

**Massenspektrometrische Charakterisierung
endogener Wachstumshormonvarianten und
Entwicklung einer Methode zum Nachweis
rekombinanten Wachstumshormons in humanem Plasma
mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese
zum Einsatz in der Dopinganalytik**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Maxie Kohler

aus Rendsburg

Köln 2009

Gedruckt und veröffentlicht mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität zu Köln

Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Schmalz,

Institut für Organische Chemie, Universität zu Köln

Prof. Dr. W. Schänzer,

Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 22. April 2009

meinen Eltern

Danksagung:

Die praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Schänzer und Herrn Prof. Dr. M. Thevis im Institut für Biochemie/Zentrum für Präventive Dopingforschung an der Deutschen Sporthochschule Köln durchgeführt. Die Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. H.-G. Schmalz und Herrn Dr. M. Schäfer von der Universität zu Köln, Institut für Organische Chemie, betreut.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Schänzer möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme im Institut und für die Unterstützung während der praktischen Arbeiten bedanken.

Herrn Prof. Dr. M. Thevis gilt mein besonderer Dank für die hervorragende Einarbeitung und Unterstützung während der Arbeit sowie die ständige Bereitschaft zu Diskussionen bei stets gewährter Freiheit, eigene Ideen zu verwirklichen.

Herrn Prof. Dr. H.-G. Schmalz danke ich für die freundliche Betreuung und das Interesse, die Arbeit zu betreuen und zu verfolgen. Herrn Dr. M. Schäfer gilt ein besonderer Dank für die Unterstützung in der Massenspektrometrie und die Diskussion offener Fragen.

Herrn Prof. Dr. K. Püschel vom Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, danke ich herzlich für die Bereitstellung der Hypophysen, die sehr ergiebige Zusammenarbeit und die Hilfe in rechtsmedizinischen Fragen. Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Willig vom Endokrinologikum Hamburg für die Bereitstellung von Patientenproben, die das Funktionieren der Methode belegen konnten.

Außerdem möchte ich mich bei allen Probanden bedanken, die sich zu einer Blutabnahme und/oder einem Belastungstest bereit erklärt haben, um die vorliegende Arbeit zu unterstützen.

Ich danke Agilent Technologies für die OFFGEL-Fraktionierung, die für die Charakterisierung der glykosylierten Wachstumshormon-Variante essentiell war.

Mein besonderer Dank gilt meinem Kollegen Herrn Dr. Andreas Thomas, der jederzeit zu Rat und Tat bereit war und die Arbeit damit sehr unterstützt hat. Herrn Dr. Hans Geyer danke ich für motivierende Worte zur rechten Zeit.

Schließlich möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Biochemie/Zentrums für Präventive Dopingforschung für die nette, hilfsbereite Arbeitsatmosphäre und konstruktive Zusammenarbeit danken.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Veröffentlichungen:

- Maxie Kohler, Klaus Püschel, Dimitri Sakharov, Alexander Tonevitskiy, Wilhelm Schänzer, Mario Thevis
Detection of recombinant growth hormone in human plasma by a 2D-PAGE method
Electrophoresis (2008) 29, 4495-4502
- Maxie Kohler, Andreas Thomas, Klaus Püschel, Wilhelm Schänzer, Mario Thevis
Identification of human pituitary growth hormone variants by mass spectrometry
Journal of Proteome Research (2009) DOI: 10.1021/pr8009456, epub 05.01.2009

Tagungsbeiträge und Vorträge:

- Maxie Kohler, Klaus Püschel, Wilhelm Schänzer, Mario Thevis
Mass spectrometric identification of human pituitary growth hormone variants
(Vortrag)
In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (eds.) Recent advances in doping analysis 15. Sport und Buch Strauß, S. 21-31, 2007, Köln
- Maxie Kohler, Klaus Püschel, Wilhelm Schänzer, Mario Thevis
Mass spectrometric identification of human pituitary growth hormone variants (Poster)
Tagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS) 2007, Bremen
- Maxie Kohler, Klaus Püschel, Dimitri Sakharov, Alexander Tonevitskiy, Wilhelm Schänzer, Mario Thevis
Detection Method for recombinant human growth hormone based on 2D-PAGE
(Vortrag)
In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (eds.) Recent advances in doping analysis 16. Sport und Buch Strauß, S. 233-243, 2008, Köln
- Maxie Kohler, Klaus Püschel, Wilhelm Schänzer, Mario Thevis
Wachstumshormonisoformen in der Hypophyse und im Plasma (Poster)
Tagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS) 2008, Gießen

- Maxie Kohler, Klaus Püschel, Wilhelm Schänzer, Mario Thevis
Anwendung der 2D-Elektrophorese in der Dopinganalytik: Charakterisierung hypophysären Wachstumshormons und Entwicklung einer Methode zum Nachweis von rekombinantem Wachstumshormon im Plasma (Vortrag)
GE Healthcare Workshop 2008, Köln
- Maxie Kohler, Andreas Thomas, Wilhelm Schänzer, Mario Thevis
Orbitrap-Massenspektrometrie-basierte Methoden in der Dopinganalytik (Vortrag)
Thermo Anwenderforum 2008, Marburg

Inhaltsverzeichnis:

1	<u>ENGLISH ABSTRACT.....</u>	<u>12</u>
2	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>14</u>
3	<u>EINLEITUNG</u>	<u>16</u>
4	<u>LITERATURBESPRECHUNG</u>	<u>18</u>
4.1	WACHSTUMSHORMON (GH).....	18
4.1.1	GESCHICHTE.....	18
4.1.2	DER WACHSTUMSHORMON GENLOCUS UND PROLAKTIN	19
4.1.3	BIOCHEMIE.....	19
4.1.4	RÄUMLICHE STRUKTUR	21
4.1.5	ENDOKRINOLOGIE.....	22
4.1.5.1	PULSATILE FREISETZUNG VON WACHSTUMSHORMON.....	23
4.1.5.2	FUNKTIONEN UND WIRKUNGSMECHANISMEN.....	24
4.1.5.3	BELASTUNGSINDUZIERTER WACHSTUMSHORMONAUSCHÜTTUNG	27
4.1.6	PATHOLOGIE: AKROMEGALIE UND WACHSTUMSHORMONMANGEL	28
4.1.7	PHARMAKOLOGIE UND PHARMAZEUTISCHE PRODUKTE.....	29
4.1.8	MISSBRAUCH IM SPORT	30
4.1.9	WACHSTUMSHORMON ALS ANTI-AGING-MITTEL.....	32
4.1.10	ANSÄTZE FÜR NACHWEISVERFAHREN IN DER DOPINGKONTROLLE.....	33
4.1.11	ZUSAMMENFASSUNG WICHTIGER DATEN ZUM WACHSTUMSHORMON	35
4.2	PROTEINBIOCHEMIE UND ANALYTIK.....	36
4.2.1	POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN VON PROTEINEN.....	36
4.2.2	MASSENSPEKTROMETRIE VON PEPTIDEN UND PROTEINEN	39
4.2.2.1	MASSENANALYSATOREN ZUR ANALYSE VON PEPTIDEN UND PROTEINEN	39
4.2.2.2	MASSENSPEKTREN VON PEPTIDEN UND PROTEINEN NACH ELEKTRO- ODER NANOSPRAY- IONISATION	41
4.2.3	ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE (2D-PAGE).....	43
4.2.4	IMMUNOAFFINITÄTSAUFREINIGUNG (IAP).....	45
4.2.5	NACHWEIS VON PEPTIDHORMONEN IN DER DOPINGANALYTIK.....	46

5	<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	48
5.1	MASSENSPEKTROMETRISCHE CHARAKTERISIERUNG VON HYPOPHYSÄREM WACHSTUMS- HORMON	48
5.1.1	HYPOPHYSEN	48
5.1.2	2D-PAGE	48
5.1.3	<i>DIFFERENCE GEL ELECTROPHORESIS</i> (DIGE)	48
5.1.4	TRYPsin- UND GLUC-VERDAU	49
5.1.5	OFFGEL-FRAKTIONIERUNG UND SDS-PAGE	52
5.1.6	ULTRAFILTRATION ZUR ANALYSE VON WACHSTUMSHORMON-FRAGMENTEN	52
5.1.7	FLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE/MASSENSPEKTROMETRIE	53
5.1.7.1	NANO-LC/LTQ ORBITRAP-MS	53
5.1.7.2	KAPILLAR-LC/LTQ ORBITRAP-MS	54
5.1.7.3	LC/ API QTRAP 4000-MS	55
5.2	ENTWICKLUNG EINER DOPINGKONTROLLMETHODE ZUM NACHWEIS VON WACHSTUMSHORMON AUS HUMANEM PLASMA	56
5.2.1	PLASMAPROBEN UND WACHSTUMSHORMONKONZENTRATIONEN	56
5.2.2	WACHSTUMSHORMONKONZENTRATIONEN	57
5.2.3	STANDARDLÖSUNGEN	57
5.2.4	PROBENVORBEREITUNG	57
5.2.4.1	IMMUNOAFFINITÄTSAUFREINIGUNG	60
5.2.4.2	2D-PAGE UND IMMUNOBLOT	60
5.2.5	AUSWERTUNG	61
5.2.6	VALIDIERUNG	61
6	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	63
6.1	MASSENSPEKTROMETRISCHE CHARAKTERISIERUNG	63
6.1.1	2D-PAGE UND TRYPsinVERDAU	63
6.1.2	SPLICE-VARIANTE	64
6.1.3	VERSCHIEBUNG DES pI INS BASISCHE	65
6.1.4	VERSCHIEBUNG DES pI INS SAURE: PHOSPHORYLIERTES WACHSTUMSHORMON	65
6.1.5	GLYKOSYLIERTES WACHSTUMSHORMON	68
6.1.6	WACHSTUMSHORMONFRAGMENTE	72
6.1.7	OXIDATIONEN	74
6.1.7.1	TRYPTOPHANOXIDATION	75
6.1.7.2	OXIDATION VON HISTIDIN	78
6.2	VERGLEICH ENDOGENEN UND REKOMBINANTEN GHS MITTELS DIGE	80

6.3	ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUM NACHWEIS VON REKOMBINANTEM WACHSTUMSHORMON AUS HUMANEM PLASMA.....	81
6.3.1	VALIDIERUNG	85
6.3.1.1	SPEZIFITÄT	86
6.3.1.2	LINEARITÄT UND NACHWEISGRENZE	86
6.3.1.3	PRÄZISION	88
6.3.1.4	WIEDERFINDUNG	89
6.3.2	REFERENZPOPULATION UND FESTLEGUNG EINER UNTERSCHIEDUNGSGRENZE.....	90
6.3.3	PATIENTENPROBEN	92
6.3.4	EINFLUSS VON KÖRPERLICHER BELASTUNG AUF DIE ANALYSE.....	95
6.3.5	HGH TAGESPROFIL	96
7	<u>SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK</u>	98
8	<u>ANHANG.....</u>	99
8.1	AMINOSÄUREN	99
8.2	MASSENSPEKTREN UND DETEKTIERTE PEPTIDE.....	100
8.2.1	MS/MS-SPEKTREN VON GH-PEPTIDEN NACH TRYPSINVERDAU	100
8.2.2	MS/MS-SPEKTREN VON GH-PEPTIDEN NACH GLUC-VERDAU	110
8.3	AUFLISTUNG DETEKTIERTER PEPTIDE IN DEN SPOTS 1-10 AUF ABB. 16.....	113
8.4	REAGENZIIEN, REFERENZSUBSTANZEN UND VERWENDETE GERÄTE.....	117
9	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	121
10	<u>LITERATUR.....</u>	123

1 English Abstract

Human endogenous growth hormone is produced in the pituitary and is one of the most important growth-promoting factors in the human body. Besides, it has several important metabolic functions such as lipolysis, protein anabolism, regulation of bone metabolism and has influence on the immune system and mineral balance. Due to those endocrinological properties and mainly the improvement of the muscle-to-fat ratio, growth hormone is used as performance enhancing agent by athletes, and the use is prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA).

Endogenous human growth hormone consists of several variants and isoforms with a 22 kDa-variant being the main growth hormone isoform. Beside that, a splice variant as well as e.g. phosphorylated or deamidated variants and fragments or polymers were detected. The 22 kDa-isoform accounts for about 90% of total growth hormone in the body and is identical to the homogenous recombinant growth hormone. Therefore, a test method needs to detect and evaluate low concentrated endogenous variants that are not present in the recombinant protein. The presented work was carried out to develop a method to detect recombinant human growth hormone from plasma samples by immunoaffinity purification, two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. Additionally, the detected endogenous variants were identified by high resolution/high accuracy mass spectrometry.

The method uses a polyclonal anti-growth hormone antibody and a secondary antibody, which is coupled to magnetic beads to isolate growth hormone from 1 mL of plasma. Additionally, an internal standard (placental lactogen) is added prior to the immunoaffinity purification. After 2D-electrophoresis proteins are visualized by immunoblotting and chemiluminescent detection. The whole procedure takes 2.5 days and allows the simultaneous preparation of six samples. The method was validated regarding the analytical parameters specificity, linearity, limit of detection (0.3 ng/ml), precision (14%) and recovery (30%). The influence of an exercise-induced growth hormone release was tested and found not to affect the analysis by discriminating isoforms. To prove the performance of the method to differentiate endogenous from recombinant growth hormone, a reference population was tested and discrimination limits in the form of normalized spot volumes of the main 22 kDa spot on the membrane were determined. Samples with a normalized spot volume of > 0.52 of the main spot (and therefore the main growth hormone variant) need to show at least one additional growth hormone variant on the blot. If not, it is evaluated as containing recombinant growth hormone. Plasma samples from patients with growth hormone deficiency

or idiopathic short stature that need to inject recombinant growth hormone were clearly positive and fulfilled the criteria defined from the reference group data. The test is a valuable complementation to the analysis currently used and should be implemented as confirmation test.

The mass spectrometric characterization of growth hormone was focused on the four endogenous spots that are detected by the doping control method. Those were identified as 1) the 22 kDa main isoform, 2) a 20 kDa splice variant, 3) a phosphorylated variant with modifications at Ser 106 or Ser 150 and 4) a glycosylated variant being glycosylated presumably at threonine 60. The glycosylation is a mucin-type O-glycosylation and was identified to consist of a hexose (Hex), a N-acetylated hexosamine (HexNAc) and two sialic acid residues (NeuAc). Additionally, fragments of 9 and 12 kDa as well as different oxidation products were identified.

The characterization of variants that are detected by an immunological method is essential to enable the evaluation of results and atypical findings. Furthermore, the characterization of new isoforms, as for example the glycosylation, can clarify functions of growth hormone, and endocrinological studies may follow to identify further functions or metabolic pathways. Therefore the conducted studies are important for anti-doping research as well as for endocrinologists and clinical applications.

2 Zusammenfassung

Humanes endogenes Wachstumshormon wird in der Hypophyse produziert und ist einer der wichtigsten Wachstumsregulatoren im menschlichen Körper. Außerdem hat Wachstumshormon eine Fülle metabolischer Funktionen wie Fettabbau und Muskelaufbau und hat Einfluss auf den Knochen- sowie Mineralstoffhaushalt. Besonders aufgrund der endokrinen Wirkungen auf Lipolyse und Proteinanabolismus wird Wachstumshormon im Sport zur Leistungssteigerung eingesetzt, und dessen Verwendung ist von der Welt Anti-Doping Agentur (WADA) verboten.

Endogenes Wachstumshormon ist ein heterogenes Protein und besteht aus vielen Varianten und Fragmenten. Die Hauptform, die etwa 90% des Wachstumshormons im Körper ausmacht, ist 22 kDa groß und entspricht dem rekombinanten Wachstumshormon. Andere bereits identifizierte Formen sind eine 20 kDa Splice-Variante, phosphorylierte und deamidierte Formen und Fragmente sowie Polymere. Eine Testmethode zur Detektion rekombinanten Wachstumshormons muss daher die niederkonzentrierten, für endogenes Wachstumshormon spezifischen Formen detektieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Dopingkontrollmethode entwickelt, die Wachstumshormon aus humanem Plasma durch Immunoaffinitätsaufreinigung, 2D-Elektrophorese und Immunoblot detektiert und die Unterscheidung von endogenem und rekombinanten Wachstumshormon ermöglicht. Des Weiteren wurden die in der Methode detektierten endogenen Formen mittels hochauflösender/hochakkurater Massenspektrometrie identifiziert.

Die Immunoaffinitätsaufreinigung dient zur Isolation des Wachstumshormons und des zugegebenen internen Standards (plazentares Laktogen) mittels eines polyklonalen anti-Wachstumshormon-Antikörpers und, an einen sekundären Antikörper gekoppelten, magnetischen Beads. Nach Auftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese werden die Proteine mittels Immunoblot und Chemilumineszenzreaktion visualisiert.

Die Prozedur detektiert bis zu vier endogene Wachstumshormonvarianten, erlaubt die Analyse von sechs Proben in einer Aufarbeitung und nimmt 2 ½ Tage in Anspruch. Die Methode wurde unter Berücksichtigung der analytischen Parameter Spezifität, Linearität, Nachweisgrenze (0,3 ng/ml), Präzision (14%) und Wiederfindung (30%) validiert. Der Einfluss einer belastungsinduzierten Wachstumshormonausschüttung auf die Detektion unterschiedlicher Varianten wurde mittels eines Belastungstests geprüft und ergab keine Diskriminierung endogener Formen. Um Grenzwerte für die Präsenz rekombinanten Wachstumshormons in einer Probe festlegen zu können wurden Proben einer Referenzgruppe gesunder Probanden sowie Proben von Patienten gemessen, die rekombinantes

Wachstumshormon applizieren. Aus der Referenzpopulation wurde ein Unterscheidungslimit von 0,52 für das auf den internen Standard normierte Spotvolumen der 22 kDa-Hauptform errechnet. Proben mit einem normierten Spotvolumen der 22 kDa-Hauptform $> 0,52$ müssen, wenn sie endogenes Wachstumshormon enthalten, mindestens eine weitere Form (die 20 kDa Splice-Variante) zeigen. Ist dies nicht der Fall, wird die Schlussfolgerung gezogen, dass die Probe rekombinantes Wachstumshormon enthält. Die Werte der analysierten Patientenproben lagen weit über dem Unterscheidungslimit und konnten eindeutig als Proben identifiziert werden, die rekombinantes Wachstumshormon enthalten. Der entwickelte Test ist damit eine wertvolle Ergänzung und sollte als Bestätigungsmethode zu dem bisher verwendeten Immunoassay eingesetzt werden.

Die massenspektrometrische Identifizierung konzentrierte sich auf die vier endogenen Spots, die in der Dopingkontrollmethode detektiert werden. Diese wurden identifiziert als 1) 22 kDa-Hauptform, 2) 20 kDa Splice-Variante, 3) phosphorylierte Form mit Modifikationen an Serin 106 und 150 und 4) einer glykosylierten Form, die vermutlich an Threonin 60 modifiziert ist. Die Glykosylierung ist eine O-Glykosylierung vom Mucin-Typ und die Struktur wurde als Verknüpfung einer Hexose (Hex) mit einem N-acetylierten Hexosamin (HexNac) und zwei Sialinsäuren (NeuAc) identifiziert. Zusätzlich wurden Fragmente mit 9 und 12 kDa sowie unterschiedliche oxidierte Formen detektiert.

Die massenspektrometrische Charakterisierung von Varianten und Isoformen, die in einer auf immunologischen Techniken beruhenden Methode detektiert werden, ist entscheidend, um Ergebnisse bewerten und ungewöhnliche Werte besser einordnen zu können. Des Weiteren kann die Identifizierung neuer Varianten eines Proteins zur Aufklärung von Funktionen und Signalwegen beitragen. Damit sind die hier vorgestellten Ergebnisse sowohl für die Dopinganalytik als auch für die Endokrinologie sehr bedeutsam.

3 Einleitung

Wachstumshormon (GH) wird therapeutisch zur Behandlung von Kleinwuchs oder Wachstumshormonmangel im Erwachsenenalter eingesetzt. Neben der Verwendung in der Medizin wird es seit vielen Jahren zur Leistungssteigerung im Breiten- und Leistungssport missbraucht. Erste Beschreibungen stammen aus den frühen 1980er Jahren [1]. Seit Ende der 80er Jahre ist rekombinantes Wachstumshormon verfügbar, welches den Einsatz des Wachstumshormons aus Hypophysen von Leichen aufgrund der Infektionsgefahr z.B. mit der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit schnell großteils ersetzte [2,3]. Die Wirkungen des Wachstumshormons, die es für Athleten interessant macht, sind vielfältig, obwohl viele physiologische Wirkungen im gesunden Menschen umstritten sind. Die wesentlichen Effekte, die von Sportlern oder ihren Betreuern beschrieben werden, sind Muskelaufbau und Fettabbau. Es wird aber auch über verbesserte Ausdauerkapazität und schnellere Regeneration berichtet. Im Sport sind Wachstumshormon und andere Peptidhormone wie Insulin oder Erythropoietin seit 1989 verboten [4]. Die Entwicklung leistungsfähiger Nachweisverfahren für Wachstumshormon lieferte bis heute zwei unterschiedliche Ansätze. Der derzeit verwendete Test basiert auf der Heterogenität endogenen Wachstumshormons. Das in der Hypophyse synthetisierte Wachstumshormon ist in seiner Hauptform dem rekombinanten Protein identisch. Weitere endogene Formen wie eine 20 kDa Splice-Variante und Varianten, die posttranslational modifiziert wurden sowie Dimere oder Fragmente, zirkulieren im menschlichen Körper [5], werden aber in dem homogenen, rekombinanten, 22 kDa großen Hormon nicht detektiert. Durch negative Rückkopplung wird bei Applikation rekombinanten GHs die endogene Freisetzung unterdrückt und das Verhältnis der 22 kDa-Hauptform zu anderen endogenen Varianten verändert, wodurch ein Dopingvergehen detektiert werden kann. Der Test basiert auf zwei Immunoassays mit unterschiedlichen Antikörpern: Der eine bindet ausschließlich an die 22 kDa-Hauptform und damit auch das rekombinante GH, der Antikörper des zweiten Assays bindet vorwiegend an alle anderen endogenen Formen. Der Quotient der beiden Messungen wird zur Bewertung der Proben herangezogen. Der zweite Testansatz basiert auf indirekten Parametern aus dem IGF-I-Stoffwechsel und Knochenumsatzmarkern. Dieser Test ist noch in der Entwicklung und die Verwendung indirekter Tests bedarf einer sehr ausführlichen Prüfung möglicher Einflussparameter [6-9].

In dieser Arbeit wird die massenspektrometrische Charakterisierung unterschiedlicher endogener Wachstumshormonvarianten sowie die Entwicklung einer Dopingkontrollmethode zum Nachweis rekombinanten Wachstumshormons in humanem Plasma vorgestellt. Die Dopingkontrollmethode ist wie der derzeit verwendete Assay ein direkter Nachweis. Im

Unterschied zu diesem Test sollen in der hier dargestellten Methode diskrete Wachstumshormonformen detektiert werden. Das Wachstumshormon soll über Immunoaffinitätsaufreinigung aus dem Plasma isoliert, die unterschiedlichen endogenen Formen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend mittels Immunfärbung detektiert werden. Im Anschluss an die Entwicklung der Methode soll diese nach analytischen Parametern validiert und Kriterien zur Bewertung verdächtiger Proben vorgeschlagen werden. Die massenspektrometrische Charakterisierung konzentriert sich auf die in dieser Methode detektierten Varianten. Dies ist entscheidend für die Bewertung der Resultate und die Einordnung ungewöhnlicher Proben. Des Weiteren kann eine möglichst detaillierte Charakterisierung von Modifikationen endokrinologische Funktionen aufdecken oder erklären und ist damit auch für klinische Bereiche von großer Bedeutung.

4 Literaturbesprechung

4.1 Wachstumshormon (GH)

4.1.1 Geschichte

Die Geschichte des Wachstumshormons (GH) selbst beginnt in den 1920er Jahren. Die ersten Beobachtungen und Dokumentationen zu den wachstumsfördernden Eigenschaften der Hypophyse (Hirnanhangdrüse), in welcher das Wachstumshormon produziert wird, stammen aus den ersten Jahren des 20. Jahrhunderts. Bereits 1909 führte Harvey Cushing eine partielle Hypophysektomie an einem Akromegalie-Patienten durch, der weitere 21 Jahre lebte und dessen Symptome innerhalb von Monaten deutlich zurückgingen [10]. Der Begriff der Akromegalie und die Beschreibung der Symptome stammt von Pierre Marie 1885 [11]. Im Jahre 1921 wurde das Wachstumshormon entdeckt [11] und im Laufe der nächsten Jahre eine Reihe von Versuchen an Ratten und Hunden durchgeführt. Es wurde starkes Wachstum beobachtet, nachdem Ratten Hypophysenextrakt (vom Rind) injiziert wurde [12] während wenige Jahre später nach Hypophysektomie verlangsamtes Wachstum festgestellt wurde, welches durch Injektion von Hypophysenextrakt ausgeglichen werden konnte [13]. In den 1940er Jahren gelang es Li und Evans Wachstumshormon aus einer Rinderhypophyse zu isolieren [14], wobei auch schon früher unterschiedliche Extraktionsmethoden getestet wurden [11]. Im Jahre 1969 machten sie den ersten Vorschlag der Aminosäuresequenz, der aber in den Folgejahren noch zweimal korrigiert werden musste. Die erste Behandlung eines Kleinwüchsigen mit aus Leichen isoliertem, humanem Wachstumshormon, wurde 1958 beschrieben [15] und 1985 die Infektion mit der Creutzfeld-Jakob Krankheit mit der Administration von Leichenwachstumshormon in Verbindung gebracht [3]. Daraufhin wurde die Medikation mit humanem, endogenem Wachstumshormon weitestgehend eingestellt und die Verwendung des im gleichen Jahr verfügbaren rekombinanten Wachstumshormons aus *E.coli*-Zellen bevorzugt [2]. Rekombinantes Wachstumshormon wird auch heute zur Behandlung von Klein- und Zwergwuchs, sowie Wachstumshormonmangel im Erwachsenenalter verwendet. Weitere mögliche Einsatzgebiete die untersucht werden sind Krankheiten, die zu katabolen Zuständen führen, wie beispielsweise AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), Sepsis, Verbrennungen oder große Operationen, häufig auch im Zusammenhang mit Krebserkrankungen. Auch wenn Studien den erhofften Ausgleich der negativen Stickstoffbilanz und des Proteinkatabolismus belegen, wurde der Behandlung auch eine erhöhte Sterblichkeit von Schwerkranken, mit GH behandelten Patienten nachgewiesen,

so dass der Einsatz in diesen Gebieten noch detaillierter erforscht werden muss, bevor eine Anwendung in der Medizin denkbar ist [16-19].

4.1.2 Der Wachstumshormon Genlocus und Prolaktin

Der Wachstumshormon/Laktogen-Gencluster ist auf dem langen Arm des Chromosom 17 (17q 22-24) lokalisiert und enthält 5 Gene. Zwei Gene, hGH-N und hGH-V, codieren für zwei Wachstumshormon-Formen, welche sich in 7% der Aminosäuren unterscheiden. Die daraus entstehenden Proteine werden ebenso als hGH-N (normal) und hGH-V (variant) bezeichnet, wobei hGH-N in der Hypophyse exprimiert wird, während hGH-V das plazentare Wachstumshormon ist. Die drei weiteren Gene codieren für drei Laktogenformen, die ebenfalls in fetalen synzytiotrophoblastischen Zellen der Plazenta exprimiert werden [20]. Eines der plazentaren Laktogene (*Chorionic somatomammotropin hormone 1*) wird im Rahmen dieser Arbeit als interner Standard verwendet. Das hGH-N Gen enthält 5 Exons und vier Introns [21,22].

Ein weiteres sequenzähnliches und evolutionär mit dem GH verwandtes Protein ist Prolaktin. Das Gen des Prolaktins liegt beim Menschen auf Chromosom 6. Prolaktin wird wie Wachstumshormon in der Hypophyse produziert und ist für das Wachstum der Brustdrüse während der Schwangerschaft und für die Milchsekretion während der Stillzeit verantwortlich. Damit hängt es funktionell mit hGH-V und Laktogen zusammen, die ebenso für die Entwicklung des Embryos zuständig sind. Humanes Prolaktin und humanes hypophysäres Wachstumshormon haben eine Sequenzhomologie von etwa 60 % und unterscheiden sich in der Länge der Aminosäuresequenz [23].

4.1.3 Biochemie

Endogenes humanes Wachstumshormon (hGH) ist in seiner aktiven Hauptform ein 22 kDa (MW (monoisotopisch): 22111,0409 Da, MW(mittleres): 22125,0597 Da) großes Protein mit 191 Aminosäuren, vier Cysteinresten, zwei Disulfidbrücken (Cys 53-Cys 165, Cys 182-Cys 189) und einem isoelektrischen Punkt von 5,27. Es wird als Vorläuferprotein mit 217 Aminosäuren von dem Gen hGH-N abgelesen und das Signalpeptid cotranslational abgespalten [5]. Die Aminosäuresequenz des aktiven Proteins ist in Abb. 1 aufgelistet.

1	11	21	31	41
FPTIPLSRLF	DNAMLRAHRL	HQLAFDITYQE	FEEAYIPKEQ	KYSFLQNPQT
51	61	71	81	91
SLCFSESIPT	PSNREETQQK	SNLELLRISL	LLIQSWLEPV	QFLRSVFANS
101	111	121	131	141
LVYGASDSNV	YDLLKDLEEG	IQTLMGRLED	GSPRTGQIFK	QTYSKFDTNS
151	161	171	181	191
HNDDALLKNY	GLLYCFRKDM	DKVETFLRIV	QCRSVEGSCG	F

Abb. 1 Aminosäuresequenz von hGH.

Neben der 22 kDa-Hauptform (~90 %) existiert eine Vielzahl von Isoformen und Varianten, die sowohl auf Transkriptionsebene als auch posttranslational gebildet werden. Alternatives Splicen von Exon 3 resultiert im Wesentlichen in einer 20 kDa-Variante (5-10%), der im Vergleich zu der 22 kDa-Form die Aminosäuren 32-46 fehlen [22,24,25], was auch zu einem etwas basischeren pI von 5,33 führt. Außerdem wurden 17,0 und 17,8 kDa große Splicevarianten nachgewiesen, diese existieren jedoch nur zu einem sehr kleinen Anteil [26]. Posttranslational konnten Phosphorylierungen an den Serinresten 51, 106 und 150 [27-29] massenspektrometrisch identifiziert werden und Glykosylierungen wurden nach chemischer oder enzymatischer Deglykosylierung und Natrium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in 12, 24, und 34 kDa-Formen postuliert [30-32]. Die Glykosylierungen der 12 kDa- und 34 kDa-Formen konnten durch Behandlung mit N-Glykosidase gespalten werden. Daraus wurde geschlossen, dass diese Formen von einem anderen Gen stammen, da es in der Aminosäuresequenz des hGH-N Transkripts kein Sequenz-Motiv (Asn-Xxx-Ser/Thr) für eine N-Glykosylierung gibt [30,32]. Des Weiteren wurden Deamidierungen [27], Acylierung des N-Terminus und Fragmente mit 5 und 17 kDa, sowie 6 und 16 kDa [33,34] nachgewiesen. Die 6- und 16 kDa-Fragmente wurden als Artefakt aus der Extraktion der Hypophysen und der Lagerung der Extrakte beschrieben [26]. Nicht-kovalente Dimere konnten zwischen 22 kDa- oder 20 kDa-Molekülen, sowie als Kombination der beiden nachgewiesen werden und kovalente Dimere bestehend 22 kDa-Formen, sowie aus 22 kDa-20 kDa-Varianten wurden detektiert [5,35]. Es wurden Disulfidbrückendimere beschrieben, die besonders stabil sind und unter gewöhnlichen reduzierenden Bedingungen nicht gespalten werden [36,37]. Des Weiteren wurden unterschiedliche polymere Formen registriert (Abb. 2).

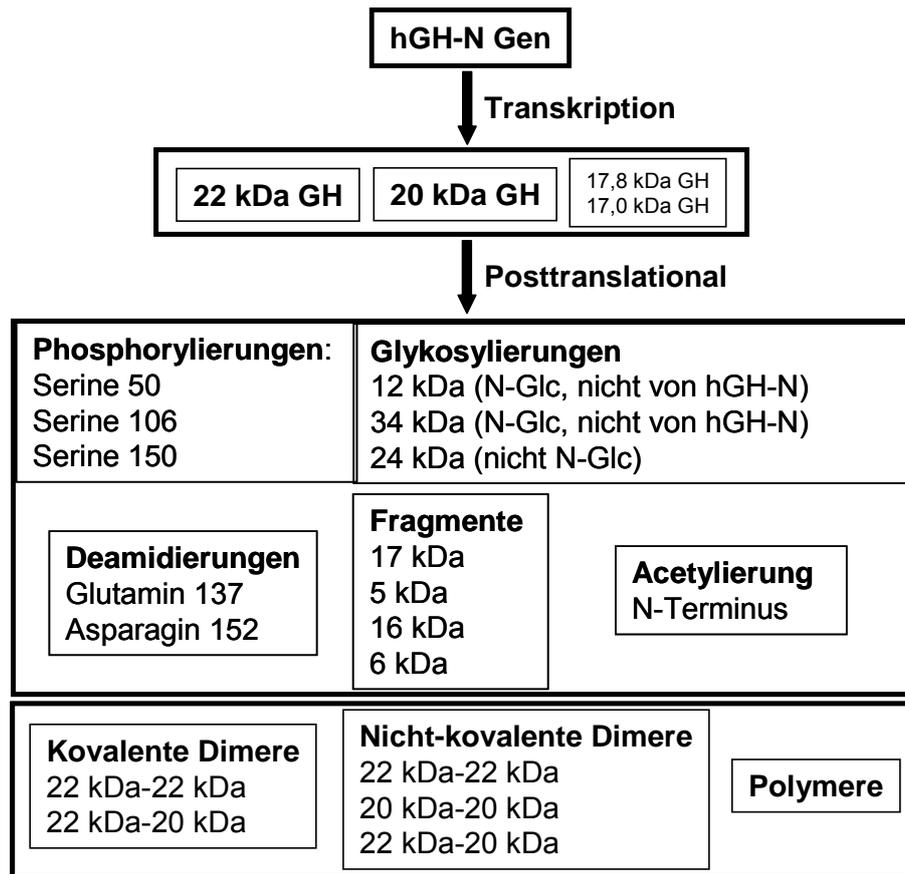


Abb. 2 Modifikationen von endogenem, humanem Wachstumshormon.

Weitere interindividuelle Variation endogenen Wachstumshormons entsteht durch zwei unterschiedliche Bindungsproteine, deren Affinität für die verschiedenen Formen variiert und damit die Zirkulationszeiten beeinflusst. So hat beispielsweise die 20 kDa-Splicevariante eine höhere Affinität und damit längere Zirkulationszeit, als die unmodifizierte 22 kDa-Form [5]. Einigen der endogenen Formen wurden von der 22 kDa-Form abweichende oder sogar antagonistische Wirkungen zugesprochen, andere Formen konnten bisher nicht erklärt werden. Die Wirkungen unterschiedlicher GH-Varianten werden in 4.1.5.2 beschrieben.

4.1.4 Räumliche Struktur

Die dreidimensionale Struktur von Wachstumshormon ist in Abb. 3 gezeigt und besteht aus 4 Helices im Bereich der Aminosäuren 7-34, 75-87, 106-127 und 152-183 [38]. Durch die vier Cysteinreste und zwei Disulfid-Brücken entstehen ein großer und ein kleiner Loop, die für Wachstumshormon aller Vertebraten charakteristisch sind (Abb. 3, rechts).

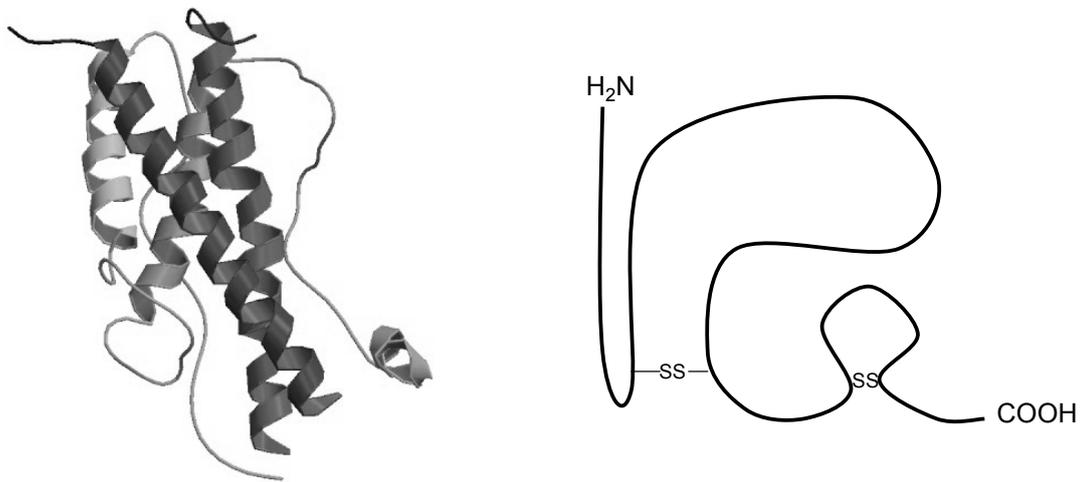


Abb. 3 Struktur von Wachstumshormon [39], links: 3D-Struktur, rechts: 2 Loops durch Disulfidbrücken.

Wachstumshormon hat zwei Rezeptorbindungsregionen. Die erste Bindungsstelle liegt in Helix 4 und dem Loop mit den Aminosäuren 54-74. An der Bindung des zweiten Rezeptors sind die Helices 1 und 3 beteiligt, von denen besonders die Aminosäurereste Asn-12, Arg-16 und Arg-19 mit der Rezeptorbindung in Verbindung gebracht wurden. Wachstumshormon besitzt eine Metallbindungsstelle mit hoher Affinität für divalente Metallionen (z.B. Zink). Diese wird von His 18 und His 21 aus Helix 1 und Glu 174 aus Helix 4 gebildet [40-42].

4.1.5 Endokrinologie

Wachstumshormon (hGH-N) wird in somatotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens produziert und pulsatil ausgeschüttet. Eine Hypophyse (Hirnanhangdrüse) enthält etwa 5-15 mg Wachstumshormon [43].

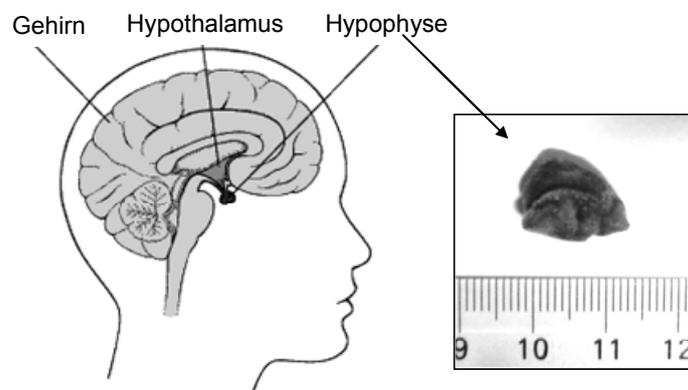


Abb. 4 Schema eines Kopfes mit Hypophyse und Hypothalamus [44] und Foto einer Hypophyse aus einer Leiche am Zentimetermaß.

Die Hauptregulatoren der pulsatilen GH-Ausschüttung sind Somatostatin (SST, hemmend) und *Growth Hormone Releasing Hormone* (GHRH, Somatoliberin, stimulierend) aus dem Hypothalamus (Abb. 4), die durch eine Vielzahl von Faktoren die pulsatile Ausschüttung von Wachstumshormon aus der Hypophyse beeinflussen.

4.1.5.1 Pulsatile Freisetzung von Wachstumshormon

Durch die pulsatile Ausschüttung, die durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus gesteuert wird, variieren die Mengen in der Blutbahn und liegen zwischen $< 0,5$ ng/ml und etwa 25 ng/ml. Die regelmäßige Pulsatilität folgt bestimmten Regeln und wird von vielen Faktoren beeinflusst. Die tägliche Produktion von Wachstumshormon ist bei Frauen (~ 47 $\mu\text{g/l}$) etwa dreifach so hoch wie bei Männern (~ 15 $\mu\text{g/l}$) [45-47], was durch höhere und länger andauernde Freisetzungspulse erklärt werden konnte. Entsprechend ist auch die durchschnittliche Konzentration im Serum unterschiedlich (Frauen $\sim 0,78$ $\mu\text{g/l}$, Männer $\sim 0,27$ $\mu\text{g/l}$) [47]. Ein Intra-Individuum-Vergleich der GH-Pulsfrequenz aufeinanderfolgender Tage und der Wachstumshormonmenge pro Puls zeigte, dass diese Parameter innerhalb eines Probanden sehr konstant sind [48]. Während die GH-Menge, die täglich freigesetzt wird, bis zur Pubertät zunimmt, sinkt sie anschließend um etwa 14 % pro Dekade. Die Häufigkeit der Pulse hängt außerdem vom Geschlecht ab und liegt zwischen 6 und 18 pro Tag [49,50]. Im zirkadianen Rhythmus ist die GH-Freisetzung nachts am höchsten. Die GH-Freisetzung wird außerdem durch Kälte und Adipositas gehemmt, wohingegen eine Erhöhung der Körpertemperatur, NREM (*non-rapid eye movement*)-Schlaf oder körperliche Belastung die GH-Freisetzung stimuliert. Die belastungsinduzierte GH-Ausschüttung wird in 4.1.5.3 detaillierter beschrieben.

Neben diesen globalen Einflussfaktoren gibt es pharmakologische bzw. metabolische Signale, die die Ausschüttung beeinflussen (Tabelle 1). Der Rückkopplungsmechanismus wird über zwei wesentliche Hypothalamuspeptide, Somatostatin und GHRH, gesteuert, die hemmend oder stimulierend auf die GH-Freisetzung wirken [51,52]. Der Wachstumshormon-Spiegel selbst und der des Hauptmediators IGF-I (insulin-like growth factor I, Somatomedin C) wirken sowohl direkt auf die Hypophyse als auch über SST im Hypothalamus hemmend auf die weitere Ausschüttung von GH.

Tabelle 1 Faktoren, die die GH-Ausschüttung über Somatostatin und GHRH beeinflussen [51].

Hemmende Einflüsse – Wirkung über Somatostatin	Stimulierende Einflüsse – Wirkung über GHRH
Hyperglykämie	Aminosäuren (v.a. Arginin)
Hyperlipidämie	Hypoglykämie
Gestagene	Glukagon
Kortisol	Schilddrüsenhormone
Somatomedine (IGF-I, IGF-II)	Östrogene
<i>Thyrotropin Releasing Hormone</i> (TSH)	Dopamin
Adrenalin (über β -Rezeptoren)	Serotonin
GABA	Noradrenalin (über α -Rezeptoren)
Adipositas	Endorphine
Kälte	NREM-Schlaf
	Stress

GABA = γ -Aminobuttersäure, NREM = *non-rapid eye movement*, GHRH = *Growth Hormone Releasing Hormone*

GH-Messungen werden gewöhnlich aus Blutproben durchgeführt. Wachstumshormon wurde auch in Urin und Speichel nachgewiesen, wobei die Mengen deutlich kleiner sind als im Blut (Urin 1:100-1:1000, Speichel etwa 1:1000). Im Urin wurden unterschiedliche GH-Formen nachgewiesen, die Mengen in Urin und Speichel korrelierten allerdings nur schwach mit denen im Plasma [53-56].

4.1.5.2 Funktionen und Wirkungsmechanismen

Wachstumshormon hat im menschlichen Körper im Kindes- sowie Erwachsenenalter viele wichtige metabolische Funktionen, die meist durch die Defizite bei einem Wachstumshormon-Mangel oder den Überschuss bei Akromegalie erkannt wurden. Wachstumshormon ist ein entscheidender Regulator des Knochenwachstums im Kindesalter, welches über den Mediator IGF-I induziert wird. Neben dieser namensgebenden Eigenschaft hat das Wachstumshormon viele metabolische Funktionen, die wie folgt zusammen gefasst werden können [51,57]:

Proteinstoffwechsel:

- Anabole Wirkung
 - Proteinsynthese
 - Knorpelbildung und Erhöhung der Knochenfestigkeit durch Kollagenbiosynthese

Kohlenhydratstoffwechsel:

- Hemmung der Glukoseaufnahme in die Zellen des Muskel- und Fettgewebes
- Förderung der Glukoneogenese in der Leber

Fettstoffwechsel:

- Mobilisierung von Fettsäuren aus Fettgewebe: erhöhte Lipolyse

Mineralstoffwechsel:

- Natrium-Resorption in der Niere
- Stimulation der Bildung von Calcitriol, welches die intestinale Resorption von Ca^{2+} und Phosphat stimuliert (Voraussetzung für die Mineralisierung des Knochens)

Zellumsatz:

- Fördert die Zellproliferation in vielen Geweben wie Knorpelzellen (Knochenwachstum) und Blutstammzellen (Erythropoese)

Immunsystem:

- Stärkung des Immunsystems durch Stimulation von T-Lymphozyten und Makrophagen

Während Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel direkt von Wachstumshormon beeinflusst werden, übt es alle anderen Wirkungen über den Mediator IGF-I aus (Abb. 5). Die Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel führt zu Hyperglykämie. Umgekehrt führt eine Insulin-induzierte Hypoglykämie zur GH-Ausschüttung, was auch als GH-Stimulationstest in der Diagnose von Wachstumshormonmangel beschrieben wird. Im Gegensatz dazu hat der Mediator des GH, IGF-I, insulinähnliche Wirkungen, was häufig zu gegensätzlichen Beschreibungen der Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel führt.

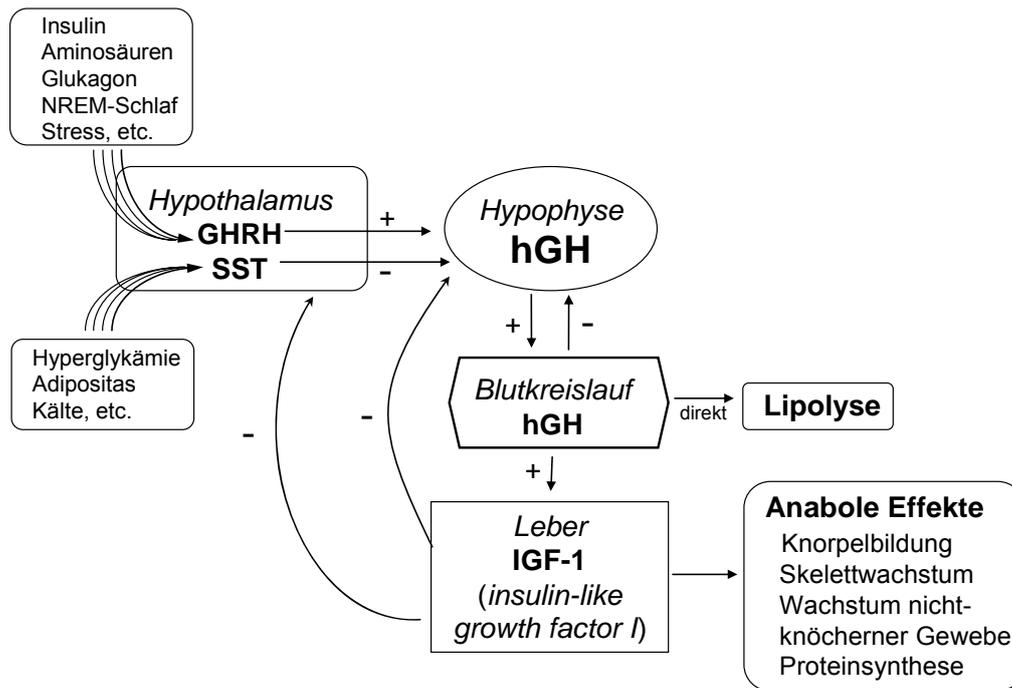


Abb. 5 Wirkungswege und Einflussfaktoren von Wachstumshormon (hGH) im Körper (SST = Somatostatin, GHRH = Growth Hormone Releasinghormone).

