden. Ausgehend von diesen 100%-Werten wurden für alle AK-Verdünnungen die relativen Bindungsprozente aus den zugehörigen Meßdaten errechnet und so das Bindungsvermögen der AK bestimmt.

3.2.1.2. Verdrängungsversuche

Um die optimale Tracerkonzentration zu ermitteln, wurden ebenfalls Vorversuche durchgeführt. Dabei sollte geklärt werden, ob der Tracer (7 α -Bio-17OHP) das Substrat (17OHP) von der Bindungsstelle am AK in geeigneter Weise verdrängt.

Aus einer 7 α -Bio-17OHP-Stocklösung der Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ wurden die Verdünnungen 1,513 / 3,026 / 7,565 / 15,13 / 30,26 / 75,65 und 151,3 nmol/l mit Puffer hergestellt. Als

Antikörperverdünnung wurde 1:100 gewählt, da bei dieser Konzentration in den Antikörperbindungsversuchen das beste Bindungsvermögen erzielt worden war.

Die AK-Verdünnung wurde mit allen 7α -Bio-17OHP-Verdünnungen in Doppelbestimmung getestet: 100 μ l AK, 100 μ l 7α -Bio-17OHP, 100 μ l ^3H -17OHP in einer Konzentration von 5,2 nmol/l und 200 μ l Assaypuffer wurden für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden alle Ansätze mit 500 μ l des Aktivkohle / Dextran- Gemisches, wie unter Punkt 3.2.2.1 für die Auswahl des Antikörpers beschrieben, versetzt, zentrifugiert und 800 μ l des Überstands im β -Counter gemessen. Die Meßwerte wurden als %B gegen die log- 7α -Bio-17OHP-Konzentrationen aufgetragen. Als optimale Tracerkonzentration wurde diejenige gewählt, die 50 % relative Bindung im Bezug auf den Nullwert (rel %B) ergab.

3.2.2. Adaption an das Mikrotiterplatten-System

3.2.2.1. Antikörper- und Tracerverdünnung

Die in den Vorversuchen ermittelten AK- und Tracerverdünnungen sollten nun an die Bedingungen im Well angepaßt werden. Dazu wurde der Antikörper 1:25 / 1:50 / 1:100 / 1:200 / 1:500 / 1:1000 / und 1:2000 mit Assaypuffer verdünnt. Es wurden jeweils 100 μ l AK-Verdünnung zusammen mit 50 μ l Puffer und 50 μ l 1:2500 verdünntem (5,2 nmol/l) ^3H -17OHP in die Mikrotiter-Wells gegeben und 1h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Wells abpipettiert und diese im Waschgerät mit Boratpuffer gewaschen. Um die gebundenen Ag-AK-Komplexe wieder von der Wand abzulösen, wurden 200 μ l einer 1% Triton X-100-Lösung in die Wells pipettiert und 20 min bei 37°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Für die Messung im β -Counter wurden 5 ml Szintillationsgel, der Inhalt der Wells und die Wells selbst in Szintillationsröhrchen gegeben.

Um optimale Bedingungen für den Assay zu schaffen, wurden weitere Versuche mit verschiedenen AK- und Tracerkonzentrationen durchgeführt. Die Messungen erfolgten mittels Chemilumineszenz und die verschiedenen Standardkurven wurden miteinander verglichen. Als ideal definierte man: möglichst hohe counts (gute Lichtausbeute), sigmoider Kurvenverlauf mit Abfall der B/B₀%-Werte auf 20%.

3.2.2.2 Serumvorbehandlung

Native Seren sind für die Messung im CLIA nicht geeignet, da es zu Störungen der Signalgenerierung durch die Serummatrix kommen kann. Aus diesem Grund wurden verschiedene Extraktionsmethoden getestet. Entscheidend war die Wiederfindung des 17OHP nach Extraktion, die durch Versuche mit Tritium-markiertem 17OHP als internem Standard bestimmt wurde.

Für die Extraktion wurden die C₁₈ Säulen zunächst mit 2 ml Methanol, dann 2 ml H₂O konditioniert. Es folgte die Zugabe von 200 µl der Probe. Anschließend wurde die Säule mit 2 ml H₂O gewaschen. Das Eluat wurde schließlich mit 2 ml eines Methanol/Acetonitril-Gemisches (1:1) aus der Säule gewaschen, in 5 ml Glasröhrchen aufgefangen und in einer Speedvac[®]-Zentrifuge bei mittlerer Temperatur getrocknet.

Die Proben wurden in trockenem Zustand luftdicht gelagert. Vor Gebrauch wurden sie jeweils mit 200 µl steroidfreiem Serum rekonstituiert und 30 min bei 37°C gerüttelt.

3.2.2.3 Herstellung der 17OHP-Standards

Die 17OHP-Standards für den CLIA wurden aus einer 10 mM 17OHP-Stocklösung (3,305 mg 17OHP in 1 ml Ethanol) hergestellt. Die Standards 0,3/1,0/3,0/ 5,0/10/15 und 30 nmol/l wurden in PBS/2% BSA aufgenommen. Durch mehrfache Messung von Proben, deren 17OHP-Gehalt massenspektrometrisch bestimmt worden war, wurde festgestellt, daß dieser Puffer nicht die geeignete Matrix für die Standards ist. Daraufhin wurden die Standards in steroidfreiem Serum hergestellt.

3.2.3. Evaluierung des Chemilumineszenz-Immunoassays

Die Evaluierung wurde in Anlehnung an allgemeine Empfehlungen von FELDKAMP *et al.* [18, S. 49-95] und analog zu anderen CLIA-Evaluierungen für die Steroide Estron und Testosteron von LUPPA *et al.* [44, S.564-70; 42, S.2345-52] durchgeführt.

3.2.3.1 Präzision

Die Unpräzision eines Meßverfahrens ist auf die zufallsbedingten Variationen (zufällige Fehler) jedes mit größter Sorgfalt durchgeführten Teilschrittes der Analyse zurückzuführen [72, S.11].

Um diese zu bestimmen, wurden in jedem CLIA-Ansatz verschiedene Präzisionskontrollen mitgeführt. Hierzu wurden Serumpools mit niedrigem, mittlerem und hohem 17OHP-Gehalt verwendet.

Die 3 Präzisionskontrollen wurden sowohl für die Intra- als auch für die Interassaypräzision herangezogen. Bis zur Messung waren die Poolseren zu je 250 µl aliquotiert bei -70°C tiefgefroren und wurden jeweils vor dem Einsetzen in den CLIA extrahiert und rekonstituiert.

Für die gemessenen 17OHP-Konzentrationen wurden die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) und die Variationskoeffizienten (VK) berechnet.

Die Intraassay-Präzision ist definiert als die Präzision, die beim wiederholten Messen einer bestimmten Probe innerhalb derselben Testreihe erreicht wird. Hierfür wurde jede der 3 Präzisionskontrollen als 10fach Bestimmung in einem Assay gemessen.

Die Interassay-Präzision ist ein Maß für die Fähigkeit des Tests, ein und dieselbe Probe von Tag zu Tag mit dem gleichen Wert zu bestimmen. Jede der 3 Kontrollen wurde in Doppelbestimmung an mindestens 11 Tagen gemessen. Auch bei der Interassay-Präzision wurde für jede Kontrolle Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient bestimmt.

3.2.3.2. Analytische Sensitivität

Als analytische Sensitivität bezeichnet man den kleinsten meßbaren Wert, der von Null unterschieden werden kann. Sie ist bei Immunoassays und speziell im Falle des 17OHP-CLIA abhängig von dem verwendeten Antikörper, dem Tracer und der verwendeten Meerrettichperoxidase. Die Sensitivität kann durch die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze und die Erfassung der unteren Diskriminationsfähigkeit des Assays abgeschätzt werden.

3.2.3.2.1. Untere Nachweisgrenze

Zur Ermittlung der unteren Nachweisgrenze wird der Null-Standard 20mal gemessen. Aus den relativen Lichteinheiten (RLU) errechnet man den Mittelwert und die dreifache Standardabweichung (-3 SD). Mittels der Standardkurve bestimmt man für den RLU-Wert $MW - 3 SD$ die zugehörige 17OHP-Konzentration [49, S.291; 46, S.706]. Dieser Wert kann mit 99,7 %iger Wahrscheinlichkeit vom Nullwert unterschieden werden.

3.2.3.2.2. Untere Diskriminationsfähigkeit des Assays

Die untere Diskriminationsfähigkeit (LDP) eines Assays beschreibt die analytische Sensitivität, die unter realistischen Bedingungen mit einem analytischen Verfahren erzielt werden kann. Die Differenz der niedrigsten Konzentrationen, deren 2 SD-Bereiche sich nicht mehr überlappen, wird berechnet und dient als Maß für die LDP (Abb.7) [18, S.72; 44, S.565-6].

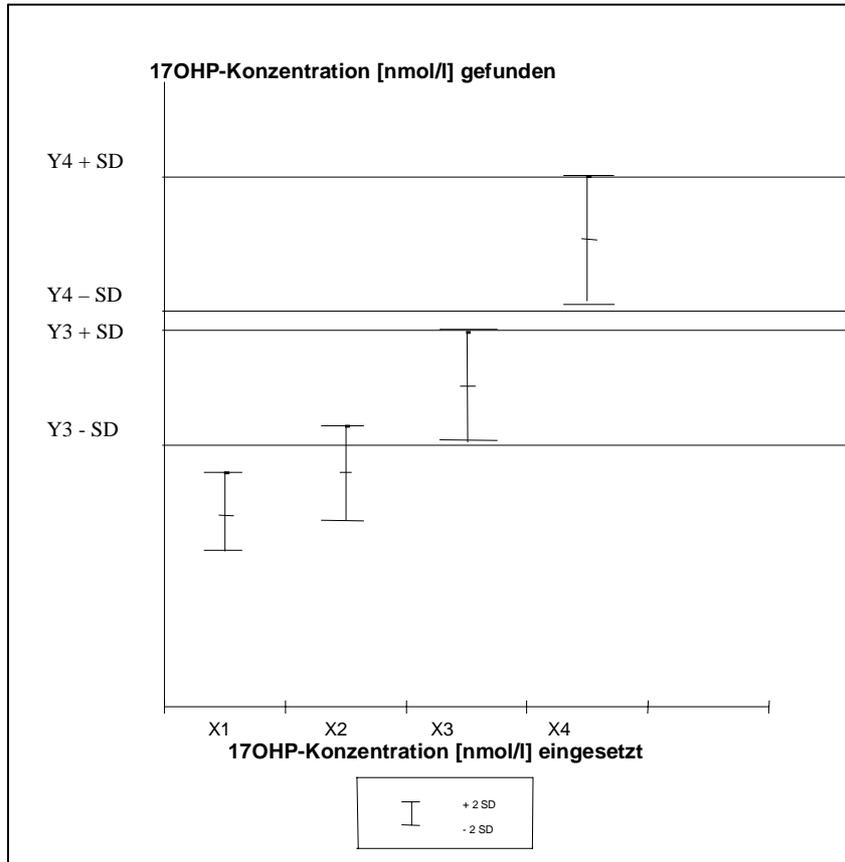


Abb.7: Untere Diskriminationsfähigkeit des Assays

Wie man aus den graphischen Verlängerungen, parallel zur Abszisse, für ± 2 SD von X1 bis X3 erkennen kann, überschneiden sie jeweils die ± 2 SD Bereiche. Erst die Bereiche ± 2 SD von X3 und X4 werden nicht mehr geschnitten. Daraus läßt sich die kleinste Differenz zwischen zwei Werten ermitteln, die noch voneinander unterschieden werden können, also $X4 - X3$.

3.2.3.3. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Analyseergebnisse ist eine wesentliche Voraussetzung für deren zuverlässige medizinische Beurteilung und klinische Bedeutung. Die Prüfung der Richtigkeit einer Analyse-Methode erfolgt in der Regel durch folgende Maßnahmen [72, S.12-3]: Linearität, Wiederfindung nach Aufstockung und Messung von Proben mit bekanntem Analyt-Gehalt.

3.2.3.3.1. Linearität

Die Messung der Linearität eines Assays wird durchgeführt, um zu ermitteln, ob eine Probe nach Verdünnung unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors den gleichen Konzentrationswert für

die Analyten wie die Ausgangslösung ergibt [18, S.73-4]. Zu diesem Zweck werden Proben mit unterschiedlicher 17OHP-Konzentration 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 verdünnt und danach ihr 17OHP-Wert bestimmt. Trägt man die gemessenen Konzentrationen ohne Einberechnung des Verdünnungsfaktors gegen das effektive Probenvolumen auf, so sollte sich eine Gerade ergeben.

3.2.3.3.2. Wiederfindung nach Aufstockung

Die Wiederfindung beschreibt die Fähigkeit des Assays, die einer Probe zugegebene Menge des Analyten auch quantitativ wiederzuerhalten. Für diese Versuche werden sechs Serumproben mit verschiedenen in Puffer hergestellten 17OHP-Konzentrationen aufgestockt und nach Extraktion gemessen.

