

**Human Myostatin:
Isolierung aus humaner Skelettmuskulatur,
rekombinante Herstellung und Antikörpergenerierung
zur Entwicklung und Validierung eines Immunoassays.**

Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie und Chemie

angefertigt am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Karl Florian Wintgens

Dekan: Prof. Dr. P.R. Schreiner

Erstgutachterin: Prof. Dr. T. Trenczek

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Dorresteyn

Gießen, im August 2007

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
Abb.	Abbildung
abs.	absolut (Reinheitsgrad)
AG	Antigen
AK	Antikörper
AMP	Ampicillin
anti / alpha	Präfix zur Kennzeichnung eines AK (gegen-)
BCI	5-Brom-4-chlor-indigo
Brij35	(Dodecylpoly-(ethylenglycoether)23
BSA	Rinderserum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
cpm	count per minute
Cy3	Fluoreszenzfarbstoff
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F12	Ham's F12 Medium
FCS	Fötales Rinderserum
g	Gramm
h	Stunde

HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin Klasse G
IgY	Immunglobulin Klasse G aus Eigelb (yolk)
IL-6	Interleukin-6
Imidazol	1,3-Diaza-2,4-cyclopentadien
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	kilo (Präfix)
kDa	kilo Dalton / atomare Masseinheit
KLH	Keyhole limpet Hämocyanin
kV	kilo Volt
lb medium	Nährlösung nach Giuseppe Bertani (lysogeny broth)
m	milli (Präfix)
M	Mol
m	Maus (mouse) (als Präfix)
mA	milli Ampere
mab	monoklonaler Antikörper
min	Minuten
ml	Mililiter
mM	mili Mol
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA/Boten-RNA
MTP	Mikrotiterplatte
MWM	Molekulargewichtsmarker
NaOAc	Natrium Oxal Acetat
ng	Nanogramm
NP-40	Nonylphenylpolyethylenglycol
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIS	präimmun Serum
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Markierung mit Meerrettichperoxidase
PPGNE	Phosphatpuffer mit Gelatine, Natriumazid und EDTA
PVDF	Polyvinylidenfluorid

r	Kaninchen (rabbit) (als Präfix)
RIA	Radio Immuno Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-Medium	Zellkulturmedium RPMI-1640
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Sammelgel
Stains-All	1-Ethyl-2-[3-(1-Ethyl-naphthol[1,2-d]thiazol-2-(1H)yliden)-2-methyl-1-propenyl]-naphtho[1,2-d]thiazoliumbromid
TAE Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Trenngel
Thimerosal	Ethyl(2-mercaptobenzoato-(2-)-O,S)mercurat(1-) Natrium-Salz
TMB	Tetra Methyl Benzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris Base	siehe TRIS
TrisHCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid
Triton X-100	Polyethylenglycol-mono-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether
Tween-20	Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat
U	Units
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
v/w	Volumen pro Gewicht
w/v	Gewicht pro Volumen
WP	Waschpuffer
x g	x-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

1.	Einleitung	1
1.1.	Die TGF-β Proteinfamilie	1
1.2.	Der Signalweg der TGF-β Familie	3
1.3.	Myostatin	6
1.3.1	Molekulare Struktur von Myostatin	6
1.3.2	Selbstinhibition von Myostatin	8
1.3.3	Inhibition von Myostatin durch andere Proteine	9
1.3.4	Myostatin in Mäusen	9
1.3.5	Myostatin in Rindern.....	11
1.3.6	Myostatin im Menschen.....	12
1.3.7	Mutationen im humanen Myostatin - Gen.....	13
1.3.8	Myostatin in anderen Spezies	14
1.4.	GDF-11	18
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Gerätschaften	19
2.2.	Quantifizierung des Gesamtproteinanteils in Lösungen	21
2.2.1	Proteinbestimmung nach BRADFORD	21
2.2.2	Proteinbestimmung mittels Spektralphotometrie	21
2.3.	Proteinfällungsmethoden	22
2.3.1	TCA – Fällung	22
2.3.2	Ethanolische Fällung	22
2.4.	Extraktion von Proteinen aus Muskel	22
2.4.1	Proteinextraktion aus Muskulatur nach BAUMANN.....	22
2.4.2	Proteinextraktion aus Muskulatur nach KAWADA.....	23
2.4.3	Proteinextraktion aus Muskulatur nach MENDLER	24
2.4.4	Proteinextraktion aus Muskulatur nach SAKUMA	25
2.5.	Proteinnachweise und elektrophoretische Methoden	26
2.5.1	SDS – Gelelektrophorese nach (LAEMMLI 1970).....	26
2.5.2	Silberfärbung	27
2.5.3	„stains – all“ – Färbung von SDS – Gelen	28
2.5.4	Coomassie® Färbung	30

2.5.5	Kolloidale Coomassie® Färbung	30
2.5.6	„dot-Blot“	31
2.5.7	Western Blot.....	32
2.6.	Proteinsequenzierung	33
2.7.	Chromatographische Verfahren	34
2.7.1	Gelfiltrationschromatographie	34
2.7.2	Affinitätschromatographie.....	35
2.7.2.1	Ni ²⁺ - Chelat Säule	35
2.7.2.2	HiTrap™ NHS-activated HP	36
2.7.2.3	Affinitätschromatographie mit Protein G.....	38
2.8.	Enzymatischer Verdau mit <i>Furin</i>	39
2.9.	Kopplungsverfahren an Proteine	39
2.9.1	Biotinylierung von Proteinen.....	40
2.9.2	KLH Kopplung	40
2.10.	Immunhistologie	41
2.10.1	Demineralisierung	41
2.10.2	Paraffineinbettung	41
2.10.3	Anfertigung von Schnitten	42
2.10.4	Entparaffinierung	42
2.11.	Immunisierung von Hühnern	43
2.11.1	Antikörpergewinnung aus Eidotter	44
2.12.	Immunisierung von Kaninchen.....	44
2.13.	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	45
2.13.1	Immunisierung von Mäusen	45
2.13.2	Fusionierung von Milzzellen	45
2.13.3	Herstellung von Makrophagen	47
2.13.4	Testung der Zellkulturüberstände.....	48
2.13.5	Klonierung und Subklonierung von Hybridom-Zelllinien.....	48
2.13.6	Isotypisierung von monoklonalen Antikörpern.....	49
2.14.	Titerbestimmung.....	49
2.15.	Immunoassays	50

2.15.1	Benötigte Puffer und Lösungen zur ELISA – Entwicklung.....	50
2.15.2	Kompetitive EIA.....	54
2.15.3	Nicht kompetitive EIA	55
2.16.	Entwicklung und Optimierung von ELISA	56
2.16.1	Variation der Beschichtungskonzentrationen	56
2.16.2	Bestimmung der optimalen Beschichtungskonzentration	56
2.16.3	Bestimmung des optimalen Blockierungsmediums	57
2.16.4	Bindungskinetiken	58
2.16.5	Waschen von Mikrotiterplatten	60
2.16.6	Kreuzreaktivität	60
2.16.7	Linearität	61
2.17.	Molekularbiologische Arbeiten.....	62
2.17.1	Verwendete Vektoren.....	62
2.17.2	RT-PCR.....	63
2.17.3	PCR (Polymerasekettenreaktion).....	65
2.17.3.1	Verwendete Primer.....	66
2.17.4	Reinigung der PCR-Produkte.....	67
2.17.5	Agarose - Gelelektrophorese.....	67
2.17.6	Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen	68
2.17.7	Ligationen.....	68
2.17.8	Transformationskompetente E.coli DH5 α	69
2.17.9	„heat-shock“ - Transformation	69
2.17.10	Minipräparation	70
2.17.11	X-Gal Test zur Selektion rekombinanter Klone	70
2.17.12	DNA – Präzipitation	71
2.17.13	Photometrische Quantifizierung von DNA	71
2.17.14	DNA – Sequenzierung	72
2.17.15	Kultivierung von HEK 293 EBNA Zellen	72
2.17.16	Kryokonservierung von Zellen	73
2.17.17	Transfektion von HEK 293 EBNA - Zellen	74
2.17.17.1	Chemische Transfektion.....	74

2.17.17.2	Transfektion durch Elektroporation	74
3.	Ergebnisse	75
3.1.	Proteinextraktion aus Rattenmuskulatur	75
3.1.1	Proteinextraktion nach SAKUMA, WATANABE et al. 2000	75
3.1.2	Proteinextraktion nach KAWADA, TACHI et al. 2001	77
3.1.3	Proteinextraktion nach Mandler, Zador et al. 2000	78
3.2.	Proteinextraktion aus humaner Oberschenkelmuskulatur	79
3.3.	Affinitätschromatographie mit Blue Sepharose® G	82
3.4.	Gelfiltration humaner Skelettmuskulatur	83
3.5.	Affinitätschromatographie nach Gelfiltration	85
3.6.	Herstellung von rekombinantem Myostatin	86
3.6.1	Rekombinante Expression von humanem Myostatin	87
3.6.2	Sequenzierung von rekombinantem Myostatin	89
3.6.3	Furin – Verdau von rekombinantem Myostatin	93
3.7.	Charakterisierung verschiedener Antikörper	94
3.7.1	Antikörper aus Kaninchen gegen synthetische Peptide	94
3.7.2	Antikörper aus Kaninchen gegen rekombinantes Myostatin	95
3.7.3	Antikörper aus Eidotter	101
3.7.4	Monoklonale Antikörper aus Mäusen	105
3.8.	Immunhistologie	111
3.9.	ELISA Entwicklung	115
3.9.1	Kompetitiver EIA mit Myostatin – Peptid-Antikörper	115
3.9.2	Sandwich ELISA mit <i>chicken-α-rek. Myo</i> und <i>rabbit-α-rek. Myo</i>	119
3.9.3	Kompetitiver EIA mit rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)	122
3.9.3.1	Beschichtungskonzentration	122
3.9.3.2	Blockierungslösungen	124
3.9.3.3	Bindungskinetiken	125
3.9.3.4	Waschen der beschichteten Mikrotiterplatte	128
3.9.3.5	Kreuzreaktivität mit anderen Analyten	128
3.9.3.6	Standardeichkurve	129
3.9.3.7	Reproduzierbarkeit der Standardkurve	132

3.9.3.8	Linearität von Patientenproben	134
3.9.3.9	Nachweisgrenze.....	136
4.	Diskussion	137
4.1.	Extraktion von nativem Myostatin aus Muskulatur.....	139
4.2.	Expression von rekombinantem Myostatin	142
4.3.	Antikörper gegen Myostatin.....	144
4.4.	Immunhistologische Untersuchungen.....	148
4.5.	Immunoassay – Entwicklung.....	150
5.	Zusammenfassung.....	157
6.	Literaturverzeichnis	158
7.	Anhang	170
8.	Danksagung.....	173

1. Einleitung

Bereits im Jahre 1962 postulierte W.S. Bullough (BULLOUGH 1962) die Existenz von negativen Wachstumsregulatoren, welche seiner Meinung nach für die Regulation des Größenwachstums von Gewebe verantwortlich sind. Nach dieser These ist jede Art von Gewebe zu einer beschleunigten oder gar ungehemmten Zellteilung fähig, sofern ein ausreichender Stofftransport vorausgesetzt werden kann. Normalerweise wird diese beschleunigte Zellteilung jedoch von Signalstoffen begrenzt, welche in direkter Beziehung zum Zustand der Unversehrtheit stehen. Die Homöostase, die Aufrechterhaltung der Gesamtfunktion und Größe der Gewebe, wird durch diese Stoffe sichergestellt. Diese Signalstoffe – genannt Chalone – zirkulieren im Körper und inhibieren gewebsspezifisch, aber nicht artspezifisch, das Wachstum des entsprechenden Gewebes. Es konnte jedoch trotz großer Anstrengungen über Jahre hinweg in keinem Gewebe ein solcher Stoff nachgewiesen werden, der die Eigenschaften der Chalone aufweist und die Hypothese über die Kontrolle der Gewebsmasse bestätigen würde.

Das erste Gewebe, für das mittlerweile gezeigt werden konnte, dass dessen Wachstum durch einen Prozess reguliert wird, wie er von Bullough beschrieben wurde, ist das Muskelgewebe. Das Chalon, welches im Skelettmuskel die Hauptrolle der negativen Wachstumsregulation zu spielen scheint, wird Myostatin genannt und gehört zur TGF- β Proteinfamilie.

1.1. Die TGF- β Proteinfamilie

Viele Faktoren spielen bei der Zellproliferation und Zelldifferentiation eine große Rolle. Meist werden diese Faktoren grob zur Gruppe der Zytokine zusammengefasst, welche in zahlreiche Untergruppen eingeteilt werden können, wie zum Beispiel in Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren, Peptid-Faktoren, die eine Signalfunktion erfüllen und in sehr kleinen Konzentrationen bereits eine Wirkung hervorrufen, oder auch in

Transformierende Wachstumsfaktoren – beta (*transforming growth factors- β* , TGF- β).

Die TGF- β – Untergruppe umfasst eine große Zahl extrazellulärer Wachstumsfaktoren, welche unterschiedlichste Funktionen in der Differenzierung und Proliferation von Zellen haben. Sie sind beispielsweise an der Regulierung von Entzündungsprozessen, an der Blutzellbildung oder aber auch an der Bildung von Knochen beteiligt. Es sind mehr als 35 Wachstumsfaktoren bekannt (CHANG, BROWN ET AL. 2002). Dazu zählen unter anderem BMPs (*bone morphogenetic proteins*), GDFs (*growth differentiation factors*), Activine, Inhibine und auch die Familie der TGF- β s.

Die Mitglieder der TGF- β Familie sind strukturell alle relativ ähnlich. Sie werden zunächst als Pro-Protein (PrePropeptid / Vorstufe) translatiert, welches aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer darauf folgenden Prodomäne sowie einer C-terminalen „reifen“ Domäne (*mature domain*) besteht. Nach dem Ausschleusen aus der Zelle und der proteolytischen Abspaltung des Signalpeptids bleibt die biologische Aktivität der Proteine maskiert. Die Pro-Domäne (LAP, *latency associated peptide*) wird an einer dibasischen proteolytischen Prozessierungsstelle (-RXXR-) mittels einer Furin-ähnlichen Endopeptidase während der Sekretion von der C-terminalen Domäne getrennt. Die beiden Domänen bleiben jedoch nichtkovalent gebunden, und erst nach der Dissoziation des LAP von der C-terminalen Domäne erhält diese ihre biologisch aktive Form. An diesem letzten Dissoziationsschritt können unterschiedliche extrazelluläre Matrixproteine wie zum Beispiel Thrombospondin 1 (SCHULTZ-CHERRY, RIBEIRO ET AL. 1994) oder auch Integrine (MUNGER, HUANG ET AL. 1999) beteiligt sein. Es könnten aber auch weitere proteolytische Prozesse hier eine Rolle spielen (SAHARINEN, HYYTIAINEN ET AL. 1999).

Typischerweise hat der C-terminale, biologisch aktive Teil sechs bis neun Cysteine, welche durch Disulfidbrücken einen so genannten Cysteinknoten bilden. Zahlreiche Mitglieder der Familie haben eine ungerade Anzahl an

Cysteinresten und bilden darüber meist eine Disulfidbrücke. In der Regel bilden die TGF- β s hierüber Homodimere; es können jedoch auch Heterodimere gebildet werden.

Eine besondere Eigenschaft aller TGF- β s ist, dass die abgespaltene Pro-Domäne eine hohe Affinität zum reifen Protein hat und daher die Proteine meist als latent gebundener Komplex sekretiert werden. Zusätzlich wird die Pro-Domäne meist von einer Gruppe Proteine (LTBP, *latent TGF- β binding proteins*) über Disulfidbrücken zu einem tri-molekularen Komplex (*large latent complex*) gebunden (LAWRENCE 2001). Die Dissoziation der TGF- β aus diesem Komplex und damit die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden ist ein ausschlaggebendes regulatorisches Ereignis (RIFKIN 2005).

1.2. Der Signalweg der TGF- β Familie

Die Mitglieder der TGF- β Familie stoßen zelluläre Prozesse an, indem sie spezifisch an einen heteromeren Komplex zweier verschiedener Formen von Serin/Threonin Kinase-Rezeptoren in der Plasmamembran binden (FRANZEN, TEN DIJKE ET AL. 1993). Diese Rezeptoren werden Typ I und Typ II Rezeptoren genannt. Durch Bindung des Liganden an den Typ II Rezeptor dreht sich der cytoplasmatische Teil des Rezeptors, welcher dadurch Serinreste des Typ I Rezeptors phosphorylieren kann. Diese Phosphorylierung führt zu einer Aktivierung des Rezeptors und dadurch zur Initiierung weiterer spezifischer intrazellulärer Signale durch so genannte Smad Proteine. Bei Abwesenheit des Typ I Rezeptors ist eine weitere Reaktion nicht möglich.

Smad-Proteine sind eine Gruppe stark konservierter Proteine, welche eine intrazelluläre Signaltransduktion bewirken (ZHANG & DERYNCK 1999). Sie werden unterteilt in R-Smad Proteine (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 und Smad8), die durch den Typ I Rezeptor aktiviert und reguliert werden, I-Smad Proteine (Smad6 und Smad7), welche eine inhibitorische Wirkung auf die

Signalkaskade haben, und das Co-Smad Protein (Smad4), welches ein Kofaktor bei den weiteren Signalkaskaden ist.

Ein Protein, welches eine Zink-Doppelfinger FYVE Domäne enthält, genannt SARA (*Smad Anchor for Receptor Activation*), bewirkt eine Anlagerung von R-Smads an den Typ I Rezeptor, welcher Serin-Reste der R-Smads phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung und damit die Dissoziation der R-Smads vom Typ I Rezeptor – SARA – Komplex. Die phosphorylierten R-Smads bilden Komplexe mit dem Co-Smad (Smad4) und können nun in den Nukleus gelangen (MASSAGUE 1998; MASSAGUE 2000; MASSAGUE & WOTTON 2000; SHI & MASSAGUE 2003).

Im Zellkern binden die R-Smad / Co-Smad Komplexe an Transkriptionspromotoren und Transkriptionskofaktoren und induzieren somit eine Transkription der DNA, welche die Expression der I-Smads (Smad7) verursachen kann (DERYNCK & ZHANG 2003).

Die I-Smads binden an die intrazelluläre Region der Typ I Rezeptoren und kompetitieren dadurch um die Phosphat-Gruppen der intrazellulären Phosphorylierungskaskade der Rezeptoren und der R-Smads (HANADA & YOSHIMURA 2002).

Der Mechanismus ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Neben den inhibitorischen Einflüssen der I-Smads (Smad7) gibt es weitere äußere Regulationsmechanismen, die bei dieser Signalkaskade eine Rolle spielen. Als verstärkende Signale können hier verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. LIF) genannt werden, aber auch der Vitamin D Status sowie unterschiedliche Stressfaktoren. Zu den hemmenden Signalen zählen ebenfalls verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. TNF- α , IL-1 α), aber auch Hormone wie Glucocorticoide (HANADA & YOSHIMURA 2002).

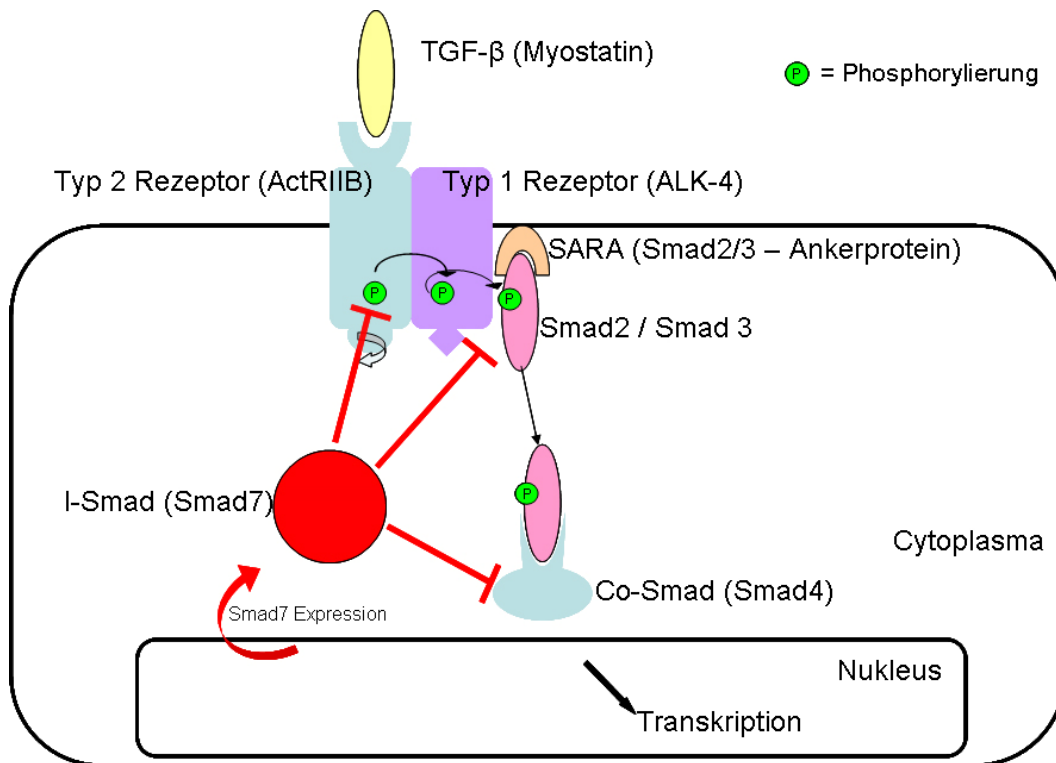


Abb. 1 TGF- β Signalkaskade: TGF- β binden an einen membranständigen Typ 2 Rezeptor. Mehrere aufeinander folgende Phosphorylierungsvorgänge sorgen für die Ablösung von Smad2 oder Smad3 Proteinen von den dazugehörigen Ankerproteinen. Die freien, phosphorylierten Smad2/3 Proteine können von Co-Smad (Smad4) Proteinen gebunden werden, welche in dieser Form in den Nucleus gelangen können und dort die Transkription des Ziel-Genes verursachen können. Diese Transkription kann jedoch eine Smad7 Expression auslösen, welche wiederum verschiedene inhibitorische Einflüsse auf die gesamte Signalkaskade haben kann.

1.3. Myostatin

Im Jahre 1997 entdeckte McPherron im Rahmen einer Suche nach neuen Mitgliedern der TGF- β Familie im Mausmodell ein Protein, welches die Eigenschaft aufwies, das Wachstum von Muskelfasern negativ zu beeinflussen (MCPHERRON, LAWLER et al. 1997; MCPHERRON & LEE 1997). Damit konnte also die Theorie der Chalone, die Bullough 1962 aufgestellt hatte, bestätigt werden (SLACK 1997).

In Anlehnung an das im medizinischen Sprachgebrauch häufig verwendete Wort *Statin*, welches eine pharmakologische Substanzklasse der Cholesterinsyntheseenzymhemmer (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Inhibitoren; z.B. Lovastatin, Rosuvastatin oder Cerivastatin) bezeichnet, die als Nebenwirkungen toxische Myopathien (z.B. Lipobay®, Pravasin®, Crestor®) auslösen können, wurde das Protein *Myostatin* genannt.

1.3.1 Molekulare Struktur von Myostatin

Das Protein weist die typischen Merkmale der Mitglieder der TGF- β Familie auf. Es besteht aus 375 Aminosäuren, von denen Aminosäure 1 bis 23 das Signalpeptid bilden. Das Signalpeptid hat eine theoretische Molekülmasse von 2,6 kDa. An die N-terminale Signaldomäne schließt sich die Pro-Domäne von Aminosäure 24 bis 266 an. Die theoretische Molekülmasse dieses Abschnitts beträgt 27,7 kDa. Als C-terminales Erkennungsmuster für die Schnittstelle dienen die Aminosäuren 263 bis 266 (RSRR). Der auf diese Schnittstellen-Domäne folgende Abschnitt von Aminosäure 267 bis 375 ist das „reife“ Myostatin und damit die biologisch aktive Form mit einem theoretischen Molekulargewicht von 12,4 kDa. Wie auch bei anderen Mitgliedern der TGF- β Familie durchläuft das Myostatin zwei proteolytische Prozessierungen. Die erste Prozessierung, die Abspaltung des Signalpeptids, findet unmittelbar nach dem Ausschleusen aus der Zelle statt. Die zweite Prozessierung und damit die Abspaltung der Pro-Domäne vom biologisch aktiven C-Terminus erfolgt an der

RSRR – Schnittstelle (Arginin-Serin-Arginin-Arginin). Es ist bisher nicht bekannt, welche Proteinasen *in vivo* für diese Spaltungen verantwortlich sind, jedoch ist das Vorhandensein zweier basischer Aminosäuren in der Regel ein Hinweis auf Furin-ähnliche Proteinase (PACE, Furin (REHEMULLA & KAUFMAN 1992)).

```
MOKLQLCVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQLSKLRLETAP  
NISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFF  
KFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKT  
VLQNWLKQPE.SNLGIEIKALDENGHDLA VTFPGGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESR  
CCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINM  
LYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS
```

Abb. 2 Aminosäuresequenz von humanem Myostatin. Aminosäure 1 bis 23 **Signalpeptid**, Aminosäure 24 bis 266 **Pro-Domäne** und Aminosäuren 267 bis 375 das biologisch aktive C-terminale **Myostatin**. Die Sequenz **RSRR** ist die Schnittstelle zur Abspaltung der Pro-Domäne.

Der C-terminale Bereich („reifes Myostatin“) zeichnet sich besonders durch die zahlreichen Cysteine aus. Die 9 Cysteinreste dieser Domäne veranlassen zum einen diesen Proteinabschnitt vermutlich zur Ausbildung eines für die TGF- β Familie typischen Cysteinknotens (DAOPIN, PIEZ et al. 1992), zum anderen sorgt die ungerade Anzahl dieser Aminosäuren auch für die Ausbildung eines Homodimers.

Aufgrund der Zugehörigkeit zur TGF- β Familie wird angenommen, dass die Pro-Domäne eine entscheidende Rolle bei der Faltung des C-Terminus spielt.

1.3.2 Selbstinhibition von Myostatin

Nach Abspaltung der Pro-Domäne vom C-terminalen Myostatin lagert sich die Pro-Domäne nichtkovalent an den dimerisierten C-Terminus an (JIANG, LIANG et al. 2004). Dieser Komplex (*latent complex*), erstmals in transfizierten CHO-Zellen (Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster) gezeigt, ist biologisch inaktiv (LEE & MCPHERRON 2001; THIES, CHEN et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass vor allem der N-terminale Teil der Pro-Domäne für die inhibitorische Wirkung verantwortlich ist (HILL, DAVIES et al. 2002; JIANG, LIANG et al. 2004).

Durch Hitzeeinwirkung, aber auch durch die Einwirkung von Metalloproteinasen (BMP-1 / Tolloid-Familie) kann dieser Komplex auseinander dissoziieren und das Myostatin damit aktiviert werden. (WOLFMAN, MCPHERRON et al. 2003; GE & GREENSPAN 2006). Es wurde bewiesen, dass Myostatin als Komplex im Serum zirkuliert und auch durch Säure aktiviert werden kann (ZIMMERS, DAVIES et al. 2002).

Untersuchungen ergaben, dass auch die Abspaltung der Pro-Domäne vom C-Terminus an der *RSRR* Schnittstelle ein wichtiger Faktor für die Bioaktivierung des Myostatin ist (ZHU, HADHAZY et al. 2000). Mutationen an der Stelle im Gen, welche für diese Schnittstelle kodiert, verursachen einen Abbruch der Signalkaskade.

Ein weiterer Mechanismus, der zur Selbstinhibierung von Myostatin beiträgt, ist eine Regulation über die Expression von Smad7-Proteinen. Smad7 greift hier wahrscheinlich direkt in die Transkription des Myostatin Gens ein, jedoch ist der genaue Mechanismus noch nicht vollständig geklärt. Es handelt sich hierbei um einen so genannten *negative feedback loop*, bei dem die Expression von Myostatin eingeschränkt wird, indem dieses andere negative Regulationsproteine anregt, die wiederum einen Einfluss auf die Expression von Myostatin haben (ZHU, TOPOUZIS et al. 2004; FORBES, JACKMAN et al. 2006).

1.3.3 Inhibition von Myostatin durch andere Proteine

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass verschiedene Proteine, die die biologische Funktion von Myostatin hemmen können. Das Protein Follistatin, welches auch bei anderen Mitgliedern der TGF- β Familie als Inhibitor nachgewiesen werden konnte (GAMER, WOLFMAN et al. 1999), kann auch die Wirkung des Myostatin verhindern, indem es mit diesem einen lockeren Komplex bildet und damit eine Signalkaskade unterbindet (LEE & MCPHERRON 2001). Durch diese Komplexbildung wirkt Follistatin hier als Antagonist zur Myostatin-gesteuerten Inhibition der Myogenese (AMTHOR, NICHOLAS et al. 2004).

Ähnlich wie das Propeptid komplexieren weitere Proteine wie FLRG (*follistatin related gene* (HILL, DAVIES et al. 2002)) oder auch GASP1 (*growth and differentiation factor-associated serum protein – 1* (HILL, QIU et al. 2003)) mit Myostatin und verhindern dadurch eine weitere Reaktion.

Bisher konnte noch nicht genau geklärt werden, welche Proteine *in vivo* die Rolle des Antagonisten zum Myostatin übernehmen. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass es sich um Proteine handelt, welche zumindest eine Follistatin Domäne aufweisen.

1.3.4 Myostatin in Mäusen

Myostatin wurde erstmals im Jahre 1997 gefunden, als McPherron nach neuen Mitgliedern der TGF- β suchte (MCPHERRON, LAWLER et al. 1997). Das Expressionsmuster von Myostatin wies darauf hin, dass das neue Protein, auch GDF-8 (*growth and differentiation factor – 8*) genannt, eine wichtige Rolle bei der Muskelentwicklung spielt. Daher wurden homozygote *knock-out* Mäuse generiert, welche eine *deletion* in dem Teil des Gens haben, welcher für den C-terminalen Bereich von Myostatin codiert. Zunächst zeigte sich hier vor allem ein enormer Muskelzuwachs. Diese Mäuse wurden scherzhaft „*look-alike-Schwarzenegger-mice*“ genannt.

Genauere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dem Muskelzuwachs nicht nur um eine muskuläre Hypertrophie, also die Vergrößerung der Muskelzellen, sondern auch um eine Hyperplasie, also eine Vermehrung der Muskelzellen handelt (MCPHERRON, LAWLER et al. 1997).

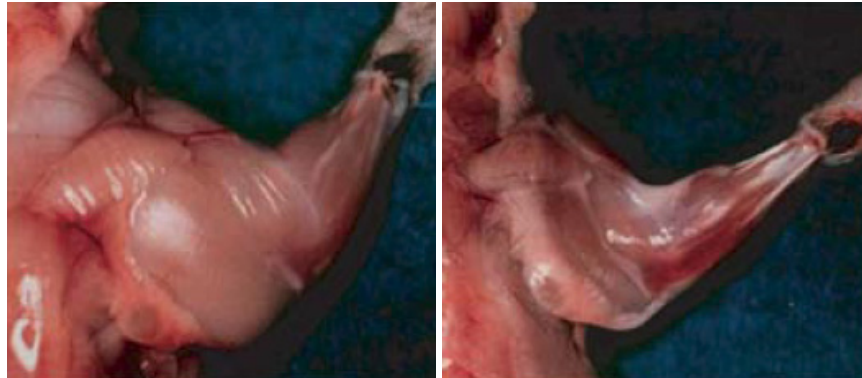


Abb. 3 Wirkung des Myostatins auf die Muskelausprägung. Vordere Extremität einer Myostatin *knock-out* Maus (links) sowie einer *wildtype* Maus (rechts). Deutlich zu erkennen ist im linken Bild die extreme Vergrößerung der Muskeln gegenüber der *wildtype* Maus im rechten Bild (Quelle: (MCPHERRON & LEE 1997)).

Homozygote *knock-out* Mäuse weisen eine zwei bis drei Mal so hohe Muskelmasse auf wie *wild-type* Mäuse, heterozygote Mäuse dagegen nur eine um 25% erhöhte Muskelmasse.

Die Expression von Myostatin findet in Mäusen bis zum Tag 9,5 des Embryonalstadiums im myotomen Teil der Somiten statt. Bei adulten Tieren kann Myostatin vor allem im Skelettmuskel nachgewiesen werden, aber die mRNA ist ebenso im Fett- und anderem Gewebe nachweisbar (CARLSON, BOOTH et al. 1999).

Myostatin-RNA kann in sämtlichen Skelettmuskeltypen detektiert werden, wobei der Grad der Expression sehr stark schwankt (MCPHERRON, LAWLER et al. 1997). Sowohl männliche als auch weibliche *knock-out* Mäuse zeigen den auffälligen Phänotyp.

1.3.5 Myostatin in Rindern

Myostatin ist bisher in zahlreichen Spezies nachgewiesen worden, wobei sich hier eine sehr starke Gen-Konservierung zeigt. Dies legt den Schluss nahe, dass auch eine Konservierung der Funktion stattgefunden hat. Rinder, welche einen Defekt im Myostatin-Gen haben, existieren bereits seit über 200 Jahren. Das codierende Gen liegt auf Chromosom 2 (GROBET, MARTIN et al. 1997; KAMBADUR, SHARMA et al. 1997; MCPHERRON & LEE 1997). Diese Rinder wurden von Viehzüchtern über einen langen Zeitraum so gezüchtet, dass stets die stärksten Exemplare gekreuzt wurden. Dies führte zu verschiedenen Rassen, wie zum Beispiel den „weiß-blauen Belgiern“ oder den „Piedmontesischen Rindern“, die sich durch besonders starke Muskulatur sowie sehr zartes Fleisch auszeichnen (DICKMAN 1997; SMITH, LOPEZ-CORRALES et al. 1997; WESTHUSIN 1997). Auch bei diesen Tieren kann man den so genannten „*double-muscling*“ Phänotyp beobachten (SMITH, LOPEZ-CORRALES et al. 1997).



Abb. 4 Bulle der Rasse „weiß-blauer Belgier“. Die extrem starke Muskelausbildung macht den „*double-muscling*“ Phänotypen deutlich (MCPHERRON & LEE 1997).

Bei Untersuchungen zur Evolution verschiedener Rinder- und Antilopenrassen konnte gezeigt werden, dass sich zwar das codierende Gen (MSTN) leicht verändert hat, die grundlegende Funktion des Proteins, die Kontrolle des Muskelwachstums, jedoch über 23 Millionen Jahre beibehalten worden ist (TELLGREN, BERGLUND et al. 2004). Die Analyse verschiedener Rinderrassen

ergab zahlreiche verschiedene Mutationen im Myostatin-Gen (GROBET, MARTIN et al. 1997; GROBET 2000; KARIM, COPPIETERS et al. 2000). Die unterschiedlichen Veränderungen des Myostatin-Gens führen zu verschieden starken Ausprägungen des Phänotyps. Bei der Rinderrasse „South Devon“ ist die Mutation des Gens zwar ähnlich wie bei den „weiß-blauen Belgiern“, jedoch hat diese Rasse weniger Probleme beim Kalben (SMITH, LEWIS et al. 2000). Mit Hilfe des Wissens über die möglichen Mutationen im Myostatin-Gen können Viehzüchter heutzutage gezielter gewünschte Effekte bei der Kreuzung ihrer Tiere erreichen und damit die Fleischproduktion steigern, ohne unbedingt auf molekularer Ebene genetische Veränderungen vornehmen zu müssen (BELLINGE, LIBERLES et al. 2005).

1.3.6 Myostatin im Menschen

Myostatin ist ein negativer Regulator für die Muskelmasse. Dies bedeutet, dass in Gegenwart von Myostatin das Muskelwachstum gehemmt wird, wohingegen in Abwesenheit des Proteins die Muskelmasse zunimmt (LEE & MCPHERRON 1999; LEE & MCPHERRON 2001; SHARMA, LANGLEY et al. 2001; GONZALEZ-CADAVID & BHASIN 2004). Das codierende Gen liegt auf Chromosom 2 (GROBET, MARTIN et al. 1997; KAMBADUR, SHARMA et al. 1997; MCPHERRON & LEE 1997). Die ersten Untersuchungen von Myostatin im menschlichen Körper wurden 1998 durchgeführt (GONZALEZ-CADAVID, TAYLOR et al. 1998). Aufgrund der Ergebnisse wurde postuliert, dass Myostatin als 26 kDa Protein im Serum zirkuliert. Die Arbeitsgruppe um N. Gonzalez-Cadavid konnte erstmals mit Hilfe eines Radioimmunoassays relative Werte an Myostatin im menschlichen Blutkreislauf messen und hierbei feststellen, dass die Konzentrationen bei HIV-infizierten Personen signifikant höher lagen als im direkten Vergleich mit gesunden Patienten. Bei längerem Liegen bis zu 25 Tagen ist ebenfalls ein Anstieg von Myostatin zu beobachten gewesen (ZACHWIEJA, SMITH et al. 1999). Weitere Untersuchungen zeigen eine positive Veränderung, nämlich ein Absinken der Konzentration von Myostatin im Plasma, durch gezieltes Training der Muskulatur (WALKER, KAMBADUR et al. 2004). Bei besonders alten Personen

(60 bis 92 Jahre) wurde ein Anstieg der Myostatinkonzentration im Vergleich zu jungen Menschen (19 bis 35 Jahre) beobachtet (YARASHESKI, BHASIN et al. 2002).

Aufgrund der hohen Konservierung der Aminosäuresequenz und der starken Ähnlichkeit zu anderen Proteinen (GDF-11, siehe Abschnitt 1.4), stellt die Generierung von hoch affinen Antikörpern gegen Myostatin eine Schwierigkeit dar, welche bislang die Entwicklung spezifischer Tests für die Detektion der Plasmakonzentrationen des Proteins erschwert hat. Alle Angaben von Konzentrationen in bisherigen Publikationen waren relative Angaben, welche lediglich innerhalb einer Studie vergleichbar waren.