Seine Wirkung kann das Wachstumshormon durch Bindung an den Wachstumshormonrezeptor entfalten. Wachstumshormonrezeptoren sind Transmembranrezeptoren in vielen Geweben und dimerisieren bei GH-Bindung. Durch diese durch extrazelluläre Bindung von GH erzeugte Dimerisierung der Rezeptoren ändert sich innerhalb der Zelle die Tertiärstruktur der Rezeptorstrukturen und setzt Signalkaskaden in Gang.

Die Signalkaskade startet mit Tyrosin-Janus-Kinasen (JAK) 2, welche an die Rezeptoren angelagert sind. Die Kinasen zweier dimerisierter Rezeptoren phosphorylieren sich gegenseitig, was durch die eine räumliche Annäherung bei der GH-Bindung ermöglicht wird [58-60]. Durch die Phosphorylierung sind die Kinasen aktiviert und können weitere Signalmoleküle phosphorylieren. JAK2 phosphoryliert unter anderem ein Regulationsprotein der Genexpression, STAT5 (STAT = *signal transducers and activators of transcription*), und den Wachstumshormonrezeptor selbst. STAT5 bildet durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten Dimere, die in den Zellkern wandern und dort Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Abschnitte binden und damit die Genexpression beeinflussen. Weitere Signalwege, die durch Bindung von GH an den Wachstumshormonrezeptor aktiviert werden, sind der MAPK (*mitogen activated protein kinase*)- und Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3)-Signalweg. Beide Signalwege werden im Zusammenhang mit Zellteilung, -wachstum und -differenzierung beschrieben.

Unterschiedliche Varianten und Isoformen von Wachstumshormon wirken unterschiedlich und haben verschiedene Affinitäten zum GH-Rezeptor. Die Wirkung der 20 kDa Splice-Variante ist der 22 kDa Form sehr ähnlich. Sie bindet an den Wachstumshormonrezeptor, zirkuliert durch eine höhere Affinität zu den Bindungsproteinen länger und hat eine geringe insulinähnliche und daher weniger diabetogene Wirkung.

Die untersuchten Fragmente dagegen wirken deutlich unterschiedlich. Während das N-terminale 5 kDa-Fragment eine insulinähnliche Wirkung hat, wurde gezeigt, dass das 17 kDa große Gegenstück weder insulinähnlich noch wachstumsfördernd ist und mit seiner Bindung an den Wachstumshormonrezeptor eher antagonistisch wirkt [5,34,61,62]. Fragmente von 6 und 16 kDa konnten in Hypophysenextrakten nachgewiesen werden, scheinen aber während der Extraktion des Wachstumshormons aus der Hypophyse zu entstehen und haben keine physiologische Bedeutung [26]. Die endokrinologische Bedeutung der bekannten modifizierten Formen, wie beispielsweise der phosphorylierten, glykosylierten oder acylierten Varianten des GH, sind nicht beschrieben.

4.1.5.3 Belastungsinduzierte Wachstumshormonausschüttung

Die Stimulation der Wachstumshormonausschüttung durch körperliche Belastung wurde durch viele Studien bewiesen und Einflussparameter wie Dauer und Intensität der Belastung sowie deren Auswirkung auf den Wachstumshormonpuls analysiert [49]. Eine Belastung von etwa 30 % V_{\max} ist nötig um einen GH-Puls auszulösen [63]. Die Ausschüttung beginnt etwa nach 10 min anaerober Belastung und der GH-Puls ist größer je intensiver die Belastung [64]. Der Mechanismus der belastungsinduzierten GH-Ausschüttung ist noch nicht aufgeklärt, es wird aber angenommen, dass mehrere Faktoren eine Rolle spielen. Laktat, Erhöhung der Körpertemperatur, Stickstoffmonoxid (NO), Katecholamine oder der direkte neuronale Stimulus auf den Hypophysenvorderlappen zum Beispiel als Folge der Muskelkontraktion, sind Faktoren, die als Einflüsse beschrieben werden [49,65]. Laktat und NO wird in der Literatur der größte Einfluss zugesprochen.

Stickstoffmonoxid ist als wichtiger intra- und interzellulärer Transmitter in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse bekannt. Zu Beginn einer Belastung erhöhen sich Blutfluss und Blutdruck stark und NO aus der *Tunica intima* der Gefäßwand spielt eine bedeutende Rolle in der Vasodilatation. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die NO-Synthase an der Skelettmuskel-Endplatte konzentriert lokalisiert ist und NO bzw. sein Endprodukt Nitrat bei Belastung in Plasma und Urin erhöhte Konzentrationen aufweisen [66].

Laktatkonzentrationen und die Veränderung des pH-Wertes im Blut korrelieren sehr stark mit der belastungsinduzierten Wachstumshormonausschüttung, wobei diese wie die Laktatkonzentration von der Intensität der Belastung abhängig ist. Je intensiver und stärker anaerob die Belastung, desto höher die Laktatkonzentration und die GH-Ausschüttung [67-70]. Dieser Zusammenhang ist über einen gewissen Laktatbereich linear [70].

Ein weiterer interessanter Faktor ist die Erhöhung der Körpertemperatur. Wachstumshormon fördert die Schweißbildung und Belastungen in der Kälte lösen keinen GH-Puls aus [71].

Zur Funktion der belastungsinduzierten Wachstumshormonausschüttung gibt es nur Vermutungen. Die Lipolyse, die durch die Wachstumshormonfreisetzung stimuliert wird, wirkt sehr fördernd auf die Regeneration, was ein Ansatz für eine physiologische Erklärung der belastungsinduzierten GH-Ausschüttung sein könnte [72].

Die Fragestellung, ob eine belastungsinduzierte GH-Ausschüttung biochemisch einem normalen GH-Puls entspricht, wurde durch Messung unterschiedlicher endogener Formen untersucht. Die belastungsinduzierte GH-Ausschüttung erfolgt ohne Diskriminierung bestimmter Isoformen und es wurde gezeigt, dass das zirkulierende GH nach Belastung ebenso eine Mischung unterschiedlicher endogener Formen ist. Verhältnisse der 22 kDa-Hauptform zu nicht-22 kDa GH ergab keine Veränderung bei Belastung. Nach der Belastung nimmt das Verhältnis von 22 kDa zu nicht-22 kDa GH zugunsten der endogenen Formen ab. Dies kann unter anderem durch unterschiedliche Halbwertszeiten im Blut verursacht werden [73].

4.1.6 Pathologie: Akromegalie und Wachstumshormonmangel

Ein großer Teil der endokrinologischen Wirkungswege und metabolischen Einflüsse von Wachstumshormon wurde aus pathologischen Zuständen abgeleitet. Als Akromegalie wird eine ausgeprägte Vergrößerung der Akren (distale Körperteile wie Hände, Füße, Unterkiefer, Kinn, Nase, Augenbrauenwülste, Geschlechtsteile) bezeichnet. Zusätzlich wachsen Weichteile, Organe und Kehlkopf und die Haut verdickt sich. Durch Wachstum von Gelenkknorpel entstehen häufig Gelenkerkrankungen. Akromegalie-Patienten leiden häufig an Kopfschmerzen und *Diabetes mellitus* oder einer verminderten Glukosetoleranz. Außerdem sind Karpaltunnelsyndrom und damit Taubheitsgefühle in den Händen, sowie eine gesteigerte Funktion der Schweißdrüsen und allgemeine Antriebslosigkeit häufige Folgen der erhöhten GH-Mengen. Die Ursache ist in 90 % der Fälle ein gutartiger, wachstumshormon-

produzierender Tumor des Hypophysenvorderlappens, in seltenen Fällen sind die Tumore bösartig [74]. Lokale Druckwirkungen des Tumors auf das Gehirn können Ausfälle von Hirnnerven und Gesichtsfeldern verursachen. Tritt der Tumor vor Abschluss des Längenwachstums auf kommt es zum hypophysären Riesenwuchs (Gigantismus). Dabei bleiben die Körperproportionen in der Regel erhalten, da zusätzlich zum Wachstum der Akren ein gesteigertes Längenwachstum beobachtet wird.

Wachstumshormonmangel im Kindesalter führt zu Kleinwuchs. Auch bei normalem Wachstumshormonspiegel kann Kleinwuchs entstehen, dieser resultiert dann aus Defekten des Wachstumshormonrezeptors oder anderen Faktoren der GH-IGF-I-Achse, häufig in Form von Gendefekten (idiopathischer (ungeklärter) Kleinwuchs). Neben der geringen Körpergröße (weiter als 2 Standardabweichungen (SD) vom Bevölkerungsmittel entfernt = Minderwuchs/Kleinwuchs; $> 3SD$ = gesteigerter Minderwuchs/Zwergwuchs) treten weitere Symptome auf, die im Wesentlichen denen des Wachstumshormonmangels im Erwachsenenalter entsprechen. Ein Wachstumshormonmangel im Erwachsenenalter resultiert zumeist aus einem Defekt im Bereich der Hypophyse, zum Beispiel durch schwere Kopfverletzungen oder nach Bestrahlung eines Tumors [75]. Wachstumshormonmangelpatienten haben in der Regel ein gemindertes Wohlbefinden und ein vermehrtes Schlafbedürfnis, die Muskelmasse und Knochendichte nimmt ab, die Körperfettmasse zu und die Haut wird trocken. Außerdem ist das Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen erhöht [76].

4.1.7 Pharmakologie und pharmazeutische Produkte

Zur Therapie von Kleinwuchs und Wachstumshormonmangel beim Erwachsenen wird rekombinantes Wachstumshormon eingesetzt, welches zumeist in *E. coli* aber auch in Säugetier- oder Hefezellen (*S. cerevisiae*) produziert wird. Die in Deutschland zugelassenen Produkte sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Die Aminosäuresequenz des rekombinanten GH ist der 22 kDa-Hauptform des endogenen Proteins identisch.

Tabelle 2 Name und Hersteller der in Deutschland zugelassenen GH-Produkte

Produktname	Hersteller	Stadt/Land der Herstellung	Zellstamm
Genotropin[®]	Pharmacia GmbH	Karlsruhe, Deutschland	<i>E.coli</i>
Humatrope[®]	Lilly Deutschland GmbH	Gießen, Deutschland	<i>E.coli</i>
Norditropin[®]	Novo Nordisk Pharma GmbH	Mainz, Deutschland	<i>E.coli</i>
NutropinAq[®]	Ipsen Pharma GmbH	Ettlingen, Deutschland	<i>E.coli</i>
Omnitrope[®]	Sandoz GmbH	Kundl, Österreich	<i>E.coli</i>
Saizen[®]	Serono GmbH	Unterschleißheim, Deutschland	Säugetier- zellen
Zomacton[®]	Ferring GmbH	Kiel, Deutschland	<i>E.coli</i>
Valtropin[®]	Biopartners GmbH	Baar, Schweiz	<i>S. cerevisiae</i>

Wachstumshormon hat in der Blutbahn, also nach Ausschüttung aus der Hypophyse oder nach intravenöser Applikation, eine Halbwertszeit von 8-20 Minuten. Nach subkutaner Injektion wird das Konzentrationsmaximum im Blut nach etwa 1-3 Stunden erreicht [56,77,78], nach 11 bis 24 Stunden ist die Konzentration zurück auf den Basiswerten. Therapeutische Dosen zur Behandlung eines GH-Mangels oder Minderwuchses liegen bei Kindern zwischen 35 und 50 µg/kg Körpergewicht und bei Erwachsenen zwischen 0,15 und 1 mg/Tag [79].

4.1.8 Missbrauch im Sport

Dass Wachstumshormon im Sport zur Leistungssteigerung verwendet wird, ist durch viele Berichte und Beschreibungen belegt und der Gebrauch im Sport hat in den vergangenen Jahren zugenommen [80,81]. Erstmals tauchte eine Beschreibung zur Verwendung von GH im Sport im „Underground Steroid Handbook“ 1982 auf, 1988 gestand Ben Johnson den Missbrauch von Wachstumshormon und anabolen Steroiden, nachdem er nach seinem Goldmedaillenrennen über 100 m bei dem Olympischen Spielen positiv auf Stanozolol getestet wurde. Ebenfalls im Jahr 1988 wurde eine große Menge Wachstumshormon in einem Teamfahrzeug bei der Tour de France gefunden. Ein Bericht von Rickert et al. belegt die Verwendung von Wachstumshormon unter Jugendlichen 1992 [81]. Der Footballspieler Lyle Alzado berichtete 1992 an seinem Sterbebett von seinen Dopinggewohnheiten und gab preis, dass 80 % der amerikanischen Football-Spieler Wachstumshormon verwenden. Im Jahre 2000 beschrieb der australische Diskuswerfer Walter Reiterer den institutionellen und betreuten

Missbrauch von Wachstumshormon. Unter Berücksichtigung dieser Aussage ist es sehr verdächtig, dass 6 Monate vor Beginn der Olympischen Spiele in Sydney 1575 Ampullen GH aus einer Apotheke in Sydney gestohlen wurden. Auch Victor Conte, Besitzer der Bay Area Laboratory Co-Operative (BALCO) gab zu, Sportler unter anderem mit Wachstumshormon versorgt zu haben und Tim Montgomery bestätigte dies vor Gericht [82-85]. Auch Sylvester Stallone gab die Anwendung von Testosteron und Wachstumshormon zu, nachdem 2007 bei der Einreise nach Australien Wachstumshormon in seinem Gepäck gefunden wurde.

Gründe für die Verwendung sind Muskelaufbau und Fettabbau, kürzere Regenerationszeiten, erhöhte Knochenfestigkeit und gesteigertes Wohlbefinden sowie eine Stärkung des Immunsystems. Auch eine Verbesserung der Ausdauerfähigkeit wurde bei ehemaligen Anabolika-Nutzern gezeigt [86]. Die wichtigsten Effekte sind dabei der Muskelauf- und Fettabbau, welche für die Anwendung im Bodybuilding besonders interessant sind. Es soll aber auch durch die lipolytischen Eigenschaften die Erholung nach hoher Belastung beschleunigen, was häufig auch als Erklärung für die Wachstumshormonausschüttung bei sportlicher Belastung vermutet wird. Für die Anwendung im Bodybuilding gibt es Literatur, die „Rezepte“ für die Anwendung von Wachstumshormon und dessen Kombination mit anderen leistungssteigernden Substanzen beschreibt [1]. Wachstumshormon wird dabei immer in Kombination mit Insulin und anabolen Steroiden, besonders Testosteron, empfohlen.

Auch wenn Berichte von Sportlern eine Leistungssteigerung belegen, sind die wissenschaftliche Literatur und das Ergebnis kontrollierter Studien widersprüchlich [87-93]. Während die Steigerung der fettfreien Körpermasse belegt werden konnte, liefern Studien unterschiedliche Ergebnisse über den Effekt der Kraft- und Ausdauerleistungssteigerung. Dies kann mehrere Gründe haben [94]:

- Die Versuchszeiträume liegen meist bei mehreren Wochen, während die Anwendung bei Sportlern in der Regel mindestens über einige Monate geplant wird,
- Die im Sport eingesetzten Mengen sind nach derzeitigen Informationen deutlich höher als die, die in kontrollierten Studien verwendet werden können (2-35 I.E. [1,95]),
- Athleten verwenden meist Mixturen von Substanzen um einen synergistischen Effekt zu erzielen, im Falle des GH sind dies häufig Wachstumshormon, Insulin und Steroide. Diese Kombination ist schon aus ethischen Gründen kaum in einer Studie nachzuvollziehen [64].

Eine Studie, in der Wachstumshormon und Testosteron kombiniert wurden und die über 6 Monate durchgeführt wurde, zeigte bei männlichen Probanden leichte anabole Effekte und einen Anstieg des VO_2_{max} und damit der Ausdauerkapazität. Der Fettabbau war sowohl bei Einnahme von Wachstumshormon als auch der Kombination GH/Testosteron signifikant [89]. Interessanter Weise ergaben Studien, in denen Wachstumshormon kurzzeitig ehemaligen Anabolika-Nutzern appliziert wurde, leistungssteigernde Effekte [86,96]. Dass der anabole Effekt bei alleiniger Einnahme von Wachstumshormon meist nicht nachgewiesen werden kann liegt möglicherweise in dem komplexen Zusammenspiel von Wachstumshormon, Insulin und Testosteron beim Proteinaufbau im Körper begründet. Erst die Kombination erlaubt daher einen effektiven anabolen Stimulus [85]. Abb. 6 skizziert ein Zusammenwirken von Wachstumshormon, IGF-I, Testosteron und Insulin, welches einen Hinweis gibt, warum klinische Studien, in denen GH allein appliziert wurde keinen anabolen Effekt zeigen konnten. Ohne das Vorhandensein ausreichender Mengen Insulin verpufft der anabole Effekt von GH zum größten Teil.

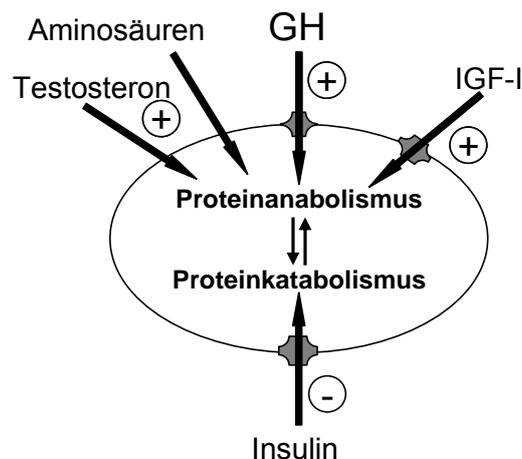


Abb. 6 Schema des Zusammenwirkens von Wachstumshormon, Insulin, Testosteron und IGF-I beim Muskelaufbau [85].

4.1.9 Wachstumshormon als Anti-Aging-Mittel

Wachstumshormon wird im Internet und populärwissenschaftlicher Literatur als Anti-Aging- oder sogar Verjüngungs-Mittel angeboten und vertrieben [97-99]. Der Begriff Somatopause beschreibt den Rückgang der GH-Ausschüttung im Alterungsprozess. Durch die altersbedingte Verringerung zirkulierenden Wachstumshormons treten ähnliche Symptome in Körperzusammensetzung und Metabolismus auf wie bei Wachstumshormonmangel [100]. Diese Tatsache führte zu der Fragestellung, ob rekombinantes Wachstumshormon auch diese

altersbedingten Wachstumshormonmangelerscheinungen ausgleichen kann. Wissenschaftliche Studien konnten kaum positive Effekte in gesunden, alternden Menschen feststellen und zeigten im Gegensatz dazu ein hohes Risiko unterschiedlicher Nebenwirkungen [101].

4.1.10 Ansätze für Nachweisverfahren in der Dopingkontrolle

Es gibt zwei Methodenansätze, um die Applikation von Wachstumshormon nachzuweisen. Ein direkter Nachweis basiert auf einem Lumineszenzimmunoassay (LIA) und wird derzeit zum Nachweis von rekombinantem Wachstumshormon in der Dopinganalytik eingesetzt. Der Test wurde auch schon während der Olympischen Spiele in Athen 2004 und Turin 2006 verwendet, brachte allerdings weltweit bisher noch kein positives Ergebnis [56,102]. Der Assay basiert auf der Heterogenität des endogenen Wachstumshormons und besteht aus zwei Sandwich-Immunoassays. Ein Assay bindet nur das 22 kDa-Wachstumshormon (rec-Assay), während der Antikörper des zweiten Assays vorwiegend die anderen endogenen Formen (pit-Assay) bindet. Wird rekombinantes Wachstumshormon appliziert, welches homogen aus der 22 kDa-Form besteht, werden endogene Pulse durch negative Rückkopplungsmechanismen unterdrückt und der Anteil anderer endogener Formen, wie beispielsweise der 20 kDa-Splicevariante oder phosphorylierter Formen, nimmt ab. Jede Probe wird mit beiden Assays gemessen und der Quotient gebildet. Übersteigt der Quotient von rec/pit einen bestimmten Wert, gilt die Probe als verdächtig, da der Anteil der 22 kDa-Hauptform höher ist als in Proben mit endogenem GH erwartet werden würde. Zur Bestätigung wird ein zweites Assay-Paar mit unterschiedlichen Antikörpern herangezogen, welcher bis auf unterschiedliche Antikörper-Epitope identisch ist. Wird auch hier der Grenzwert für die Quotienten überschritten, gilt die Probe als positiv. Ein Grund dafür, dass der Test bisher keine positiven Ergebnisse liefern konnte ist der kurze Nachweiszeitraum. Studien zeigten, dass das 20 kDa GH als Repräsentant endogener Isoformen je nach Applikationsmenge 14-30 Stunden unterdrückt blieb [103]. Damit liegt die Nachweiszeit in der gleichen Größenordnung, zwischen etwa 12-24 h. Ein zweites Problem ist die Spezifität der Antikörper des Bestätigungsassays, welcher häufig unauffällige Ergebnisse liefert, nachdem im Screening sehr verdächtige Werte beobachtet wurden.

Der zweite Testansatz misst indirekte Serumparameter für den Missbrauch von Wachstumshormon mittels Radioimmunoassays (RIA) [8,104-107]. In ersten Studien wurde eine Reihe von Substanzen getestet, die von der Sekretion von Wachstumshormon abhängen. Dabei konzentrierte man sich auf Komponenten des GH-IGF-Signalweges, wie IGF-I und

IGF-Bindungsproteine, und Marker des Kollagen- und Knochenstoffwechsels (knochen-spezifische alkalische Phosphatase, carboxy-terminales Propeptid von Prokollagen Typ I, amino-terminales Extensions-Peptid von Typ III Prokollagen (PIIIP) und ein carboxy-terminales vernetztes Telozeptid von Typ I Kollagen). Nach Messung unterschiedlicher Proben und Bestimmung der Zeiträume, in denen die Marker nach rGH-Gabe erhöht waren, sowie des Ausmaßes der Erhöhung wurden IGF-I und PIIIP als leistungsfähigste Marker ausgewählt [104,106]. Der Vorteil dieses indirekten Tests ist hauptsächlich die längere Nachweiszeit und er wird als Zusatz zu dem aktuellen direkten Test in Erwägung gezogen. Außerdem würde der indirekte Nachweis auch die Applikation von humanem, endogenem Wachstumshormon detektieren. Da es sich um einen indirekten Test handelt, ist allerdings die Validierung aufwändig und das Ausmaß der Vortests sehr groß um andere Einflüsse auf die Marker auszuschließen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die interindividuelle Variation der Marker sehr hoch und vom Alter sowie von ethnischen Unterschieden abhängig ist. Körperliche Belastung führt, wenn auch in geringerem Maße als die Applikation von rekombinantem GH [105,107], zur Erhöhung der IGF-I Werte und Verletzungen wurden als Auslöser der Erhöhung von Knochenumsatzmarkern beschrieben [108].

4.1.11 Zusammenfassung wichtiger Daten zum Wachstumshormon

Tabelle 3 Zusammenfassung biochemischer und endokrinologischer/pharmakologischer Daten zum Wachstumshormon

Bezeichnung	Daten	Literatur
Biochemie		
Synonyme	Somatropin, Somatotropin, Somatotrophes Hormon (STH), <i>Growth Hormone, Growth Hormone 1</i>	
Uniprot/Swissprot Accession number	P01241	
Molekulargewicht (Hauptform)	Nicht-reduziert (2 S-S-Brücken): 22111,04 Da (monoisotopisch) 22125,06 Da (mittleres) Reduziert: 22115,07 Da (monoisotopisch) 22129,09 Da (mittleres)	
Isoelektrischer Punkt	5,27	
Disulfidbrücken	Cys 53-Cys 165, Cys 182-Cys 189	
Präprotein	24847,3 Da, 217 Aminosäuren (AS)	
Splice-Varianten	20274,0 Da, 176 AS, AS 32-46 fehlen, pI 5,39 17843,3 Da, 153 AS, AS 85-122 fehlen, pI 6,35 17083,4 Da, 145 AS, AS 91-136 fehlen, pI 5,93	[5,26]
Weitere Modifikationen (eine Phosphorylierung/ Deamidierung verschiebt den pI um etwa 0,1 pH-Einheiten)	Phosphorylierungen (Ser 51, 106, 150) Deamidierung (Asn 152, Gln 137) Acylierung des N-Terminus	[27,109]

Bezeichnung	Daten	Literatur
Endokrinologie und Pharmakologie		
Umrechnung Internationale Einheiten (I.E.) – Gramm (g)	1 I.E. = 0,3 mg 1 mg = 3 I.E.	
Durchschnittliche GH-Menge im Serum	männlich ~ 0,27 µg/l, weiblich ~ 0,78µg/l	[47]
Serum-GH Mengen pro Tag	männlich ~ 15 µg/l, weiblich ~47 µg/l	[47]
Halbwertszeit im Blut	8-25 min	[56]
Rekombinantes GH	Entspricht der 22 kDa Hauptform	
Therapeutische Dosis	Kinder 35-50 µg/kg Körpergewicht Erwachsene 1-2 I.E./Tag	[95]
Nach subkutaner Injektion - Maximale Konzentration im Blut - Konzentration zurück auf Basiswerten	2-6 h nach Injektion 11-20 h nach Injektion	[56]
Im Sport verwendete Mengen	2-35 I.E./Tag	[1,56,64]

4.2 Proteinbiochemie und Analytik

4.2.1 Posttranslationale Modifikationen von Proteinen

Das menschliche Genom umfasst etwa 20000-25000 Gene [110], das Proteom ist jedoch viel komplexer. Der Gewinn an Komplexität wird durch zwei Faktoren wesentlich beeinflusst, auf Transkriptionsebene durch alternatives Splicen und auf Proteinlevel durch posttranslationale Modifikationen (PTM) [111]. Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen, die an unterschiedliche Aminosäurereste angefügt werden. Die fünf gängigsten kovalenten PTMs sind Phosphorylierung, Acylierung, Alkylierung, Glykosylierung und Oxidation.

Phosphorylierungen können an die Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin geknüpft werden, wobei die Modifikation von Serin am häufigsten vorkommt. Phosphatreste werden mit Hilfe von Kinasen von Adenosintriphosphat (ATP) auf das Protein übertragen und haben häufig Bedeutung in Signalkaskaden, wo Phosphorylierungen zur Aktivierung von Enzymen

führen und somit molekulare Interaktionen modulieren [112]. Phosphorylierungen von Proteinen können entscheidenden Einfluss auf die Regulation zellulärer Prozesse wie Zellzyklus, Wachstum, Apoptose oder Differenzierung haben [113]. Durch die Superfamilie der Kinasen (500 Kinasen, Kinom) ist diese Modifikation sehr spezifisch reguliert.

Glykosylierungen sind als N-, O- oder C-Glykosylierungen bekannt, wobei die Glykosylierung an C2 des Indolringes von Tryptophan sehr selten ist. N-Glykosylierungen sind in der Regel deutlich größer und komplexer als O-Glykosylierungen und werden an die Asparagin-Seitenkette gebunden, wobei die Kohlenhydratkette mit einem N-Acetylglucosamin beginnt [114]. N-Glykosylierungen sind häufiger als O-Glykosylierungen und werden im Endoplasmatischen Retikulum eingeleitet, indem eine Oligosaccharidtransferase einen Tetradasaccharyl-PP-dolichol-Rest unter Abspaltung des PP-dolichols auf eine Asparaginseitenkette überträgt. Für eine N-Glykosylierung ist dabei ein Aminosäuremotiv von Ser/Thr-Xxx-Asn notwendig. Der ursprüngliche 14-gliedrige Kohlenhydratrest $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ wird enzymatisch zu seiner endgültigen Struktur verändert, was nach Abspalten der drei Glukosereste im Golgi-Apparat geschieht. Neue Kohlenhydratreste werden mittels unterschiedlicher Glykosyltransferasen unter Spaltung von Zuckerresten von UDP-Molekülen angehängt. N-Glykosylierungen sind häufig entscheidend für die Aktivität eines Proteins. Beispielsweise ist bei Erythropoietin, welches zu 40% aus Kohlenhydratresten besteht, eine Rezeptorbindung bei fehlenden Glykosylierungen nicht möglich [115].

Die O-Glykosylierung ist deutlich weniger komplex und besteht häufig allein aus einem GlcNAc-Rest oder Tri- oder Tetrasacchariden. Auch wenn es keine feste Kernstruktur wie im Falle der N-Glykosylierung gibt konnte eine Systematik der Glykosylierung festgestellt werden. Folgende Kernstrukturen wurden bisher gefunden [116]:

- Mucin-Typ: alkali-labile Bindung zwischen N-Acetylgalaktosamin und Serin oder Threonin,
- Proteoglycan-Typ: alkali-labile Bindung zwischen Xylose und Serin,
- Kollagen-Typ: alkali-stabile Bindung zwischen Galaktose und 5-Hydroxylysin,
- Extensin-Typ: alkali-stabile Bindung zwischen Arabofuranose und 4-Hydroxyprolin (in Pflanzenproteinen).

Die Mucin-Typ-Glykosylierung wurde in vielen unterschiedlichen Proteinen detektiert. Es wurden bisher vier Strukturen dieses Glykosylierungstyps gefunden, die in Abb. 7 aufgelistet sind.

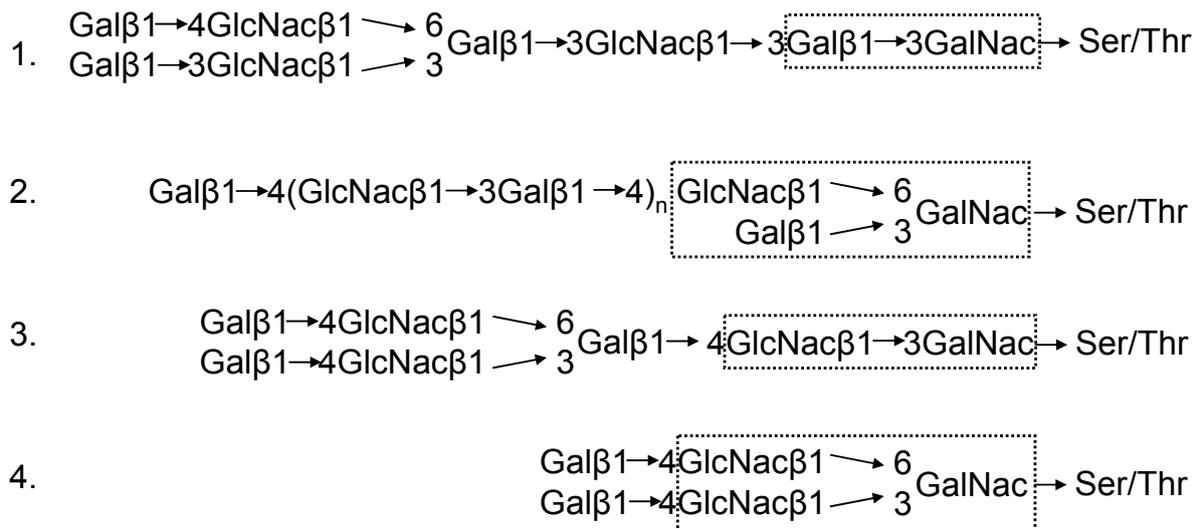


Abb. 7 Unterschiedliche Mucin-Typ-Glykosylierungen, eingerahmte Strukturen sind die Kernstruktur des jeweiligen Typs [114,117]; GlcNac = N-Acetyl-Glukosamin, GalNac = N-Acetyl-Galaktosamin, Gal = Galaktose

Die O-Glykosylierung kann eine Rolle in der Modulation von Transkriptionsfaktoren spielen und dient als Erkennungselement des Notch-Signalweges. Glykosylierungen allgemein spielen häufig eine wichtige Rolle bei Rezeptorbindung, Immunerkennung, Entzündungsreaktionen und Pathogenität der Proteine [113,117].

Acetylierungen am N-Terminus von Proteinen dienen häufig der Stabilität. Im Falle von Histonen regulieren sie Protein-DNA-Wechselwirkungen.

Deamidierungen, also die Umwandlungen Asn-Asp oder Gln-Glu werden häufig als chemisches Artefakt der Probenaufarbeitung beschrieben. Finden sie im Metabolismus statt, dienen sie der Regulation von Protein-Ligand oder Protein-Protein-Wechselwirkungen [112].

Oxidationen können enzymatisch entstehen, wie beispielsweise im Falle von Kollagen oder des *hypoxia inducible factors* (HIF), wo ein Prolin bzw. ein Asparaginrest hydroxyliert werden. Nicht-enzymatische Hydroxylierung, wie beispielsweise durch oxidativen Stress oder im Alterungsprozess an Aminosäuren wie Methionin, Histidin, Tyrosin, Tryptophan oder Cystein, beeinflusst in der Regel die Aktivität der Proteine [111].

Die Funktionen unterschiedlicher Modifikationen sind häufig nur für bestimmte Proteine beschrieben. Die Bedeutung einer Modifikation für physiologische Prozesse eines bestimmten Proteins kann daher häufig nur abgeschätzt werden und muss durch endokrinologische Untersuchungen ergründet werden.

4.2.2 Massenspektrometrie von Peptiden und Proteinen

4.2.2.1 Massenanalytoren zur Analyse von Peptiden und Proteinen

Die Massenspektrometrie hat sich zu einer sehr leistungsfähigen Methode zur Analyse von Proteinen, Peptiden und ihren Modifikationen entwickelt [118,119]. Je nach Zielsetzung werden unterschiedliche Ionisierungstechniken und Massenanalytoren zur Analyse eingesetzt. Hauptsächlich verwendete Ionisierungstechniken sind in der Proteinanalytik das Elektro- (ESI) oder Nanospray (NSI) oder die *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI). Der Vorteil von Elektro- und Nanospray ist dabei, dass die Ionisierung bei Atmosphärendruck und aus der Flüssigkeitsphase heraus kontinuierlich stattfindet. Damit ist die Kopplung an einen Flüssigkeitschromatographen als Separationstechnik problemlos. Bei der MALDI-Ionisation dagegen wird der Analyt zusammen mit einer Matrix (z.B. Nikotinsäure, Dihydroxybenzoesäure oder α -Cyano-Hydroxyzimtsäure) auf eine Targetplatte aufgebracht. Laserpulse werden von der Matrix aufgenommen und führen zur Desorption von zumeist einfachgeladenen Quasi-Molekülonen. An die MALDI-Ionisation schließt sich meist ein Flugzeit-Analysator (*Time-of-Flight*, TOF) an, wobei mittlerweile QTOF oder TOF/TOF-Geräte auch die Fragmentierung von Analyten und die Aufzeichnung der Fragmente ermöglichen. Diese Technik wird aufgrund der relativ schlechten Kopplung an Chromatographiesysteme meist für Proben verwendet, die keine Matrix enthalten und relativ frei von Störsubstanzen sind. Werden Proteine oder Peptide mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) aufgetrennt und anschließend im Elektro- oder Nanospray ionisiert, können unterschiedliche Massenanalytoren, wie Triple-Quadrupol-, Ionenfallen-, Quadrupol-TOF (QTOF)-, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* (FTICR)- oder LTQ Orbitrap-Instrumente folgen. Die Ionen werden durch Anlegen einer Spannung an eine Kapillare erzeugt und je nach Feldrichtung entstehen positiv oder negativ geladene Ionen, wobei für Peptide und Proteine meist positive Ionisation verwendet wird. Am Ende der Kapillare bildet sich ein *Taylor Cone* aus dem ein Tröpfchen entsteht. Das Lösungsmittel verdampft, bis die Tröpfchen einen kritischen Radius (Rayleigh-Limit) erreichen, an dem die Coulomb-Abstoßung der positiven Ladungen die Oberflächenspannung übersteigt und sich kleinere Tröpfchen bilden. Schließlich entstehen Gasphasenionen durch den Austritt von Ionen aus dem Tropfen (*ion evaporation model*) oder es bleiben nur noch Gasphasenionen übrig, nachdem das Lösungsmittel verdampft ist (*charged residue model*) [120,121]. Die entstehenden Ionen sind ab einem Molekulargewicht von 1000 Da meist doppelt geladen und können bei höherer Molmasse bis zu 100 Ladungen tragen. Nach der Ionisierung gelangen die geladenen

Analyten ins Hochvakuum des Massenspektrometers. Je nach Zielsetzung werden unterschiedliche Massenanalysatoren verwendet.

Die in Abb. 8 dargestellte LTQ Orbitrap ist ein sehr leistungsfähiger und mittlerweile viel verwendeter Massenanalysator zur Analyse von Peptiden und Proteinen aber auch zur Bestimmung akkurater Massen und Elementarzusammensetzungen von kleinen Molekülen. Die Ionen aus einer Atmosphärendruck-Ionenquelle (API) gelangen zuerst in eine lineare Ionenfalle, die auch eine Fragmentierung der Analyten ermöglicht. Nachdem die Ionen in einer C-Trap gebremst und abgekühlt werden, gelangen sie in einem kurzen Puls in die Orbitrap. Diese besteht aus einer spindelförmigen inneren Elektrode und einem äußeren Elektrodenpaar. Nachdem die Ionen in die Orbitrap gelangt sind, oszillieren sie um die innere Elektrode. Die Oszillationsfrequenz steht in direktem Zusammenhang mit dem m/z der Analyten und durch Fourier-Transformation (FT) wird ein Massenspektrum erhalten [122-124]. FT-Massenanalysatoren wie die Orbitrap zeichnen sich durch eine sehr hohe Massengenauigkeit (< 5 ppm) und Auflösung (100000 bei m/z 400) aus, was besonders im Bereich der Proteomics mittlerweile unverzichtbar ist. Fragmentationen können in der vorgeschalteten linearen Ionenfalle erzeugt werden und die MS^n -Spektren sowohl in der Ionenfalle als auch in der Orbitrap aufgezeichnet werden.

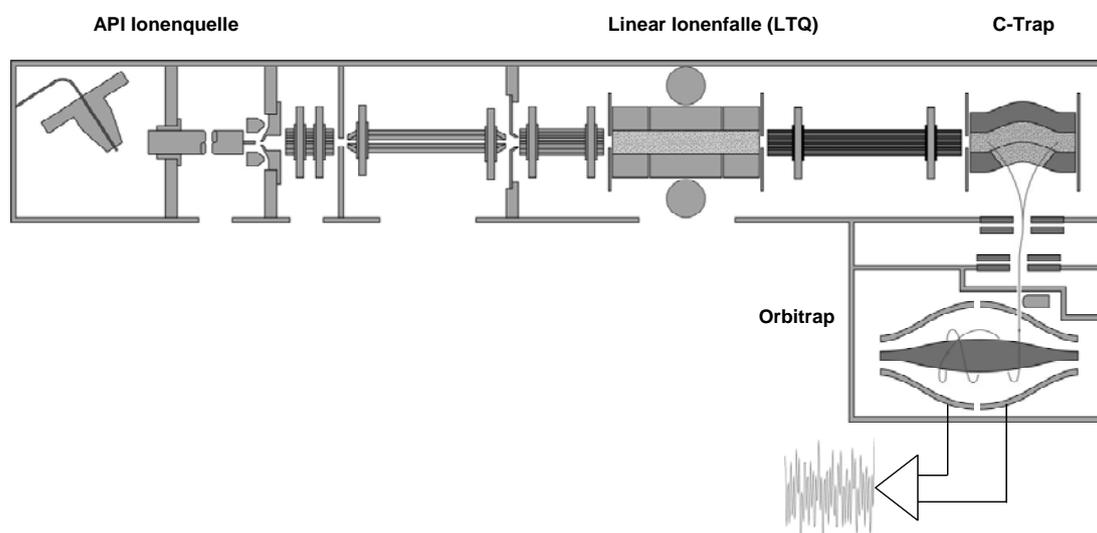


Abb. 8 Aufbau eines LTQ Orbitrap-Massenspektrometers [125].

Andere Massenspektrometer wie beispielsweise Triple-Quadrupol-Geräte mit linearer Ionenfalle haben zwar keine vergleichbar hohe Auflösung oder Massengenauigkeit, können aber komplementär sehr hilfreich sein. Beispielsweise kann damit der *low mass cut-off* in MS/MS -Spektren, die in Ionenfallen aufgenommen werden, umgangen werden. Dadurch

können Fragmente geringen Molekulargewichtes, wie zum Beispiel charakteristische Zuckerfragmente, detektiert werden. Die Aufnahme von MS/MS-Spektren in einem großen dynamischen Bereich ist dabei durch die räumliche Trennung von Selektion, Fragmentierung und Massenanalyse der Analyten möglich.

4.2.2.2 Massenspektren von Peptiden und Proteinen nach Elektro- oder Nanospray-Ionisation

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, sind Peptide und Proteine nach Elektro- oder Nanospray-Ionisation in der Regel mehrfach geladen. Handelt es sich um Proteine, die viele Ladungen tragen, wird im Massenspektrum eine Verteilung unterschiedlicher Ladungszustände detektiert. Jeder Ladungszustand bildet ein Set von Signalen, die als Ladungs-*Envelope* bezeichnet werden und die Isotopensignale darstellen. Die Isotopensignale können bei mehrfach geladenen Peptiden und Proteinen nur bei der Verwendung hochauflösender Massenspektrometer aufgetrennt und einzeln detektiert werden. Aus dieser Verteilung der Isotopensignale lassen sich die Ladung und damit auch das Molekulargewicht des Moleküls bestimmen. Wird das Molekül mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (*Collision-Induced Dissociation*, CID) fragmentiert, zerfällt es in charakteristische Bruchstücke aus denen sich die Aminosäuresequenz ableiten lässt. Die vorrangige Spaltung dieser geringenergetischen Dissoziation findet an der Peptidbindung statt (b- und y-Ionen), die Nomenklatur für unterschiedliche Spaltstellen im Peptid ist in Abb. 9 dargestellt [126]. Fragmentiert ein Peptid unter CID-Bedingungen an einer Peptidbindung, wird das N-terminale Fragment als b-Ion bezeichnet, wenn die Ladung am N-Terminus verbleibt. Befindet sich die Ladung am C-terminalen Fragment, wird dieses y-Ion genannt.

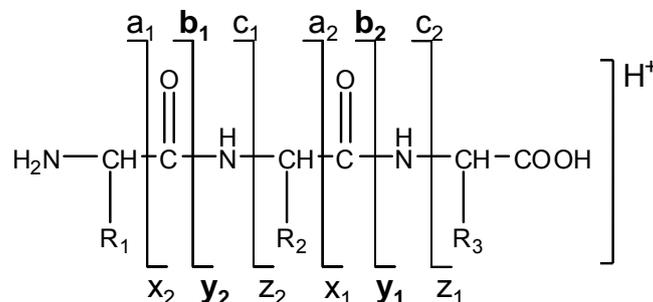


Abb. 9 Nomenklatur der Fragmentierung von Peptiden nach kollisionsinduzierter Dissoziation [126].

Ein möglicher Dissoziationsmechanismus ist in Abb. 10 dargestellt. Die Fragmentierung von protonierten Peptiden durch CID ist stark von der Struktur der Peptide abhängig. Der in Abb. 10 dargestellte Mechanismus setzt die Anwesenheit eines mobilen Protons [127] voraus, welches durch Lokalisation an dem Stickstoffatom der Peptidbindung, die gebrochen wird, den nukleophilen Angriff der Kohlenstoffzentrums begünstigt und damit die Dissoziation der Bindung einleitet [128].

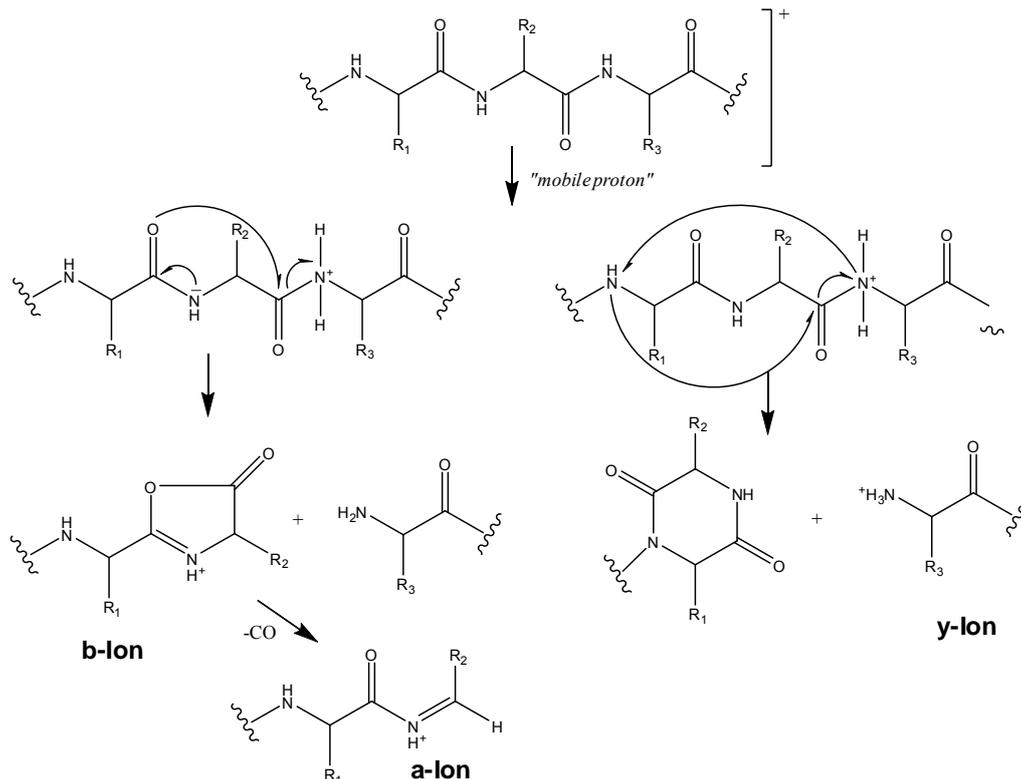


Abb. 10 Möglicher Dissoziationsmechanismus von protonierten Peptiden unter CID-Bedingungen [129].

Zur Charakterisierung und Identifizierung von Proteinen stehen grundsätzlich zwei Ansätze zur Verfügung. Die *Bottom-Up*-Methode ist durch die Messung von Spaltprodukten des zu analysierenden Proteins gekennzeichnet. Proteine werden dabei mittels einer Endoprotease, wie zum Beispiel Trypsin, in Peptide gespalten und Massenspektren sowie MS/MS-Spektren der Peptide aufgezeichnet. Diese Technik ist für die meisten Analysen und insbesondere für die Identifizierung von Modifikationen sehr praktikabel, da aus den Peptiden deutlich aussagekräftigere MS/MS-Spektren entstehen als bei der Fragmentierung eines intakten Proteins [109,130,131]. Eine andere Möglichkeit ist die *Top-Down*-Methode wo das intakte Protein analysiert und während der MS-Analyse fragmentiert wird. Dieser Ansatz kommt im Wesentlichen zum Einsatz, wenn das Molekulargewicht eines Proteins bestimmt werden soll.

Die *Bottom-Up*-Methode wird häufig mit einer 2D-Elektrophorese gekoppelt, welche eine sehr effektive Vortrennung von Proteinen erlaubt [132].