Die Wiederfindung wird nach folgender Formel berechnet [18, S.77] :

$$R = \frac{\text{Konz. gemessen}}{\text{Konz. theoretisch}} * 100$$

3.2.3.3.3. Messung von Proben mit bekanntem 17OHP-Gehalt

Mit dem CLIA wurden 8 Referenzproben mit zuvor massenspektrometrisch definiertem 17OHP-Gehalt mehrfach gemessen. Die Proben im niedrigen Bereich (2,5/3,7/5,4/7,0/9,3 nmol/l) wurden 7fach im CLIA gemessen, die Proben mit hoher 17OHP-Konzentration (11,8/15,7/22,5 nmol/l) wurden 15fach bestimmt. Es wurden die Ergebnisse der beiden Analyseverfahren miteinander verglichen, da die Bestimmung mittels Massenspektrometrie eine Referenzmethode darstellt [67, S.117-23].

3.2.3.3.4. Messung von Ringversuchseren

Zur Überprüfung der Richtigkeit des CLIA wurden die beiden Proben eines Ringversuchs der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC) mit dem CLIA gemessen und mit den angegebenen 17OHP-Werten verglichen.

3.2.3.4. Spezifität

Definition: Als Spezifität einer Methode bezeichnet man die Fähigkeit dieser Methode, nur diejenige(n) Komponente(n) zu bestimmen, die sie zu messen vorgibt [72, S.13].

Die Spezifität wird bei Immunoassays vor allem durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität erfaßt. Die Kreuzreaktivität mit anderen, strukturell ähnlichen Stoffen, die sich in der zu messenden Probe befinden können, ist um so geringer, je spezifischer der Antikörper für sein Substrat ist. Diese wird ausgedrückt als die relative Konzentration, die benötigt wird, um 50% der maximalen Tracerbindung zu ersetzen [2, S.262-3].

Für die potentiell kreuzreagierenden Steroide, die unter Punkt 3.1.1.1. aufgeführt sind, werden daher Verdünnungen in Assaypuffer hergestellt, und für jedes Steroid eigene Standardkurven ermittelt. Dies wird in *Abb.8* dargestellt.

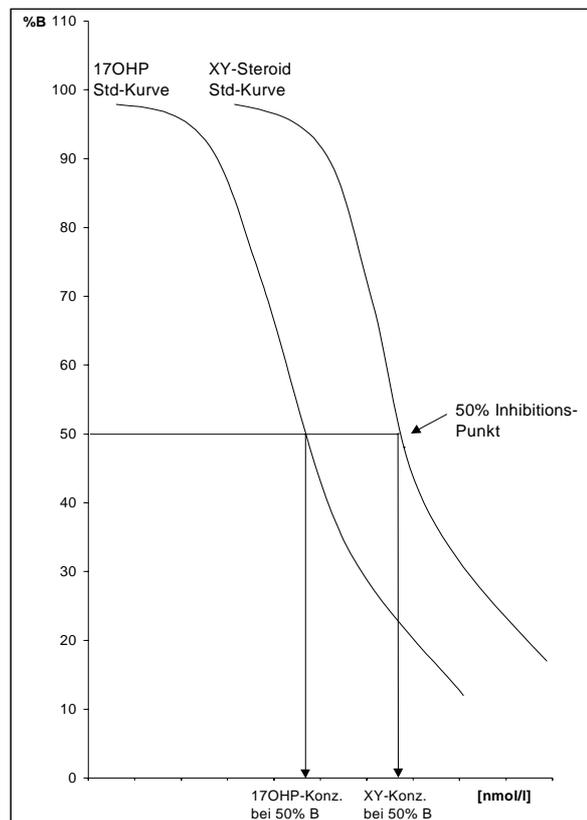


Abb.8: Bestimmung der Kreuzreaktivität

Die 17OHP-Konzentration und die Konzentration des Steroids XY werden bei 50% bestimmt. Die Kreuzreaktivität errechnet sich dann nach ABRAHAM [2, S.263] wie folgt:

$$\text{Kreuzreaktivität (\%)} = \frac{\text{17OHP-Konz. bei 50\%B}}{\text{XY-Konz. bei 50\%B}} * 100$$

3.2.4. 17OHP-Messungen mit dem Chemilumineszenz-Immunoassay

3.2.4.1. Methodenbezogener Referenzbereich

Zur Festlegung von Referenzbereichen wurden 68 Seren gesunder Männer und Frauen mit dem CLIA gemessen. Bei den Frauen wurde zwischen Luteal- und Follikelphase, und einer bestehenden Schwangerschaft unterschieden.

3.2.4.2. Messung von 17OHP in Serumproben von Kindern mit Adrenogenitalem Syndrom

Kinder mit Adrenogenitalem Syndrom bei 21-Hydroxylasemangel haben erhöhte Werte für 17OHP. Der CLIA sollte diesbezüglich überprüft werden, ob er auch im hohen Konzentrationsbereich 17OHP verlässlich messen kann und somit geeignet für die Diagnostik des AGS ist. Hierfür wurden 13 Proben von Kindern mit AGS nach Extraktion im CLIA gemessen.

3.2.4.3. Methodenvergleiche

Der neue 17OHP-CLIA wurde mit einem in der Routine verwendeten RIA und einem kommerziellen ELISA verglichen. Zu diesem Zweck wurden 24 Männer- und 24 Frauenserum jeweils mit allen 3 Methoden gemessen. Die linearen Regressionsparameter für die zu vergleichenden Assays wurden nach PASSING und BABLOCK [61, S.709-20] berechnet und graphisch dargestellt.

3.2.5. Statistische Methoden

Für die Datenverarbeitung und Kurvenanpassung der CLIA's mittels der Spline-Funktion wurde das Programm Securia II von Packard Instruments, Meriden, CT, USA benutzt. Die Methodenvergleiche wurden nach der Methode von PASSING und BABLOCK berechnet [61, S.709-20].

4. Ergebnisse

4.1. Vorversuche

In den Vorversuchen, wie unter 3.2.1. – 3.2.2. beschrieben, wurde die optimale Antikörperkonzentration bei einer Verdünnung von 1:500 gefunden. Für den Tracer stellte sich heraus, daß er in einer 20 nM Lösung eingesetzt werden muß. Der an Position 7 α biotinylierte Tracer bewies gute Kompetitionsfähigkeit mit 17OHP an dem für die Position 7 α -spezifischen polyklonalen anti-17OHP-AK. In 4 Versuchen mit einer ³H-17OHP-Konzentration von 5,2 nmol/l ergab sich im Mittel eine 50%-Verdrängungskonzentration des Tracers von 22 nM.

4.2. Optimierung der Bedingungen für das Mikrotiterplatten-System

4.2.1 Serumvorbehandlung

Um Störeffekte der Serummatrix zu vermeiden, wurden alle Standards und Proben vor der Messung im CLIA, wie unter 3.2.2.2. beschrieben, extrahiert. In Versuchen mit Tritiummarkiertem 17OHP wurde die Wiederfindung der Extraktionsmethode mit 95 \pm 1,8 % (n=4) festgestellt..

4.2.2. Assayprotokoll

Zunächst werden jeweils 200 μ l einer gebrauchsfertigen anti-17OHP-Antikörper-Lösung (1:500 in PBS/2% BSA) in die mit Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper beschichteten Wells pipettiert und eine Stunde lang bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend werden die Mikrotiterplatten in einem vierfachen Waschschrift mit Boratpuffer gewaschen.

Als nächstes werden je 50 μ l der fertig rekonstituierten Standards bzw. Proben (nach Extraktion), 100 μ l Assaypuffer, und 50 μ l einer frisch hergestellten 7 α -Bio-17OHP-Lösung (20 nmol/l in PBS/2% BSA) in die Wells pipettiert. Nicht-spezifische Bindungen (Blank-Wert) werden durch das Vermessen von 200 μ l Assaypuffer bestimmt. Nun folgt erneut eine einstündige Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator und anschließend ein vierfacher Waschschrift mit Boratpuffer. Im nächsten Schritt werden 200 μ l Meerrettichperoxidase (1:20000 in PBS/2% BSA) in jedes Well pipettiert. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37°C, die ebenfalls im Schüttelinkubator stattfindet, wird noch einmal gewaschen. Zum Schluß gibt man 250 μ l Signalreagenz in jedes Röhrchen, wartet 2 Minuten und mißt dann im Luminometer.

Die so erhaltenen relativen Lichteinheiten (RLU) werden mittels des Programms Securia II ausgewertet. Aus den Werten der Standards wird eine Standardkurve erstellt, anhand dieser die jeweilige 17OHP-Konzentration der Serumproben ermittelt wird.

4.2.3. Korrekturfaktor für die 17OHP-Standards

Durch Mehrfachmessungen von Proben, deren 17OHP-Gehalt zuvor massenspektrometrisch bestimmt worden war, stellte sich heraus, daß die im CLIA gemessenen Konzentrationen von den massenspektrometrisch ermittelten Werten proportional zur Konzentration des 17OHP abwichen. Die Proben wurden wie unter 3.2.3.3.3. beschrieben 7- bzw. 15-fach gemessen. Die Mittelwerte der so erhaltenen 17OHP-Konzentrationen wurden durch die aus der Massenspektrometrie bekannten 17OHP-Konzentrationen dividiert. Daraus ergab sich der Korrekturfaktor. Über den gesamten Meßbereich wird der Korrekturfaktor durch eine Exponentialfunktion, die in *Abb.9* dargestellt ist, beschrieben.

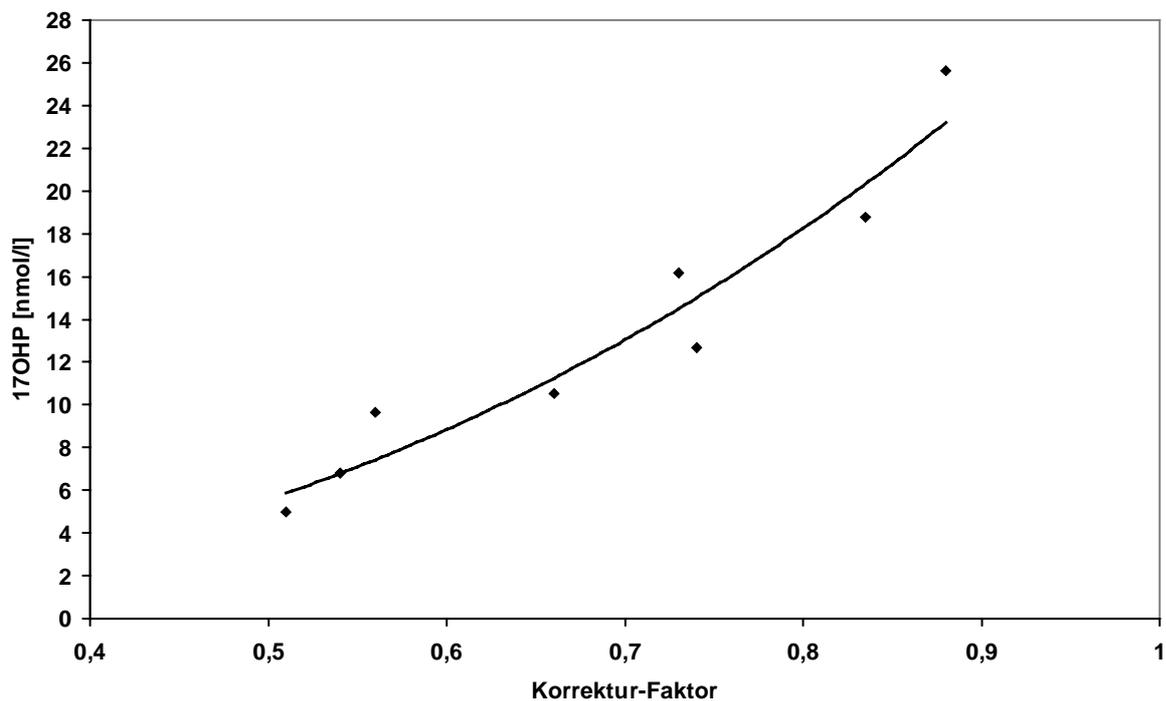


Abb.9: Korrekturfaktor-Bestimmung

Anhand der so ermittelten Kurve wurden für den 17OHP-CLIA alle Standards mit dem Faktor korrigiert. Der 17OHP-Gehalt von unbekanntem Serumproben konnte nun wie gewohnt anhand der korrigierten Standardkurve ermittelt werden.

4.2.4. Standardkurve des 17OHP-Chemilumineszenz-Immunoassays

Anhand der Standards mit bekanntem 17OHP-Gehalt (mittels Faktor korrigiert) in steroidfreiem Serum wurde eine Standardkurve erstellt. Jeder Standardwert wurde in 20 Interassay-Messungen bestimmt und der Mittelwert ± 2 SD berechnet. Die Abbildung der Standardkurve, *Abb. 10*, beschreibt deutlich deren sigmoiden Verlauf.