Daher wurden zahlreiche Untersuchungen unter Betrachtung der Myostatin-mRNA Expression durchgeführt. Aufgrund der Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen wurde die Myostatin mRNA Expression von jungen Personen mit der von alten verglichen, wobei kein signifikanter Anstieg der mRNA Konzentration festgestellt werden konnte und somit auch keine Korrelation zwischen mRNA Konzentration und Muskelmasse bestand (WELLE, BHATT et al. 2002). Eine andere Studie wiederum zeigte einen deutlichen Anstieg sowohl der Muskelmasse, der Myostatinkonzentration im Plasma als auch der Myostatin-mRNA Konzentration nach 12-wöchigem, intensivem Muskeltraining (WILLOUGHBY 2004b). Bei Vergleichen von gezieltem Krafttraining mit Ausdauertraining konnte vor allem bei den Probanden, welche das Ausdauertraining durchführten, eine Verdoppelung der mRNA Konzentration gemessen werden, wohingegen dies bei denjenigen, welche Krafttraining betrieben, nicht zu beobachten war (COFFEY, SHIELD et al. 2006).

1.3.7 Mutationen im humanen Myostatin - Gen

Im Jahre 2004 publizierte die Arbeitsgruppe um M.SCHÜLKE an der Charité Berlin Untersuchungen eines Kindes, welches bereits direkt nach der Geburt einen auffälligen Phänotypen besaß (SCHUELKE, WAGNER et al. 2004). Die Muskulatur war bereits sehr deutlich ausgebildet, ohne jedoch hormonelle Auffälligkeiten zu zeigen. Es wurde eine Hypertrophie festgestellt wie sie bis

dahin bei keinem Neugeborenen jemals beobachtet werden konnte. Genetische Untersuchungen zeigten, dass das Kind eine homozygote Mutation im Myostatin Gen trägt, welche eine Expression von biologisch aktivem Myostatin verhindert. Mittlerweile wurden weitere Mutationen im Myostatin Gen des Menschen entdeckt. Bei Patienten mit einer *Duchenne* Muskeldystrophie (DMD) konnten kürzlich zwei neue Mutationen im codierenden Gen gefunden werden, welches jedoch, da diese Mutationen nur heterozygot beobachtet wurden, nicht zu einem verstärkten Muskelwachstum geführt haben (NISHIYAMA, TAKESHIMA et al. 2007).

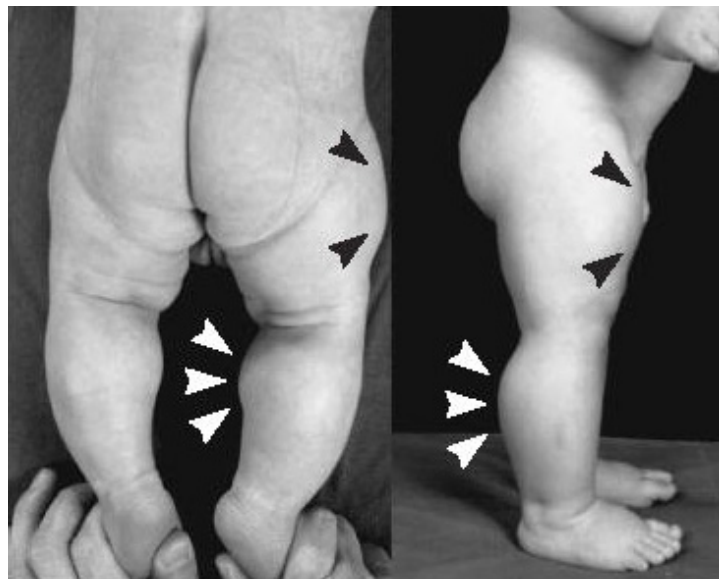


Abb. 5 Fotografien eines Jungen mit einer Mutation im Myostatin-Gen. links: 6 Tage alter Säugling. rechts: derselbe Junge im Alter von 7 Monaten. Die Pfeile deuten auf die besonders auffällig ausdifferenzierten Muskeln im Oberschenkel- und Wadenbereich.

1.3.8 Myostatin in anderen Spezies

Sowohl die Proteinsequenz als auch die Funktion von Myostatin ist in zahlreichen anderen Mammalia hoch konserviert (PIE & ALVARES 2006). Zahlreiche Wissenschaftler beschäftigen sich vor allem auch aus Interesse für

die Fleischindustrie mit der Untersuchung des Myostatins in verschiedenen Schafsrassen (MATEESCU & THONEY 2002; JEANPLONG, BASS et al. 2003; HARPER & PETHICK 2004; WALLING, VISSCHER et al. 2004), und auch Schweinerassen (JI, LOSINSKI et al. 1998; FONSECA, WILSONS et al. 2003; SILLENCE 2004), bei denen Myostatin ebenfalls als negativer Muskelwachstumsregulator eine entscheidende Rolle spielt. Aufgrund des starken Muskelbaus von Tieren mit einem Defekt im Myostatin – Gen kann davon ausgegangen werden, dass diese Tiere deutlich weniger Körperfett ansammeln als Tiere ohne Defekt (LIN, ARNOLD et al. 2002; MCPHERRON & LEE 2002).

Neueste Untersuchungen an Windhunden zeigen auch hier einen Einfluss von Myostatin auf das Muskelwachstum. Durch die fortwährende Kreuzung von besonders schnellen Hunden wurden vor allem Tiere gezüchtet mit einem muskulösen, aber dennoch schnellen Phänotypen. Molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Phänotypen heterozygote Mutationen im Myostatin Gen aufweisen. Die Homozygoten Abkömmlinge heterozygoter Elterntiere weisen einen deutlich stärkeren Muskelbau auf und werden oftmals von den Züchtern kurz nach der Geburt getötet, da sie nicht dem Rassestandard entsprechen. Statistisch betrachtet sind Tiere, welche eine heterozygote Mutation im Myostatin Gen tragen, leistungsfähiger als Tiere ohne Mutation (MOSHER, QUIGNON et al. 2007).

Nicht nur bei Säugetieren, sondern auch in Vögeln konnte Myostatin mRNA gefunden werden (KOCAMIS, KIRKPATRICK-KELLER et al. 1999). Hier scheint Myostatin gleichfalls bereits im embryonalen Stadium eine wichtige Rolle bei der Skelettmuskelentwicklung zu spielen (KOCAMIS, MCFARLAND et al. 2001; AMTHOR, HUANG et al. 2002; KOCAMIS, GAHR et al. 2002; CASTELHANO-BARBOSA, GABRIEL et al. 2005).

Die Untersuchung von Fischen zeigte ebenfalls eine starke Konservierung von Myostatin hinsichtlich seiner Funktion im adulten Muskel. Insbesondere bei der Dorade (*Sparus auratus*; Goldbrasse) konnte jedoch gezeigt werden, dass bei der Embryonalentwicklung keine Expression von Myostatin stattfindet

(MACCATROZZO, BARGELLONI, RADAELLI et al. 2001). Da Myostatin mRNA nicht nur in Muskelgewebe, sondern auch in anderem Gewebe wie Gehirn, intestinalen Endothelzellen oder Augen bei Fischen gefunden wird, kann man davon ausgehen, dass das Protein hier weitere Funktionen übernimmt (OSTBYE, GALLOWAY et al. 2001). Zudem können bei Fischen zwei unterschiedliche Myostatin Gene nachgewiesen werden (MACCATROZZO, BARGELLONI, CARDAZZO et al. 2001; RESCAN, JUTEL et al. 2001; BIGA, CAIN et al. 2004).

Es wurde zwar festgestellt, dass die Promoter Region des Myostatin Gens sich in verschiedenen Spezies stark unterscheidet, dennoch ist die resultierende Aminosäuresequenz recht ähnlich (GU, ZHANG et al. 2002; GU, ZHANG et al. 2004).

Unterschiede in der Myostatin Sequenz zwischen verschiedenen Spezies sind vor allem in der Pro-Domäne zu erkennen. Der C-Terminus weist hingegen kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Arten auf.

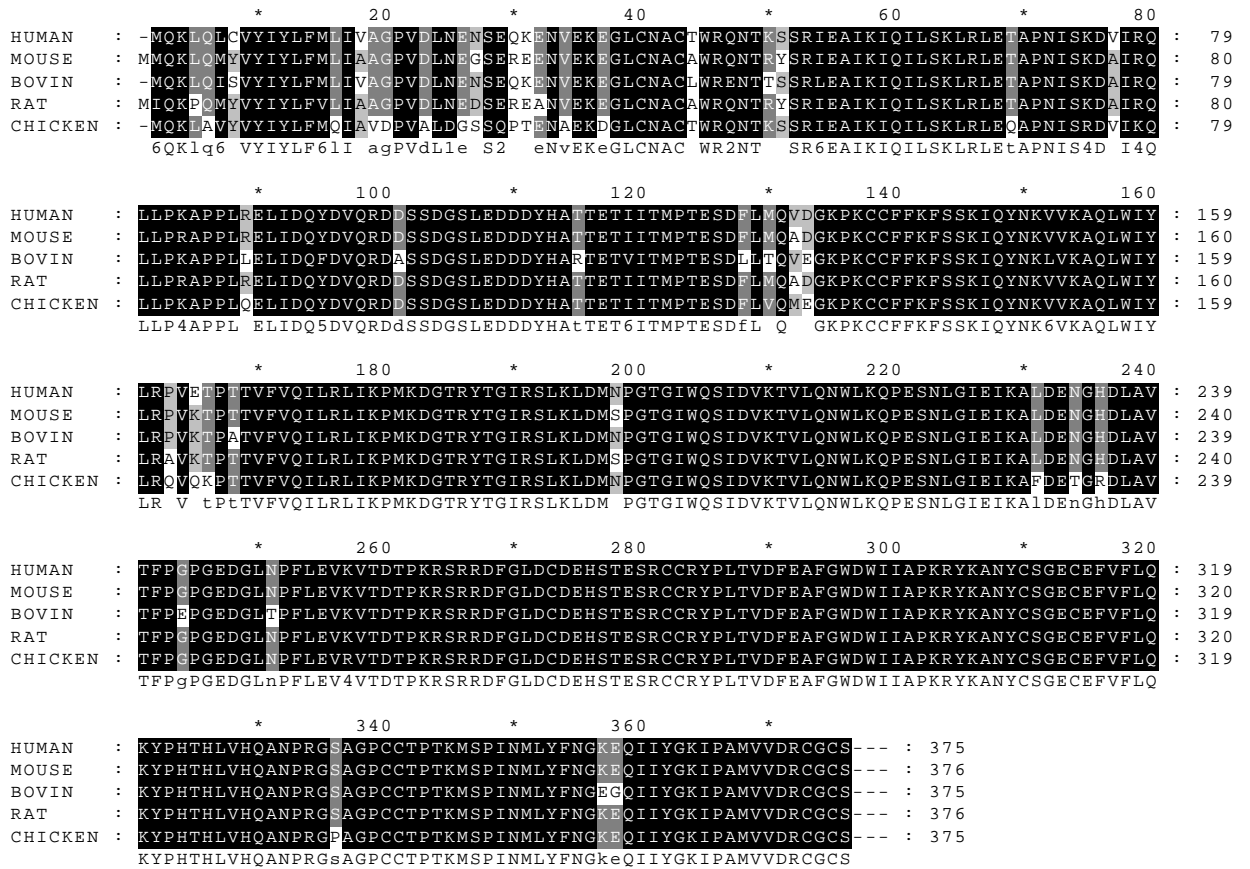


Abb. 6 Alignment verschiedener Myostatin Proteinsequenzen unterschiedlicher Spezies. **Schwarz** hinterlegt: 100% Übereinstimmung zwischen allen Spezies; **weiße Schrift grau hinterlegt**: Übereinstimmung zwischen 4 Spezies; **schwarze Schrift, grau hinterlegt**: Übereinstimmung zwischen 3 Spezies; keine Einfärbung: maximal 2 Spezies stimmen überein.

1.4. GDF-11

Ein weiteres Mitglied der TGF- β Familie ist GDF-11 und wurde zunächst bei Mäusen entdeckt (NAKASHIMA, TOYONO et al. 1999). Dieses Protein GDF-11 besitzt vor allem im C-Terminus eine Sequenzidentität von nahezu 90% zu GDF-8 (Myostatin). Trotz der starken Ähnlichkeit dieser beiden Proteine haben sie unterschiedliche Funktionen und werden an verschiedenen Orten exprimiert. GDF-11 ist ein negativer Regulator für das Wachstum der Nervenzellen und wird nicht in der Skelettmuskulatur gefunden (WU, IVKOVIC et al. 2003). Es wird davon ausgegangen, dass sich in der Evolution die beiden sehr ähnlichen Proteine relativ parallel entwickelt haben. Dafür spricht, dass bei Fischen zwei verschiedene Myostatin Gene gefunden wurden und bei ihnen Myostatin auch Funktionen in Nervenzellen übernimmt (ROBERTS & GOETZ 2001; RODGERS & WEBER 2001; BIGA, ROBERTS et al. 2005; KERR, ROALSON et al. 2005).

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Gerätschaften

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden – sofern nicht anders angegeben – in reinster Qualität (*per analysi*) von folgenden Firmen bezogen:

- Merck KGaA / Darmstadt
- VWR / Darmstadt
- Sigma – Aldrich / Schnelldorf
- Serva / Heidelberg
- Boehringer Mannheim
- Roth / Karlsruhe
- Thermo Fisher Scientific / Waltham, MA, USA
- BioRad / München
- Dianova / Hamburg
- BioFX / Owings Mills, MD, USA
- GE Healthcare Europe GmbH / München

Das verwendete Wasser war Reinstwasser mit einer elektrischen Leitfähigkeit von maximal 0,055 $\mu\text{S} / \text{cm}$, welches durch Ionenaustausch mit anschließender Ultrafiltration und UV-Entkeimung erzeugt wurde.

Die Verbrauchsmaterialien wurden – sofern nicht anders angegeben – von folgenden Firmen bezogen:

- Eppendorf / Hamburg
- Greiner / Frickenhausen
- Nunc / Wiesbaden
- GE Healthcare Europe GmbH / München
- Sartorius / Göttingen
- Roth / Karlsruhe

Die verwendeten Geräte wurden – sofern nicht anders angegeben – von den folgenden Herstellern erworben:

- IKA / Staufen
- Hettich / Schramberg
- Heraeus / Hanau
- Hof Sonderanlagen / Lohra
- Eppendorf / Hamburg
- Gilson / Middleton, WI, USA
- Heidolph Instruments / Schwabach
- Sartorius / Göttingen
- Dynex / Chantilly, VA, USA
- Tecan Group AG / Männedorf, Schweiz

In dieser Dissertation wurden folgende Programme / Herstellerangabe verwendet:

- Office 2003 / Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Adobe Photoshop CS / Adobe Systems, San Jose, CA, USA
- Adobe ImageReady CS / Adobe Systems, San Jose, CA, USA
- easyWIN fitting V6.0 / Tecan Group AG , Männedorf, Schweiz
- Revelation 4.2.2 / Dynex, Chantilly, VA, USA
- KC4 2.5 #17 / BioTek Instruments, Winooski, VE, USA

2.2. Quantifizierung des Gesamtproteinanteils in Lösungen

2.2.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Zur schnellen Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (BRADFORD 1976). Hierzu wird in eine Mikrotiterplatte 10 μ l Standard (human IgG im Konzentrationsbereich von 0 bis 1 mg / ml in PBS), bzw. 10 μ l Probe in Doppelwerten pipettiert.

Anschließend wurden 200 μ l Bradfordreagenz zugegeben, 5 min schüttelnd inkubiert und dann im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer (SpectraMini®, Fa. Tecan) bei $\lambda = 620$ nm gemessen. Die resultierenden optischen Dichten konnten anhand der Standarddeichkurve computergestützt ausgewertet werden.

Bradfordreagenz (BRADFORD 1976)

Coomassie Brill. Blue R-250®	0,1 g
Phosphorsäure (85%)	100,0 ml
Ethanol (95%)	50,0 ml
Reinstwasser	ad 1000,0 ml

2.2.2 Proteinbestimmung mittels Spektralphotometrie

Eine weitere Möglichkeit, den Gesamtproteinanteil in einer Lösung zu bestimmen, ist die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. Anhand einer mitgeführten Eichreihe von Proteinlösungen definierter Konzentrationen kann sehr sensitiv die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt werden.

2.3. Proteinfällungsmethoden

2.3.1 TCA – Fällung

Zu 1 ml einer zu fällenden Proteinlösung wurden 250 µl 50% Trichloressigsäure sowie 10 µl einer 10%igen Triton X100® - Lösung gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Nach 15min Zentrifugation bei 21500 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut 15 min bei 21500 x g und 4°C zentrifugiert.

2.3.2 Ethanolische Fällung

Zu 1ml einer Proteinlösung wurden 2ml 96% Ethanol gegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 21500 x g und 4°C wurde das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und 15 min bei 21500 x g und 4°C zentrifugiert.

2.4. Extraktion von Proteinen aus Muskel

2.4.1 Proteinextraktion aus Muskulatur nach BAUMANN

Zu 2,05 g gefrorenem Muskelpulver wurden 10 ml eiskalter Aufschlußpuffer gegeben und 15 min auf Eis mit einem Ultraschallfinger sonifiziert (Amplitude 80%, Cycle 0,8). Der Muskelextrakt wurde danach bei 21500 x g und 4°C 30 min zentrifugiert. Der Überstand (17 ml) wurde abgenommen und auf zwei 15 ml Gefäße á 8,5 ml verteilt. Zu den Überständen wurde je 1,5 ml Delipidierungsreagenz (Fa. Immundiagnostik) gegeben; für 10 min inkubiert und anschließend 20 min bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und in Zentrifugenfiltrationseinheiten (Amicon®, Fa. Millipore) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa überführt und in PBS umgepuffert. Die Überstände der Umpufferung wurden anschließend steril filtriert und bis zur Verwendung in den entsprechenden Versuchen bei -20°C gelagert.

„Baumann“ – Puffer (BAUMANN, IBEUNJO et al. 2003)

Tris – HCl	0,79	g
EDTA	0,02	g
NP-40	0,2	ml
Triton X-100	0,1	ml
2-Mercapto-Ethanol	0,05	ml
Natriumvanadat	0,02	g
Benzamidin	0,0783	g
6-Aminocaprinsäure	1,812	g
PMSF	0,01742	g
Reinstwasser	ad 100	ml
pH 7,4		

2.4.2 Proteinextraktion aus Muskulatur nach KAWADA

Für die Proteinextraktion nach KAWADA (KAWADA, TACHI et al. 2001) wurde gemahlendes Muskelpulver in flüssigem Stickstoff heruntergekühlt und mit „Kawada“ – Puffer versetzt (7 v/w). Mit einem Potter-Homogenisator wurde das Pulver zu einer Suspension verarbeitet, auf 95°C erhitzt und anschließend 20 Minuten bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

„Kawada“ - Puffer

Tris 1 M	1,0	ml
EDTA 0,5 M	0,4	ml
NaCl 5 M	3,0	ml
SDS 0,1%	10,0	ml
Reinstwasser	ad 100,0	ml
Benzamidin-HCl	5	mM
6-Aminocaprinsäure	100	mM
PMSF	1	mM
pH 7,0		

2.4.3 Proteinextraktion aus Muskulatur nach MENDLER

Die Proteinextraktion nach MENDLER (MENDLER, ZADOR et al. 2000) wurde in zwei Phasen durchgeführt. Zunächst wurde tiefgekühlte, pulverisierte Muskulatur in Extraktionspuffer 1 (7 v/w) aufgenommen und mit Hilfe eines Potter-Homogenisators zu einer Suspension verarbeitet, welche dann filtriert und 8 Minuten bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in Extraktionspuffer 2 überführt, noch einmal im Potter-Homogenisator homogenisiert und anschließend abzentrifugiert. Die beiden Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Extraktionspuffer 1 (pH 7,5)

HEPES	10	mM
KCl	5	mM
MgCl	10	mM
Mercaptoethanol	5	mM
Saccharose	0,32	M
Proteaseinhibitoren		
Leupeptin	0,2	µg / ml
Aprotinin	0,2	µg / ml

Extraktionspuffer 2 (pH 7,9)

HEPES	20	mM
NaCl	0,42	M
EDTA	1	mM
DTT	2	mM
Glycerin	25	%

2.4.4 Proteinextraktion aus Muskulatur nach SAKUMA

Für die Extraktion von Muskelproteinen nach SAKUMA (SAKUMA, WATANABE ET AL. 2000) wurde in flüssigem Stickstoff gefrorenes Muskelpulver verwendet, welches mit Hilfe eines Potter-Homogenisators unter Zugabe von „Sakuma“-Puffer zu einer Suspension verarbeitet wurde. Hierbei diente der Potter-Homogenisator dazu, die Zellen aufzubrechen. Aufgrund der starken Reibung bei diesem Vorgang war darauf zu achten, dass die Homogenisationsapparatur stets gekühlt wurde. Nach 25 Minuten Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

„Sakuma“ – Puffer

EDTA	5,0	mM
Tris (base)	50	mM
NP-40	0,2	%
Triton X-100	0,1	%
Mercaptoethanol	0,05	%
pH 7,4		
Proteinaseinhibitoren		
PMSF	10	µg / ml
Leupeptin	0,2	µg / ml
Aprotinin	0,2	µg / ml
Na ₃ VO ₄	1	mM

2.5. Proteinnachweise und elektrophoretische Methoden

2.5.1 SDS – Gelelektrophorese nach (LAEMMLI 1970)

Die SDS Gelelektrophorese wurde in miniVE™ Gelkammern der Fa. GE Healthcare durchgeführt. Die dafür verwendeten 12,5 % igen Trenngele und 4 % igen Sammelgele wurden nach den unten angegebenen Rezepten und Pipettierschemata angesetzt und in den jeweils benötigten Abmessungen gegossen.

Sammelgelpuffer pH 8,8

Tris Base	363,0	g
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Trenngelpuffer pH 6,8

Tris Base	30,0	g
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Probenpuffer

Sammelgelpuffer	2,5	ml
10% SDS Lösung	4,0	ml
Glycerol	5,0	ml
Bromphenolblau	2,0	mg

Elektrodenpuffer pH 8,5

Tris Base	3,0	g
Glycin	14,4	g
SDS	1,0	g
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

10% APS Lösung

Ammoniumperoxodisulfat	100,0	g
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

2.5.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen in SDS-Gelen erfolgte nach Modifikation (WINTGENS 2002) des Protokolls von (BLUM, BEIER et al. 1987) nach folgendem Schema:

Fixierlösung	1	h (oder länger)
Waschlösung 1	20	min (oder länger)
Reinstwasser	2 x 20	sec
Vorbehandlungslösung	1	min
Reinstwasser	3 x 20	sec
Färbelösung	20	min
Reinstwasser	2 x 20	sec
Entwicklungslösung		nach Sicht
Stopplösung	10	min

Wenn Gele verwendet wurden, welche dicker als 0,75 mm waren, so mussten die Waschschrte verlängert werden (mindestens 4 x 1 min). Vor allem bei Gradientengelen erwiesen sich verlängerte Waschzeiten als äußerst notwendig.

Fixierlösung

Methanol	500,0	ml
Eisessig	120,0	ml
Formaldehyd	0,5	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Waschlösung

Ethanol	500,0	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Vorbehandlungslösung

Natriumthiosulfatpentahydrat	0,05	g
Reinstwasser	ad 250,0	ml

Imprägnier- und Färbelösung

Silbernitrat	2,0	g
Formaldehyd	0,75	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Entwicklerlösung

Natriumcarbonat (wasserfrei)	30,0	g
Natriumthiosulfat (x5 H ₂ O)	2,0	mg
Formaldehyd (37%)	0,5	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Stopplösung

Methanol (96%)	500,0	ml
Essigsäure (99%)	120,0	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

2.5.3 „stains – all“ – Färbung von SDS – Gelen

Zur Färbung von Proteinen in SDS – Polyacrylamidgelen mittels STAINS-ALL wurden diese Gele nach der Elektrophorese 6 Stunden oder über Nacht in Fixierlösung inkubiert, um die Proteine im Polyacrylamidgel zu fixieren. Danach wurden sie mindestens 1 Stunde mit mehrfachem Lösungswechsel mit der Waschlösung gespült, um Essigsäurereste herauszuwaschen (Geruchsprobe!).

Nach Inkubation im Färbebad über Nacht im Dunkeln wurden die Gele unter Lichtabschluß mehrfach mit Reinstwasser abgespült und dann auf einem Leuchttisch entfärbt. Da der Farbstoff lichtempfindlich ist, entfärbt sich zunächst der „Hintergrund“ des Gels.

Da jedoch auch das Bandenmuster durch Licht entfärbt werden kann, muss dieses durch Scannen oder Fotokopieren dokumentiert werden. Die Färbung ist reversibel, sofern das Gel einen basischen pH aufweist. Daher sollte das Gel nach dem Waschen mit Reinstwasser kurz in 0,1 M NaOH geschwenkt werden, damit ein eventuell noch vorhandener saurer pH Wert vermieden wird.

„Stains-all“ Stammlösung

„Stains-All“	0,1	g
Formamid	50,0	ml

„Stains-all“ Färbelösung

Isopropanol	250,0	ml
3 M Tris, pH 8,8	5,0	ml
„Stains-All“-Stammlösung	50,0	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Fixierer für „Stains-All“

Methanol	500,0	ml
Essigsäure (99%)	70,0	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Waschlösung für „Stains-all“

Methanol	500,0	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

2.5.4 Coomassie® Färbung

Wenn Proteinbanden nach einer Proteingelelektrophorese sichtbar gemacht werden sollen, so ist die Anfärbung mit Coomassie® Brilliantblau G250 eine schnelle und zuverlässige Methode. Der Farbstoff aus der Triphenylmethan Gruppe lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt damit die Proteine unspezifisch.

Es kamen in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung. Für die Sichtbarmachung von Proteinen auf PVDF-Membranen nach einem Western-Blot wird eine Methode unter Verwendung von Essigsäure und organischen Lösungsmitteln verwendet, welche genauer unter Abschnitt 2.6 beschrieben wird.

2.5.5 Kolloidale Coomassie® Färbung

Zur Anfärbung von Proteinen nach Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese kann ein Verfahren verwendet werden, bei welchem der Farbstoff zunächst gereinigt wird und dann als kolloidale Coomassie®-Lösung für die Färbung der Proteine verwendet werden kann (NEUHOFF, STAMM et al. 1990). Hierzu werden 10 g Coomassie® Brilliantblau G250 in 500 ml 12,5% Essigsäure gegeben, unter Rühren auf 70°C erwärmt und dann 150 g Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) langsam eingerührt. Nach Erkalten der Lösung wird diese durch einen Faltenfilter filtriert. Die verbleibenden Farbpartikel im Filter werden zunächst mit etwa 30 ml 0,1 M Tris pH6,5, dann mit 15 ml 20% Methanol und anschließend mit 20% (NH₄)₂SO₄-Lösung gewaschen. Das so präparierte kolloidale Coomassie® kann nun vorsichtig vom Faltenfilter in eine 20% (NH₄)₂SO₄-Lösung überführt werden.

kolloidale Coomassie®-Färbelösung

kolloidales Coomassie	0,1	g
Ortho-Phosphorsäure 85%	2,0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,0	g
Methanol	20,0	ml
Reinstwasser	ad 100,0	ml

Für die Anfärbung von Gelen oder Membranen mit kolloidaler Coomassie®-Färbelösung müssen die Proteine zunächst mindestens 2 Stunden mit dem unter Abschnitt 2.5.2 beschriebenen Silberlösungs-Fixierer fixiert werden. Die Anfärbung der Proteine mit der kolloidalen Lösung erfolgt nach Sicht innerhalb von mindestens 2 Stunden.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber der konventionellen Coomassie®-Färbung ist, dass hierbei der Gel-Hintergrund kaum angefärbt wird und somit ein zeitaufwändiger Entfärbungsschritt entfällt.

2.5.6 „dot-Blot“

Zum schnellen Nachweis, ob ein Antikörper ein bestimmtes Protein erkennt, und zur Überprüfung, ob sich der etwas aufwändigere Western Blot lohnt, kann vorab ein so genannter „dot-Blot“ durchgeführt werden. Hierfür wurden 2 µl einer Proteinlösung auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft und kurz gewartet, bis diese etwas getrocknet war und dann der Vorgang bis zu 5-mal wiederholt. Nach Blockieren der freien Bindungsstellen der Membran mit Sättigungslösung erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem primären Antikörper. Der sekundäre Antikörper wurde nach mehrmaligem Waschen der Membran mit PBS eine Stunde mit der Nitrozellulosemembran inkubiert, nicht gebundenes Antikörpermaterial wurde dann ebenfalls abgewaschen. Dieser Zweitantikörper konnte aufgrund seiner Peroxidase-Markierung mit TMB oder DAB (siehe Kapitel 2.5.7) sichtbar gemacht werden.

2.5.7 Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese auf Nitrozellulose Membranen (Protran®, Fa. Schleicher und Schüll) mittels des Western-Blot Verfahrens transferiert. Hierzu wurde in einer Western-Blot Kammer (*semi-wet*-Verfahren) auf der Kathodenseite („-“) das Gel platziert und auf der Anodenseite („+“) die Membran. Zur Fixierung von Gel und Membran in der Kammer wurde eine ausreichende Zahl Schwämme in diese gesteckt. Durch dieses Schichtungsverfahren war die Durchführung von 2 parallelen Elektrotransfers möglich, wenn zwischen die beiden Gel/Membran – Stapel mindestens ein Schwamm gelegt wurde.

Die Transferbedingungen betragen 25 V und 300 mA bei einer Transferzeit von 1h.

Zur Kontrolle des Elektrotransfers auf die Membran wurde eine Ponceau – Färbung durchgeführt. Hierzu wurde die Membran 1h in Ponceau Färbelösung geschwenkt und anschließend mit Reinstwasser bis zur Sichtbarkeit der Banden entfärbt.

Nach digitaler Dokumentation der gefärbten Membran wurde diese 1h in Sättigungslösung zur Blockierung aller freien Bindungsstellen inkubiert, mehrmals mit PBS abgespült und dann über Nacht mit dem entsprechenden Primärantikörper gekühlt (2 – 8°C) geschüttelt. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurde die Membran in einer Lösung mit dem entsprechenden mit Peroxidase markierten Sekundärantikörper 1h bei Raumtemperatur geschwenkt, mit PBS nachgespült und die Proteinbanden mit einem Farbreagenz sichtbar gemacht.

Als Farbreagenz im Western Blot wurde entweder *TMB one component HRP membrane substrate* der Fa. BioFX verwendet oder aber *DAB two component HRP membrane substrate*, ebenfalls Fa. BioFX.

Blotting Puffer

Tris Base	3,0	g
Glycin	14,4	g
Methanol	200,0	ml
0,1% SDS-Lösung	1,0	ml
Reinstwasser	1000,0	ml

Ponceau – Färbelösung

Ponceau S	5,0	g
Essigsäure (99%)	10,0	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Sättigungslösung

Magermilchpulver	50,0	g
PBS	ad 1000,0	ml

2.6. Proteinsequenzierung

Zur Sequenzierung von Proteinen müssen diese zunächst elektrophoretisch im Gel aufgetrennt werden. Der Elektrotransfer mittels Western Blot muss hier jedoch auf eine PVDF-Membran erfolgen, da eine Sequenzierung von Proteinen, die auf Nitrozellulosemembranen gebundenen sind, nicht möglich ist. Vor dem Elektrotransfer der Proteine auf die Membran wurde diese zunächst in absolutem Methanol 1 min aktiviert und anschließend 2 min in Wasser geschwenkt, um überschüssiges Methanol abzuwaschen. Nach 3 min Äquilibration in Transferpuffer konnte die Membran wie unter Abschnitt 2.5.7 beschrieben im Blot eingesetzt werden.

Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, kann bei PVDF-Membranen keine Ponceau-Färbung angewandt werden. Daher war es notwendig, die Membran

über Nacht mit Coomassie-Färbelösung zu färben und daran anschließend mit Entfärbelösung bis zur Sichtbarwerdung der einzelnen Proteinbanden zu entfärben.

Coomassie – Färbelösung für Sequenzierblot

Coomassie Brilliant Blue R-250®	2,5	g
Methanol	454,0	ml
Essigsäure (99%)	92,0	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Entfärbe-Lösung für Sequenzierblot

Methanol	300,0	ml
Essigsäure (99%)	100,0	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

Die Proteinsequenzierungen wurden durchgeführt am Institut für Peptidforschung, IPF PharmaCeuticals GmbH, Hannover, in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Markus Meyer.

2.7. Chromatographische Verfahren

2.7.1 Gelfiltrationschromatographie

Zur Auftrennung von Molekülen nach ihrer Größe wird in der Regel die Gelfiltrationschromatographie, auch Größenausschlusschromatographie genannt, verwendet. Dieses Trennverfahren beruht darauf, dass kleinere Moleküle besser in die Poren des Säulenmaterials hinein diffundieren können und somit deren Flussgeschwindigkeit in der Säule geringer ist als die der größeren Moleküle. Daher eluieren die größeren Moleküle schneller aus der Säule und können somit von den kleineren Bestandteilen der Lösung getrennt werden. Durch Wahl unterschiedlicher Säulenmaterialien, verschiedener Puffer

sowie Veränderungen in der Flussgeschwindigkeit des Laufpuffers kann der Trennbereich erheblich variiert werden. Sofern nicht anders angegeben, betrug die Fließgeschwindigkeit 0,5 ml / ml, und als Säulenmatrix wurde Sepharose 6B verwendet.

Laufpuffer für Sepharose 6B pH 7.6

NaCl	8,766	g
Tris (base)	2,42	g
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

HEFTI – Puffer(Hefiti 1982) pH 7.0

Na ₂ HPO ₃ x 2H ₂ O	14,2	g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	11,0	g
NaCl	37,0	g
Ethanol (abs.)	200,0	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml

2.7.2 Affinitätschromatographie

2.7.2.1 Ni²⁺ - Chelat Säule

Zur Aufreinigung von His⁶-markiertem Myostatin wurde eine Ni²⁺-Chelat-Säule (*HiTrap™ chelating HP 1 ml; GE Healthcare*) verwendet. Bei diesem Reinigungsverfahren wird ausgenutzt, dass Nickel, welches in einem Chelatkomplex an die Säulenmatrix gebunden ist, zwei freie Valenzen besitzt und damit die freien Elektronen des Stickstoffs zweier Histidine binden kann. Die Elution erfolgte durch Verdrängung der Histidine durch Imidazol. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml / min. Zunächst wurden 0,5 ml einer 0,1 M NiSO₄ Lösung auf die Säule aufgetragen und anschließend mit 10 ml Ni²⁺-Chelat-Waschpuffer gewaschen. Bereits dem Ni²⁺-Chelat-Waschpuffer wurden geringe Mengen an Imidazol zugefügt, da nach Herstellerangaben

insbesondere bei His6-markierten Proteinen die Effektivität der Reinigung dadurch gesteigert werden kann. Die Elution wurde mit 5 ml Ni²⁺-Chelat-Elutionspuffer durchgeführt.

Ni²⁺-Chelat-Waschpuffer (pH 7,4)

Na ₂ HPO ₄	3,56	g
NaCl	29,22	g
Imidazol	0,68	g
Reinstwasser	ad 1000,00	ml

Ni²⁺-Chelat-Elutionspuffer (pH 7,4)

Na ₂ HPO ₄	3,56	g
NaCl	29,22	g
Imidazol	34,04	g
Reinstwasser	ad 1000,00	ml

2.7.2.2 HiTrap™ NHS-activated HP

Zur Kopplung von Antikörpern oder Antigenen an Säulen eignen sich besonders gut Säulen, deren Matrix aktivierte NHS-Gruppen trägt, wodurch eine Bindung mit den Proteinen eingegangen werden kann. Im vorliegenden Fall wurden dafür Säulen der *Fa. Amersham Biosciences* verwendet. Es handelte sich um *HiTrap NHS-activated HP* – Säulen mit 1 ml oder 5 ml Volumen. Die Säulenmatrix besteht hierbei aus einer hochgradig vernetzten sphärischen 6%igen Agarose mit einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 34 µm. Zur Kopplung von Proteinen, insbesondere Antikörpern, wurden die Liganden mit einer Konzentration von 10 mg / ml in NHS-Kopplungspuffer umgepuffert, die Säule mit eiskalter 1 mM HCl aktiviert und sofort im Anschluss die Ligandenlösung aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 25°C wurde die Reaktion mit 6 Säulenvolumen NHS-Inaktivierungspuffer gestoppt und sofort mit weiteren 6 Säulenvolumen NHS-Waschpuffer gespült. Mehrmalige wechselnde Waschzyklen mit den beiden Puffern verhinderten

fehlerhafte Vernetzungen und Rückstände von ungebundenen Liganden. Zur Aufbewahrung wurden 3 Säulenvolumina NHS-Aufbewahrungslösung verwendet, welche vor Verwendung mit NHS-Laufpuffer herausgepült werden mussten.

Zur Aufreinigung von Antigenen über eine Antikörper-gekoppelte NHS-Säule wurde diese zunächst mit 10 Säulenvolumina NHS-Laufpuffer gewaschen. Die sterilfiltrierte Antigenlösung, welche zuvor in den NHS-Laufpuffer umgepuffert worden war, wurde in ständiger Zirkulation über Nacht bei 2-8°C und einer Flussrate von 0,5 ml / min auf der Säule inkubiert um eine möglichst vollständige Bindung zu gewährleisten. Nach Waschen mit 5 Säulenvolumina NHS-Laufpuffer konnten die gebundenen Proteine mit 3 Volumina NHS-Elutionspuffer eluiert und ihre Konzentration mit Hilfe einer Proteinbestimmung nach BRADFORD bestimmt werden.

NHS-Kopplungspuffer

NaHCO ₃	0,2	M
NaCl	0,5	M
pH 8,3		

NHS-Inaktivierungspuffer

Ethanolamin	0,5	M
NaCl	0,5	M
pH 8,3		

NHS-Waschpuffer

Natriumacetat	0,1	M
Essigsäure	0,1	M
pH 4,0		

NHS-Aufbewahrungslösung

Na ₂ HPO ₄	0,05	M
NaN ₃	0,1	%
pH 7,0		

NHS-Laufpuffer

TrisHCl	50	mM
pH 7,4		

NHS-Elutionspuffer

Glycin	0,1	M
pH 3,0		

2.7.2.3 Affinitätschromatographie mit Protein G

Zur Aufreinigung von Antikörpern aus Serum eignet sich Sepharose, an welche Protein G oder Protein A gekoppelt ist. Je nach Spezies und Antikörpersubklasse bieten die beiden Proteine, welche bakteriellen Ursprungs sind, unterschiedliche Affinitäten und damit Aufreinigungsausbeuten. In dieser Arbeit wurden zur Aufreinigung von Antikörpern der Klasse IgG aus Kaninchenserum und von monoklonalen Maus-Antikörpern der Klasse IgG aus Zellkulturüberstand Protein G Säulen der Firma *Amersham Bioscience* verwendet (HiTrap™ Protein G HP), welche den Vorteil bieten, dass bei diesem Protein G, welches an die Sepharose der Säule gekoppelt wurde, die Bindungsstelle für Albumin herauscloniert wurde und somit das Serumalbumin bei der Extraktion der Antikörper aus Albuminhaltigen Lösungen keinen Störfaktor darstellt. Die Aufreinigung von Seren und Zellkulturüberständen erfolgte nach Herstellerangaben.