4.2.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Elektrophorese, 2D-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem isoelektrischen Punkt in der ersten Dimension [133] und nach dem Molekulargewicht in der zweiten, anschließenden Dimension [134]. Die isoelektrische Fokussierung wird heutzutage meist auf Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) durchgeführt. Dabei gibt es IPGs mit sehr weitem (z.B. 3-10 oder 3-11) bis zu sehr engem pH-Bereich (z.B. 4.7-5.9), welche dann eine sehr feine Auftrennung ermöglichen. Je nach Gel, welches in der zweiten Dimension verwendet werden soll, wird die Länge der IPGs gewählt, diese können 7-24 cm lang sein. Um die Probe auf den Gelstreifen aufzugeben, gibt es ebenfalls unterschiedliche Möglichkeiten, die je nach Probe und pH-Gradient bevorzugt werden. Die beiden gängigsten Methoden sind dabei das Rehydratations-Laden der Probe in den Streifen, indem der Gelstreifen auf die Probe gelegt wird und diese in das Gel einzieht und den Streifen gleichzeitig rehydriert, und das *Cup-Loading*. Letzteres wird bei IPGs mit basischem pH-Bereich häufig bevorzugt. Hier wird der IPG in einer Rehydratationslösung aufgequollen und die Probe anschließend in ein Töpfchen (*Cup*) gegeben, welches auf den IPG gesetzt wird. Die Probe zieht dann unter leichter Spannung zu Beginn der Fokussierung in den Streifen ein. Bei basischem pH-Gradienten wird die Probe dabei auf der saureren Seite des IPGs aufgegeben. Auch in der zweiten Dimension gibt es viele Variationsmöglichkeiten um bestimmte Proteine und Mischungen möglichst effektiv aufzutrennen. Grundsätzlich kann die Auftrennung der Proteine reduzierend oder nicht-reduzierend durchgeführt werden. Am häufigsten ist in der zweiten Dimension die Verwendung von SDS-Gelen aber auch native Gele, bei denen die Struktur der Proteine aufrechterhalten wird, sind möglich. Die verwendeten Polyacrylamid-Gele können mit unterschiedlichem Prozentsatz an Acrylamid hergestellt werden, was großen Einfluss auf die Trennung von Proteinen in bestimmten Molekulargewichtsbereichen hat. Zusätzlich können unterschiedliche Laufpuffer verwendet werden, um die Auftrennung zu variieren [135]. Die 2D-Elektrophorese hat im Proteomics-Bereich eine große Bedeutung und dient häufig zusammen mit spezieller Software nicht nur als Auftrennungssystem, sondern auch zur Analyse relativer Spotvolumina und damit zur Bestimmung relativer Proteinmengen unterschiedlicher Spots in komplexen Proteingemischen. Ein Schema einer 2D-Elektrophorese ist in Abb. 11 dargestellt.

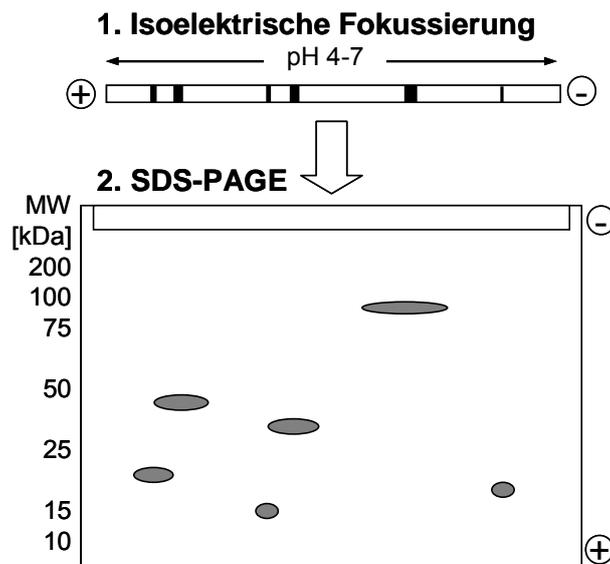


Abb. 11 2D-PAGE.

Um nach einer 2D-Elektrophorese Proteine auf dem Gel sichtbar zu machen werden sie gewöhnlich mit Coomassie Blue angefärbt. Diese Färbemethode ist die gängigste, ist aber mit einer Empfindlichkeit um 50 ng relativ unempfindlich.

Möchte man empfindlicher und zusätzlich selektiver visualisieren, verwendet man einen Immunoblot. Dabei werden die Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen (i.d.R. Polyvinylidenfluorid- (PVDF) oder Nitrozellulosemembranen) [135,136] und diese dann mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Eine zweite Inkubation wird mit einem sekundären Antikörper durchgeführt, der an eine Peroxidase gekoppelt ist. Nach Zugabe eines Chemilumineszenzreagenzes (basierend auf Luminol) wird so eine Lumineszenzreaktion ausgelöst und in einer CCD (*charged-coupled device*)-Kamera oder auf einem Film die Detektion der Proteine ermöglicht.

Eine neuere Form der 2D-Elektrophorese ist die DIGE-Technologie (*Difference Gel Electrophoresis*) [137]. Zwei Proben, die verglichen werden sollen (zum Beispiel Proben eines gesunden und eines kranken Versuchstieres) werden mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert, gemischt und anschließend als eine Probe mittels 2D-PAGE aufgetrennt. Durch Auslesen der Gele mit einem Fluoreszenz-Scanner können die unterschiedlich markierten Proteine, sowie die Kombination der beiden Proben angezeigt und Veränderungen im Proteinpattern leichter und eindeutiger erkannt werden (Abb. 12, rechts). Zum Ausgleich von Gel zu Gel-Variationen kann zusätzlich ein interner Standard mit einem dritten Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden. Für die Kombination mit der Massenspektrometrie eignet sich ein *minimal labeling* von Lysinresten zur

Fluoreszenzmarkierung, bei dem etwa 3 % der Lysine markiert werden wie in Abb. 12 dargestellt.

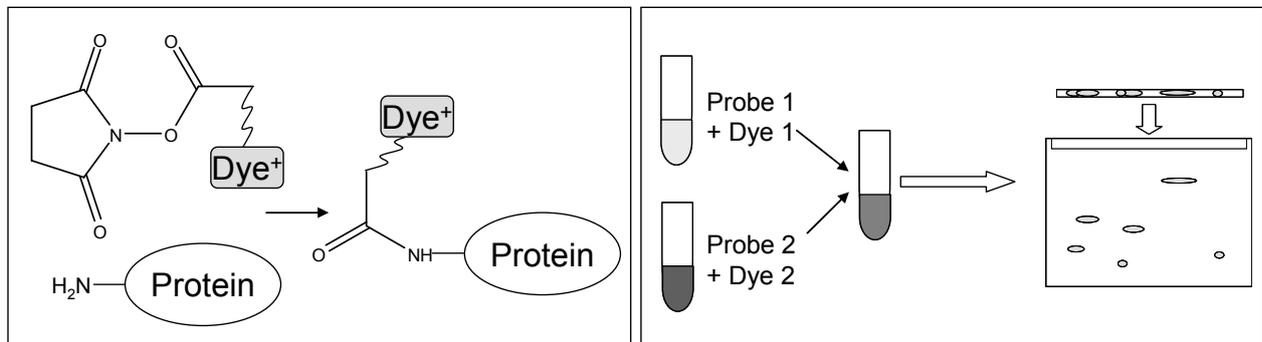


Abb. 12 DIGE: Markierung von Lysinresten (links), Mischen der Proben und 2D-PAGE (rechts).

4.2.4 Immunoaffinitätsaufreinigung (IAP)

Die Immunoaffinitätsaufreinigung (IAP) dient der selektiven Aufreinigung und Isolation eines bestimmten Peptids oder Proteins aus einer komplexen Matrix wie beispielsweise Plasma oder Urin. Neben Immunoaffinitätssäulen, die mit einem Antikörper-gekoppelten Gel befüllt sind oder der Immunpräzipitation mittels Sepharose-Protein G-Beads, ist die Aufreinigung mittels paramagnetischer Beads eine sehr elegante Isolationsmethode [138]. Diese superparamagnetischen Polystyren-Partikel können mit einem Antikörper gekoppelt werden, aber auch bereits gekoppelt an zum Beispiel Protein G oder A oder einen sekundären Antikörper erworben werden. Die Antikörperkopplung erfolgt an tosylaktivierte Beads, die primäre Amino- oder Sulphydryl-Gruppen von Proteinen unter Bildung einer Peptidbindung binden. Magnetische Beads, die bereits an einen sekundären Antikörper gekoppelt sind, erlauben eine sehr gute Reproduzierbarkeit und Flexibilität des Analyten und sind damit für die Implementierung analytischer Verfahren sehr gut geeignet. Die Methode der IAP mittels Sekundär-Antikörper-gekoppelter Beads ist in Abb. 13 dargestellt. Ein primärer Antikörper (der zum Beispiel im Kaninchen produziert wurde), der selektiv an das zu isolierende Antigen bindet, wird einer Probe zugegeben. Zusätzlich werden die entsprechenden Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, gekoppelt an magnetische Beads, zugefügt (A). Die Probe wird inkubiert und der primäre Antikörper bindet das gesuchte Protein während die magnetischen Beads mit ihrem sekundären Antikörper die primären Antikörper aus der Matrix fischen (Abb. 13 B, vergrößert). Das gebundene Antigen wird mit Hilfe eines Magneten abgetrennt und die Beads können gewaschen werden (C), bevor das Protein in einem kleinen Volumen Lösung eluiert wird. Das Eluat ist je nach Elutionsmittel kompatibel mit der Massenspektrometrie sowie der 2D-Elektrophorese.

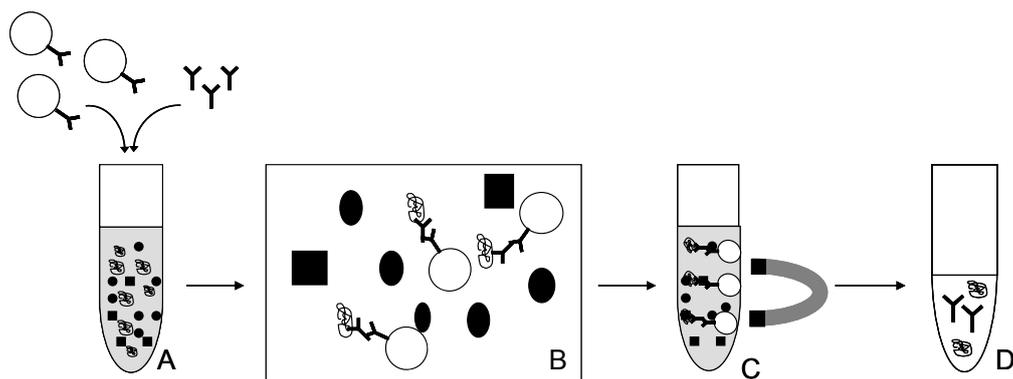


Abb. 13 Immunoaffinitätsaufreinigung mittels Antikörper-gekoppelter, paramagnetischer Beads.

Die Produktion von Antikörpern erfolgt für polyklonale Antikörper in Tieren, häufig Mäusen oder Kaninchen. Die Tiere werden mehrmals mit einem bestimmten Antigen, gegen welches die entstehenden Antikörper gerichtet sein sollen, immunisiert, bevor das Antiserum entnommen und aufgereinigt wird. Polyklonale Antikörper sind damit auf mehrere unterschiedliche Epitope gerichtet und können auch unterschiedliche Antikörperklassen haben (zum Beispiel IgM und IgG). Monoklonale Antikörper werden durch hybridisieren eines bestimmten B-Lymphozyten mit einer Myelom-Zelllinie hergestellt. Dazu werden Tiere mit einem Antigen immunisiert und die B-Lymphozyten aus der entnommenen Milz isoliert. Diese Antikörper binden damit sehr spezifisch an nur ein Epitop eines Antigens, enthalten nur eine Antikörperklasse und sind unbegrenzt verfügbar (Hybridom-Technik) [139].

4.2.5 Nachweis von Peptidhormonen in der Dopinganalytik

Der Nachweis von Proteinen und Peptiden in der Dopinganalytik ist, im Vergleich zu Substanzen wie Steroidhormone oder Stimulantien, noch sehr stark in der Entwicklung. Laut Welt Anti-Doping Agentur ist die Verwendung folgender Proteine und Peptide im Sport verboten [4]:

- Erythropoietin (EPO),
- Wachstumshormon, Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-I), Mechano-Wachstumsfaktoren (MGFs),
- Gonadotropine (e.g. LH, hCG, nur bei Männern),
- Insuline,
- Kortikotropine,
- und andere Substanzen mit ähnlicher Struktur oder Wirkung, sowie die Releasingfaktoren der Proteine.

Während Nachweismethoden für Insulin oder das Releasinghormon des Luteinisierenden Hormons (LHRH) nach Immunoaffinitätsaufreinigung aus Urin massenspektrometrisch möglich sind [140-143] und IGF-I auf ähnliche Weise aus Serum nachgewiesen werden kann, [144] sind die im Blut zirkulierenden und in den Urin ausgeschiedenen Mengen bei EPO oder Wachstumshormon zu klein, um sie massenspektrometrisch erfassen zu können. Stattdessen muss auf immunologische Methoden zurückgegriffen werden. Zur Detektion von Erythropoietin werden 20 ml Urin aufkonzentriert und mittels eines IEF-Gels aufgetrennt, bevor das EPO mittels Doppelblot und Immunfärbung detektiert werden kann [145,146]. Eine zweite Technik, die komplementär verwendet wird, basiert auf der Auftrennung der Analyten mittels SDS-PAGE, da rekombinantes EPO ein etwas höheres Molekulargewicht hat als das Endogene [50]. Die entscheidenden Unterschiede, die eine Diskriminierung von endogenem und rekombinantem EPO erlauben, liegen in den Kohlenhydratketten, da deren Zusammensetzung stark von den Zellen abhängig ist, in denen das Protein produziert wird.

5 Experimenteller Teil

5.1 Massenspektrometrische Charakterisierung von hypophysärem Wachstumshormon

5.1.1 Hypophysen

Zur massenspektrometrischen Charakterisierung endogenen Wachstumshormons wurden Hypophysen aus Leichen verwendet. Diese wurden vom Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt. Die Drüsen wurden nach Entnahme aus dem Körper bei -20 °C tiefgefroren.

Eine Hypophyse wurde in 2 ml MCSS-Lösung (*multichaotropic sample solution*, 7,7 M Harnstoff, 2,2 M Thioharnstoff, 4,4 % CHAPS, 44 mM Tris) mittels eines Mikromörser homogenisiert und nach 30 min im Ultraschallbad für 3 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum Zeitpunkt der Analyse bei -20 °C tiefgefroren.

5.1.2 2D-PAGE

Zur Vorbereitung der isoelektrischen Fokussierung wurden 10-50 µl des Hypophysenextraktes mit MCSS auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Die Proteine wurden mit DTT (10 µl, 1 M, 45 min) reduziert und die Cystein-Reste mit Acrylamid (30 µl, 1 M, 45 min) derivatisiert. Nach Zugabe von weiteren 20 µl DTT (10 min), um den Acrylamid-Überschuss zu deaktivieren, wurde die Lösung durch Rehydratations-Laden (~ 4 h Raumtemperatur (RTmp)) in die Gelstreifen (11 cm, pH 4,7-5,9) aufgenommen und die Fokussierung über Nacht mit folgendem Spannungsgradienten durchgeführt: 100-300 V in 2 h, 300-10000 V in 6 h und 10000 V bis insgesamt 80000 Vh erreicht wurden (Stromfluss maximal 50 µA/IPG). Die IPGs wurden in LDS-Probenpuffer zweimal 10 min equilibriert und die Proteine anschließend auf 12 % Bis-Tris oder 8-16 % Tris-Glycin Gelen nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (90 min, 125 V). Schließlich wurden die Gele gewaschen (3x5 min, MilliQ Wasser), fixiert (15 min, 7 % Essigsäure, 50 % Methanol), nochmals gewaschen (10 min, MilliQ Wasser) und mit Coomassie Blue gefärbt.

5.1.3 Difference Gel Electrophoresis (DIGE)

Um zu prüfen, ob die 22 kDa-Hauptform des endogenen GH und das rekombinante GH sich tatsächlich weder im Molekulargewicht noch im pI unterscheiden, wurde eine *Difference Gel Electrophoresis* durchgeführt. Um eine möglichst gute Auflösung zu erreichen wurden 18 cm

lange IPGs und 25x20 cm große SDS-Gele verwendet. Die SDS-Gele wurden nach Anleitung des Anbieters (EttanDALTweleve, GE Healthcare) mit 12,5 % Acrylamid gegossen (900 ml Monomerlösung: 281 ml 40 % Acrylamid/3 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 225 ml 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 450 µl TEMED (N,N,N'-Tetramethylethylendiamin), 388 ml MilliQ-Wasser, 3,6 ml 10 % APS (Ammoniumpersulfat)), zum Polymerisieren mit 0,1 % SDS überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Für das DIGE-Gel wurden zwei Proben vorbereitet. Eine Menge von 5 µg (10 µl einer 500 µg/ml Lösung in MCSS) rekombinanten Wachstumshormons und eine Probe Hypophysenextrakt mit etwa der gleichen Menge des 22 kDa-GHs wurden nach Überprüfen des pH-Wertes (pH 8,5) folgendermaßen markiert: Die Fluoreszenzfarbstoffe Cydye 3 und 5 wurden zu einer Konzentration von 400 pmol/µl in Dimethylformamid gelöst. Zu der Hypophysenextraktprobe wurde 1 µl Cy5 und zu der Probe mit rekombinatem GH 1 µl Cy3 gegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 0 °C wurde 1 µl 10 mMol Lysin zugegeben um die Markierungsreaktion zu stoppen. Die Proben wurden mit MCSS auf 100 µl aufgefüllt, reduziert und derivatisiert wie in 5.1.2 beschrieben. Für das *Cup-Loading* wurde die Probe an der Kathode aufgetragen und die IEF mit folgendem Spannungsgradienten durchgeführt: 150 V für 3 h; 300 V für 3 h; 300-1000 V in 6 h; 1000-10000 V in 1 h; 10000 V für weitere 2 h; Stromfluss: maximal 75 µA/IPG. Nach Nachfokussieren (30 min, 10000 V) und Equilibrieren der IPG-Streifen (6 M Harnstoff, 2 % SDS, 75 mM Tris pH 8,8, 0,002 % Bromphenol-Blau, 30 % Glycerol) wurde das SDS-Gel gestartet (SDS-Laufpuffer: 250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS, 5 mA/Gel für 2 h, dann 25 mA/Gel über Nacht). Die unterschiedlichen Fluoreszenzfarben wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners aufgenommen.

5.1.4 Trypsin- und GluC-Verdau

Trypsin ist das gängigste Enzym zur Spaltung von Proteinen vor einer massenspektrometrischen *Bottom-Up* Analyse der entstandenen Peptide. Trypsin spaltet sehr selektiv C-terminal der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Die theoretisch entstehenden Peptide des Wachstumshormons sind in Tabelle 4 aufgelistet. Für den Trypsinverdau aus dem Gel wurden Spots von Interesse mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit 100 mM NH₄HCO₃/Acetonitril (ACN) 1/1 (v:v) entfärbt (2 x 10 min RTmp, je 100 µl). Der Spot wurde mit 100 µl ACN dehydriert und nach Verwerfen des ACN in der Vakuumzentrifuge getrocknet (10 min). Es wurden 10 µl Trypsin zugegeben (20 µg/ml) und die Probe 30 min bei 4 °C belassen, um ein Einziehen des Enzyms zu gewährleisten, bevor der Verdau beginnt. Anschließend wurde nach Zugabe von 20 µl 50 mM NH₄HCO₃ über Nacht bei 37 °C

inkubiert. Die entstandenen Peptide wurden dreimal mit je 100 µl 1 % Trifluoressigsäure (TFA)/50 % ACN aus den Gelspots extrahiert (je 10 min, 1000 rpm, RTmp) und die vereinigten Extrakte in der Vakuumzentrifuge eingeeengt. Nach Anlösen in 50 µl Essigsäure (2 %) wurden die Proben mittels Nano- oder Kapillar-LC/LTQ Orbitrap MS analysiert.

Der Verdau mit GluC wurde gleichermaßen durchgeführt. Von der Enzymlösung wurden 5 µl (1 mg/ml) zugegeben (+10 µl 50 mM NH₄HCO₃) und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. GluC spaltet in Carbonatpuffer vorwiegend C-terminal an Glutamat.

Tabelle 4 Theoretischer Verdau von Wachstumshormon mit Trypsin und GluC.

Aminosäuresequenz des Peptids	Position der Aminosäuren	Masse [M+H] ⁺
<u>Trypsinverdau:</u>		
YSFLQNPQTSLC*FSESIPTPSNR	42-64	2687,277*
LHQLAFDITYQEFEEAYIPK	20-38	2342,134
SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	95-115	2262,129
ISLLLIQSWLEPVQFLR	78-94	2055,200
FDTNSHNDDALLK	146-158	1489,692
DLEEGIQTLMGR	116-127	1361,673
NYGLLYC*FR	159-167	1219,593*
LFDNAMLR	9-16	979,503
FPTIPLSR	1-8	930,541
SNLELLR	71-77	844,489
SVEGSC*GF	184-191	856,351*
LEDGSPR	128-134	773,379
VETFLR	173-178	764,430
EETQQK	65-70	762,363
TGQIFK	135-140	693,393
QTYSK	141-145	626,314
IVQC*R	179-183	689,376*
DMDK	169-172	508,207
EQK	39-41	404,214
AHR	17-19	383,215
K	168-168	147,113
<u>Glu-C-Verdau</u>		
DGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYC*FRKDMDKVE	130-174	5329,568*
LLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLLE	75-119	5166,776
FPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDITYQE	1-30	3600,853
QKYSFLQNPQTSLC*FSE	40-56	2090,985*
TFLRIVQC*RSVE	175-186	1521,821*
SIPTPSNREE	57-66	1129,548
GIQTLMGRLE	120-129	1117,603
TQQKSNLE	67-74	947,479
AYIPKE	34-39	720,393
GSC*GF	187-191	541,208*
FEE	31-33	424,171

*Acrylamidderivate

5.1.5 OFFGEL-Fraktionierung und SDS-PAGE

Die OFFGEL-Fraktionierung ist eine isoelektrische Fokussierung die in Lösung abläuft, so dass die intakten Proteine anschließend massenspektrometrisch erfasst werden können und nicht mittels Verdau aus einem Gel herausgelöst werden müssen. Die OFFGEL-Fraktionierung wurde mit 500 µl Hypophysenextrakt durchgeführt, nachdem diese in einem Zentrifugenfilter (Molekulargewicht (MW) cut-off 5 kDa) mit MilliQ Wasser gewaschen und in OFFGEL Stammlösung verdünnt wurde, wie vom Hersteller (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) empfohlen. Es wurden IPG-Streifen mit pH-Gradienten von 4,5-5,5 oder 4-7 und ein 24 *Well Frame-Set* verwendet. Die Fraktionierung wurde nach Herstellerinformationen mit einer Stromflussgrenze von 50 µA/Probe und einer Voltstundenzahl von mindestens 50000 Vh über Nacht durchgeführt. Nach der Fraktionierung wurden aus den Wells 50-150 µl Lösung gewonnen, und zur Überprüfung der Fraktionierung ein SDS-Gel angefertigt. Ein Volumen von 20 µl jeder Fraktion wurde mit 3 µl Dithiothreitol (DTT, 1 M) und 7 µl LDS-Probenpuffer (4x) gemischt und 10 min auf 70 °C erhitzt. Die Proben wurden auf ein 12 %iges Bis-Tris Gel aufgegeben und das Gel nach dem Lauf (100 min, 125 V) mit Coomassie Blue gefärbt. Interessante Fraktionen wurden nach Waschen und Aufkonzentrieren in einem 10 kDa-Zentrifugenfilter mittels Kapillar-LC/Orbitrap-MS gemessen. MS/MS-Spektren wurden auf einer API 4000 QTrap aufgenommen.

5.1.6 Ultrafiltration zur Analyse von Wachstumshormon-Fragmenten

Zur Analyse intakter Wachstumshormonfragmente in der Hypophyse wurden 100 µl Hypophysenextrakt durch einen Zentrifugenfilter zentrifugiert (MW cut-off 30 kDa) und der Durchlauf mittels Kapillar-LC/Orbitrap-MS gemessen.

5.1.7 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie

Für die Analyse der Proben wurden drei unterschiedliche LC/MS-Setups verwendet.

5.1.7.1 Nano-LC/LTQ Orbitrap-MS

Die Nano-LC wurde zur Analyse von Peptiden nach Trypsin- oder Glu-C-Verdau verwendet und war mit einer Säule ausgestattet, die speziell für Peptide geeignet ist.

Flüssigkeitschromatographie:	Waters Nano-Acquity UPLC
<i>Trapping</i> -Säule:	Symmetry C18 (5 µm, 180 µm x 20 mm, Fluss 5 µl/min)
Analytische Säule:	BEH130C ₁₈ peptide column (1,7 µm, 100 µm x 100 mm)
Säulentemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen, Fluss:	1 µl, 750 nl/min
Laufmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure B: 0,1 % Ameisensäure in ACN
Laufmittel-Gradient:	3 min 97 % A, 3-5 min 80 % A, 5-45 min 40 % A, 45-48 min 20 % A, 48-50 min 3 % A, 50,01 min 97 % A, 15 min Equilibrierung 97 % A
Massenpektrometrie:	Thermo LTQ Orbitrap
Ionisierung:	positiv, Nanospray
Ionisierungsspannung:	~1,4 kV
Auflösung:	60000 bei <i>m/z</i> 400 (FWHM)
Kollisionsenergie:	35 %
Kollisionsgas:	Helium
<i>Damping</i> -Gas LTQ:	Helium
<i>Damping</i> -Gas <i>C-Trap</i> :	Stickstoff

5.1.7.2 Kapillar-LC/LTQ Orbitrap-MS

Für intaktes Wachstumshormon oder große Fragmente wurde eine Kapillar-LC verwendet. Die Kopplung mit der Orbitrap ermöglichte die Bestimmung akkurater Massen der Proteine. Außerdem wurden Trypsin- und GluC-Verdaue mit diesem System analysiert.

Flüssigkeitschromatographie:

Agilent 1100 Kapillar LC

<i>Trapping</i> -Säule:	Zorbax 300 SB - C18 (3,5 µm, 50 x 0,3 mm)
Analytische Säule:	Zorbax 300 SB - C18 (5 µm, 5 x 0,3 mm)
Säulentemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen, Fluss:	5 µl, 10 µl/min
Laufmittel:	A: 0,1 % Essigsäure, 0.01 % TFA B: 80 % ACN, 0,1 % Essigsäure, 0.01 % TFA
Laufmittel-Gradient:	0-2 min 95 % A, 2- 25 min 60 % A, 25-34 min 3 % A, 34-44 min 3 % A, Reequilibrierung 16 min 95 % A

Massenspektrometrie:

Thermo LTQ Orbitrap

Ionisierung:	positiv, Elektrospray
Ionisierungsspannung:	3,5 kV
Auflösung:	100000 bei m/z 400 (FWHM)
Kollisionsenergie:	35 %
Kollisionsgas:	Helium
<i>Damping</i> -Gas LTQ:	Helium
<i>Damping</i> -Gas <i>C-Trap</i> :	Stickstoff

5.1.7.3 LC/ API QTrap 4000-MS

Der Triple-Quadrupol wurde für MS/MS-Experimente verwendet bei denen kleine Fragmente detektiert werden sollten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde er zur Messung von charakteristischen Zuckerfragmenten einer modifizierten Wachstumshormonform verwendet. Das modifizierte Wachstumshormon wurde nach der OFFGEL-Fraktionierung intakt gemessen und fragmentiert. Durch den *low mass cut-off* von Ionenfallen im MS/MS-Modus war dies mit der Orbitrap bzw. dem LTQ nicht möglich.

Flüssigkeitschromatographie:	Agilent 1100 LC
Vorsäule:	Zorbax StableBond (1 mm x 17 mm, 5 µm)
Analytische Säule:	Zorbax 300SB-C18, 3,5 µm
Säulentemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen, Fluss:	5 µl, 100 µl/min
Laufmittel:	A: 1 % Essigsäure/0,1 % TFA B: ACN/Laufmittel A (80/20)
Laufmittel-Gradient:	95 % A, 0-25 min 15 % A, 10 min Reequilibrierung
Massenspektrometrie:	API QTrap 4000 Triple-Quadrupol mit LIT
Ionisierung	positiv, Elektrospray
Ionisierungsspannung	5,0 kV
Temperatur (ESI)	150 °C
Kollisionsenergie	40 eV
Kollisionsgas	Stickstoff

5.2 Entwicklung einer Dopingkontrollmethode zum Nachweis von Wachstumshormon aus humanem Plasma

5.2.1 Plasmaproben und Wachstumshormonkonzentrationen

Die in dieser Arbeit verwendeten Blutproben stammten von gesunden Probanden oder Patienten, die Wachstumshormon applizieren müssen, um einen Wachstumshormonmangel oder Kleinwuchs auszugleichen. Die Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis und die Studie wurde von der Ethikkommission der Deutschen Sporthochschule Köln genehmigt.

Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen abgenommen und 10 min bei 2700 g zentrifugiert. Das Plasma (1 ml) wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zum Zeitpunkt der Analyse bei -20 °C eingefroren. Wachstumshormon im Plasma ist bei Raumtemperatur und 4 °C mindestens eine Woche und bei -20 °C mehr als 100 Tage stabil [147-149].

Zur Implementierung von Referenzwerten wurden 33 Proben unterschiedlicher gesunder Probanden analysiert (Alter: 14-34, 16 männlich, 17 weiblich).

Die Patientenproben wurden vom Endokrinologikum Hamburg zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um 5 Patienten (3 männlich, 2 weiblich), die aufgrund von Wachstumshormonmangel oder ungeklärtem Kleinwuchs eine tägliche Menge von 50 µg/kg Wachstumshormon applizieren müssen (Genotropin[®] von Pharmacia, Humatrope[®] von Lilly oder Omnitrope[®] von Sandoz). Die Blutproben wurden etwa 2,5 und 14 h nach subkutaner Injektion genommen (Tabelle 5).

Tabelle 5 Patientenproben mit rGH-Medikation.

	Geburts-jahr	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Ge-schlecht	Krankheit	Präparat, Menge, Häufigkeit
a	1996	133	21,6	w	Minderwuchs, Wachstumshormonmangel	Omnitrope, 1 mg, täglich
b	1995	147	36,4	w	ISS (<i>idiopathic short stature</i> , ungeklärter Kleinwuchs)	Humatrope 12, 2 mg, täglich
c	1994	145	44,2	m	Wachstumshormonmangel	Omnitrope 3,3, 1,2 mg, täglich
d	2001	113	21,7	m	ISS (<i>idiopathic short stature</i> , ungeklärter Kleinwuchs)	Genotropin 12, 1 mg, täglich
e	1997	129	26,4	m	Wachstumshormonmangel	Genotropin 12, 1 mg, täglich

Zur Untersuchung der belastungsinduzierten Wachstumshormon-Ausschüttung mit dem entwickelten Assay wurde eine 30minütige, anaerobe Laufbelastung (durchschnittlicher Puls: 180 Schläge/min) mit zwei Probanden (1 männlich, 34 Jahre; 1 weiblich, 26 Jahre) durchgeführt. Blutproben wurden vor und 0, 10, 20, 30 und 90 min nach der Belastung abgenommen. Laktatwerte wurden vor und unmittelbar nach der Belastung gemessen.

5.2.2 Wachstumshormonkonzentrationen

Die Wachstumshormon-Konzentrationen von den Patientenproben sowie den Proben des Belastungstests und des Tagesprofils wurden mit einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA, R & D Systems) nach Herstellerangaben gemessen.

5.2.3 Standardlösungen

Rekombinantes GH (0,2 mg/ml) sowie der interne Standard Laktogen (1 mg/ml) wurden als Stammlösung in 1 % Rinderserumalbumin (BSA) bei -20 °C gelagert. Arbeitslösungen wurden arbeitstäglich in Konzentrationen von 0,2 ng/ml (rGH) sowie 0,1 µg/ml und 10 ng/ml (Laktogen) neu hergestellt.

5.2.4 Probenvorbereitung

Die im Folgenden beschriebene Probenvorbereitung erlaubt die Analyse von 6 Proben in einer Aufarbeitung und nimmt für Immunoaffinitätsaufreinigung, 2D-PAGE und Immunoblot etwa 2½ Tage in Anspruch. Abb. 14 und 15 zeigen ein Fließschema und eine schematische Darstellung der Aufarbeitung.

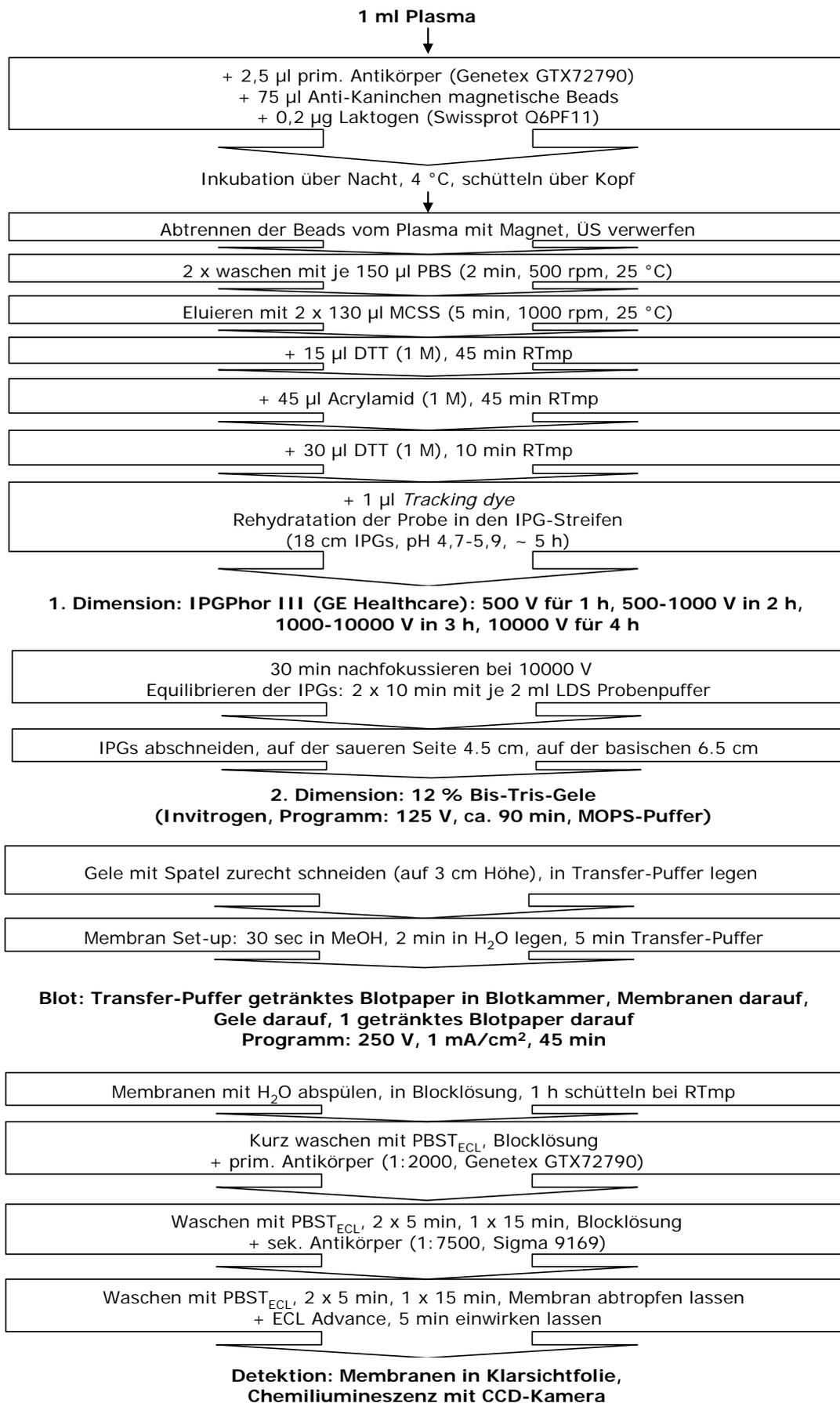


Abb. 14 Schematische Darstellung der Probenvorbereitung und Detektion.

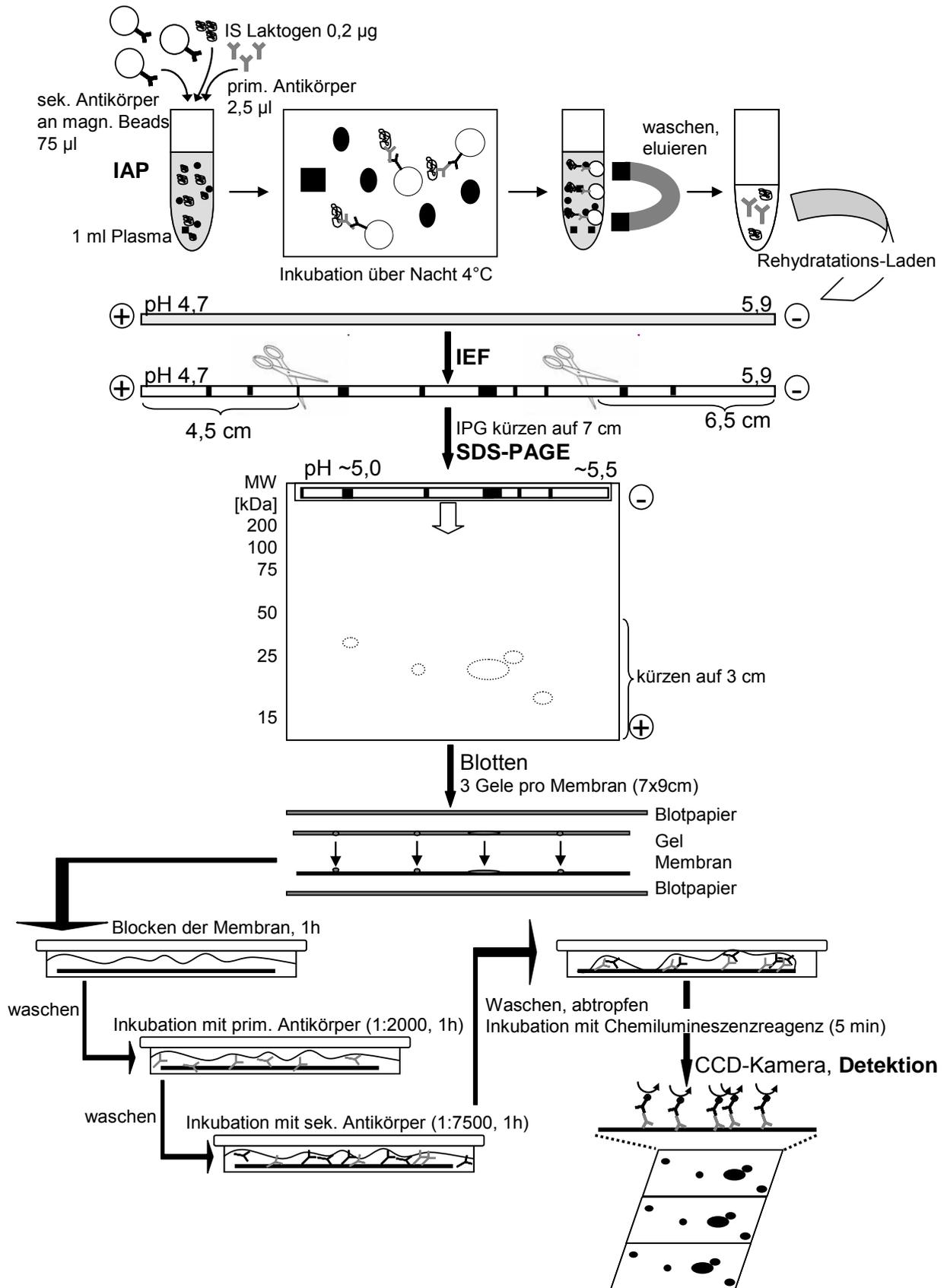


Abb. 15 Graphische Darstellung der Probenvorbereitung und Detektion.

5.2.4.1 Immunoaffinitätsaufreinigung

Das Wachstumshormon wurde mit Hilfe magnetischer Beads aus 1 ml Plasma isoliert. Für die Aufreinigung wurden 2,5 µl primärer Antikörper (1 mg/ml, produziert im Kaninchen) und 75 µl magnetische Beads, die an einen sekundären anti-Kaninchen Antikörper gekoppelt sind, verwendet. Zusätzlich wurden 0,2 µg humanes, plazentares Laktogen als interner Standard zugegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden die Beads mit PBS-Puffer (*Phosphate Buffered Saline*, 140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM NaH₂PO₄) gewaschen und die Analyten mit 2 x 130 µl MCSS (je 5 min, 1000 rpm) eluiert.

5.2.4.2 2D-PAGE und Immunoblot

Zur Vorbereitung der isoelektrischen Fokussierung wurden die Proteine in dem Eluat der IAP mit DTT reduziert (15 µl, 1 M, 45 min RTmp), mit Acrylamid derivatisiert (45 µl, 1 M, 45 min RTmp) und der Acrylamid-Überschuss mit weiteren 30 µl DTT inaktiviert.

Die IPGs (18 cm, pH 4,7-5,9) wurden mit der Probenlösung rehydriert und die isoelektrische Fokussierung über Nacht mit folgendem Spannungsgradienten durchgeführt: 500 V, 1 h; 500-1000 V, 2 h; 1000-10000 V, 3 h; 10000 V für 4 h (insgesamt: 57000 Vh). Die IPGs wurden 30 min bei 10000 V nachfokussiert und dann zweimal in LDS-Puffer (je 10 min) equilibriert.

Um Mini-Gele (8x10 cm) in der zweiten Dimension verwenden zu können, aber nicht an Auftrennungskapazität in der IEF zu verlieren wurden die 18 cm-IPGs nach der IEF auf 7 cm und einen pI-Bereich von etwa 5,0-5,5 gekürzt (4,5 cm auf der sauren Seite des IPGs, 6,5 cm auf der basischen Seite). Die SDS-PAGE wurde auf 12 %igen Bis-Tris Gelen durchgeführt. (90 min, 125 V, MOPS-Laufpuffer (MOPS=3-(*N-morpholino*)propanesulfonic acid)).

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit einem Spatel auf etwa 3 cm Höhe an der oberen Seite gekürzt (siehe Abb. 15), um drei Proben auf eine 7x9 cm Membran blotten zu können, welche sich in ihrer Größe zum Blotten mit extradicken Blotpapier sehr gut eignete. Die verwendete Gelkammer ermöglicht das Laufen von 6 Gelen gleichzeitig, so dass 2x3 Gele zusammen geblottet werden können und damit ein für eine Bestätigungsanalyse akzeptabler Probendurchsatz von 6 Proben/Aufarbeitung ermöglicht wird. Die Proteine wurden auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen geblottet (1 mA/cm², 45 min, Blotpuffer: 39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0.0375 % SDS, 20 % Ethanol) und es wurde unter der Membran und über dem Gel je ein in Puffer getränktes Blotpapier verwendet.

Nach dem Blotten wurde die Membran mit MilliQ Wasser abgespült und aktive Stellen mit ECL Advance Blocking Reagenz vor der Immunfärbung durch einstündige Inkubation abgesättigt. Alle Inkubationsschritte wurden unter leichtem Schütteln (20 rpm) auf einem

Schwenkschüttler durchgeführt. Die Membran wurde in PBST_{ECL}-Puffer (100 mM NaCl, 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 0.2 % Tween 20) zweimal kurz gewaschen und anschließend eine Stunde mit dem primären Antikörper inkubiert. Der Antikörper, der dem polyklonalen Antikörper der IAP entspricht, wurde 1:2000 in Blocking-Lösung verdünnt und die Membran eine Stunde in der Lösung geschüttelt. Nach Waschen in PBST_{ECL}-Puffer (2x5 min, 1x15 min) wurde mit einem sekundären, Meerrettich-Peroxidase gekoppelten, anti-Kaninchen-IgG Antikörper (1:7500) 1 h inkubiert. Die Membran wurde wie nach der ersten Inkubation mit PBST_{ECL} gewaschen (2x5 min, 1x15 min) und der überschüssige Puffer abgetropft. Es wurde in ECL Advance Chemilumineszenzreagenz 5 min inkubiert und das Reagenz auf Zellstoff abgetropft. Die Membran wurde in eine Klarsichtfolie gelegt und die Signale in einer FluorChem CCD-Kamera (Software: Alpha Ease FC 3.0) detektiert.

5.2.5 Auswertung

Nach der Detektion wurden die Blotbilder mit der Image Master 2D Platinum 6.0 Software ausgewertet. Mit der Image Master Software wurden Spot-Volumina berechnet, indem mit Hilfe des Spot-Editing Tools Kreise um die Spots gezogen wurden. Diese wurden so klein wie möglich gewählt, sodass eine Subtraktion des Hintergrunds nicht nötig war. Die von der Software errechneten Spotvolumina für die GH-Spots wurden auf das Volumen des internen Standards normiert.

5.2.6 Validierung

Da die entwickelte Methode als analytisches Werkzeug zum Nachweis von Doping mit rGH dienen soll, war eine Validierung analytischer Parameter notwendig. In Anlehnung an klassisch-analytische Methoden wurden die Parameter Spezifität, Linearität, Nachweisgrenze (LOD), Präzision und Wiederfindung bestimmt.

Für die Messung von Linearität, Nachweisgrenze und Wiederfindung wurde Pferdeserum anstelle humaner Matrix verwendet um dem Einfluss endogenen Wachstumshormons zu verhindern. Das Wachstumshormon des Pferdes hat einen deutlich basischeren pI (7,0) und ist auf dem Gelausschnitt, der in dieser Methode aufgenommen wird, nicht sichtbar.

Spezifität:

Zur Untersuchung der Spezifität wurden 10 Plasmaproben unterschiedlicher, gesunder Probanden analysiert. Zusätzlich wurde eine Probe ohne Zugabe internen Standards analysiert, um auch hier Störsignale auszuschließen.

Linearität:

Um die Linearität zu prüfen, wurde eine äquidistante Kalibriergerade angefertigt. Je 1 ml Pferdeserum wurde mit 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 und 3,0 ng/ml rekombinanten Wachstumshormons dotiert und analysiert.

Nachweisgrenze (LOD):

Die Nachweisgrenze wurde nach der Formel $LOD = y_{LOD} + 3,3 * s_{LOD}$ [150] aus der Kalibriergeraden berechnet (y_{LOD} =Achsenabschnitt der Kalibriergeraden; s_{LOD} =Standardabweichung von sechs Hintergrund-Werten). Zusätzlich wurde eine visuelle Nachweisgrenze bestimmt, welche als die Konzentration GH festgelegt wurde, die in 6 von 6 Proben detektiert werden kann. Je 1 ml Pferdeserum wurden vor der Aufarbeitung 0,25 ng/ml rekombinantes Wachstumshormon zugegeben.

Präzision:

Die Präzision wurde aus fünf identischen, mit rGH dotierten Proben bestimmt. Einem Plasmapool wurden 2 ng/ml zugegeben, es wurden 5 Aliquote gebildet und die Proben nach Zugabe des internen Standards aufgearbeitet und analysiert.

Wiederfindung:

Die Wiederfindung wurde durch Zugabe von je 2 ng/ml rGH zu 6 Aliquoten einer Pferdeserumprobe bestimmt. Weiteren 6 Proben wurde die gleiche Menge rekombinanten Wachstumshormons nach der Immunoaffinitätsaufreinigung zugegeben, wobei der interne Standard in beiden Fällen nach der IAP zugefügt wurde.