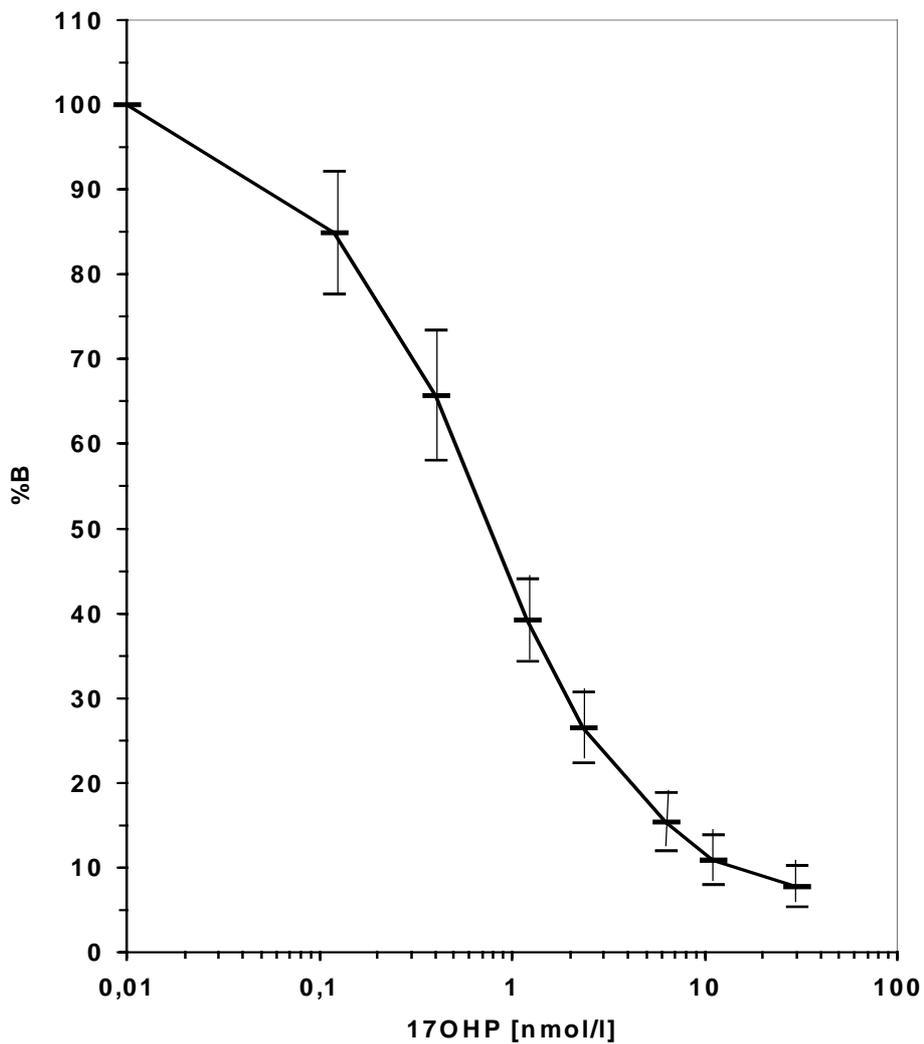


Abb. 10: Standardkurve

4.3. Evaluierung des CLIAs

4.3.1. Präzision

Für die Intraassay-Präzision ergaben sich die in *Tab.1* aufgeführten Ergebnisse.

Pool	n	Mittelwert \pm 1 SD [nmol/l]	VK [%]
1	12	1,62 \pm 0,14	8,5
2	12	2,70 \pm 0,18	6,6
3	12	5,19 \pm 0,39	7,6

Tab.1: Intraassay-Präzision

Bei der Bestimmung der Interassay-Präzision wurden folgende Resultate (*Tab.2*) erzielt.

Pool	n	Mittelwert \pm 1 SD [nmol/l]	VK [%]
1	11	1,76 \pm 0,47	26,9
2	13	5,31 \pm 0,78	14,7
3	12	13,67 \pm 1,34	9,8

Tab.2: Interassay-Präzision

4.3.2. Analytische Sensitivität

4.3.2.1. Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze stellt der Wert dar, der mit 99,7 % Wahrscheinlichkeit von Null unterschieden werden kann. Dieser wurde durch die 20fache Messung des Null-Standards ermittelt: MW = 11007,5 RLU; SD = 545,4. Daraus resultierte für die untere Nachweisgrenze: MW – 3 SD = 9464,8 RLU. In der Standardkurve entspricht dies einer 17OHP-Konzentration von 0,08 nmol/l.

4.3.2.2. Untere Diskriminationsfähigkeit des Assays

Die untere Diskriminationsfähigkeit ist ein Maß für die analytische Sensitivität eines klinisch-chemischen Verfahrens. Für die Versuche wurde mit 17OHP aufgestocktes steroidfreies Serum verwendet. Das Ergebnis ist in *Abb.11* graphisch dargestellt. Die untere Diskrimination des CLIA liegt bei ca. 2,0 nmol/l, da sich zwar zwischen 1,0 und 0,5 nmol/l (Differenz 0,5 nmol/l), aber nicht mehr zwischen 2,40 und 1,0 nmol/l Überschneidungen ergeben. Durch Intrapolation im Bereich zwischen 1,0 und 2,4 nmol/l läßt sich unter der Voraussetzung konstanter Standardabweichungen die untere Diskriminationsfähigkeit bei einem 17OHP-Wert von 2,0 nM berechnen.

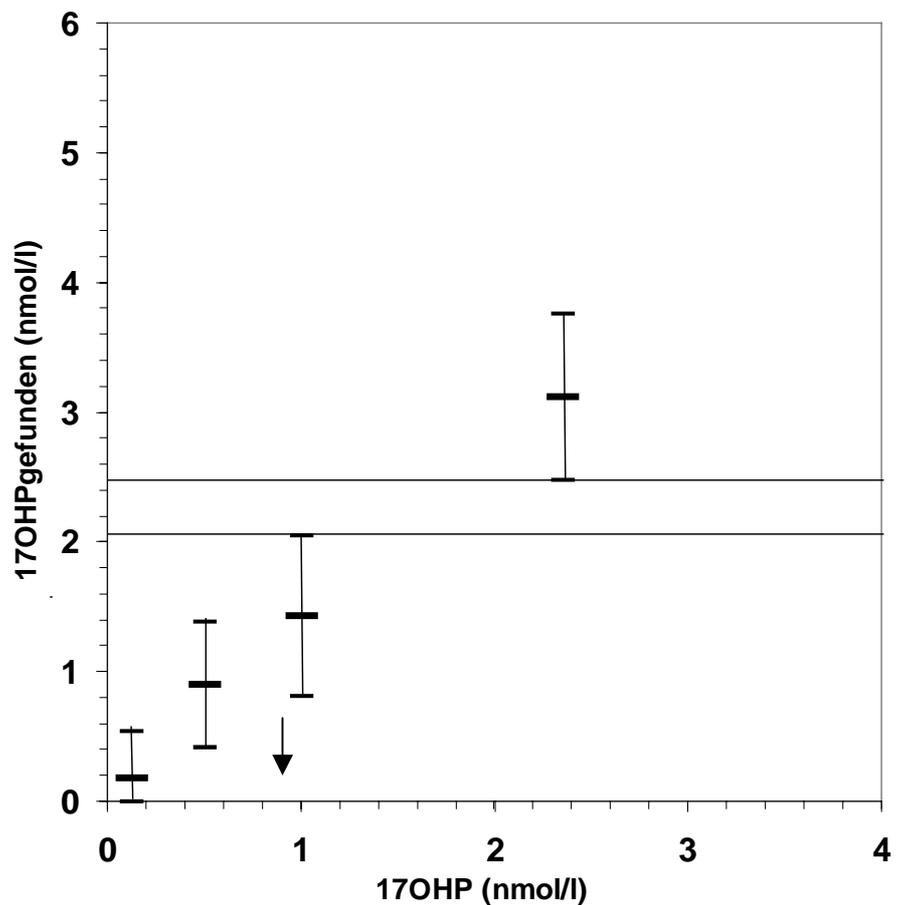


Abb.11: Untere Diskriminationsfähigkeit

4.3.3. Richtigkeit

4.3.3.1. Linearität

6 Seren mit 17OHP-Konzentrationen von 1,65 bis 16,01 nmol/l als Ausgangswerte wurden nach Extraktion und Rekonstitution in vier Schritten stufenweise (1:2 / 1:4 / 1:8 / 1:16) verdünnt. *Abb.12* zeigt das Ergebnis, wobei das effektive Probenvolumen gegen die gemessene 17OHP-Konzentration aufgetragen ist.

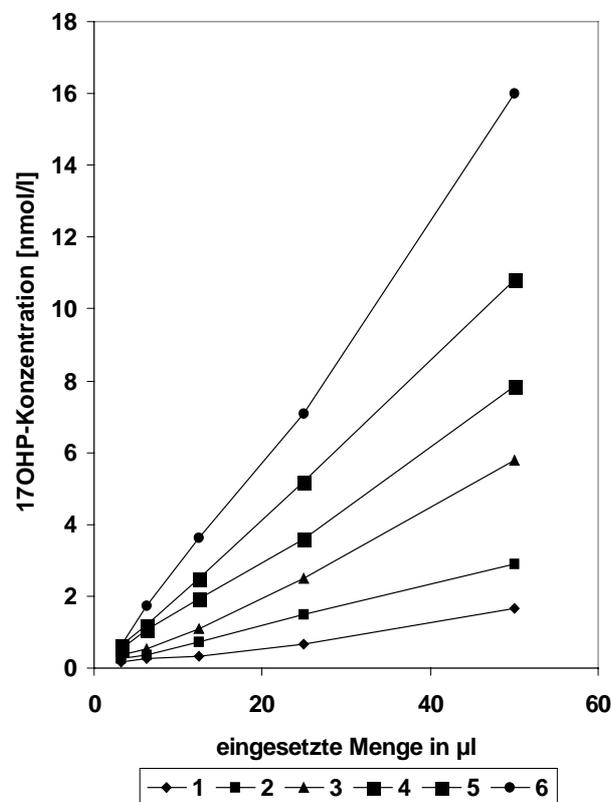


Abb.12: Linearität

Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, daß die Linearität des CLIA bei Verdünnung der Proben sowohl im Bereich mit niedriger als auch im Bereich mit hoher 17OHP-Konzentration sehr gut ist.

4.3.3.2. Wiederfindung nach Aufstockung

Für die Wiederfindung wurden 6 Seren mit Ausgangskonzentrationen von 1,0 / 1,21 / 1,92 / 2,23 / 2,33 und 2,88 nmol/l 17OHP verwendet. Die Ergebnisse nach Aufstockung sind in *Tab.3* zusammengefasst.

Probe	Ausgangswert [nmol/l]	Sollwert nach Aufstockung [nmol/l]	Istwert nach Aufstockung [nmol/l]	Wiederfindung [%]
1	1,0	1,37 3,03	1,37 3,28	100 108
2	1,21	1,57 3,23	1,72 2,64	109,5 82
3	1,92	2,24 3,91	2,24 4,7	100 120
4	2,23	2,53 4,2	3,08 5,0	122 119
5	2,33	2,63 4,3	2,42 4,86	92 113
6	2,88	3,15 4,82	3,22 5,52	102 114,5

Tab.3: Wiederfindung nach Aufstockung

Die Wiederfindung des CLIA liegt somit zwischen 82 und 122 %, im Mittel bei 107 %.

4.3.3.3. Messung von Proben mit bekanntem 17OHP-Gehalt

Die Proben, deren 17OHP-Gehalt durch massenspektrometrische Bestimmung bekannt war, wurden mit dem CLIA in 6-facher Weise vermessen. Die Ergebnisse sind unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors für die Standards (vgl. 4.2.3.) in *Tab.4* aufgeführt.

Massenspektrometrie	2,542 [nmol/l]	3,668 [nmol/l]	5,358 [nmol/l]	7,008 [nmol/l]	9,336 [nmol/l]
CLIA 1 [nmol/l]	1,997	3,410	5,713	6,149	9,997
CLIA 2 [nmol/l]	2,751	3,085	4,944	6,888	11,357
CLIA 3 [nmol/l]	2,877	3,418	4,684	7,053	9,198
CLIA 4 [nmol/l]	2,657	3,804	6,533	6,799	8,610
CLIA 5 [nmol/l]	2,483	4,528	4,634	7,137	8,031
CLIA 6 [nmol/l]	2,714	3,844	5,859	7,750	7,896
MW [nmol/l]	2,580	3,682	5,394	6,963	9,182

Tab.4: Messung von Proben mit bekanntem 17OHP-Gehalt

4.3.3.4. Messung von Ringversuchseren

Als weitere Möglichkeit, die Richtigkeit des Assays zu überprüfen, wurden zwei Proben aus einem Ringversuch der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC) mit dem CLIA gemessen (Tab.5). Die ermittelten 17OHP-Werte beider Proben lagen im Bereich der von der DGKC angegebenen Zielwerte.