2.8. Enzymatischer Verdau mit *Furin*

Proteine können mit Hilfe von bestimmten Enzymen gespalten werden. Myostatin besitzt eine spezifische Schnittstelle mit der Aminosäureabfolge RSRR direkt am C-Terminus des Propeptids. Das Enzym, welches *in vivo* die Spaltung von Propeptid und biologisch aktivem Myostatin bewirkt, ist bislang nicht bekannt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass es sich bei diesem Enzym um Furin handelt oder aber um ein Protein, welches dem Furin sehr ähnlich ist. Die minimale Schnittstelle für Furin ist Arg – X – X – Arg, wobei das Protein eine Schnittstelle der Form Arg – X – (Lys / Arg) – Arg bevorzugt.

Zum enzymatischen Verdau von Myostatin wurden 3,4 µg rekombinantes Protein mit 6 Units Furin über Nacht in 15 µl Furin-Reaktionspuffer bei 30°C inkubiert und anschließend auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

Furin – Reaktionspuffer

HEPES	0,1	M
Triton X-100	0,5	%
CaCl ₂	1,0	mM
Mercaptoethanol	1,0	mM
pH 7,5		

2.9. Kopplungsverfahren an Proteine

An Proteine können die unterschiedlichsten Moleküle gekoppelt werden. Zum einen erhalten Proteine durch die Kopplung an andere, deutlich größere Moleküle eine andere Struktur, welches die Antigenizität des markierten Proteins erhöhen kann, und zum anderen können solche Moleküle Markierungen darstellen, welche beispielsweise durch enzymatische Reaktionen eine optische Sichtbarmachung ermöglichen.

2.9.1 Biotinylierung von Proteinen

Die Kopplung von Biotin an ein Protein stellt eine gängige Methode dar, um Proteine zu markieren. Durch kommerziell erhältliche Antikörper gegen Biotin ist es daher kostengünstig möglich, Proteine, welche eine solche Markierung tragen, zu detektieren, ohne einen spezifischen Antikörper gegen dieses Protein zu haben.

Hierzu wird in einem 0,1 M Natriumboratpuffer pH 8,8 eine Proteinkonzentration von etwa 1 bis 3 mg / ml eingestellt. Eine Lösung von 10 mg / ml N-Hydroxysuccinimid-Biotin in DMSO wird dann mit dieser Proteinlösung in einem Verhältnis von 25 µg Biotin-Ester pro Milligramm Protein mit diesem vermischt und über Nacht bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Zum Abstoppen des Vorganges wird der Reaktionsansatz mit 10 µl einer 1M NH₄Cl – Lösung versetzt und in PBS umgepuffert.

2.9.2 KLH Kopplung

Bei KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) handelt es sich um ein etwa 400 kDa großes Protein, welches eine Struktur besitzt, die zu der von Säugetierproteinen vollkommen unterschiedlich ist. Durch die Kopplung von KLH an ein Antigen ist es daher meist möglich, eine Immunantwort zu erreichen, auch wenn es sich bei diesem Antigen um ein Protein handelt, dessen Sequenz denjenigen Proteinen im tierischen Organismus sehr stark gleicht.

Zur Kopplung von rekombinantem Myostatin an KLH wurden 2 mg des Antigens zunächst in 1,25 ml 0,1 M NaHCO₃ + 0,5 M NaCl pH 8,3 umgepuffert. Nach Zugabe zu 1 ml einer Lösung von KLH in einer Konzentration von 5,7 mg / ml wurde das Gemisch mit 250 µl einer 1 µmol DSS-Lösung (gelöst in DMF) vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln wurde die Reaktion durch umpuffern über eine PD10-Säule in 0,1 M NaHCO₃ + 0,5 M NaCl + 10% DMF gestoppt. Nach Dialyse gegen Wasser wurde die Proteinkonzentration bestimmt und das gekoppelte Protein gefriergetrocknet.

2.10.3 Anfertigung von Schnitten

Für nachfolgende Untersuchungen wurden von den Gewebestücken auf einem Rotationsmikrotom (RM2035, Fa. Leica) Schnitte von 10 µm Dicke angefertigt.

2.10.4 Entparaffinierung

Das sogenannte „Herabführen“ erfolgte in folgenden Reihen:

Rotihistol®	2 x 15 – 30 min (50°C)
Isopropanol	2 x 5 min
Alkoholreihe (3 min)	96%, 70%; 50%;

Nach dem Entparaffinieren der Schnitte wurden die Objektträger 4 mal 10 Minuten schüttelnd in PBS inkubiert, anschließend vorsichtig um den Schnitt herum abgetupft und mit einem DAKO – Pen ® umrandet, um den Antikörperverbrauch zu minimieren. Auf die Schnitte wurden nun 10% Ziegennormalserum in PBS aufgetropft und 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert und danach wieder abgeschlagen. Die in PBS / 2% BSA verdünnten Primärantikörper wurden aufgetragen und 24 h bei 2 - 8°C in einer feuchten Kammer auf dem Schnitt belassen. Nachdem die Schnitte 4 x 10 min mit PBS gewaschen wurden, wurde der Cy3-markierte Sekundärantikörper 1 : 200 in PBS / 2% BSA aufgetragen, 2 h bei RT inkubiert, 2 x gespült, danach eine DAPI-Gegenfärbung durchgeführt und anschließend wieder gespült. Nach dem Eindeckeln konnten die Schnitte nun unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

2.11. Immunisierung von Hühnern

Aufgrund der großen phylogenetischen Distanz zwischen *Aves* und *Mammalia* kann es häufig Unterschiede zwischen den Antikörpern aus Hühnereiern (IgY – Fraktion) und denen aus Säugetieren (IgG – Fraktion) geben, welche für die Entwicklung eines Immunassays von Bedeutung sein können. Da sie weder das Komplementsystem aktivieren, noch mit humanen Rheumafaktoren reagieren, kann unter Umständen ein geringeres Hintergrundrauschen auftreten. Falsch positive oder falsch negative Ergebnisse bei Patienten mit einem hohen Rheumafaktortiter können dadurch minimiert werden (LARSSON, BALOW ET AL. 1993). Außerdem können sie unter Umständen niedrigere oder höhere Spezifitäten als herkömmliche Kaninchen- oder Mausantikörper aufweisen und für einzelne Nachweise günstiger sein.

Die Aufreinigung von IgY aus Hühnereiern ist zudem eine einfache und kostengünstige Methode, Antikörper zu gewinnen.

Die Grundimmunisierung der Hühner (Zuchtform „*White Leghorn*“) wurde unter Verwendung von 100 µg Antigen gelöst in 200 µl PBS, welches mit 100 µl ABM-ZK (Fa. Linaris) emulgiert wurde, durchgeführt. Die Emulsion wurde an verschiedenen Stellen in den *musculus pectoralis major* (großer Brustmuskel) injiziert.

Die erste Boosterinjektion wurde 6 Wochen später durchgeführt. Dafür wurden 200 µg Antigen in 200 µl PBS gelöst und mit 100 µl ABM-N (Fa. Linaris) emulgiert und wiederum mehrfach in den *musculus pectoralis major* injiziert.

Die zweite Boosterung erfolgte 14 Wochen nach der Grundimmunisierung mit 100 µl Antigen in 200 µl PBS und 100 µl ABM-N. In einem Abstand von etwa 8 bis 12 Wochen wurde diese Immunisierung wiederholt.

Ab Tag 0 der Immunisierungszeit (Prä-Immun-Ei) wurden die Eier gesammelt und bei 2-8°C gelagert.

2.11.1 Antikörpergewinnung aus Eidotter

Zur Isolierung der Antikörper aus dem Eidotter werden diese „nach Hausfrauenart“ zunächst vom Eiklar getrennt. Nach Entfernung der Dotterhaut wird der Dotter 1 : 10 (v/v) in Reinstwasser verdünnt und auf einem Magnetrührer homogenisiert, der pH Wert mit 0,1 M HCl auf pH 5,0 eingestellt und über Nacht bei 2-8°C ohne weitere Verwirbelung inkubiert. Bei dieser Inkubation bilden sich zwei Phasen. Die obere wässrige Phase wird vorsichtig dekantiert und damit von der unteren Phase, in der sich Lipide und Lipoproteine befinden, abgetrennt.

Der pH Wert der wässrigen Phase wird mit 0,1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt, und zu 6 Teilen dieser Lösung werden langsam unter stetigem Rühren 4 Teile gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Lösung gegeben. Nach der Zugabe des gesamten Volumens der Ammoniumsulfatlösung wird ohne weiteres Rühren bei 2-8°C über Nacht inkubiert. Die Lösung wird 60 min bei 3000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in PBS + 0,1% NaN_3 gelöst.

2.12. Immunisierung von Kaninchen

Die Immunisierung von so genannten „Stallhasen“ (Zuchtform „*Deutsche Widder*“) ist eine gängige Methode, um in relativ kurzer Zeit mit geringem Kostenaufwand genügend Antiserum zu gewinnen.

Die Grundimmunisierung wurde unter Verwendung von 150 µg Antigen gelöst in 150 µl PBS, welches mit 100 µl ABM-ZK (Fa. Linaris) emulgiert wurde, durchgeführt. Die Emulsion wurde an verschiedenen Stellen subcutan injiziert.

Die erste Boosterung wurde 6 Wochen später durchgeführt. Dafür wurden 200 µg Antigen in 200 µl PBS gelöst und mit 100 µl ABM-N (Fa. Linaris) emulgiert und wiederum mehrfach subcutan injiziert.

Die zweite Boosterung erfolgte 14 Wochen nach der Grundimmunisierung mit 200 µl Antigen in 200 µl PBS und 100 µl ABM-N. In einem Abstand von etwa 8 bis 12 Wochen wurde diese Immunisierung wiederholt.

Vor der Grundimmunisierung wurde den Tieren etwa 3 ml Serum entnommen (Prä-Immun-Serum; PIS). Etwa 14 bis 18 Tage nach jeder Immunisierung wurde den Tieren etwa 10 ml Serum abgenommen und der Antikörpertiter bestimmt.

2.13. Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Monoklonale Antikörper, also Antikörper, die auf einen B-Lymphozyten zurückgehen und ein einziges Epitop erkennen, bieten den Vorteil, dass sie meist eine hohe Spezifität zu ihrem Antigen haben.

2.13.1 Immunisierung von Mäusen

Es wurden *Balb/C* Mäuse verwendet, welchen gereinigtes, rekombinantes Myostatin, bzw. gereinigtes, KLH-gekoppeltes Myostatin injiziert wurde. Um eine stärkere Immungenität zu erreichen, wurde das Antigen zuvor mit ABM-S (Fa. Linaris) vermischt. Die Immunisierung erfolgte 4 x im Abstand von etwa 3 Wochen mit etwa 100 µg Antigen. Die letzte Immunisierung fand 4 Tage vor Entnahme der Milzzellen statt.

2.13.2 Fusionierung von Milzzellen

Durch die Fusion von Myelomazellen mit den B-Zellen der Milz werden so genannte Hybridomzellen gewonnen, welche die Eigenschaften der Myelomazellen sowie der B-Zellen in sich vereinigen. Bei den Myelomazellen handelte es sich um *P3 X 63 Ag8.653* – Zellen (Ag8-Zellen), welche einige Tage vor der Fusionierung in Azaguanin Medium gehalten wurden. Für die Fusionierung wurden pro Milz etwa 4×10^7 Ag8 - Zellen benötigt. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen herauspräpariert und in eine Petrischale mit 5 ml Normalmedium und 0,5 ml 10% Glucose gegeben. Die gesamte Milz wurde durch ein Netz aus Nylongaze mit einer Porengröße von 100 µm gedrückt, die erhaltene Zellsuspension mehrmals aufsuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1500 x g

5 Minuten pelletiert und das erhaltene Zellpellet 3 x mit 20 ml RPMI-Medium (ohne FCS Zusatz) gewaschen. Beim 3. Waschgang wurden zu diesem Zellpellet die Myelomazellen hinzu gegeben, vorsichtig resuspendiert und wieder zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde langsam innerhalb von 1 Minute 1 ml 50% PEG 1500 zugefügt und dabei vorsichtig gerührt, damit sich keine Klumpen bilden konnten. Nach 2 Minuten wurde langsam 15 ml RPMI-Medium (ohne FCS-Zusatz) hinzugegeben und daran anschließend mit 20 ml Normalmedium aufgefüllt. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1500 x g wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100 ml RPMI-Medium mit 5% FCS und 20000 Einheiten IL-6 aufgenommen. Die frisch fusionierten Zellen wurden á 0,5 ml auf 8 makrophagenhaltige Costar™ 24-Loch-Platten verteilt und 1 Tag im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dieser 20- bis 24-stündigen Ruhephase wurde 1 ml 2x HAT-Selektionsmedium in jede Vertiefung gegeben. Das Selektionsmedium wurde alle 4 Tage gewechselt, und nachdem alle nicht fusionierten Myelomazellen und B-Zellen abgestorben waren, wurde nach 14 Tagen anstelle von HAT Medium zur weiteren Aufzucht der Hybridomzellen nur noch HT-Medium verwendet.

Normalmedium

RPMI 1640 Hepes	500,0	ml
fötale Kälberserum	55,0	ml
200 mM L-Glutamin	5,5	ml
Kanamycin	5,5	ml

2x HAT-Selektionsmedium

Normalmedium	571,5	ml
HT-Stocklösung	11,0	ml
Aminopterin-Lösung	11,0	ml

1x HAT-Selektionsmedium

Normalmedium	571,5	ml
HT-Stocklösung	5,5	ml
Aminopterin-Lösung	5,5	ml

HT-Medium

Normalmedium	571,5	ml
HT-Stocklösung	5,5	ml

HT-Stocklösung

Hypoxanthin	$1,0 \times 10^{-2}$	M
Thymidin	$1,6 \times 10^{-3}$	M

gelöst in Reinstwasser

Aminopterin-Lösung

Aminopterin	$4,0 \times 10^{-5}$	M
-------------	----------------------	---

2.13.3 Herstellung von Makrophagen

Zur Herstellung von Makrophagen als Fresszellen für abgestorbene Ag8 oder Milzzellen wurde unter sterilen Bedingungen zunächst eine Maus durch Genickdislokation getötet und dieser etwa 10 ml Normalmedium intraperitoneal injiziert. Das Medium wurde wieder entnommen und wiederholt in die Bauchhöhle gespritzt. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt und schließlich die gewonnene Makrophagensuspension 5 Minuten bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert und 3 x mit Normalmedium gewaschen. Für die Klonierung auf 8 Costar™ 24 - Loch Platten wurden bei einem Volumen von 0,5 ml / well die Makrophagen von 2 *NMRI*-Mäusen benötigt.

2.13.4 Testung der Zellkulturüberstände

Die fusionierten Zellen wurden alle 2 Tage unter dem Mikroskop begutachtet. Sobald die Zellen anfangen, einen guten Wuchs zu zeigen und sich das Medium leicht gelblich verfärbte, wurden die Zellkulturüberstände auf eventuell enthaltene Antikörper getestet. Dazu wurden 100 µl des Zellkulturüberstandes auf eine Mikrotiterplatte übertragen, welche zuvor mit dem Antigen beschichtet worden war. Nach einer 3-stündigen Inkubation wurde die Platte 3 x mit etwa 250 µl ELISA-Waschpuffer gewaschen und auf einem trockenen, saugfähigen Papiertuch ausgeschlagen. Die einstündige Detektion der Antikörper erfolgte mit einem Peroxidase markierten Antikörper, der für den Fc-Teil von Maus-Antikörpern spezifisch ist (*goat α mouse* POX, 1:5000 in HRP). Als Substrat wurde TMB (Fa. BioFxx) verwendet. Nach Abstoppen der blauen Farbentwicklung nach etwa 25 Minuten wurde die optische Dichte der einzelnen Vertiefungen bei $\lambda = 450$ nm erfasst.

2.13.5 Klonierung und Subklonierung von Hybridom-Zelllinien

Nach dem Test der verschiedenen Klone wurden einige in flüssigem Stickstoff konserviert, während diejenigen Klone, welche die höchsten optischen Dichten zeigten, weiter kloniert wurden. Hierzu wurden die Zellen, bei denen davon ausgegangen werden musste, dass es sich noch nicht um Zellen eines einzigen Klons handelt, erneut auf 96 - Loch Platten ausgesät und bis zur Farbveränderung des Mediums angezüchtet. Die Überstände wurden wieder getestet und die 2 Klone mit dem höchsten Messwert für die Subklonierung ausgewählt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die Messungen zeigten, dass die Messwerte aller Vertiefungen dieselbe optische Dichte zeigten. In diesem Fall kann davon ausgegangen werden, dass sich in jeder Vertiefung Zellen eines Klons befinden.

2.13.6 Isotypisierung von monoklonalen Antikörpern

Zur Isotypisierung von monoklonalen Maus-Antikörpern wurden Teststreifen „*mouse monoclonal antibody isotyping test kit*“ der Fa. Serotec verwendet, welche den Vorteil bieten, dass nur ein relativ geringes Volumen an Zellkulturüberstand verwendet werden muss und das Ergebnis innerhalb weniger Minuten feststeht. Die Isotypisierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.14. Titerbestimmung

Bevor das Serum eines immunisierten Tieres in einem Assay verwendet werden kann, muss der so genannte Titer, also die Arbeitskonzentration des Antikörpers im Serum, bestimmt werden. Dazu ist es notwendig, die Serumabnahmen verschiedener Zeitpunkte des Immunisierungsvorganges miteinander zu vergleichen, insbesondere unter Berücksichtigung des Prä-Immunisierungs-Serums (PIS).

Dazu wird das zur Immunisierung verwendete Antigen auf der Kunststoffoberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Hierbei wird meist eine Konzentration von 1 µg Antigen pro Milliliter Beschichtungspuffer verwendet und damit die Vertiefungen der Mikrotiterplatte befüllt. Die restlichen freien Bindungsstellen der Oberfläche werden mit entsprechendem Proteinüberschuß blockiert. Das zu testende Serum wird in Phosphatpuffer pH 7,0 in unterschiedlichen Verdünnungen auf die Mikrotiterplatte aufgetragen, über Nacht bei 2 - 8°C oder 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 x mit ELISA - Waschpuffer gewaschen. Ein peroxidasemarkierter, sekundärer Antikörper, der spezifisch gegen den Fc - Teil des primären Antikörpers gerichtet ist, wird in einer Verdünnung von 1 : 10000 (v/v) in HRP-Stabilisatorlösung aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem 5maligem Waschen der Vertiefungen wird TMB Substrat (Fa. BIOFX) aufgetragen. Die blaue Farbentwicklung wurde nach spätestens 30 min durch Zugabe von Stopplösung unterbrochen und der nun entstandene Farbkomplex

bei $\lambda = 450$ nm unter Verwendung einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 620$ nm im Spektralphotometer für Mikrotiterplatten gemessen und per Software ausgewertet.

Der Titer eines Antikörpers wird errechnet als diejenige Konzentration des Antikörpers, welche 30% der maximalen optischen Dichte ergibt.

$$OD_{\text{Titer}} = OD_{\text{max}} * 0,3$$

2.15. Immunoassays

2.15.1 Benötigte Puffer und Lösungen zur ELISA – Entwicklung

Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer)

NaHCO₃ 5,0 g

Aqua dest. 1,0 l

pH 9,6 (mit NaOH einzustellen)

ELISA-Waschpufferkonzentrat (10x)

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 14,2 g

KH₂PO₄ 2,0 g

KCl 2,0 g

NaCl 80,0 g

Triton X-100 10,0 ml

Thimerosal 0,2 g

Reinstwasser ad 1,0 l

pH 7,4

Der Waschpuffer muss vor Verwendung 1:10 mit Reinstwasser verdünnt werden.

Stoplösung

H ₂ SO ₄ (96%)	21,25	ml
Reinstwasser	978,75	ml

Blockierungslösung (PPGNE)

KH ₂ PO ₄	1,8	g
NaN ₃	1,0	g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	9,5	g
EDTA	0,4	g
Gelatine	2,0	g
Reinstwasser	ad 1,0	l
pH 7,1 – 7,5		

Verdünnungspuffer A

PBS/Casein (s.u.)	100,0	ml
PEG 8000	30,0	g
Thimerosal	1,0	g
Tween®-20	0,5	ml
Reinstwasser	ad 1000,0	ml
exakt pH 7,4 einstellen		

Verdünnungspuffer B

PBS	1,0	l
BSA	1,0	g
Thimerosal	0,4	g
Tween®-20	0,5	ml
PEG 6000	30,0	g
pH 7,1 – 7,5		

PBS

KH ₂ PO ₄	1,97	g
KCl	0,20	g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	9,53	g
NaCl	8,00	g
Reinstwasser	ad 1,0	l

Tris / Casein

Tris (base)	12,3	g
NaCl	90,0	g
Thimerosal	2,0	g
Casein	5,0	g
Reinstwasser	ad 1,0	l

pH 7,2 - 7,7

Vor Verwendung ist der Puffer durch einen Faltenfilter zu filtrieren.

PBS / Casein

PBS	900	ml
Thimerosal	0,4	g
Casein	5,0	g
Reinstwasser	90	ml
NaOH (1M)	10	ml

Es werden alle Zutaten zusammengegeben und auf einem Heizrührer so lange gekocht, bis das gesamte Casein gelöst ist. Nach Erkalten des Puffers muss dieser auf pH 7,2 - 7,6 eingestellt werden.

Zur Quantifizierung von Proteinen in biologischen Flüssigkeiten, wie zum Beispiel in Serum, gibt es verschiedene immunologische Verfahren. Die häufigsten Verfahren sind die „Radio Immuno Assay“ (RIA) sowie die „Enzymgekoppelten Immuno Assay“ (EIA). Der Nachweis von Antikörpern mittels eines EIA wird in der Regel als „enzyme linked immuno sorbent assay“

(ELISA) bezeichnet. Häufig werden jedoch alle nicht radioaktiven Immunoassays kurz und vereinfacht als ELISA zusammengefasst.

Die erste Form des Immunoassays war der Radioimmunoassay (YALOW & BERSON 1959). Bei diesem Testsystem konkurriert in Flüssigphase ein radioaktiv markiertes Antigen (Tracer) mit dem nicht markierten Analyten um die Bindung mit einem Antikörper. Nachdem überschüssiger, ungebundener Analyt sowie überschüssiger, ungebundener radioaktiver Tracer vom Antigen-Antikörper - Komplex abgetrennt sind, wird die Anzahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) bestimmt. Durch die Verwendung verschiedener bekannter Konzentrationen des Analyten kann anhand dieser die unbekannte Konzentration einer Probe ermittelt werden. Hierbei ist die Analytenkonzentration umgekehrt proportional zur Stärke des radioaktiven Signals.

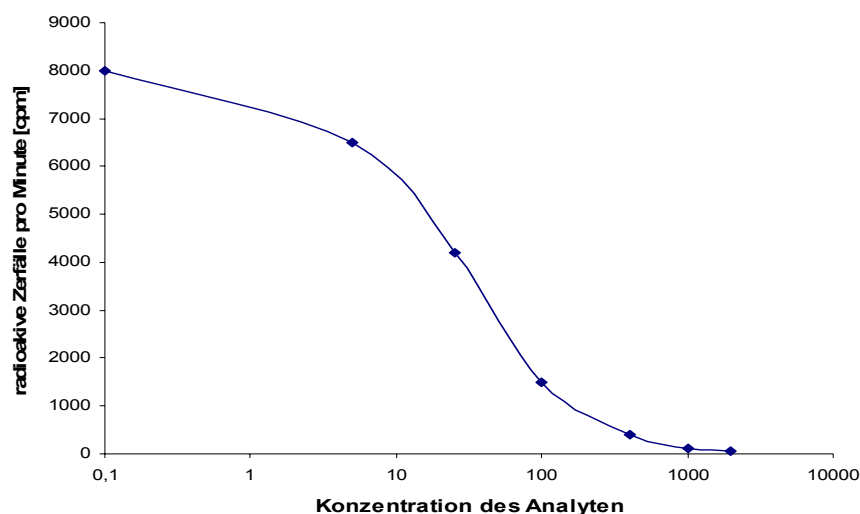


Abb. 7 Beispielhafte Darstellung der Standardkurve eines RadioimmunoAssays. Die Konzentration des Analyten (X-Achse) ist hierbei umgekehrt proportional zur Anzahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm; Y-Achse). Die Konzentration eines Analyten in einer Probe kann anhand dieser Kurve abgelesen werden.

Aufgrund der Verwendung von radioaktivem Material und der damit einhergehenden Schwierigkeiten der Entsorgung der entstehenden Abfälle,

finden heute die nicht radioaktiven Verfahren (EIA, ELISA) deutlich mehr Verwendung.

Diese nicht radioaktiven Tests beruhen darauf, dass die Konzentration des Analyten mit einer Enzymaktivität im Assay korreliert. Die Enzym-Immuno-Assays werden in zwei verschiedene Testprinzipien unterteilt. Bei den homogenen Assays erfolgt keine Abtrennung des Antikörper-Antigen-Komplexes aus dem Versuchsansatz, sondern hierbei wird die Enzymaktivität direkt durch die Komplexbildung beeinflusst.

Bei den heterogenen Assays erfolgt stets eine Abtrennung des ungebundenen Materials mittels Waschen. Diese heterogenen Assays werden weiter unterteilt in kompetitive und nicht kompetitive Assays. Beide Testprinzipien eignen sich sowohl für die Quantifizierung von Antikörpern als auch von Antigenen in Proben. Hier werden die Testprinzipien zum Nachweis von Antigenen beschrieben, die analog für Antikörper gelten.

2.15.2 Kompetitive EIA

Bei den kompetitiven Testverfahren wird an einer Kunststoffoberfläche ein Antigen immobilisiert (Festphase). Durch Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen desselben Antigens sowie antigenspezifischem Antikörper in die Flüssigphase konkurrieren das Antigen in der Festphase sowie das Antigen in der Flüssigphase um die Bindung mit dem Antikörper. Bei einem direkten kompetitiven Assay ist an den verwendeten Antikörper chemisch ein Enzym gekoppelt. Werden nun alle Komponenten des Testansatzes abgewaschen, welche nicht an das Antigen der Festphase gebunden haben, so kann durch Zugabe eines Substrates eine Farbreaktion mit dem Enzym hervorgerufen und diese photometrisch erfasst werden.

Für den indirekten kompetitiven Test wird der antigenspezifische Antikörper nicht direkt an ein Enzym gekoppelt. Stattdessen wird ein Anti-Immunglobulin-Antikörper verwendet, welcher eine Markierung mit einem Enzym besitzt. Auch hier erfolgt durch Zugabe eines Substrates eine Farbreaktion, welche

photometrisch erfasst werden kann. Dieses indirekte System hat zwar den Nachteil, dass durch die Verwendung eines zusätzlichen Antikörpers ein zusätzlicher Arbeitsschritt anfällt, es hat jedoch den Vorteil, dass eine Verstärkung des optischen Signals und damit eine Steigerung der Sensitivität erreicht werden kann. Zudem sind Anti-Immunglobulin-Antikörper mit Markierungen, zum Beispiel mit Meerrettichperoxidase, in gleich bleibenden Qualitäten käuflich zu erwerben, und die direkte Markierung eines antigenspezifischen Antikörpers ist kostenintensiv und aufwändig.

Generell ist bei kompetitiven Verfahren die Menge an umgesetztem Substrat umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten in der Flüssigphase.

2.15.3 Nicht kompetitive EIA

Eine wichtige Grundvoraussetzung für die Entwicklung eines nicht kompetitiven Assays ist das Vorhandensein von zwei Antikörpern, welche unterschiedliche Epitope des Antigens erkennen.

Bei einem nicht kompetitiven EIA werden antigenspezifische Antikörper an einer Kunststoffoberfläche immobilisiert. Diese Antikörper können das Antigen mit hoher Affinität binden und auf der Oberfläche konzentrieren. Zum Nachweis dieses Antigens wird ein zweiter antigenspezifischer Antikörper (Zweitantikörper) benötigt, welcher jedoch ein anderes Epitop des Antigens erkennen muss.

Auch bei den nicht kompetitiven Assays kann in direkte und indirekte Tests unterschieden werden. Trägt bereits der Zweitantikörper eine Markierung mit einem Enzym, so spricht man von einem direkten, nicht kompetitiven EIA. Bei den indirekten, nicht kompetitiven EIA wird ein dritter Antikörper verwendet, bei dem es sich um einen Anti-Immunglobulin-Antikörper handelt, der eine Markierung trägt. Die Vor- und Nachteile der Verwendung von Anti-Immunglobulin-Antikörpern wurden bereits erläutert.

2.16. Entwicklung und Optimierung von ELISA

2.16.1 Variation der Beschichtungskonzentrationen

Um eine optimale Sensitivität des Testsystems zu erreichen, ist es notwendig, die Konzentration des Antigens in der Festphase zu variieren. Hierzu wird das Antigen in unterschiedlichen Konzentrationen über Nacht bei 2°C bis 8°C auf den Mikrotiterplatten inkubiert.

Die Mikrotiterplatten werden mit den folgenden Konzentrationen an rekombinantem Myostatin in Beschichtungspuffer über Nacht beschichtet:

- 1 µg / ml
- 0,5 µg / ml
- 0,25 µg / ml
- 0,1 µg / ml

Am nächsten Tag wird nach der Blockierung auf den unterschiedlich beschichteten Mikrotiterplattenstreifen ein Titer test durchgeführt (siehe 2.14).

2.16.2 Bestimmung der optimalen Beschichtungskonzentration

Nachdem eine nahezu optimale Antikörperkonzentration gefunden ist, muß noch einmal die Beschichtungskonzentration überprüft werden, denn dies führt oft zu einer zusätzlichen Steigerung der Sensitivität.

Daher werden Mikrotiterplatten mit den folgenden Konzentrationen an Antigen beschichtet:

- 100 ng / ml
- 50 ng / ml
- 10 ng / ml

Für die Kompetition wird eine Standardkurve von rekombinantem Myostatin mit folgenden Verdünnungsstufen verwendet:

- 0 ng / ml
- 0,7 ng / ml
- 2,0 ng / ml
- 6,2 ng / ml
- 18,5 ng / ml
- 55 ng / ml
- 166 ng / ml
- 500 ng / ml

Die Inkubationszeit des Vorinkubats beträgt 3 Stunden und die Inkubationszeit auf der Mikrotiterplatte 1 Stunde. Der *rabbit – anti – rec Myo* Antikörper hat eine Endverdünnung von 1:45000 in PPGNE, und die Detektion erfolgt wie bereits unter 2.14 beschrieben.

2.16.3 Bestimmung des optimalen Blockierungsmediums

Eine handelsübliche Polystyrol - Mikrotiterplatte (MTP, z.B. NUNC-Immuno™ BreakApart™ MaxiSorp) hat eine theoretische Bindungskapazität von 650 ng Protein pro Kavität. Aufgrund der geringen Beschichtungsdichte (5 ng pro Kavität, bzw. 50 ng / ml) müssen die potentiell freien Bindungsstellen der Kavität mit einem Überschuss an Fremdprotein blockiert werden, um eine unspezifische Bindung von freiem Antigen oder auch des Detektionsantikörpers an die Oberfläche der Kavität zu verhindern. Hierzu sollte ein Protein verwendet werden, zu denen die verwendeten Antikörper keine Kreuzreaktivität aufweisen. Hierfür wird eine Mikrotiterplatte mit verschiedenen Blockierungsreagenzien eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, gewaschen und der zu testende Antikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:40000, 1:50000) über Nacht bei 2°C bis 8°C auf der MTP inkubiert. Die Detektion erfolgt wie unter 2.14 bereits beschrieben.

Für diese Untersuchungen wurden folgende Blockierungslösungen verwendet:

- PBS / 2% BSA
- Tris / Casein
- PBS / Casein
- PPGNE
- PBS / 1% Fischgelatine
- PBS / 2% FCS

Eine optimale Blockierungslösung sorgt für eine homogene Abdeckung aller potentiell freien Bindungsstellen. Dies wird meist durch die Verwendung eines heterogenen Proteins erreicht, da in solchen Proteinlösungen meist Bestandteile unterschiedlicher molekularer Größe vorhanden sind, wodurch eine optimale Abdeckung aller Zwischenräume der bereits auf der Kunststoffoberfläche immobilisierten Antigene gewährleistet werden kann (NUNC™ Bulletin No7).

Zudem bietet eine Blockierungslösung mit einem starken Proteinüberschuss den Vorteil, dass die Stabilität des Antigens in der Festphase erhöht wird, welches die Lagerungsfähigkeit der beschichteten Mikrotiterplatte erhöht und dadurch eine höhere Chargenkonstanz gewährleistet.

Als Blockierungslösung für das Testsystem wird diejenige gewählt, welche in allen Antikörperverdünnungsstufen eine niedrige optische Dichte hat und damit sowohl eine optimale Blockierung als auch eine geringe oder gar keine Kreuzreaktivität aufweist.

2.16.4 Bindungskinetiken

Zur Bestimmung, welche Reaktionszeiten notwendig sind, um das Gleichgewicht zwischen Antigen und Antikörper zu erreichen, wird die Inkubationszeit des Testsystems variiert. Zudem kann oft eine Steigerung der Sensitivität eines ELISA erreicht werden, wenn die Reaktion von Antikörper und Antigen in der Flüssigphase von der Reaktion von Antigen (Festphase) und

Antikörper (Flüssigphase) zunächst abgetrennt und erst dann dieses vorinkubierte Gemisch auf die antigenbeschichtete Mikrotiterplatte aufgetragen wird.

Daher erfolgte eine Bestimmung verschiedener Bindungskinetiken, sowohl mit einem System, bei dem eine Vorinkubation von Antigen und Antikörper in der Flüssigphase vorgenommen wird, als auch mit einem weiteren Testsystem, bei dem das Antigen in der Flüssigphase direkt mit dem immobilisierten Antigen um die Bindung mit dem Antikörper konkurriert.

Ein Faktor, der solche Reaktionskinetiken oft stark beeinflusst, ist die Temperatur. Daher wurden die verschiedenen Systeme nicht nur in den Inkubationszeiten, sondern auch in den Reaktionstemperaturen verändert.

Es wurden folgende Versionen für die Variation von Inkubationsdauer und Temperatur gewählt.

direkte Konkurrenz auf MTP

4h RT	4h 2-8°C
3h RT	3h 2-8°C
2h RT	2h 2-8°C
1h RT	1h 2-8°C
	ÜN 2-8°C

Konkurrenz mit Vorinkubation und anschließend auf MTP

1h Vorinkubation	2h Vorinkubation	3h Vorinkubation
3h RT	3h RT	3h RT
2h RT	2h RT	2h RT
1h RT	1h RT	1h RT
ÜN 2-8°C	ÜN 2-8°C	ÜN 2-8°C

2.16.5 Waschen von Mikrotiterplatten

Bei einem heterogenen Enzymimmunoassay ist einer der wichtigsten Schritte die Abtrennung des ungebundenen Materials durch Waschen. Hierbei haben sich die unterschiedlichsten Methoden etabliert. Eine der gängigsten Methoden ist die Verwendung eines so genannten Waschkamms, welcher über einen Schlauch mit einem Vorratsbehälter für den Waschpuffer verbunden ist.

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte können somit zügig nacheinander bis zum Rand befüllt werden (etwa 350 µl pro Kavität). Sind alle Kavitäten befüllt, wird der Waschpuffer wieder ausgeschüttet und die Prozedur in der Regel 4 mal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang werden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte kräftig auf einem saugfähigen Papier ausgeschlagen, um alle Waschpufferreste zu entfernen.

2.16.6 Kreuzreaktivität

Die Spezifität eines Antikörpers ist dann gegeben, wenn dieser auch in Anwesenheit anderer, dem Antigen strukturell ähnlicher Proteine, das Antigen richtig erkennt. Dazu müssen Kompetitionsversuche mit unterschiedlichen Proteinen durchgeführt werden. Es sollten hier vor allem Substanzen verwendet werden, welche dem eigentlichen Analyten in Sequenz, Struktur und möglichst auch in der biologischen Funktion sehr ähnlich sind. Im vorliegenden Fall wurden die verwendeten Antikörper auf ihre Kreuzreaktivität zu GDF-11 sowie Myoglobin getestet, da es sich bei GDF-11 um das Protein handelt, welches auf Aminosäureebene die größte Ähnlichkeit zu Myostatin besitzt. Myoglobin ist eines der am häufigsten vorkommenden Muskelproteine. Zudem weist Myoglobin ein Molekulargewicht auf, welches dem des C-terminalen, biologisch aktiven Myostatin in etwa entspricht.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden in einer seriellen Verdünnung in 10er Schritten im Probenverdünnungspuffer eingesetzt und anhand der Eichkurve ausgewertet.

2.16.7 Linearität

Eines der wichtigsten Qualitätskriterien bei der Validierung eines ELISA ist, dass bei logarithmischer Verdünnung der Proben (1+1, 1+2, 1+3, 1+7 v/v usw.) die Resultate im Messbereich der Eichkurve liegen und in linearer Beziehung zueinander stehen. Mittels der Linearität der Probenverdünnung kann sichergestellt werden, dass diese im optimalen Messbereich der Kurve liegen und konzentrierte Proben, welche erst nach stärkerer Verdünnung im Messbereich der Eichkurve liegen, ebenfalls richtig gemessen werden können. Zur Bestimmung der Linearität wurden mehrere Plasmen seriell in Probenverdünnungspuffer verdünnt und an der Eichkurve ausgewertet.

Linearität wird ausgedrückt durch den Pearson'schen Korrelationskoeffizienten „r“, der Möglichst einen Wert von 1 erreichen sollte.

2.17. Molekularbiologische Arbeiten

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden in den Laboren des Zentrum für Biochemie, Institut für Biochemie II, Medizinische Fakultät der Universität Köln, mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Mats Paulsson durchgeführt.