6 Ergebnisse und Diskussion

Die massenspektrometrische Charakterisierung von Wachstumshormonisoformen und Fragmenten diente als Grundlage für die Entwicklung einer Dopingkontrollmethode. Da die Dopingkontrollmethode auf der Detektion diskreter endogener Wachstumshormonformen basiert, ist eine Charakterisierung endogener Varianten essentiell. Mögliche individuelle Unterschiede in der Detektion unterschiedlicher Formen nach 2D-Elektrophorese können besser eingeschätzt und erklärt werden, wenn bekannt ist, um welche Veränderung des Moleküls es sich handelt. Zusätzlich fördert eine möglichst detaillierte und vollständige Charakterisierung die Aufklärung endokrinologischer Wirkungsweisen und ist damit auch für klinische Anwendungen sehr bedeutsam.

6.1 Massenspektrometrische Charakterisierung

6.1.1 2D-PAGE und Trypsinverdau

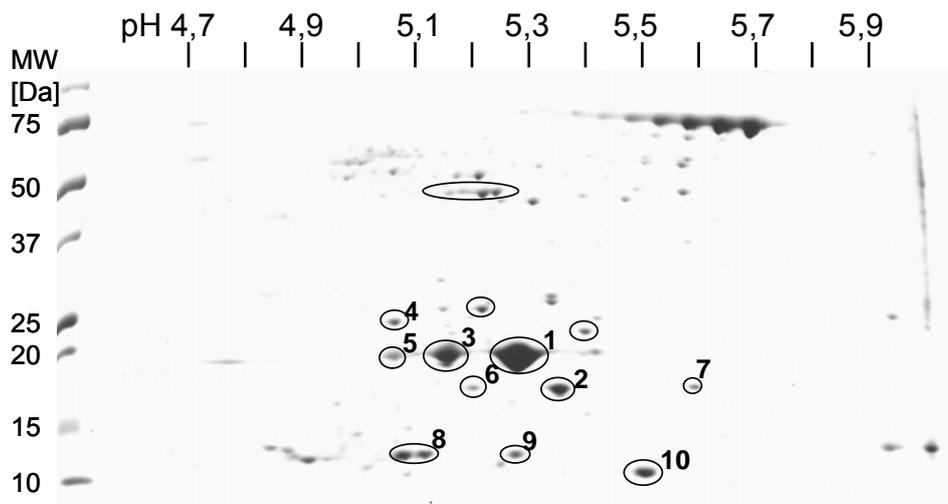


Abb. 16 2D-Gel eines Hypophysenextraktes. In den eingekreisten Spots wurden Wachstumshormon-peptide nachgewiesen, nummerierte Spots wurden detailliert untersucht.

Abb. 16 zeigt ein 2D-Gel eines Hypophysenextraktes. Durch den engen pH-Bereich der IPG-Streifen konnten die unterschiedlichen Formen effektiv aufgetrennt werden. In allen eingekreisten Spots wurden Wachstumshormon-Peptide detektiert, wobei die nummerierten Spots detaillierter analysiert wurden und im Folgenden beschrieben werden.

Der Unterschied im isoelektrischen Punkt (pI) der Spots 1 und 3 sowie 3 und 5 entspricht etwa 0,1 pH-Einheiten was im Falle des 22 kDa-Wachstumshormons einer Ladung und damit beispielsweise einer Phosphorylierung, Sulfatierung oder Deamidierung entspricht. Der pI-

Unterschied zwischen den Spots 2 und 6 entspricht ebenfalls einer Ladung, wie im Folgenden noch erklärt wird. Die als Spot 1-4 nummerierten Spots entsprechen den Formen, die auch in der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Dopingkontrollmethode detektiert werden (siehe 6.3).

Spot 1 ist der intensivste GH-Spot auf dem Gel und enthält die unmodifizierte Hauptform von GH, was in pI (5,27) und Molekulargewicht mit der Position auf dem Gel übereinstimmt. Die MS/MS-Spektren der detektierten Peptide aus dem Trypsin- oder GluC-Verdau sowie eine Tabelle mit den in den unterschiedlichen Spots gefundenen Peptiden sind in 8.2 (Anhang) dargestellt und aufgelistet. Die *Bottom-Up* Analyse nach Trypsin- und GluC-Verdau von Spot 1 ergab eine Identifizierung von 96 % der Aminosäuresequenz wie in Abb. 17 dargestellt

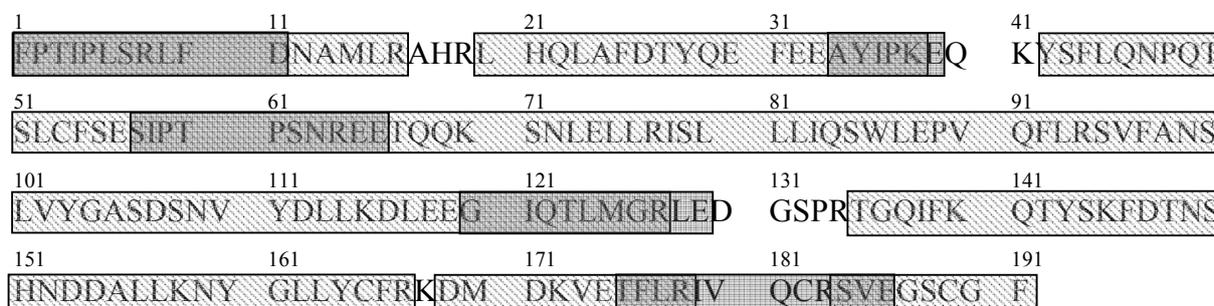


Abb. 17 Detektierte Abschnitte der GH-Sequenz nach Trypsin (gestreift) und/oder GluC-Verdau (grau).

Ein zuvor von Zhan et al. vorgestelltes 2D-Gel eines Hypophysenextraktes in dem Wachstumshormon detektiert wurde zeigte ein ähnliches Spotmuster, wenn auch die IEF- und SDS-PAGE-Bedingungen unterschiedlich waren [27].

6.1.2 Splice-Variante

Spots 2, 6 und 7 enthalten die 20 kDa Splice-Variante, der die Aminosäuren 32-46 fehlen. Das für die Charakterisierung eindeutige tryptische Peptid ist in Abb. 18 dargestellt. Durch das Fehlen der Aminosäuren 32-46 setzt sich das Peptid aus den Aminosäuren 20-31 und 47-64 zusammen.

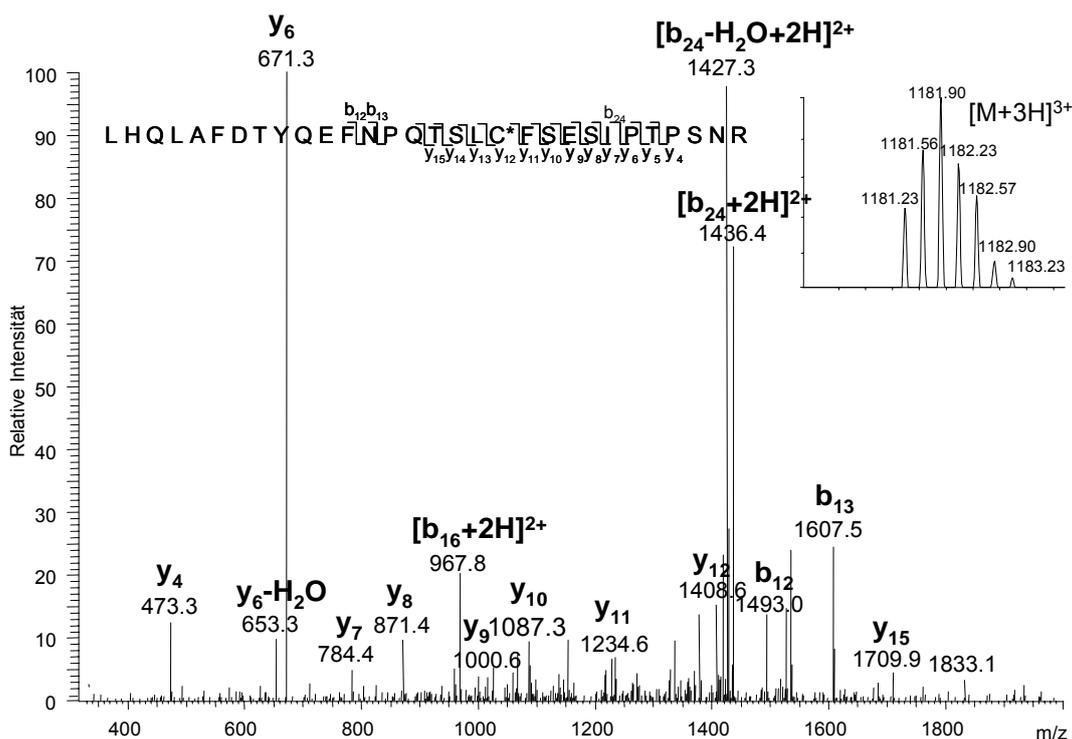


Abb. 18 MS/MS-Spektrum des „20 kDa-Peptids“ und Massenspektrum des 3-fach geladenen Vorläuferions.

Besonders charakteristisch für MS/MS-Spektren von Peptiden sind die sehr intensiven Signale y_6 und b_{24} aus Abb. 18, die eine N-terminale Spaltung an der Aminosäure Prolin widerspiegeln. Spot 2 liegt auf dem 2D-Gel bei einem pI von etwa 5,4, was dem errechneten isoelektrischen Punkt der unmodifizierten Splicevariante entspricht.

6.1.3 Verschiebung des pI ins Basische

Spot 7 liegt im Vergleich zur unmodifizierten Splicevariante (Spot 2) ins Basische verschoben. Diese Verschiebung könnte beispielsweise durch Acetylierung oder Amidierung verursacht werden. Im tryptischen Verdau wurden die gleichen Peptide detektiert wie für Spot 2, es konnte keine zusätzliche Modifikation detektiert werden, die den pI-Shift erklären würde.

6.1.4 Verschiebung des pI ins Saure: Phosphoryliertes Wachstumshormon

Phosphorylierungen von Wachstumshormon wurden bereits beschrieben und konnten hier an den Serinresten 106 und 150 nachgewiesen werden [28,109]. Phosphorylierungen konnten in den Spots 3, 5 und 6 detektiert werden wobei Spot 3 sowohl Phosphorylierungen an Serin 106 als auch an Serin 150 enthielt und in Spots 5 und 6 nur die Phosphorylierung an Serin 150

detektiert werden konnte. Tabelle 6 zeigt die theoretischen und beobachteten pI-Werte für die 22- und 20 kDa-Formen. In früheren Studien wurde zusätzlich eine Phosphorylierung mittels MALDI-TOF-Analyse an Ser 51 identifiziert, diese Modifikation konnte hier nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 6 Verschiebung des pI durch Modifikationen mit je einer(-)- Ladung.

Anzahl der Modifikationen*	22 kDa (theor.)	Spot Nr.	pI (exp.)
0	~5,27	1	~5,27
1	~5,12	3	~5,15
2	~4,99	5	~5,05
Anzahl der Modifikationen*	20 kDa (theor.)	Spot Nr.	pI (exp.)
0	~5,39	2	~5,35
1	~5,19	6	~5,20

* Phosphorylierung, Sulfatierung, Deamidierung erzeugen nahezu gleiche pI-Verschiebung, pI-Werte wurden mit Scansite und Promost [151,152] berechnet.

Die Spektren zu den modifizierten Peptiden sind in den Abbildungen 19 und 20 gezeigt und lassen die Identifizierung der Modifikation als Phosphorylierung zu. Neben den zusätzlichen 80 u des Vorläuferions kann der Massenunterschied auch im MS/MS-Spektrum in Position von einem Serinrests gefunden werden, was die modifizierte Aminosäure identifiziert. Eine sehr intensive Abspaltung von Phosphorsäure (- 98 u) differenziert die Phosphorylierung von einer Sulfatierung, die die gleiche Massendifferenz (80 u) ausmachen würde, aber eine Abspaltung von 80 u anstelle 98 auslösen würde [113]. Zusätzlich konnte die Phosphorylierung an Serin 150 durch die Berechnung der mittleren Masse aus den akkuraten Isotopensignalen bestätigt werden. Der Vergleich zu den errechneten, leicht unterschiedlichen mittleren Massen einer Phosphorylierung und einer Sulfatierung, ergab eine Übereinstimmung der errechneten Masse des phosphorylierten Peptids mit der experimentellen Masse des modifizierten Peptids (Abb. 20, $MW_{\text{mittleres}}(\text{exp.})=782,779$; $MW_{\text{mittleres, phosphoryliert}}(\text{theor.})=785,779$; $MW_{\text{mittleres, sulfatiert}}(\text{theor.})=785,820$).

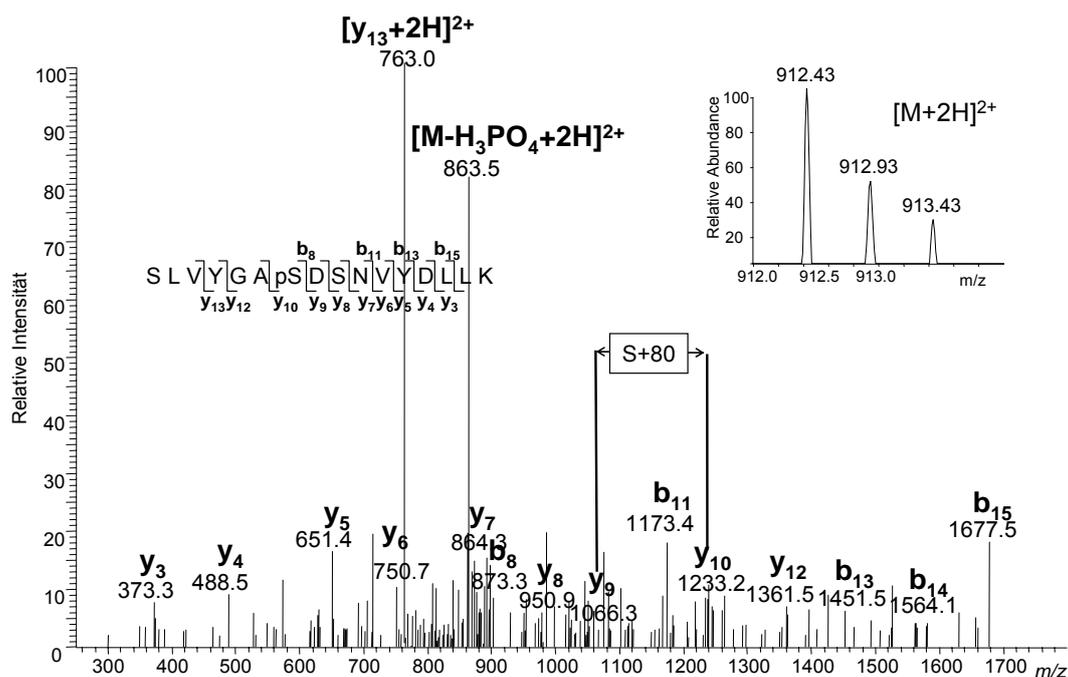


Abb. 19 ESI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 100-115, phosphoryliert and Serin 106, mit doppelt geladenem Vorläuferion.

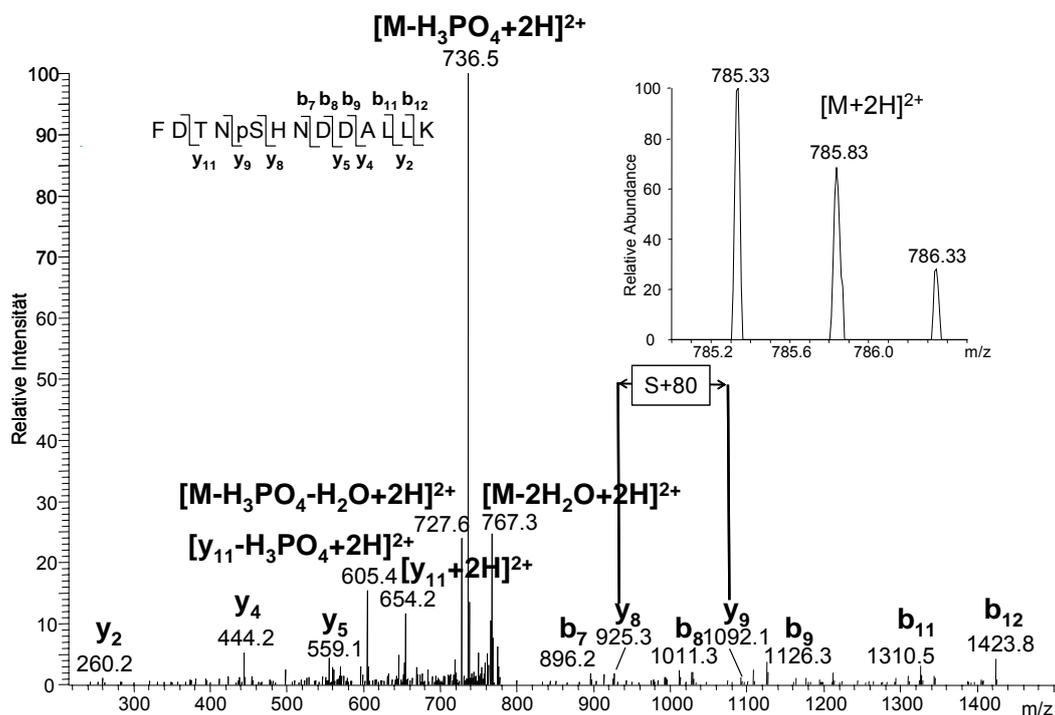


Abb. 20 ESI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 146-158, phosphoryliert and Serin 150, mit doppelt geladenem Vorläuferion.

Die Detektion des Peptids mit der Phosphorylierung und Serin 106 enthält eine weitere interessante Beobachtung. Während ohne Modifikation das tryptische Peptid AS 95-115 detektiert wird, konnte die Phosphorylierung nur an einem Fragment dieses Peptids (AS 100-

115) nachgewiesen werden, welches keiner spezifischen tryptischen Spaltung entspricht. Das intakte modifizierte Peptid wurde nicht detektiert. Eine Erklärung für diese unspezifische Spaltung in dem modifizierten Peptid konnte nicht gefunden werden.

Neben Phosphorylierungen wurden auch Deamidierungen (Asn 152, Gln 137) in früheren Studien detektiert [27]. Da sie zu der gleichen Verschiebung im isoelektrischen Punkt führen würden, ist es möglich, dass auch diese einen Anteil der Spots 3, 5 und 6 ausmachen. Da Deamidierungen häufig auch als Artefakt der Probenvorbereitung beschrieben wurden, wurden diese hier nicht detailliert untersucht [153,154].

6.1.5 Glykosyliertes Wachstumshormon

Spot 4 konnte als glykosylierte GH-Form identifiziert werden. Die Glykosylierung des 22 kDa-GH wurde bereits vermutet, nachdem chemische und enzymatische Deglykosylierung eine so genannte „24 kDa-Form“ auf einem SDS-Gel auf etwa 22 kDa verschob [31]. Spot 4 hat ein höheres Molekulargewicht als das 22 kDa-GH und der isoelektrische Punkt liegt ins Saure verschoben. Die pI-Verschiebung entspricht Spot 5 und damit zwei zusätzlichen, negativen Ladungen, wenn man davon ausgeht, dass die Aminosäuresequenz identisch ist (siehe Tabelle 6).

Nachdem nach Trypsinverdau des Gelspots im Vergleich zum unmodifizierten GH ein Peptid fehlte (AS 42-64, YSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNR), aber kein modifiziertes Peptid detektiert werden konnte, wurde die akkurate Masse des intakten modifizierten GH bestimmt. Um die intakte, modifizierte Form detektieren zu können, musste diese in dem Hypophysenextrakt angereichert werden. Dies wurde mittels einer OFFGEL-IEF-Methode ermöglicht, die es erlaubt Proteine in Lösung nach ihrem isoelektrischen Punkt aufzutrennen und damit die modifizierte Form gegenüber dem unmodifizierten 22 kDa-GH anzureichern. Dadurch erreicht man eine Auftrennung wie bei der gelbasierten IEF, kann die Lösung aber anschließend mittels LC/MS analysieren. Ein Gel mit den OFFGEL-Fraktionen 7-15 ist in Abb. 21 gezeigt. Die Auftrennung wurde in 24 Fraktionen mit einem pH-Gradienten von 4,5-5,5 erreicht. Die SDS-PAGE diente in diesem Falle der Überprüfung der Fokussierung und der Analyse, welche Fraktionen für die MS-Analyse verwendet werden müssen. Während die Fraktionen 13-15 einen sehr hohen Anteil des unmodifizierten 22 kDa-GH enthalten, ist das Verhältnis in den Fraktionen 9-12 etwa 1:1. Die Fraktionen 9-12 wurden für die MS-Analyse aufkonzentriert und gewaschen, um den hohen Harnstoffanteil in der OFFGEL-Lösung zu verringern.

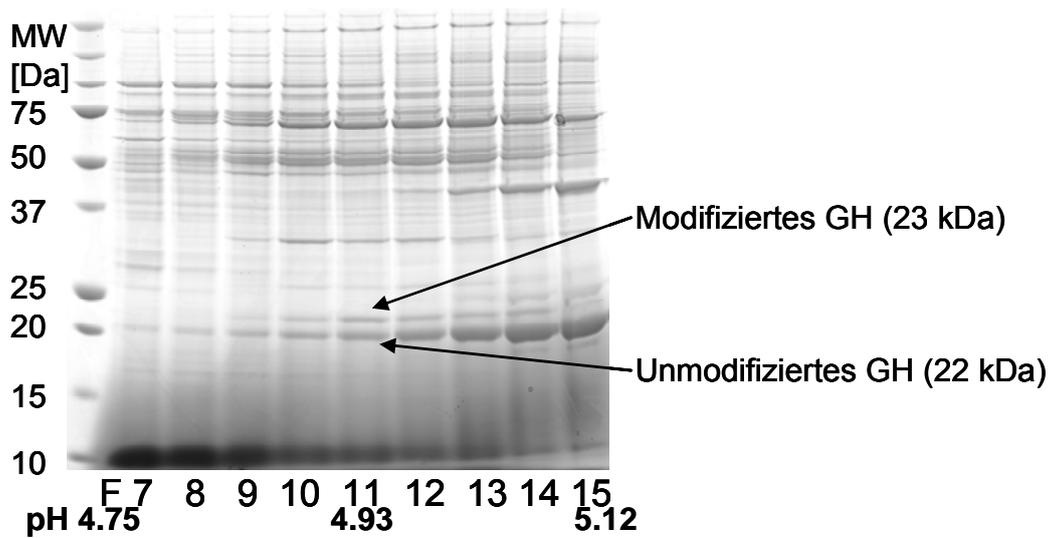


Abb. 21 SDS-PAGE von OFFGEL-Fractionen 7-15.

Die modifizierte Form hat einen isoelektrischen Punkt von etwa 5,0 (siehe Abb. 16, Tabelle 6) und nach OFFGEL-Fraktionierung ist in diesem Bereich eine Bande sichtbar, die etwas höher liegt als die des 22 kDa-GH. Das Ergebnis der Messung von F 11 mittels Orbitrap-Massenspektrometrie ist in Abb. 22 dargestellt. Das Spektrum zeigt modifiziertes und unmodifiziertes GH zu etwa gleichem Anteil und in unterschiedlichen Ladungszuständen von 12+ bis 22+. Dekonvolvieren des Spektrums ergab ein Molekulargewicht von 23062,5 Da (monoisotopisch) für das modifizierte Protein und damit eine Masse für die Modifikation von etwa $23062,5 - 22115,1$ ($MW_{\text{monoisotopisch}} \text{ 22 kDa-GH}$) = 947,4 Da. Die Masse der modifizierten Form ist damit deutlich geringer als zuvor vermutet. In früheren Studien wurde sie als 24 oder 27 kDa-Variante beschrieben [31,155].

Um mögliche charakteristische Kohlenhydrat-Fragmente detektieren zu können, wurden MS/MS-Experimente mit einer API 4000 QTrap aufgenommen. Das MS/MS-Spektrum des 20-fach geladenen Vorläuferions m/z 1154 ist in Abb. 23 gezeigt.

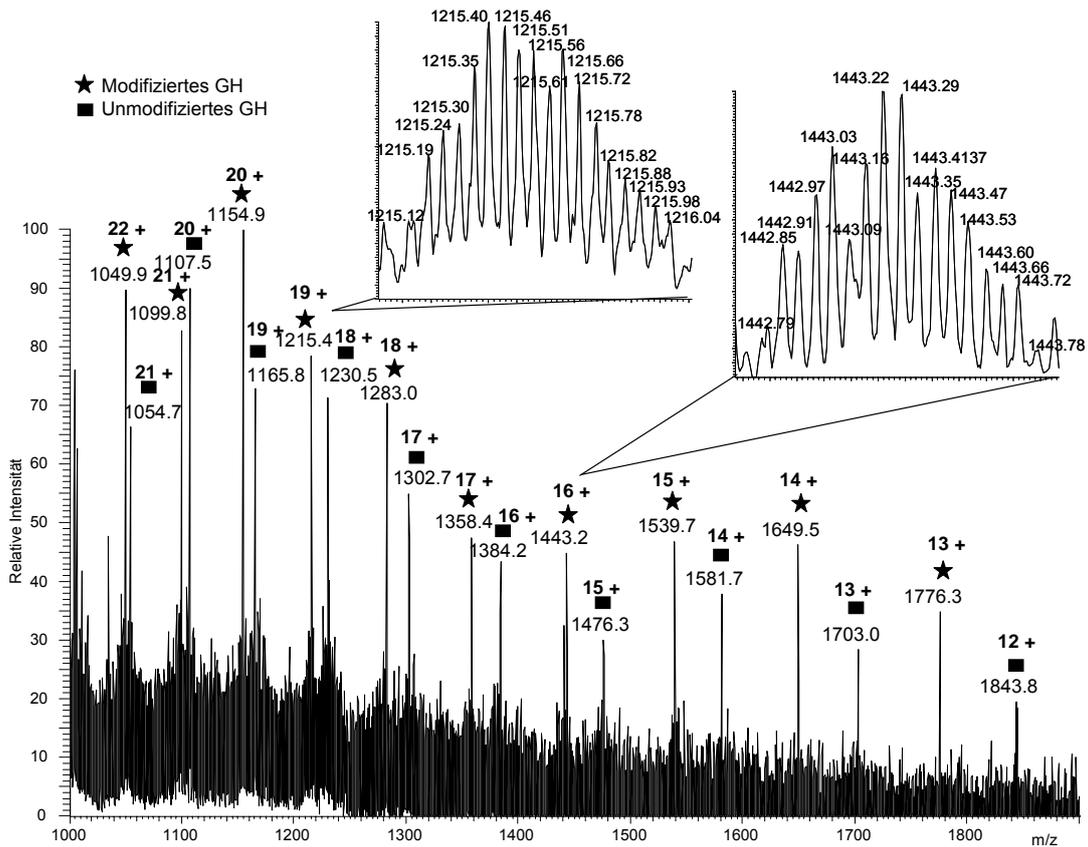


Abb. 22 Massenspektrum der OFFGEL-Fraktion 11 mit modifiziertem (★) und unmodifiziertem GH (■) in unterschiedlichen Ladungszuständen.

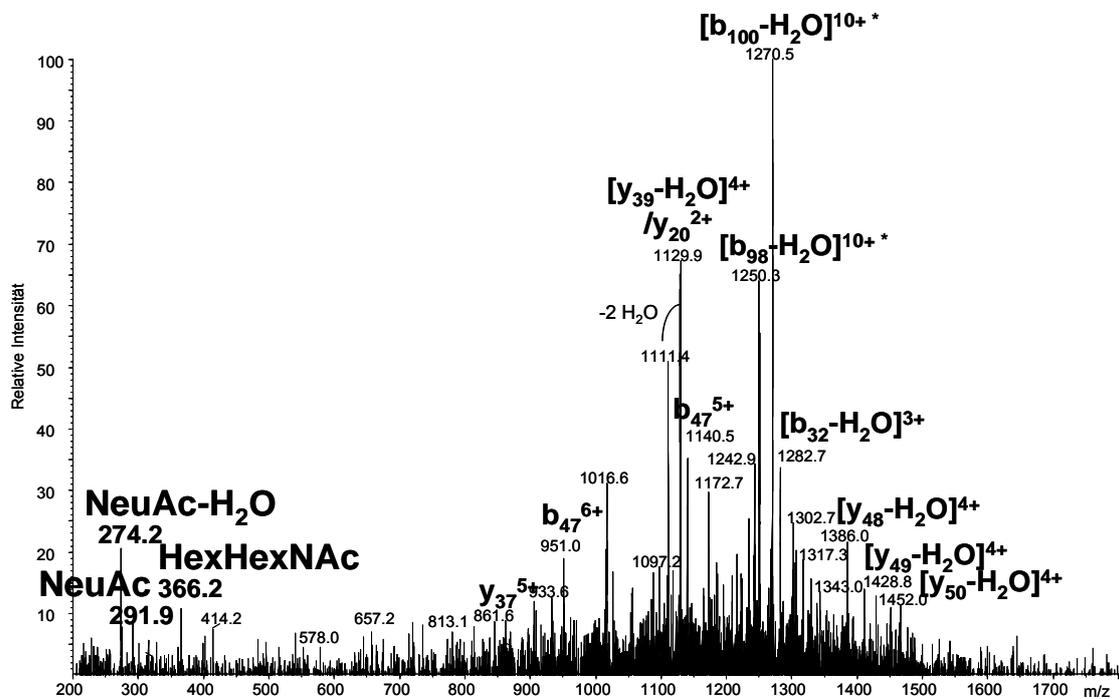


Abb. 23 MS/MS-Spektrum des 20-fach geladenen Vorläuferions m/z 1154 ($[M+20H]^{20+}$) des modifizierten GH, NeuAc=Sialinsäure, Hex=Hexose, HexNac=N-Acteyl-Hexosamin.

Die MS/MS-Messung ergab charakteristische Fragmente von Sialinsäure (292, 274 (Sialinsäure-H₂O)) und ein Fragmentation m/z 366 welches als charakteristisch für die Kombination einer Hexose und eines N-acteylierten Hexosamins (HexHexNac) gilt [156]. Addiert man die theoretischen Massen der beobachteten Fragmente erhält man genau den Massenunterschied von 947 Da ($365,1316 + 291,0949 + 291,0949 = 947,3214$; $947,32 + 22115,1 = 23062,4$ (calc), Fehler -4,3 ppm). Dies lässt den Schluss zu, dass die Modifikation sich aus einer Hexose, eines N-actylierten Hexosamins und zwei Sialinsäureresten zusammensetzt (HexHexNac*2NeuAc, Abb. 24).

Diese Zusammensetzung wurde bereits in anderen humanen Proteinen [112,114,116], unter anderem auch in Erythropoietin [157,158] beobachtet. Eine solche O-Glykosylierung wird als Mucin-Typ bezeichnet und beinhaltet die Bindung zwischen Serin oder Threonin und einem N-Acetyl-Galaktosamin-Rest [116]. An diesen Zucker gebunden ist in der Regel ein Galaktose-Monomer in 1-3-Verknüpfung. An Disacchariden dieser Art wurden bis zu zwei Sialinsäuren gefunden, die an beiden Galaktose-Resten gebunden sein können [114,116].

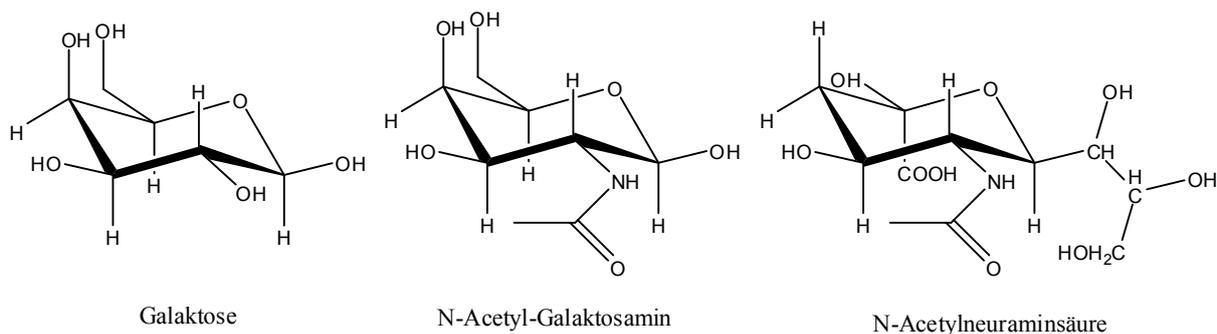


Abb. 24 Zuckerreste einer Mucin-Typ-Glykosylierung.

Die Abfrage der NetOGlyc 3.1 Datenbank, die nach möglichen Stellen für eine O-Glykosylierung des Mucin-Typs in einem Protein sucht, ergab für GH einen Treffer an Threonin 60 [159,160]. Threonin 60 liegt innerhalb des Peptids, das im Trypsinverdau in dem 23 kDa-Spot nicht detektiert werden konnte (AS 42-64). Nach Verdau mit GluC fehlte im Gegensatz zum Verdau des unmodifizierten 22 kDa-Spots das Peptid 57-64, was die Position der Glykosylierung zusätzlich absichert. Dass das modifizierte Peptid selbst nicht detektiert werden konnte liegt möglicherweise an dem In-Gel-Verdau. Durch den Kohlenhydratrest ist das ohnehin schon recht große Peptid noch größer und ließ sich vermutlich nicht intakt aus dem Gelspot extrahieren.

6.1.6 Wachstumshormonfragmente

Auf einigen der 2D-Gele unterschiedlicher Hypophysenextrakte konnten Wachstumshormonfragmente detektiert werden. Nachdem in Spot 10 nach Trypsinverdau nur N-terminale Peptide und in den Spots 8 und 9 (Abb. 16) nur C-terminale Peptide gefunden wurden, während das Peptid 78-94 in keinem der Spots detektiert werden konnte (siehe 8.3, Anhang), wurden die Fragmente intakt gemessen um akkurate Massen und dadurch die Spaltstelle zu bestimmen. Um große Proteine abzutrennen wurde der Extrakt vor der Messung durch einen 30 kDa Zentrifugenfilter filtriert und der Durchlauf gemessen. Die Abbildungen Abb. 25 und 26 zeigen Massenspektren der detektierten Fragmente und in Abb. 27 ist ein MS/MS-Spektrum des 9 kDa-Fragments dargestellt. Dekonvolvieren der Massenspektren ergab eine monoisotopische Masse von 7241,64 Da für das N-terminale Fragment (AS 1-78, error 1,7 ppm) und 12891,43 Da für das C-terminale Fragment (AS 79-191, error 1,8 ppm).

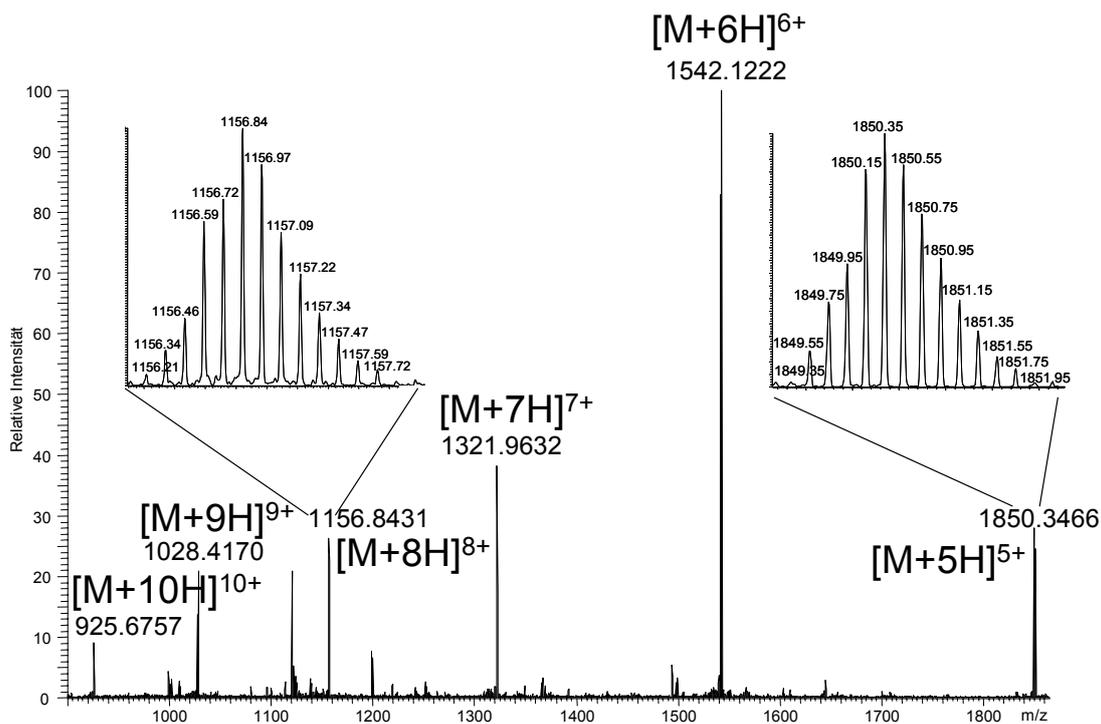


Abb. 25 Massenspektrum des N-terminalen 9 kDa-Fragments in unterschiedlichen Ladungszuständen.

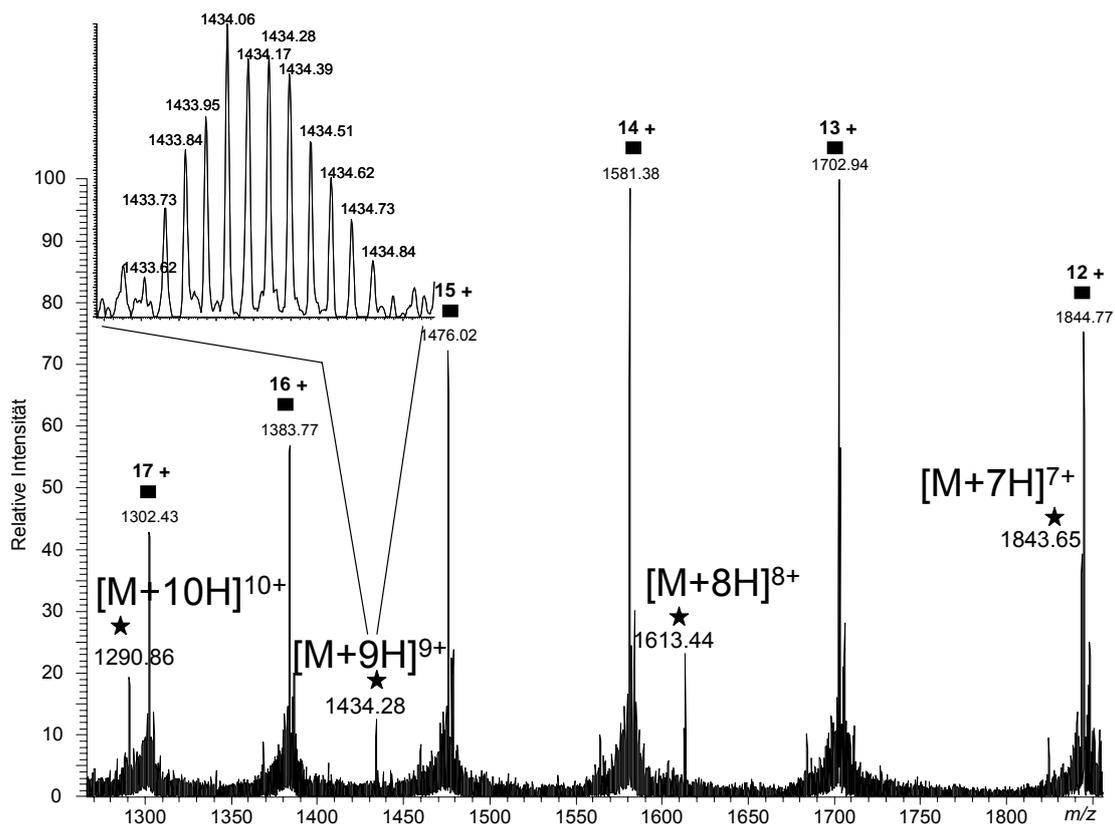


Abb. 26 Massenspektrum des C-terminalen, 12 kDa-Fragments (★). Die übrigen Signale repräsentieren unterschiedliche Ladungszustände intakten, unmodifizierten Wachstumshormons (■).

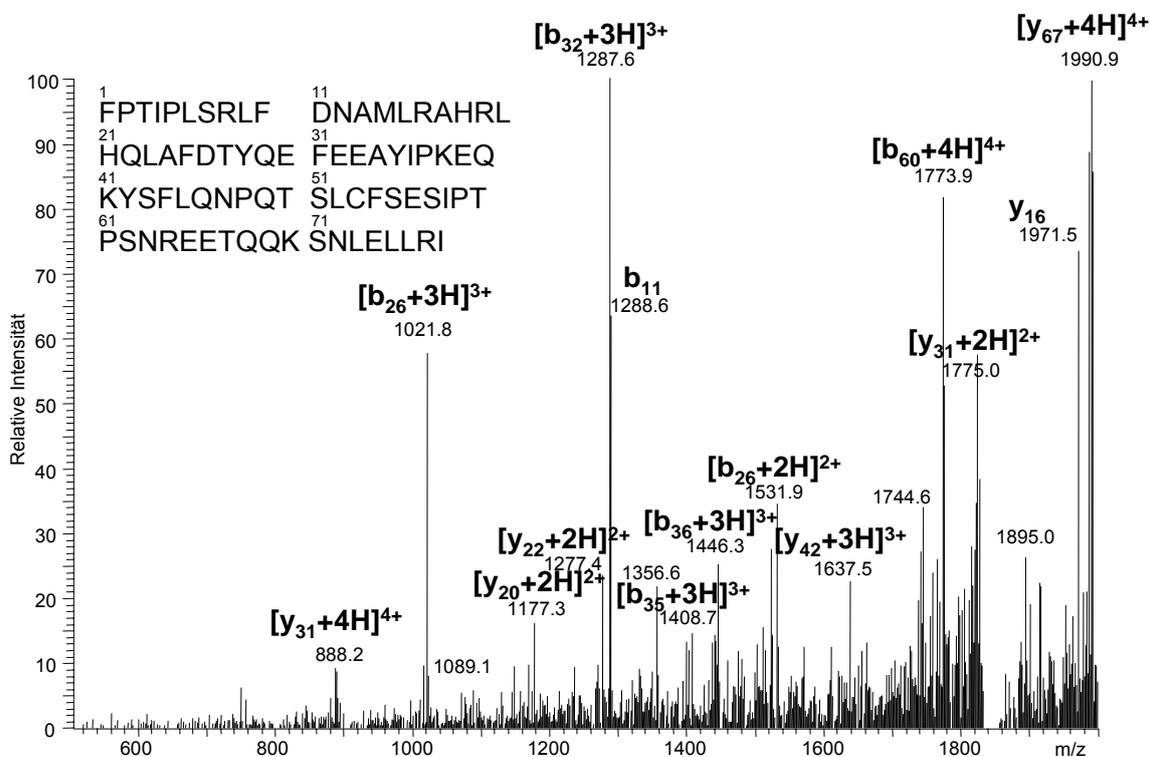


Abb. 27 MS/MS-Spektrum des 5-fach geladenen Vorläuferions m/z 1850 ($[M+5H]^{5+}$) des 9 kDa-Fragments.

Die Fragmente wurden in zwei von sieben analysierten Hypophysen nachgewiesen (Tabelle 7, grau unterlegt). Keine der zur Verfügung stehenden Daten der Donoren wie Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, Autolyse oder Todesursache lässt eine Erklärung des Auftretens der Fragmente zu.

Tabelle 7 Merkmale analysierter Hypophysen. In 2D-Gelen der grau unterlegten Proben konnten die beschriebenen Fragmente nachgewiesen werden

Geschlecht	Alter	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Autolyse [Tage]	Todesursache
männlich	20	174	64	1	Schweres Schädelhirntrauma
männlich	42	170	97	3	Akutes Herzversagen
männlich	56	174	70	3	Hirnmassenblutung
männlich	81	unauffällig		5	Hirnblutung
weiblich	43	165	65	5	unbekannt
weiblich	56	156	47	3	<i>diabetes mellitus</i> , Pankreatitis
weiblich	80	171	56	3	Chronische Pneumonie, Lungenembolie

6.1.7 Oxidationen

In den Analysen der tryptischen Peptide wurde eine Reihe von Oxidationen beobachtet. Oxidationen von Methionin zu Methioninsulfoxid sind häufig und werden als Artefakt der Probenvorbereitung beschrieben [161,162]. Daher werden diese hier nicht im Detail besprochen, MS/MS-Spektren von Peptiden mit oxidiertem Methionin sind in Abb. 51 und 60 (Anhang) dargestellt.

Weitere Oxidationen wurden an Tryptophan- und Histidinresten gefunden und werden in den nächsten Kapiteln detaillierter beschrieben. Die bisher beschriebenen Proteine, die an einer der beiden Aminosäuren oxidiert waren, standen gewöhnlich in Verbindung mit Redoxsystemen und reaktiven Sauerstoffspezies oder die oxidierten Aminosäuren lagen, im Falle der Histidinoxidation, nahe einer Metallbindungsstelle. Die Oxidation von Tryptophanresten wurde außerdem, wie bei Methioninresten, als Folge der Probenvorbereitung beschrieben. Bei der Identifizierung und Bewertung von Oxidationen muss beachtet werden, dass die detektierten Proteine aus Hypophysen stammen, die Leichen entnommen wurden. Grundsätzlich stellt der Sterbevorgang, in starker Abhängigkeit von der Todesursache, eine

Stresssituation für den Körper dar und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Verletzung, Krankheit oder auch Todesursachen wie Herzinfarkt ist bekannt [163-167]. Für traumatische Hirnverletzungen ist die Oxidation von Proteinen beispielsweise gut untersucht [168,169] und Studien zeigten, dass Oxidationen von Histidin und Tryptophan sehr übliche Modifikationen aufgrund reaktiver Sauerstoffspezies sind [170,171]. Die detektierten Oxidationen werden im Folgenden beschrieben, es sollte aber berücksichtigt werden, dass sie auch eine Folge der Todesursache und des Sterbevorganges sein können.

6.1.7.1 Tryptophanoxidation

Die Oxidation von Tryptophan wurde bei unterschiedlichen Proteinen beobachtet und steht in der Regel im Zusammenhang mit Redoxsystemen und reaktiven Sauerstoffspezies. Bei der Oxidation entstehen unterschiedliche Spezies: Einfache Oxidation führt zur Anlagerung eines Sauerstoffatoms an den Pyrrolring und weitere Oxidation führt zur Ringöffnung, die eine Abspaltung von CO nach sich ziehen kann (Abb. 28). In Proteinen mit oxidierten Tryptophanresten können alle drei oxidierten Formen detektiert werden.