Ringversuch	Probe	CLIA [nmol/l]	Zielwert Ringversuch [nmol/l]	SD Ringversuch
HM 1/98	A	12,2	14,0	4,24
	B	3,4	4,35	1,54

Tab.5: Ringversuchseren

4.3.4. Spezifität

4.3.4.1. Kreuzreaktivität

Die Versuche zur Bestimmung der Kreuzreaktivität potentiell kreuzreagierender Steroide mit Strukturhomologien zum 17OHP mit dem eingesetzten polyklonalen anti-17OHP-AK ergab folgende Ergebnisse (Tab.6).

Steroid	Steroid (IUPAC-Nomenklatur) [9, S.5575; 33, S.277]	50% Hemmungs- konzentration [nmol/l]	Kreuz- reaktivität [%]
11-Desoxycortisol	17α,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion	350	3,17
Progesteron	Δ^4-Pregnen-3,20-dion	15243	0,07
Desoxycorticosteron	21-Hydroxy-Δ^4-pregnen-3,20-dion	8846	0,125
17 α -OH Pregnanolon	3α,17α-Dihydroxypregnan-20-on	47948	0,023
Testosteron	17β-Hydroxyandrost-4-en-3-on	> 100000	< 0,01
Androstendion	4-Androsten-3,17-dion	> 100000	< 0,01
17 α -OH Pregnenolon	3β,17α-Dihydroxy-Δ^5-pregnen-20-on	3692	0,196
Pregnenolon	3β-Hydroxy-Δ^5-pregnen-20-on	> 100000	< 0,01
Cortisol	11β,17α,21-Trihydroxy-Δ^4-pregnen-3,20-dion	> 100000	< 0,01
17OHP	17α-Hydroxypregn-4-en-3,20-dion	11,1 / 7,24	100

Tab.6: Kreuzreaktivität

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß außer 11-Desoxycortisol keines der Steroide eine nennenswerte Kreuzreaktivität mit 17OHP zeigt.

4.4. 17OHP-Messungen mit dem Chemilumineszenz-Immunoassay

4.4.1. Methodenbezogener Referenzbereich

In der folgenden Tabelle sind die Referenzbereiche für 17OHP für Männer, prämenopausale Frauen in der Follikel- und Lutealphase und Schwangere im I. und II. Trimenon aufgeführt. Angegeben wird jeweils der Mittelwert, die Standardabweichung und das 95%-Konfidenzintervall der 17OHP-Konzentrationen (*Tab.7*).

Gruppe	n	17OHP [nmol/l] (MW±1SD)	17OHP [nmol/l] (95%-Konfidenzintervall)
Männer	34	2,63 ±1,39	2,16 – 3,1
Frauen: Follikelphase	12	2,16 ±1,44	1,35 – 2,97
Lutealphase	14	3,05 ±1,75	2,13 – 3,97
Schwangere (I. und II. Trimenon)	8	6,08 ±3,04	3,97 – 8,19

Tab.7: Referenzbereiche

Die gefundenen Referenzbereiche sind gut vereinbar mit entsprechenden Werten aus der Literatur [56, S.320-6; 40, S.1035].

4.4.2. Messung von klinischen Proben

Es wurden 13 Seren von Kindern mit Adrenogenitalem Syndrom bei gesichertem 21-Hydroxylasemangel im CLIA gemessen. Hierbei lässt sich zwischen behandelten und unbehandelten Kindern unterscheiden, wie aus *Tab.8* hervorgeht.

Gruppe	n	17OHP [nmol/l] (MW)	17OHP [nmol/l] (95%-Konfidenzintervall)
Behandelt	8	1,98	1,08 – 2,88
Unbehandelt	5	47,17	4,57 – 89,77

Tab.8: Proben von AGS-Patienten

Die gefundenen Werte sind mit Angaben aus der Literatur vereinbar [23, S.828].

4.4.3. Methodenvergleich mit einem Radioimmunoassay

Für den Methodenvergleich mit dem RIA der Firma CIS bio international wurden jeweils Seren von 24 Männern und 24 Frauen im RIA und CLIA gemessen. Zur Verwendung im CLIA wurden die Proben in gewohnter Weise extrahiert. *Abb.13 und Abb.14* zeigen die dazugehörigen Meßwertepaare. Außerdem wurden die Parameter der linearen Regression nach PASSING und BABLOCK [61, S.709-20] und der SPEARMANSche Korrelationskoeffizient berechnet.

Der Methodenvergleich der 24 *Frauenser*en mit dem RIA ergab folgende Werte:

Lineare Regression: ($y = a + bx$) mit $y = -0,15 + 0,47x$;

SPEARMANScher Korrelationskoeffizient: $r_s = 0,675$

Für die 24 *Männerseren* wurden folgende Werte berechnet:

Lineare Regression: ($y = a + bx$) mit $y = 0,44 + 0,35x$;

SPEARMANScher Korrelationskoeffizient: $r_s = 0,786$

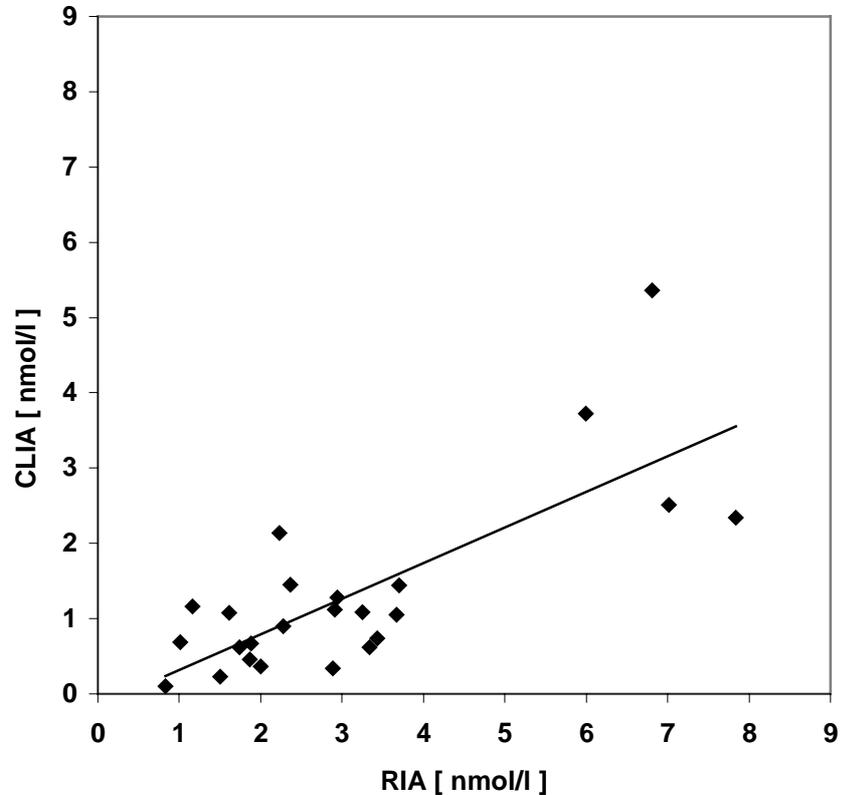


Abb.13: Methodenvergleich 17OHP RIA/CLIA Frauenser

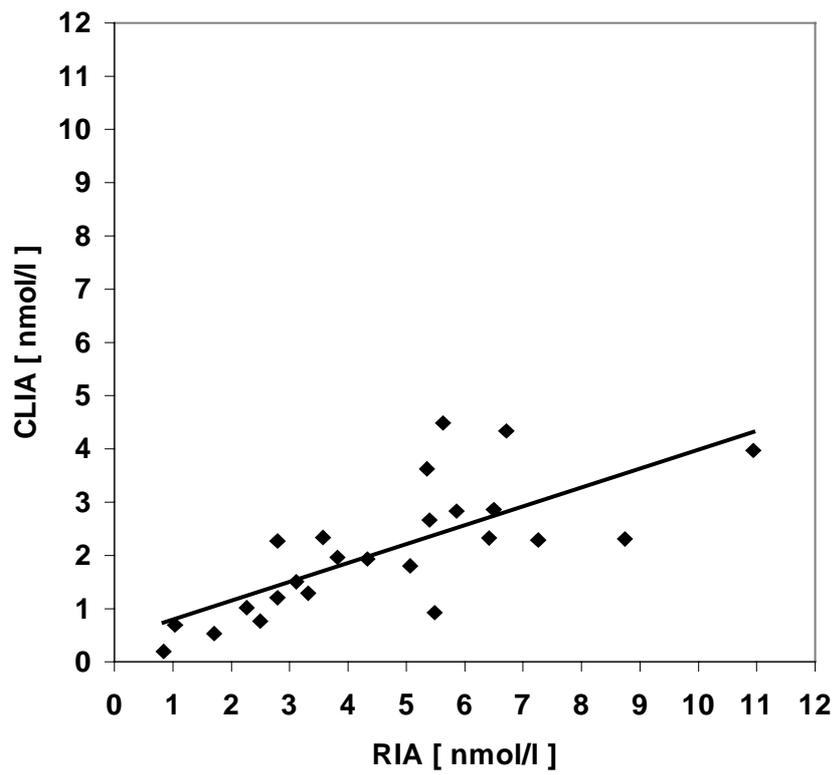


Abb. 14: Methodenvergleich 17OHP RIA/CLIA Männerseren

4.4.4. Methodenvergleich mit einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Zur Durchführung des Methodenvergleichs mit dem ELISA der Firma DRG wurde analog wie in Punkt 4.4.3. vorgegangen. Es wurden die selben Seren verwendet wie für den Methodenvergleich RIA / CLIA.

Hierbei ergaben sich folgende Werte, die in *Abb.14* und *15* dargestellt sind:

Im Vergleich der *Frauenser*en:

Lineare Regression: ($y = a + bx$) mit $y = -0,08 + 0,71x$;

SPEARMANScher Korrelationskoeffizient: $r_s = 0,793$

Im Vergleich der *Männerseren*:

Lineare Regression: ($y = a + bx$) mit $y = 0,34 + 0,46x$;