Soweit nicht anders erwähnt, erfolgten diese molekularbiologischen Arbeiten nach den Standardarbeitsanweisungen von Sambrook (SAMBROOK 1989).

2.17.1 Verwendete Vektoren

Für Klonierungsarbeiten wurde der Vektor pBluescript® verwendet. Zur Transfektion und rekombinanten Expression von Proteinen in eukaryotischen HEK 293 EBNA Zellen wurde als Vektor pCEP-Pu eingesetzt. Dieser Expressionsvektor enthält in der vorliegenden Variante im 3' Bereich der multiplen Klonierungsstelle die Sequenz für eine C-terminale 6 x His-Markierung. Die Vektoren wurden freundlicherweise von Neil Smyth zur Verfügung gestellt.

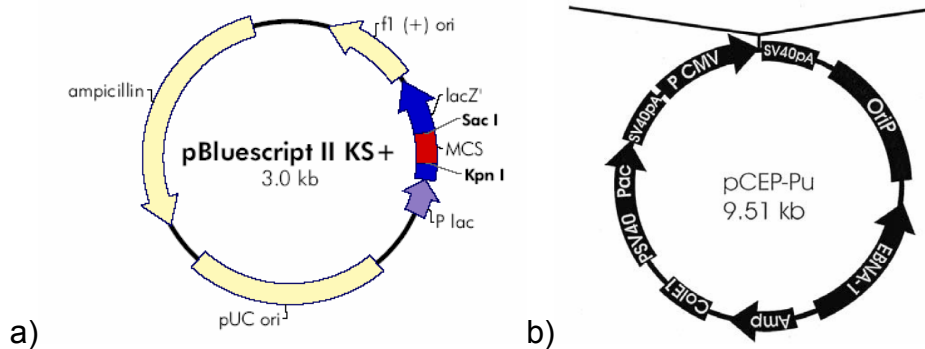


Abb. 8 a) Schematische Darstellung des Vectors pBluescript II KS+ (Stratagene). Der Vector trägt neben einer Sequenz für die Ampicillin-Resistenz (ampicillin), den Promotor und Operator des lac-Operons, das 5' Ende des lacZ Gens, welches für die X-Gal Selektion notwendig ist, den pUC Replikationsursprung sowie den Replikationsursprung des Bakteriophagen f1. b) Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCEP-Pu. Der Vector besitzt ein Ampicillin Resistenzgen (Amp), eine SV40polyA-Kassette, das EBNA-1 Gen, das für ein virales DNA bindendes Protein kodiert, und die EBV-Replikationsstelle (OriP), an die EBNA-1 DNA bindet, welches die extrachromosomale Replikation und gleichmäßige Verteilung des Plasmids in sich teilenden eukaryotischen Zellen gewährleistet (Quelle:Herstellerwebseiten).

2.17.2 RT-PCR

Zur Amplifizierung der Konstrukte musste aus juveniler, gesamter Skelettmuskel-RNA die benötigte cDNA mittels RT-PCR (Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion) generiert werden. Die mRNA wurde freundlicherweise von Neil Smyth zur Verfügung gestellt.

Zusammensetzung und Durchführung des RT-PCR Ansatzes:

- Reaktionsmischung

RNA	2,0	µl
oligo-dT-Primer (25 µM)	2,0	µl
Reinstwasser	20,0	µl
dNTP-Mix (je 25 mM)	0,5	µl
Puffer	2,5	µl
- Mischung inkubieren für 8 bis 10 min, 75°C (zur Denaturierung und Beseitigung von Sekundärstrukturen)
- auf Eis abkühlen 2 min
- zentrifugieren bei 5000 x g; 20 sec; 4°C
- Zugabe

RNAse-Inhibitor (40 U / µl)	0,5	µl
AMV RTase (20 U / µl)	0,5	µl
- inkubieren 30 min bei 42°C
- zentrifugieren bei 5000 x g; 20 sec; 4°C
- Zugabe

AMV RTase	0,5	µl
-----------	-----	----
- inkubieren 30 min bei 45°C
- Zugabe

5-fach Puffer	2,0	µl
DTT (0,1M)	1,0	µl
dNTP-Mix (25 mM)	0,5	µl
- inkubieren 10 min bei 42°C
- Zum Stoppen der Reaktion wurde der gesamte Ansatz 10 min auf 70°C erhitzt.

Die Oligo dt-Primer stammten von der Firma MWG, dNTP's von der Firma Pharmacia. AMV-RTase, RNAse-Inhibitor, DTT und RT-PCR Puffer stammten von der Firma Invitrogen.

5-fach RT-PCR Puffer:

Tris-HCl pH8,3	250	nM
KCl	375	nM
MgCl ₂	15	mM

2.17.3 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Zur Amplifizierung wurden die unten aufgeführten PCR-Ansätze mit verschiedenen Temperaturzyklen in einem *Tpersonal Thermocycler* der Fa. Biometra behandelt, in dem sich wiederholende Denaturierung, Primerhybridisierung und Polymerisation zu einer exponentiellen Vervielfältigung der cDNA führten.

Ansatz für PCR

Reinstwasser	40,0	µl
10x Herculase® Puffer	5,0	µl
Primer a)	2,0	µl
Primer b)	2,0	µl
dNTP-Mix	0,5	µl
cDNA (RT-PCR Ansatz)	1,0	µl
Herculase®	0,5	µl

Die Polymerase „Herculase®“ und der 10 x Herculase® Puffer sind Produkte der Firma Stratagene und viermal genauer bei der Amplifizierung der Produkte als herkömmliche Taq-Polymerase.

2.17.3.1 Verwendete Primer

PCR-Produkt	Primer a)	+	Primer b)
I.	5 <i>kpn</i> MyoFULL	+	3 <i>not</i> MyoFULL
II.	5 <i>spe</i> MyoLESSSP	+	3 <i>not</i> MyoFULL
III.	5 <i>spe</i> MyoNOPROP	+	3 <i>not</i> MyoFULL
IV.	5 <i>kpn</i> MyoFULL	+	3 <i>not</i> MyoPROP
V.	5 <i>spe</i> MyoLESSSP	+	3 <i>not</i> MyoPROP

Nomenklatur der Primer am Beispiel von „5*spe*MyoNOPROP“:

5	5' oder 3' Ende der DNA Sequenz
spe	Enzymschnittstellen (<i>spe</i> I, <i>kpn</i> I oder <i>not</i> I)
Myo	Myostatin
noPROP	kein Propeptid (noPROP)
	volle Länge (FULL)
	ohne Signalpeptid (LessSP)
	bis 3' Ende des Propeptids (PROP)

Primercode	Primersequenz
5 <i>kpn</i> MyoFULL	AATTG GGTACC GCCACCATGG A AAA CTG CAA CTC TGT G
5 <i>spe</i> MyoLESSSP	TAA ACTAGT I AAT GAG AAC AGT GAG CAA AAA GAA AAT GTG G
3 <i>not</i> MyoPROP	AATT GCGGCC GC CCT TCT GGA TCT TTT TGG TGT GTC
5 <i>spe</i> MyoNOPROP	TAA ACTAGT I GAT TTT GGT CTT GAC TGT GAT G
3 <i>not</i> MyoFULL	AATT GCGGCC GC TGA GCA CCC ACA GCG GTCTAC

GCC ACC ATG G Kozak Sequenz steigert die Effizienz der Translation

GGTACC *kpn*1 Schnittstelle

ACTAGT *spe*1 Schnittstelle

GCGGCC *not*1 Schnittstelle

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Deckeltemperatur	105 °C
einleitende Denaturierung	94 °C 3 min
Denaturierung	94 °C 30 s
Annealing	50 °C 30 s
Elongation	72 °C 4 min
→ 25 mal Wiederholung von Schritt 2. bis 4.	
abschließende Elongation	72 °C 10 min

2.17.4 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels einer elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel. Die entsprechenden DNA-Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt.

2.17.5 Agarose - Gelelektrophorese

Agarosegele wurden je nach Anwendung mit 0,7% (w/v) bis 1,2% (w/v) gegossen. Hierbei wurde beispielsweise 1 g Agarose mit 100 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erwärmt und in eine horizontale Gelkammer (Amersham Pharmacia) gegossen.

50 x TAE (Tris-Acetat) Puffer

Tris-Base	252,0 g
0,5 M EDTA pH 8.0	100,0 ml
Essigsäure (100%)	57,1 ml
Reinstwasser	ad 1000,0 ml

Dieser Puffer wurde vor Verwendung 1:50 mit Reinstwasser verdünnt.

2.17.6 Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen

Zur Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden ausschließlich Enzyme der Firma New England Biolabs (NEB) verwendet. Die Bedingungen, insbesondere die Temperatur, wurden stets wie vom Hersteller gefordert eingehalten und nur die mitgelieferten Puffer verwendet. Wenn zwei verschiedene Enzyme verwendet werden mussten, deren Pufferbedingungen nicht identisch waren, so wurden die Spaltungen aufeinander folgend durchgeführt. Dazu wurde nach Verwendung des ersten Enzyms dieses 20 min bei 65°C inaktiviert, die Pufferbedingungen an das zweite Enzym angepasst und erst dann der Verdau mit dem zweiten Enzym durchgeführt. Wurden Enzyme verwendet, welche nicht durch Hitze inaktivierbar waren, so wurde die DNA nach dem ersten Verdau elektrophoretisch aufgetrennt, die Bande herausgeschnitten und anschließend aus der Agarose eluiert und der Spaltung mit dem zweiten Enzym unterworfen.

2.17.7 Ligationen

Bei Ligationen wurden Vektor und DNA-Fragment stets in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt, wobei die eingesetzte DNA-Menge meist etwa 100 ng betrug.

Ligationsansatz:

T4-DNA-Ligase Puffer	2,0	µl
Vector	0,5	µl
T4-DNA-Ligase	1,0	µl
DNA	15,0	µl

Die Ligationen erfolgten bei 16°C über Nacht. Als Negativkontrolle und zur Überprüfung der Reinheit der verwendeten Reagenzien wurde stets ein paralleler Ansatz durchgeführt, bei dem anstelle der DNA 15 µl Reinstwasser verwendet wurden.

2.17.8 Transformationskompetente *E.coli* DH5 α

Zur Herstellung von transformationskompetenten Bakterien wurde 1 ml einer Kultur von *E.coli* DH5 α in 100 ml *Luria Bertani* (LB) – Medium angeimpft und 2 - 3h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Wenn die Kultur bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm eine optische Dichte von 0,5 erreicht hatte, wurde sie 15 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C und 1200 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 33 ml kaltem Ec-Medium 1 resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation unter den o.g. Bedingungen wurde das entstehende Pellet in 8 ml Ec-Medium 2 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die gekühlte Bakterienlösung wurde anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Ec-Medium 1

RbCl	100	mM
MnCl ₂	50	mM
KAc	30	mM
CaCl ₂	10	mM
Glycerin	15	% (v/v)

Ec-Medium 2

RbCl	10	mM
CaCl ₂	75	mM
MOPS	10	mM
Glycerin	15	% (v/v)

2.17.9 „heat-shock“ - Transformation

Zur Transformation des ligierten Vectors wurde der Ligationsansatz mit 200 μ l kompetenten *E.coli* DH5- α Zellen und 8 μ l 0,5M β -Mercaptoethanol versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock bei 42°C

wurde der Ansatz wieder für 2 min in Eis inkubiert, mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Die Bakteriensuspension wurde bei 5000 x g 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das in 1 ml LB-Medium resuspendierte Pellet auf AMP-Platten (100 µg AMP / ml LB-Agar) ausplattiert.

2.17.10 Minipräparation

Von der LB-Agarplatte wurden einzelne Kolonien gepickt und in ein Reaktionsgefäß mit je 10 ml LB-Amp-Medium (Endkonzentration von Ampicillin: 50 µg / ml) übertragen. Nach einer Inkubation von 9h bei 37°C in einem Schüttelinkubator wurden 1,5 ml dieser Bakterienkultur in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation der Bakterien für 3 min bei 14000 x g wurde aus dem Bakterienpellet mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kit (Fa. Macherey-Nagel) die Plasmid-DNA gereinigt.

2.17.11 X-Gal Test zur Selektion rekombinanter Klone

Der X-Gal Test wird dazu verwendet, diejenigen Klone selektieren zu können, welche nach der Übertragung der DNA ein Plasmid mit Insert enthalten, und nicht diejenigen, welche nur den Vector ohne Insert tragen. Neben der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz stellt daher dieses System eine zusätzliche Screeningmöglichkeit dar. Die pBluescript Plasmide enthalten neben dem Promotor und Operator- Bereich des lac-Operon auch das 5' – Ende des lacZ Genes, welches für das α -Peptid kodiert, das die inaktive β -Galaktosidase von Wirtsstämmen (wie zum Beispiel *E.coli DH5 α*) komplementieren kann. Da die Klonierungsstelle (MCS, *multiple cloning site*) inmitten des N-terminalen Bereichs des lacZ-Gens liegt, ist eine Komplementation nur dann möglich, wenn das Plasmid kein Insert besitzt. Durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid) als Induktor und X-Gal (5-Brom-4-chlor-indoyl- β -D-galaktosid) als Substrat, welches durch das Enzym gespalten wurde, auf Agarplatten konnte die aktive β -Galaktosidase

nachgewiesen werden. Dabei entstand unter aeroben Bedingungen ein blauer Farbstoff BCI (5-Brom-4-chlor-indigo), welcher der Indikator für rekombinante E.coli Stämme ist, die ein Plasmid ohne Insert tragen.

2.17.12 DNA – Präzipitation

Zur Fällung von DNA wurde diese mit 1/10 ihres Volumens 3 M NaOAc pH 5,2 versetzt und dann das doppelte Volumen an eiskaltem Ethanol (96%) zugegeben. Diese Lösung wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C und 21500 x g zentrifugiert. Das präzipitierte DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol zweimal gewaschen und dann bei Raumtemperatur getrocknet. Zur weiteren Verwendung wurde das getrocknete Pellet im benötigten Volumen Reinstwasser gelöst.

2.17.13 Photometrische Quantifizierung von DNA

Zur quantitativen Bestimmung von DNA in Lösungen wurden DNA-haltige Lösungen in Quarzglasküvetten gegeben und die optische Dichte bei 260 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge befindet sich das Absorptionsmaximum der Purin und Pyrimidin-Basen. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei $OD_{260} = 1$ die DNA Konzentration etwa 50 µg / ml beträgt. Damit kann bei bekanntem Verdünnungsfaktor und bekannter OD_{260} die Konzentration einer DNA-haltigen Lösung bestimmt werden.

Da das Absorptionsmaximum von Tyrosin und Tryptophan-haltigen Proteinen bei $\lambda = 280$ nm liegt, kann der Quotient der Extinktionen (OD_{260}/OD_{280}) Aufschluss über den Reinheitsgrad der DNA-Lösung geben. Sollten die Proteine jedoch Phenylalanin enthalten, so werden falsche Werte ermittelt, da es eine starke Absorption bei $\lambda = 260$ nm aufweist.

2.17.14 DNA – Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK), Zentrale Bioanalytik (ZBA) im Zentrum für Biochemie durchgeführt. Hier wurde die *Taq FS BigDye-terminator cycle sequencing* Methode auf einem *ABI Prism 377 DNA Sequencer* der Fa. Applied Biosystems angewendet. Zur Sequenzierung wurden 150 – 300 ng DNA als Ausgangsmaterial in 6 µl Reinstwasser mit 3,5 – 6 pmol Sequenzierprimer eingesetzt.

Tab. 1 Auflistung der bei DNA – Sequenzierung verwendeten Primer Sequenzen

Primercode	Primersequenz
Universal (5' --3') (-21M13)	ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG
M 13 revers	TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC

2.17.15 Kultivierung von HEK 293 EBNA Zellen

Zur rekombinanten Expression wurde die humane Nierenzelllinie HEK 293 EBNA verwendet, welche eine Neomycin-Resistenz trägt und damit mit Geneticin selektionierbar ist. Da sie außerdem das EBNA-1 Gen (*Epstein-Barr virus nuclear antigen*) fest in ihr Genom integriert hat, welches die Expression und Replikation des episomalen Vektors pCEP-Pu unterstützt, eignet sie sich sehr gut zur Expression von Proteinen, die eine möglichst native Faltung und posttranslationale Modifikation haben sollen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM/F12 (1:1) Nährmedium (GibcoBRL) mit folgenden Zusätzen:

FCS (fötale Rinderserum)	10%
Glutamin	2 mM
Penicillin / Streptomycin	0,01 Vol

Zur Selektion der Zellen wurde dem Medium Puromycin (0,5 µg / ml) zugesetzt. Zur serumfreien Kultivierung wurde auf die Zugabe von FCS verzichtet.

Für die Aufzucht und Vermehrung der Zellen wurden konfluente Einzellschichten dreimal in PBS gewaschen und anschließend 5 min mit Trypsin/EDTA (0,25% / 2 mM in PBS) bei 37°C von der Zellkulturschale abgelöst und die Zellen vereinzelt. Durch Zusatz von 2 bis 10 Volumen Medium zur Zellsuspension wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:10 neu ausgesät.

2.17.16 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden diese, sobald sie zu ca. 80% konfluent gewachsen waren, mit Trypsin von den Zellkulturschalen abgelöst und vereinzelt. Diese vereinzelt Zellen wurden mit etwa 2 Volumen Medium versetzt und die Zellen 5 min bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen einer Zellkulturschale (Durchmesser: 10 cm) in 1 ml Einfriermedium resuspendiert.

Einfriermedium

DMEM/F12 (1:1) Nährmedium

FCS (fötale Kälberserum) 20%

DMSO 10%

Nach Überführen in Kryo-Röhrchen wurden die Zellen in einem Isopropanol-Gefäß langsam auf -80°C eingefroren. Nach etwa 24 h konnten die kryokonservierten Zellen für eine langfristige Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

2.17.17 Transfektion von HEK 293 EBNA - Zellen

2.17.17.1 Chemische Transfektion

Um die Plasmid – DNA in die HEK 293 EBNA – Zellen einzuschleusen, wurde unter anderem das Verfahren der chemischen Transfektion angewendet. Dazu wurden 3 µl FuGene6 – Lösung (Fa. Roche) pro Mikrogramm Plasmid-DNA in 100 µl serumfreiem Medium verdünnt. Zu dieser Verdünnung wurden 1-3 µg Plasmid-DNA gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Gemisch auf eine Zellkulturschale mit Zellen, welche zu etwa 50-70% konfluent waren und welchen zuvor frisches Zellkulturmedium zugefügt wurde, gegeben und 24h Stunden inkubiert. Nach dieser Ruhephase folgte eine 2-wöchige Selektionierung der Zellen mit Puromycin.

2.17.17.2 Transfektion durch Elektroporation

Ein anderes Verfahren der Transfektion von Zellen ist die Elektroporation. Hierbei wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes, welches durch einen schnell entladenden Kondensator erzeugt wird, die Membran der Zellen kurzzeitig permeabel gemacht und damit das Einschleusen der Plasmid-DNA in die Zelle ermöglicht. In diesem Fall wurden 50-70% konfluent gewachsene Zellen einer 10ml Zellkulturschale mit PBS gewaschen und anschließend 5 min mit 3 ml Trypsin inkubiert, um sie von der Kunststoffoberfläche abzulösen. Nach Vereinzelung der Zellen wurden diese 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 800 µl Elektroporationsmedium (10 ml PBS + 50 µl 5 M NaCl) resuspendiert und in die Küvette der Elektroporationseinheit gegeben. Die Elektroporationsbedingungen waren 0,23 kV und 500 µF x 1000. Der so behandelte Versuchsansatz wurde in 10 ml frisches Medium gegeben und die Zellen 24 Stunden ruhen gelassen, bevor sie unter Zusatz von Puromycin selektiert wurden.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, humanes Myostatin in einer Form zu gewinnen, welche dem nativen Myostatin möglichst ähnlich ist, gegen dieses Protein Antikörper herzustellen und mit diesen ein Testsystem zur quantitativen Erfassung des Proteins in humanem Serum oder Plasma zu entwickeln.

Zu Beginn der Arbeit waren mehrere Kaninchen - Antiseren vorhanden von Tieren, welche mit unterschiedlichen, synthetischen Peptiden des humanen Myostatin immunisiert waren. Von diesen Antikörpern war bis dahin keine Charakterisierung erfolgt.

Da humanes Muskelmaterial nicht in unbeschränkten Mengen vorhanden ist, wurden zunächst Vorversuche an Rattenmuskulatur durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Extraktionsverfahren verwendet, um für die Extraktion von Proteinen optimale Bedingungen zu erhalten. Dabei wurde vor allem darauf Wert gelegt, dass die Ausbeute an extrahiertem Protein, insbesondere in dem Molekulargewichtsbereich, in dem Myostatin erwartet wird, entsprechend hoch ist.

3.1. Proteinextraktion aus Rattenmuskulatur

3.1.1 Proteinextraktion nach SAKUMA, WATANABE et al. 2000

Der beschriebene Extraktionspuffer (SAKUMA, WATANABE et al. 2000) zeichnet sich durch die Verwendung von NP-40 und Triton X-100 als Detergentien sowie Mercaptoethanol zur Spaltung von Disulfid-Bindungen aus. Bei NP-40 (*Nonylphenylpolyethylenglycol*) und Triton X-100 (*Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether*) handelt es sich um nichtionische Detergentien, welche häufig zur Lösung von Kernproteinen und cytoplasmatischen Proteinen aus eukaryotischen Zellen verwendet werden. Da die Proteine bei Verwendung dieser Detergentien nicht denaturiert werden, wird der Lösung etwas Mercaptoethanol zugesetzt, um zumindest Disulfidbindungen zu lösen. Die

Extraktion des Muskelpulvers erfolgte bei dieser Extraktionsmethode ohne Unterbrechung der Kühlkette. Zur Detektion der Muskelproteine wurden alle vorhandenen Antikörper (siehe Tab. 3; Seite 94) im Western Blot eingesetzt, wobei jedoch keine Bande erkannt werden konnte. Nur mit einer Silberfärbung konnten einige Proteine angefärbt werden.

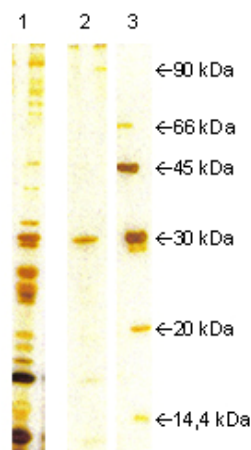


Abb. 9 Proteinextraktion aus Rattenmuskulatur mit NP-40, Triton-X100 und Mercaptoethanol. Silberfärbung eines 10%igen Polyacrylamid-Gels. Spur 1: Überstand nach Zentrifugation; Spur 2: Filtrat des Überstandes; Spur 3: Marker Sigma *Low MWM* 2 µl.

Vor allem im Bereich zwischen 14 und 45 kDa konnten viele Muskelproteine im Gel nachgewiesen werden. Nachdem jedoch der sehr trübe Überstand (Spur 1) nach der Zentrifugation filtriert worden war, reduzierte sich die Anzahl der Proteinbanden enorm. Es ist davon auszugehen, dass der Aufschluss der Zellen nicht vollständig war.

3.1.2 Proteinextraktion nach KAWADA, TACHI et al. 2001

Bei diesem Extraktionsverfahren wird nach der Homogenisation der Muskeln in einem Puffer, welcher stark SDS-haltig ist, die Suspension 3 Minuten lang auf 95°C erhitzt. Bei SDS (Natriumdodecylsulfat) handelt es sich um ein anionisches Detergenz, welches die Wasserstoffbrücken zwischen Proteinen und innerhalb von Proteinen unterbricht und damit Sekundär- und Tertiärstrukturen stört. Diese Denaturierung der Proteine führt meist zur Auslösung von Proteinen aus Komplexen. Insbesondere das Erhitzen der Proteinsuspension unter Anwesenheit von SDS führt dazu, dass größere Proteinkomplexe ebenfalls gelöst werden. Es konnten bei diesem Extraktionsverfahren zahlreiche Proteine aus den Muskelzellen gelöst werden, welche bei dem unter 3.1.1 beschriebenen Verfahren nicht gezeigt wurden. Insbesondere im Bereich zwischen 45 und 90 kDa erschienen auf den Gelbildern deutlich mehr Banden. Es war jedoch auch hier wieder nicht möglich, mit den vorhandenen Antikörpern Proteine im Western Blot zu detektieren.

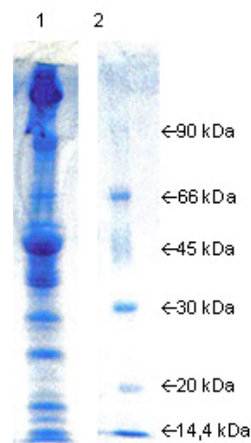


Abb. 10 Proteinextraktion aus Rattenmuskulatur mit SDS. Kolloidale Coomassie-Färbung eines 10%igen Polyacrylamid-Gels. Spur 1: Überstand nach Zentrifugation. Spur 2: Marker Sigma Low MWM 2 µl.

3.1.3 Proteinextraktion nach Mendler, Zador et al. 2000

Durch die Verwendung von Mercaptoethanol und DTT sowie einer geringer Veränderung des pH-Wertes während der stets gekühlten Extraktion sollen bei diesem Verfahren die Proteine besonders schonend aus den Muskelzellen gelöst werden (MENDLER, ZADOR et al. 2000). Die meisten Muskelproteine befanden sich jedoch weiterhin im unaufgeschlossenen Zelltrümmer-Pellet (Abb. 11. Spur 2).

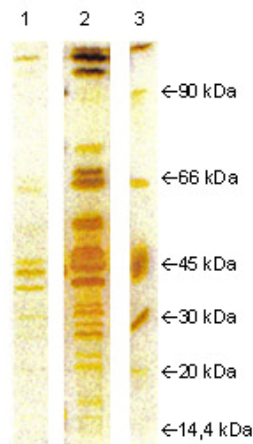


Abb. 11 Proteinextraktion aus Rattenmuskulatur mit Mercaptoethanol und DTT. Silberfärbung eines 10%igen Polyacrylamid-Gels. Spur 1: Überstand nach Zentrifugation. Spur 2: Zelltrümmer-Pellet mit PBS aufgenommen. Spur 3: Marker Sigma *Low MWM* 2 µl.

Auch bei diesem Verfahren konnte mit keinem der vorhandenen Antikörper ein positives Ergebnis auf einem Western Blot erreicht werden.

Die unterschiedlichen Methoden eignen sich unterschiedlich gut zur Extraktion von Proteinen aus Muskulatur. Anscheinend reichte die Qualität der verwendeten Antikörper nicht aus, um Myostatin in diesen Muskelextrakten nachzuweisen, oder aber die Konzentration des gesuchten Proteins in diesen Proben war zu gering. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die bereits vorhandenen Antikörper keine Kreuzreaktivität zu Ratten-Myostatin aufwiesen.

Für die weiteren Extraktionsversuche wurde humane Oberschenkelmuskulatur eines gesunden, jungen Erwachsenen verwendet. Die Verwendung des Muskelmaterials wurde vom Ethik-Komitee der Universität Würzburg genehmigt und stammte von einer Beinamputation. Die Durchführung der Studien erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki zu Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen.

3.2. Proteinextraktion aus humaner Oberschenkelmuskulatur

Um natives Myostatin aus humaner Skelettmuskulatur zu gewinnen, wurde auf den Versuchen mit Rattenmuskulatur aufbauend zunächst die Zusammensetzung der Extraktionslösung variiert. Hierbei wurde vor allem versucht, über die Variation der Detergentien eine hohe Ausbeute an Protein zu erreichen. Bei der Verwendung von Triton X-100 als nichtionisches Detergenz in Kombination mit CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat), einem zwitterionischen Detergenz, konnten zwar einige Proteine aus dem Muskel gelöst werden, jedoch war die Ausbeute relativ gering.

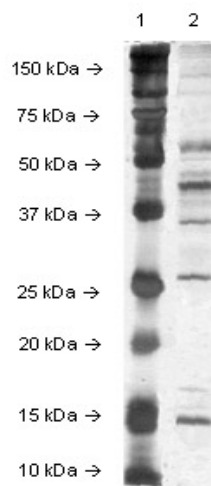


Abb. 12 Proteinextraktion mit Triton X-100 und CHAPS. Silberfärbung eines 12,5%igen SDS-Polyacrylamid Gels. Spur 1: Marker *Biorad Rainbow* 3 μ l, Spur 2: Skelettmuskel-Proteinextrakt mit Triton X-100 und CHAPS als Detergenzienzusatz. Proteinkonzentration 10 μ g.

Der Nachteil bei der Verwendung der beiden oben genannten Detergenzien ist, dass die Durchführung des Bradford – Assays zur schnellen Bestimmung von Proteinkonzentrationen gestört wird, so dass diese Messmethode in Kombination mit dieser Aufschlusslösung nicht verwendet werden kann.

Als anionisches Detergenz, welches Proteine denaturiert und an diese bindet, wurde SDS verwendet. Wird Natriumdodecylsulfat in einer Konzentration von nicht mehr als 0,5% in der Extraktionslösung verwendet, hat dies den Vorteil, dass die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bradford – Assay nicht gestört wird. Die Ausbeute an Protein war deutlich größer als bei der Verwendung von Triton X-100 und CHAPS. Auch bei der Verwendung von Brij35®, welches ebenfalls ein nichtionisches Detergenz darstellt und meist für die Isolierung funktionaler Membrankomplexe gebraucht wird, erschien die Proteinausbeute des Muskelextraktes nicht so groß wie bei der Verwendung von SDS als Tensid.

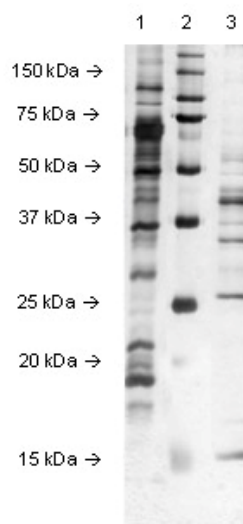


Abb. 13 Proteinextraktion mit SDS bzw. Brij35®. Silberfärbung eines 12,5%igen SDS-Polyacrylamid Gels. Spur 1: Proteinextrakt aus humaner Oberschenkelmuskulatur mit SDS als Detergenz. Proteinkonzentration 5 µg; Spur 2: *Biorad Rainbow* Marker 3 µl; Spur 3: Proteinextrakt aus humaner Skelettmuskulatur mit Brij35® als Detergenz. Proteinkonzentration 5 µg.

Durch Verwendung eines Aufschlusspuffers nach (BAUMANN, IBEUNJO et al. 2003) mit nahezu derselben Zusammensetzung wie der unter 2.4.4 beschriebene Puffer wurde bei der Proteinextraktion aus humaner Oberschenkelmuskulatur ein sehr zufrieden stellendes Ergebnis erreicht.

Die Anzahl und Intensität der Banden, welche in der Silberfärbung der SDS-PAGE des Aufschlusses zu erkennen waren, war deutlich größer als die der anderen Verfahren. Diese Beobachtung war nur visuell möglich da eine densitometrische Bestimmung der Bandenintensitäten auf den Acrylamidgelen technisch nicht möglich war.

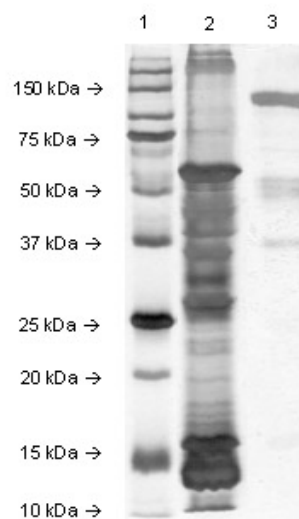


Abb. 14 Proteinextraktion mit NP-40, Triton X1-100 und Mercaptoethanol. Silberfärbung eines 12,5%igen Polyacrylamid-Gels. Spur 1: *Biorad Rainbow* Marker 3 μ l; Spur 2: Proteinextrakt mit Extraktionspuffer nach Baumann. Proteinkonzentration 5 μ g; Spur 3: rekombinantes human Myostatin 2 μ g. Bei diesem Proteinextrakt sind Proteinbanden erkennbar, welche etwa das Molekulargewicht des rekombinanten Proteins haben.

Da die Proteinextraktion mit diesem Puffer die größte Ausbeute ergab, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit stets diese Methode zum Proteinaufschluss aus humaner Skelettmuskulatur verwandt.

3.3. Affinitätschromatographie mit Blue Sepharose® G

Albumine bilden die Mehrheit der Proteine im Blut, und auch im Gewebe sind sie eine stark vertretene Gruppe. Bei der Proteinextraktion aus Gewebe stellen Albumine daher häufig einen störenden Faktor dar. Zudem weisen sie im SDS-Gel eine sehr breite Bande auf, welche sich von 40 bis 70 kDa erstreckt und damit die Bande des nativen Myostatin überdecken kann. Um diese Störung zu verhindern, wurde versucht, aus dem Muskelextrakt Albumin herauszureinigen. Zur Absorption von Albumin aus Serum, aber auch aus Extrakten anderer Herkunft, wird in der Regel *Blue Sepharose® G* verwendet. Der Muskelextrakt wurde nach dem Umpuffern in den Laufpuffer für diese Matrix zweimal über eine *Blue Sepharose® G* – Säule gereinigt.

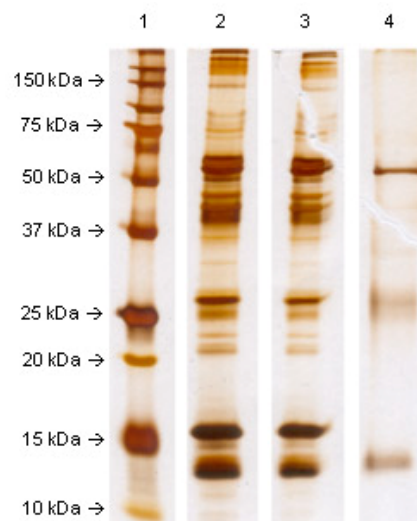
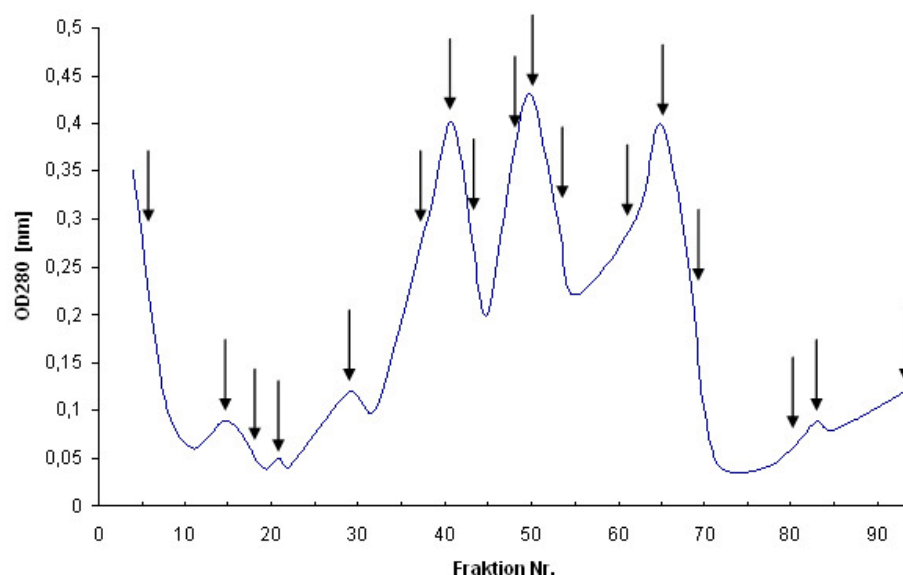


Abb. 15 Affinitätschromatographie von Muskelextrakt über Blue Sepharose® G – Säule.
Spur 1: Biorad Rainbow Marker 3 µl; Spur 2: ungereinigter Muskelextrakt;
Spur 3: ungebundener Durchfluß; Spur 4: Eluat.

Die Aufreinigung über die Säule zeigte, dass Albumin nur teilweise aus dem Muskelextrakt gereinigt werden konnte und sich diese Methode daher nur unzureichend eignete.

3.4. Gelfiltration humaner Skelettmuskulatur

Zur Isolierung von nativem humanem Myostatin wurde zunächst eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt, um die Muskelproteine abzutrennen, deren Molekulargewicht deutlich von dem von Myostatin abweicht. Für dieses Chromatographieverfahren wurde 1 g extrahiertes Muskelpulver auf Sepharose 6B mit einem Partikeldurchmesser von etwa 45-165 μm verwendet, da der Fraktionierungsbereich dieser Matrix zwischen 10 und 4000 kDa liegt und der Ausschlussbereich damit gut die Bereiche abdeckt, in denen Myostatin erwartet wird (~ 15 kDa für den monomeren C-terminalen Abschnitt bis ~ 90 kDa für das Dimer des gesamten Myostatin). Die extrahierten Proben wurden stets in den Laufpuffer für die Größenausschlusschromatographie mit PD-10 Säulen oder durch Zentrifugationsdialyse umgepuffert und vor Auftrag auf die Säule mit einem $0,22 \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert.



a),

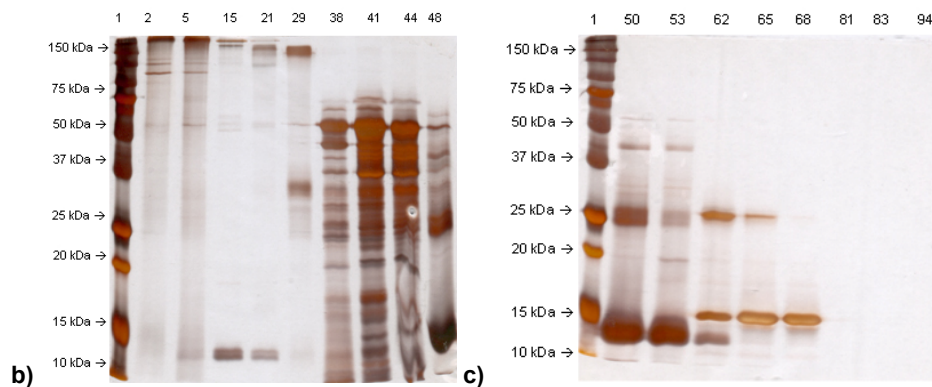


Abb. 16 Fraktionierung von Skelettmuskelextrakt. a) (vorhergehende Seite) Chromatographieverlauf von humanem Skelettmuskelextrakt. Die Pfeile deuten auf die Fraktionen, welche in der SDS-PAGE (b und c) aufgetragen wurden. Flussrate 0,5 ml / min; Puffersystem: HEFTI; Säulenmatrix: Sepharose 6B; Säulenvolumen: 50 mm x 100 cm b) und c) Darstellung der Proteinfractionen nach der Chromatographie mittels SDS-PAGE. b) Silberfärbung eines 12,5%igen Polyacrylamid-Gels. Spur 1: *Biorad Rainbow* Marker 4 μ l; Spur 2 bis 48 entsprechen den Fraktionen 2 bis 48 der Gelfiltrationschromatographie. c) Silberfärbung eines 12,5%igen Polyacrylamid-Gels. Spur 1: *Biorad Rainbow* Marker 4 μ l; Spur 50 bis 94 entsprechen den Fraktionen 50 bis 94 derselben Gelfiltrationschromatographie wie bei a).