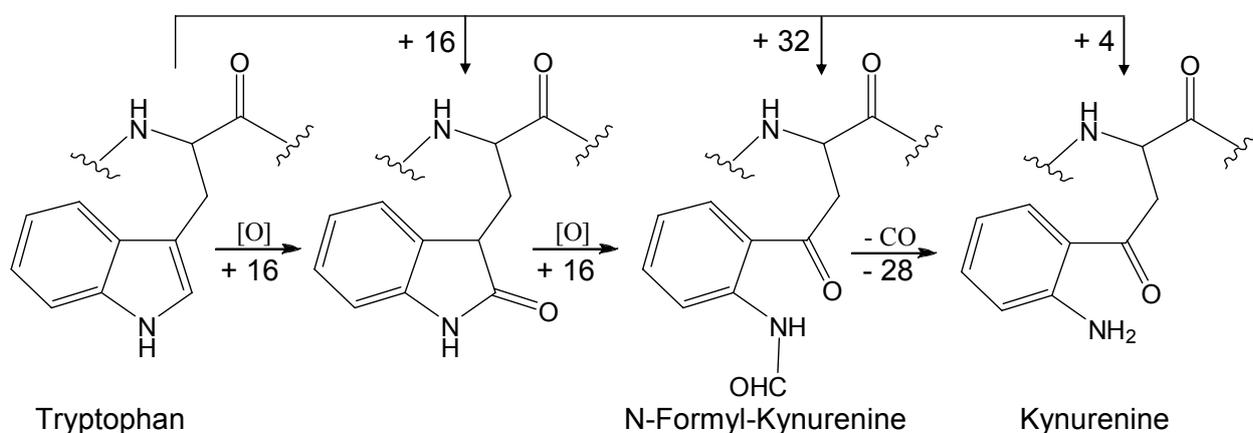


Abb. 28 Oxidation von Tryptophan nach [172].

Wachstumshormon enthält ein Tryptophan in Position 86. Es konnten alle drei Oxidationsformen detektiert werden, wobei der Oxidationsgrad interindividuell variierte. Nach Präparation von sieben unterschiedlichen Hypophysen (siehe Tabelle 7) wurden deutlich unterschiedliche Verhältnisse der oxidierten Formen festgestellt. Um Unterschiede aufgrund der Probenvorbereitung auszuschließen, wurden pro Hypophyse drei 2D-Gele angefertigt und für den Vergleich wurde Spot 1 (Abb. 16) aus jedem Gel tryptisch gespalten. Die MS/MS-Spektren der oxidierten Formen sind in Abb. 29 bis 31 gezeigt.

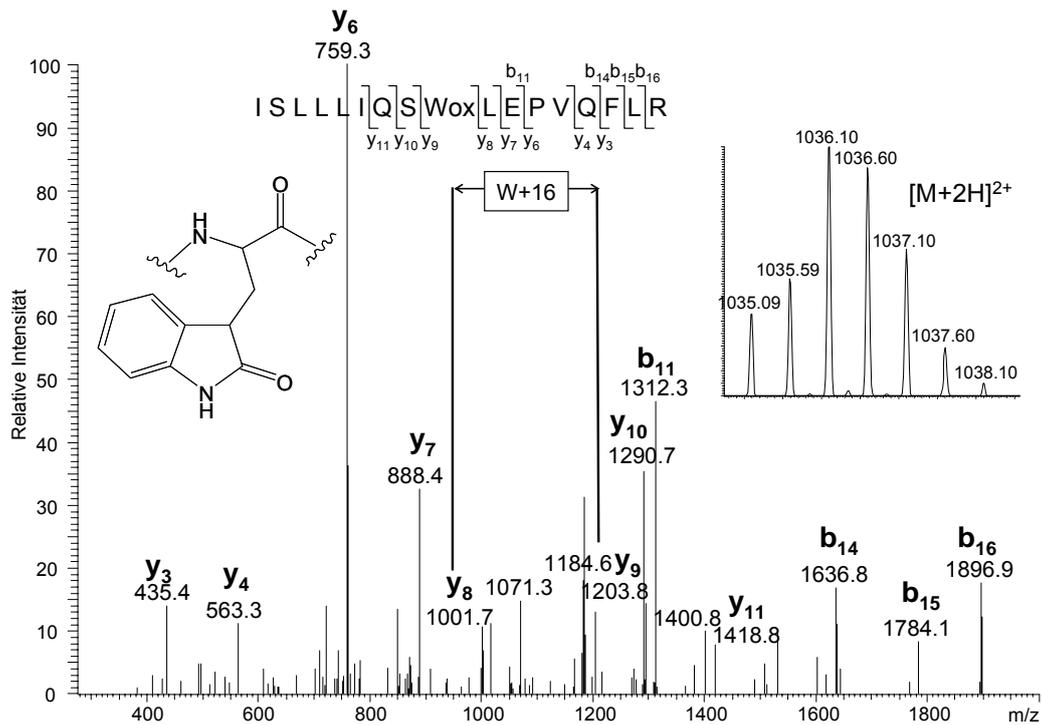


Abb. 29 ESI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 78-94, einfach oxidiert an Tryptophan 86.

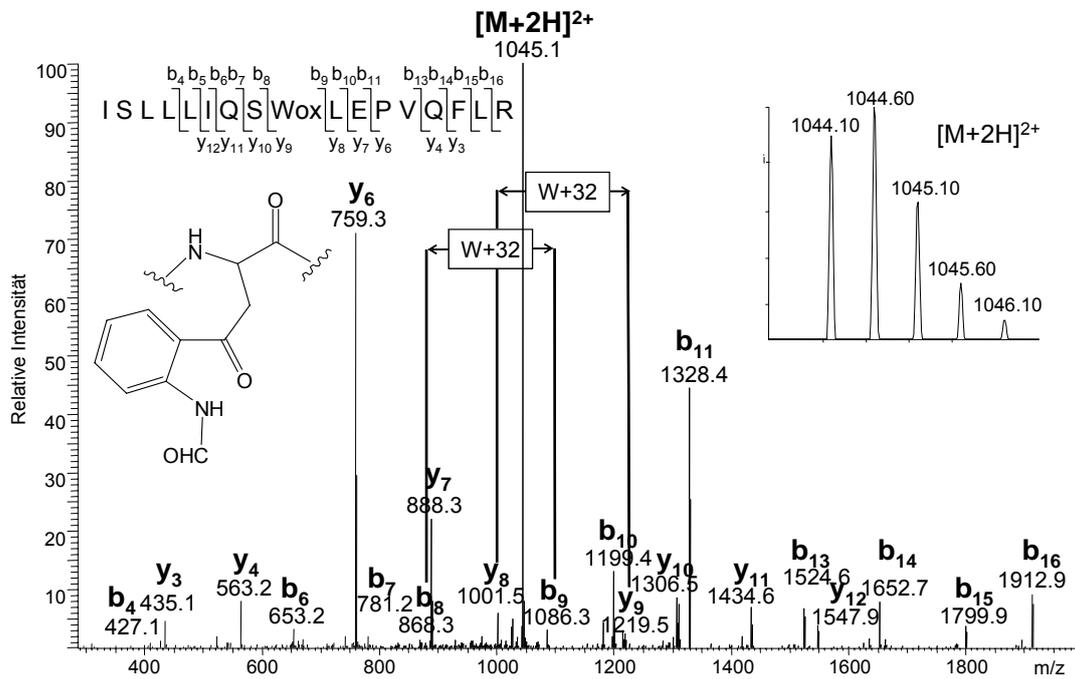


Abb. 30 ESI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 78-94 mit doppelt oxidiertem Trp 86.

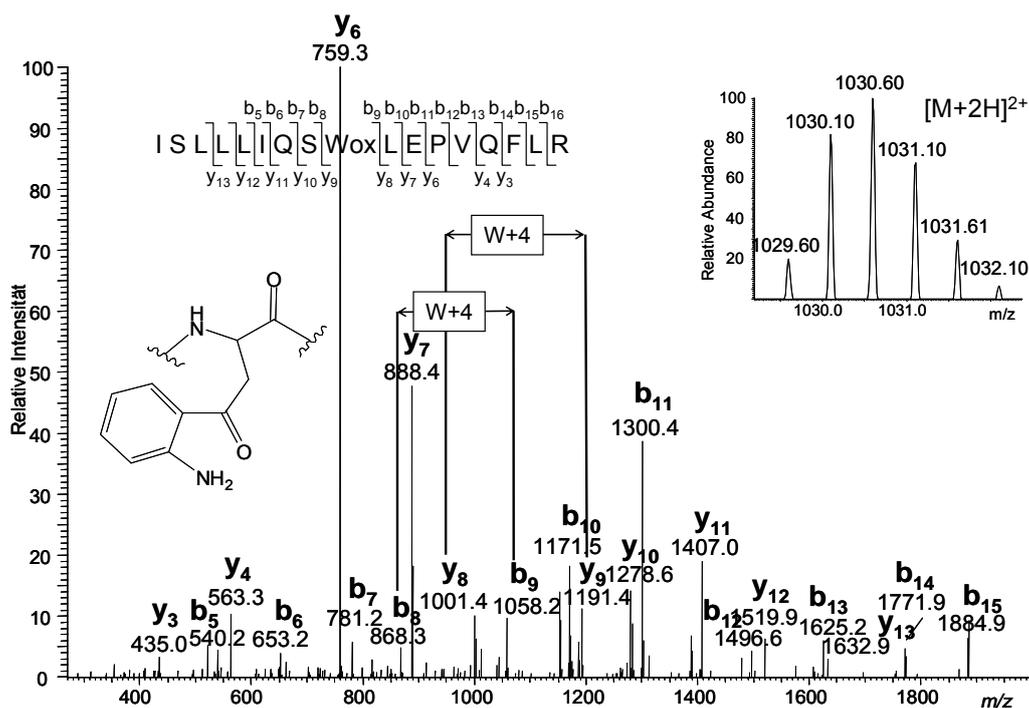


Abb. 31 ESI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 78-94 mit doppelt oxidiertem Tryptophan 86 nach Abspaltung von CO.

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Verhältnisse oxidiertes Tryptophanstrukturen. Sie listet die Intensitäten der Peptide der unterschiedlichen Oxidationszustände (m/z 1036, 1044, 1030) des Tryptophans auf, normiert jeweils auf die Intensität des unmodifizierten Peptids (m/z 1028). Das unmodifizierte Peptid machte in allen Hypophysen den größten Anteil aus während die modifizierten Formen etwa 6-100-fach weniger konzentriert waren. Eine MANOVA (Multifaktorielle Varianzanalyse) zeigte, dass die Verhältnisse der oxidierten Tryptophanstrukturen signifikant unterschiedlich sind ($2.9e-15$) und belegt damit, dass ein interindividuelle Unterschied in der Oxidation des Tryptophanrestes besteht.

Ein Vergleich mit Tabelle 7, welche die Merkmale der Hypophysen-Donoren auflistet, gibt auch für die Oxidation des Tryptophanrestes keinen weiteren Hinweis zum Auftreten der unterschiedlichen Oxidationsformen.

Tabelle 8 Interindividuelle Unterschiede im Oxidationsgrad von Tryptophan.

(n=3) Hypophyse	m/z	1028/1028	1036/1028 (+16)	1044/1028 (+32)	1030/1028 (+4)
m, 20 Jahre		100	1	2	1
SD			0.3	0.1	0.3
w, 43 Jahre		100	1	1	1
SD			0.2	0.4	0.4
m, 42 Jahre		100	1	1	1
SD			0.2	0.6	0.2
w, 56 Jahre		100	1	6	1
SD			0.5	1.0	0.4
m, 56 Jahre		100	2	2	1
SD			0.5	0.2	0.2
w, 80 Jahre		100	3	4	4
SD			0.2	0.3	0.1
m, 81 Jahre		100	2	15	8
SD			0.7	3.2	1.4

6.1.7.2 Oxidation von Histidin

Oxidationen von Histidin wurden als nicht-enzymatische, metallkatalysierte Hydroxylierung beschrieben, und auch für Wachstumshormon sind Histidinoxidationen in den Positionen 18 und 21 bekannt [40,173]. In der Regel tauchen diese Oxidationen in der Nähe von Metallbindungsstellen auf, was für Histidin 18 und 21 auch der Fall ist, da die Zink-Metallbindungsstelle von His 18, His 21 und Glu 174 gebildet wird [40].

Das dritte Histidin in der AS-Sequenz von Wachstumshormon befindet sich in Position 151 und liegt damit weit von der Metallbindungsstelle entfernt, exponiert auf der Oberfläche des Proteins (Abb. 32). Das MS/MS-Spektrum des oxidierten His 151 ist in Abb. 33 gezeigt, das Spektrum des Peptids mit der Oxidation an His 21 ist im Anhang (Abb. 53) dargestellt.

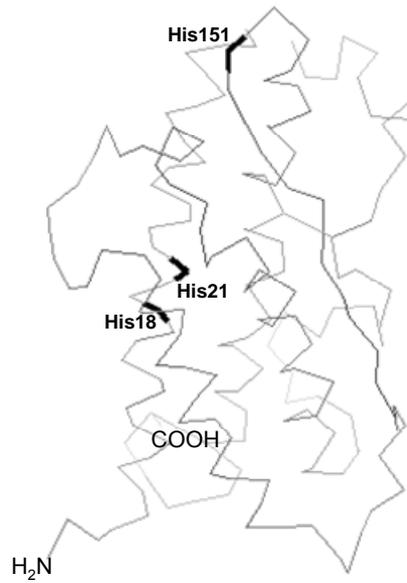


Abb. 32 3D-Struktur von Wachstumshormon mit Markierung der drei Histidin-Reste [174].

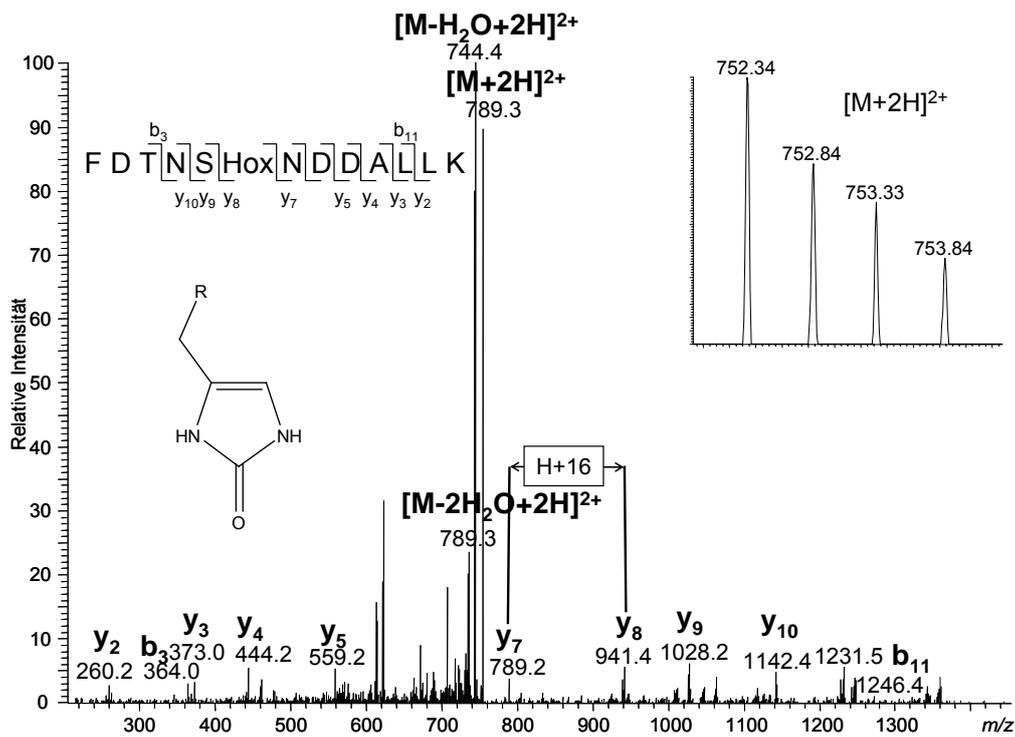


Abb. 33 MS/MS-Spektrum des Peptids 146-158, der Histidin-Rest 151 ist oxidiert zu 2-oxo-Histidin.

6.2 Vergleich endogenen und rekombinanten GHs mittels DIGE

Abb. 34 zeigt das Ergebnis einer *Difference Gel Electrophoresis*. Auf der linken Seite der Abbildung sind die einzelnen Aufnahmen der Fluoreszenzfarbstoffe gezeigt. Die rechte Seite zeigt die Überlagerung der beiden Farben und bestätigt, dass der Spot des rekombinanten GHs und der Hauptspot des endogenen GHs an der gleichen Position liegen und sich weder im pI noch im Molekulargewicht unterscheiden und das rGH keine vom endogenen GH abweichenden Spots zeigt. Damit ist belegt, dass sich eine Nachweismethode auf die Detektion der niederkonzentrierten endogenen Isoformen konzentrieren muss.

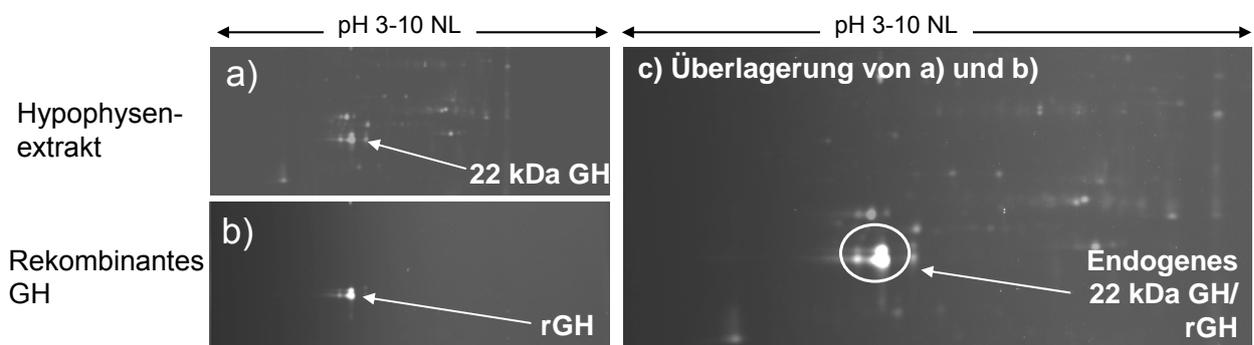


Abb. 34 DIGE rekombinanten und endogenen Wachstumshormons und Vergleich der 22 kDa-Formen.

6.3 Entwicklung einer Methode zum Nachweis von rekombinantem Wachstumshormon aus humanem Plasma

Die Anwendung von rekombinantem Wachstumshormon im Sport ist durch Zeugenaussagen, Geständnisse und Beschlagnahmungen eindeutig bewiesen. Die Tatsache, dass die aktuell verwendete Methode noch keinen positiven Befund hervorgebracht hat, belegt die Notwendigkeit, den bisherigen Test zu ergänzen. Die Grundlage des derzeit eingesetzten und des hier vorgestellten Analyseverfahrens ist ähnlich: Es gilt, niederkonzentrierte endogene Formen des Wachstumshormons im Plasma zu erfassen und ins Verhältnis zu der 22 kDa Hauptform zu setzen, die dem rekombinanten GH identisch ist. Bei Applikation rekombinanten Wachstumshormons wird durch negative Rückkopplung die Ausschüttung endogenen Wachstumshormons aus der Hypophyse unterdrückt. Dadurch überwiegt die 22 kDa-Hauptform noch stärker und der Anteil anderer endogener Formen wird verschwindend gering. Im Unterschied zu der derzeitigen Analyseverfahren, welche auf Immunoassays beruht, erfolgt in der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode nach der Antikörper-unterstützten Isolation des Wachstumshormons eine Auftrennung der unterschiedlichen Formen mittels 2D-PAGE. Der anschließende Immunoblot ermöglicht die Detektion diskreter endogener Wachstumshormonformen in Form von Spots auf der Membran.

Abb. 35 zeigt ein Muster endogener Wachstumshormonformen aus Plasma nach Immunoaffinitätsaufreinigung mittels magnetischer Beads, 2D-PAGE, Immunoblot und Chemilumineszenzdetektion. Die Spots 1-4 entsprechen den Spots 1-4 aus Abb. 16 und damit:

- der 22 kDa-Hauptform (1),
- der 20 kDa Splice-Variante (2),
- einer phosphorylierten 22 kDa Variante (3) und
- einer glykosylierten Form mit etwas höherem Molekulargewicht (4).

Die anderen beiden Spots (a und b, Abb. 35) repräsentieren den internen Standard, humanes plazentares Laktogen. Dieses wurde der Plasmaprobe vor der Immunoaffinitätsaufreinigung zugegeben, um normierte Spotvolumina berechnen zu können und die Probenaufarbeitung zu überprüfen. Ein Coomassie Blue gefärbtes Gel eines Hypophysenextraktes, welches unter den gleichen Bedingungen in IEF und SDS-PAGE angefertigt wurde, ist zum Vergleich in Abb. 36 dargestellt.

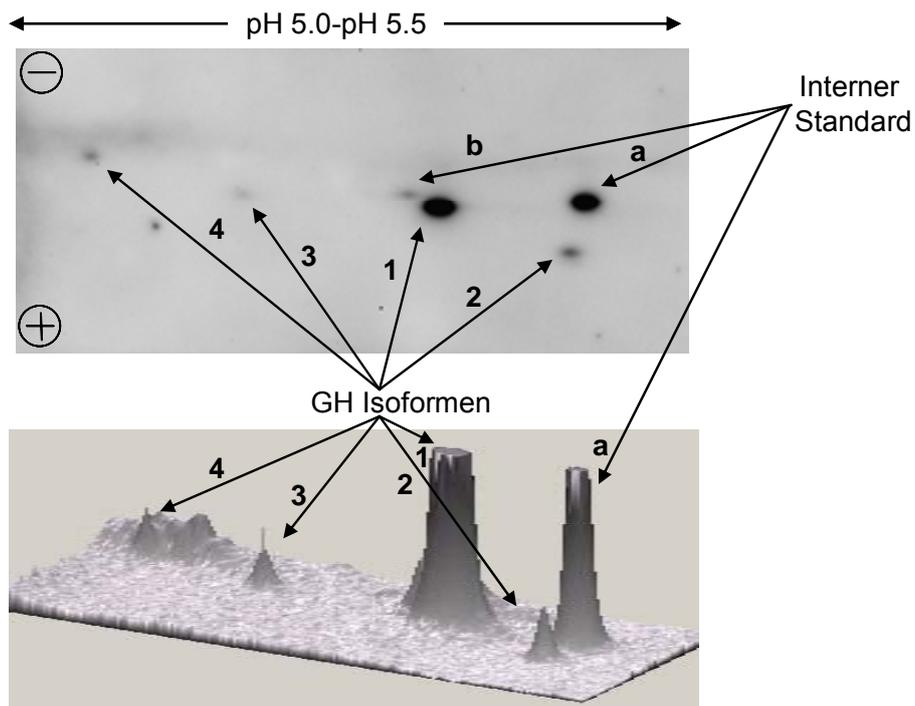


Abb. 35 Typische 2D-PAGE endogenen Wachstumshormons aus Plasma nach IAP, 2D-PAGE und Immunoblot und 3D-Ansicht des Blots; 1-4 endogene GH-Formen, a, b interner Standard.

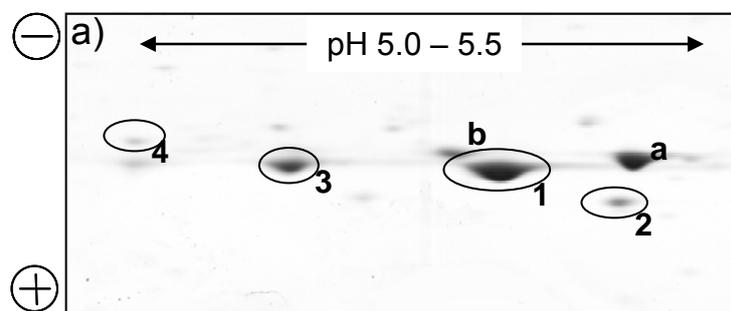


Abb. 36 2D-PAGE endogenen Wachstumshormons aus der Hypophyse nach Extraktion und Coomassie-Färbung; Spots 1-4: endogene GH-Formen, Spots a, b: interner Standard.

Im Gegensatz zu den Spotmustern von Proben, die endogenes Wachstumshormon enthalten, wird bei einer Probe die rekombinantes Wachstumshormon enthält nur ein Spot erwartet, wie es in Abb. 37 (Plasmaprobe) und 38 (Genotropin[®], Coomassie Blue gefärbt) dargestellt ist.

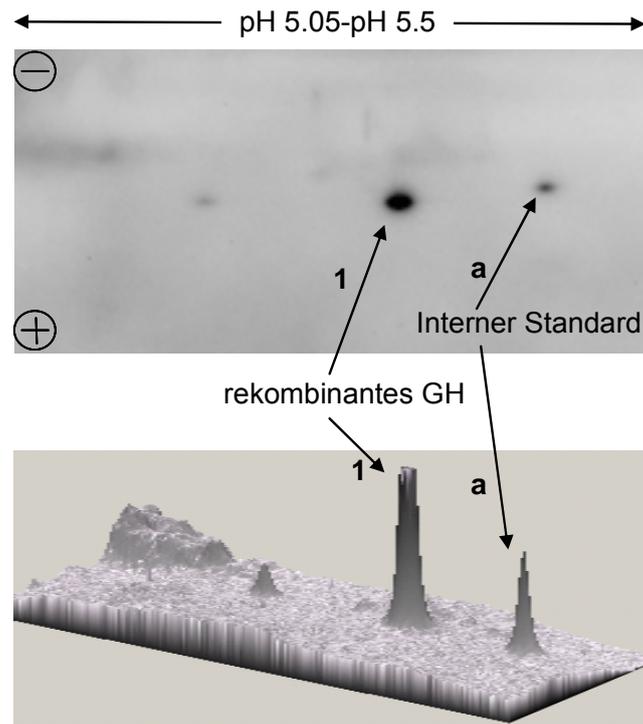


Abb. 37 2D-PAGE von Wachstumshormon aus Plasma eines Patienten (2,5 h nach Applikation von rGH) und 3D-Ansicht des Blots; Spot 1: rekombinantes GH, Spot a: interner Standard.

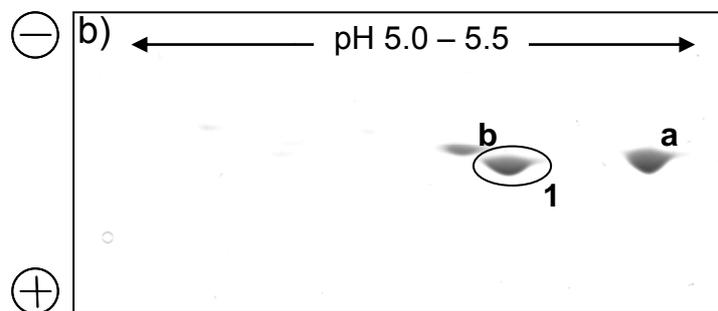


Abb. 38 2D-PAGE rekombinanten Wachstumshormons aus einer Injektionslösung (Genotropin®); Spot 1: rekombinantes GH, Spot a: interner Standard.

Der gewählte interne Standard, humanes plazentares Laktogen (= *Chorionic somatomammotropin hormone 1*, Swissprot-ID: Q6PF11) ist dem Wachstumshormon zu 86 % sequenzhomolog und hat eine sehr ähnliche räumliche Struktur [175]. Ein Vergleich der Sequenzen ist in Abb. 39 dargestellt.

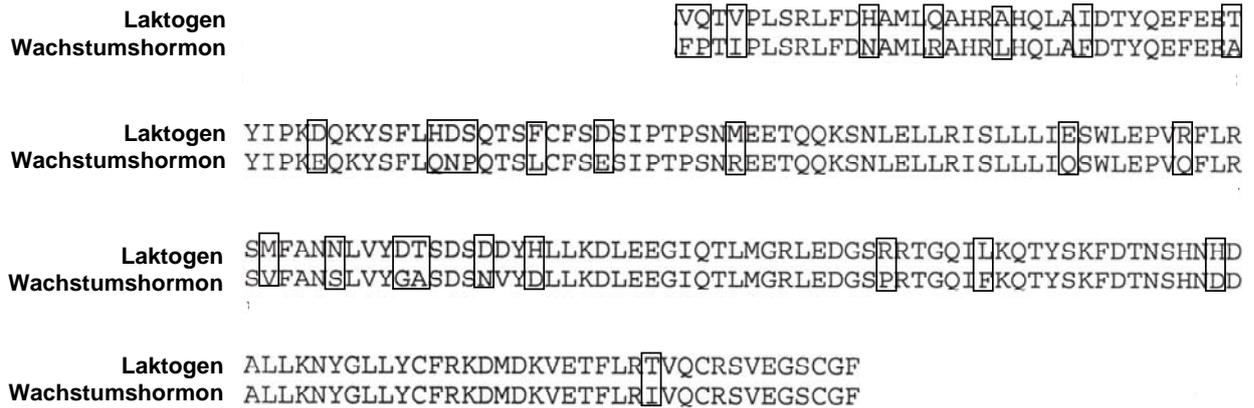


Abb. 39 Sequenzvergleich von Laktogen und Wachstumshormon; Positionen, an denen sich die Aminosäuren unterscheiden, sind eingerahmt.

Die ähnlichen Sequenzen gehen mit einem sehr ähnlichen Molekulargewicht einher ($MW_{\text{monoisotopisch}} = 22263,93 \text{ Da}$) und auch der pI liegt dem von Wachstumshormon sehr nahe ($pI = 5,33$). Durch die ähnliche Sequenz ist eine Kreuzreaktion mit dem anti-Wachstumshormon Antikörper möglich, so dass der interne Standard aus dem Plasma isoliert und auf den Blots detektiert werden kann. Da die Kreuzreaktion deutlich schwächer ist als die Affinität des Antikörpers zum Wachstumshormon wird der interne Standard in etwa 100-fach höherer Konzentration ($0,2 \mu\text{g/ml}$ Plasma) zugegeben als das in der Probe enthaltene GH. Durch die ähnlichen biochemischen Eigenschaften kann der interne Standard außerdem auf dem in MW und pI sehr begrenzten Membranbereich sehr gut detektiert werden, ohne mit der Detektion der Wachstumshormonformen zu interferieren.

Plazentares Laktogen spielt eine wichtige Rolle in der Energieversorgung des Fötus während der Schwangerschaft und wird auch nur während dieser Zeit im Körper produziert [176], so dass es in Plasmaproben von Athleten nicht vorhanden sein sollte. In Plasmaproben wurde im Rahmen der Spezifitätsmessungen kein Signal in der Position des Laktogens detektiert.

Zur Normierung von Spotvolumina der Wachstumshormon-Spots wurde der intensivere der beiden IS-Spots genutzt (Spot a, Abb. 35 und 37).

6.3.1 Validierung

Da die Methode als analytische Prozedur in der Dopinganalytik eingesetzt werden soll, wurde eine Validierung nach analytischen Parametern, in Anlehnung an klassische analytische Methoden, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 Validierungsergebnisse.

Validierungsparameter	Absolutes Spotvolumen GH	Absolutes Spotvolumen ISTD	Normiertes Spotvolumen	Ergebnis
Linearität				y=0,34x-0,058 linear
Nachweisgrenze Berechnet Visuell				0,3 ng 0,25 ng
Präzision Probe 1 2 3 4 5	165972 67920 107360 107524 105729	230266 87655 146016 200972 160835	0,72 0,77 0,74 0,54 0,66	14 %
Wiederfindung Zugabe von GH vor IAP nach IAP			0,14 0,48	30 %

Die Validierung einer solchen Methode nach den untersuchten Parametern ist nicht sehr gängig. Da alle Parameter zufriedenstellend bestimmt werden konnten und die Methode eine sehr gute Spezifität und hinreichende gute Präzision sowie Wiederfindung hat, ist es gerechtfertigt, sie als analytisches Werkzeug in der Dopingkontrolle einzusetzen. Die einzelnen Ergebnisse werden im Folgenden detaillierter dargestellt.

6.3.1.1 Spezifität

Die Spezifitätsmessungen zeigen keinerlei Störsignale auf den Blots zehn unterschiedlicher Plasmaproben (Abb. 40). Sehr auffällig sind die unterschiedlichen Mengen endogenen Wachstumshormons, die in den Proben enthalten sind und die durch die pulsatile Ausschüttung aus der Hypophyse entstehen. Durch die unterschiedliche GH-Konzentration variiert auch die Detektion der Isoformen und Varianten entscheidend. Während in sehr gering konzentrierten Proben kein GH (Abb. 40, 4) oder nur die 22 kDa-Hauptform (Abb. 40, 1, 3, 7) detektiert werden, können in anderen Proben zwei (5, 6) oder vier Varianten (2, 8) analysiert werden.

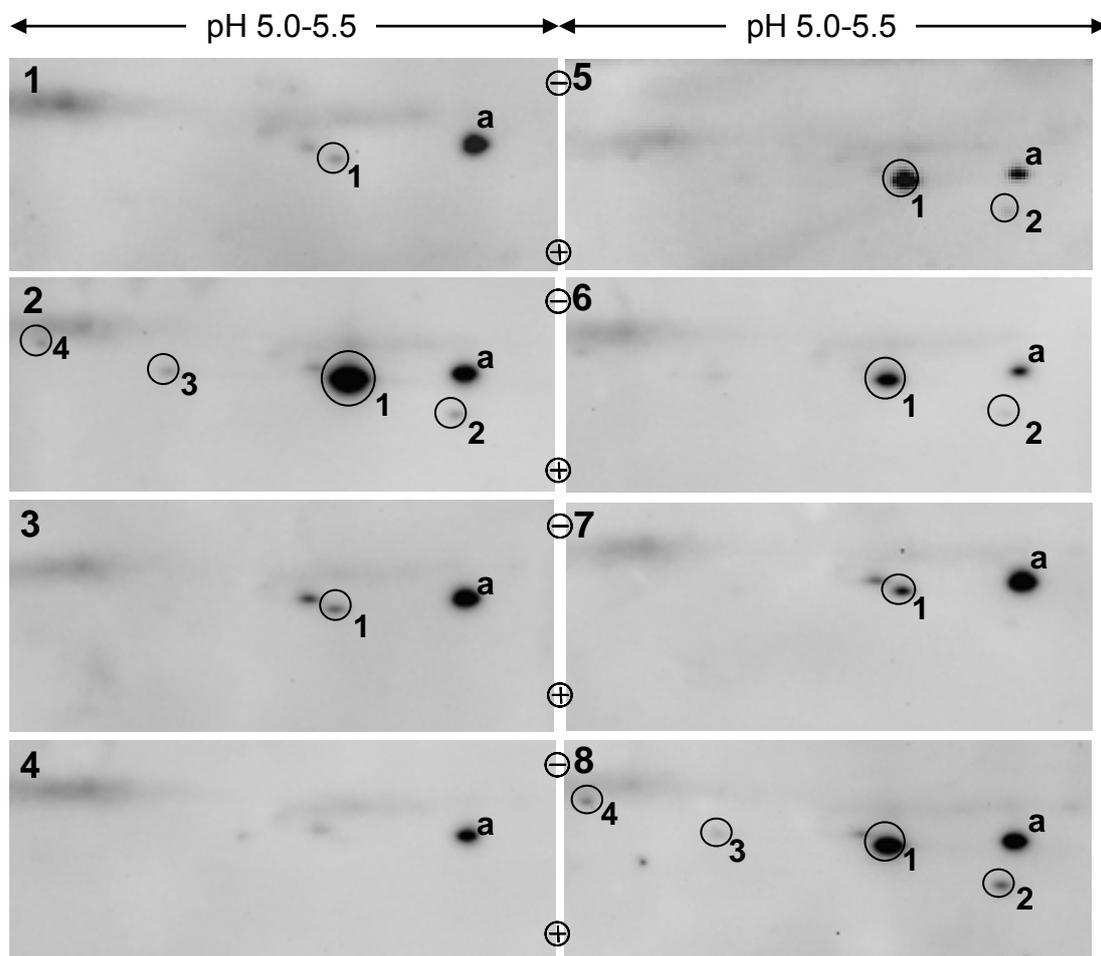


Abb. 40 Proben aus der Analyse der Spezifität; Spots 1-4 repräsentieren endogene GH-Varianten, Spot a enthält den internen Standard.

6.3.1.2 Linearität und Nachweisgrenze

Die in Abb. 41 dargestellte Gerade aus den normierten Spotvolumina der unterschiedlichen Konzentrationen von rGH ist nach Mandel [177] linear und die aus der Geraden errechnete Nachweisgrenze der Methode liegt bei 0,3 ng/ml Plasma ($LOD = y_{LOD} + 3,3 * SD_{LOD}$, y_{LOD} = Achsenabschnitt der Kalibriergeraden, SD = Standardabweichung von 6 Hintergrund-Intensitätswerten) [150]. Zusätzlich wurde eine visuelle Nachweisgrenze bestimmt, die als die Menge festgelegt wurde, die in 6 von 6 dotierten Proben detektiert werden konnte. Die visuelle Nachweisgrenze wurde mit 0,25 ng/ml sehr ähnlich bestimmt wie die aus der Geraden errechnete.

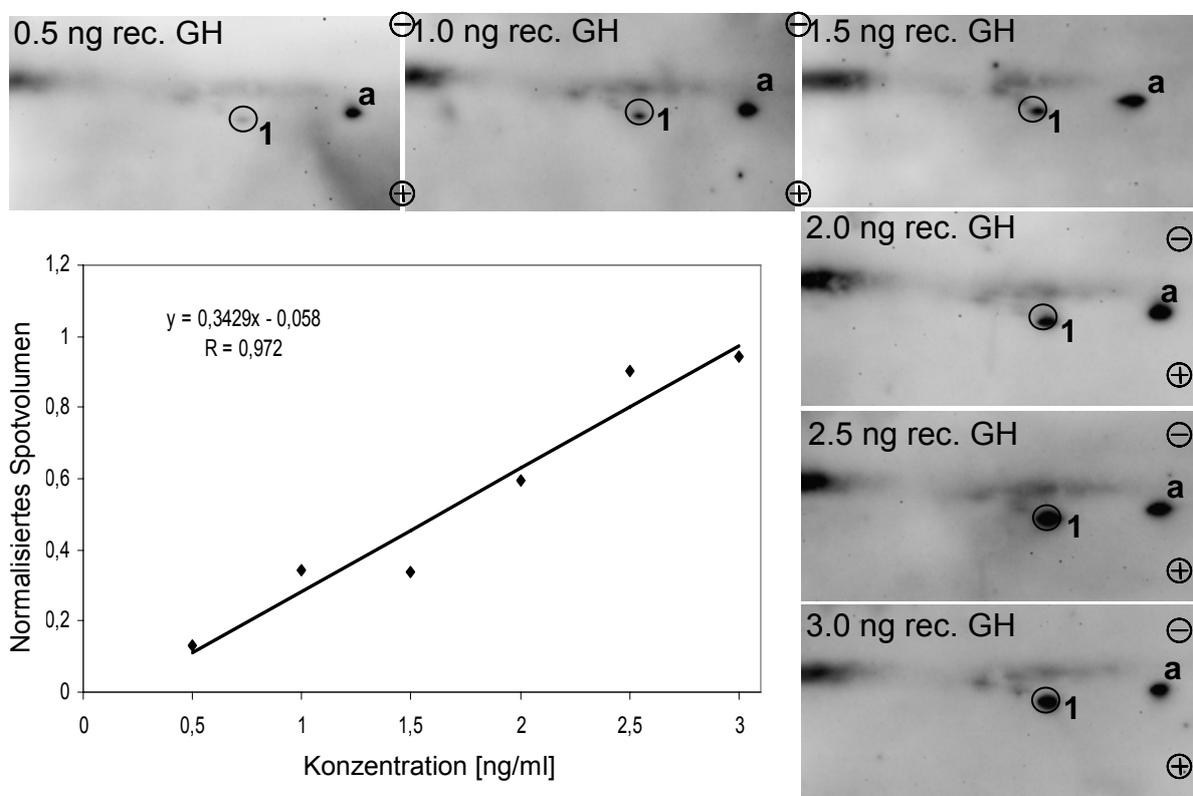


Abb. 41 Linearität: Blots mit unterschiedlichen Konzentrationen von GH und die resultierende Gerade. 1 = rekombinantes GH, a = IS.

6.3.1.4 Wiederfindung

Die Analyse der Wiederfindung der Immunoaffinitätsaufreinigung ist in Abb. 43 dargestellt. Der Mittelwert aus 6 Proben (Abb. 43, beispielhaft 1-3), die nach Zugabe rekombinanten GHs vor der IAP aufgearbeitet wurden, im Vergleich zu sechs Proben, denen das rGH erst nach der IAP zugegeben wurde (Abb. 43, 4-6), ergab eine Wiederfindung der IAP von 30 %.

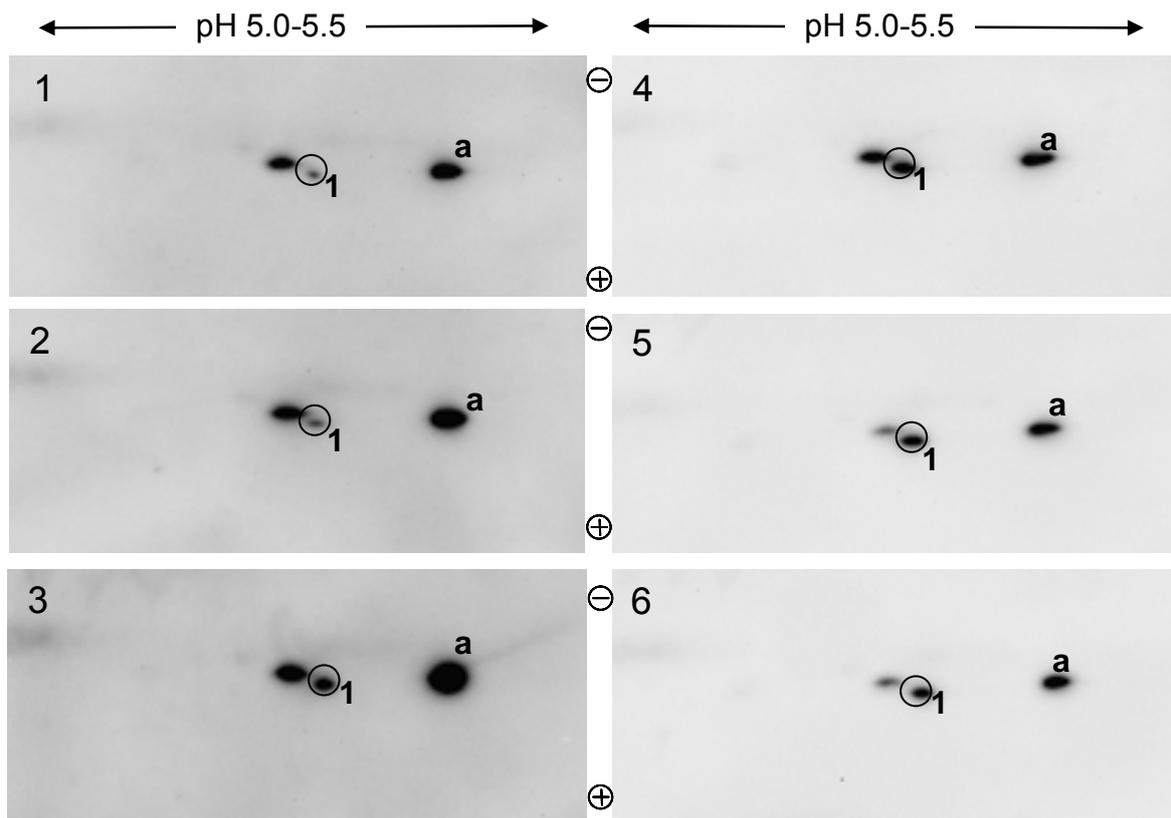


Abb. 43 Wiederfindung; 1-3: GH wurde der Probe vor der IAP zugegeben, 4-6: GH wurde nach der IAP zugegeben; 1 = rekombinantes GH, a = IS.

6.3.2 Referenzpopulation und Festlegung einer Unterscheidungsgrenze

Für die Analyse einer Referenzpopulation wurden 33 Proben von freiwilligen Probanden gemessen und die normierten Spotvolumina der vier endogenen Spots sind in Abb. 44 als Balkendiagramm dargestellt.

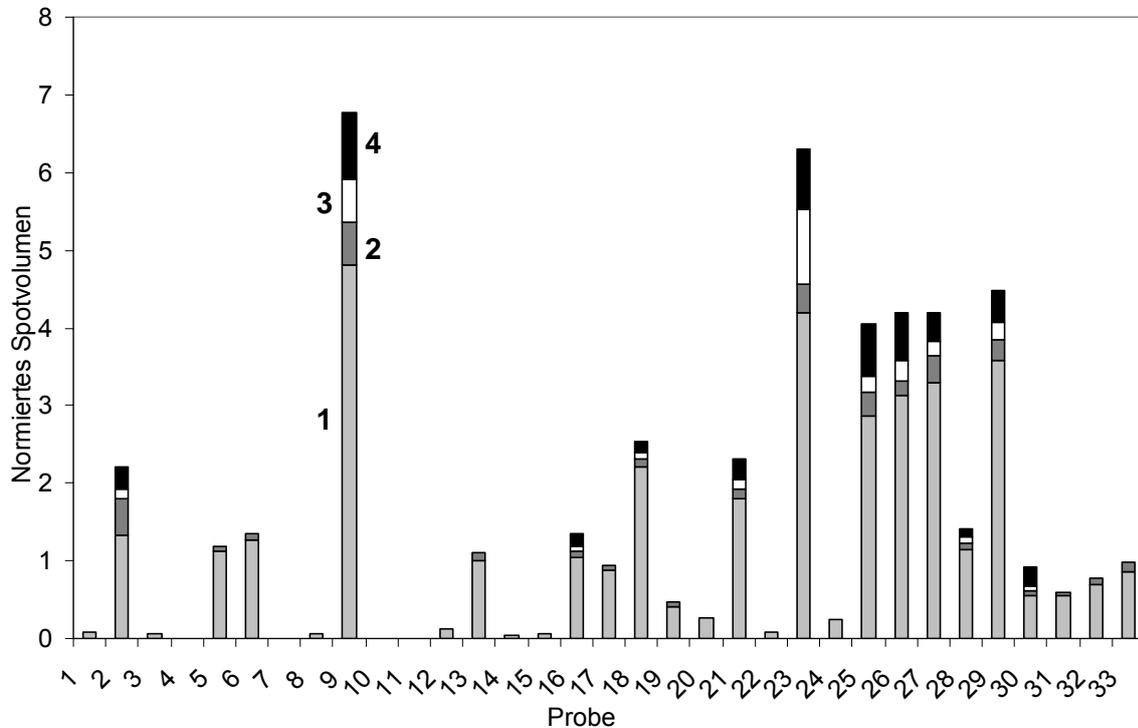


Abb. 44 Normierte Spotvolumina von Referenzproben; Die Balken 1-4 entsprechen den NSVs der endogenen Varianten 1-4 aus Abb. 35.

Wie auch in den Spezifitätsmessungen sind deutliche Mengenunterschiede erkennbar und mit der Konzentration variiert auch die Detektion unterschiedlicher Isoformen und Varianten. Die Blots können in vier Gruppen eingeteilt werden:

1. **vier Spots** (22 kDa-Hauptform, 20 kDa Splice Variante, phosphoryliertes 22 kDa GH, glykosyliertes 23 kDa GH, n=12),
2. **zwei Spots** (22 kDa-Hauptform, 20 kDa Splice Variante, n=8),
3. **ein Spot** (22 kDa-Hauptform, n=9),
4. **kein Spot** (GH-Konzentration < LOD, n=4).

Die Gruppen 1 und 2 können problemlos als Plasmaproben mit endogenem Wachstumshormon eingeordnet werden, da in diesen Fällen für endogenes Wachstumshormon spezifische Varianten detektiert wurden. Bei den Proben aus den Gruppen

3 und 4 ist eine Unterscheidung zu einer Probe, die rekombinantes GH enthält, visuell nicht möglich, da maximal die 22 kDa-Hauptform detektiert wurde, welche für endogenes und rekombinantes GH identisch ist.