SPEARMANScher Korrelationskoeffizient: $r_s = 0,888$

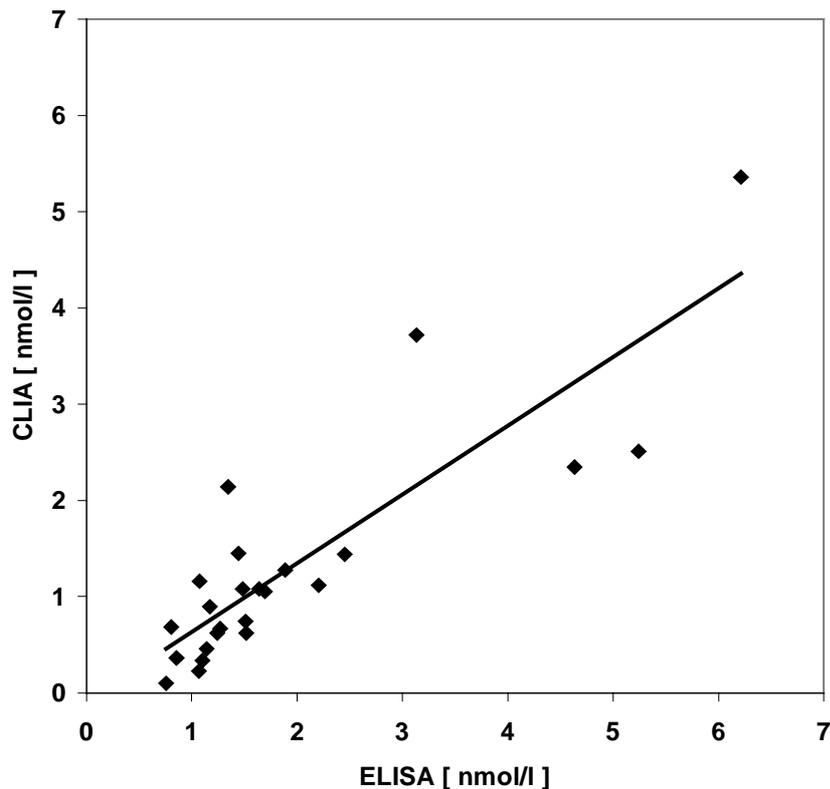


Abb.15: Methodenvergleich 17OHP ELISA/CLIA Frauenser

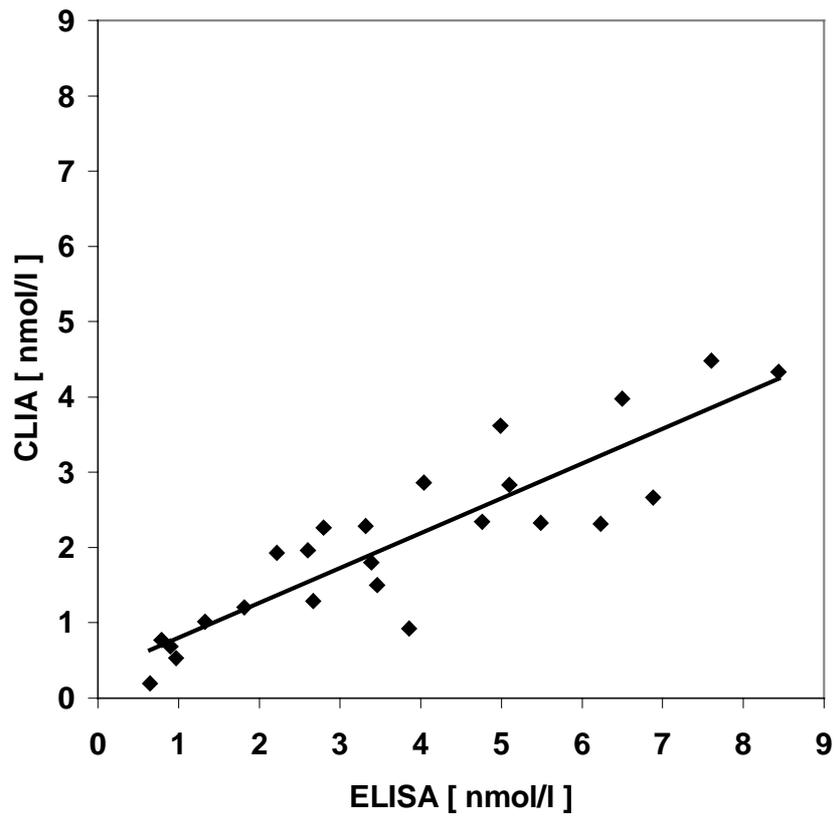


Abb.16: Methodenvergleich 17OHP ELISA/CLIA Männerseren

5. Diskussion

Die Bestimmung von 17α -Hydroxyprogesteron im Serum spielt eine große Rolle im endokrinologischen Labor, vorwiegend in der pädiatrischen Endokrinologie. 17OHP ist der wichtigste Parameter bei der Diagnosestellung des Adrenogenitalen Syndroms bei 21-Hydroxylasemangel, einer der häufigsten Erbkrankheiten mit einer Inzidenz von 1:14000 in der kaukasischen Bevölkerung [60, S.866-74]. Die Heterozygotenfrequenz beträgt ca.1:50; man vermutet, daß in der Normalbevölkerung jeder Tausendste von der mild verlaufenden nicht-klassischen Form dieser Erkrankung betroffen ist [50, S.732]. Das Adrenogenitale Syndrom resultiert aus einem autosomal rezessiven Erbleiden. Das defekte Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, inmitten des Haupthistokompatibilitätskomplexes [14, S.1309-11]. Normalerweise gibt es zwei 21-Hydroxylase Gene, CYP21P und CYP21, die sich zu 98% gleichen [84, S.5111-5]. CYP21P ist das Pseudogen, während CYP21 für das aktive Enzym codiert. Die genetischen Grundlagen des 21-Hydroxylasemangels wurden von MILLER *et al.* [51, S.241-6] genau definiert und mehr als 80% der Fälle mit der schweren Form des AGS können einer großen Deletion von CYP21 und des benachbarten C4B Gens zugeschrieben werden oder werden von ein oder zwei definierten Punktmutationen (A/C655G in Intron 2, T999A in Exon 4) bedingt. Eine dritte Mutation (G1683T) tritt mit hoher Frequenz bei Patienten mit der Late-Onset Form des Adrenogenitalen Syndroms auf [71, S.584-95; 58, S.210]. Anhand des Genotyps läßt sich auch eine Aussage über den Schweregrad der Ausprägung machen [21, S.285]. Bedeutung bekommt dieses Wissen bei der pränatalen Diagnostik des genetischen Defektes. Bei Kindern von Müttern mit AGS und Kindern von Müttern, die bereits ein Kind mit 21-Hydroxylasemangel geboren haben, sucht man bereits intrauterin nach diesem Defekt, um eine Virilisierung der externen Genitalien bei Mädchen zu verhindern und um auf Salzverlust-Krisen bei Neugeborenen vorbereitet zu sein. Diese Diagnostik kann im Rahmen einer Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie durch HLA-Typisierung, Hormonbestimmung (17OHP) oder Analyse des CYP21 Gens durchgeführt werden [59, S.866-72; 34, S.445-51]. Die molekularbiologische Analyse des CYP21 Gens durch *Southern Blot* oder Polymerase Kettenreaktion (PCR) [59, S.853-91] wird aufgrund der vielfältigen genetischen Defekte nicht routinemäßig bei allen Schwangeren durchgeführt. Darüber hinaus besteht ein erhöhtes Abortrisiko nach Amniozentese und Chorionzottenbiopsie. Mit den molekularbiologischen Verfahren läßt sich eine exakte Diagnose stellen; die Bestimmung von 17OHP ist jedoch weiterhin notwendig, um ein AGS bei Kindern zu diagnostizieren, das nicht bereits intrauterin erkannt wurde. Weiterhin sind

Verlaufskontrollen unter Therapie bei Kindern mit einem 21-Hydroxylasemangel indiziert. Die beiden Verfahren ergänzen sich gegenseitig.

Das Einführen eines Neugeborenen Screenings (Bestimmung von 17OHP im Serum) wurde immer wieder diskutiert und auch vielerorts probeweise durchgeführt, in Deutschland hat es sich jedoch noch nicht durchgesetzt [60, S.866-74; 75, S.583-90; 76, E11; 23, S.830].

17OHP wird auch bei Verdacht auf das Syndrom der polyzystischen Ovarien bestimmt, da man bei diesen Frauen erhöhte Werte im Serum findet. Man vermutet bei diesem Syndrom eine Dysregulation des Cytochrom P450c 17 α -Enzymkomplexes [45, S.280-8].

Das im Blut zirkulierende 17OHP ist hauptsächlich an Albumin und CBG gebunden; nur ein geringer Teil liegt in freier Form vor [13, S.58-68]. Zur Zeit wird dieses Hormon fast ausschließlich durch radioimmunometrische Methoden bestimmt. Es besteht jedoch weiterhin der Trend, alternative nicht-radioaktive Methoden zu finden, da diese automatisierbar sind. Bisher beschriebene nicht-radioaktive Assays konnten die RIAs noch nicht ablösen, da letztere eine sehr gute Sensitivität und Spezifität aufweisen und die Ergebnisse binnen weniger Stunden vorliegen [31, S.766-73; 19, S.660; 3, S.331; 82, S.544; 5, S.3037].

Mit dem Ziel, einen nicht-radioaktiven Immunoassay zu entwickeln, der mit den derzeit routinemäßig verwendeten RIAs konkurrieren kann, wählten wir als Assay-Design einen kompetitiven nicht-radioaktiven Immunoassay mit einem 7 α -biotinylierten-17OHP-Tracer, da bereits Assays desselben Prinzips für die Bestimmung von Estron und Testosteron im Serum entwickelt wurden und gute Ergebnisse im Bezug auf Sensitivität, Spezifität, Präzision und Richtigkeit vorlagen [42, S.2345-52; 44, S.564-70]. Die Methode läßt sich folgendermaßen beschreiben: Als Fängerantikörper, der an die Wellwand einer Mikrotiterplatte gebunden wird, dient ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, der einen polyklonalen, im Kaninchen generierten Position 7 α -spezifischen anti-17OHP-AK über dessen Fc-Teil sekundär immobilisiert. Um die Bindungsstellen des anti-17OHP-AK konkurrieren das in der Probe enthaltene 17OHP und der biotinylierte 17OHP-Tracer.

Die anschließend zugegebene an Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert die Reaktion von Luminol mit H₂O₂ zu H₂O und Aminophthalat, bei der Licht freigesetzt wird, welches im Luminometer detektiert werden kann. Da Streptavidin fest an Biotin bindet [10, S.625-36], ist das entstehende Licht direkt proportional zur Menge des gebundenen Tracers und damit umgekehrt proportional zu der in der Probe vorhandenen 17OHP-Konzentration, die folglich aus den relativen Lichteinheiten berechnet werden kann. Die Chemilumineszenzreaktion wird durch sogenannte Enhancersubstanzen noch verstärkt,

wodurch die Lichtausbeute erheblich gesteigert und die Sensitivität somit noch verbessert wird [37, S.325-31].

Einfluß auf die Eigenschaften des nicht-radioaktiven Immunoassays hat vor allem die Derivatisierungsposition des zu bestimmenden Steroids, die für die Kopplung an das Carrier-Protein zur Antikörpergenerierung einerseits und an die prosthetische Enzymgruppe zur Tracersynthese andererseits verwendet wird. In der vorliegenden Arbeit wird ein CLIA mit einem an Position 7 biotinylierten Tracer aufgebaut. Die Position 7 trägt beim 17OHP keine funktionelle Gruppe und ist weit entfernt von der Region des Hormons, die für 17OHP charakteristisch ist (Landsteiner's Prinzip) [38, S.240-66]. Die Spezifität bei der Wiedererkennung durch den polyklonalen Antikörper, welcher mit Hilfe eines 17 α -Hydroxyprogesteron-7 α -CETE-BSA als Immunogen produziert wurde, wird dadurch nicht vermindert; im Gegenteil, es hat sich herausgestellt, daß Tracer, die direkt am Steroidgerüst markiert werden, eine bessere Spezifität aufweisen, als solche, die an ihren funktionellen Gruppen derivatisiert werden [43, A113; 42, S.2345-52]. Diese Art der Markierung am Steroidgerüst unter Umgehung der funktionellen Gruppen wird als „near-to-native“- Konzept bezeichnet [43, A113; 42, S.2345-52].

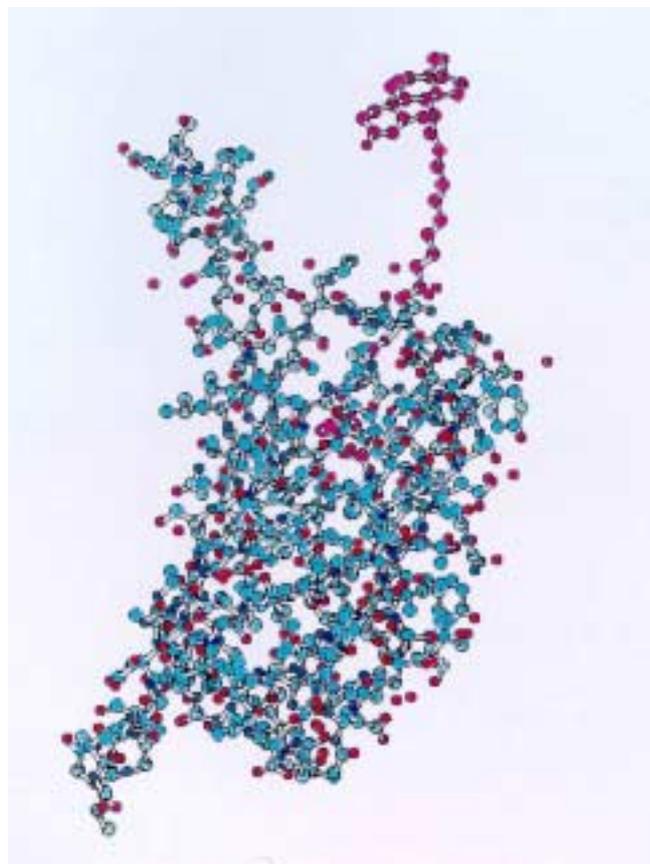


Abb.17: HyperchemTM-Darstellung des sAv/7 α -C₁₁-Bio-T-Komplexes

In *Abb.17* wird dieser Sachverhalt in einer Molecular-modeling-Darstellung sichtbar gemacht. Diese wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. T. Kaiser vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, zur Verfügung gestellt.

Die Länge des Verbindungsarms zwischen Steroid und Biotin hat ebenfalls Einfluß auf die Spezifität des Immunoassays. Man spricht von einem Brückeneffekt, wenn der Spacer anstelle des Steroids vom Antikörper erkannt wird [22, S.95-108; 80, S.251-7]. Die hier verwendete aliphatische C₁₁-Kette ermöglicht optimale Bindungsvoraussetzungen für das System Antikörper - biotinyliertes Steroid - Streptavidin-Meerrettichperoxidase, wie sich in Versuchen mit biotinyliertem Testosteron herausstellte [42, S.2345-52].

Auf die analytischen Vorteile der Benutzung des Biotin-(Strept-)Avidin-Systems wurde bereits unter Punkt 1.2 detailliert eingegangen. Daß biotinylierte Tracer bei ihrem Einsatz in Immunoassays gute Ergebnisse erzielen, wurde auch von DRESENDÖRFER *et al.* bei der Bestimmung von 17OHP im Speichel bestätigt [12, S.650-5]. Durch die starke Affinität der beiden Moleküle zueinander [28, S.85-133] bewirkt der Tracer eine optimale Signalgebung. Auch die Waschschrte stören die Bindung nicht. Dies ist ein deutlicher Vorteil gegenüber der direkten Markierung mit Meerrettichperoxidase, die ja letztendlich für die adäquate Chemilumineszenz-Signalgenerierung verantwortlich ist. Eine weitere Verbesserung der Sensitivität wird durch den zugegebenen Enhancer erreicht.