Auf den oben abgebildeten Polyacrylamid-Gelen sind beispielhaft einige Fraktionen der Größenausschlusschromatographie aufgetragen. Die Fraktionen 2 und 5 zeigen vor allem Proteine mit einem sehr großen Molekulargewicht von mehr als 100 kDa. Fraktionen 15, 21 und 29 zeigen ebensolche großen Proteine und zusätzlich kleinere Proteine von etwa 10 kDa, welche vermutlich Spaltprodukte der größeren Moleküle darstellen, die durch die denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE entstanden sind. In den Fraktionen 38, 41, 44 und 48 eluieren vor allem Proteine mit einem mittleren Molekulargewichtsbereich von 10 bis 75 kDa, wohingegen in den Fraktionen 50, 53, 62, 65 und 68 größtenteils Banden zwischen 10 und 37 kDa zu erkennen sind. In den darauf folgenden Fraktionen scheinen keine Proteine mehr von der Säule zu eluieren, deren Molekulargewicht oberhalb von 10 kDa liegt. Ein anschließender Western

Blot der Fraktionen unter Verwendung des Antikörpers ID1308 konnte jedoch keine Myostatin Banden zeigen.

3.5. Affinitätschromatographie nach Gelfiltration

Nachdem mit dem Antikörper ID1308 keine Proteinbanden im Western Blot nachgewiesen werden konnten, wurden die Fraktionen 35 bis 70 der Gelfiltration gepoolt, über Größenausschlusszentrifugation eingengt und auf eine Säule gegeben, an welche der Antikörper ID1308 gekoppelt war. Die Elution der gebundenen Proteine zeigte im Gel zwar Banden, jedoch konnten diese nicht eindeutig dem Molekulargewichtsbereich zugeordnet werden, welcher dem von Myostatin entspricht.

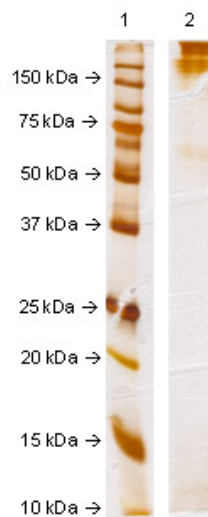


Abb. 17 Affinitätschromatografie von humanem Muskelextrakt mittels ID1308 gekoppelter Säule. Silberfärbung eines 12,5%igen Polyacrylamid-Gels. Spur 1: Biorad Rainbow Marker 3 μ l; Spur 2: Eluat der Affinitätschromatographie mit ID1308 gekoppelter Säule.

Durch Verwendung der 5-fachen Menge an pulverisierter Muskulatur (5 g Ausgangsmaterial) konnte das Elutionsprofil der Gelfiltration wiederholt werden. Die Bandenstärke in der Silberfärbung war wesentlich deutlicher und einige Fraktionen wurden mittels Zentrifugen - Ultrafiltration (5 kDa Ausschlussgröße) eingengt.

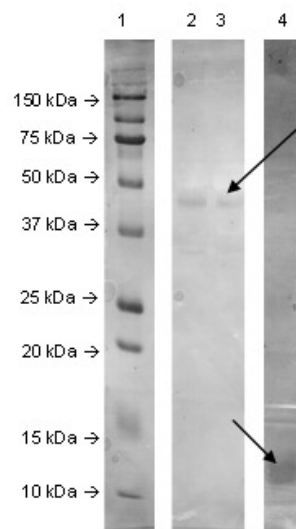


Abb. 18 Western Blot von Gelfiltrationschromatographie Fraktionen. 12,5%ige SDS-PAGE; transferiert auf Nitrozellulose Membran. Detektionsantikörper ID1308 1:100 in PBS+0,05% Milchpulver. Sekundärer Antikörper goat- α -rabbit-POX 1:15000 in PBS. DAB-Färbung. Spur 1: *Biorad Rainbow* Marker 3 μ l. Die Fraktionen 41 (Spur 2), 45 (Spur 3) sowie 65 (Spur 4) aus der Gelfiltrationschromatographie wurden 10x aufkonzentriert. Die Pfeile zeigen auf positive Banden bei \sim 45 kDa sowie \sim 12,5 kDa.

Der Nachweis im Western Blot mit diesen eingeeengten Fraktionen erfolgte wieder mit dem Antikörper ID1308 und verlief positiv. Sowohl in den Fraktionen 41 und 45 als auch in Fraktion 65 waren Banden erkennbar, welche von Ihrem Molekulargewicht Myostatin zugeordnet werden können. In den Fraktionen 41 und 45 wird bei etwa 45 kDa das Gesamt-Myostatin vermutet und in Fraktion 65 bei etwa 12,5 kDa der C-terminale und damit biologisch aktive Teil.

3.6. Herstellung von rekombinantem Myostatin

Zur Gewinnung von Antikörpern und der damit verbundenen Immunisierung sind meist größere Proteinmengen erforderlich. Es ist davon auszugehen, dass bis zur vollständigen Entwicklung eines Messsystems zur quantitativen

Bestimmung eines Antigens mehrere Milligramm dieses Proteins notwendig sind. Durch die Überexpression eines solchen Proteins in Zellen, welche relativ einfach in Kultur zu halten sind, ist es in der Regel möglich, eben diese benötigten Mengen an Antigen künstlich herzustellen.

3.6.1 Rekombinante Expression von humanem Myostatin

Zur rekombinanten Expression von humanem Myostatin wurde die benötigte cDNA mittels RT-PCR aus juveniler, humaner Skelettmuskel-mRNA generiert. Die Myostatin cDNA wurde mit den entsprechenden Primern mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert und in die multiple Klonierungsseite des Vektors pCEP-PU inseriert. Bei dem verwendeten Vektor handelt es sich um ein Plasmid, welches speziell für die Expression in eukaryotischen Zellen geeignet ist. Der Vektor trägt den Startpunkt (ori) des Epstein-Barr-Virus, wodurch er in Anwesenheit des Replikationsfaktors EBNA-1 daher ständig repliziert wird. Um die Selektion zu vereinfachen, trägt der Vektor ein Puromycin-Resistenzgen. Des Weiteren befindet sich die multiple Klonierungsseite (MCS) im Leseraster hinter dem Signalpeptid des BM-40 Proteins, wodurch gewährleistet werden kann, dass das Protein in das Medium sekretiert wird. Das durch dieses Konstrukt exprimierte Protein erhielt zusätzlich am carboxyterminalen Ende einen Anhang von sechs Histidin-Resten, welches die Aufreinigung des Myostatin aus dem Zellkulturmedium erleichtern sollte.

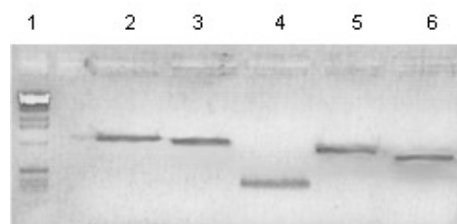


Abb. 19 Agarose-Gelelektrophorese der unterschiedlichen Myostatin Konstrukte I bis V. Konstrukt I entspricht der DNA des gesamten Myostatin. Konstrukt II ist das Myostatin ohne Signalpeptid. Bei Konstrukt III handelt es sich lediglich um den C-terminalen Abschnitt. Konstrukt IV ist die DNA des Propeptids inklusive und dementsprechend Konstrukt V das Propeptid von Myostatin exklusive des Signalpeptids.

Durch Sequenzierung (siehe Anhang) konnte der DNA-Abschnitt in den rekombinanten Vektoren analysiert werden. Nach dieser Verifikation wurde die DNA des Konstrukt I für die Transfektion von HEK 293 EBNA Zellen durch Elektroporation verwendet. Es handelt sich bei den HEK 293 EBNA Zellen um eine Zelllinie, deren Ursprung eine humane, embryonale Niere ist und die den Replikationsfaktor EBNA-1 stabil in ihr Genom integriert hat und ihn somit kontinuierlich produziert. Die Kombination aus diesen verwendeten Zellen und dem oben erwähnten Vektor pCEP-Pu gewährleistet also eine kontinuierliche Expression des Proteins mit einer nahezu natürlichen Faltung und ebensolchen posttranslationalen Modifikationen.

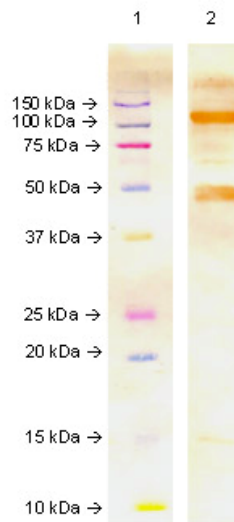


Abb. 20 Qualitätskontrolle der Expression von rekombinantem Myostatin (*full length*) aus HEK 293 EBNA – Zellen. Western Blot - DAB gefärbt – zum Nachweis von rekombinantem Myostatin nach Auftrennung eines Ni^{2+} -Chelat gereinigten Zellkulturüberstandes mittels einer 12,5%igen SDS-PAGE. Detektionsantikörper mouse- α -6xHis (Fa.Dianova) 1:200 in PBS mit 0,01% Milchpulver; Sekundärantikörper goat- α -mouse-POX 1:5000 in PBS mit 0,01% Milchpulver. Spur 1: *Biorad Rainbow* Marker 3 μl ; Spur 2: 3 μg rekombinantes Myostatin (*full length*).

Im Anschluss an die Transfektion der Zellen wurde nach einer zweitägigen Ruhephase eine Selektion durch Zugabe von 0,5 μg / ml Puromycin ins Medium durchgeführt. Der FCS-freie Zellkulturüberstand wurde gesammelt, mit Hilfe

einer Ni^{2+} - Chelat – Säule gereinigt und mittels eines Antikörpers, welcher spezifisch den 6 x His-Tag des exprimierten Proteins erkennt, nachgewiesen. In Abb. 20 sind deutliche Banden bei ~45 kDa und bei ~100 kDa zu erkennen. Bei diesen Banden handelt es sich um das Monomer sowie das Dimer des Gesamt-Myostatins. Eine sehr schwache Bande ist bei ~15 kDa erkennbar, welche auf den C-terminalen Teil von Myostatin hinweist.

3.6.2 Sequenzierung von rekombinantem Myostatin

Zur Kontrolle, ob es sich bei dem exprimierten Protein tatsächlich um humanes Myostatin handelt, wurde zunächst Zellkulturüberstand mit Hilfe einer SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF Membran transferiert. Da deutlich mehr Proteinbanden bei der Färbung der Membran zu erkennen waren als bei Myostatin zu vermuten gewesen wäre, wurden zwei Elektrophoresen durchgeführt. Bei der einen SDS-PAGE wurde ein 12,5%iges Trenngel verwendet, um die Proteine im niederen Molekulargewichtsbereich besser auftrennen zu können. Für die zweite Auftrennung wurde ein 8%iges Trenngel verwendet, da dieses die Möglichkeit bietet, im mittleren Molekulargewichtsbereich (37 bis 90 kDa) eine gute Auftrennung der Proteine zu erreichen. Die verwendeten Gele waren besonders dick (1,5 mm) und hatten sehr breite Taschen, um ein großes Probenvolumen auftragen zu können, um dadurch intensivere Proteinbanden und somit auch zuverlässige Sequenzierungsergebnisse zu erhalten.

Nach dem Transfer auf die PVDF Membran wurde eine Coomassie Färbung durchgeführt, die Membran luftgetrocknet und die Proteinbanden unter sterilen Bedingungen herausgeschnitten. Die Sequenzierung erfolgte am Institut für Peptidforschung (IPF PharmaCeuticals GmbH, Hannover).

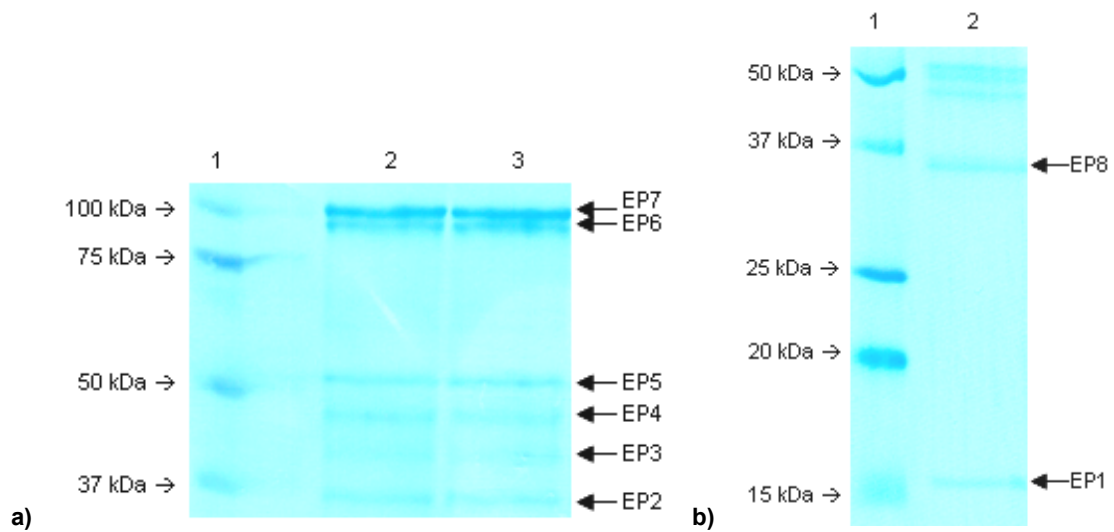


Abb. 21 Coomassie Färbung von Sequenzierungsblots auf PVDF Membran nach SDS-PAGE: a) 8% Trenngel. Spur 1: *Biorad Rainbow* Marker 4 µl; Spur 2 und 3: je 6 µg rekombinantes Myostatin. EP2 bis EP7 geben die herausgeschnittenen Proteinbanden an, welche sequenziert wurden b) 12,5% Trenngel. Spur 1: *Biorad Rainbow* Marker 4 µl; Spur 2: 6 µg rekombinantes Myostatin. EP1 und EP8 zeigen die Banden an, welche sequenziert wurden.

Die Sequenzierung der Proben EP1 und EP5 konnte nicht ausgewertet werden, da hier die Signalintensität zu gering bzw. keine lesbaren Signale vorhanden waren.

Tab. 2 Tabellarische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse der Proben EP1 bis EP8 von rekombinantem Myostatin. Probe EP1 und EP5 lieferten bei der Sequenzierung kein auswertbares Ergebnis. Bei nicht eindeutigen Signalen im Abbauschnitt wurden die Aminosäuren mit den deutlichsten Signalen wiedergegeben. Die Darstellung dieser Aminosäuren erfolgt in Klammern (z.B. (EG)), wobei das stärkere Signal zuerst genannt wird.

Probe Nr.	gelesene Sequenz
EP1	nicht lesbar
EP2	N E N S E Q K E N V E (KR) R E (GR) L
EP3	N S(?) E – K E N V E K E G L
EP4	(FE) (NE) (SL) (ED) (QR) K (EN?) (NP) (VRL) (EG) (KT) (EP) (GRL) (L)
EP5	Signalintensität zu gering
EP6	(NG) (EP) (NV) (SD) (EL) (QN) K (EN) (NS) V E K E G L
EP7	(NG) (EP) (NV) (SD) (EL) – (KE) E (NV) (VP) E K E G L
EP8	(NG) (EP) (NV) (SD) (EL) Q K E N V E K E G L

Die Proteinbanden der Proben EP2 bis EP5 sowie EP8 befanden sich alle in einem Molekulargewichtsbereich von 37 bis etwa 50 kDa. In diesem Bereich liegt das theoretische Molekulargewicht von humanem Myostatin mit 42754 Da. Das Molekulargewicht der Proben EP6 und EP7 liegt zwischen 75 und 100 kDa. Nach theoretischen Überlegungen sollte also in diesem Bereich das Myostatin-Dimer (~84 kDa) zu finden sein.

```

          *           20           *           40           *
Myo      : MQKLQLCVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKS : 50
EP2      : -----NENSEQKENVEKEGL----- : 15
EP3      : -----NSE-KENVEKEGL----- : 12
EP4      : -----ENSEQKENVEKEGL----- : 14
EP6_1    : -----NENSEQKENVEKEGL----- : 15
EP6_2    : -----GPVDLNKNS-----VEKEGL----- : 15
EP7_1    : -----NENSEQKENVEKEGL----- : 15
EP7_2    : -----GPVDLNKNS-----VEKEGL----- : 15
EP8_1    : -----NENSEQKENVEKEGL----- : 15
EP8_2    : -----GPVDL-----QKENVEKEGL----- : 15
          ns   kenVEKEGL

```

Abb. 22 Sequenz-Alignment des Sequenzierungsergebnisses. Myo sind die ersten 50 Aminosäuren des humanen Myostatin. EP2 bis EP8_2 sind die Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen Proben, wobei z.B. EP8_1 bzw. EP8_2 die verschiedenen Möglichkeiten der Sequenzinterpretation darstellen. Gelb hinterlegt sind diejenigen Aminosäuren, welche mit der Sequenz des Myostatin übereinstimmen. Rot hinterlegt sind differente Aminosäuren bzw. Lücken im Raster.

Wie in Abb. 22 und Tab. 2 zu erkennen, waren die Signale der Sequenzierung nicht immer deutlich oder die Intensität zu gering, um sichere Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz machen zu können. Teilweise waren die Proben nicht sauber genug, so dass mehrfach zwei oder gar drei Aminosäuresignale mit derselben Intensität zu erkennen waren. Bei der Probe EP4 konnte zudem eine zweite, parallele Sequenz festgestellt werden, welche auf eine Verunreinigung mit Acetyltransferase schließen lässt. Die Sequenzierungsergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass es sich bei dem rekombinanten Protein um Myostatin handelt. Alle Sequenzierungsergebnisse zeigen, dass das Signalpeptid nicht oder nicht vollständig vorhanden ist. Auch bei den Proben EP6 und EP7, deren Molekulargewicht etwa doppelt so hoch war wie das der anderen Proben, konnte die N-Terminale Sequenz des Myostatin gezeigt werden.

3.6.3 Furin – Verdau von rekombinantem Myostatin

Da Myostatin eine enzymatische Schnittstelle des Typs -RSRR- besitzt, welche die Erkennungssequenz für das Enzym *Furin* darstellt, konnte zur weiteren Qualitätskontrolle des rekombinant hergestellten Materials ein enzymatischer Verdau durchgeführt werden um festzustellen, ob die Transkription und Translation in den HEK 293 EBNA Zellen korrekt abgelaufen sind.

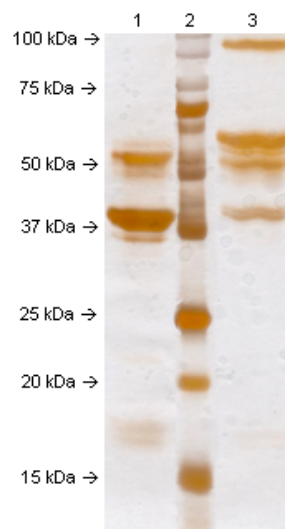


Abb. 23 SDS-PAGE von rekombinantem Myostatin vor und nach enzymatischem Verdau mit *Furin*. Silberfärbung eines 12,5%igen Trenngels. Spur 1: 3,4µg rekombinantes Myostatin + 6U *Furin* ÜN 30°C. Spur 2: *Biorad Rainbow Marker* 4 µl. Spur 3: rekombinantes Myostatin 3,4 µg ohne *Furin* (-20°C gelagert).

Die Silberfärbung der SDS-PAGE der verdauten und der unverdauten Probe zeigte deutliche Unterschiede. Das unverdaute Myostatin (Spur 3) wies eine charakteristische Bande bei 37 kDa, mehrere Banden bei etwa 50 kDa und eine weitere, deutliche Bande bei ca. 100 kDa auf. Nach enzymatischem Verdau mit der Protease Furin (Spur 1) war die Bande bei etwa 100 kDa nicht mehr zu erkennen. Die Anzahl und Intensität der Banden um 50 kDa wurde deutlich geringer, allerdings nahm die Intensität der Proteinbanden bei 37 kDa und auch bei etwa 15 kDa deutlich zu. Dies lässt darauf schließen, dass das Enzym das rekombinante Protein direkt hinter der Schnittstelle -RSRR- gespalten hat und somit in der Probe (Spur 1) hauptsächlich Propeptid und der

C-terminale, biologisch aktive Teil vorlagen. Bei der relativ deutlichen Proteinbande bei etwa 50 kDa in Spur 1 kann es sich auch um *Furin* handeln, welches ein Molekulargewicht von etwa 57 kDa hat.

3.7. Charakterisierung verschiedener Antikörper

3.7.1 Antikörper aus Kaninchen gegen synthetische Peptide

Zu Beginn der Arbeit waren bereits verschiedene Antikörper aus Kaninchen vorhanden, welche durch Immunisierung mit unterschiedlichen, synthetischen Myostatin Peptiden erhalten wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Antiseren die jeweiligen Antigene erkennen, es standen lediglich die Peptide zur Verfügung, jedoch kein Myostatin mit voller Länge. Die Antikörper der beiden Kaninchen je eines Codes zeigten jeweils denselben Titer für ihr Antigen.

Tab. 3 Auflistung verschiedener Kaninchen-Antiseren und den Peptidsequenzen, welche zur Immunisierung verwendet wurden.

Code	Kaninchen – Nr.	AS – Nr.	Sequenz
RA 2864	1135	102 – 115	SDGSLEDDDYHATT
	1136		
RA 2923	1307	319 – 332	QKYPHTHLVHQANP
	1308		
RA 2978	1442	349 – 364	NMLYFNGKEQIIYGKI
	1443		

Erst als das rekombinante Myostatin vorhanden war, konnte überprüft werden, ob die Antikörper das Gesamtprotein erkennen. Hierzu wurde ein Western Blot durchgeführt, bei dem zusätzlich GDF-11 sowie Myoglobin aufgetragen wurde.

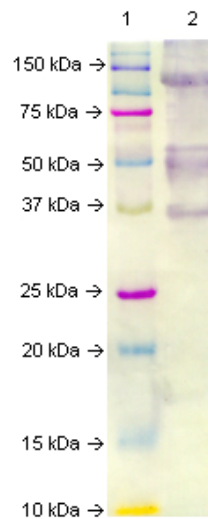


Abb. 24 Überprüfung der Spezifität des Antikörper ID1307. Western Blot - TMB gefärbt - einer 12,5%igen SDS-PAGE von Marker (Spur 1) sowie rek. Myostatin (Spur 2). Nicht gezeigt, GDF-11 sowie Myoglobin, welche kein Signal zeigten. Antikörperkonzentration des ID1307 1:100. Detektionsantikörper goat- α -rabbit POX 1:5000.

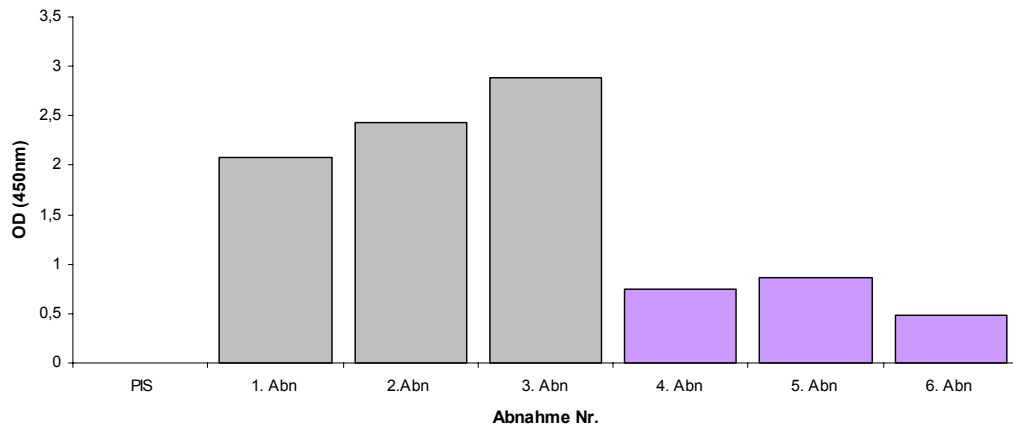
In der Abbildung oben wird beispielhaft der Western Blot mit dem Antikörper ID1307 gezeigt, welcher die typischen Banden für Myostatin erkennt. Die Antikörper der Kaninchen RA 2864 (Antikörper ID1135 und ID1336) sowie der Kaninchen RA 2978 (Antikörper ID1442 und ID1443) detektieren weder rekombinantes Myostatin noch GDF-11 oder Myoglobin. Lediglich die Antiseren der Kaninchen RA 2923 (Antikörper ID1307 und ID1308) binden rekombinantes Myostatin, jedoch nicht GDF-11 oder Myoglobin.

3.7.2 Antikörper aus Kaninchen gegen rekombinantes Myostatin

Zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen Myostatin wurde ein Kaninchen mit rekombinantem Myostatin und ein Kaninchen mit Myostatin, an welches zuvor KLH gekoppelt wurde, um die Antigenizität zu erhöhen, immunisiert, in regelmäßigen Abständen nachimmunisiert und eine Serumprobe abgenommen.

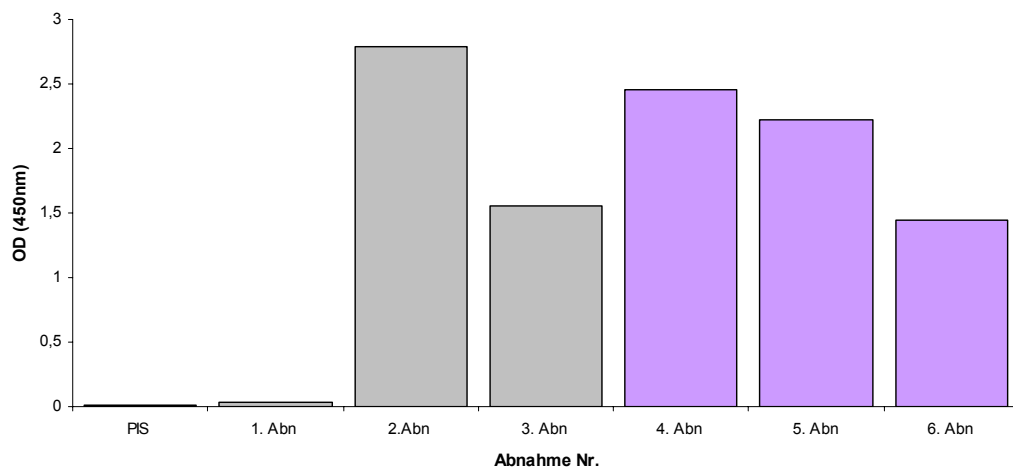
Um den Erfolg der Immunisierung zu überprüfen, wurde der Titer dieser Blutproben bestimmt und graphisch ausgewertet.

Titerverlauf rabbit-anti-rec.Myo bei 1:45000 in PPGNE



a)

Titerverlauf rabbit-anti-rec. Myo KLH bei 1:120000 in PPGNE



b)

Abb. 25 Titerverlauf von 2 verschiedenen Kaninchen-Immunisierungen. a) Titerverlauf der Antiseren des Kaninchens 1, welches mit rekombinantem Myostatin immunisiert wurde. Verdünnung des Antikörpers 1:45000 in PPGNE 2%BSA die violetten Balken dienen zur Verdeutlichung, dass es sich bei diesen Abnahmen um Antiseren aus Kaninchen 2 (ursprünglich gegen rek. Myo KLH immunisiert) handelt. b) Titerverlauf des Kaninchens 2, welches mit rek. Myo KLH immunisiert wurde. Vor der 4. Abnahme wurde das Antigen geändert und ab dieser Immunisierung reines rek. Myostatin verwendet (violett dargestellt).

Das Kaninchen, welches als Antigen rekombinantes Myostatin erhalten hatte, zeigte bereits bei der 1. Abnahme eine deutliche Immunreaktion. Bereits diese Serumprobe musste 1:45000 verdünnt werden, um ein auswertbares Signal zu erhalten. Die folgenden beiden Abnahmen wiesen einen noch höheren Titer als die erste Abnahme auf. Das Kaninchen, welches rek. Myo-KLH als Antigen erhalten hatte, zeigte erst bei der 2. Abnahme einen deutlichen Antikörpertiter, der jedoch nur bei einer Verdünnung von 1:12000 deutlich erkennbar ist.

Da das Kaninchen, welches mit rekombinantem Myostatin immunisiert worden war, nach der 3. Abnahme gestorben ist, wurde das andere Kaninchen ab diesem Moment mit rekombinantem Myostatin und nicht mehr mit KLH gekoppeltem Myostatin immunisiert (violette Balken in der oben abgebildeten Grafik). Wie zu erkennen ist, nahm die Immunantwort zunächst bei der 4. Abnahme wieder zu, flachte jedoch dann trotz weiterer Booster-Impfungen ab. Für weitere Versuche in dieser Arbeit wurde stets die 3. Serumabnahme des verstorbenen Kaninchens verwendet, da diese den höchsten Antikörpertiter gezeigt hatte.

Durch die Anfertigung eines Western Blots konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Antiserum aus diesem Kaninchen um ein echtes polyklonales Serum handelt, welches alle Untereinheiten des rekombinanten Myostatin erkennen kann.

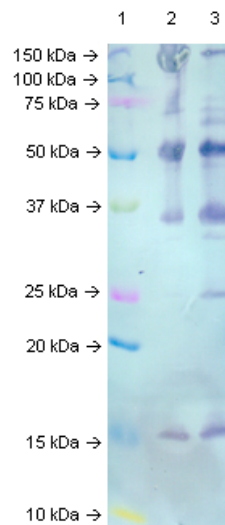


Abb. 26 Überprüfung der Spezifität des Antikörper r- α -rek. Myo (3.Abn). Western Blot – TMB gefärbt – einer 12,5%igen SDS-PAGE. Spur 1: Marker, Spur 2: rekombinantes Myostatin, Spur 3: rekombinantes Myostatin nach Verdau mit Furin (30°C ÜN).

Zusätzlich zum rekombinanten Myostatin wurde auf diesem Western Blot rekombinantes Myostatin aufgetragen, welches zuvor über Nacht bei 30°C mit Furin verdaut worden war. Nach Inkubation des Western Blots mit diesem polyklonalen Kaninchenserum konnten alle Proteinuntereinheiten des Myostatin erkannt werden.

Diese Beobachtung konnte durch die Durchführung eines Peptid-mappings unterstützt werden. Hierfür wurden Nunc®Peptide Immobilizer Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen, synthetischen Peptiden aus humanem Myostatin beschichtet und die Antikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetragen.

Tab. 4 Tabellarische Auflistung der verwendeten Peptide von human-Myostatin (soweit nicht anders angegeben)

Peptid Name	AS – Sequenz	Ursprung
Peptid 1	SDGSLEDDDYHATT	Propeptid
Peptid 2	QVDGKPKCCFFKFSSKIQYNK	Propeptid
Peptid 3	DLNEGSEREENVEKEGLL	Propeptid (Maus)
Peptid 4	QKYPHTHLVHQANP	C-Terminus
Peptid 5	PINMLYFNGKEQIIYGKI	C-Terminus
Peptid 6	NMLYFNGKEQIIYGKI	C-Terminus

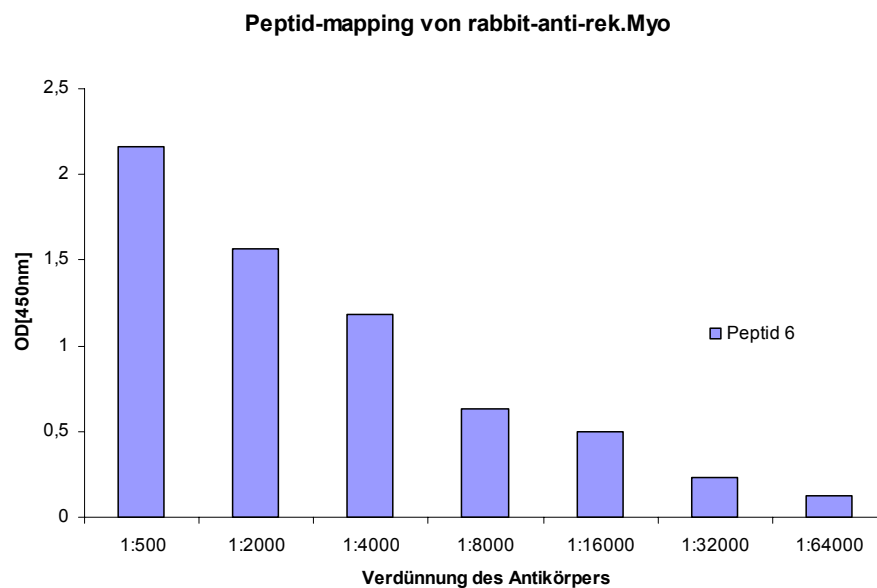


Abb. 27 Beispielhafte Darstellung einer Titerbestimmung. Titerbestimmung von rabbit-anti-*rek.Myo* (3.Abn) auf einer Mikrotiterplatte mit einer Beschichtung von 5 ng / ml Peptid 6. Der deutliche Abfall der Extinktion deutet darauf hin, dass der Antikörper das Antigen spezifisch erkennt. Es wurde auf die Darstellung der anderen Peptide verzichtet, da hier der Verlauf identisch verlief.

Zur Detektion wurde ein sekundärer Antikörper der Firma Dianova (*goat- α -rabbit* POX 1:5000 in HRP) verwendet. Alle Peptide konnten vom Antikörper

rabbit- α -rek. Myo (3.Abn) in gleichem Maße erkannt werden. Auch bei der Bestimmung des Peptids aus dem Propeptid von Maus-Myostatin zeigte der Antikörper denselben Titer ($OD_{\text{Titer}} = 0,6 \rightarrow$ entspricht etwa 1:8000) wie bei den anderen verwendeten Peptiden. Daher kann dieses polyklonale Antiserum vermutlich zusätzlich für die Detektion von Gesamt-Myostatin in Mäuseproben eingesetzt werden.

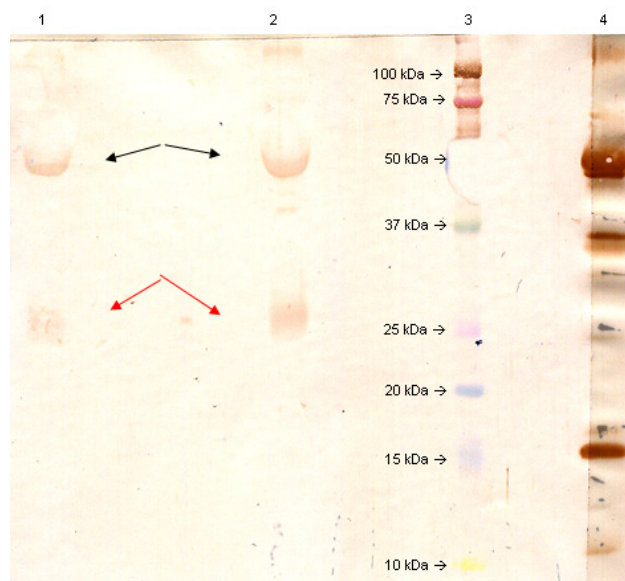


Abb. 28 Identifizierung von Patientenproben mit r- α -rek. Myo (3.Abn). Western Blot – DAB-gefärbt – einer 12,5%igen SDS-PAGE von Spur 1: Patient *Low-Control* Serum, Spur 2: Patient *High-Control* Serum, Spur 3: Marker sowie Spur 4 rekombinantes Myostatin. Die schwarzen Pfeile weisen auf typische Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa hin, welche Gesamt-Myostatin darstellen können. Die roten Pfeile deuten auf eine Proteinbande, bei ca. 25 kDa, welche das Dimer des C-terminalen Teiles von Myostatin darstellen könnte.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ein Immunoassay mit diesem Antikörper aufgebaut und verschiedene Patientenplasmen gemessen. Aus diesen Patientenkollektiven wurden 2 Plasmen ausgewählt, von denen das eine in einem besonders niedrigen Konzentrationsbereich und das andere in einem

sehr hohen Konzentrationsbereich lag. Mit diesen Plasmen wurde ein Western Blot durchgeführt und mit dem im Assay verwendeten Antikörper detektiert. Wie aus der Abbildung zu erkennen, waren nicht alle Banden, welche bei rekombinantem Myostatin in der Regel zu erkennen sind, detektierbar. Deutlich war jedoch der Unterschied zwischen der Plasmaprobe mit dem niedrigen Level (*Low-Control* Plasma) und derjenigen mit einer hohen Konzentration (*High-Control* Plasma) zu sehen. Während bei beiden Proben die Proteinbande bei etwa 50 kDa (welches ungefähr dem MG von Myostatin entspricht) in etwa gleich stark ausgebildet war, so war bei der Probe, welche im ELISA ein stärkeres Signal gezeigt hatte, bei etwa 25 kDa eine deutliche Bande zu erkennen, die bei dem *Low-Control* Plasma nur sehr schwach ausgeprägt war. Bei dieser Bande handelt es sich vermutlich um das Dimer des biologisch aktiven C-Terminus von Myostatin, welcher ein Molekulargewicht von etwa 25 kDa hat.

3.7.3 Antikörper aus Eidotter

Da Vögel aus evolutionärer Sicht relativ weit von Säugetieren entfernt sind, eignen sich Hühner meist sehr gut dazu, Antikörper gegen hoch konservierte Säugetierproteine zu gewinnen. Die Antikörper der Klasse IgG werden bei Vögeln aus dem Eidotter gewonnen und werden daher IgY genannt. (IgY *immunglobulin from yolk*). Diese Art der Antikörpergewinnung bietet den Vorteil, dass die Tiere lediglich in regelmässigen Abständen immunisiert werden müssen, aber sie dann keinem zusätzlichen Stress durch eine Blutabnahme ausgesetzt werden müssen, da nur die Eier eingesammelt werden, aus welchen die IgY-Fractionen gewonnen werden.