Für Proben, die nur die 22 kDa-Hauptform enthalten musste ein Grenzwert nach folgender Fragestellung festgelegt werden:

Ab welchem normierten Spotvolumen der 22 kDa-Hauptform ist in Proben, die endogenes Wachstumshormon enthalten, immer eine zweite Variante (die 20 kDa Splice-Variante) detektierbar?

Mit Hilfe der normierten Spotvolumina der Referenzpopulation wurden Konfidenzintervalle für die einzelnen Gruppen berechnet, um einen Grenzwert festzulegen. Die Unterscheidungsgrenze musste zwischen den Gruppen 2 (2 Spots, eindeutig endogen) und 3 (1 Spot, nicht eindeutig endogen) bestimmt werden. Die Errechnung von 99,9 % Konfidenzintervallen der beiden Gruppen (Microsoft Excel) ergab eine obere Intervallgrenze des NSV von 0,21 für die Gruppe mit einem Spot und eine untere Intervallgrenze von 0,52 für die Gruppe der Proben mit zwei Spots. Die Normalverteilung der Daten wurde zuvor mittels Kolmogorov-Smirnov-Test (Microsoft Excel) gezeigt. Das bedeutet, dass Proben, bei denen nur ein GH-Spot detektiert werden kann, zu 99,9 % ein normiertes Spotvolumen von $< 0,21$ haben. Für die zweite Gruppe gilt, dass Proben mit einem normierten Spotvolumen $> 0,52$ zu 99,9 % noch eine zweite Variante, nämlich die 20 kDa Splice Variante zeigen. Der Grenzwert sollte also im Bereich dieser beiden Werte gewählt werden. Da die Probenzahlen in den jeweiligen Gruppen für eine Referenzpopulation und zur Berechnung eines Grenzwertes sehr klein ist (~ 10 Proben/Gruppe), wurde aus den erhobenen Daten der Wert 0,52 als Grenzwert festgelegt. Diese Unterscheidungsgrenze legt fest, dass in einer Probe, die einen 22 kDa-Spot mit einem NSV $> 0,52$ zeigt, auch weitere Varianten detektiert werden müssen, wenn es sich um eine Probe handelt, die endogenes Wachstumshormon enthält. Ist das NSV $> 0,52$ und die 22 kDa-Hauptform der einzige GH-Spot auf der Membran, wird gefolgert, dass es sich um rekombinantes GH handelt. Nach Analyse einer größeren Probenzahl und statistischer Bewertung einer größeren Referenzpopulation sollte die Unterscheidungsgrenze nach unten korrigiert werden können.

6.3.3 Patientenproben

Zur Überprüfung der Methode und des Grenzwertes wurden Proben von Patienten analysiert, die aufgrund eines Wachstumshormonmangels oder ungeklärten Kleinwuchses rekombinantes Wachstumshormon applizieren müssen. Die Blots und die errechneten NSV sind in Abb. 45 und Tabelle 10 aufgeführt. Ein Vergleich zu den Referenzproben und der Unterscheidungsgrenze ist in Abb. 46 verdeutlicht.

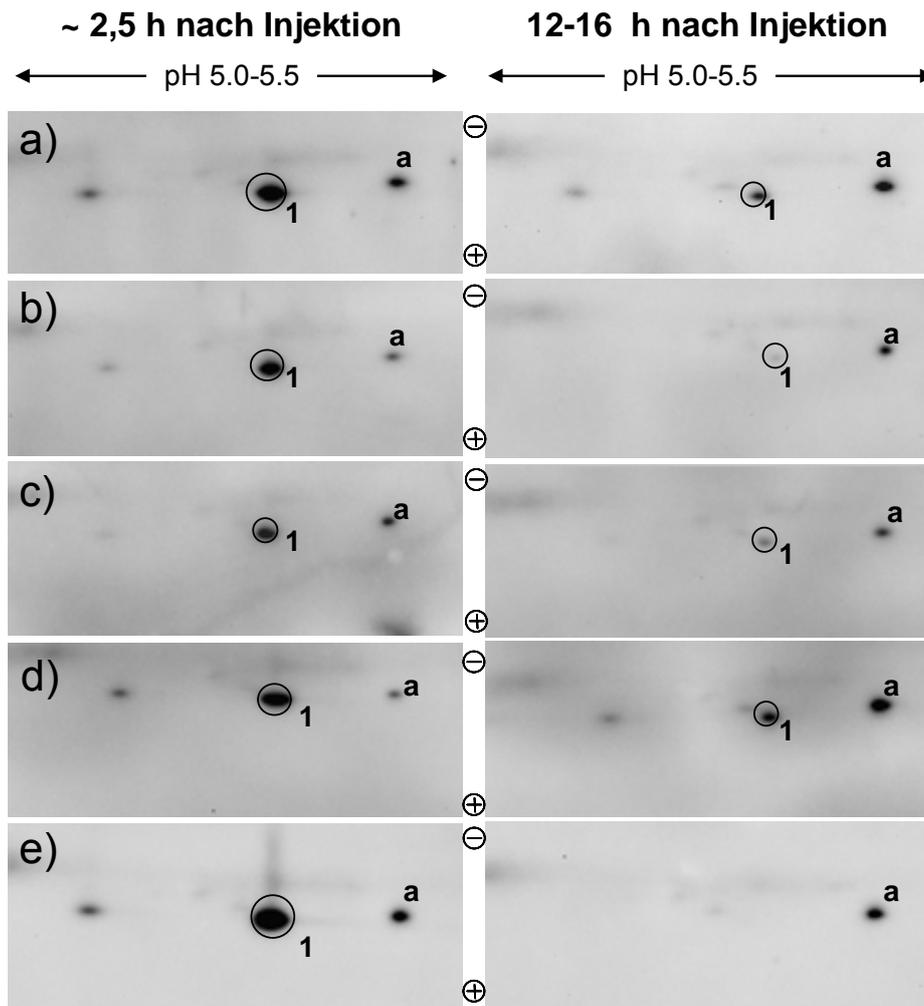


Abb. 45 Patientenproben etwa 2,5 und 12-16 h nach Injektion; 1 = rekombinantes GH, a = IS.

Die linke Spalte in Abb. 45 zeigt Plasmaproben, die etwa 2,5 h nach subkutaner Injektion abgenommen wurden. Der Spot des rekombinanten Wachstumshormons ist hier in allen fünf Proben sehr intensiv und die normierten Spotvolumina liegen weit über der Unterscheidungsgrenze (siehe Abb. 46). Da in keiner der Proben die 20 kDa Splice-Variante detektiert werden konnte, ist die Präsenz rekombinanten Wachstumshormons in den Proben eindeutig bewiesen.

Tabelle 10 Ergebnis der Patientenproben nach subkutaner Applikation von etwa 50 µg/kg Körpergewicht.

	Zeit seit letzter Injektion	GH Konzentration [ng/ml]	NSV 22 kDa	Zeit seit letzter Injektion	GH Konzentration [ng/ml]	NSV 22 kDa
a	2,5 h	9,3	2,57	~ 12 h	1,6	0,69
b	2,75 h	9,7	3,24	~ 14 h	0,92	0,16
c	2,25 h	7,2	1,83	~ 15 h	1,85	0,66
d	2,25 h	11,3	5,32	~ 16 h	0,97	0,59
e	2,25 h	11,3	3,64	~ 14,5 h	0,07	< LOD

Das Maximum der Konzentration rekombinanten Wachstumshormons im Plasma liegt zwischen 2 und 6 Stunden nach der Injektion [56], was zu den sehr intensiven Signalen in den Proben 2,5 h nach Injektion führt. In den Proben ist ein zusätzlicher Spot in der Position von Spot 3 (siehe Abb. 35) zu erkennen. Dieser ist vermutlich ein Artefakt aus der Produktion des rekombinanten Proteins, da beschrieben wurde, dass bei dem Prozess des Lyophilisierens Deamidierungen stattfinden können. Diese würde den pI der 22 kDa-Hauptform in gleichem Maße verschieben wie eine Phosphorylierung (siehe Tabelle 6). Dieser zusätzliche Spot wurde außerdem in Coomassie Blue gefärbten 2D-Gelen detektiert, die rekombinantes Wachstumshormon (Injektionslösung Genotropin®) enthielten, so dass ausgeschlossen werden konnte, dass es sich um eine im Blutkreislauf entstandene Form oder eine endogene GH-Variante handelt. Die Tatsache, dass dieser zusätzliche Spot anstelle endogener Isoformen auftaucht, macht eine Festlegung der Spotreihenfolge notwendig. Handelt es sich um endogene Isoformen und Varianten, taucht immer zuerst die 20 kDa Splice-Variante auf, bevor die phosphorylierten und glykosylierten Varianten eine ausreichende Konzentration erreichen, um sie auf den Membranen zu detektieren. Das Vorhandensein einer Variante in Position der phosphorylierten/deamidierten Form bei Fehlen der Splice-Variante kann daher vernachlässigt werden.

Folgende Reihenfolge ist für die Bewertung von Proben mit endogenem Wachstumshormon essentiell:

1. 22 kDa Hauptform (endogen oder rekombinant, Spot 1, Abb. 35),
2. 20 kDa Splice-Variante (endogen, Spot 2, Abb. 35),
3. phosphorylierte und glycosylierte Varianten (endogen, Spots 3 und 4, Abb. 35).

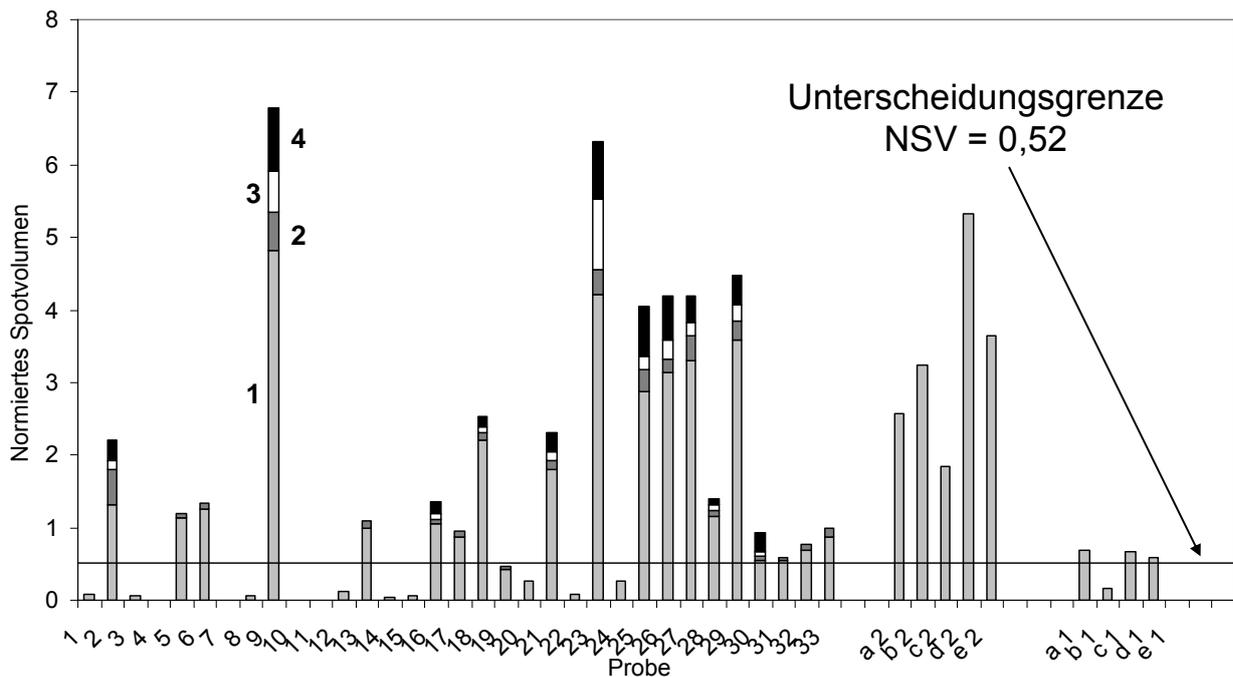


Abb. 46 Patientenproben im Vergleich zur Referenzpopulation; a2-e2: ~2,5 h nach Injektion, a1-e1: 12-16 h nach Injektion; die Balken 1-4 entsprechen den NSVs der endogenen Varianten 1-4 aus Abb. 35.

Drei der fünf Proben, die 12-16 h nach der letzten Injektion genommen wurden, liegen noch über der Unterscheidungsgrenze und können als rekombinant erkannt werden. Dies gibt einen Hinweis auf den möglichen Nachweiszeitraum. Bei der Bewertung der Patientenproben ist zu beachten, dass die Probanden entweder an ungeklärtem Kleinwuchs (Proben b+d) oder an Wachstumshormonmangel (Proben a, c und e) leiden. Patienten mit ungeklärtem Kleinwuchs haben keinen Wachstumshormonmangel sondern einen anderen Defekt, zum Beispiel am GH-Rezeptor, der die Wirkung des Wachstumshormons einschränkt. Die Applikation von GH bei Menschen mit ungeklärtem Kleinwuchs kann daher sehr gut mit Athleten verglichen werden, da in beiden Fällen endogenes GH vorhanden ist, dessen Freisetzung nach Applikation von rGH durch den negativen Rückkopplungsmechanismus gehemmt wird.

Betrachtet man die gemessenen GH-Konzentrationen zusammen mit den normierten Spotvolumina (Tabelle 10), kann abgeschätzt werden, dass eine Konzentration von mindestens 1 ng/ml Wachstumshormon in der Probe vorhanden sein muss, um die Unterscheidungsgrenze eines NSVs $> 0,52$ zu erreichen.

6.3.4 Einfluss von körperlicher Belastung auf die Analyse

Der Einfluss von körperlicher Belastung auf die Ausschüttung von Wachstumshormon ist gut untersucht und es ist bekannt, dass eine belastungsinduzierte Ausschüttung zur Konzentrationssteigerung aller endogenen Isoformen in der Zirkulation führt [73]. Da der Dopingkontrolle häufig eine extreme körperliche Belastung im Wettkampf vorausgeht, ist dies ein sehr wichtiger Parameter, und ein Belastungstest sollte die Auswirkung der belastungsinduzierten GH-Ausschüttung auf die Detektion der vier Wachstumshormonvarianten dieser Methode klären.

Abb. 47 illustriert die GH Formen vor und nach Belastung am Beispiel eines Probanden, und Tabelle 11 fasst die GH-Konzentrationen sowie die NSVs zusammen. Abb. 47 zeigt, dass die GH-Menge durch die Belastung deutlich zunimmt und dadurch auch die Detektion von vier GH-Varianten möglich ist. Nach Ende der Belastung fällt der GH-Spiegel relativ schnell, innerhalb von etwa 90 min, wieder auf Basiswerte.

Tabelle 11 GH-Konzentrationen und normierte Spotvolumina nach Belastung.

Probe	GH Konzentration [ng/ml]	NSV 22 kDa Spot	Anzahl detektierter Spots
vor Belastung	2,2	0,25	1
0 min nach Belastung	21,9	1,05	4
10 min nach Belastung	20,4	0,76	4
20 min nach Belastung	10,1	0,66	2
30 min nach Belastung	8,4	0,55	2
90 min nach Belastung	0,8	0,08	1

Die GH-Konzentration im Plasma stieg nach der Belastung auf 22 ng/ml. Die hohe GH-Menge wurde aber auch sehr schnell abgebaut, nach 20 min war die GH-Konzentration schon auf die Hälfte (10 ng/ml) gefallen.

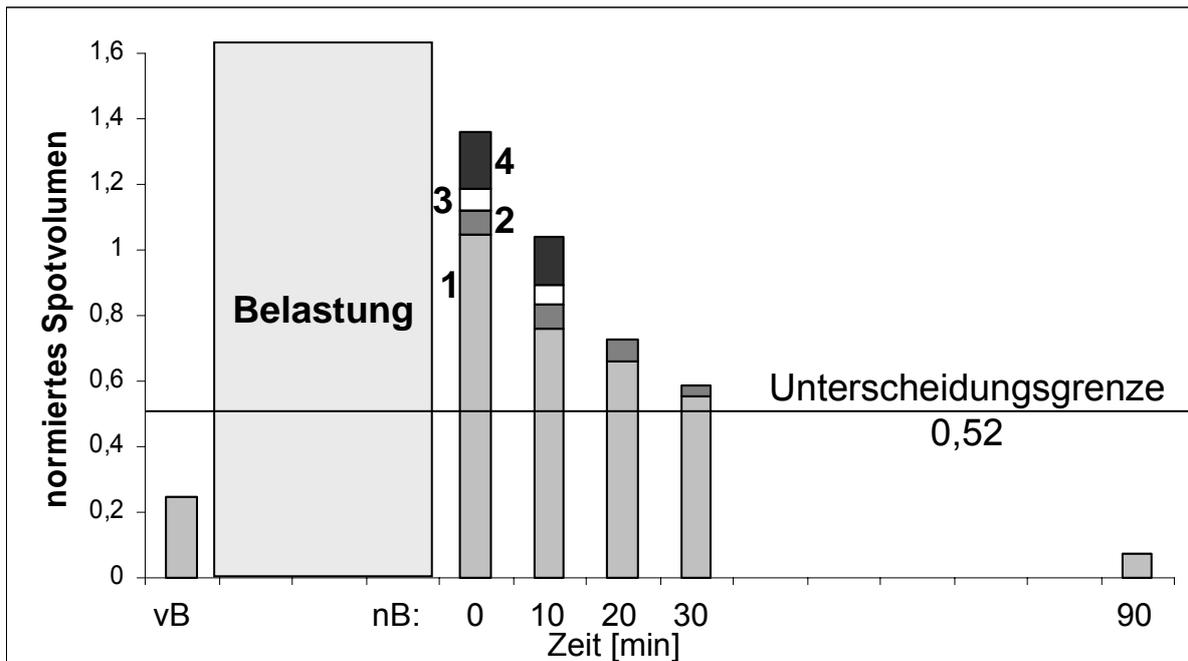


Abb. 47 Belastungsinduzierte Wachstumshormonausschüttung; Die Balken 1-4 entsprechen den NSVs der endogenen Varianten 1-4 aus Abb. 35; vB = vor Belastung, nB = nach Belastung.

Die belastungsinduzierte GH-Ausschüttung führt also zur Erhöhung der Konzentration aller vier detektierten Varianten. Bei Proben, die die Unterscheidungsgrenze überschreiten, sind mehrere endogene Formen auf der Membran sichtbar sind, so dass eine belastungsinduzierte GH-Ausschüttung nicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

6.3.5 hGH Tagesprofil

Um einen Eindruck über die Veränderung der GH-Mengen im Laufe eines Tages zu bekommen, wurden innerhalb von 24 h 11 Proben eines Probanden genommen und analysiert. Das Ergebnis von NSVs und Konzentrationen ist in Abb. 48 dargestellt.

Die GH-Mengen schwanken in den analysierten Proben zwischen 0,4 und 9,6 ng/ml. Zu Beginn des Tages wurde alle 30 min eine Probe abgenommen und bereits in der zweiten Probe eine sehr hohe Konzentration und damit ein Ausschüttungspuls detektiert.

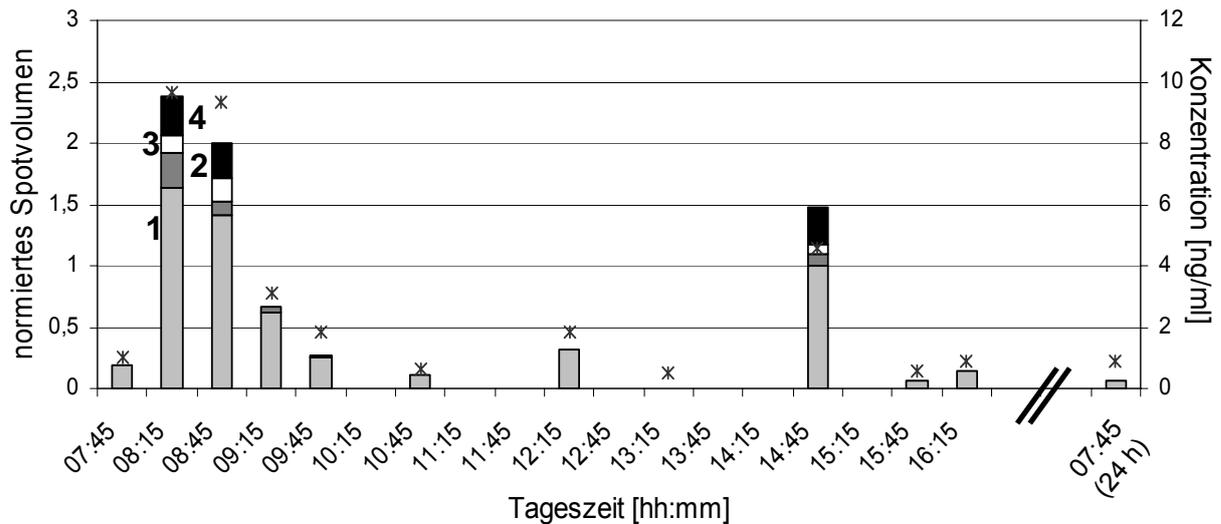


Abb. 48 Tagesprofil GH, * = Konzentrationen, Balkendiagramm (1-4) = NSVs der vier GH-Varianten.

Das Muster der aufeinanderfolgenden Proben nach der Ausschüttung ist dem der Belastungsproben in Abb. 47 sehr ähnlich. Ein kleiner Unterschied könnte in der Abbaugeschwindigkeit der hohen GH-Konzentrationen erkannt werden. Die Konzentration scheint nach Belastung etwas schneller wieder abzunehmen. Während es nach Belastung etwa 20 min dauert, bis die Konzentration im Plasma halbiert ist, ist bei einer regulären Ausschüttung nach 30 min kaum eine Veränderung der Konzentration erkennbar. Die Konzentration war nach der Belastung etwa doppelt so hoch wie bei der regulären Ausschüttung, was einen schnelleren Abbau und eine kürzere Halbwertszeit begünstigen könnte, wenn beispielsweise die Bindung an Bindungsproteine gesättigt ist. Da die Abstände der Blutabnahmen in den beiden Untersuchungen unterschiedlich waren und der genaue Zeitpunkt des Maximums und die maximale Konzentration hier nicht bestimmt werden konnten, müssten diese Überlegungen jedoch durch weitere Versuche bestätigt werden. Auch im Verlauf des Tages enthalten Proben mit einem NSV > 0,52 mindestens eine weitere endogene Variante (die 20 kDa Splice-Variante).

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zum Nachweis von rekombinantem Wachstumshormon aus humanem Plasma auf der Basis immunologischer Techniken und zweidimensionaler Gelelektrophorese zu entwickeln. Zusätzlich sollten Wachstumshormonmodifikationen und -varianten aus endogenem, hypophysärem Wachstumshormon massenspektrometrisch identifiziert werden. Insbesondere sollten dabei die Varianten charakterisiert werden, die auch in der Dopingkontrollmethode detektiert werden.

Die entwickelte Methode ermöglicht die Detektion diskreter Formen von Wachstumshormon aus dem Plasma. Durch das Fehlen spezifisch endogener Varianten kann ein Dopingvergehen mit rekombinantem Wachstumshormon nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die detektierten Formen massenspektrometrisch identifiziert, was für die Leistungsfähigkeit eines Antikörper-basierten Tests und die Bewertung von Ergebnissen sehr wichtig ist.

Die Identifizierung neuer Varianten erlaubt Rückschlüsse auf Wirkungswege oder zusätzliche Funktionen des Wachstumshormons und macht die Ergebnisse dieser Arbeit damit auch für weiterführende, endokrinologische Studien interessant.

Durch die Detektion diskreter Formen ist die Spezifität der Methode sehr gut kontrollierbar und Variationen in Verhältnissen endogener Formen können erfasst werden. Dies könnte die Dopingkontrollmethode auch für klinische Untersuchungen interessant machen, wenn Verhältnisse endogener Formen im Plasma bestimmt werden sollen, um beispielsweise abweichende Wirkungen des Wachstumshormons zu erklären.

Ein Faktor, der zukünftig optimiert werden könnte, ist die Empfindlichkeit der Methode. Es wird mit der vorgestellten Probenvorbereitung eine zirkulierende GH-Menge von mindestens 1 ng/ml benötigt, um die Unterscheidungsgrenze zu erreichen und eine eindeutige Aussage zu der Herkunft des Wachstumshormons in der Probe machen zu können. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit könnte in weiterführenden Studien versucht werden, das Detektionssystem oder die Blotbedingungen zu optimieren.

Die vorliegende Arbeit präsentiert damit einen leistungsfähigen und sehr spezifischen Test zum Nachweis von rekombinantem Wachstumshormon im Plasma und ermöglicht die Detektion unterschiedlicher, identifizierter, endogener Wachstumshormonvarianten.

8 Anhang

8.1 Aminosäuren

Tabelle 12 Aminosäuren: Abkürzungen und Peptidmassen.

Aminosäure			Mittlere Masse	Mittlere Peptidmasse	Monoisotopische Peptidmasse
Alanin	Ala	A	89,09	71,08	71,04
Cystein	Cys	C	121,16	103,14 174,22*	103,01 174,05*
Aspartat	Asp	D	133,1	115,09	115,03
Glutamat	Glu	E	147,13	129,12	129,04
Phenylalanin	Phe	F	165,19	147,18	147,07
Glycin	Gly	G	75,07	57,05	57,02
Histidin	His	H	155,10	137,14	137,00
Isoleucin	Ile	I	131,17	113,16	113,08
Lysin	Lys	K	146,19	128,17	128,09
Leucin	Leu	L	131,17	113,16	113,08
Methionin	Met	M	149,21	131,19	131,04
Asparagin	Asn	N	132,12	114,10	114,04
Prolin	Pro	P	115,13	97,12	97,05
Gutamin	Gln	Q	146,15	128,13	128,06
Arginin	Arg	R	174,2	156,19	156,10
Serin	Ser	S	105,09	87,08	87,03
Threonin	Thr	T	119,12	101,11	101,05
Valin	Val	V	117,15	99,13	99,07
Tryptophan	Trp	W	204,22	186,21	186,08
Tyrosin	Tyr	Y	181,19	163,18	163,06

* Acrylamid-Addukte

8.2 Massenspektren und detektierte Peptide

8.2.1 MS/MS-Spektren von GH-Peptiden nach Trypsinverdau

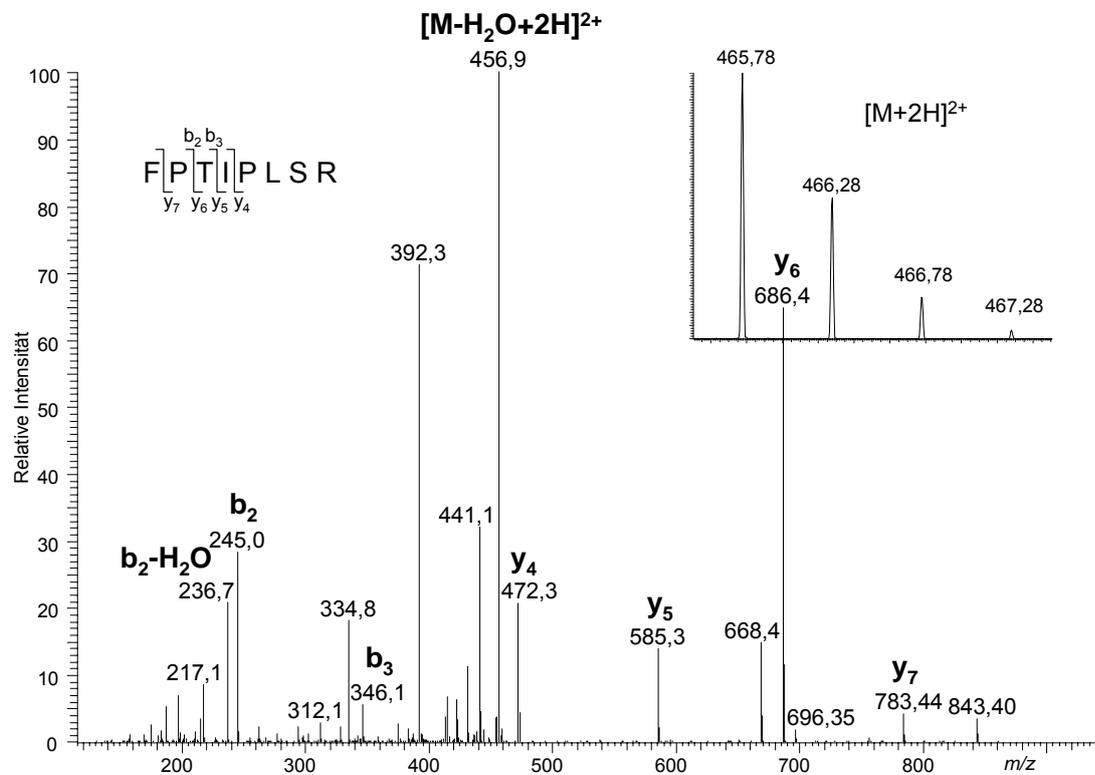


Abb. 49 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 1-8 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (Retentionszeit (RT) 26,0 min).

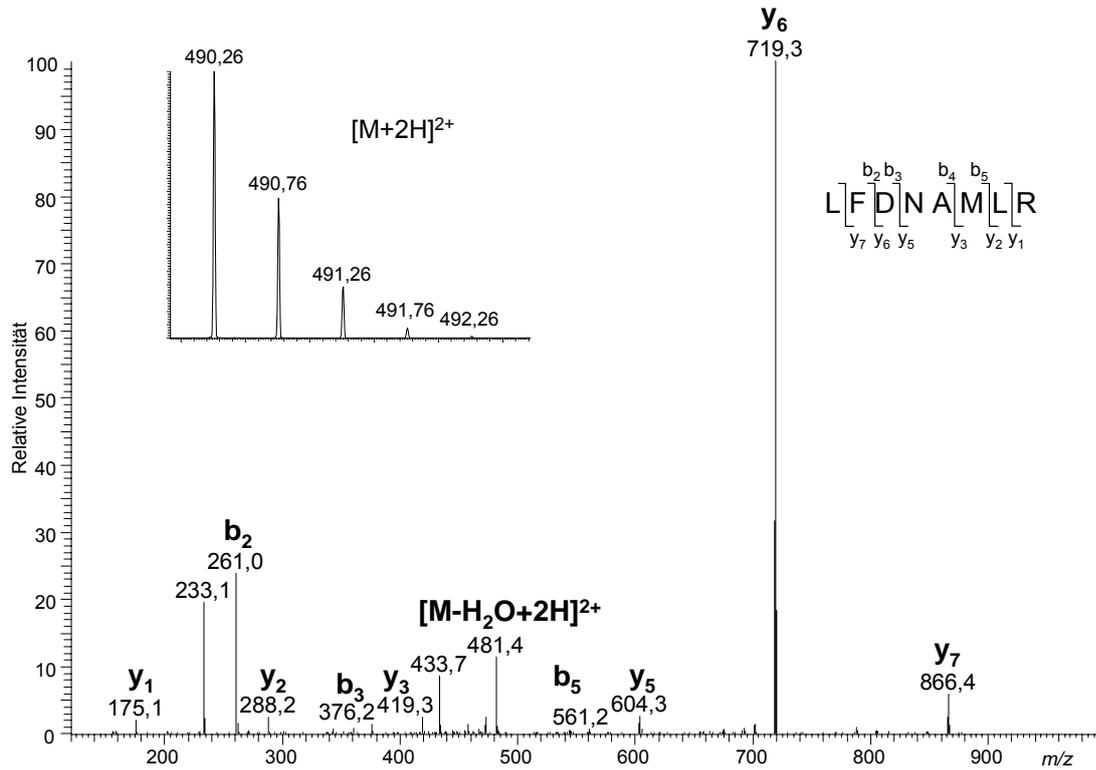


Abb. 50 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 9-16 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 25,6 min).

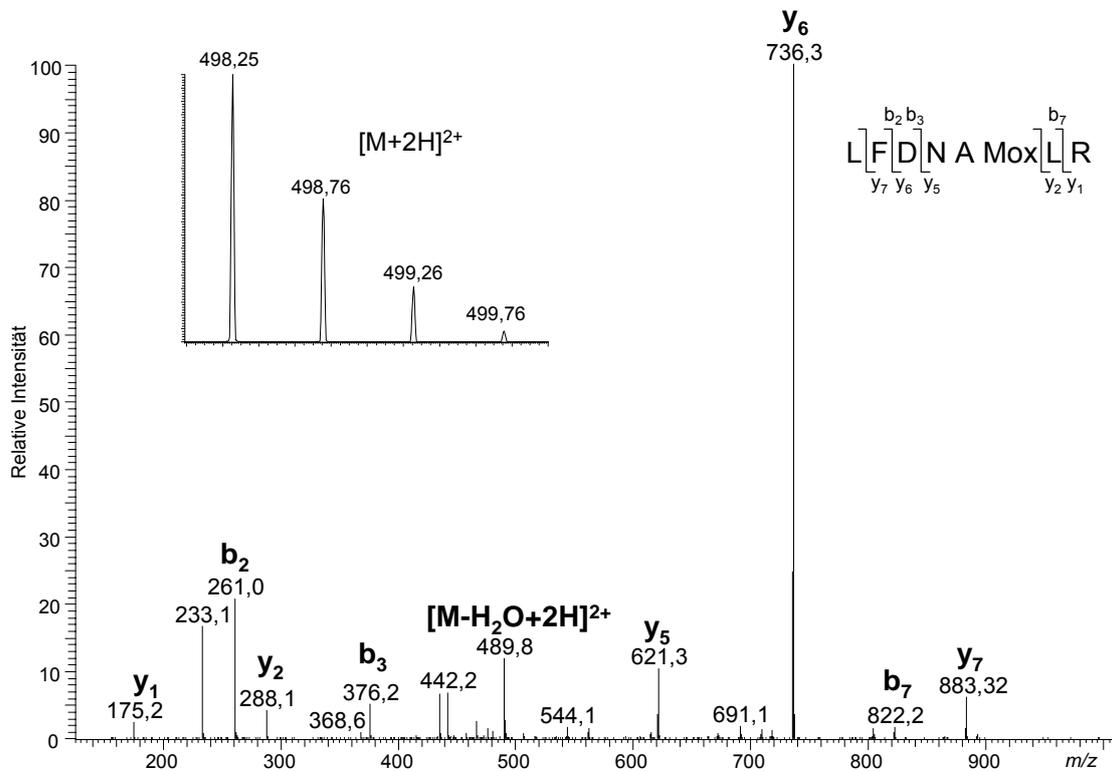


Abb. 51 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 9-16 mit doppelt protoniertem Vorläuferion und oxidiertem Methionin (RT 22,9 min).

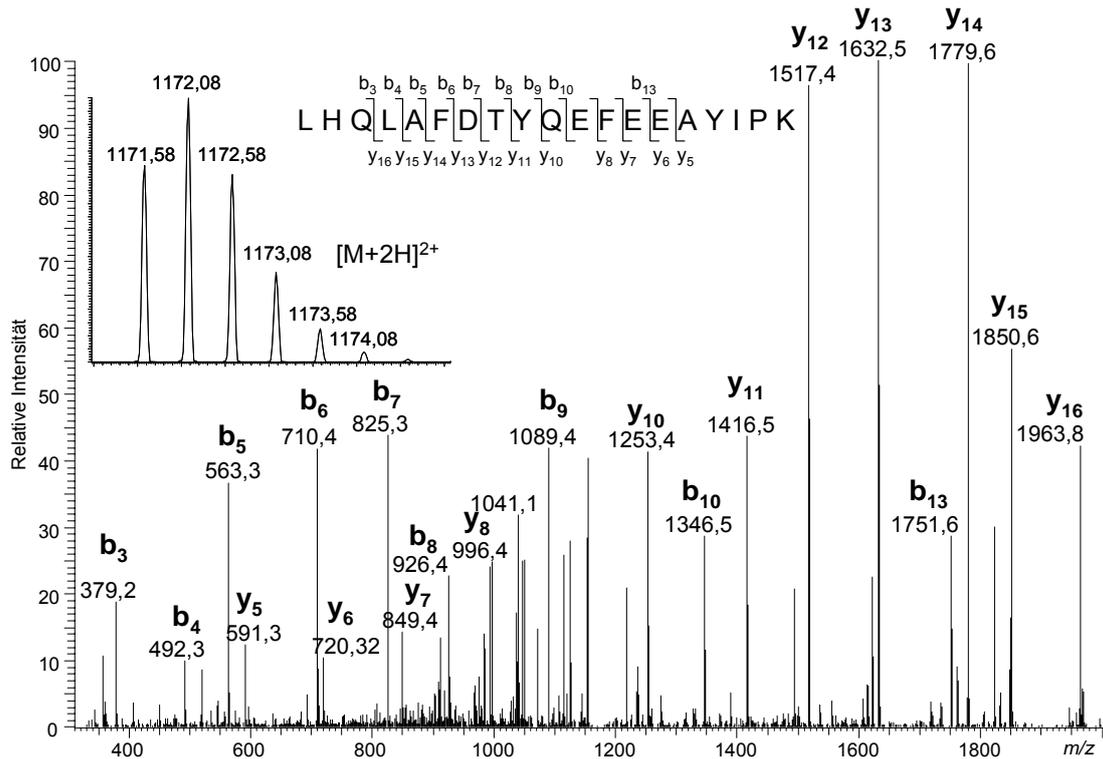


Abb. 52 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 20-38 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 29,7 min).

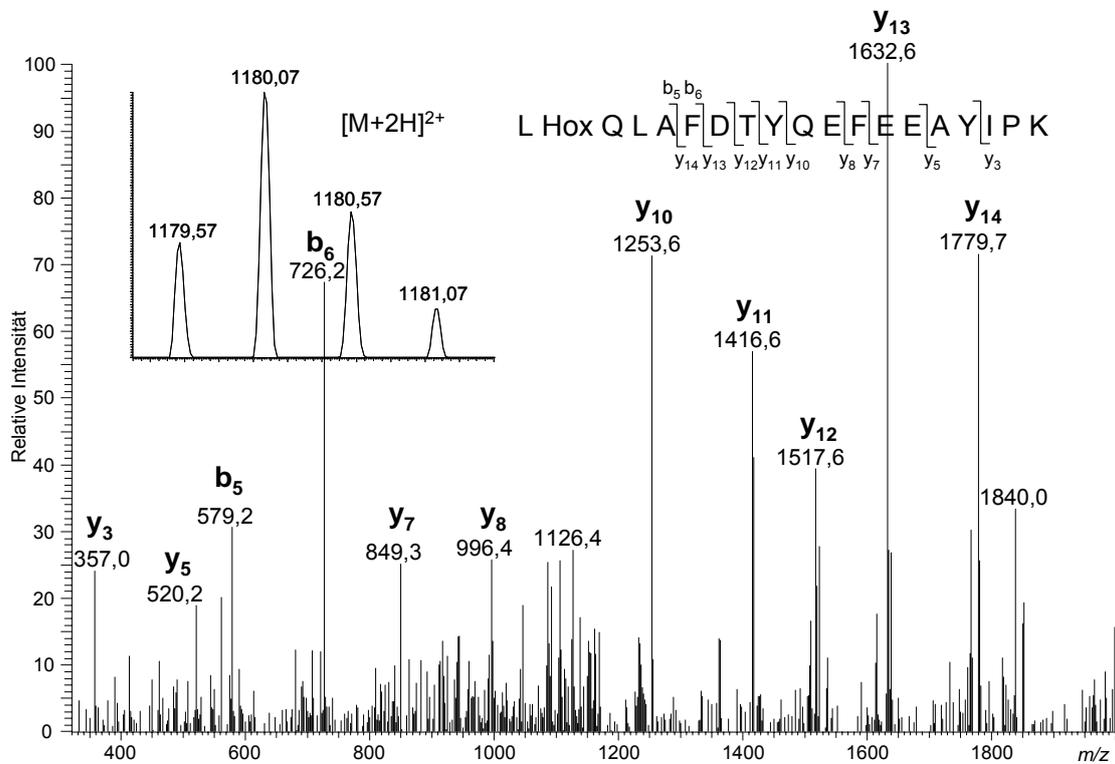


Abb. 53 ESI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 20-38 mit doppelt protoniertem Vorläuferion und oxidiertem Histidinrest.

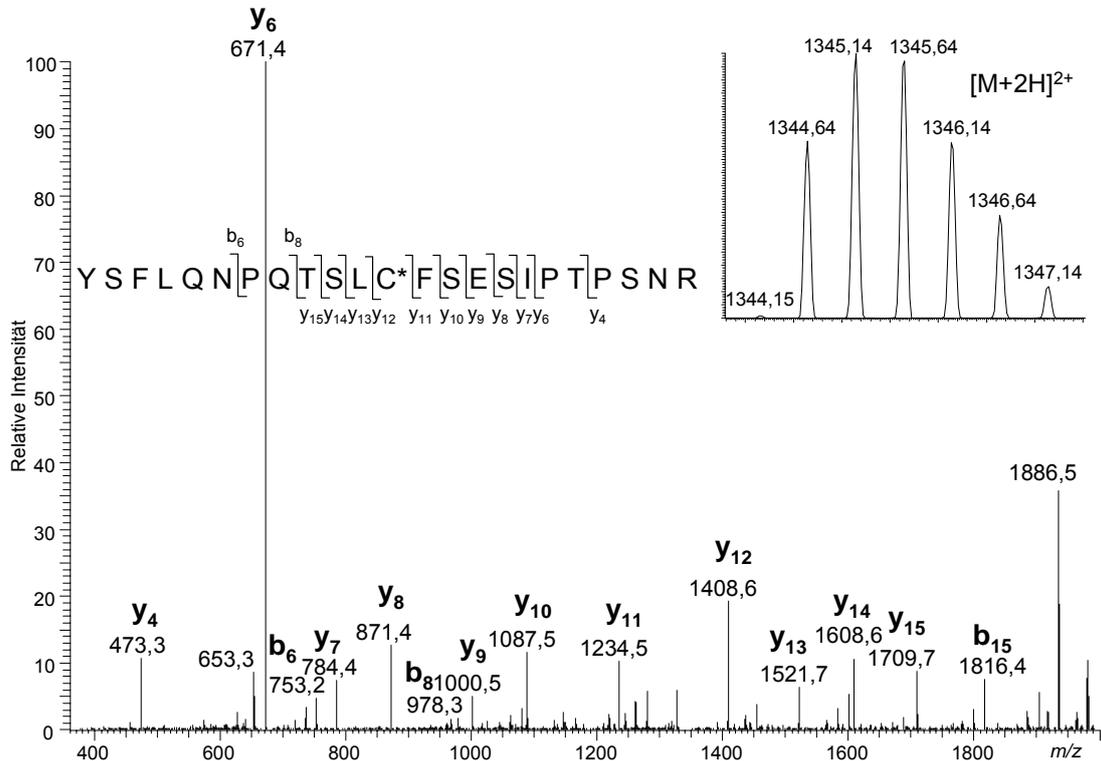


Abb. 54 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 42-64 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 29,3 min).

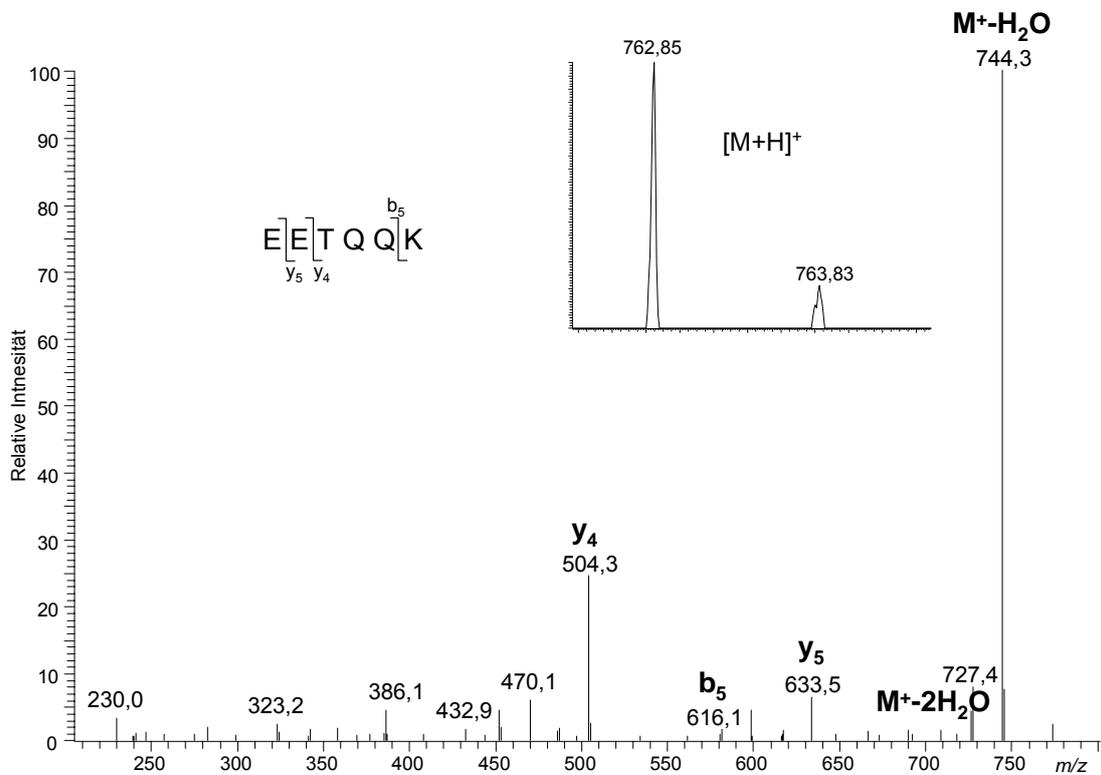


Abb. 55 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 65-70 mit protoniertem Vorläuferion (RT 1,9 min).

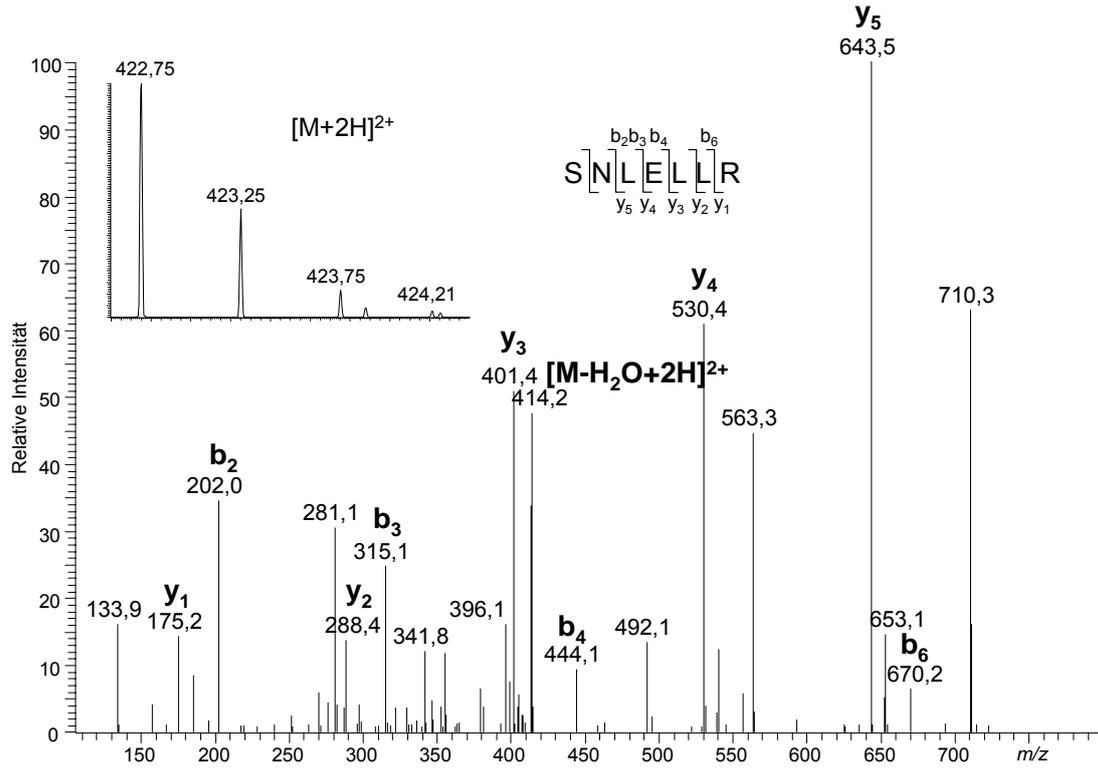


Abb. 56 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 71-77 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 23,5 min).