Als Antikörper wurde ein Position 7 α -spezifischer polyklonaler anti-17OHP-Antikörper ausgewählt, der in den Vorversuchen zeigte, daß der Tracer das Tritium-markierte 17OHP kompetitiv von seinen Bindungsstellen verdrängte. Diese gute Kompetitionsfähigkeit wird dadurch erreicht, daß der Tracer und das Immunogen, welches für die Generierung des Antikörpers verwendet wurde, beide an der selben Position am Steroidgerüst derivatisiert sind.

Vor ihrem Einsatz im Assay wurden sowohl die Serumproben als auch die in steroidfreiem Serum hergestellten Standards extrahiert. Dadurch konnte i) die Gesamtkonzentration des Steroidhormons ermittelt werden, da die Proteine, an die es im Serum gebunden ist, ausgefällt werden, und ii) die störenden Matrixeffekte minimiert werden. Die Wiederfindung nach Extraktion ergab ausgezeichnete Werte, die im Mittel bei 95,8 % lagen (verglichen mit 80-90 % anderer RIAs bzw. 102 % eines anderen CLEIA) [19, S.659-67; 5, S.3036-9]. Die Extraktion hat daher keinen nennenswerten Einfluß auf die Messungen und der minimale Verlust an Steroid wurde bei der Ergebnisermittlung nicht weiter berücksichtigt.

Die Richtigkeitskontrollen mit den Referenzproben von SIEKMANN zeigten eine systematische Abweichung, die gesetzmäßig durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden konnte (vgl. 4.2.4.). Die Standards wurden deshalb durch Umrechnung der Konzentrationswerte mittels des Korrekturfaktors auf die massenspektrometrische Referenzmethode bezogen, der Assay also an der MS-Methode kalibriert.

Durch Verdünnung einer 17OHP-Stocklösung mit steroidfreiem Serum wurden die Standards hergestellt. Bei -20°C sind diese mindestens 4-6 Wochen haltbar. Die Standardkurve des CLIA zeigt einen für kompetitive Immunoassays typischen sigmoiden Verlauf. 17OHP-Konzentrationen können in einem Bereich von 0,12 – 30 nmol/l bestimmt werden. Patienten mit homozygotem 21-Hydroxylase-Defekt haben deutlich höhere Werte, die jedoch problemlos gemessen werden können, da der Assay auch bei Verdünnung eine ausgezeichnete Linearität aufweist.

Vergleicht man die Intraassay-Präzision mit der anderer Immunoassays, vorzugsweise RIAs, so schneidet dieser mit Variationskoeffizienten von 6,6 bis 8,5 % gegenüber 7,2 – 11,9 % bei HUGHES *et al.* [31, S.766-73], 7,7 % bei ABRAHAM *et al.* [3, S.325-35] und 10,3-10,6 % bei dem CLEIA von ARAKAWA *et al.* sehr gut ab [5, S.3036-9].

Die Interassay-Präzision bei mittleren und hohen 17OHP-Konzentrationen liegt durchaus im Bereich der Präzision anderer Assays mit 9,8 – 14,7 % gegenüber 12,6 % bei HUGHES *et al.* [31, S.766-73], 14,7 % bei ABRAHAM *et al.* [3, S. 325-35] und 16,9 – 18,5 % bei ARAKAWA *et al.* [5, S.3036-9]; FIET *et al.* [19, S.659-67] konnten eine Interassay-Präzision von 8,8 % erreichen. Im unteren Bereich ist die Präzision nicht zufriedenstellend. Es bleibt weiteren Assayverbesserungen vorbehalten, den CLIA für 17OHP routinetauglich zu machen.

Die untere Nachweisgrenze konnte bei 0,08 nmol/l und eine LDP von 2,0 nmol/l bestimmt werden, was zufriedenstellend ist, da die niedrigsten Referenzwerte für Frauen in der Follikelphase ab 1,35 nmol/l beginnen. Andere RIAs detektieren Konzentrationen ab 0,06 (FIET *et al.*) oder 0,24 nmol/l (HUGHES *et al.*) bzw. der Chemilumineszenz Enzym Immunoassay (CLEIA) von ARAKAWA *et al.* 0,016 nmol/l.

Die 17OHP-Konzentrationen hängen von Alter, Geschlecht, Zyklusphase und Tageszeit ab. In diesem CLIA wurden folgende Referenzbereiche ermittelt: für Männer bei 2,16 - 3,1 nmol/l, bei Frauen in der Follikelphase von 1,35 – 2,97 nmol/l, in der Lutealphase bei 2,13 - 3,97 nmol/l. Für Schwangere im I. und II. Trimenon liegen die Werte bei 3,97 - 8,19 nmol/l. Diese Werte stimmen mit Angaben anderer Autoren überein [40, S.1035; 69, S.72; 19, S.661].

Des weiteren wurden verschiedene Seren mit unterschiedlichen 17OHP-Konzentrationen aufgestockt und anschließend die Wiederfindungsrate berechnet. Diese lag zwischen 82 und

122 %, im Mittel bei 107 %. In dem CLIA für Testosteron, der ebenfalls auf dem „near-to native“-Prinzip beruht, wurden 87 - 128 % wiedergefunden [65, S.52]. SIPPELL *et al.* konnten in ihrem simultanen Radioimmunoassay für Plasma Aldosteron, Corticosteron, 11-Desoxycorticosteron, Progesteron, 17-Hydroxyprogesteron, 11-Desoxycortisol, Cortisol und Cortison nur 52 - 68,2 % wiederfinden [69, S.66].

Durch Bestimmung des 17OHP-Gehalts von den beiden Seren eines Ringversuchs der DGKC im CLIA und Vergleich mit den von der DGKC angegebenen Werten, konnte die Richtigkeit des CLIA überprüft werden. Der CLIA ergab Werte für 17OHP, die sich im Bereich einer Standardabweichung vom Mittelwert befanden, also durchaus im zulässigen Streubereich.

Potentiell kreuzreagierende Steroide, also 11-Desoxycortisol, Progesteron, 11-Desoxycorticosteron, 17α -Hydroxypregnanolon, Testosteron, Androstendion, 17α -Hydroxypregnenolon, Pregnenolon und Cortisol wurden getestet, um eine Aussage bezüglich der Spezifität des Immunoassays treffen zu können. 11-Desoxycortisol zeigte als einziges Hormon eine Kreuzreaktivität über 1 %. Mit 3,17 % ist diese jedoch auch zu vernachlässigen, da dieses Steroid im Serum Werte von 0,34 nmol/l im Mittel nicht überschreitet. Selbst bei AGS-Patienten mit 21-Hydroxylase-Defekt, bei denen bis 6,5 nmol/l im Serum erreicht werden, verfälscht es die Ergebnisse kaum [19, S.661]. WALKER *et al.* [82, S.544] ermittelten eine Kreuzreaktivität von 3,3 % für 11-Desoxycortisol, FIET *et al.* [19, S.660] fanden die höchste Kreuzreaktivität mit 1,8 % für 17α -Hydroxypregnenolon. Daraus kann man schließen, daß die Spezifität besser als bei anderen Methoden liegt.

Wie bereits erwähnt, sind bei Kindern mit 21-Hydroxylase-Defekt die Serumwerte des Steroidhormons im CLIA deutlich erhöht. Es konnte zwischen behandelten und unbehandelten Kindern unterschieden werden. Auch hohe Werte können verlässlich gemessen werden; die oben beschriebene Verdünnungslinearität trägt einen wesentlichen Teil dazu bei. Es konnte auf diese Weise gezeigt werden, daß die etablierte CLIA-Methode durchaus geeignet ist, als Routineverfahren eingesetzt zu werden.

Schließlich wurde noch ein direkter Methodenvergleich mit einem kommerziellen RIA der Firma CIS bio international und einem ELISA der Firma DRG durchgeführt. Die Werte lagen über den gesamten Meßbereich von 0,12 bis 30 nmol/l niedriger als bei den beiden anderen Verfahren. Die SPEARMANSchen Korrelationskoeffizienten betragen $r = 0,675$ und $0,786$ für den Vergleich RIA / CLIA und $0,793$ und $0,888$ für den Vergleich ELISA / CLIA. Bei den Männerseren waren die Ergebnisse jeweils näher an denen der Vergleichsmethode, wobei die CLIA-Werte besser mit denen des ELISAs korrelierten als mit denen des RIAs. Für beide Methoden liegen Kreuzreaktionsdaten vor, die den Schluß nahelegen, daß sie eine geringere

Spezifität aufweisen als der CLIA. Dies erklärt, daß sowohl für den RIA als auch für den ELISA im Mittel immer höhere 17OHP-Werte gefunden werden als im CLIA.

Der hier vorgestellte kompetitive nicht-radioaktive Chemilumineszenz-Immunoassay erfüllt die Anforderungen, 17OHP im Serum sensitiv, spezifisch und präzise zu ermitteln. Verglichen mit der derzeit am häufigsten eingesetzten Bestimmungsmethode, dem RIA, hat er den Vorteil, daß der Umgang mit radioaktiven Substanzen wegfällt. Für den Einsatz als Routinemethode birgt er jedoch den Nachteil, mehr Zeit in Anspruch zu nehmen, da die Proben vor der Messung extrahiert werden müssen. Die Ergebnisse sind jedoch noch am selben Tag verfügbar; damit ist er dem früher entwickelten CLEIA von ARAKAWA *et al.* [5, S.3036-9], der über Nacht inkubiert werden muß, überlegen. Anzustreben wäre noch eine Verbesserung der Präzision, vorwiegend im unteren Meßbereich. Wichtiger bei der Diagnosestellung des 21-Hydroxylase-Defektes ist aber die sichere Bestimmung hoher 17OHP-Konzentrationen, die der vorliegende Test bietet.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde ein kompetitiver, nicht-radioaktiver Chemilumineszenz-Immunoassay zur Bestimmung von 17α -Hydroxypregn-4-en-3,20-dion (17OHP) im Serum entwickelt, seine Leistungsdaten evaluiert und mit anderen Methoden zur Bestimmung des Steroidhormons verglichen.

Charakteristisch für den Assays ist der an Position 7α biotinylierte 17OHP-Tracer, der mit dem Steroidhormon um die Bindungsstellen an einem anti-17OHP-Antikörper konkurriert. Dieser Position 7α -spezifische polyklonale, im Kaninchen generierte Antikörper wird indirekt über einen an die Wellwand gebundenen Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper immobilisiert. Weiterhin wird das Biotin-(Strept-)Avidin-System benutzt, indem man Streptavidin an Meerrettichperoxidase koppelt, welches wiederum mit dem biotinylierten Tracer eine starke Bindung eingeht. Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Chemilumineszenzreaktion des Luminol, welche zusätzlich durch das Vorhandensein von Enhancern verstärkt wird. Die gemessenen relativen Lichteinheiten sind umgekehrt proportional zu der in der Probe vorhandenen 17OHP-Konzentration.

In Verdrängungsversuchen wurde die gute Kompetitionsfähigkeit des Tracers mit 17OHP bestätigt, welche die Voraussetzung für den Testaufbau darstellte. Im Assay wurden die einzelnen Komponenten folgendermaßen eingesetzt: 200 μ l Antikörper in einer 1:500 Verdünnung; 50 μ l Probe / Standard, 100 μ l Assaypuffer, 50 μ l 7α -Bio-17OHP in einer 20 nM Konzentration; 200 μ l Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat in einer Verdünnung von 1:20000. Als Assaypuffer diente Phosphat-Puffer mit 2 % BSA und einem pH von 7,4. Die Serumproben und die Standards wurden vor dem Einsetzen im Assay extrahiert, um Matrixstöreffekte zu minimieren. Die Standards wurden aus einer Stocklösung hergestellt und in steroidfreiem Serum aufgenommen. Die Standards wurden an einer massenspektrometrischen Referenzmethode kalibriert. Es wurden folgende Standards für den Assay ausgewählt: 0 / 0,12 / 0,4 / 1,2 / 2,35 / 6,3 / 11,1 / 30 nmol/l.