Zur Gewinnung von Hühner Antikörpern wurden 2 Hühner immunisiert. Bei Huhn 1 wurde rekombinantes Myostatin als Antigen verwendet, wohingegen bei Huhn 2 KLH gekoppeltes Myostatin zum Einsatz kam. Alle Eier der beiden Hühner wurden gesammelt und bei 2-8°C bis zur Antikörperaufreinigung gelagert.

Zur Überprüfung des Immunisierungserfolges wurde vor der ersten Immunisierung ein Ei gesammelt (PIE = Prä-Immun-Ei) und aus diesem ebenfalls die IgY Fraktion gereinigt. Es wurden insgesamt 5 verschiedene Aufreinigungen durchgeführt, wobei für die jeweiligen Aufreinigungen die Eidotter mehrerer Eier eines Monats vereinigt wurden. Die so entstandenen IgY-Fractionen wurden analog den jeweiligen Monaten bezeichnet.

Für die Überprüfung des Titers der IgY-Fractionen wurden Platten mit rek. Myostatin in der Konzentration 100 ng / well beschichtet und die verbliebenen freien Bindungsstellen mit verschiedenen Blockierungslösungen blockiert.

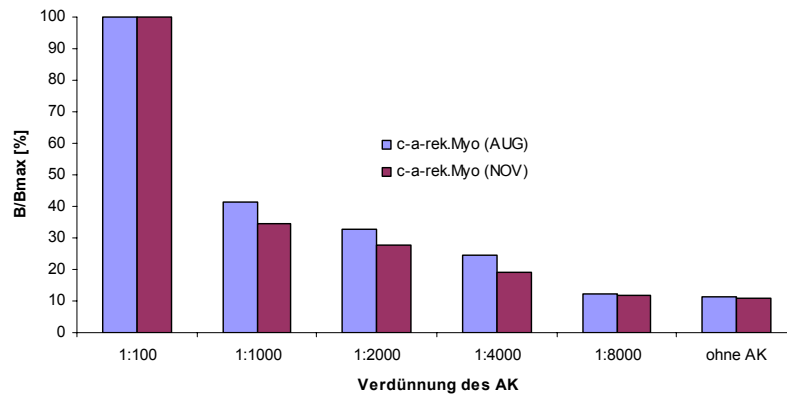
Bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:100 wurde zudem überprüft, ob die IgY-Fraktion spezifisch das Antigen erkennt oder aber mit der Blockierungslösung kreuzreagiert.

Tab. 5 Tabellarische Darstellung der Untersuchung eines geeigneten Blockierungsmediums für Antikörper aus Eidotter. Spalte A zeigt die optische Dichte (OD 450 nm) bei einer Antikörperverdünnung von 1:100 auf einer definierten Blockierungslösung. Spalte B zeigt die optische Dichte (OD 450 m) bei einer Antikörperverdünnung von 1:100 ohne Beschichtung der Mikrotiterplatte. In Spalte ΔAB wird die Differenz der beiden Spalten A und B gebildet, um zu verdeutlichen, dass bei den meisten Blockierungslösungen eine Kreuzreaktivität hervorgerufen wird. Nur die Blockierung mit PPGNE deutet auf ein spezifisches Signal hin (gelbe Markierung). Bei dem hier verwendeten Antikörper handelt es sich um chicken – α – rek. Myo (NOV).

Blockierungslösung	A	B	ΔAB
	AK 1:100	AK 1:100	
Tris Casein	1,332	1,512	-0,180
PPGNE	0,518	0,056	0,462
PBS 2% BSA	1,715	1,704	0,011
PBS Casein	1,165	1,106	0,059
PBS 2% FCS	1,329	1,217	0,112
PBS 1% Fischgelatine	0,738	0,432	0,306

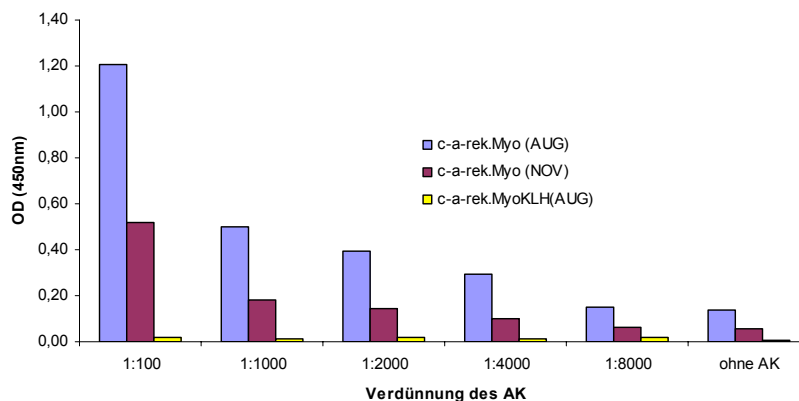
In der oben stehenden Tabelle wird beispielhaft die Wirkung der unterschiedlichen Blockierungslösungen gezeigt. Alle IgY-Fractionen zeigten, sofern überhaupt eine Immunreaktion erkennbar war, dasselbe Verhalten bezüglich der Blockierungslösungen. Hierbei erwies sich PPGNE als das beste Blockierungsmedium mit den geringsten unspezifischen Bindungen.

Titervergleich von 2 IgY Fraktionen



a)

Titervergleich von 3 IgY-Fractionen



b)

Abb. 29 Grafische Darstellung zur Vergleich verschiedener Antikörperaufreinigungen aus Eidotter. a) Vergleich der Titer von 2 unterschiedlichen IgY Fraktionen. Blau dargestellt ist die Fraktion eines gepoolten Antikörpers aus Eiern des Monats August generiert gegen rekombinantes Myostatin. Rötlich dargestellt der Titer eines Antikörpers aus den gepoolten Eiern des Monats November. Darstellung erfolgt prozentual als B / Bmax unter Angabe der verwendeten Verdünnungsstufen auf der X-Achse. b) Vergleich der absoluten optischen Dichten derselben Antikörper wie unter a) jedoch zusätzlich dargestellt der Titer eines anderen Antikörpers eines Huhns, welches mit KLH gekoppeltem Myostatin immunisiert wurde. Darstellung der optischen Dichte (450 nm) auf der Y-Achse zur Verdeutlichung des Unterschiedes des Titers der verschiedenen Antikörperpräparationen.

Die oben stehenden Abbildungen verdeutlichen, dass die verschiedenen Antikörperpräparationen sehr unterschiedliche Qualitäten an Antikörpern aufweisen können. Die Ergebnisse der Antikörperaufreinigung des Prä-Immunei sowie die Aufreinigung *c- α -rek. MyoKLH (NOV)* wurde auf den oben stehenden Grafiken nicht dargestellt, da sich diese mit den Ergebnissen der Aufreinigung des Antikörpers *c- α -rek. MyoKLH (AUG)* decken. Die beste Präparation stellt der Antikörper *c- α -rek. Myo (AUG)* dar, da diese auch bei einer Verdünnung von 1:1000 noch ein deutliches Signal ($\sim 0,5$ OD) im ELISA zeigte. Die Eier des Huhnes, welches mit KLH gekoppeltem, rekombinantem Myostatin immunisiert wurde, scheinen keine bzw. nur einen sehr geringen Anteil spezifischer Antikörper zu enthalten. Daher wurde in nachfolgenden Versuchen auf die Verwendung dieser Antikörper (*c- α -rek. MyoKLH (AUG)* und *c- α -rek. MyoKLH (Nov)*) verzichtet.

3.7.4 Monoklonale Antikörper aus Mäusen

Durch die Generierung von monoklonalen Antikörpern ist es möglich, hochspezifische Antikörper zu erhalten, welche in nahezu unbegrenzter Menge verfügbar sind. Im vorliegenden Fall wurden 2 Mäuse mit rekombinantem Myostatin immunisiert, wobei das Immunisierungs-Antigen einer Maus (Maus 2) an KLH gekoppelt vorlag.

Vorversuche zeigten, dass die Antikörperproduktion in der Maus mit ungekoppeltem Myostatin (Maus 1) stärker war, und da Maus 2 aufgrund einer Erkrankung frühzeitig getötet werden musste, wurde auf die Immunisierung einer weiteren Maus verzichtet.

Nach Fusionierung der Milzzellen mit Myelomazellen zu Hybridomzellen wurden die Zellkulturüberstände nach jeder Klonierung getestet. Nach zahlreichen Subklonierungsvorgängen wurden 2 Zellkulturüberstände für weitere Testungen ausgewählt und ein größeres Volumen an Zellkulturüberstand gewonnen.

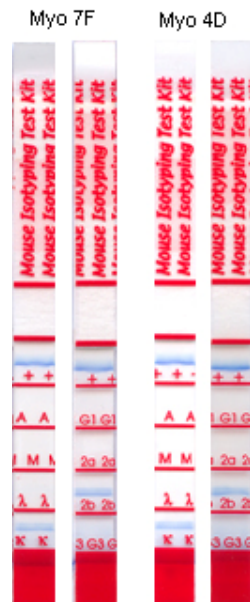


Abb. 30 Isotypisierung von Maus-Antikörpern. Verwendet wurde das *Mouse Isotyping Test Kit* der Fa. Serotec bei dem Teststreifen zur Verwendung kommen, die auf der einen Seite die Klasse und auf der anderen den Subtypen anzeigen. Links im Bild Vorder- und Rückseite des Teststreifens für die Isotypisierung des Antikörpers *Myo 7F*, bei dem es sich um einen Antikörper der Klasse IgG2bk handelt. Rechts im Bild Vorder- und Rückseite des Teststreifens für die Isotypisierung des Antikörpers *Myo 4D*, bei dem es sich ebenfalls um einen Antikörper der Klasse IgG2bk handelt.

Durch Isotypisierung dieser Zellkulturüberstände konnte gezeigt werden, dass es sich bei den beiden Klonen *Myo 7F* und *Myo 4D* um Antikörperklone der Klasse IgG2bk handelt. Die beiden Klone verhielten sich in nachfolgenden Versuchen identisch.

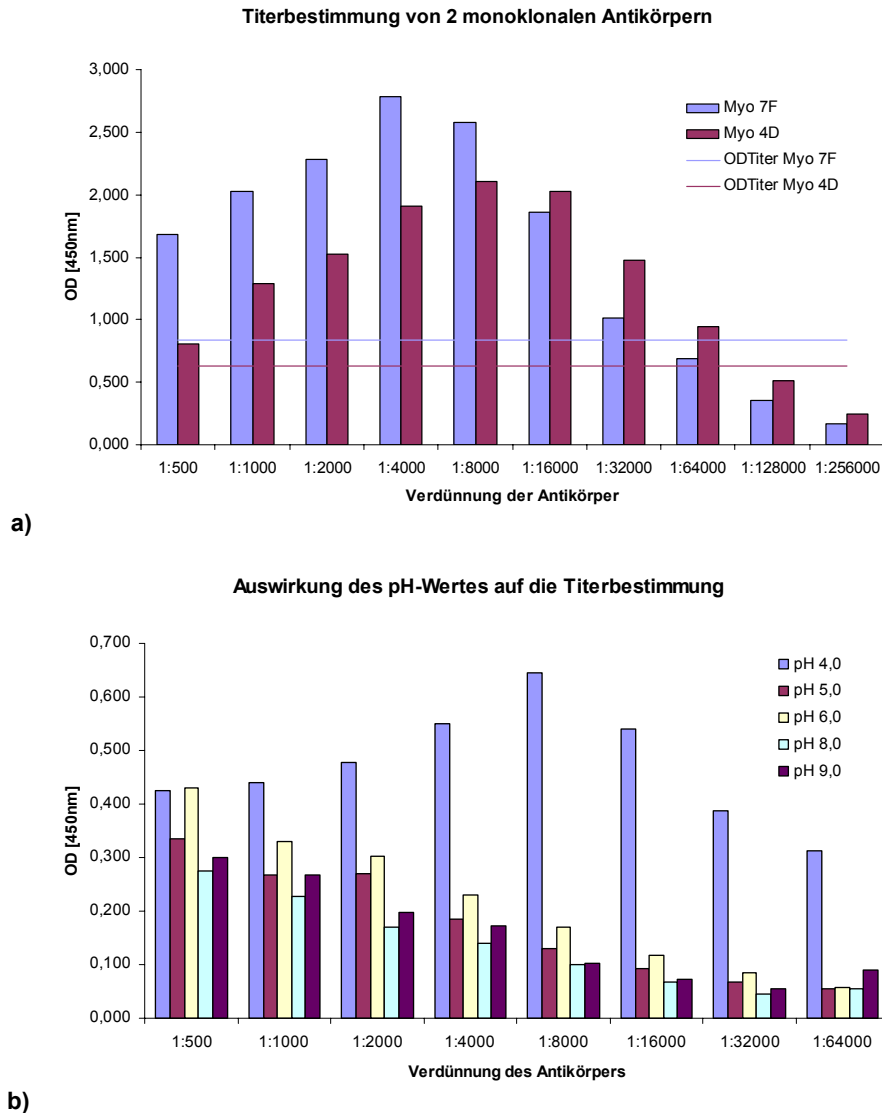


Abb. 31 Titerbestimmung von Mausantikörpern. a) Graphische Darstellung der Titerbestimmung der Myostatin Antikörper Myo 7F (blau) und Myo 4D (rot) und Verwendung eines Citratpuffers pH 3,0. Zunächst Anstieg der optischen Dichte bis zu einer Verdünnung von 1:4000 bis 1:8000, danach Abfall der optischen Dichte; ab 1:32000 bis 1:64000 etwa Halbierung der optischen Dichte. b) Graphische Darstellung der Auswirkung der Verwendung unterschiedlicher Puffer bei der Titerbestimmung (AK Myo 7F). Es findet keine Halbierung der optischen Dichten statt. Nur bei pH 4,0 kann ein Verdünnungsprofil erreicht werden, welches annähernd dem von a) entspricht. pH-Werte größer pH 4,0 zeigen kein spezifisches Bindungsverhalten der Antikörper. Beschichtung 50 µg / ml rek. Myostatin, Sekundärer Antikörper *goat-α-mouse* POX 1:5000 in HRP-Stablösung.

Die Titerbestimmung der beiden monoklonalen Antikörper wurde in einem Citratpuffer pH 3,0 durchgeführt, da die Verwendung von anderen Puffern bei der Titerbestimmung zu nicht zufrieden stellenden Ergebnissen führte. Abb. 31 b) zeigt, dass die Bestimmung der optimalen Verdünnung der Antikörper bei pH Werten größer pH 3,0 nicht möglich ist. Nach der Formel $OD_{\text{Titer}} = OD_{\text{max}} * 0,3$ ergibt sich ein Titer von etwa 1:32000 für den Antikörper Myo 7F sowie ein Titer von etwa 1:64000 für den Antikörper Myo 4D.

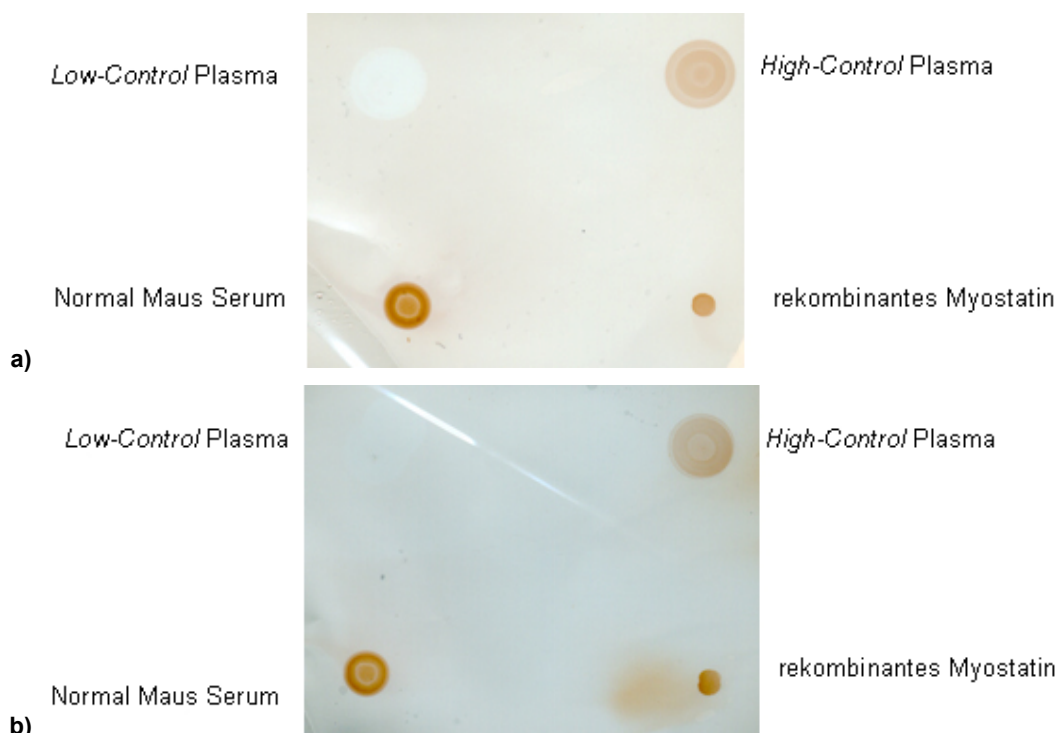


Abb. 32 Dot Blot zur Überprüfung der Spezifität von monoklonalen Maus-Antikörpern. a) Dot-Blot mit *Low-Control Plasma*, *High-Control Plasma*, Normal-Maus-Serum sowie rekombinatem Myostatin. Nur bei *Low-Control Plasma* ist keine Antikörperfärbung zu erkennen. Verwendeter Antikörper: m- α -rek. Myo (Clon *Myo 4D*) (10x konzentriert und 1:1000 in PBS 2% BSA verdünnt) b) Dot-Blot. Probenauftrag wie unter a) beschrieben. Verwendeter Antikörper m- α -rek. Myo (Clon *Myo 7F*) (10x konzentriert und 1:1000 in PBS 2% BSA verdünnt) Sekundärantikörper g- α -mouse IgG Fc POX (Fa.Dianova) 1:10000 in PBS.

Um die Spezifität der beiden monoklonalen Antikörper zu zeigen, wurde zunächst ein Western Blot durchgeführt, für den nur rekombinantes Myostatin verwendet wurde. Da jedoch scheinbar die Antikörperkonzentration nicht ausreichte, wurden die Zellkulturüberstände 10fach aufkonzentriert und der Versuch als Dot-Blot unter Verwendung des *High-Control* und des *Low-Control* Plasmas wiederholt. Diese Überprüfung zeigte, dass die monoklonalen Antikörper sowohl mit dem rekombinanten Myostatin ein positives Signal zeigten als auch mit dem *High-Control* Plasma. Bei dem Fleck des *Low-Control* Plasmas konnte kein Signal beobachtet werden. Dies spricht für eine sehr hohe Spezifität der beiden Antikörper *Myo 7F* und *Myo 4D*.

Zur Untersuchung, welche Aminosäuresequenz von den monoklonalen Antikörpern erkannt wird, wurde mit den zur Verfügung stehenden Myostatin-Peptiden ein *mapping* durchgeführt. Hierzu wurden an einer *Nunc®Peptide Immobilizer* Mikrotiterplatte unterschiedliche Peptide gebunden und die Antikörper in einer linearen Verdünnung aufgetragen.

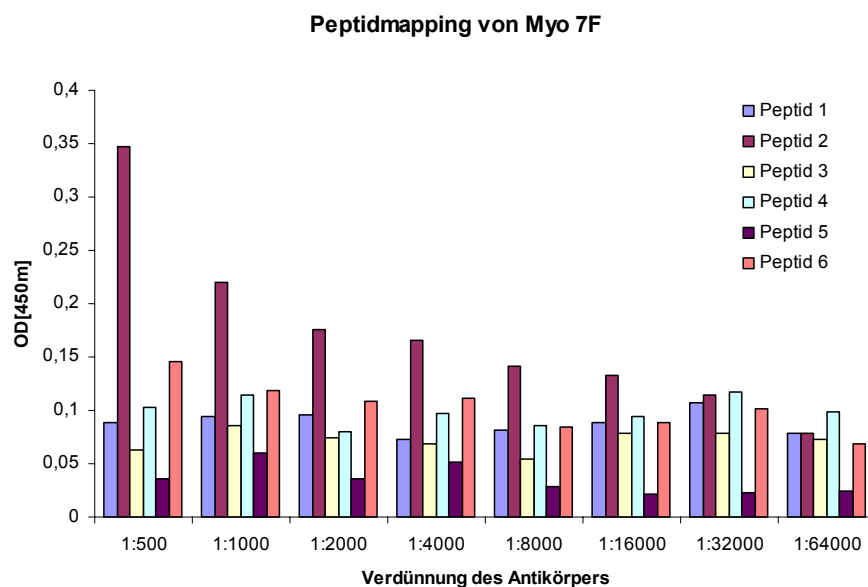


Abb. 33 Graphische Darstellung des Peptidmappings des Antikörpers Myo 7F. Nur bei der Detektion von Peptid 2 ist ein klarer Abfall in der Extinktion erkennbar. Bei allen anderen Peptiden ist bei keiner der verwendeten Verdünnungen ein Abfall der optischen Dichte im Verdünnungsverlauf zu beobachten.

Wurde für die Detektion mit den Antikörpern die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Peptid 2 gewählt, so war eine geringe optische Dichte ($\sim 0,350$) erkennbar, welche bei linearer Verdünnung bis 1:2000 nahezu linear abnahm. Die anderen Peptide konnten weder mit dem Antikörper *Myo 7F* noch mit dem Antikörper *Myo 4D* erkannt werden. Dies spricht dafür, dass die monoklonalen Antikörper lediglich ein Epitop aus dem biologisch nicht aktiven N-Terminus (Propeptid) erkennen.

3.8. Immunhistologie

Für die immunhistologischen Arbeiten wurde der polyklonale Antikörper *rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)* verwendet, da zu diesem Zeitpunkt die Antikörper aus den anderen Spezies noch nicht vorlagen. Zunächst wurden Untersuchungen an Skelettmuskulatur durchgeführt, da in der Literatur Myostatin vor allem in dieser nachgewiesen wird (SAKUMA, WATANABE et al. 2000).

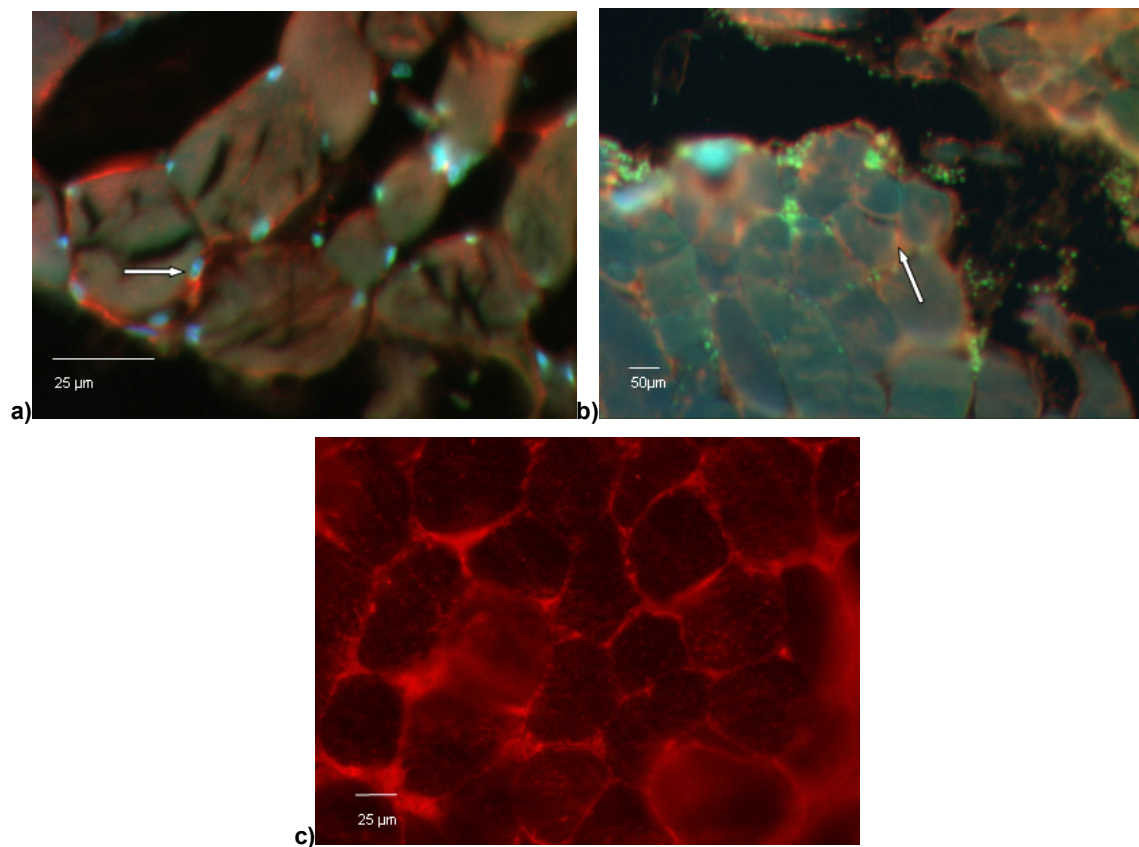


Abb. 34 Immunhistologische Aufnahme von Skelettmuskulatur und Detektion mit primärem Antikörper *r- α -rek. Myo (3.Abn)* (1:1000). a) Skelettmuskulatur DAPI – Färbung; der weiße Pfeil deutet auf einen angefärbten Zellkern, um den herum eine deutliche orange Färbung zu erkennen ist. b) Immunhistologische Aufnahme von Skelettmuskulatur, bei der auf die Anfärbung mit DAPI verzichtet wurde. Der weiße Pfeil deutet auf eine Stelle in der Nähe der Zellmembran einer Muskelfaser, welche stark durch Antikörper angefärbt wurde. c) Skelettmuskulatur ohne DAPI Färbung.

Die Aufnahmen der Skelettmuskulatur zeigen deutlich eine Lokalisation von Myostatin rund um die Muskelzellkerne, von denen ausgehend das Signal entlang der Zellmembran schwächer wird. Die grüne Färbung in Abb. 34 b) rührt von der Eigenfluoreszenz von Lipofuscin, einem Alterspigment, da es sich bei dem vorliegenden Schnitt um älteres Material handelte. Zur Überprüfung, ob das Verhalten des Antikörpers spezifisch ist, oder aber ob er unspezifisch Gewebe und alle Muskeltypen anfärbt, wurden weitere histologische Untersuchungen an anderen Gewebe- und Muskeltypen durchgeführt.

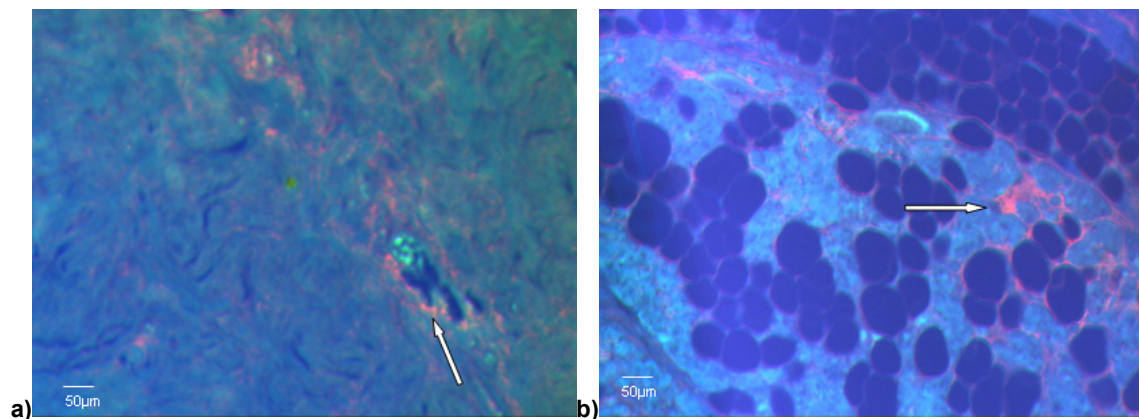


Abb. 35 Immunhistologische Aufnahmen von glatter Muskulatur a) und Organgewebe b). a) Antikörperfärbung (r- α -rek. Myo) von glatter Muskulatur aus dem Uterus. Der weiße Pfeil deutet auf Gefäße, die diese Muskulatur durchziehen und durch den Antikörper im Gegensatz zum übrigen Gewebe angefärbt werden. b) Anfärbung von Parathyroidea (Nebenschilddrüse) mit polyklonalem Antikörper gegen rekombinantes Myostatin. Der Pfeil deutet auf Gefäße, die das Organ durchziehen und deren Muskulatur durch den Antikörper angefärbt wird.

Diese immunhistologischen Aufnahmen zeigen, dass nicht nur Skelettmuskulatur mit diesem Antikörper angefärbt werden kann, sondern auch die glatte Muskulatur von größeren Gefäßen. Die glatte Muskulatur aus Geweben wie dem Uterus hingegen zeigte keinerlei Färbung. Ebenso wenig konnte das Drüsengewebe aus endokrinen Drüsen wie der Parathyroidea oder aber kapillare Gefäße ohne Muskulatur mit diesem Antikörper angefärbt werden.

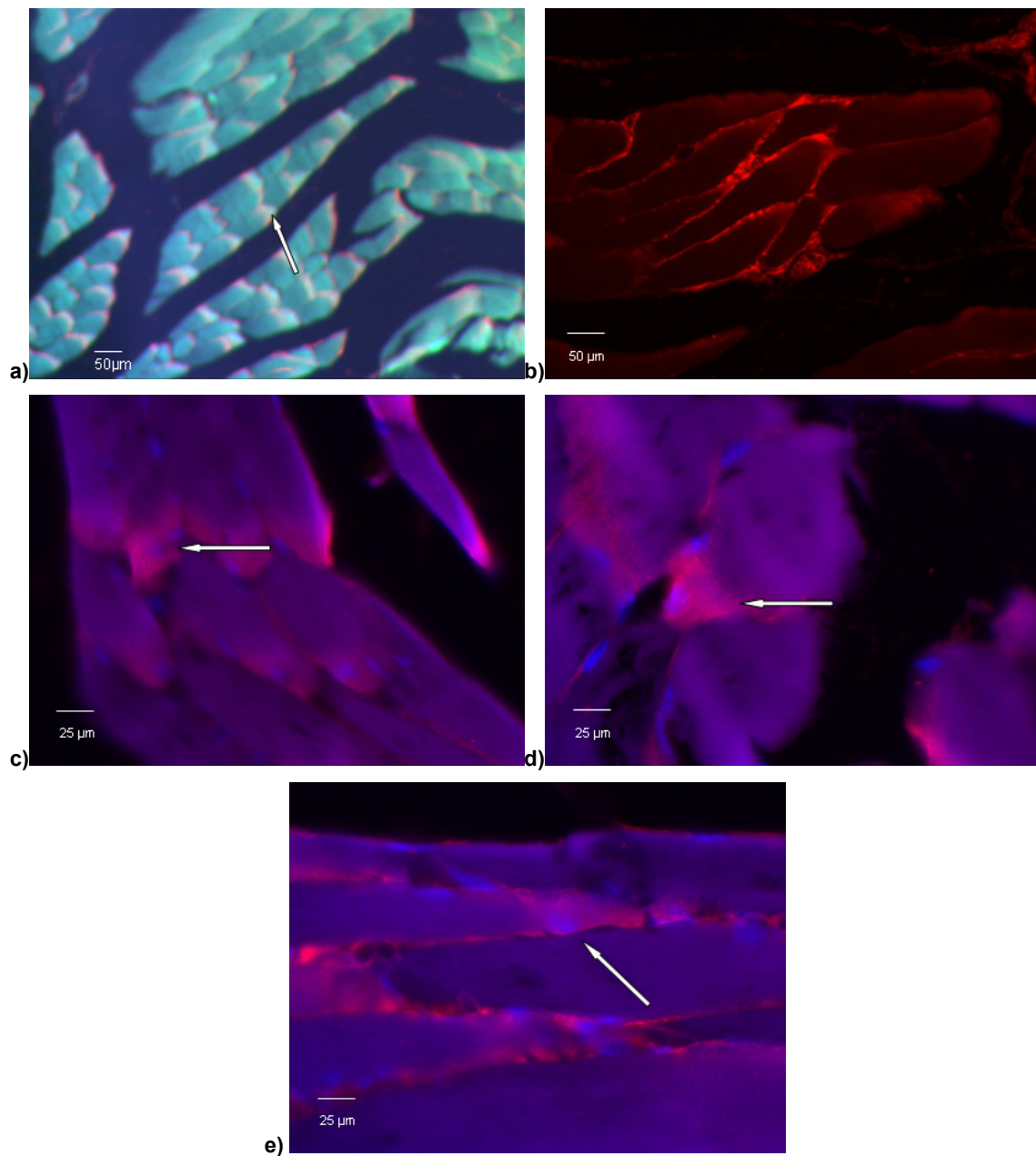


Abb. 36 Immunhistologische Aufnahmen von humaner Herzmuskulatur. Detektion erfolgte mit *rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)*. a) Die erste Aufnahme von Herzmuskulatur in geringer Auflösung zeigte die Anfärbung der Glanzstreifen. b) Aufnahme nur in Rotfluoreszenz zur Verdeutlichung der membranständigen Lokalisation von Myostatin auch in Herzmuskulatur. c) d) e) DAPI-Färbung der Zellkerne, UV und Rotfluoreszenzaufnahmen. Die weißen Pfeile deuten auf blau gefärbte Zellkerne. Um diese Zellkerne herum ist deutlich eine orange Anfärbung durch Myostatin erkennbar.

Durch Anfärbung von Kryoschnitten humaner Herzmuskulatur konnte gezeigt werden, dass Myostatin auch in der Herzmuskulatur mit diesem Antikörper detektiert werden kann. Vor allem im Bereich der Glanzstreifen (*Discus intercalatus*), also dem Bereich in dem zwei Herzmuskelzellen aufeinander stoßen, ist eine Anhäufung von Myostatin zu beobachten.

Die Detektion von Myostatin um die Zellkerne und auch die starke Färbung um die Zellmembran herum spricht dafür, dass Myostatin nach der Expression im Zellkern aus der Zelle ausgeschleust wird und sich danach in der Zirkulation befinden kann. Leider war es nicht möglich, Schnitte von anderen Gewebeteilen zu erhalten, um die Expressierung dort genauer zu lokalisieren.

3.9. ELISA Entwicklung

3.9.1 Kompetitiver EIA mit Myostatin – Peptid-Antikörper

Zu Beginn der Arbeit lagen mehrere Antikörper vor, welche durch Immunisierung von Kaninchen mit unterschiedlichen Peptiden von Myostatin generiert worden waren. Da die Bestimmung des C-Terminus und damit des biologisch aktiven Teils von besonderem Interesse ist, wurde dieser Assay mit dem Antikörper des Kaninchens 1308 aufgebaut. Dieses Antiserum ist durch Immunisierung mit dem Peptid mit der Aminosäuresequenz QKYPHTHLVHQANP, welches aus dem C-terminalen Ende des Gesamt-Myostatin stammt, generiert worden.

Durch Variation der Beschichtungskonzentration wird bei gegebener Konzentration der Standarddeichkurve die optimale Konzentration ermittelt, bei der die Sensitivität des Systems am größten ist.

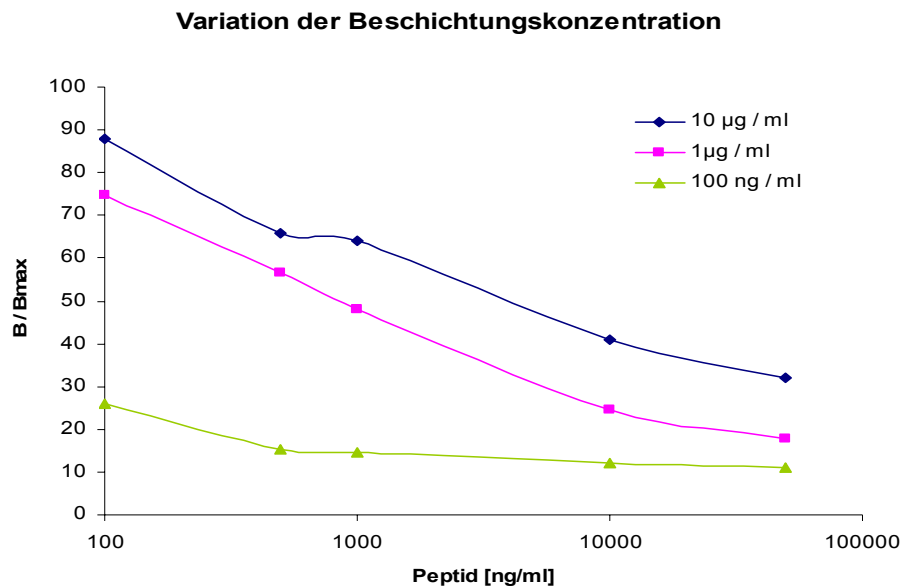


Abb. 37 Graphischer Vergleich von 3 Beschichtungskonzentrationen. Auf einer Nunc®Peptide Immobiliser MTP wurden unterschiedliche Konzentrationen an Myostatin Peptid immobilisiert und mit AK 1308 (Verdünnung 1:100) detektiert. Als Sekundärantikörper wurde *goat- α -rabbit* POX 1:5000 in HRP verwendet. Der Auftrag erfolgt auf der Y-Achse als B / Bmax, d.h. der Quotient aus der optischen Dichte der Bindung sowie der optischen Dichte der maximalen Bindung (in diesem Fall Standard 0 ng / ml). Auf der X-Achse wird die Konzentration des Peptids in ng / ml angegeben.

Aus Abb. 37 ist zu erkennen, dass eine Beschichtungskonzentration von 100 ng / ml in diesem Fall nicht ausreichend ist, da die Bindung zu gering ist. Es wurde eine Beschichtungskonzentration von 1 µg / ml gewählt, da hier die Bindung des Antikörpers an das Antigen bei logarithmischer Betrachtung nahezu linear verläuft und zudem Material im Vergleich zur etwas höheren Konzentration von 10 µg / ml gespart werden kann. Eine Blockierung der Mikrotiterplatte zur Absättigung der freien Bindungsstellen ist in diesem Fall laut Herstellerangaben nicht notwendig, da die verwendeten MTP die Eigenschaft besitzen, bereits durch den verwendeten Waschpuffer und Zusatz von 2% Tween 20™ abgesättigt zu sein.