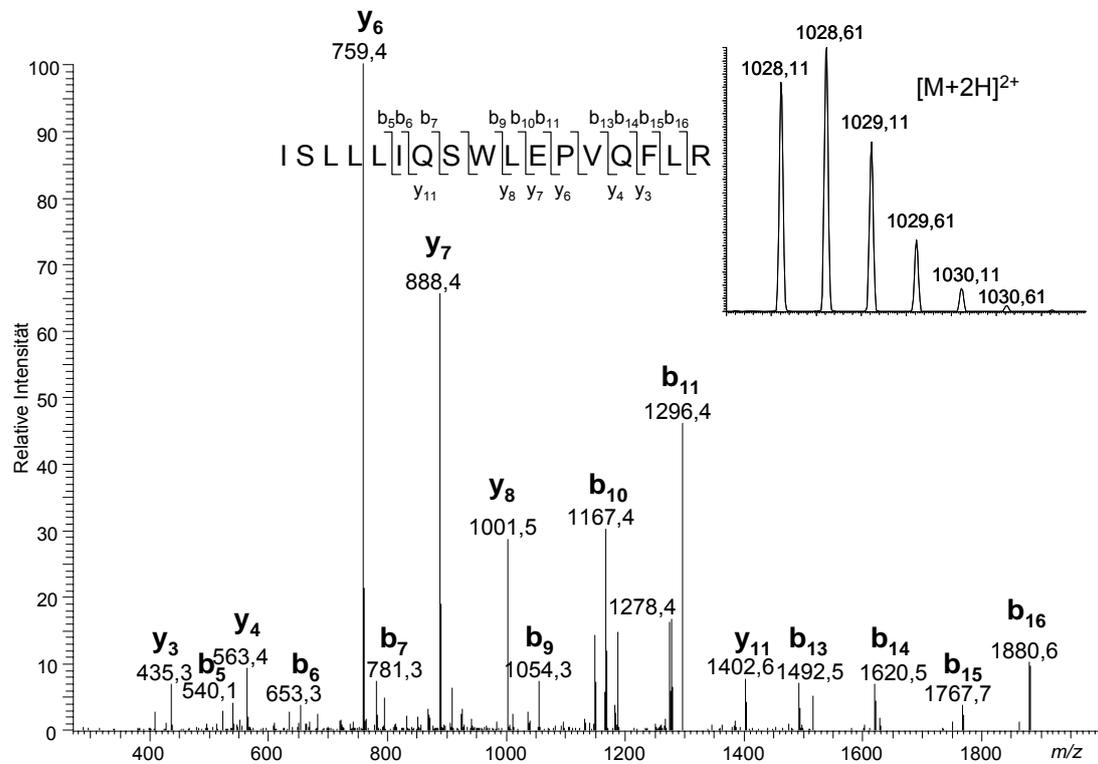


Abb. 57 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 78-94 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 38,7 min).

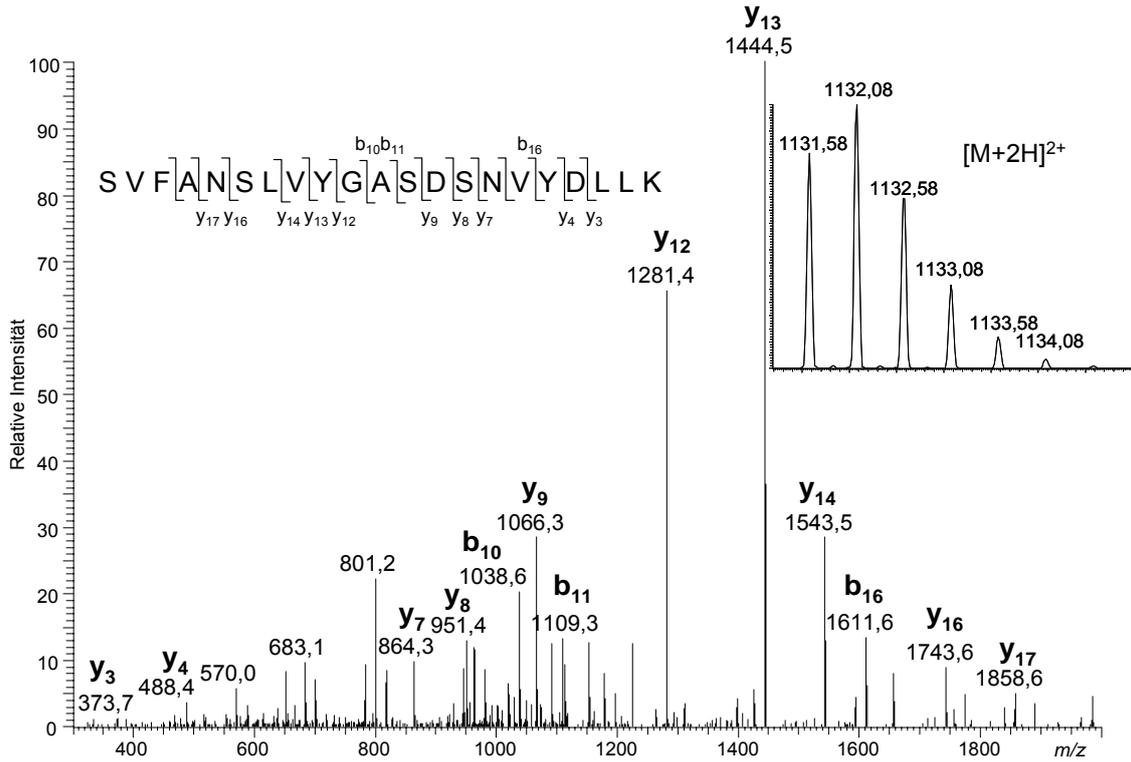


Abb. 58 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 95-115 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 31,3 min).

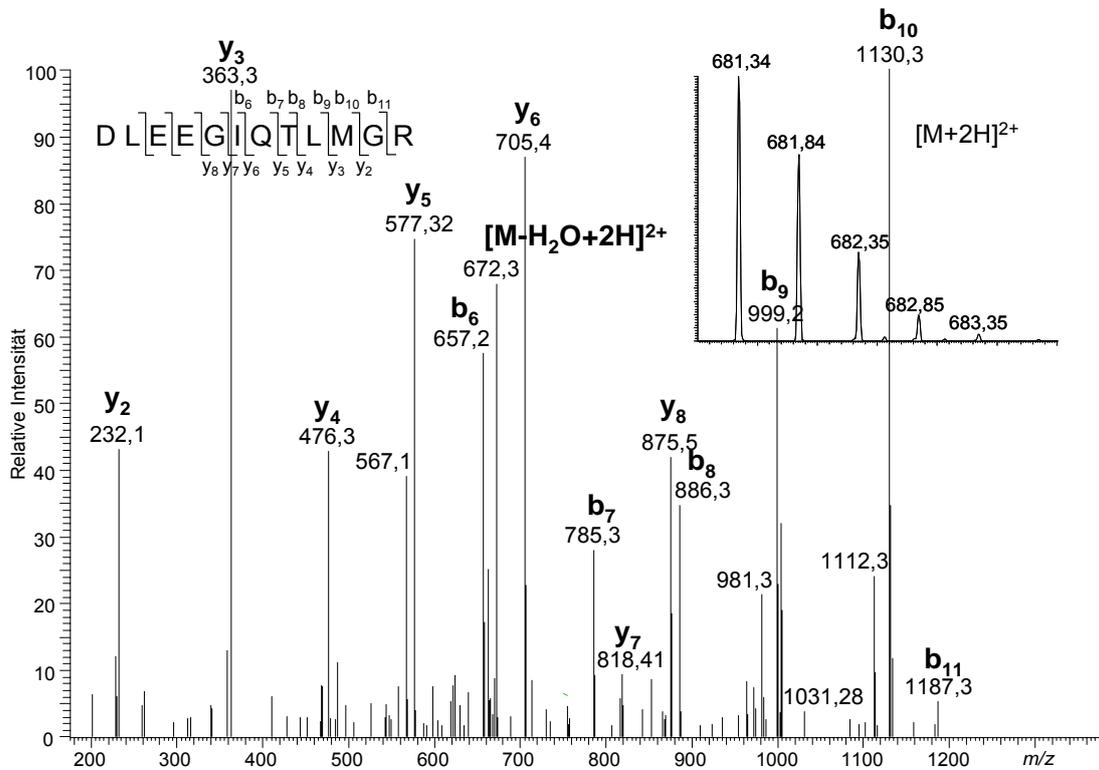


Abb. 59 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 116-127 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 30,0 min)

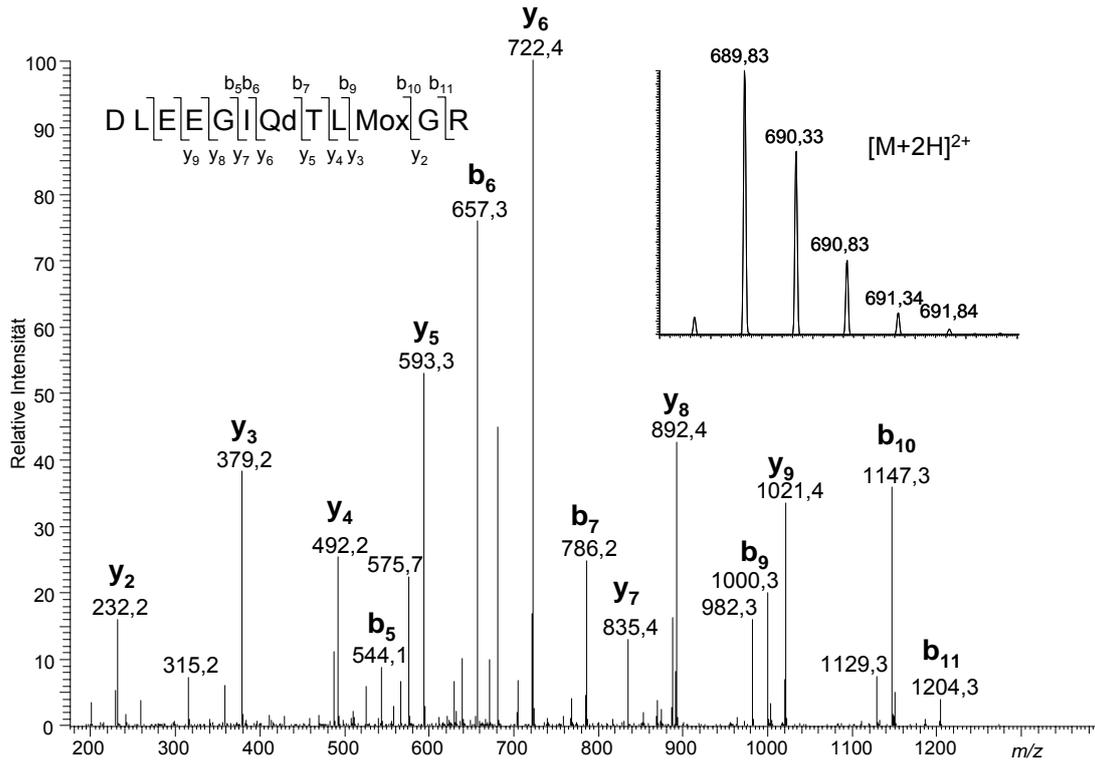


Abb. 60 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 116-127 mit doppelt protoniertem Vorläuferion oxidiertem Methionin und deamidiertem Glutamin (RT 26,6 min).

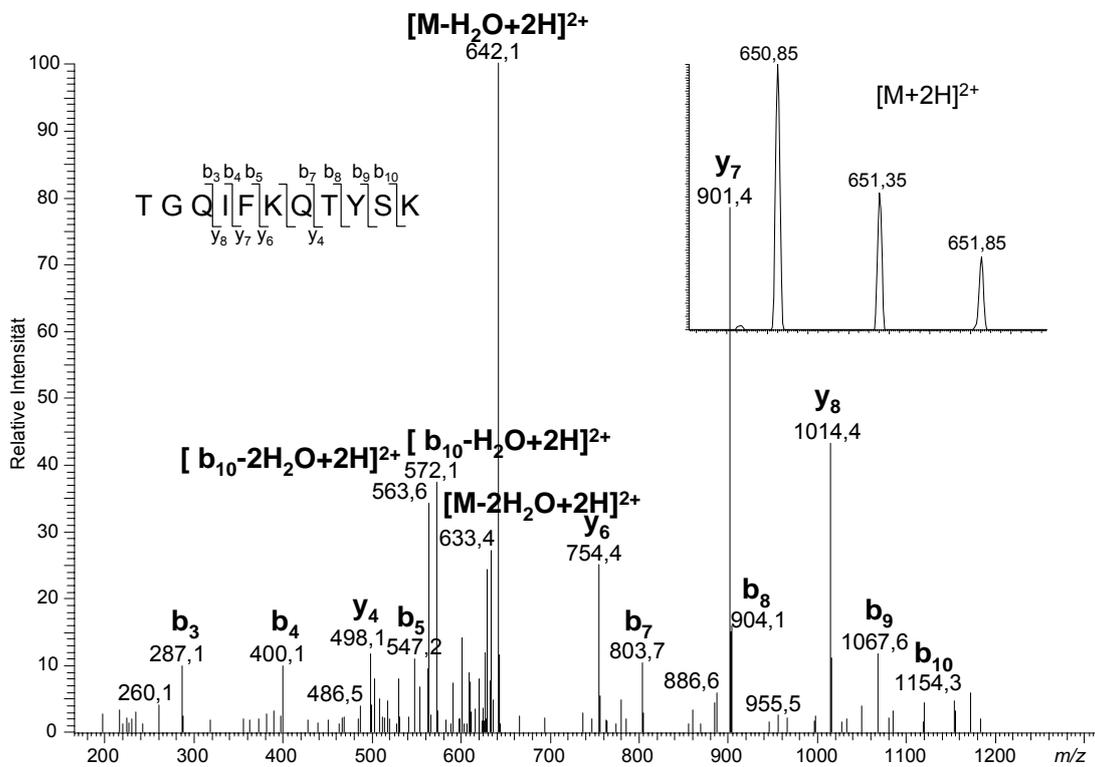


Abb. 61 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 135-140 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 18,3 min).

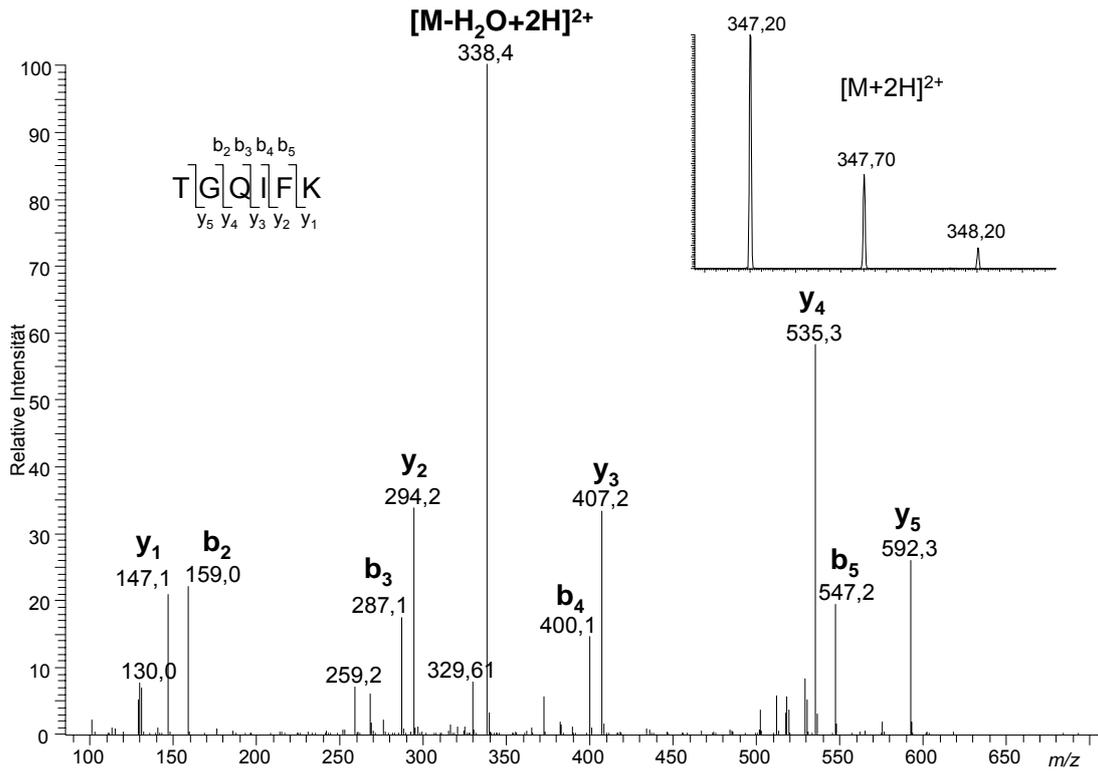


Abb. 62 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 135-145 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 19,1 min).

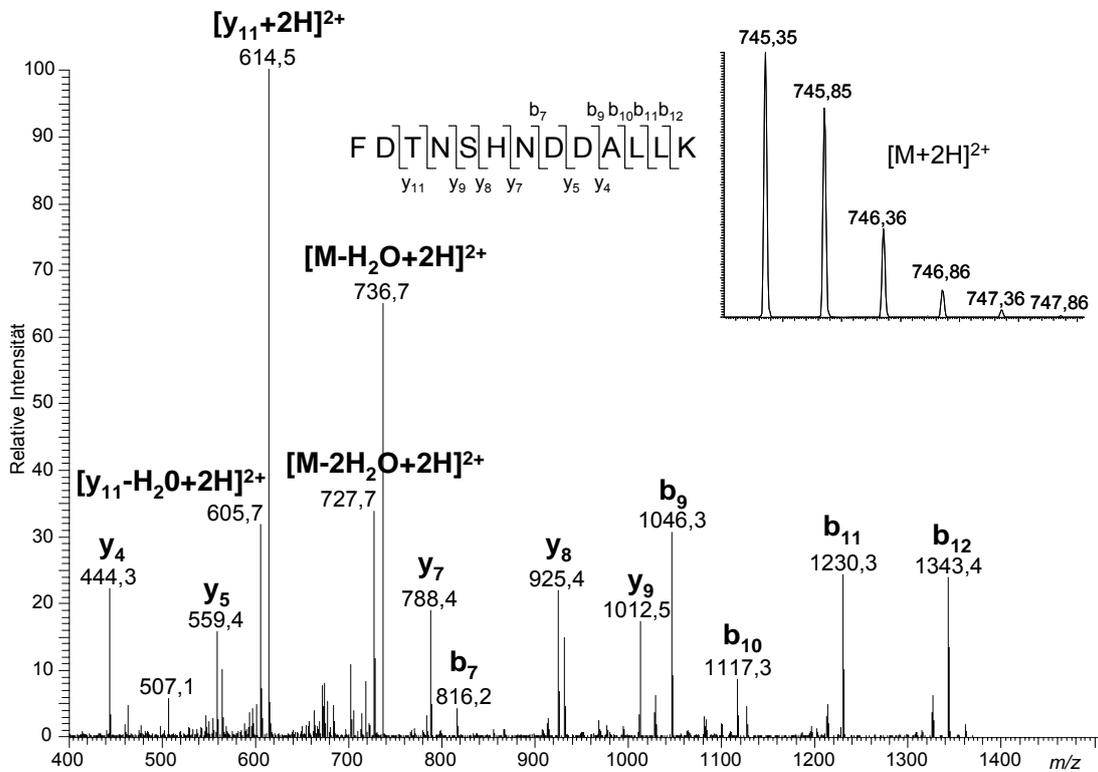


Abb. 63 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 146-158 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 21,0 min).

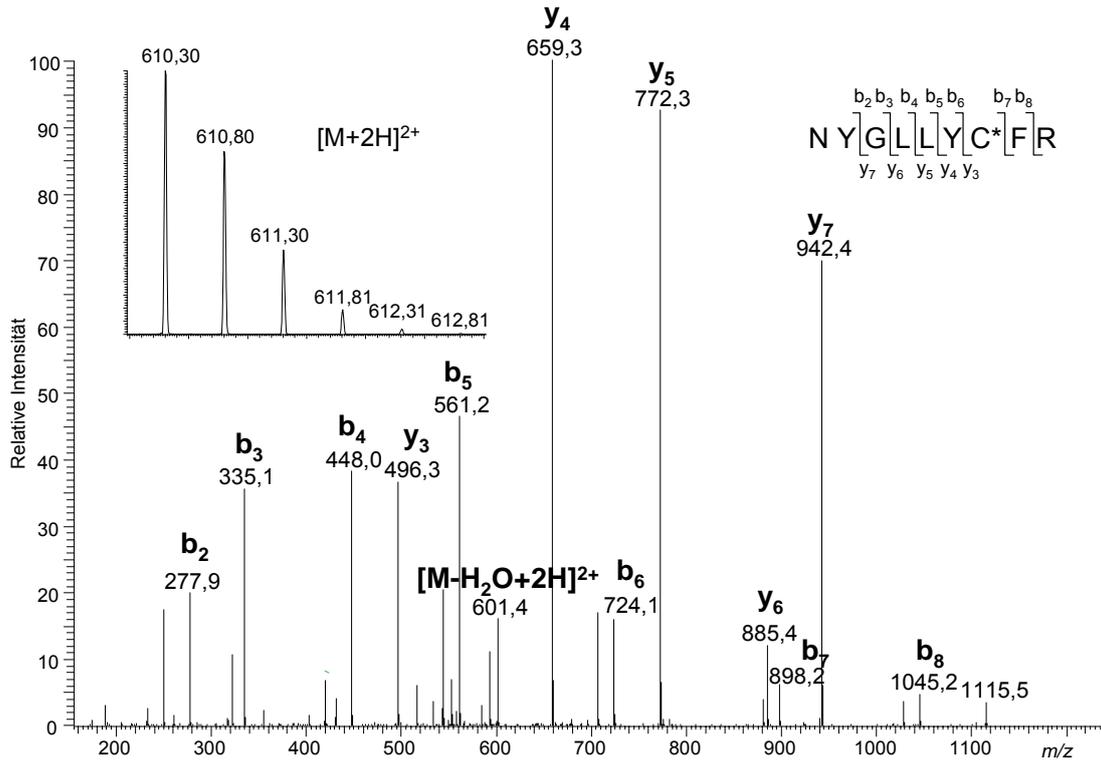


Abb. 64 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 159-167 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 28,9 min).

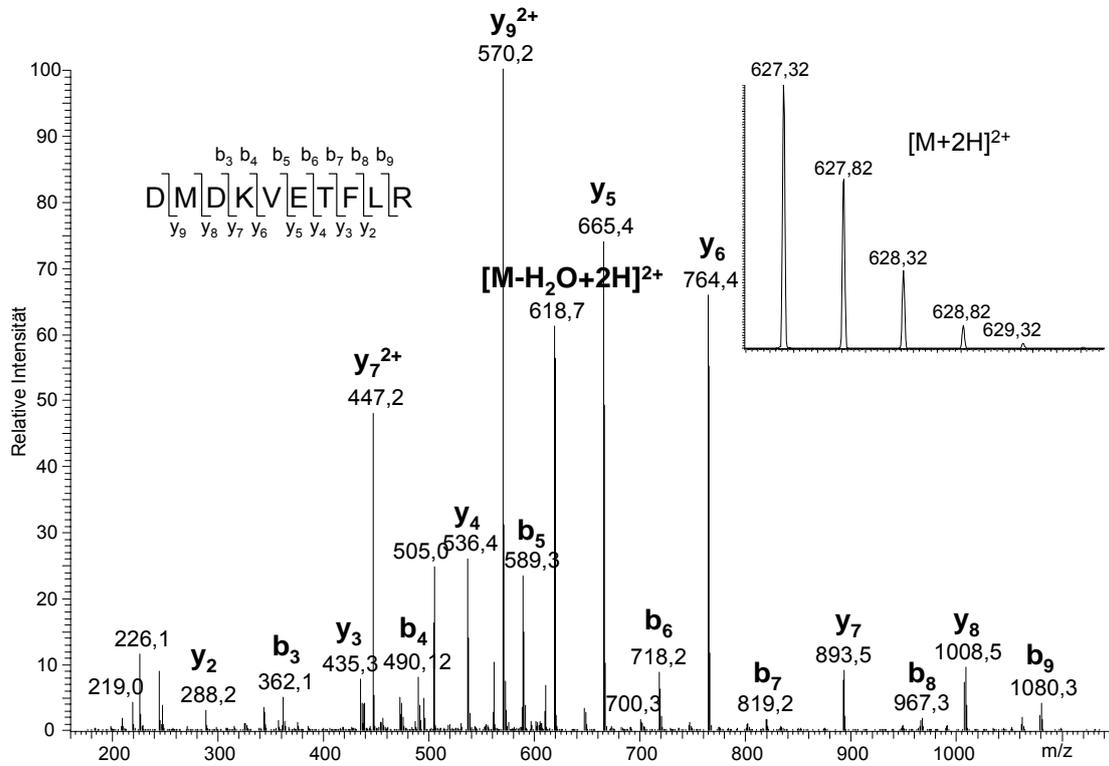


Abb. 65 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 169-178 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 25,2 min).

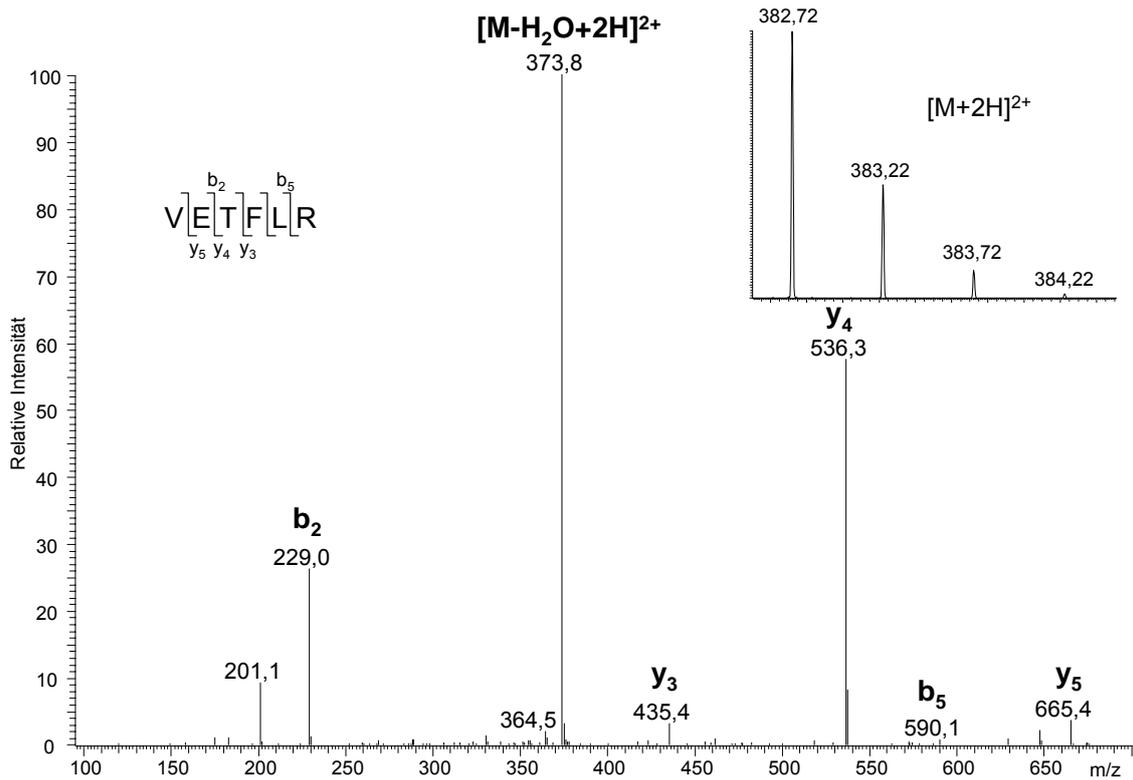


Abb. 66 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 173-178 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 22,2 min).

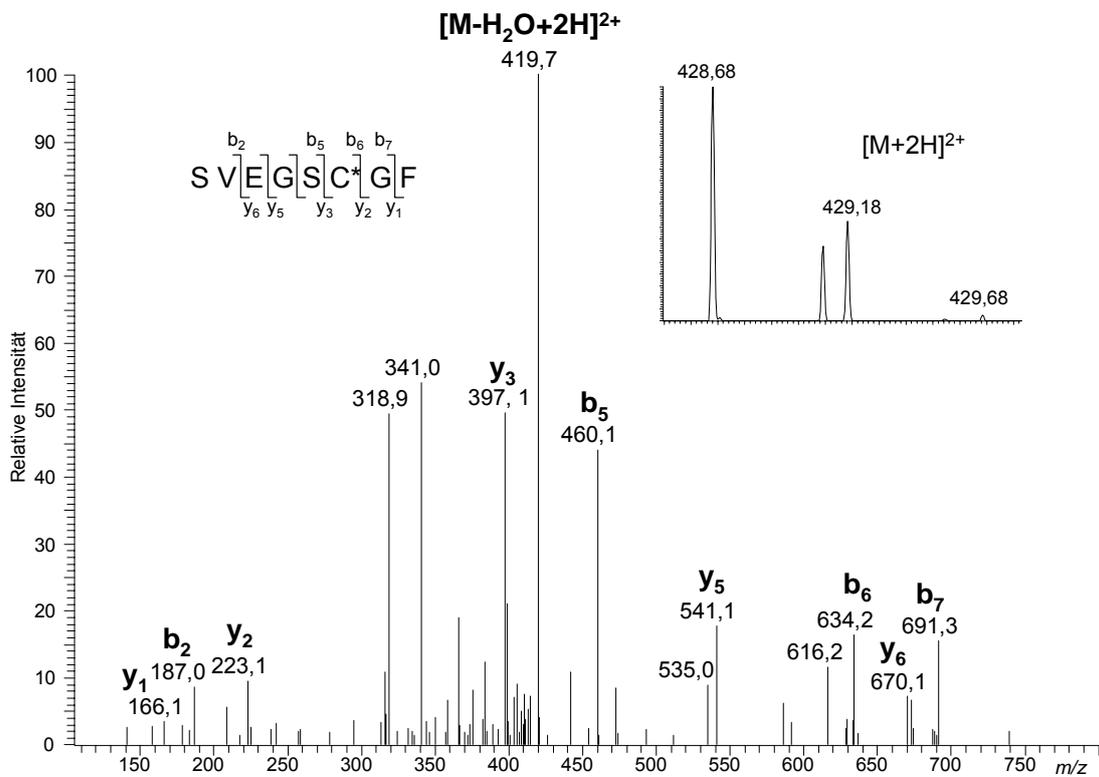


Abb. 67 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 184-191 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 20,7 min).

8.2.2 MS/MS-Spektren von GH-Peptiden nach GluC-Verdau

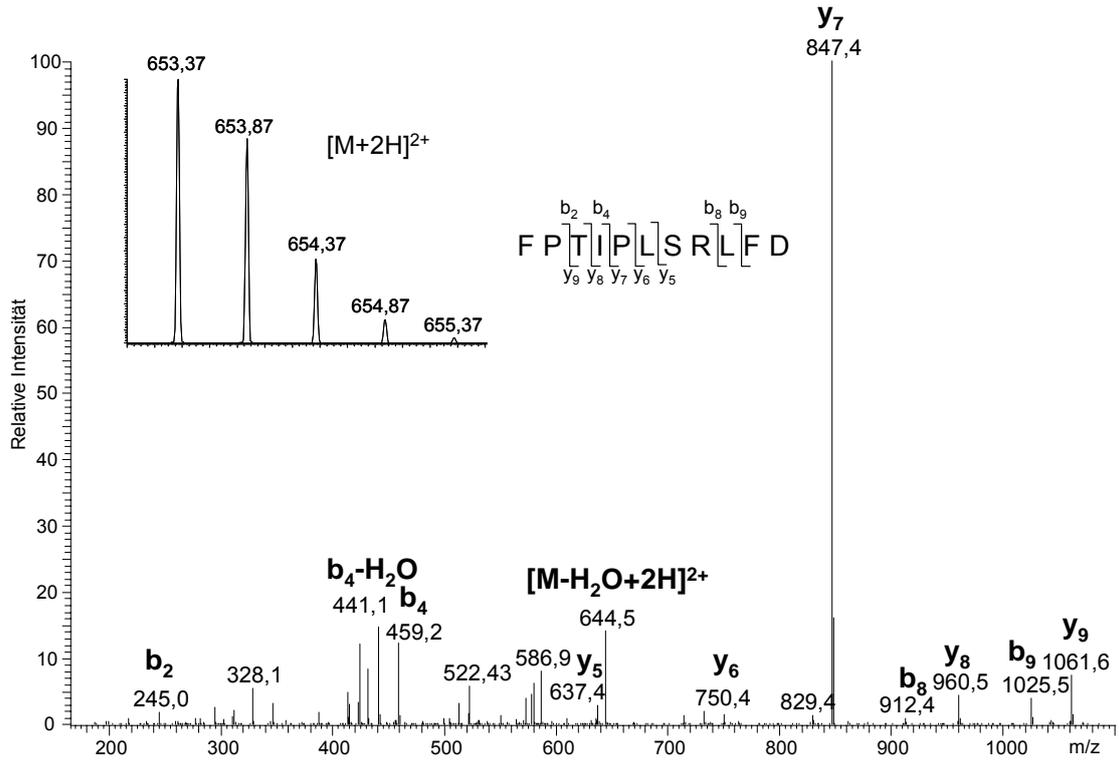


Abb. 68 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 1-11 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 31,7 min).

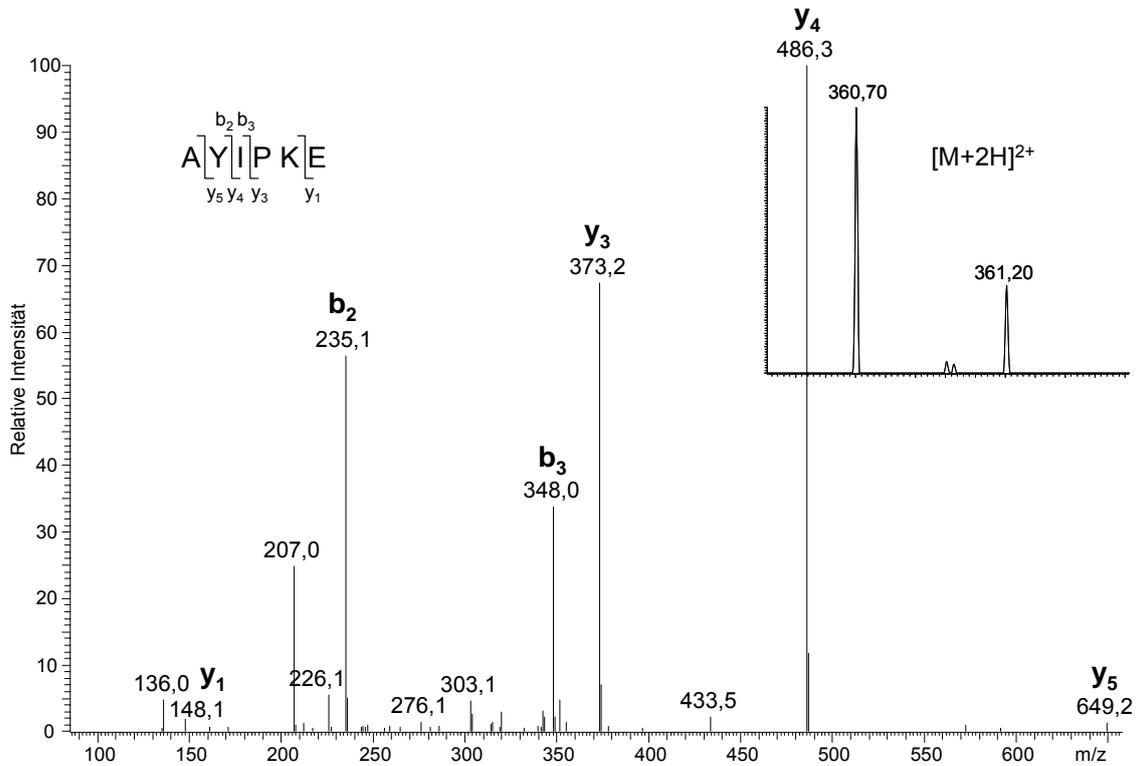


Abb. 69 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 34-39 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 14,9 min).

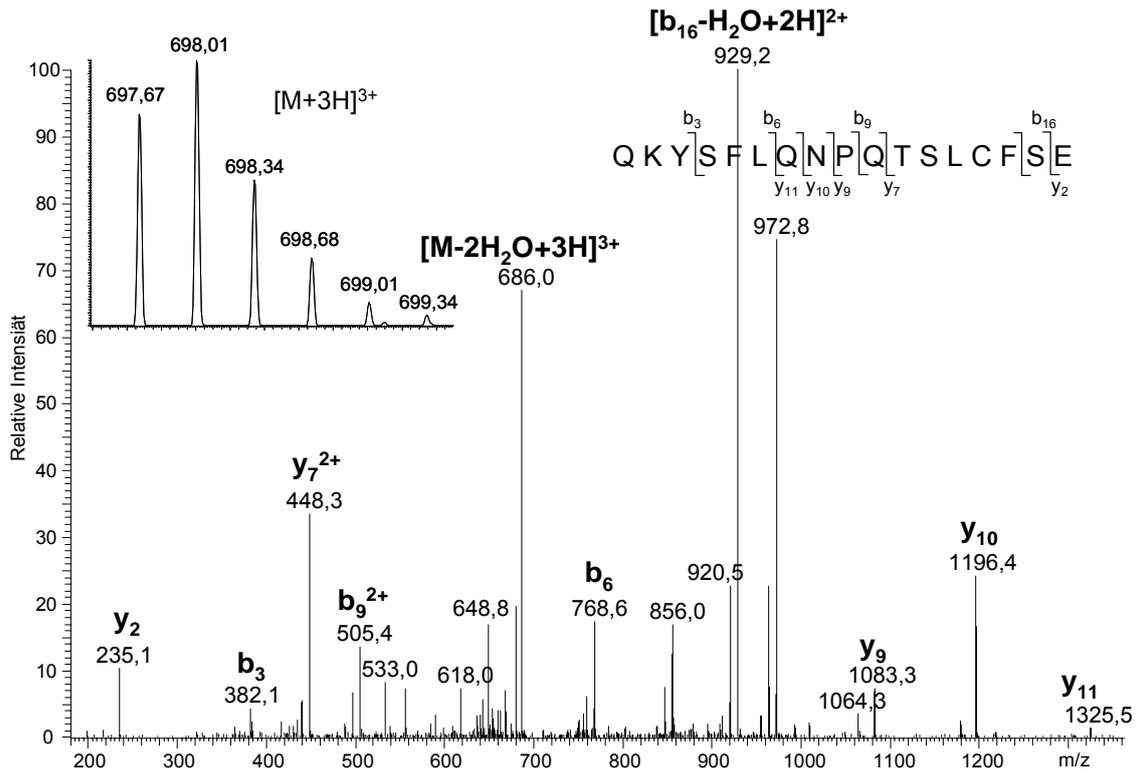


Abb. 70 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 40-56 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 27,1 min).

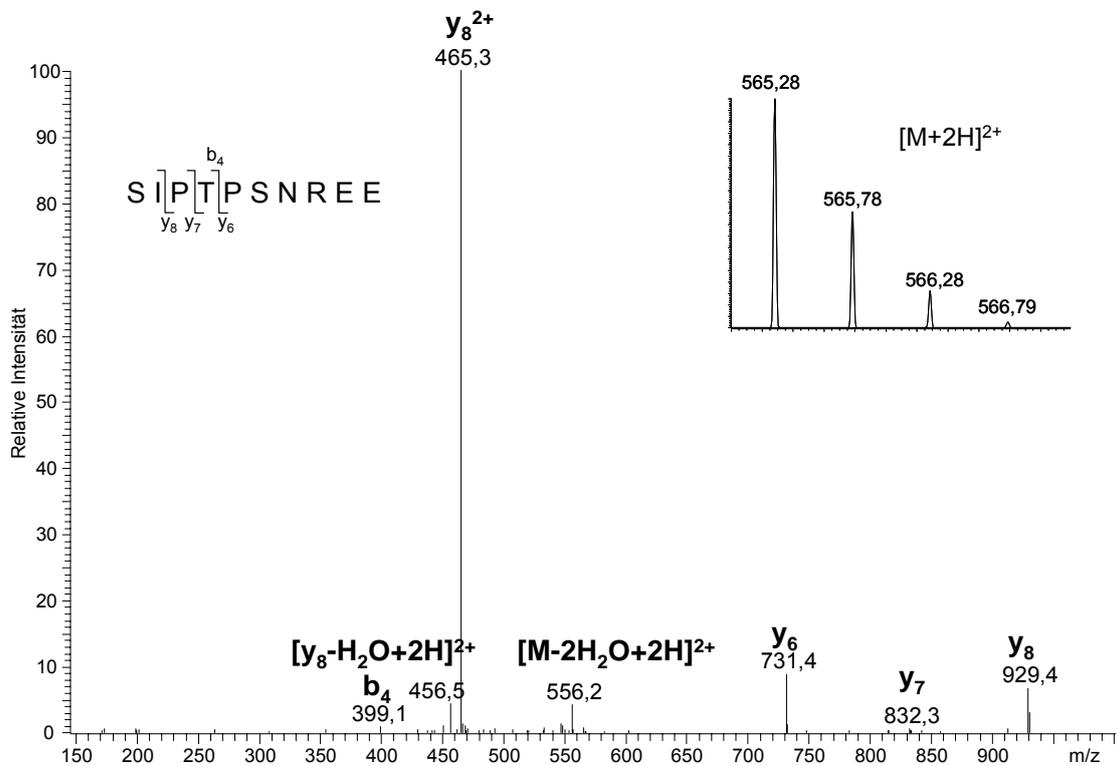


Abb. 71 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 57-66 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 14,8 min).

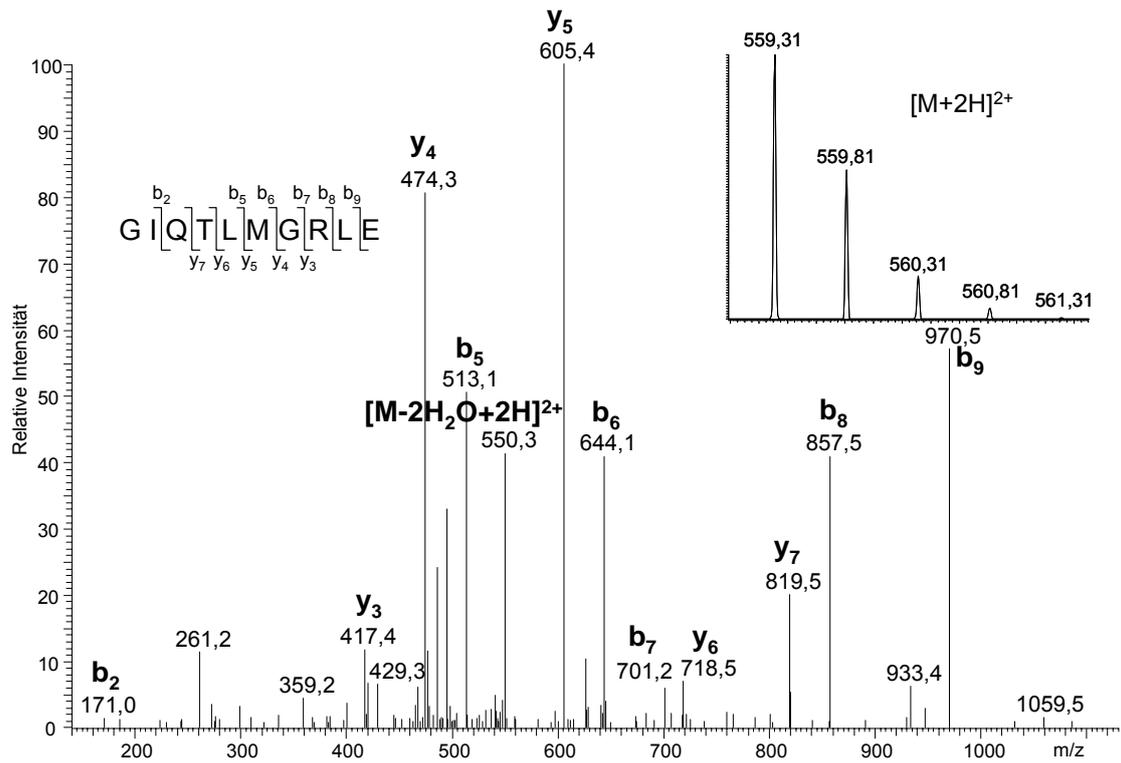


Abb. 72 NSI-MS/MS-Spektrum des Peptids AS 120-129 mit doppelt protoniertem Vorläuferion (RT 26,0 min).

8.3 Auflistung detektierter Peptide in den Spots 1-10 auf Abb. 16

Tabelle 13 Liste der in den unterschiedlichen Spots detektierten Peptide. Für einzelne Spots charakteristische Peptide sind fett gedruckt.