Der Meßbereich des Immunoassays reicht von 0,12 bis 30 nmol/l 17OHP. Die Intraassay-Präzision ergab Werte von 6,6 - 8,5 %; die Interassay-Präzision lag zwischen 9,8 und 26,9 %. Die analytische Sensitivität wurde durch Bestimmung der unteren Nachweisgrenze (0,08 nmol/l) und der unteren Diskriminationsfähigkeit, die bei 2,0 nmol/l liegt, ermittelt. Der Assay weist eine ausgezeichnete Linearität bei Verdünnung der Proben sowohl im niedrigen als auch im Bereich hoher 17OHP-Werte auf. Die Richtigkeit wurde durch Wiederfindungsversuche mit aufgestockten Seren und durch vergleichende Messungen von Ringversuchs-

Proben überprüft. Die mittlere Wiederfindung lag bei 107 %. Die Spezifität wurde durch Kreuzreaktivitätsmessungen ermittelt. Für keines der untersuchten potentiell kreuzreagierenden Steroidhormone wurde eine Kreuzreaktivität in nennenswertem Umfang festgestellt (alle Kreuzreaktivitäts-Werte kleiner 3,17 %). Der Referenzbereich wurde für Männer mit 2,16 - 3,1 nmol/l gefunden; für prämenopausale Frauen in der Follikelphase mit 1,35 – 2,97 nmol/l, in der Lutealphase mit 2,13 – 3,97 nmol/l. Bei Schwangeren im I. und II. Trimenon konnten Werte zwischen 3,97 und 8,19 nmol/l ermittelt werden. Es wurden Proben von behandelten und unbehandelten Kindern mit Adrenogenitalem Syndrom (21-Hydroxylasemangel) gemessen. Die gefundenen Werte stimmen mit Werten aus der Literatur überein. Im Methodenvergleich mit einer RIA-Methode wurde folgende Korrelation gefunden: $y = -0,15 + 0,47 x$; $r_s = 0,675$ für die Frauenserien und $y = 0,44 + 0,35 x$; $r_s = 0,786$ für die Männerserien. Die Korrelation mit einem ELISA ergab: $y = -0,08 + 0,71 x$; $r_s = 0,793$ für die Frauenserien; $y = 0,34 + 0,46 x$; $r_s = 0,888$ für die Männerserien.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Chemilumineszenz-Immunoassay die Voraussetzungen für die Bestimmung von 17OHP im Serum erfüllt. Aufgrund der analytischen Sensitivität und der hervorragenden Spezifität können niedrige und aufgrund der ausgezeichneten Verdünnungslinearität hohe Konzentrationen genau ermittelt werden. Der Assay ist leicht zu handhaben, die *total assay time* beträgt 5h.

7. Literaturverzeichnis

- 1) Abraham, G.E.
Radioimmunoassay of steroids in biological fluids.
Clin Biochem 7 (1974) 193 - 201
- 2) Abraham, G.E.
Radioimmunoassay of steroids in biological fluids.
J Steroid Biochem 6 (1975) 261 - 270
- 3) Abraham, G.E., Hopper, K., Tulchinsky, D., Swerdloff, R.S., Odell, W.D.
Simultaneous measurement of plasma progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 β by radioimmunoassay.
Anal Letters 4 (1971) 325 - 335
- 4) Albrecht, H.O.
Z Physik Chemie 135 (1928) 321 - 330
- 5) Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A.
Chemiluminescence enzyme immunoassay of 17 alpha-hydroxyprogesterone using glucose oxidase and bis(2,4,6-trichlorophenyl) oxalate - fluorescent dye system.
Chem Pharm Bull (Tokyo) 30 (1982) 3036 - 3069
- 6) Birkmayer, C.
Synthesis of 7-biotinylated steroid hormones.
Dissertation, Universität Regensburg, (1996) 44 - 52
- 7) Bodmer, D.M., Tiefenauer, L.X., Andres, R.Y.
Antigen-versus antibody-immobilized ELISA procedures based on a biotinyl-estradiol conjugate.
J Steroid Biochem 33 (1989) 1161 - 1166
- 8) Cutler, G.B., Laue, L.
Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.
N Engl J Med 33 (1990) 1806 - 1813
- 9) Definite rules for the nomenclature of amino acids, steroids, vitamins and carotenoids.
JACS 82 (1960) 5575
- 10) Diamandis, E.P., Christopoulos, T.K.
The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology.
Clin Chem 37 (1991) 625 - 636
- 11) Dörr, H.G., Sippell, W.G., Willig, R.P.
Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Endokrinologie in der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und der Sektion Pädiatrische Endokrinologie in der Deutschen Gesellschaft Für Endokrinologie zur pränatalen Diagnostik und Therapie des Adrenogenitalen Syndroms (AGS) mit 21-Hydroxylase-Defekt.
Endokrinologie Informationen 16 (1992) 24 - 29

- 12) Dressendorfer, R.A., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, F., Klug, I., Kistner, A., Siebler, T., Kiess, W.
Development of a highly sensitive nonisotopic immunoassay for the determination of salivary 17-hydroxyprogesterone: reference ranges throughout childhood and adolescence.
Pediatr Res 44 (1998) 650 - 655
- 13) Dunn, J.F., Nisula, B.C., Rodbard, D.
Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid binding globulin in human plasma.
J Clin Endocrinol Metab 53 (1981) 58 - 68
- 14) Dupont, B., Oberfield, S.E., Smithwick, E.M., Lee, T.D., Levine, L.S.
Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency).
Lancet 2 (1977) 1309 - 1311
- 15) Engvall, E., Perlman, P.
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochem 8 (1971) 871 - 874
- 16) Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, M.F., Lieberman, S.
Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone.
J Biol Chem 228 (1957) 713 - 727
- 17) Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, M.F., Lieberman, S.
Steroid-protein conjugates. II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone, and estrone.
J Biol Chem 234 (1959) 1090 - 1094
- 18) Feldkamp, C.S., Smith, S.W.
Practical guide to immunoassay method evaluation.
In: „Immunoassay: A practical guide“,
Chan, D.W., Perlstein, M.T. (eds.) Academic Press,
New York, 1987, 49 - 95
- 19) Fiet, J., Gueux, B., Gourmelen, M., Kuttann, F., Vexiau, P., Couillin, P., Pham-Huu-Trung, M.T., Villette, J.M., Raux-Demay, M.C., Galons, H., Julien, R.
Comparison of basal and adrenocorticotropic-stimulated plasma 21-deoxycortisol and 17-hydroxyprogesterone values as biological markers of late-onset adrenal hyperplasia.
J Clin Endocrinol Metab 66 (1988) 659 - 667
- 20) Fiet, J., Vilette, J.M., Galons, H., Boudou, P., Burthier, J.M., Hardy, N., Soliman, H., Julien, R., Vexiau, P., Gourmelen, M., Kuttann, F.
The application of a new highly-sensitive radioimmunoassay for plasma 21-deoxycortisol to the detection of steroid-21-hydroxylase deficiency.
Ann Clin Biochem 31 (1994) 56 - 64
- 21) Forest, M.G., Morel, Y., David, M.
Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia.
TEM 9 (1998) 284 - 289

- 22) Fránek, M.
Structural aspects of steroid-antibody specificity.
J Steroid Biochem 28 (1987) 95 - 108
- 23) Frenzel, S., Dörr, H.G.
Probleme der verspäteten Diagnose eines unkomplizierten adrenogenitalen Syndroms (AGS) mit 21-Hydroxylase-Defekt am Beispiel eines 7jährigen Jungen.
Dtsch Med Wschr 123 (1998) 827 - 831
- 24) Garner, P.R.
Congenital adrenal hyperplasia in pregnancy.
Semin Perinatol 22 (1998) 446 - 456
- 25) Gitlin, G., Bayer, E.A., Wichek, M.
Studies on the biotin-binding site of avidin, tryptophan residues involved in the active site.
Biochem J 250 (1988) 291 - 294
- 26) Gosling, J.P.
A decade of development in immunoassay methodology.
Clin Chem 36 (1990) 1408 - 1027
- 27) Gosling, J.P., Middle, J., Siekmann, L., Read, G.
Standardization of hapten immunoprocudures: total cortisol.
Scand J Clin Lab Invest Suppl 216 (1993) 3 - 41
- 28) Green, M.N.
Avidin [Review].
Adv Protein Chem 29 (1975) 85 - 133
- 29) Gundermann, K.D.
Bioluminescence and Chemiluminescence – Basic chemistry and analytical applications“,
De Luca, M.A., McElroy, W.D. (eds.), Academic Press,
New York 17 - 19
- 30) Hoermann, R., Luppá, P., Engelhardt, D.
25jähriger Patient mit Kleinwuchs und männlichem Erscheinungsbild bei fehlenden Testes.
Internist 34 (1993) 1044 - 1048
- 31) Hughes, I.A., Winter, J.S.D.
The application of a serum 17OH-progesterone radioimmunoassay to the diagnosis and management of congenital hyperplasia.
J Pediatr 88 (1976) 766 - 773
- 32) Ishikawa, E., Tamaka, K., Hashida, S., Yamaguchi, K., Uno, T.
Novel and sensitive noncompetitive (two-site) immunoassay for haptens with emphasis on peptides.
Clin Biochem 23 (1990) 445 - 453
- 33) IUPAC.
Steroids 13 (1969) 277

- 34) Karaviti, L.P., Mercado, A.B., Mercado, M.B., Speiser, P.W., Buegeleisen, M., Crawford, C., Antonian, L., White, P.C., New, M.I.
Prenatal diagnosis/treatment in families at risk for infants with steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia).
J Steroid Biochem Mol Biol 41 (1992) 445 - 451
- 35) Kohen, F., Kim, J.B., Lindner, H.R., Collins, W.P.
Development of a solid-phase chemiluminescence immunoassay for plasma progesterone.
Steroids 38 (1981) 73 - 88
- 36) Kricka, L.J.
Chemiluminescent and bioluminescent techniques.
Clin Chem 37 (1991) 1472 - 1481
- 37) Kricka, L.J.
Ultrasensitive immunoassay techniques.
Clin Biochem 26 (1993) 325 - 331
- 38) Landsteiner, K.
„The specificity of serological reactions“
Dover Publications, New York, 1962, 240 - 266
- 39) Löffler, G.
Endokrine Gewebe I: Allgemeine Grundlagen.
In: „Physiologische Chemie“,
Löffler, Petrides (Hrsg.), Springer Verlag,
Berlin-Heidelberg, 1990, 4. Auflage, 643 - 655
- 40) Löffler, G., Arndt, T., Wisser, H., Knoll, E., Kiess, W., Höflich, A., Vogt, W.,
Bidlingmaier, F., Kleesiek, K.
Endokrines System.
In: „Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie“,
Greiling, H., Gressner, A.M. (Hrsg.), Schattauer Verlag,
Stuttgart-New York, 1995, 3. Auflage, 947 - 1063
- 41) Löffler, G., Weiss, L.
Lipide.
In: „Physiologische Chemie“,
Löffler, Petrides (Hrsg.), Springer Verlag,
Berlin-Heidelberg, 1990, 4. Auflage, 55 - 68
- 42) Luppá, P., Brückner, C., Schwab, I., Hauck, S., Schmidmayr, S., Birkmayer, C.,
Paulus, B., Hauptmann, H.
7 α -Biotinylated testosterone derivatives as tracers for a competitive chemiluminescence immunoassay of testosterone in serum.
Clin Chem 43 (1997) 2345 - 2352
- 43) Luppá, P., Brückner, C., Schmidmayr, S., Hauck, S., Paulus, B., Hauptmann, H.
Development of sensitive competitive chemiluminescence immunoassays for testosterone in serum by use of different 3- and 7 α -biotinylated testosterone tracers.
Eur J Clin Chem Clin Biochem 35 (1997) A113

- 44) Lippa, P., Hauck, S., Schwab, I., Birkmayer, C., Hauptmann, H.
6 α -Biotinylated estrone: novel tracer in competitive chemiluminescence immunoassay of estrone in serum.
Clin Chem 41 (1995) 564 - 570
- 45) Lippa, P., Müller, B., Jakob, K., Kimmig, R., Strowitzki, T., Höss, C., Weber, M.M., Engelhardt, D., Lobo, R.A.
Variations of steroid hormone metabolites in serum and urine in polycystic ovary syndrome after nafarelin stimulation: evidence for an altered corticoid excretion.
J Clin Endocrinol Metab 80 (1995) 280 - 288
- 46) Lippa, P., Neumeier, D., Knedel, M.
Evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for the determination of human chorionic gonadotropin in serum.
J Clin Chem Clin Biochem 26 (1988) 705 - 713
- 47) Maeda, M., Arakawa, H., Tsuji, A.
Chemiluminescent assay of various enzyme activities and its application to enzyme immunoassays.
J Biol Chem 264 (1989) 140 - 148
- 48) Mares, A., DeBoever, J., Stans, G., Bosmans, E., Kohen, F.
Synthesis of a novel biotin-estradiol conjugate and its use for the development of a direct, broad range enzyme immunoassay for plasma estradiol.
J Immunol Methods 183 (1995) 211 - 219
- 49) McConway, M.G., Chapman, R.S., Beastall, G.H., Brown, E., Tillman, J., Bonar, J.A., Hutchinson, A., Allison, T., Finlayson, J., Weston, R.
How sensitive are immunometric assays for thyrotropin?
Clin Chem 35 (1989) 289 - 291
- 50) Miller, W.L.
Congenital adrenal hyperplasias.
Endocrinol Metab Clin N Amer 20 (1991) 721 - 749
- 51) Miller, W.L.
Genetics, diagnosis, and management of 21-hydroxylase deficiency.
J Clin Endocrinol Metab 78 (1994) 241 - 246
- 52) Miller, W.L., Morel, Y.
The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency.
Annu Rev Genet 23 (1989) 371 - 393
- 53) Munro, C.J., Lasley, B.L.
Non-radiometric methods for immunoassay of steroid hormones.
In: „Non-radiometric assays. Technology and application in polypeptide and steroid hormone detection.“,
Albertson, B.D., Haseltine, F.P. (eds.), Alan R Liss,
New York, 1988, 289 - 329