Für die Herstellung einer Standardkurve wurde das Peptid in PPGNE verdünnt. Die folgende Tabelle gibt die Standardkonzentrationen an, welche für dieses Testsystem gewählt wurden.

Tab. 6 Beispiel einer Standardkurve des kompetitiven EIA mit Peptid-Antikörper AK1308. Als Standard wird das Peptid QKYPHTHLVHQANP in den unten angegebenen Konzentrationen verwendet. Zudem Angabe einer willkürlich ausgewählten Standardkurve dieses Testsystems unter Darstellung von OD 1 (optische Dichte des 1. Wertes eines Doppelwertes), OD 2 (optische Dichte des 2. Wertes eines Doppelwertes), Mittelwert der optischen Dichten von OD1 und OD2 sowie Angabe des Variationskoeffizienten (VK in %).

Standard Nr.	Konzentration [ng/ml]	OD 1	OD 2	Mittelwert		VK [%]
				OD1	OD2	
Standard 1	0	1,571	1,598	1,585		1,20
Standard 2	18,75	1,136	1,098	1,117		2,41
Standard 3	37,50	0,996	0,974	0,985		1,58
Standard 4	75,00	0,918	0,894	0,906		1,87
Standard 5	150,00	0,832	0,798	0,815		2,95
Standard 6	300,00	0,665	0,623	0,644		4,61
Standard 7	600,00	0,595	0,581	0,588		1,68
Standard 8	1200,00	0,422	0,402	0,412		3,43

Aufgrund von Versuchen zur Bindungskinetik wurde festgestellt, dass es bei diesem Testsystem notwendig ist, den Standard zunächst in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß zusammen mit dem primären Antikörper AK 1308 1:100 in PPGNE verdünnt über Nacht bei 4°C zu inkubieren und erst dann auf die beschichtete Mikrotiterplatte zu übertragen. Dieser Ansatz wurde wiederum über Nacht bei 4°C inkubiert und am folgenden Tag 5 mal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Als sekundärer Antikörper (Konjugat) wurde *goat- α -rabbit-POX* (Fa. Dianova) 1:10000 in PPGNE eingesetzt und 100 μ l davon 1h

bei Raumtemperatur auf der Mikrotiterplatte inkubiert. Die farbliche Sichtbarmachung und Detektion erfolgte wie bereits in Kapitel 2.14 beschrieben.

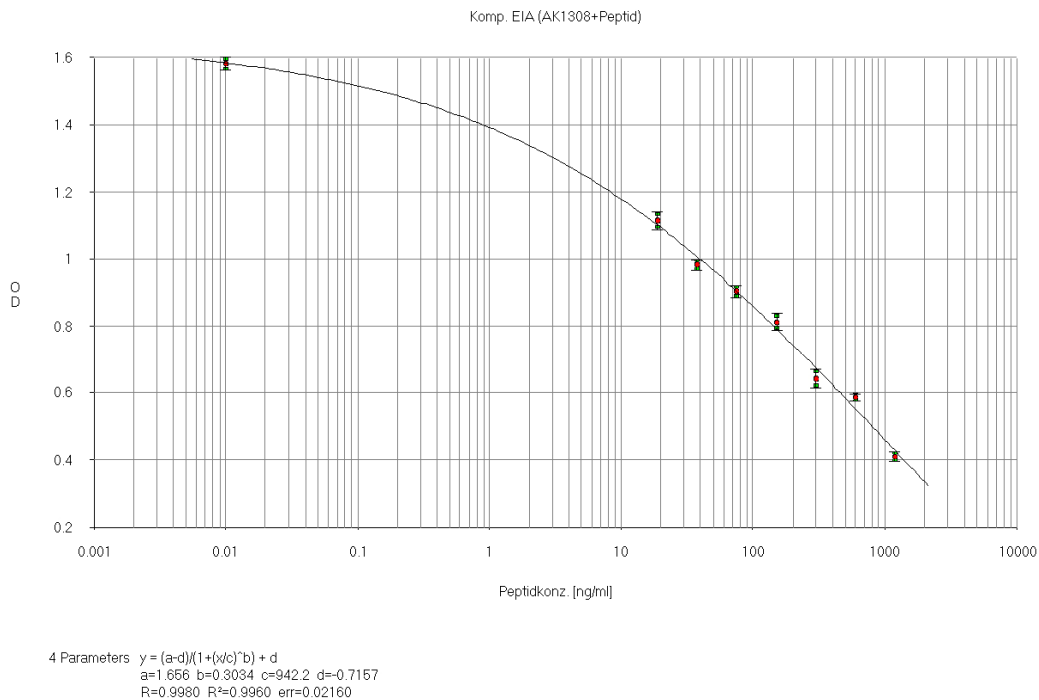


Abb. 38 Standardkurve des kompetitiven EIA mit dem Peptid-Antikörper AK1308. Halblogarithmische Darstellung der Standardkurve generiert mit dem Myostatin Peptid QKYPHTLHVHQANP in serieller Verdünnung. Verwendetes mathematisches Modell für die Auswertung: 4-Parametrische Auswertung. Software: KC4.

Mit diesem Assay war es möglich, Serum und EDTA-Plasma Proben in einem Konzentrationsbereich von etwa 18 bis 1200 ng / ml zu bestimmen. Die Haltbarkeit der beschichteten Mikrotiterplatten ist jedoch nur sehr gering. Dies führt dazu, dass stets eine frische Beschichtung durchgeführt werden muss. Das Peptid ist nur im gefriergetrockneten Zustand über Monate hinweg stabil, was dazu führt, dass sowohl für die Beschichtung der Mikrotiterplatten, als auch für die Herstellung der Standardkurve nur Material verwendet werden kann, welches nicht länger als 7 Tage aufgelöst war. Diese schlechte Haltbarkeit und die relative Ungenauigkeit der Waagen führten dazu, dass bei jedem erneuten

Einwiegen des Peptids geringfügige Unterschiede in der Konzentration der Beschichtung sowie der Standardkurve das Gleichgewicht der Konkurrenz mit dem Antikörper stören können. Zwar ist es mit diesem Testsystem möglich, Patientenproben zu messen (Verdünnung 1:10 in PPGNE), jedoch sind die chargenspezifischen Unterschiede so groß, dass hier für die Versuchsergebnisse keine absoluten Konzentrationen angegeben werden konnten, sondern lediglich mit relativen Einheiten, bezogen auf die Gesamtheit der Versuchsgruppe, gearbeitet werden konnte.

3.9.2 Sandwich ELISA mit *chicken- α -rek. Myo* und *rabbit- α -rek. Myo*

In der Regel eignen sich solche Testsysteme am besten, welche auf der Sandwich-Technik aufbauen. Diese ELISA sind in der Regel schnell abzuarbeiten, besitzen eine hohe analytische Sensitivität und sind durch den Einsatz von zwei Antikörpern spezifischer als kompetitive Messsysteme. Zudem haben kleinste Veränderungen in der Konzentration der Antikörper in der Regel keine großen Auswirkungen auf das Testsystem wie bei kompetitiven EIA, bei welchem das Gleichgewicht zwischen Analyten, Kompetitor und Antikörper sehr empfindlich ist. Daher wird stets angestrebt, ein nicht-kompetitives Testsystem zum Nachweis eines Analyten zu entwickeln.

Für die Herstellung eines solchen Sandwich-ELISA wurde im vorliegenden Fall eine Kombination der beiden Antikörper *chicken- α -rek. Myo (AUG)* sowie *rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)* gewählt. Hierfür wurde eine Beschichtung (ÜN; 2-8°C) einer Nunc™ Maxisorb Mikrotiterplatte des Hühnerantikörpers von 1:400 in einem Phosphatpuffer mit pH 8.0 gewählt. Vor der Blockierung der ungebundenen Stellen der Mikrotiterplatte mit PPGNE wurde diese zweimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Nach der Blockierung wurde die Platte 5 mal gewaschen, die Standards in Verdünnungspuffer A angesetzt und á 100 µl aufgetragen. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mikrotiterplatte 5-mal gewaschen und 100 µl des Antikörpers *rabbit- α -rek. Myo* (1:20000 verdünnt in Verdünnungspuffer A) in alle Vertiefungen pipettiert und dort 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die

Detektion erfolgte mit *goat- α -rabbit POX* (Fa. Dianova; 1h; RT; 1:10000 in HRP).

Tab. 7 Beispiel einer Standardkurve des Sandwich ELISA unter Verwendung von c- α -rek. Myo (AUG) und r- α -rek. Myo (3.Abn). Dargestellt werden die verwendeten Konzentrationen der Standardreihe in pg/ml. Als Standardmaterial wurde rekombinantes Myostatin verwendet. Zusätzlich Auflistung des Mittelwertes der optischen Dichten.

Standard Nr.	Konzentration [pg/ml]	Mittelwert OD
Standard 1	16000	2,283
Standard 2	6400	1,401
Standard 3	2560	0,573
Standard 4	1024	0,342
Standard 5	410	0,286
Standard 6	163	0,258
Standard 7	65,2	0,242
Standard 8	0	0,238

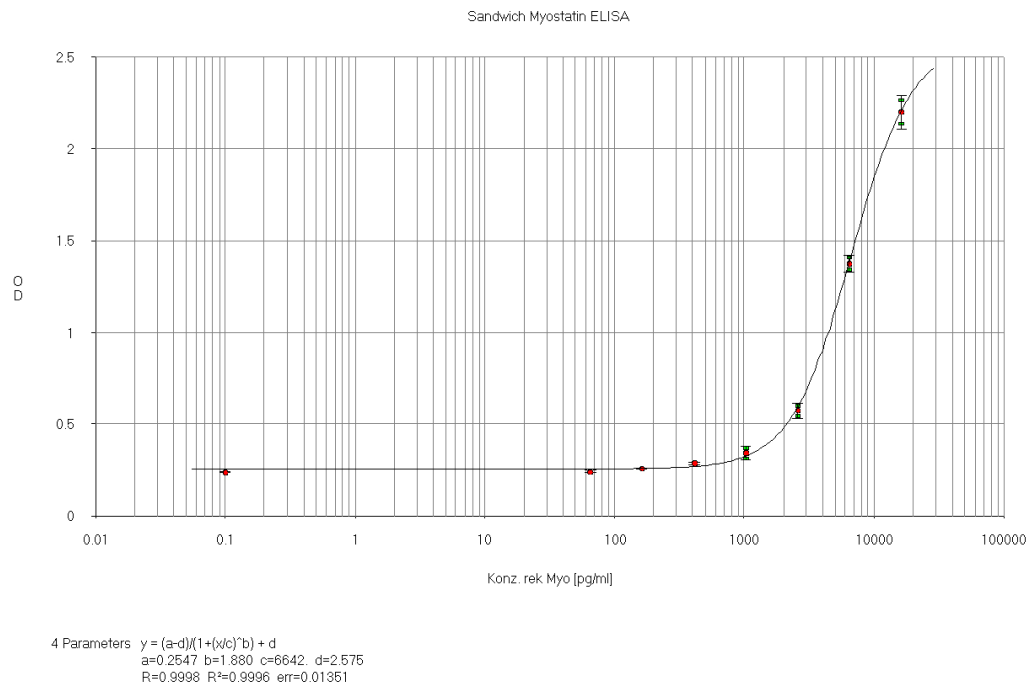


Abb. 39 Standardkurve des Sandwich ELISA. Standardkurve unter Verwendung eines Hühnerantikörpers zur Beschichtung und eines Kaninchenantikörpers zur Detektion. Halblogarithmische Darstellung der Standardkurve generiert mit rekombinantem Myostatin in serieller Verdünnung. Verwendetes mathematisches Modell für die Auswertung: 4-Parametrische Auswertung.

Durch die Verwendung dieser Antikörperkombination in den oben angegebenen Konzentrationen und nach Optimierung der Inkubationszeiten konnte erstmals ein nicht-kompetitives Testsystem zur Messung von Myostatin entwickelt werden, bei dem eine Differenzierung bis in den Picogramm (pro Milliliter) Bereich möglich ist. Für die Messung von Patientenproben mit diesem Sandwich-ELISA wurden mehrere Verdünnungen von verschiedenen Patientenproben (sowohl Serum als auch Plasma) in unterschiedlichsten Puffersystemen durchgeführt, jedoch zeigten alle Verdünnungen eine optische Dichte unterhalb von Standard 8. Auch durch die Oxidation der Proben mit Chloramin T, die Reduktion mit NaBH₄ oder aber die Behandlung mit dem Detergenz SDS konnte mit dieser Antikörperkombination in Patientenproben kein Myostatin detektiert werden.

3.9.3 Kompetitiver EIA mit rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)

Aufgrund sämtlicher vorhergehender Versuche wurde ein kompetitives Testsystem unter Verwendung des Antikörpers *rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)* entwickelt.

3.9.3.1 Beschichtungskonzentration

Hierzu wurde eine Nunc™ Maxisorb Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem Myostatin beschichtet. Parallel wurden verschiedene Puffer getestet, bei denen sich Verdünnungspuffer B als der geeignetste zur Beschichtung herausstellte.

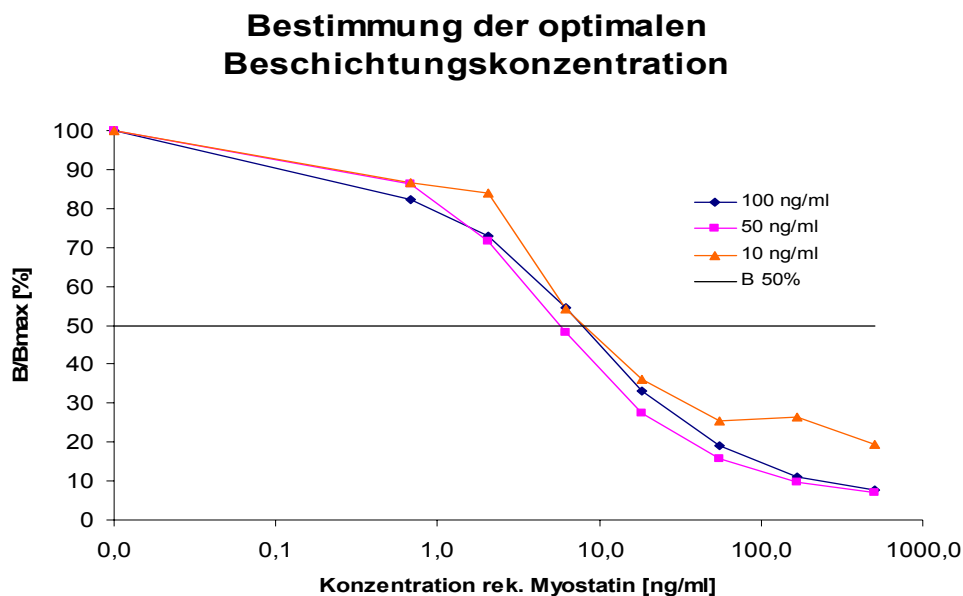


Abb. 40 Graphische Darstellung für die Wahl der optimalen Beschichtungskonzentration. Auf der Y-Achse ist der Quotient aus der Bindung B des Antikörpers an den jeweiligen Standard und die Bindung B_{\max} des Antikörpers an den Standard mit der Konzentration 0 aufgetragen. Die X-Achse spiegelt die Konzentrationen der Standardkurve aus rekombinantem Myostatin wieder. In der Graphik dargestellt ist neben den Beschichtungskonzentrationen 10, 50 und 100 ng / ml zusätzlich die theoretische Bindung bei 50% Sättigung des Antikörpers (B 50%).

An der oben abgebildeten Grafik kann die optimale Beschichtungskonzentration abgelesen werden. Die Kurve, welche auf einer Mikrotiterplatte generiert wurde, welche mit 50 ng / ml beschichtet wurde (hier pink dargestellt) schneidet die B_{50%}-Linie im Vergleich zu den anderen Kurven am niedrigsten X-Wert der Grafik. Damit kann gezeigt werden, dass bei dieser Beschichtungskonzentration im Vergleich mit den anderen Konzentrationen die größte Sensitivität erreicht werden kann. Die Verwendung von 25% Karion F zur Stabilisierung der Beschichtung hat keinen Einfluss auf die Performance des Tests. Somit können mehrere Mikrotiterplatten einer Charge produziert werden und über einen längeren Zeitraum (min. 2 Monate) verwendet werden, ohne dass es zu Schwankungen der Beschichtungsqualität kommt.

3.9.3.2 Blockierungslösungen

Für die Bestimmung des optimalen Blockierungsmediums wurden sechs unterschiedliche Lösungen mit einem hohen Proteinanteil verwendet.

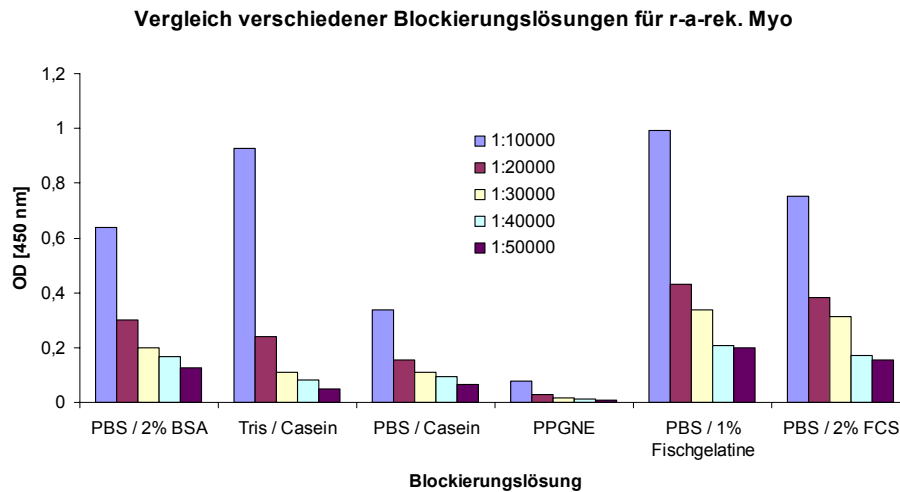


Abb. 41 Darstellung des Einflusses verschiedener Blockierungslösungen auf die Verwendung im ELISA. Ziel ist es, eine stark proteinhaltige Blockierungslösung zu finden, welche keine oder nur wenige Kreuzreaktionen mit den verwendeten Antikörpern hervorruft. Es wurden verschiedene Blockierungslösungen verwendet: PBS / 2% BSA; Tris / Casein; PBS / Casein; PPGNE; PBS / 1% Fischgelatine und PBS / 2% FCS. Die Abbildung zeigt, dass PPGNE schon bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:10000 ein sehr niedriges Signal hervorruft, wohingegen z.B. bei der Verwendung von PBS / 2% FCS auch noch bei einer Antikörperverdünnung von 1:50000 ein höheres Signal erreicht wird.

Als optimales Blockierungsmedium stellte sich PPGNE heraus, da das Signal, welches auch bei einer Antikörperverdünnung von 1:10000 erhalten wird, das niedrigste darstellt. Auch bei stärkerer Verdünnung des Antikörpers ist das Signal, welches durch die anderen Lösungen hervorgerufen wird, zu hoch, um diese in einem ELISA verwenden zu können.

3.9.3.3 Bindungskinetiken

Für die weitere Optimierung eines Immunoassays ist es notwendig, die Bindungskinetik von Antikörper und Antigen zu bestimmen. Hierzu werden die Inkubationszeiten und Inkubationstemperatur verändert. Zudem wird in diesem Falle unterschieden, ob eine direkte Kompetition auf der Mikrotiterplatte stattfindet, oder ob zunächst ein Vorinkubat von ungebundenem Antigen (Standard in der Flüssigphase) und Antikörper notwendig ist. Im zweiten Falle werden die Zeiten bei der Vorinkubation sowie die Zeiten und Temperaturen der Inkubation auf der Mikrotiterplatte variiert.

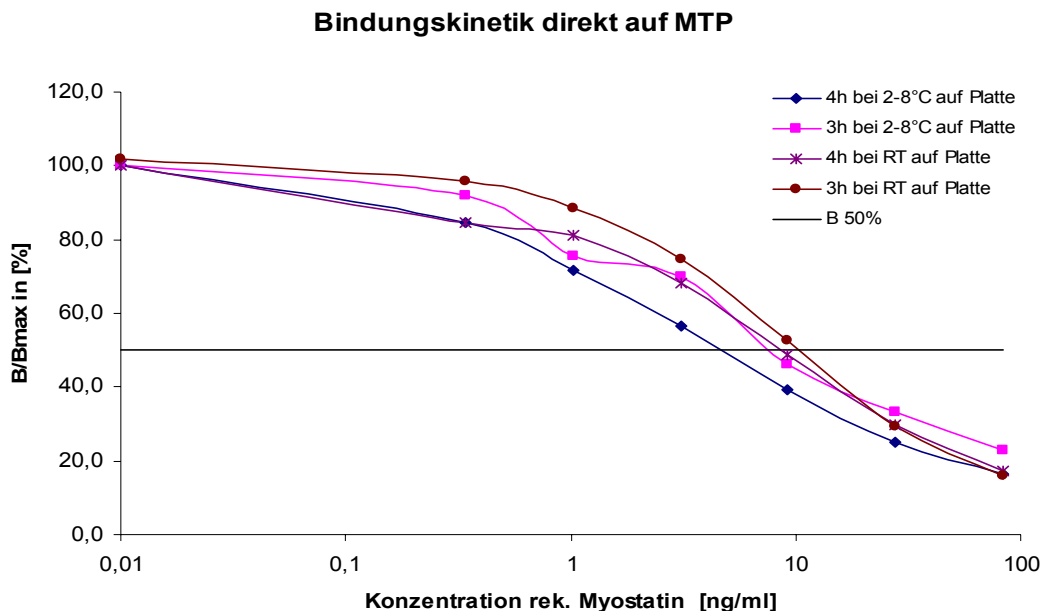


Abb. 42 Graphische Darstellung der Bindungskinetik. Inkubation von Standard und Antikörper direkt auf der Mikrotiterplatte. Dargestellt werden nur die 3h und 4h Inkubation bei 2-8°C und Raumtemperatur. Deutlich erkennbar ist eine Zunahme der Sensitivität durch 4h Inkubation bei 2-8°C.

Oben dargestellt ist das Ergebnis der Bindungskinetiken bei Inkubation von Antigen und Antikörper direkt auf der Mikrotiterplatte. Hierbei ist zu erkennen, dass in diesem Fall eine Erhöhung der Inkubationsdauer bei gleichzeitiger Kühlung des ELISA (2-8°C) die Sensitivität des Systems verbessert.

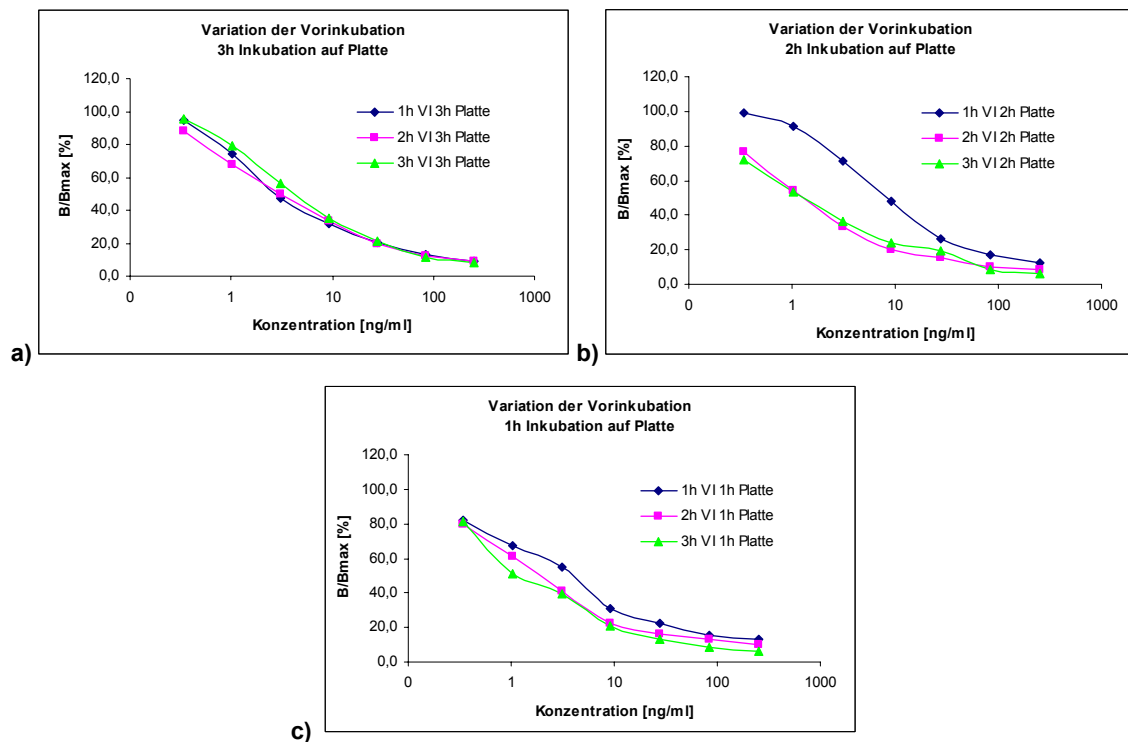


Abb. 43 Graphische Darstellung der Auswirkung von Bindungskinetikversuchen auf die Sensitivität des ELISA. a) 3h Inkubation des Vorinkubats auf der MTP bei RT unter Variation der Vorinkubationszeit b) 2h Inkubation des Vorinkubats auf der MTP bei RT unter Variation der Vorinkubationszeit c) 1h Inkubation des Vorinkubats auf der MTP bei RT unter Variation der Vorinkubationszeit.

Wie aus Abb. 43 b) zu erkennen ist, beeinflusst eine Vorinkubation von 1h die Sensitivität des Tests negativ. Es sind also 2 bis 3 Stunden Inkubation notwendig, um eine optimale Sensitivität des Immunoassays zu erreichen. Bei direktem Vergleich aller Kurven (aufgrund der Unübersichtlichkeit nicht dargestellt) stellte sich heraus, dass die höchste Sensitivität bei einer Vorinkubation von 2 oder 3 Stunden gefolgt von einer 2-stündigen Inkubation auf der Mikrotiterplatte erreicht werden kann.

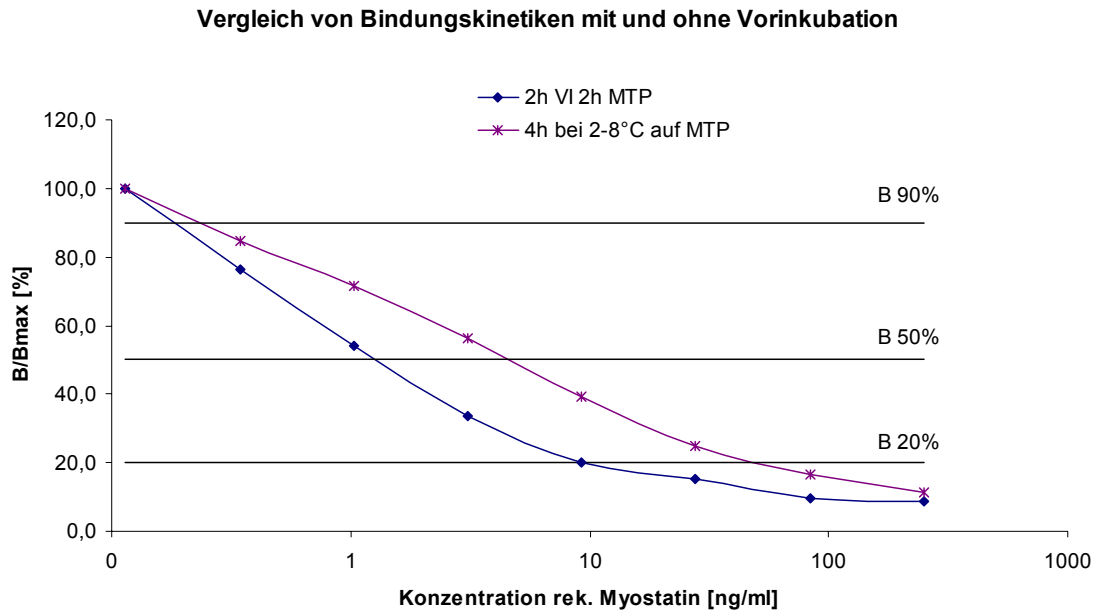


Abb. 44 Graphischer Vergleich der Sensitivität von 2 unterschiedlichen Testsystemen. Direkte 4-stündige Inkubation (2-8°C) auf der MTP sowie 2h Vorinkubation mit folgender 2-stündiger Inkubation auf der MTP. Zur Verdeutlichung wurden die assaycharakteristischen Angaben B 90% (Nachweisgrenze), B 50% (Gleichgewicht der Bindung) sowie B 20% (obere Bestimmungsgrenze / Ende des linearen Bereichs) in der Graphik angegeben.

Durch direkten graphischen Vergleich des optimalen Systems ohne Vorinkubation mit dem genannten Testprinzip mit Vorinkubation konnte festgestellt werden, dass die optimale Sensitivität des Assays erreicht werden kann, wenn das Antigen zunächst 2 Stunden mit dem Antikörper inkubiert wird und erst dann 2 Stunden auf der Mikrotiterplatte inkubiert.

3.9.3.4 Waschen der beschichteten Mikrotiterplatte

Abb. 45 zeigt den Einfluss des Waschens einer Mikrotiterplatte (vor Inkubation der Standardkurve) auf die Qualität und Sensitivität einer Standardkurve.

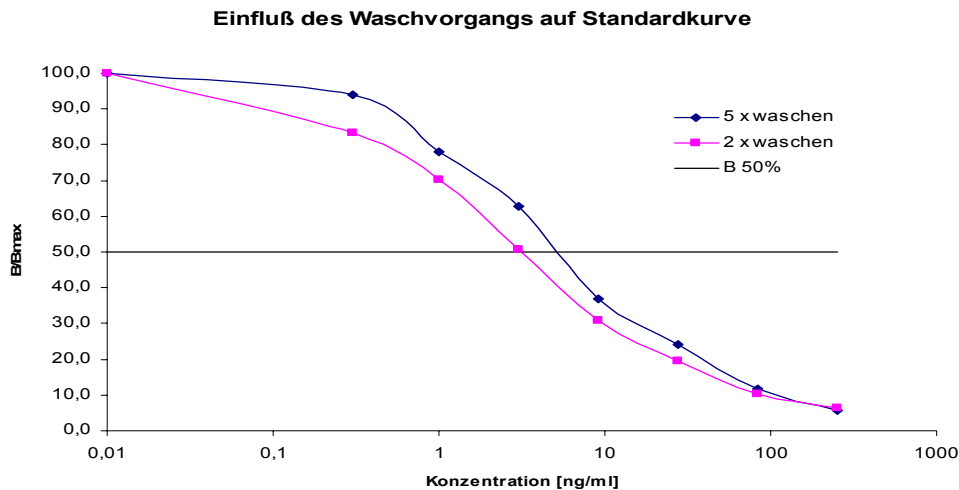


Abb. 45 Graphische Darstellung des Einflusses des Waschvorgangs auf einen ELISA. Es ist ein geringer Abfall der Sensitivität zu beobachten, wenn der Waschvorgang 5 mal wiederholt wird.

Wie zu erkennen ist, sollte die ELISA-Platte bei diesem Testsystem nicht mehr als 2 mal gewaschen werden, da dies einen negativen Einfluss auf die Sensitivität des Assays hat.

3.9.3.5 Kreuzreaktivität mit anderen Analyten

Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität wurden 2 Proteine verwendet, welche von ihrer Struktur (GDF-11) oder von ihrer Lokalisation im Körper (Myoglobin) Ähnlichkeiten mit Myostatin aufweisen. Durch lineare Verdünnung dieser Proteine sollte untersucht werden, ob sie im Assay erkannt werden. Weder mit GDF-11 noch mit Myoglobin konnte selbst bei einer maximalen Konzentration des jeweiligen Proteins von 1250 ng/ml ein messbares Signal erhalten werden. Aufgrund der Ergebnisse der Blockierungsversuche muss jedoch davon ausgegangen werden, dass der verwendete Antikörper Albumin erkennt. Bereits bei der Untersuchung des besten Verdünnungspuffers für den

Antikörper hatte sich jedoch herausgestellt, dass sich hierfür besonders gut PPGNE / 2% BSA eignete. Die Zugabe von 2% BSA zum Antikörperverdünnungspuffer führt zu einer Präabsorption unspezifischer Antikörper im polyklonalen Antiserum, so dass bei der nachfolgenden Untersuchung auf Kreuzreaktivität mit Albumin wiederum ein negatives Ergebnis erreicht werden konnte.

3.9.3.6 Standard Eichkurve

Die Standard Eichkurve wurde aus rekombinantem Myostatin hergestellt. Bei der Herstellung unterschiedlicher Standard Eichkurven mit verschiedenen Verdünnungsfaktoren stellte sich eine Eichkurve mit dem Verdünnungsfaktor „3“, ausgehend von einer maximalen Konzentration (Standard 8) von 250 ng / ml, als diejenige Eichkurve heraus, welche die größte Sensitivität bei gleichzeitig höchster oberer Bestimmungsgrenze zeigte. Die Herstellung der Standard Eichkurve erfolgte durch lineare Verdünnung der Stocklösung des rekombinanten Myostatin in Verdünnungspuffer B. Anschließend wurden die Standards á 250 µl in Glasfläschchen aliquotiert und gefriergetrocknet und somit eine Haltbarkeit der Standard Eichkurve von mindestens 2 Monaten erreicht. Vor Verwendung der gefriergetrockneten Standards müssen diese mit 250 µl Reinstwasser rekonstituiert werden.

Tab. 8 Beispiel einer Standardkurve des kompetitiven EIA mit rabbit- α -rek. Myo (3.Abn). Als Standard wird rekombinantes Myostatin in den unten angegebenen Konzentrationen verwendet. Zudem Angabe einer willkürlich ausgewählten, typischen Standardkurve dieses Testsystems unter Darstellung von OD 1 (optische Dichte des 1. Wertes eines Doppelwertes), OD 2 (optische Dichte des 2. Wertes eines Doppelwertes), Mittelwert der optischen Dichten von OD1 und OD2 sowie Angabe des Variationskoeffizienten (VK in %).

Standard Nr.	Konzentration [ng/ml]	OD 1	OD 2	Mittelwert OD1 OD2	VK [%]
Standard 1	0	3,283	3,056	3,169	5,06
Standard 2	0,3	2,639	2,516	2,577	3,37
Standard 3	1,0	2,284	2,033	2,158	8,22
Standard 4	3,0	1,702	1,564	1,633	5,98
Standard 5	9,2	1,116	0,964	1,040	10,33
Standard 6	27,7	0,704	0,575	0,640	14,26
Standard 7	83,3	0,350	0,312	0,331	8,12
Standard 8	250,0	0,171	0,175	0,173	1,63

Die obere Tabelle zeigt die Abstufung der Standardkonzentrationen sowie beispielhaft die optischen Dichten und ihre jeweiligen Variationskoeffizienten. Es wird deutlich, dass eine sehr gute Differenzierung im niedrigen ng / ml - Bereich möglich ist. Die folgende graphische Darstellung derselben Standardkurve verdeutlicht, dass der optimale Messbereich der Standardkurve zwischen Standard 2 (0,3 ng / ml) und Standard 7 (83,3 ng / ml) liegt, da hier der Verlauf der Eichkurve approximativ linear ist

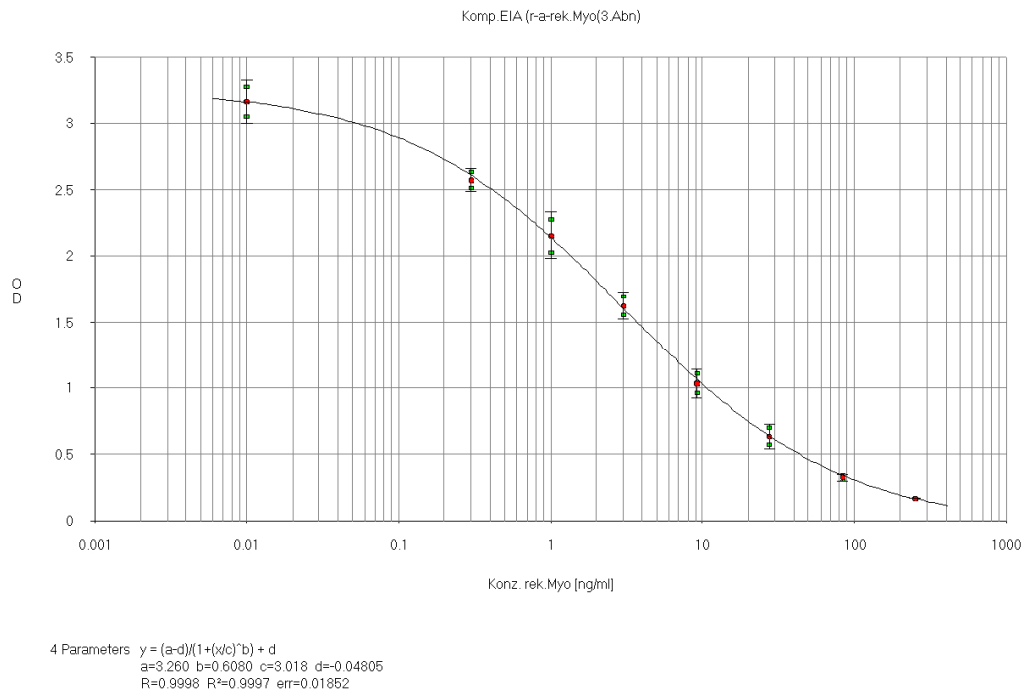


Abb. 46 Graphische Darstellung der Standardkurve des kompetitiven EIA. Verwendung des Antikörpers *rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)*. Halblogarithmische Darstellung der Standardkurve, generiert mit rekombinantem Myostatin in linearer Verdünnung. Verwendetes mathematisches Modell: 4-Parametrische Auswertung, Software: KC4.