Spot ID (Abb. 16)	AS in der GH- Sequenz	Aminosäuresequenz des Peptids	detektierte Ladungs- zustände	[M+H] ⁺ monoisotopisch	
1	1-8	FPTIPLSR	2+	930.541	
	9-16	LFDNAMLR	2+	979.503	
	9-16	LFDNAMoxLR	2+	995.498	
	20-38	LHQLAFDTYQEFEEAYIPK	2+	2342.13	
	42-64	YSFLQNPQTSLC*FSESIPTP SNR	2+, 3+	2687.28*	
	71-77	SNLELLR	2+	844.489	
	78-94	ISLLLIQSWLEPVQFLR	2+	2055.20	
	95-115	SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	2+	2262.13	
	116-127	DLEEGIQTLMGR	2+	1361.67	
	116-127	DLEEGIQTLMoxGR	2+	1377.67	
	135-140	TGQIFK	1+, 2+	693.393	
	135-145	TGQIFKQTYSK (1 missed cleavage)	2+	1300.69	
	146-158	FDTNSHNDDALLK	2+	1489.69	
	159-167	NYGLLYC*FR	2+	1219.59*	
	169-178	DMDKVETFLR (1 missed cleavage)	2+	1253.62	
	173-178	VETFLR	2+	764.430	
	184-191	SVEGSC*GF	1+, 2+	856.351*	
	1 (GluC)	1-11	FPTIPLSRLFD	2+	1305.72
		34-39	AYIPKE	2+	720.392
40-56		QKYSFLQNPQTSLC*FSE	3+	2090.99*	
57-66		SIPTPSNREE	2+	1129.55	
120-129		GIQTLMGRLE	2+	1117.60	
2	1-8	FPTIPLSR	2+	930.541	
	9-16	LFDNAMLR	2+	979.503	
	9-16	LFDNAMoxLR	2+	995.498	
	20-64 (without 32-46)	LHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYS FLQNPQTSLC*FSESIPTPSNR	3+	1181.23*	
	71-77	SNLELLR	2+	844.489	
	78-94	ISLLLIQSWLEPVQFLR	2+	2055.20	
	95-115	SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	2+	2262.13	
	116-127	DLEEGIQTLMGR	2+	1361.67	
	116-127	DLEEGIQTLMoxGR	2+	1377.67	

Spot ID (Abb. 16)	AS in der GH- Sequenz	Aminosäuresequenz des Peptids	detektierte Ladungs- zustände	[M+H] ⁺ monoisotopisch
Forts. 2	135-140	TGQIFK	1+, 2+	693.393
	135-145	TGQIFKQTYSK (1 missed cleavage)	2+	1300.69
	159-167	NYGLLYC*FR	2+	1219.59*
	169-178	DMDKVETFLR (1 missed cleavage)	2+	1253.62
	173-178	VETFLR	2+	764.430
	184-191	SVEGSC*GF	1+, 2+	856.351*
3	1-8	FPTIPLSR	2+	930.541
	9-16	LFDNAMLR	2+	979.503
	9-16	LFDNAMoxLR	2+	995.498
	20-38	LHQLAFDTYQEFEEAYIPK	2+	2342.13
	42-64	YSFLQNPQTSLC*FSEIPTP SNR	2+, 3+	2687.28*
	71-77	SNLELLR	2+	844.489
	78-94	ISLLLIQSWLEPVQFLR	2+	2055.20
	95-115	SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	2+	2262.13
	95-115	SVFANpSLVYGASDSNVYDLLK	2+	2342.10
	116-127	DLEEGIQTLMGR	2+	1361.67
	116-127	DLEEGIQTLMoxGR	2+	1377.67
	135-140	TGQIFK	1+, 2+	693.393
	135-145	TGQIFKQTYSK (1 missed cleavage)	2+	1300.69
	146-158	FDTNSHNDDALLK	2+	1489.69
	146-158	FDTNpSHNDDALLK	2+	1569.66
	159-167	NYGLLYC*FR	2+	1219.59*
	169-178	DMDKVETFLR (1 missed cleavage)	2+	1253.62
	173-178	VETFLR	2+	764.430
	184-191	SVEGSC*GF	1+, 2+	856.351*
4	1-8	FPTIPLSR	2+	930.541
	9-16	LFDNAMLR	2+	979.503
	9-16	LFDNAMoxLR	2+	995.498
	20-38	LHQLAFDTYQEFEEAYIPK	2+	2342.13
	71-77	SNLELLR	2+	844.489
	78-94	ISLLLIQSWLEPVQFLR	2+	2055.20
	95-115	SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	2+	2262.13
	116-127	DLEEGIQTLMGR	2+	1361.67
	116-127	DLEEGIQTLMoxGR	2+	1377.67
	135-140	TGQIFK	1+, 2+	693.393
	135-145	TGQIFKQTYSK (1 missed cleavage)	2+	1300.69
	146-158	FDTNSHNDDALLK	2+	1489.69
	159-167	NYGLLYC*FR	2+	1219.59*

Spot ID (Abb. 16)	AS in der GH- Sequenz	Aminosäuresequenz des Peptids	detektierte Ladungs- zustände	[M+H] ⁺ monoisotopisch
Forts. 4	169-178	DMDKVETFLR (1 missed cleavage)	2+	1253.62
	173-178	VETFLR	2+	764.430
	184-191	SVEGSC*GF	1+, 2+	856.351*
4 (GluC)	1-11	FPTIPLSRLFD	2+	1305.72
	34-39	AYIPKE	2+	720.392
	40-56	QKYSFLQNPQTSLC*FSE	3+	2090.99*
	120-129	GIQTLMGRLE	2+	1117.60
5	1-8	FPTIPLSR	2+	930.541
	9-16	LFDNAMLR	2+	979.503
	9-16	LFDNAMoxLR	2+	995.498
	20-38	LHQLAFDTYQEFEEAYIPK	2+	2342.13
	42-64	YSFLQNPQTSLC*FSESIPTP SNR	2+, 3+	2687.28*
	71-77	SNLELLR	2+	844.489
	78-94	ISLLLIQSWLEPVQFLR	2+	2055.20
	95-115	SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	2+	2262.13
	116-127	DLEEGIQTLMGR	2+	1361.67
	116-127	DLEEGIQTLMoxGR	2+	1377.67
	135-140	TGQIFK	1+, 2+	693.393
	135-145	TGQIFKQTYSK (1 missed cleavage)	2+	1300.69
	146-158	FDTNSHNDDALLK	2+	1489.69
	146-158	FDTNpSHNDDALLK	2+	1569.66
	159-167	NYGLLYC*FR	2+	1219.59*
	169-178	DMDKVETFLR (1 missed cleavage)	2+	1253.62
	173-178	VETFLR	2+	764.430
	184-191	SVEGSC*GF	1+, 2+	856.351*
6	1-8	FPTIPLSR	2+	930.541
	9-16	LFDNAMLR	2+	979.503
	9-16	LFDNAMoxLR	2+	995.498
	20-64 (without 32-46)	LHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYS FLQNPQTSLC*FSESIPTPSNR	3+	1181.23*
	71-77	SNLELLR	2+	844.489
	78-94	ISLLLIQSWLEPVQFLR	2+	2055.20
	95-115	SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	2+	2262.13
	116-127	DLEEGIQTLMGR	2+	1361.67
	116-127	DLEEGIQTLMoxGR	2+	1377.67
	135-140	TGQIFK	1+, 2+	693.393

Spot ID (Abb. 16)	AS in der GH- Sequenz	Aminosäuresequenz des Peptids	detektierte Ladungs- zustände	[M+H] ⁺ monoisotopisch
Forts. 6	135-145	TGQIFKQTYSK (1 missed cleavage)	2+	1300.69
	146-158	FDTNSHNDDALLK	2+	1489.69
	146-158	FDTNpSHNDDALLK	2+	1569.66
	159-167	NYGLLYC*FR	2+	1219.59*
	169-178	DMDKVETFLR (1 missed cleavage)	2+	1253.62
	173-178	VETFLR	2+	764.430
	184-191	SVEGSC*GF	1+, 2+	856.351*
7	1-8	FPTIPLSR	2+	930.541
	9-16	LFDNAMLR	2+	979.503
	9-16	LFDNAMoxLR	2+	995.498
	20-64 (without 32-46)	LHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSF LQNPQTSLC*FSESIPTPSNR	3+	1181.23*
	71-77	SNLELLR	2+	844.489
	78-94	ISLLLIQSWLEPVQFLR	2+	2055.20
	95-115	SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	2+	2262.13
	116-127	DLEEGIQTLMGR	2+	1361.67
	116-127	DLEEGIQTLMoxGR	2+	1377.67
	135-140	TGQIFK	1+, 2+	693.393
	135-145	TGQIFKQTYSK (1 missed cleavage)	2+	1300.69
	146-158	FDTNSHNDDALLK	2+	1489.69
	159-167	NYGLLYC*FR	2+	1219.59*
	169-178	DMDKVETFLR (1 missed cleavage)	2+	1253.62
	173-178	VETFLR	2+	764.430
184-191	SVEGSC*GF	1+, 2+	856.351*	
8,9	1-8	FPTIPLSR	2+	930.541
	9-16	LFDNAMLR	2+	979.503
	20-38	LHQLAFDTYQEFEEAYIPK	2+	2342.13
	42-64	YSFLQNPQTSLC*FSESIPTP SNR	2+, 3+	2687.28*
	71-77	SNLELLR	2+	844.489
10	95-115	SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	2+	2262.13
	116-127	DLEEGIQTLMGR	2+	1361.67
	135-140	TGQIFK	1+, 2+	693.393
	146-158	FDTNSHNDDALLK	2+	1489.69
	159-167	NYGLLYC*FR	2+	1219.59*
	169-178	DMDKVETFLR (1 missed cleavage)	2+	1253.62
	173-178	VETFLR	2+	764.430
	184-191	SVEGSC*GF	1+, 2+	856.351*

8.4 Reagenzien, Referenzsubstanzen und verwendete Geräte

Tabelle 14 Verwendete Reagenzien und Referenzsubstanzen.

Substanz	Reinheit, Gehalt, Bemerkungen	Firma	Stadt, Land
Genotropin	0,2 mg/Spritze	Pharmacia	Karlsruhe, Deutschland
Laktogen	Lyophilisat, Swissprot/Uniprot Q6PF11	Serotec	Düsseldorf, Deutschland
EDTA-Blutröhrchen		Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Magnetische Beads, gekoppelt and sekundären anti- Kaninchen Antikörper	6,7 x 10 ⁸ beads/ml	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Primärer Antikörper, anti-hGH	1 mg/ml, Polyklonal, Bestellnummer: GTX72790	Acris Antibodies	Hiddenhausen, Deutschland
Sekundärer Antikörper, anti- Kaninchen IgG	Lyophilisat, Bestellnummer: A9169	Sigma	Deisendorf, Deutschland
12 % Bis-Tris SDS Gele		Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
8-16% Tris-Glycin Gele		Proteome Systems	Massachusetts, USA
Acetonitril	HPLC Grade	Merck	Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	Für Nano-LC	Biosolve	Valkenswaard, Niederlande
Acrylamid		Sigma	Deisendorf, Deutschland
Acrylamid/N,N'- Methylenbisacrylamid	Für Elektrophorese	GE Healthcare	München, Deutschland
Ameisensäure	Für nano-LC	Biosolve	Valkenswaard, Niederlande

Substanz	Reinheit, Gehalt, Bemerkungen	Firma	Stadt, Land
Ammoniumhydrogencarbonat	p.a.	Sigma	Deisendorf, Deutschland
APS	Für Elektrophorese	GE Healthcare	München, Deutschland
Bromphenol-Blau	Für Elektrophorese	GE Healthcare	München, Deutschland
Chaps	Für Elektrophorese	Sigma	Deisendorf, Deutschland
Coomassie Blue stain G-250		Pierce	Rockford, IL, USA
DTT		Sigma	Deisendorf, Deutschland
ECL Advance		GE Healthcare	München, Deutschland
Essigsäure	p.a.	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol	96%	VWR International	Darmstadt, Deutschland
Glu-C		Roche	Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Für Elektrophorese	GE Healthcare	München, Deutschland
Harnstoff	Für Elektrophorese	Sigma	Deisendorf, Deutschland
Immobilon-P Membran	PVDF-Membran	Millipore	Billerica, MA, USA
IPF Streifen, 18 cm, pH 4,7-5,9		Bio-Rad	München, Deutschland
IPG-Streifen, 11 cm, pH 4,7-5,9 24 cm, pH 4-7		Bio-Rad	München, Deutschland
IPG-Streifen, 18 cm, pH 4,5-5,5		GE Healthcare	München, Deutschland
LDS Probenpuffer		Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
MOPS Laufpuffer		Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Rinderalbumin (BSA)	97%	Sigma	Deisendorf, Deutschland

Substanz	Reinheit, Gehalt, Bemerkungen	Firma	Stadt, Land
TEMED	Für Elektrophorese	GE Healthcare	München, Deutschland
Thioharnstoff	Für Elektrophorese	Sigma	Deisendorf, Deutschland
Trifluoroessigsäure	99+%	Sigma	Deisendorf, Deutschland
Tris	p.a.	Sigma	Deisendorf, Deutschland
Trypsin		Promega	Münster, Deutschland
Ultrafree und Amicon Zentrifugenfilter (MW cut-off 10 und 30 kDa)		Millipore	Billerica, MA, USA
Wasser	Für nano-LC	Biosolve	Valkenswaard, Niederlande

Tabelle 15 Verwendete Geräte.

Gerät	Verwendung	Firma	Stadt, Land
Polymax 1040	Schüttler für Immunfärbung	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Thermomixer comfort	Trypsin-, GluC-Verdau; Elution nach IAP	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Typhoon Trio	Fluoreszenzscanner	GE Healthcare	München, Deutschland
IPGphor 3	Isoelektrische Fokussierung	GE Healthcare	München, Deutschland
3100 OFFGEL Fraktionator	IEF in Lösung	Agilent Technologies	Böblingen, Deutschland
XCell6	SDS-PAGE	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
XCell SureLock	SDS-PAGE	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Ettan DALTwelve	SDS-PAGE	GE Healthcare	München, Deutschland
ElectrophoretIQ3	SDS-PAGE	GE Healthcare	München, Deutschland
TE77PWR	Elektroblot	GE Healthcare	München, Deutschland
LC 1100	Flüssigkeitschromatograph	Agilent Technologies	Böblingen, Deutschland
Kapillar-LC 1100	Flüssigkeitschromatograph	Agilent Technologies	Böblingen, Deutschland
Nano-LC	Flüssigkeitschromatograph	Waters	Eschborn, Deutschland
API QTrap 4000	Massenspektrometer	Applied Biosciences	Foster City, CA, USA
LTQ Orbitrap	Massenspektrometer	Thermo	Bremen, Deutschland

9 Abkürzungsverzeichnis

2D-PAGE = Zweidimensionale Polyacrylamid Gel Elektrophorese

ACN = Acetonitril

API = *Atmospheric pressure ion source*

AS = Aminosäure

BSA = Rinderserumalbumin

CCD = *charged-coupled device*

CID = *collision induced dissociation*

DIGE = *Difference Gel Electrophoresis*

DNA = Desoxyribonukleinsäure

DTT = Dithiothreitol

ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EPO = Erythropoietin

ESI = Electrospray-Ionisation

NSI = Nanospray-Ionisation

FTICR = *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*

GH = Wachstumshormon, Growth Hormone

GHRH = Growth hormone releasing hormone, Somatoliberin

hGH = endogenes, humanes Wachstumshormon

IAP = Immunoaffinitätsaufreinigung

IGF-I = *Insulin-like growth factor I*

IS = Interner Standard

JAK = Januskinase

LC/MS = Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie

LIA = Lumineszenzimmunoassay

LIT = Lineare Ionenfalle

LOD = Nachweisgrenze (*Limit of detection*)

LTQ = *Linear Trap Quadrupol*

MALDI = *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*

MW = Molekulargewicht

NREM = non-rapid eye movement

NSV = Normalisiertes Spotvolumen

PBS = Phosphate Buffered Saline

PBST = Phosphate Buffered Saline plus Tween

pI = Isoelektrischer Punkt

PTM = Posttranslationale Modifikation

PVDF = Polyvinylidenfluorid

rGH = rekombinantes, humanes Wachstumshormon

RT = Retentionszeit

RTmp = Raumtemperatur

SDS = Natrium Dodecyl Sulfat

SDS-PAGE = Natrium Dodecyl Sulfat – Polyacrylamid Gel Elektrophorese

SST = Somatostatin

STAT = *signal transducers and activators of transcription*

TFA = Trifluoressigsäure

TOF = *Time of Flight*

10 Literatur

1. Sinner D., Bachmann M., Anabole Steroide - Das schwarze Buch, BMS Verlag, Hamburg, 2007.
2. Ikehara M., Ohtsuka E., Tokunaga T., Taniyama Y., Iwai S., Kitano K., Miyamoto S., Ohgi T., Sakuragawa Y., Fujiyama K., et al., Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984, *81* (19), 5956-5960.
3. Koch T. K., Berg B. O., De Armond S. J., Gravina R. F., Creutzfeldt-Jakob disease in a young adult with idiopathic hypopituitarism. Possible relation to the administration of cadaveric human growth hormone. *N Engl J Med*. 1985, *313* (12), 731-733.
4. WADA, The 2008 prohibited list: http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2008_List_En.pdf, Zugriff: 18. February 2008.
5. Baumann G., Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocr Rev*. 1991, *12* (4), 424-449.
6. Bidlingmaier M., Wu Z., Strasburger C. J., Test method: GH. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000, *14* (1), 99-109.
7. Bidlingmaier M., Strasburger C. J., Technology insight: detecting growth hormone abuse in athletes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007, *3* (11), 769-777.
8. Erotokritou-Mulligan I., Bassett E. E., Kniess A., Sönksen P. H., Holt R. I., Validation of the growth hormone (GH)-dependent marker method of detecting GH abuse in sport through the use of independent data sets. *Growth Horm IGF Res*. 2007, *17*(5), 416-23.
9. McHugh C. M., Park R. T., Sönksen P. H., Holt R. I., Challenges in detecting the abuse of growth hormone in sport. *Clin Chem*. 2005, *51* (9), 1587-1593.
10. Cushing H., III. Partial hypophysectomy for acromegaly: With remarks on the function of the hypophysis. *Ann Surg*. 1909, *50* (6), 1002-1017.
11. Evans H. M., Meyer K., Simpson M. E., The growth and gonad-stimulating hormones of the anterior hypophysis, University of California Press, Berkeley, California, USA, 1933.
12. Evans H. M., Long J. A., Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1922, *8* (3), 38-39.
13. Lindholm J., Growth hormone: Historical notes. *Pituitary*. 2006, *9* (1), 5-10.
14. Li C. H., Evans H. M., The isolation of pituitary growth hormone. *Science*. 1944, *99* (2566), 183-184.

15. Raben M. S., Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1958, 18 (8), 901-903.
16. Teng Chung T., Hinds C. J., Treatment with GH and IGF-1 in critical illness. *Crit Care Clin.* 2006, 22 (1), 29-40, vi.
17. Carroll P. V., Treatment with growth hormone and insulin-like growth factor-I in critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2001, 15 (4), 435-451.
18. Murray R. D., Shalet S. M., Growth hormone: current and future therapeutic applications. *Expert Opin Pharmacother.* 2000, 1 (5), 975-990.
19. Lo J. C., Mulligan K., Noor M. A., Schwarz J. M., Halvorsen R. A., Grunfeld C., Schambelan M., The effects of recombinant human growth hormone on body composition and glucose metabolism in HIV-infected patients with fat accumulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86 (8), 3480-3487.
20. Barrera-Saldana H. A., Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology. *Gene.* 1998, 211 (1), 11-18.
21. Baumann G., Metabolism of growth hormone (gh) and different molecular-forms of Gh in biological fluids. *Horm Res.* 1991, 36 5-10.
22. Parks J. S., Molecular biology of growth hormone. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1989, 349 127-135.
23. Wallis M., The molecular evolution of pituitary growth hormone prolactin and placental lactogen - a protein family showing variable rates of evolution. *J Mol Evol.* 1981, 17 (1), 10-18.
24. Lewis U. J., Bonewald L. F., Lewis L. J., The 20,000-dalton variant of human growth hormone: location of the amino acid deletions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1980, 92 (2), 511-516.
25. Singh R. N., Seavey B. K., Lewis U. J., Heterogeneity of human growth hormone. *Endocr Res Commun.* 1974, 1 (5-6), 449-464.
26. Thevis M., Schänzer W., Identification and Characterization of Peptides and Proteins in Doping Control Analysis. *Currents Proteomics.* 2005, 2 191-208.
27. Zhan X., Giorgianni F., Desiderio D. M., Proteomics analysis of growth hormone isoforms in the human pituitary. *Proteomics.* 2005, 5 (5), 1228-1241.
28. Giorgianni F., Beranova-Giorgianni S., Desiderio D. M., Identification and characterization of phosphorylated proteins in the human pituitary. *Proteomics.* 2004, 4 (3), 587-598.

29. Liberti J. P., Antoni B. A., Chlebowski J. F., Naturally-occurring pituitary growth hormone is phosphorylated. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985, 128 (2), 713-720.
30. Diaz M. J., Dominguez F., Haro L. S., Ling N., Devesa J., A 12-kilodalton N-glycosylated growth hormone-related peptide is present in human pituitary extracts. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, 77 (1), 134-138.
31. Haro L. S., Lewis U. J., Garcia M., Bustamante J., Martinez A. O., Ling N. C., Glycosylated human growth hormone (hGH): a novel 24 kDa hGH-N variant. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 228 (2), 549-556.
32. Garcia-Barros M., Costoya J. A., Rios R., Arce V., Devesa J., N-glycosylated variants of growth hormone in human pituitary extracts. *Horm Res.* 2000, 53 (1), 40-45.
33. Sinha Y. N., Jacobsen B. P., Human growth hormone (hGH)-(44-191), a reportedly diabetogenic fragment of hGH, circulates in human blood: measurement by radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994, 78 (6), 1411-1418.
34. Such-Sanmartin G., Bosch J., Segura J., Wu M., Du H., Chen G., Wang S., Vila-Perello M., Andreu D., Gutierrez-Gallego R., Characterisation of the 5 kDa growth hormone isoform. *Growth Factors.* 2008, 26 (3), 152-162.
35. Brostedt P., Roos P., Isolation of dimeric forms of human pituitary growth hormone. *Prep Biochem.* 1989, 19 (3), 217-229.
36. Grigorian A. L., Bustamante J. J., Munoz J., Aguilar R. M., Martinez A. O., Haro L. S., Preparative alkaline urea gradient PAGE: application to purification of extraordinarily-stable disulfide-linked homodimer of human growth hormone. *Electrophoresis.* 2007, 28 (21), 3829-3836.
37. Grigorian A. L., Bustamante J. J., Hernandez P., Martinez A. O., Haro L. S., Extraordinarily stable disulfide-linked homodimer of human growth hormone. *Protein Sci.* 2005, 14 (4), 902-913.
38. Harvey S., Scanes C. G., Daughaday W. H., Growth Hormone, CRC Press, Florida, USA, 1995.
39. Chantalat L., Jones N. D., Korber F., Navaza J., Pavlovsky A. G., The Crystal-Structure of Wild-Type Growth-Hormone at 2.5 Angstrom Resolution. *Protein Peptide Lett.* 1995, 2 (2), 333-340.
40. Zhao F., Ghezzi-Schoneich E., Aced G. I., Hong J., Milby T., Schoneich C., Metal-catalyzed oxidation of histidine in human growth hormone. Mechanism, isotope effects, and inhibition by a mild denaturing alcohol. *J Biol Chem.* 1997, 272 (14), 9019-9029.

41. Cunningham B. C., Mulkerrin M. G., Wells J. A., Dimerization of human growth hormone by zinc. *Science*. 1991, 253 (5019), 545-548.
42. Anisimova M. V., Shulga A. A., Levichkin I. V., Kirpichnikov M. P., Poliakov K. M., Skriabin K. G., Vijayalakshmi M. A., Varlamov V. P., The study of the metal-binding region in human growth hormone using immobilized metal ion affinity gel-electrophoresis. *Bioorg Khim*. 2001, 27 (1), 27-31.
43. Larsen P. R., Kronenberg H. M., Melmed S., Polonsky K. S., Williams Textbook of Endocrinology, Saunders, 2003.
44. <http://www.cushings-help.com/images/pituitary.gif>, Zugriff: 02.01.08
45. Veldhuis J. D., Bowers C. Y., Human GH pulsatility: an ensemble property regulated by age and gender. *J Endocrinol Invest*. 2003, 26 (9), 799-813.
46. Giannoulis M. G., Boroujerdi M. A., Powrie J., Dall R., Napoli R., Ehrnborg C., Pentecost C., Cittadini A., Jorgensen J. O., Sönksen P. H., Gender differences in growth hormone response to exercise before and after rhGH administration and the effect of rhGH on the hormone profile of fit normal adults. *Clin Endocrinol*. 2005, 62 (3), 315-322.
47. van den Berg G., Veldhuis J. D., Frolich M., Roelfsema F., An amplitude-specific divergence in the pulsatile mode of growth hormone (GH) secretion underlies the gender difference in mean GH concentrations in men and premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996, 81 (7), 2460-2467.
48. Friend K., Iranmanesh A., Veldhuis J. D., The orderliness of the growth hormone (GH) release process and the mean mass of GH secreted per burst are highly conserved in individual men on successive days. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996, 81 (10), 3746-3753.
49. Godfrey R. J., Madgwick Z., Whyte G. P., The exercise-induced growth hormone response in athletes. *Sports Med*. 2003, 33 (8), 599-613.
50. Kohler M., Ayotte C., Desharnais P., Flenker U., Lüdke S., Thevis M., Völker-Schänzer E., Schänzer W., Discrimination of recombinant and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels. *Int J Sports Med*. 2008, 29 (1), 1-6.
51. Schmidt R. F., Lang F., Thews G., Physiologie des Menschen, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005.
52. Löffler G., Petrides P. E., Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag, Berlin, 1997.

-
53. Winer L. M., Shaw M. A., Baumann G., Urinary growth hormone excretion rates in normal and acromegalic man: a critical appraisal of its potential clinical utility. *J Endocrinol Invest.* 1989, 12 (7), 461-467.
 54. Baumann G., Abramson E. C., Urinary growth hormone in man: evidence for multiple molecular forms. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983, 56 (2), 305-311.
 55. Rantonen P. J., Penttila I., Meurman J. H., Savolainen K., Narvanen S., Helenius T., Growth hormone and cortisol in serum and saliva. *Acta Odontol Scand.* 2000, 58 (6), 299-303.
 56. Saugy M., Robinson N., Saudan C., Baume N., Avois L., Mangin P., Human growth hormone doping in sport. *Br J Sports Med.* 2006, 40 Suppl 1, i35-39.
 57. Thews G., Mutschler E., Vaupel P., Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart, 1999.
 58. Berg M. J., Tymoczko J. L., Stryper L., Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 2003.
 59. Campbell G. S., Growth-hormone signal transduction. *J Pediatr.* 1997, 131 (1 Pt 2), S42-44.
 60. Lanning N. J., Carter-Su C., Recent advances in growth hormone signaling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006, 7 (4), 225-235.
 61. De Palo E. F., De Filippis V., Gatti R., Spinella P., Growth hormone isoforms and segments/fragments: molecular structure and laboratory measurement. *Clin Chim Acta.* 2006, 364 (1-2), 67-76.
 62. De Palo E. F., Gatti R., Antonelli G., Spinella P., Growth hormone isoforms, segments/fragments: does a link exist with multifunctionality? *Clin Chim Acta.* 2006, 364 (1-2), 77-81.
 63. Felsing N. E., Brasel J. A., Cooper D. M., Effect of low and high intensity exercise on circulating growth hormone in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992, 75 (1), 157-162.
 64. Jenkins P. J., Growth hormone and exercise. *Clin Endocrinol.* 1999, 50 (6), 683-689.
 65. Jørgensen J. O., Krag M., Kanaley J., Møller J., Hansen T. K., Møller N., Christiansen J. S., Orskov H., Exercise, hormones, and body temperature. regulation and action of GH during exercise. *J Endocrinol Invest.* 2003, 26 (9), 838-842.
 66. Jungersten L., Ambring A., Wall B., Wennmalm A., Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Physiol.* 1997, 82 (3), 760-764.

67. Gordon S. E., Kraemer W. J., Vos N. H., Lynch J. M., Knuttgen H. G., Effect of acid-base balance on the growth hormone response to acute high-intensity cycle exercise. *J Appl Physiol.* 1994, 76 (2), 821-829.
68. Weltman A., Weltman J. Y., Schurrer R., Evans W. S., Veldhuis J. D., Rogol A. D., Endurance training amplifies the pulsatile release of growth hormone: effects of training intensity. *J Appl Physiol.* 1992, 72 (6), 2188-2196.
69. Kozlowski S., Chwalbinska-Moneta J., Vigas M., Kaciuba-Uscilko H., Nazar K., Greater serum GH response to arm than to leg exercise performed at equivalent oxygen uptake. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1983, 52 (1), 131-135.
70. Pritzlaff C. J., Wideman L., Weltman J. Y., Abbott R. D., Gutgesell M. E., Hartman M. L., Veldhuis J. D., Weltman A., Impact of acute exercise intensity on pulsatile growth hormone release in men. *J Appl Physiol.* 1999, 87 (2), 498-504.
71. Christensen S. E., Jorgensen O. L., Moller N., Orskov H., Characterization of growth hormone release in response to external heating. Comparison to exercise induced release. *Acta Endocrinol.* 1984, 107 (3), 295-301.
72. Wee J., Charlton C., Simpson H., Jackson N. C., Shojaee-Moradie F., Stolinski M., Pentecost C., Umpleby A. M., GH secretion in acute exercise may result in post-exercise lipolysis. *Growth Horm IGF Res.* 2005, 15 (6), 397-404.
73. Wallace J. D., Cuneo R. C., Bidlingmaier M., Lundberg P. A., Carlsson L., Boguszewski C. L., Hay J., Healy M. L., Napoli R., Dall R., Rosen T., Strasburger C. J., The response of molecular isoforms of growth hormone to acute exercise in trained adult males. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86 (1), 200-206.
74. Melmed S., Medical progress: Acromegaly. *N Engl J Med.* 2006, 355 (24), 2558-2573.
75. Doga M., Bonadonna S., Gola M., Mazziotti G., Giustina A., Growth hormone deficiency in the adult. *Pituitary.* 2006, 9 (4), 305-311.
76. Pfizer Pharma GmbH, <http://www.wachstum.de/index.htm>, Zugriff: 22.12.08.
77. Agerso H., Moller-Pedersen J., Cappi S., Thomann P., Jesussek B., Senderovitz T., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new formulation of recombinant human growth hormone administered by ZomaJet 2 Vision, a new needle-free device, compared to subcutaneous administration using a conventional syringe. *J Clin Pharmacol.* 2002, 42 (11), 1262-1268.
78. Sönksen P. H., Insulin, growth hormone and sport. *J Endocrinol.* 2001, 170 (1), 13-25.
79. Packungsbeilage Genotropin^R MiniQuick. Pharmacia, Karlsruhe, 2006

80. Baker J. S., Graham M. R., Davies B., Steroid and prescription medicine abuse in the health and fitness community: A regional study. *Eur J Intern Med.* 2006, 17 (7), 479-484.
81. Rickert V. I., Pawlak-Morello C., Sheppard V., Jay M. S., Human growth hormone: a new substance of abuse among adolescents? *Clin Pediatr.* 1992, 31 (12), 723-726.
82. www.nytimes.com/2006/06/07/sports/baseball/07dnd-drug.html, Pitcher used human growth hormone, document says. *NY Times.com.* 07.06.2008 Zugriff: 26.05.08.
83. www.sueddeutsche.de/sport/weitere/arikel/733/175208/print.html, Leichtathletik - Brief aus der Dopingküche. *Süddeutsche.de.* 17.05.2008, Zugriff 27.05.08.
84. Fainaru-Wada M., Williams L., Game of Shadows: Barry Bonds, Balco, and the Steroids Scandal That Rocked Professional Sports, Gotham Books, New York, 2007.
85. Holt R. I., Sönksen P. H., Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport. *Br J Pharmacol.* 2008, 154 (3), 542-556.
86. Graham M. R., Baker J. S., Evans P., Kicman A., Cowan D., Hullin D., Davies B., Short-term recombinant human growth hormone administration improves respiratory function in abstinent anabolic-androgenic steroid users. *Growth Horm IGF Res.* 2007, 17 (4), 328-335.
87. Healy M. L., Gibney J., Russell-Jones D. L., Pentecost C., Croos P., Sönksen P. H., Umpleby A. M., High dose growth hormone exerts an anabolic effect at rest and during exercise in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88 (11), 5221-5226.
88. Hansen M., Morthorst R., Larsson B., Dall R., Flyvbjerg A., Rasmussen M. H., Orskov H., Kjaer M., Lange K. H., No effect of growth hormone administration on substrate oxidation during exercise in young, lean men. *J Physiol.* 2005, 567 (Pt 3), 1035-1045.
89. Blackman M. R., Sorkin J. D., Munzer T., Bellantoni M. F., Busby-Whitehead J., Stevens T. E., Jayme J., O'Connor K. G., Christmas C., Tobin J. D., Stewart K. J., Cottrell E., St Clair C., Pabst K. M., Harman S. M., Growth hormone and sex steroid administration in healthy aged women and men: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2002, 288 (18), 2282-2292.
90. Graham M. R., Evans P., Davies B., Baker J. S., AAS, growth hormone, and insulin abuse: psychological and neuroendocrine effects. *Ther Clin Risk Manag.* 2008, 4 (3), 587-597.

91. Liu H., Bravata D. M., Olkin I., Friedlander A., Liu V., Roberts B., Bendavid E., Saynina O., Salpeter S. R., Garber A. M., Hoffman A. R., Systematic review: the effects of growth hormone on athletic performance. *Ann Intern Med.* 2008, *148* (10), 747-758.
92. Giannoulis M. G., Sönksen P. H., Umpleby M., Breen L., Pentecost C., Whyte M., McMillan C. V., Bradley C., Martin F. C., The effects of growth hormone and/or testosterone in healthy elderly men: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, *91* (2), 477-484.
93. Yarasheski K. E., Zachweija J. J., Angelopoulos T. J., Bier D. M., Short-term growth hormone treatment does not increase muscle protein synthesis in experienced weight lifters. *J Appl Physiol.* 1993, *74* (6), 3073-3076.
94. Velloso C. P., Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br J Pharmacol.* 2008, *154* (3), 557-568.
95. Ehrnborg C., Bengtsson B. A., Rosen T., Growth hormone abuse. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000, *14* (1), 71-77.
96. Graham M. R., Baker J. S., Evans P., Kicman A., Cowan D., Hullin D., Thomas N., Davies B., Physical effects of short-term recombinant human growth hormone administration in abstinent steroid dependency. *Horm Res.* 2008, *69* (6), 343-354.
97. Perls T. T., Reisman N. R., Olshansky S. J., Provision or distribution of growth hormone for "antiaging": clinical and legal issues. *JAMA.* 2005, *294* (16), 2086-2090.
98. Jamieson J., Dorman L. E., Marriott V., Growth Hormone - Reversing human aging naturally, Nutraceuticals Corp, St. Louis, 1997.
99. Elkins R., HGH - Age reversing miracle, Woodland Publishing, Orem, 2004.
100. Giordano R., Bonelli L., Marinazzo E., Ghigo E., Arvat E., Growth hormone treatment in human ageing: benefits and risks. *Hormones.* 2008, *7* (2), 133-139.
101. Liu H., Bravata D. M., Olkin I., Nayak S., Roberts B., Garber A. M., Hoffman A. R., Systematic review: the safety and efficacy of growth hormone in the healthy elderly. *Ann Intern Med.* 2007, *146* (2), 104-115.
102. Wu Z., Bidlingmaier M., Dall R., Strasburger C. J., Detection of doping with human growth hormone. *Lancet.* 1999, *353* (9156), 895.
103. Keller A., Wu Z. D., Kratzsch J., Keller E., Blum W. F., Kniess A., Preiss R., Teichert J., Strasburger C. J., Bidlingmaier M., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GH: dependence on route and dosage of administration. *Eur J Endocrinol.* 2007, *156* (6), 647-653.

-
104. Longobardi S., Keay N., Ehrnborg C., Cittadini A., Rosen T., Dall R., Boroujerdi M. A., Bassett E. E., Healy M. L., Pentecost C., Wallace J. D., Powrie J., Jorgensen J. O., Sacca L., Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study. The GH-2000 Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85 (4), 1505-1512.
 105. Ehrnborg C., Lange K. H., Dall R., Christiansen J. S., Lundberg P. A., Baxter R. C., Boroujerdi M. A., Bengtsson B. A., Healey M. L., Pentecost C., Longobardi S., Napoli R., Rosen T., The growth hormone/insulin-like growth factor-I axis hormones and bone markers in elite athletes in response to a maximum exercise test. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88 (1), 394-401.
 106. Dall R., Longobardi S., Ehrnborg C., Keay N., Rosen T., Jorgensen J. O., Cuneo R. C., Boroujerdi M. A., Cittadini A., Napoli R., Christiansen J. S., Bengtsson B. A., Sacca L., Baxter R. C., Bassett E. E., Sönksen P. H., The effect of four weeks of supraphysiological growth hormone administration on the insulin-like growth factor axis in women and men. GH-2000 Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85 (11), 4193-4200.
 107. Healy M. L., Dall R., Gibney J., Bassett E., Ehrnborg C., Pentecost C., Rosen T., Cittadini A., Baxter R. C., Sönksen P. H., Toward the development of a test for growth hormone (GH) abuse: a study of extreme physiological ranges of GH-dependent markers in 813 elite athletes in the postcompetition setting. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005, 90 (2), 641-649.
 108. Kurdy N. M., Serology of abnormal fracture healing: the role of PIIINP, PICP, and BsALP. *J Orthop Trauma.* 2000, 14 (1), 48-53.
 109. Beranova-Giorgianni S., Zhao Y., Desiderio D. M., Giorgianni F., Phosphoproteomic analysis of the human pituitary. *Pituitary.* 2006, 9 (2), 109-120.
 110. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004, 431 (7011), 931-945.
 111. Walsh C. T., Garneau-Tsodikova S., Gatto G. J., Jr., Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005, 44 (45), 7342-7372.
 112. Mann M., Jensen O. N., Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol.* 2003, 21 (3), 255-261.

-
113. Temporini C., Calleri E., Massolini G., Caccialanza G., Integrated analytical strategies for the study of phosphorylation and glycosylation in proteins. *Mass Spectrom Rev.* 2008, 27 (3), 207-236.
 114. Kobata A., Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem.* 1992, 209 (2), 483-501.
 115. Higuchi M., Oh-eda M., Kuboniwa H., Tomonoh K., Shimonaka Y., Ochi N., Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 1992, 267 (11), 7703-7709.
 116. Robertson E. R., Kennedy J. F., Glycoproteins: a consideration of the potential problems and their solutions with respect to purification and characterisation. *Bioseparation.* 1996, 6 (1), 1-15.
 117. Dwek R. A., Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem Rev.* 1996, 96 (2), 683-720.
 118. Biemann K., Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 1988, 16 (1-12), 99-111.
 119. Guerrero I. C., Kleiner O., Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci Rep.* 2005, 25 (1-2), 71-93.
 120. Budzikiewicz H., Schäfer M., Massenspektrometrie, Wiley-VCH GmbH & Co KGaA, Weinheim, 2005.
 121. Fenn J. B., Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003, 42 (33), 3871-3894.
 122. Makarov A., Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem.* 2000, 72 (6), 1156-1162.
 123. Hu Q., Noll R. J., Li H., Makarov A., Hardman M., Graham Cooks R., The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* 2005, 40 (4), 430-443.
 124. Scigelova M., Makarov A., Orbitrap Mass Analyzer - Overview and Applications in Proteomics. *Proteomics.* 2006, 6 (S2), 16-21.
 125. http://www.thermo.com/com/cda/resources/resources_detail/1,200181,00.html, Zugriff: 19.11.2008
 126. Roepstorff P., Fohlman J., Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom.* 1984, 11 (11), 601.
 127. Wysocki V. H., Tsaprailis G., Smith L. L., Brei L. A., Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom.* 2000, 35 (12), 1399-1406.

128. Paizs B., Suhai S., Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom Rev.* 2005, 24 (4), 508-548.
129. Marto C. J., Brame S. B., Ficarro S. B., White F. M., Shabanowitz J., Hunt D. F., Sequence Analysis: Low Energy MS/MS Peptide Sequence Interpretation. In: Gross M. L., Caprioli R. M. (Eds), *The Encyclopedia of Mass Spectrometry - Biological Applications: Peptides and Proteins*, Elsevier Ltd., Oxford, 2005, pp. 165-176.
130. Hepner F., Cszasar E., Roitinger E., Lubec G., Mass spectrometrical analysis of recombinant human growth hormone (Genotropin(R)) reveals amino acid substitutions in 2% of the expressed protein. *Proteome Sci.* 2005, 3 (1), 1.
131. Hepner F., Cszasar E., Roitinger E., Pollak A., Lubec G., Massspectrometrical analysis of recombinant human growth hormone Norditropin reveals amino acid exchange at M14_V14 rhGH. *Proteomics.* 2006, 6 (3), 775-784.
132. Gorg A., Weiss W., Dunn M. J., Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 2004, 4 (12), 3665-3685.
133. Gianazza E., Isoelectric focusing as a tool for the investigation of post-translational processing and chemical modifications of proteins. *J Chromatogr A.* 1995, 705 (1), 67-87.
134. O'Farrell P. H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975, 250 (10), 4007-4021.
135. Westermeier R., Naven T., Höpker H.-R., *Proteomics in Practice*, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
136. Dennis-Sykes C. A., Miller W. J., McAleer W. J., A quantitative Western Blot method for protein measurement. *J Biol Stand.* 1985, 13 (4), 309-314.
137. Unlu M., Morgan M. E., Minden J. S., Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* 1997, 18 (11), 2071-2077.
138. Hermanson G. T., Mallia A. K., Smith P. K., *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Press, Inc, London, 1992.
139. Kohler G., Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975, 256 (5517), 495-497.
140. Thevis M., Thomas A., Delahaut P., Bosseloir A., Schänzer W., Doping control analysis of intact rapid-acting insulin analogues in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2006, 78 (6), 1897-1903.

141. Thevis M., Thomas A., Schänzer W., Mass spectrometric determination of insulins and their degradation products in sports drug testing. *Mass Spectrom Rev.* 2008, 27 (1), 35-50.
142. Thomas A., Thevis M., Delahaut P., Bosseloir A., Schänzer W., Mass spectrometric identification of degradation products of insulin and its long-acting analogues in human urine for doping control purposes. *Anal Chem.* 2007, 79 (6), 2518-2524.
143. Thomas A., Geyer H., Kamber M., Schänzer W., Thevis M., Mass spectrometric determination of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in human urine for doping control purposes by means of LC-ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom.* 2008, 43 (7), 908-915.
144. Bredehoft M., Schänzer W., Thevis M., Quantification of human insulin-like growth factor-1 and qualitative detection of its analogues in plasma using liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008, 22 (4), 477-485.
145. Lasne F., Martin L., Crepin N., de Ceaurriz J., Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem.* 2002, 311 (2), 119-126.
146. Lasne F., Double-blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods.* 2003, 276 (1-2), 223-226.
147. Jacobs D. S., Kasten B. L., DeMott W. R., Wolfson W. L., Laboratory Test Handbook, Williams & Wilkins, London, 1990.
148. Dattani M. T., Ealey P. A., Pringle P. J., Hindmarsh P. C., Brook C. G., Marshall N. J., An investigation into the lability of the bioactivity of human growth hormone using the ESTA bioassay. *Horm Res.* 1996, 46 (2), 64-73.
149. Diver M. J., Hughes J. G., Hutton J. L., West C. R., Hipkin L. J., The long-term stability in whole blood of 14 commonly-requested hormone analytes. *Ann Clin Biochem.* 1994, 31 (Pt 6) 561-565.
150. Kromidas S., Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
151. Obenauer J. C., Cantley L. C., Yaffe M. B., Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31 (13), 3635-3641.
152. MCW Proteomics Center, University of Wisconsin, <http://proteomics.mcw.edu/promost>, Wisconsin, USA, Zugriff: 26.11.2007.

153. Sarioglu H., Lottspeich F., Walk T., Jung G., Eckerskorn C., Deamidation as a widespread phenomenon in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of human blood plasma proteins. *Electrophoresis*. 2000, 21 (11), 2209-2218.
154. Manning M. C., Patel K., Borchardt R. T., Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm Res*. 1989, 6 (11), 903-918.
155. Lewis U. J., Sinha Y. N., Haro L. S., Variant forms and fragments of human growth hormone in serum. *Acta Paediatr Suppl*. 1994, 399 29-31; discussion 32.
156. Wuhrer M., Catalina M. I., Deelder A. M., Hokke C. H., Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007, 849 (1-2), 115-128.
157. Nimtz M., Martin W., Wray V., Kloppel K. D., Augustin J., Conradt H. S., Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. *Eur J Biochem*. 1993, 213 (1), 39-56.
158. Zhou G. H., Luo G. A., Zhou Y., Zhou K. Y., Zhang X. D., Huang L. Q., Application of capillary electrophoresis, liquid chromatography, electrospray-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectrometry to the characterization of recombinant human erythropoietin. *Electrophoresis*. 1998, 19 (13), 2348-2355.
159. Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>. Lyngby, Denmark. Zugriff 02.10.08
160. Hansen J. E., Lund O., Tolstrup N., Gooley A. A., Williams K. L., Brunak S., NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconj J*. 1998, 15 (2), 115-130.
161. Swiderek K. M., Davis M. T., Lee T. D., The identification of peptide modifications derived from gel-separated proteins using electrospray triple quadrupole and ion trap analyses. *Electrophoresis*. 1998, 19 (6), 989-997.
162. Froelich J. M., Reid G. E., The origin and control of ex vivo oxidative peptide modifications prior to mass spectrometry analysis. *Proteomics*. 2008, 8 (7), 1334-1345.
163. Domenech P., Carbonell L., Perez Carceles M. D., Falcon M., Luna A., Osuna E., Application of postmortem lipid peroxidation in heart tissue to the diagnosis of myocardial damage. *Int J Legal Med*. 2004, 118 (1), 19-23.
164. Cerretani D., Riezzo I., Fiaschi A. I., Centini F., Giorgi G., D'Errico S., Fiore C., Karch S. B., Neri M., Pomara C., Turillazzi E., Fineschi V., Cardiac oxidative stress

- determination and myocardial morphology after a single ecstasy (MDMA) administration in a rat model. *Int J Legal Med.* 2008, 122 (6), 461-469.
165. Brinkmann B., Madea B., Handbuch gerichtliche Medizin, Springer, Berlin, 2004.
166. Osuna E., Perez-Carceles M. D., Garcia-Lorente A., Sanchez-Hanke M., Vieira D. N., Carvalho L., Puschel K., Luna A., Lipid peroxidation in lung tissue after chest trauma and correlation with the duration of the post-trauma survival period. *Int J Legal Med.* 1998, 111 (5), 256-260.
167. Ramos V., Valenzuela A., Villanueva E., Miranda M. T., Antioxidant-related enzymes in myocardial zones and human pericardial fluid in relation to the cause of death. *Int J Legal Med.* 1997, 110 (1), 1-4.
168. Ansari M. A., Roberts K. N., Scheff S. W., Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic Biol Med.* 2008, 45 (4), 443-452.
169. Opii W. O., Nukala V. N., Sultana R., Pandya J. D., Day K. M., Merchant M. L., Klein J. B., Sullivan P. G., Butterfield D. A., Proteomic identification of oxidized mitochondrial proteins following experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2007, 24 (5), 772-789.
170. Stadtman E. R., Levine R. L., Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003, 25 (3-4), 207-218.
171. Shacter E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000, 32 (3-4), 307-326.
172. Taylor S. W., Fahy E., Murray J., Capaldi R. A., Ghosh S. S., Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins. *J Biol Chem.* 2003, 278 (22), 19587-19590.
173. Chang S. H., Teshima G. M., Milby T., Gillece-Castro B., Canova-Davis E., Metal-catalyzed photooxidation of histidine in human growth hormone. *Anal Biochem.* 1997, 244 (2), 221-227.
174. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, <http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=explorer/viewers/webmol.jsp?structureId=1HGU-->. Piscataway, NY; La Jolla, CA. access: 13.01.09
175. Forsyth I. A., Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. *Exp Clin Endocrinol.* 1994, 102 (3), 244-251.

176. Handwerger S., Freemark M., The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000, 13 (4), 343-356.
177. Mandel J., The Statistical Analyses of Experimental Data, John Wiley & Sons, New York, 1964.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass die Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von den angegebenen Teilpublikation – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. H.-G. Schmalz betreut worden.

Köln, den 26.04.2009