- 54) Nahoul, K., Scholler, R.
Comparison of saliva and plasma 17-hydroxyprogesterone time-course response to hCG administration in normal men.
J Steroid Biochem 26 (1987) 251 - 257
- 55) New, M.I., Dupon, B., Grumbach, K., Levine, L.S.
Congenital adrenal hyperplasia and related conditions.
In: „The metabolic basis of inherited disease“,
Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (eds.),
Mc Graw-Hill,
New York, 1983, 5th edition, 973 - 1000
- 56) New, M.I., Lorenzen, F., Lerner, A.J., Kohn, B., Oberfield, S.E., Pollack, M.S.,
Dupont, B., Stoner, E., Levy, D.J., Pang, S., Levine, L.S.
Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data.
J Clin Endocrinol Metab 57 (1983) 320 - 326
- 57) Oellerich, M.
Enzyme-immunoassay: A review.
J Clin Chem Clin Biochem 22 (1984) 895 - 904
- 58) Ostlere, L.S., Rumsby, G., Holownia, P., Jacobs, H.S., Rustin, M.H.A., Honour, J.W.
Carrier status for steroid 21-hydroxylase deficiency is only one factor in the variable phenotype of acne.
Clin Endocrinol 48 (1998) 209 - 215
- 59) Pang, S.
Congenital adrenal hyperplasia.
Endocrinol Metab Clin North Amer 26 (1997) 853 - 891
- 60) Pang, S.Y., Wallace, M.A., Hofman, L., Thuline, H.C., Dorche, C., Lyon, I.C., Dobbins, R.H., Kling, S., Fujieda, K., Suwa, S.
Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.
Pediatrics 81 (1988) 866 - 874
- 61) Passing, H., Bablock, W.
A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods.
J Clin Chem Clin Biochem 21 (1983) 709 - 720
- 62) Pratt, J.J.
Steroid immunoassay in clinical chemistry.
Clin Chem 24 (1978) 1869 - 1890
- 63) Pritchard, P.M., Cormier, M.J.
Studies on the mechanism of the horseradish peroxidase catalyzed luminescent peroxidation of luminol.
Biochem Biophys Res Commun 31 (1968) 131 - 136

- 64) Riad-Fahmy, D., Read, G.F., Walker, R.F., Griffiths, K.
Steroids in saliva for assessing endocrine function.
Endocr Rev 3 (1982) 367 - 395
- 65) Schmidmayr, S.
Aufbau und Evaluierung eines nicht-radioaktiven Immunoassays zur Bestimmung von Testosteron im Serum mittels eines 3-biotinylierten Testosteron-Tracers.
Dissertation, Technische Universität München 1999
- 66) Sherman, B., Wysham, C., Pfohl, B.
Age-related changes in the circadian rhythm of plasma cortisol in man.
J Clin Endocr Metab 61 (1985) 439 - 443
- 67) Siekmann, L.
Determination of steroid hormones by the use of isotope dilution-mass spectrometry: a definite method in clinical chemistry.
J Steroid Biochem 11 (1979) 117 - 123
- 68) Sippell, W.G., Dorr, H.G., Bidlingmaier, F., Knorr, D.
Plasma levels of aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, cortisol, and cortisone during infancy and childhood.
Pediatr Res 14 (1980) 39 - 46
- 69) Sippell, W.G., Bidlingmaier, F., Becker, H., Brünig, H., Dörr, H., Hahn, H., Golder, W., Hollmann, G., Knorr, D.
Simultaneous radioimmunoassay of plasma aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, cortisol and cortisone.
J Steroid Biochem 9 (1978) 63 - 74
- 70) Sokolowski, G., Wood, W.G.
„Radioimmunoassay in Theorie und Praxis: Ein Laborbuch für Anfänger und Fortgeschrittene“
Schnetztor-Verlag, Konstanz, 1981, 11 - 211
- 71) Speiser, P.W., Dupont, J., Zhu, D., Serrat, J., Buegeleisen, M., Tusie-Luna, M.T., Lesser, M., New, M.I., White, P.C.
Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.
J Clin Invest 90 (1992) 584 - 595
- 72) Stamm, D., Büttner, J.
Klinisch-chemische Analytik.
In: „Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie“,
Greiling, H., Gressner, A.M. (Hrsg.), Schattauer Verlag,
Stuttgart-New York, 1995, 3. Auflage, 11 - 14
- 73) Strasburger, C.J., Amir-Zaltsman, Y., Kohen, F.
The avidin-biotin reaction as a universal amplification system in immunoassays.
In: „Non-radiometric assays. Technology and application in polypeptide and steroid hormone detection“,

Albertson, B.D., Haseltine, F.P., (eds.), Alan R Liss,
New York, 1988, 79 - 100

- 74) Strott, C.A., Yoshimi, T., Lipsett, M.B.
Plasma progesterone and 17-hydroxyprogesterone in normal men and children with congenital adrenal hyperplasia.
J Clin Invest 48 (1969) 930 - 939
- 75) Therrell, B.L., Berenbaum, S.A., Manter-Kapanake, V., Simmank, J., Korman, K., Prentice, L., Gonzales, J., Gunn, S.
Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia.
Pediatrics 101 (1998) 583 - 590
- 76) Thilen, A., Nordenstrom, A., Hagenfeldt, L., von Dobeln, U., Guthenberg, C., Larsson, A.
Benefits of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in Sweden.
Pediatrics 101 (1998) E11
- 77) Thorpe, G.H.G., Kricka, L.J.
Incorporation of enhanced chemiluminescent reactions into fully automated enzyme immunoassays.
J Biolum Chemilum 3 (1989) 97 - 100
- 78) Thorpe, G.H.G., Kricka, L.J., Moseley, S.B., Whitehead, T.P.
Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays.
Clin Chem 31 (1985) 1335 - 1341
- 79) Tiefenauer, L.X., Andres, R.Y.
Biotinyl-estradiol derivatives in enzyme immunoassays: structural requirements for optimal antibody binding.
J Steroid Biochem 35 (1990) 633 - 639
- 80) Tiefenauer, L.X., Bodmer, D.M., Frei, W., Andres, R.Y.
Prevention of bridge binding in immunoassays: a general estradiol tracer structure.
J Steroid Biochem 32 (1989) 251 - 257
- 81) Träger, L.
„Steroidhormone: Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung“
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1977, 4 - 27
- 82) Walker, R.F., Read, G.F., Hughes, I.A., Riad-Fahmy, D.
Radioimmunoassay of 17 α -hydroxyprogesterone in saliva, parotid fluid, and plasma of congenital adrenal hyperplasia patients.
Clin Chem 25 (1979) 542 - 545
- 83) Wedell, A.
Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment.
Acta Paediatr 87 (1998) 159 - 164

- 84) White, P.C., New, M.I., Dupont, B.
Structure of human steroid 21-hydroxylase genes.
Proc Natl Acad Sci USA 83 (1986) 5111 – 5115
- 85) White, P.C., New, M.I., Dupont, B.
Congenital adrenal hyperplasia.
N Engl J Med 316 (1987) 1519 - 1524
- 86) Wild, D.
Improving immunoassay performance and convenience.
Clin Chem 42 (1996) 1137 - 1139
- 87) Wood, W.G.
Luminescence immunoassays: problems and possibilities.
J Clin Chem Clin Biochem 22 (1984) 905 - 918
- 88) Wood, W.G., Fricke, H., Haritz, J., Gadow, A., Krausz, H.S., Tode, B., Strasburger, C.J.,
Scriba, P.C.
An evaluation of four different luminescence immunoassay systems: CELIA
(chemiluminescent immunoassay), SPALT (solid-phase antigen luminescence technique),
ILMA (immunoluminometric assay) and ILSA (immunoluminometric labelled second
antibody).
J Clin Chem Clin Biochem 22 (1984) 349 - 356
- 89) Yalow, R.S., Berson, S.A.
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J Clin Invest 39 (1960) 1157 - 1175

8.3. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.1: Strukturformel von Luminol

Abb.2: Syntheseweg der Steroidhormone in der Nebennierenrinde

Abb.3: Steroidgrundgerüst und Bezeichnung der Kohlenstoffatome

Abb.4: 17 α -Hydroxyprogesteron

Abb.5: Assayprinzip für den 17OHP-CLIA

Abb.6: Syntheschema des an Position 7 α -biotinylierten 17OHP-Tracers

Abb.7: Untere Diskriminationsfähigkeit des Assays

Abb.8: Bestimmung der Kreuzreaktivität

Abb.9: Korrekturfaktor-Bestimmung

Abb.10: Standardkurve

Abb.11: Untere Diskriminationsfähigkeit

Abb.12: Linearität

Abb.13: Methodenvergleich 17 α OHP RIA / CLIA Frauenserum

Abb.14: Methodenvergleich 17 α OHP RIA / CLIA Männerserum

Abb.15: Methodenvergleich 17 α OHP ELISA / CLIA Frauenserum

Abb.16: Methodenvergleich 17 α OHP ELISA / CLIA Männerserum

Abb.17: HyperchemTM-Darstellung des sAv/7 α -C₁₁-Bio-T-Komplexes

Tab.1: Intraassay-Präzision

Tab.2: Interassay-Präzision

Tab.3: Wiederfindung nach Aufstockung

Tab.4: Messung von Proben mit bekanntem 17OHP-Gehalt

Tab.5: Ringversuchserum

Tab.6: Kreuzreaktivität

Tab.7: Referenzbereiche

Tab.8: Proben von AGS-Patienten

8.2. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. P. Luppä für die Überlassung des Themas, seine hervorragende Betreuung und das wissenschaftliche Gespräch.

Dem Institutsleiter Herrn Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Bei Herrn Dr. med. H. Hofmeister möchte ich mich für die wissenschaftlichen Anregungen bedanken.

Frau Dr. med. C. Winkler-Braun und Herrn Dr. med. W. Ries danke ich für Ihre Unterstützung bei der Gewinnung von Probenmaterial.

Frau I. Schwab und dem gesamten Laborteam danke ich für Ihre Unterstützung und die Hilfe bei der Durchführung von Laborarbeiten.

Herrn Dr. rer. nat. T. Kaiser danke ich für die gute Zusammenarbeit.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name: Verena Sybille Petzold
Wohnort: Elektrastr. 15
81925 München
Tel.: 089/911336

Geburtstag: 27.01.1973
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1979-1983 Grundschule
1983-1990 Elly-Heuss-Gymnasium, Weiden
1990-1991 Austauschjahr an der Plano East Senior High, Texas, USA
1991-1993 Kollegstufe, Elly-Heuss-Gymnasium, Weiden
09.07.1993 Abitur

Hochschulausbildung

1993-1995 Vorklinisches Studium an der Universität Regensburg
20.09.1995 Ärztliche Vorprüfung
1995-2000 Klinisches Studium an der Technischen Universität München
29.08.1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
23.03.1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999-2000 Praktisches Jahr
Chirurgie: Chirurgische Abteilung, Städt. Krankenhaus München Bogenhausen
Innere Medizin: 2. Medizinische Abteilung, Städt. Krankenhaus München Bogenhausen
Anästhesie: Abteilung für Anästhesie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
11.05.2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

Chirurgie: Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Klinikum Weiden (3/1996)
Innere Medizin: I. Medizinische Klinik, Klinikum Weiden (Kardiologie) (4/1996)
II. Medizinische Klinik, Klinikum Weiden (Gastroenterologie) (9-10/1996)
Gastroenterologische Gemeinschaftspraxis Prof. Ottenjann / Dr. Höchter / Dr. Weingart, München (7-8/1998, 8/1999)
Klinische Chemie: Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (3-4/1997)

Weitere Tätigkeiten aktive Mitarbeit in der internationalen Austauschorganisation
1993-1999

Deutsches Youth for Understanding Komitee, e.V., zwischenzeitlich
Vorsitzende des Arbeitskreises Elternarbeit
1998-1999
Betreuung der Münchner Barrett-Studie der II. Medizinischen
Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität
München in der gastroenterologischen Gemeinschaftspraxis
Prof. Ottenjann / Dr. Höchter / Dr. Weingart, München

Promotion

August 1999: Abschluß Thema: „Aufbau und Evaluierung eines Chemilumineszenz-
des praktischen und Immunoassays zur Bestimmung von 17α -Hydroxyprogesteron im
theoretischen Teils Serum mittels eines 7α -biotinylierten 17α -Hydroxyprogesteron-
Tracers.“
Betreuung durch Herrn PD Dr. Luppä, Institut für Klinische Chemie
und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar der Technischen
Universität München

Publikationen

Birkmayer C, Paulus B, Petzold V, Hauptmann H and Luppä P.
Development and evaluation of a competitive chemiluminescence
assay for 17α -hydroxyprogesterone using a 7α -biotinylated steroid
tracer. Eur J Clin Chem Clin Biochem (1997) 35: A 101.

Ärztliche Tätigkeit

seit 01.06.2000 Ärztin im Praktikum in der II. Medizinischen Klinik, Klinikum
rechts der Isar der Technischen Universität München

München , den 26.06.2000