Zu Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Standardkurve wurde diese 8-mal an unterschiedlichen Tagen in Doppelbestimmung angesetzt. Da in einem solchen System die optischen Dichten stark variieren können, wurde zur Feststellung der Assaycharakteristik für jeden Standard der Quotient (B / B_{\max}) der optischen Dichte des jeweiligen Standards sowie der optischen Dichte des Standard 1 (0 ng / ml) gebildet. Diese B / B_{\max} – Darstellung ist in Abb. 46 gezeigt. Aus den Quotienten der einzelnen Standards wurde der Mittelwert gebildet und ebenfalls in Abb. 46 wiedergegeben. Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Standardkurve wurde für jeden Standard die Standardabweichung mathematisch ermittelt und in Tab. 9 aufgelistet.

3.9.3.7 Reproduzierbarkeit der Standardkurve

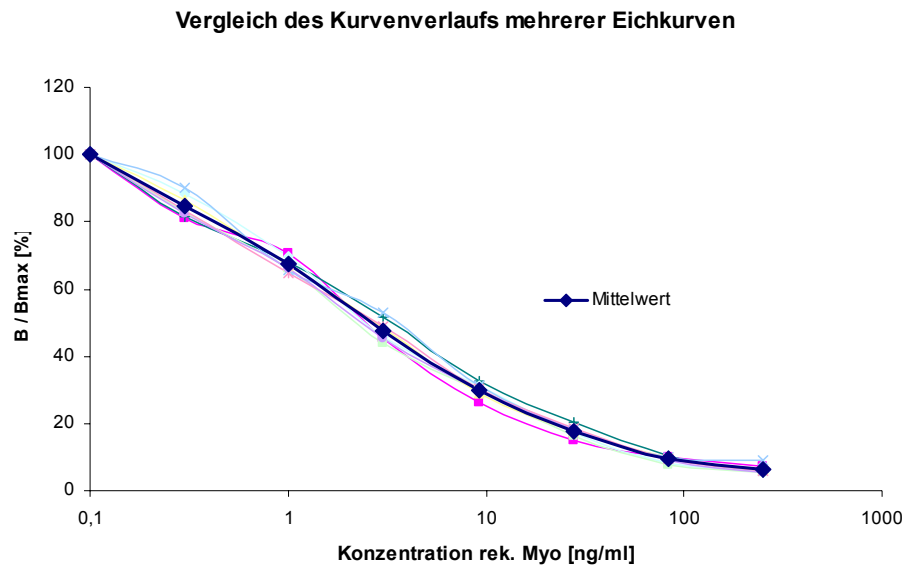


Abb. 47 Graphische B / B_{\max} -Darstellung zum Vergleich des Kurvenverlaufs und Bestimmung der Reproduzierbarkeit von 8 Eichkurven. Fett dargestellt ist der Mittelwert der Quotienten dieser Standardkurven. Halblogarithmische Auftragung von B / B_{\max} (Y-Achse) gegen die Konzentration der Standards (rekombinantes Myostatin in ng / ml).

In Abb. 47 wird die Reproduzierbarkeit der Standardkurve dargestellt. Um diese zu verdeutlichen; wurde der Quotient B / B_{\max} auf der Y-Achse gegen die Standardkonzentrationen aufgetragen, da hiermit eine direkte Vergleichbarkeit von Standardkurven gegeben ist, auch wenn diese bei jedem Versuchsansatz unterschiedliche optische Dichten gezeigt haben. In Tab. 9 folgt eine Auflistung der Reproduktionsdaten der Standardeichkurven.

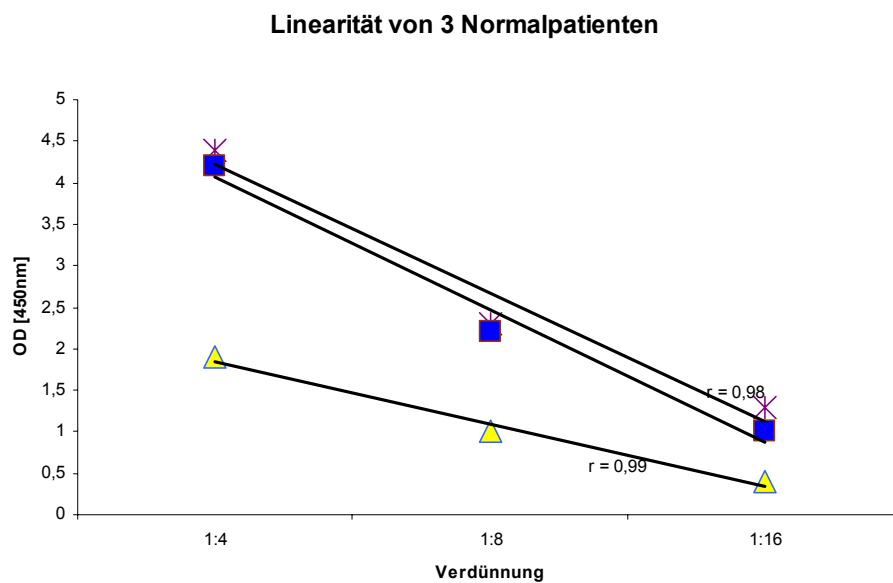
Tab. 9 Tabellarische Darstellung zur Reproduzierbarkeit der Standard Eichkurve. Wiedergegeben werden die Standardkonzentrationen und der Mittelwert der optischen Dichten der 8 Standard Eichkurven in Doppelbestimmung (also ΔOD von 16 Werten je Eichpunkt). Desweiteren Angabe von $\Delta B/B_{max}$ in % zur allgemeinen Charakterisierung des Kurvenverlaufs sowie die berechnete Standardabweichung für jeden einzelnen Standard.

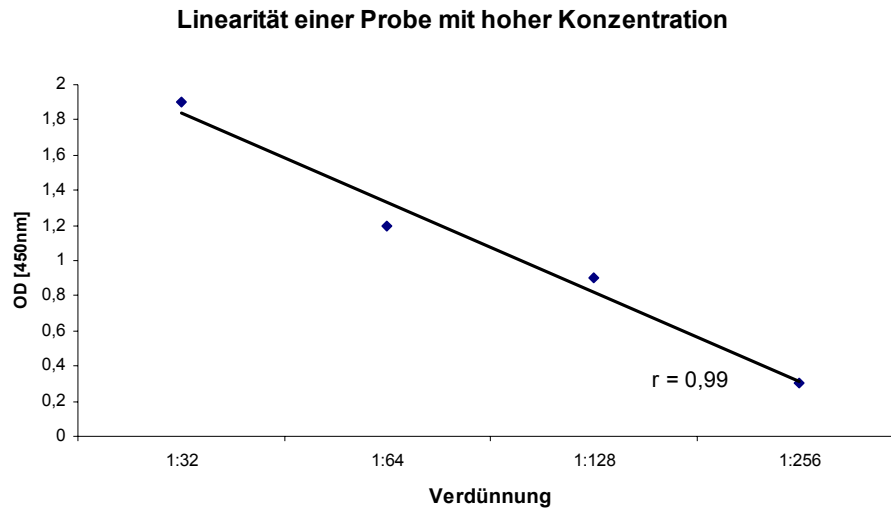
Standard Nr.	Konzentration [ng/ml]	$\Delta OD_{8Kurven}$	$\Delta B / B_{max}$ [%]	Standardabweichung $\Delta B / B_{max}$ [%]
Standard 1	0	2,739	100	0,0
Standard 2	0,3	2,312	85	3,0
Standard 3	1,0	1,841	67	1,7
Standard 4	3,0	1,309	48	2,9
Standard 5	9,2	0,827	30	1,7
Standard 6	27,7	0,487	18	1,4
Standard 7	83,3	0,256	9	0,8
Standard 8	250,0	0,169	6	1,1

Für die Erstellung dieser Reproduktionsdaten wurden sowohl lyophilisierte Standards als auch frisch hergestellte Standards verwendet. Keine der Standardabweichungen der einzelnen Standards ist größer als 3%; dies bedeutet, dass es in der Regel zu maximalen Messungenauigkeiten von 3% bedingt durch Abweichungen der Standardkurve kommen kann. Es kann daher von einer sehr guten Reproduzierbarkeit der Eichkurve gesprochen werden.

3.9.3.8 Linearität von Patientenproben

Ein wichtiges Qualitätskriterium für die Beurteilung eines Immunoassays ist, dass bei logarithmischer Verdünnung von Patientenproben (z.B. 1+1, 1+2, 1+3, 1+7, 1+15 v/v usw.), die Resultate in einem linearen Zusammenhang zueinander stehen. Damit kann sichergestellt werden, dass auch konzentrierte Proben, die erst durch die Verdünnung im Messbereich liegen, gemessen werden können. Nachdem als optimaler Probenverdünnungspuffer Verdünnungspuffer B bestimmt worden war, wurden mehrere Proben in unterschiedlichen Verdünnungsstufen im oben beschriebenen EIA eingesetzt. Bei einer Probe mit extrem hohen Myostatin Konzentrationen mussten zusätzliche Verdünnungsschritte durchgeführt werden, damit diese im Messbereich der Eichkurve lagen. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 48 dargestellt.





b)

Abb. 48 Graphische Darstellung der Linearität bei der Verdünnung von Proben. a) (vorherige Seite) Linearität der Verdünnung von 3 Plasmen von „Normalpatienten“. Die Linearität ist bei den Verdünnungsstufen 1:4; 1:8, 1:16 in Verdünnungspuffer B zu beobachten. b) Linearität der Verdünnung von 1 Plasma mit besonders hohem Myostatingehalt. Die Verdünnung der Probe erfolgte in Verdünnungspuffer B und eine Linearität wird bei den Verdünnungsstufen 1:32, 1:64, 1:128 und 1:256 erkennbar. Zusätzlich jeweils Angabe des Pearssonschen Korrelationskoeffizienten „r“.

Aus den dargestellten Daten kann geschlossen werden, dass bei der Messung von Probenkollektiven diese mindestens 1:8 in Verdünnungspuffer B verdünnt werden sollten. Diejenigen Proben, welche in einer solchen Verdünnung einen deutlich höheren Myostatingehalt aufweisen als Standard 7 (83,3 ng / ml) sollten in einer Wiederholungsmessung mindestens 1:64 verdünnt werden.

3.9.3.9 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze eines EIA gibt an, in welcher Konzentration der Analyt mindestens vorliegen muss, damit dieser noch detektiert werden kann. Die Nachweisgrenze wird als diejenige Konzentration definiert, deren Absorption drei Standardabweichungen über der des Nullstandards liegt (WOOD & SOKOLOWSKI 1981). Zur Untersuchung dieser Sensitivität wurde der Nullstandard 24-mal gemessen und sowohl Standardabweichung als auch Mittelwert bestimmt. Bei einer Standardabweichung von 3,35% und einem Mittelwert von 0,091 ergibt sich somit eine theoretische Nachweisgrenze von 0,273 ng / ml

4. Diskussion

Myostatin, ein Protein welches 1997 erstmals entdeckt wurde, wird hauptsächlich in der Skelettmuskulatur exprimiert (MCPHERRON, LAWLER et al. 1997). Es wird aus den Muskelzellen ins Plasma ausgeschleust und zirkuliert im Körper. Das Protein besitzt die Eigenschaft, das Wachstum von Muskelfasern negativ beeinflussen zu können. Vor allem die negative Regulierung der Satellitenzellen durch Myostatin bei der Proliferation scheint dafür die Ursache zu sein (MCCROSKERY, THOMAS et al. 2003). Als Mitglied der TGF- β – Familie wird Myostatin mittels eines Signalpeptids aus der Zelle ausgeschleust und durchläuft zwei proteolytische Spaltungen. Nach Prozessierung des Signalpeptids kommt es zu einer Abspaltung der Pro-Domäne, welche jedoch mit dem C-terminalen, biologisch aktiven Teil des Myostatin, einen lockeren Komplex bildet und die Funktion des Proteins hemmt (SAHARINEN, HYYTIAINEN et al. 1999; LAWRENCE 2001; HILL, DAVIES et al. 2002).

Bei Myostatin handelt es sich um ein hoch konserviertes Protein, welches zwischen zahlreichen Spezies, vor allem im C-Terminus, bis zu 100% Sequenzidentität besitzt. Insbesondere durch Untersuchung von Modellorganismen, wie zum Beispiel Myostatin *knock-out* Mäusen, aber auch durch Analyse des Genoms und Proteoms von zahlreichen anderen Wirbeltieren konnte die Funktion und Wirkung von Myostatin in den letzten Jahren deutlich besser verstanden werden. Es wurden verschiedene Inhibitionsmechanismen des biologisch aktiven Teils postuliert (GAMER, WOLFMAN et al. 1999; KOCAMIS, KIRKPATRICK-KELLER et al. 1999; LEE & MCPHERRON 2001; HILL, DAVIES et al. 2002; HILL, QIU et al. 2003), aber auch die Selbstinhibition von Myostatin untersucht (LEE & MCPHERRON 2001; THIES, CHEN et al. 2001; HILL, DAVIES et al. 2002; ZIMMERS, DAVIES et al. 2002). Die Wirkung von Myostatin kann besonders gut bei Spezies beobachtet werden, welche einen genetischen Defekt haben und bei denen das exprimierte Protein seine Funktion nicht mehr wahrnehmen kann. So sind Untersuchungen an

knock-out Mäusen heute in der Wissenschaft selbstverständlich und gehören im Prinzip zu den normalen Arbeitsschritten, aber auch die Betrachtung von anderen Spezies und ihren Rassen, welche durch Zucht, natürliche Selektion oder auch natürliche Mutation entstanden sind, ist im Hinblick auf Myostatin besonders interessant. Nicht erst mit der Entdeckung eines Jungen in Berlin (SCHUELKE, WAGNER et al. 2004), der eine Mutation im Myostatin - Gen trägt, sondern bereits bei der Untersuchung von verschiedenen Rinderrassen (GROBET, MARTIN et al. 1997; KAMBADUR, SHARMA et al. 1997) fand man Mutationen im Myostatin - Gen, welche nicht vom Menschen auf molekularbiologischer Ebene hervorgerufen worden waren, sondern durch natürliche Mutation entstanden sind.

Selbstverständlich stößt für ein Protein, welches das Muskelwachstum in dieser beeindruckenden Art beeinflusst, nicht nur bei Grundlagenforschern auf großes Interesse. Wissenschaftler aus den unterschiedlichsten Bereichen wie der Geriatrie, der Sportmedizin und der landwirtschaftlichen Nutztierforschung interessieren sich mittlerweile für die Erforschung des Proteins. Aber auch bei zahlreichen angrenzenden Industriezweigen ist das Interesse geweckt worden. Hersteller von Nahrungsergänzungsmitteln und Anabolika verkaufen so genannte „Myostatin Blocker“ mit fraglicher Wirkung, aber auch große Pharmahersteller investieren große Geldsummen um Therapeutika zu entwickeln, die Myostatin gezielt hemmen können. Der Missbrauch solcher Therapeutika zum „Gen-Doping“ wird bereits ebenso diskutiert (VOGEL 2004; AZZAZY, MANSOUR et al. 2005; BISHOP, KAMBADUR et al. 2005; HAISMA & DE HON 2006; SCHAKMAN & THISSEN 2006) wie auch die positive Wirkung eines solchen Medikaments, die eventuell bei zahlreichen unterschiedlichen Muskelerkrankungen wie *Duchenne*, *Beckers* oder anderen Dystrophien erreicht werden könnte (ZAMMIT & PARTRIDGE 2002; GHOLAMI, GONZALEZ-CADAVID et al. 2003; CHAKKALAKAL, THOMPSON et al. 2005; VOISIN & DE LA PORTE 2005; MINETTI, COLUSSI et al. 2006; TSUCHIDA, SUNADA et al. 2006).

Für die Therapiekontrolle bei Behandlung mit einem solchen potentiellen Myostatin – Inhibitor, die allgemeine Untersuchung von Muskelerkrankungen

oder anderen assoziierten Beschwerden, das Screening von Nutztierassen, die Dopingkontrolle oder aber auch für andere wissenschaftliche Fragestellungen fehlt jedoch bisher eine einfache, schnelle und kostengünstige Methode, um Myostatin in Serumproben von Patienten oder Versuchstieren in jedem Routinelabor quantifizieren zu können.

Als Methode eignet sich hier vor allem ein Immunoassay, der unter der Voraussetzung, dass ein hochspezifischer Antikörper verwendet werden kann, alle oben genannten Bedingungen erfüllen kann. Für die Entwicklung eines solchen Assay ist es jedoch mindestens ein Antikörper notwendig, der das Antigen hochspezifisch erkennt. Zur Generierung des Antikörpers wiederum wird das Antigen benötigt, mit welchem dann Tiere zu Antikörpergewinnung immunisiert werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher neben der Entwicklung eines Immunoassay zur Quantifizierung von Myostatin in humanem Plasma oder Serum auch die Entwicklung und Generierung aller notwendigen „Arbeitswerkzeuge“, die für die Assayentwicklung notwendig sind. Zudem sollte die Spezifität der generierten Antikörper nicht nur im Western Blot bestätigt werden, sondern auch Immunhistologische Untersuchungen zur Lokalisation von Myostatin in unterschiedlichen Geweben durchgeführt werden. Zusätzlich sollte erstes Probenmaterial gemessen werden, um die klinische Relevanz und Verwendbarkeit des Assay unter Beweis zu stellen.

4.1. Extraktion von nativem Myostatin aus Muskulatur

Da das Material zur Isolation von Myostatin aus menschlicher Muskulatur nur in begrenzten Mengen vorlag, wurden zunächst Versuche zur Proteinextraktion an Rattenmuskulatur durchgeführt. Die verwendeten 6 Wochen alten Ratten wurden freundlicherweise von Prof. Berger (DKFZ; Heidelberg) zur Verfügung gestellt und waren maximal 2 Stunden vor der Entnahme der Beinmuskulatur durch Genickdislokation getötet worden. Bei der Proteinextraktion aus der Rattenmuskulatur wurde vor allem auf eine hohe Proteinausbeute, schonende

Behandlung der Proteine und effektive Durchführbarkeit geachtet. Die verschiedenen Methoden wurden in Anlehnung an bekannte Literatur durchgeführt, in der bereits versucht worden war, Myostatin aus Muskulatur zu isolieren (MENDLER, ZADOR et al. 2000; SAKUMA, WATANABE et al. 2000; KAWADA, TACHI et al. 2001). Die Extraktion von Myostatin aus Rattenmuskulatur wurde mit 3 unterschiedlichen Puffersystemen durchgeführt, die sich vor allem durch die Detergentienzugabe unterschieden. Die Verwendung von NP-40 und Triton X-100 zeigte sich, ebenso wie die Verwendung von Mercaptoethanol und DTT, als nicht sehr effektiv. Lediglich mit dem Zusatz von SDS konnte ein zufrieden stellendes Ergebnis erreicht werden. Bei diesen Vorversuchen wurde stets versucht, mit bereits bei der Firma Immundiagnostik vorhandenen Antikörpern gegen Myostatin - Peptide einen Western-Blot durchzuführen. Mit den zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Antikörpern konnte jedoch bei keiner der Extraktionsmethoden eine Detektion von Myostatin im Western-Blot erreicht werden. Auf diesen Versuchen aufbauend und unter weiterer Variation der Zusammensetzung der Extraktionslösung wurde die Extraktion aus humaner Oberschenkelmuskulatur durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass weder die Kombination aus Triton X-100 und CHAPS noch die Verwendung von SDS oder Brij35® besonders geeignet ist. Ein Puffer mit NP-40 und Triton X-100 als Detergenz brachte eine besonders große Ausbeute an extrahierten Proteinen aus der Muskulatur (BAUMANN, IBEBUNJO et al. 2003). Diese konnte jedoch nur auf einer SDS-PAGE (Abb. 14) erkannt werden, da die Verwendung von Triton X-100 in der Durchführung des Bradford-Assay zur Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration zu falschen Ergebnissen führt.

Zur Aufreinigung des Muskelextraktes wurden unterschiedliche chromatographische Verfahren angewendet. Da die Albumine etwa 60% aller Plasmaproteine ausmachen und sie in der SDS-PAGE eine sehr breite Bande von 40 bis 70 kDa aufweist, wurde zunächst durch Verwendung einer *Blue Sepharose® G* Säule versucht, die Albumine aus dem plasmahaltigen Muskelextrakt zu adsorbieren. Diese Aufreinigung stellte sich jedoch nicht als eine geeignete Methode dar, da die Adsorption des Albumins nur teilweise

gelang (Abb. 15). Durch Gelfiltration mit Hilfe einer Sepharose 6B – Säule wurden die Proteine des Muskelextraktes fraktioniert und es wurde somit versucht vor allem größere Proteine, wie zum Beispiel Titin oder auch kleinere Proteine wie Myoglobin von Myostatin abzutrennen. Es konnte mit diesem Verfahren zwar eine Auftrennung der Muskelproteine erreicht werden, jedoch konnten die bis zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Antikörper keine Proteine in den Fraktionen detektieren. Als Grund hierfür wurde die geringe Myostatinkonzentration in den Fraktionen angesehen. Daher wurden einige Fraktionen der Gelfiltration wieder gepoolt und mit Hilfe einer Affinitätschromatographie aufgereinigt. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine Säule, an die der Antikörper ID1308 gekoppelt war. Die eluierten Fraktionen dieser Aufreinigung zeigten auf der SDS-PAGE keine Banden im Molekulargewichtsbereich von Myostatin. Erst durch die Verwendung einer fünffachen Menge an Muskelmaterial für die Extraktion und anschließende Gelfiltration konnten im Western-Blot mit dem Antikörper ID1308 Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von Myostatin gezeigt werden (Abb. 18). Die Intensität der Banden war sowohl im Western-Blot als auch in der Silberfärbung sehr gering, obwohl vor der Durchführung die Fraktionen mit Hilfe von Zentrifugen-Ultrafiltration etwa um den Faktor 10 eingeengt worden waren. Da die Myostatinkonzentration im menschlichen Muskel sehr gering ist und das Muskelmaterial einen limitierenden Faktor für die Isolierung von nativem Myostatin darstellt, wurde auf eine weitere Extraktion und Reinigung verzichtet. Aufgrund nachfolgender Versuche kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Verwendung eines hoch konzentrierten Muskelextraktes, gefolgt von einer Gelfiltration und anschließender Affinitätschromatographie mit einer Myostatin-Antikörper-gekoppelten Säule zu relativ gut gereinigtem Myostatin führen würde.

4.2. Expression von rekombinantem Myostatin

Aufgrund der bereits zu erwartenden Schwierigkeiten bei der Extraktion von nativem Myostatin aus menschlicher Muskulatur wurde parallel dazu rekombinantes Myostatin generiert. Die Durchführung dieser Arbeiten erfolgte im Biochemischen Institut II der Universitätsklinik Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mats Paulsson unter Anleitung von Dr. Neil Smyth. Neben der Herstellung von rekombinantem Myostatin mit der gesamten Aminosäuresequenz wurden verschiedene Ansätze gemacht, um auch einzelne Abschnitte des Proteins (Pro-Domäne, C-Terminus etc.) rekombinant herstellen zu können (Abb. 19). Als Expressionszelllinie wurde eine humane Nierenzelllinie (HEK 293 EBNA) gewählt, da diese den Vorteil bietet, dass exprimierte Proteine posttranslationale Modifikationen aufweisen, welche nativen Proteinen besonders ähnlich sind. Die Expression von rekombinantem Myostatin wurde bis dahin nur in CHO-Zelllinien (TAYLOR, BHASIN et al. 2001) oder in *E.coli* (YANG, WANG et al. 2001; LANGLEY, THOMAS et al. 2002) durchgeführt. Diese beiden gängigen Zelllinien besitzen den Nachteil, dass die Phosphorylierungen und Glykosilierungen, aber auch die Faltung des exprimierten Proteins nicht denen eines humanen Expressionssystems entsprechen. Um die Aufreinigung des exprimierten Myostatin aus dem Zellkulturüberstand zu erleichtern, wurde bei der Herstellung des Konstruktes darauf geachtet, dass das Protein in das Zellkulturmedium sekretiert werden kann und zudem einen His⁶-Tag besitzt, mit dessen Hilfe das Protein mit einer Nickel-Sepharose Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand gereinigt werden kann (Abb. 20). Bei Auftrennung des rekombinanten Myostatin auf einer SDS-PAGE waren mehrere Banden zu erkennen, von welchen eine Sequenzierung mit Hilfe eines Edman-Abbaus durchgeführt wurde (Tab. 2; Abb. 21) (EDMAN & BEGG 1967). Bei nahezu allen Proteinbanden konnte als Aminosäuresequenz ein Abschnitt aus der N-terminalen Pro-Domäne des Myostatin identifiziert werden. Eine Bande bei etwa 15 kDa, bei der vermutet wird, dass es sich hier um den C-Terminus von Myostatin handeln könnte, war nicht lesbar, während das Sequenzierungssignal einer anderen sehr

schwachen Bande bei etwa 50 kDa zu gering war. Die Sequenzierungsergebnisse zeigen, dass es sich bei dem von der humanen, embryonalen Nierenzelllinie exprimierten Protein um Gesamt-Myostatin handelt. Bei der Sequenzierung der Proteinbanden wurde bei etwa 75 bis 100 kDa ebenfalls eine Sequenz aus dem N-Terminus von Myostatin erkannt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das rekombinante Myostatin nicht nur in der gesamten Länge vorliegt, sondern zusätzlich dazu in der Lage ist, Homo- oder Heterodimere zu bilden. Aufgrund der Verunreinigung der sequenzierten Probe mit Acetyltransferase (3.6.2) wurde das rekombinante Myostatin vor der weiteren Verwendung wiederholt mit einer Nickel-Sepharose Affinitätschromatographie gereinigt.

Zur weiteren Qualitätskontrolle des rekombinanten Materials und zur Absicherung, ob es sich bei der 15 kDa-Bande tatsächlich um den C-Terminalen Teil von Myostatin handelt, wurde mit dem Protein ein Verdau mit dem Enzym *Furin* durchgeführt. An der Schnittstelle –RSRR– direkt am Ende der Pro-Domäne kann dieses Enzym den C-Terminus abtrennen. Der Verdau mit *Furin* zeigte eine deutliche Intensivierung der Banden bei 37 kDa (Pro-Domäne) und auch bei 15 kDa (C-Terminus), wohingegen die Banden, bei denen ein Dimer (100 kDa) oder ein Monomer (50 kDa) von rekombinantem Myostatin vermutet werden, nach Verdau mit *Furin* kaum noch zu erkennen waren (Abb. 23). Diese Beobachtung deckt sich mit der von JIN et al., die sowohl unprozessiertes Schweinemyostatin als auch den C-Terminus von Schweinemyostatin in *E.coli* exprimierten und dann Versuche zur Faltung der Proteine durchführten (JIN, DUNN et al. 2004). Auch in diesem Fall stellte unprozessiertes Myostatin ein Substrat für *Furin* dar. Die Versuche von JIN et al. zeigten, dass die Anwesenheit der Pro-Domäne wichtig für die korrekte Faltung und Dimerisierung des C-Terminus ist.

4.3. Antikörper gegen Myostatin

Zu Beginn der Arbeit waren bereits verschiedene Antikörper aus Kaninchen vorhanden, welche durch Immunisierung mit unterschiedlichen, synthetischen Myostatin Peptiden erhalten wurden. Da lediglich die Antigene, also die Peptide, zur Verfügung standen, konnte nur untersucht werden, ob die Antiseren ihre jeweiligen Antigene erkennen. Erst nach der Herstellung des rekombinanten Myostatin konnten auch diese Antikörper dahingehend untersucht werden, ob sie tatsächlich Myostatin in der vollen Länge erkennen und somit trotz anderer Faltung des Gesamtproteins im Vergleich zu ihrem Antigen für die Detektion von Myostatin verwendet werden können. Mit einem Western-Blot konnte gezeigt werden, dass die Antikörper der Kaninchen RA 2923 (ID1307 und ID1308) alle Banden, welche bereits durch Sequenzierung als Myostatin identifiziert werden konnten, erkennen. Zur ersten Abklärung der Spezifität des polyklonalen Antiserums wurden parallel zum rekombinanten Myostatin GDF-11 und Myoglobin untersucht und bei keinem der beiden Proteine konnte eine Kreuzreaktivität des Antikörpers festgestellt werden. Die Antikörper der Kaninchen RA 2864 sowie RA 2978 detektierten keines der oben genannten Proteine.

Nach der unter 4.2 beschriebenen Qualitätskontrolle und zweiten Aufreinigung des rekombinanten Myostatin wurden verschiedene Tierspezies mit diesem Material immunisiert. Zur Antikörpergenerierung wurden je zwei Hühner, Kaninchen und Mäuse verwendet und mit rekombinantem, KLH-gekoppeltem, bzw. ungekoppeltem Myostatin immunisiert und in regelmäßigen Abständen die Antikörpertiter kontrolliert. Dazu wurden die Antikörper aus den Hühnereiern aufgereinigt und die Antiseren der Kaninchen und Mäuse gewonnen. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Kaninchenserum teilweise gereinigt und die Mäuse für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet.

Die Überprüfung des Titers der Kaninchen zeigte deutlich, dass dieser bei dem Kaninchen, welches mit ungekoppeltem, rekombinantem Myostatin (Kaninchen 1) immunisiert worden war, deutlich höher war (1:45000 v/v) als bei dem Kaninchen, bei dem als Antigen KLH-gekoppeltes Myostatin (Kaninchen 2)

verwendet worden war. Da das Kaninchen, welches nur mit rekombinantem Myostatin immunisiert worden war, kurz nach der 3. Abnahme verstarb, wurde entschieden, das andere Kaninchen von diesem Zeitpunkt an nicht mehr mit KLH-gekoppeltem Myostatin zu immunisieren, sondern nur noch ungekoppeltes Material zu verwenden. Dieses „Um-Immunisieren“ brachte jedoch nicht den gewünschten Erfolg eines Titeranstieges. Der Titer von Kaninchen 2 lag weiterhin deutlich unter dem des verstorbenen Tieres. Dennoch kann das Antiserum auch von diesem Tier für weitere Versuche verwendet werden, da der Antikörper durchaus in einer Verdünnung von bis zu 1:45000 (v/v) eingesetzt werden kann und bei einer Abnahmemenge von etwa 10 ml genügend Material zur Verfügung steht. Bei der Überprüfung der Spezifität des Antikörpers (*rabbit- α -rek. Myostatin 3.Abn*) konnte – wie bereits bei der Untersuchung des Antikörpers ID1307 – keine Kreuzreaktivität zu GDF-11 oder Myoglobin festgestellt werden. Eine Überprüfung im Western-Blot mit prozessiertem Myostatin, also rekombinantem Myostatin, mit welchem ein Verdau mit Furin durchgeführt worden war, zeigte dasselbe Bandenmuster wie bereits für ID1308 beschrieben wurde. Zudem wurde ein kleines Peptid-*mapping* mit sechs unterschiedlichen Myostatin-Peptiden durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass das polyklonale Kaninchenserum nicht nur alle fünf Peptide erkennt, welche aus humanem Myostatin stammen, sondern auch einen Sequenzabschnitt aus der Pro-Domäne des Maus-Myostatin detektieren kann. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass der Antikörper nicht nur zum Nachweis von Myostatin humanen Ursprungs sondern auch in Proben aus Mäusen verwendet werden kann.

Parallel zur Generierung und Charakterisierung der unterschiedlichen Antikörper wurde stets an der Entwicklung von Immunoassays zur Quantifizierung von Myostatin gearbeitet und in den in der Entwicklung befindlichen Assays immer wieder Probenmaterial unterschiedlichster Probenkollektive gemessen. Aus einer dieser Messungen mit einem kompetitiven Messsystem unter Verwendung des oben beschriebenen Antikörpers *rabbit- α -rek. Myostatin 3.Abn* wurden zwei Patientenproben

ausgewählt, welche bei dieser besonders auffällige Messergebnisse gezeigt hatten. Bei einer dieser Plasmaproben konnte im Assay kein Myostatin gemessen werden, in der anderen Plasmaprobe jedoch so viel, dass der Messwert nicht mehr im Messbereich lag. Diese beiden Proben wurden im Western-Blot mit *rabbit- α -rek. Myostatin 3.Abn* detektiert. Bei etwa 25 kDa, dem Molekulargewichtsbereich des dimerisierten C-Terminus, konnte beim *High-Control* Plasma eine deutliche Bande gesehen werden, wohingegen diese bei der *Low-Control* kaum zu erkennen war. Beide Plasmen zeigten eine deutliche Bande bei etwa 50 kDa, welche auf Gesamt-Myostatin hindeutet. Daher kann darauf geschlossen werden, dass der vorliegende Antikörper *rabbit- α -rek Myostatin 3.Abn* nicht nur das gesamte Myostatin, sondern ebenfalls die biologisch aktive und damit klinisch besonders relevante Form von Myostatin, nämlich den C-Terminus und sein Dimer, erkennt. Daher wurde für die Entwicklung eines Immunoassays vor allem dieser Antikörper verwendet, da mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass mit diesem Antikörper sehr spezifische Analysen durchgeführt werden können. um die Konzentration des gesamten zirkulierenden Myostatin (Pro-Domäne, C-Terminus, Gesamtprotein und die dimeren Formen von den genannten Abschnitten) zu bestimmen.

Hühner eignen sich oft sehr gut dafür, Antikörper gegen hoch konservierte Säugetierproteine zu gewinnen. Aus diesem Grund wurden zwei Hühner immunisiert und die IgY-Antikörper aus den Eidottern gewonnen. Für diese Aufreinigung wurden Antikörper der Eier je eines Monats gewonnen. Die Überprüfung des Antikörpertiters zeigte hier, wie bereits bei den Kaninchen zu beobachten war, dass der Antikörper des Huhns, welches mit ungekoppeltem Myostatin immunisiert worden war, einen höheren Titer erreichte, als die IgY-Fraktion des Tieres, welches mit KLH-gekoppeltem Myostatin immunisiert worden war. Die Darstellung von B / B_{max} in Abb. 29 a), also dem Quotienten aus der optischen Dichte der jeweiligen Verdünnungsstufe und der optischen Dichte der maximalen Bindung (in diesem Fall die kleinste Verdünnungsstufe

1:100), ermöglicht den direkten Vergleich von zwei Titerverläufen. Bei Betrachtung der absoluten Werte der optischen Dichten wie in Abb. 29 b) ist jedoch zu erkennen, dass die Aufreinigung *c- α -rek. Myo (AUG)* den besten Titer aufweist, da hier bei einer Verdünnung von 1:100 eine optische Dichte von etwa $OD_{450nm} = 1,2$ erreicht werden kann. Daher wurde auf die weitere Verwendung der anderen Antikörperpräparationen in diesem Fall verzichtet. Die Untersuchung der besten Blockierungslösung für die Verwendung der IgY-Aufreinigungen in einem Immunoassay ergab, dass PPGNE die beste Blockierungslösung ist. Wie in Tab. 5 zu erkennen, kann lediglich mit PPGNE und PBS / 1% Fischgelatine eine signifikante Differenz zwischen den optischen Dichten des Antikörpers auf einer mit Myostatin beschichteten MTP und einer unbeschichteten Platte (*BLANK*) erreicht werden. Da der *BLANK* bei Verwendung von PBS / 1% Fischgelatine jedoch relativ hoch ($OD_{450nm} = 0,432$) war, wurde für nachfolgende Versuche nur noch PPGNE verwendet, welche bei einer OD-Differenz von 0,462 einen *BLANK* von $OD_{450nm} = 0,056$ aufwies.

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern bietet den Vorteil, dass diese in der Regel hoch affinen Antikörper in nahezu unbegrenzter Menge hergestellt werden können. Der Herstellungsprozess ist zwar deutlich aufwändiger und langwieriger als die Gewinnung von polyklonalen Antikörpern durch Immunisierung von Kaninchen oder Hühnern, jedoch ist es durchaus möglich, mehrere unterschiedliche Klone zu generieren, welche unterschiedliche Epitope eines Proteins erkennen. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden durch wiederholte Subklonierung zwei Antikörperpopulationen gewonnen. Die Isotypisierung dieser beiden Klone zeigte, dass es sich bei den Antikörpern, welche von den Hybridoma-Zellen exprimiert werden, um Antikörper der Klasse IgG2b handelt. Es konnte nicht bestimmt werden, ob die beiden Klone (7F und 4D) unterschiedliche Epitope erkennen. Für den Aufbau eines *Sandwich*-ELISA wäre es jedoch von Vorteil, zwei monoklonale Antikörper zu verwenden, da hiermit eine gleich bleibende Qualität eines solchen Immunoassays erreicht werden könnte. Weiterführende Arbeiten sollten mit den vorhandenen

Antikörperklonen ein *Epitop-Mapping* durchführen, um die Epitope zu identifizieren, welche von den monoklonalen Antikörpern erkannt werden. Zudem wäre es sinnvoll, nach weiteren Klonen zu suchen, welche andere Epitope von Myostatin erkennen, damit spezifische Assays aufgebaut werden können, mit denen gezielt definierte Domänen von Myostatin bestimmt werden. Mit Hilfe solcher Antikörper und Immunoassays wäre es möglich, die Funktion und Wirkungsweise von Myostatin, dem C-Terminus und der Pro-Domäne besser aufzuklären. Ein Peptid-Mapping mit denselben Peptiden wie unter 3.7.2 und Tab. 4 beschrieben zeigte nur eine schwache Reaktion beider Antikörper mit Peptid 2, einem Sequenzabschnitt der Pro-Domäne. Aufgrund der linearen Abnahme der optischen Dichte parallel zur linearen Verdünnung der Antikörper kann davon ausgegangen werden, dass das Antigen-Epitop der Antikörper in einem Sequenzabschnitt der Pro-Domäne liegt.

Die Verwendung der beiden monoklonalen Antikörper gegen rekombinantes Myostatin im Dot-Blot zeigte sowohl deutlich die Differenzierung zwischen zwei Patientenproben (siehe Abb. 32), als auch die Detektion von rekombinantem Myostatin auf der Nitrozellulose-Membran. Die Antikörper könnten jedoch gut für die Detektion von Gesamt-Myostatin oder aber der Pro-Domäne eingesetzt werden und somit eventuell in der Kombination mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper für die Entwicklung eines Sandwich-ELISA. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der Antikörper seine höchste Immunoreaktivität in pH-Bereichen von 3 bis 5 aufweist, welches eine Konformationsänderung des nativen Myostatin in der Probe zur Folge haben könnte, oder sogar ein Ausfällen von Proteinen in den Proben bewirken könnte.

4.4. Immunhistologische Untersuchungen

Die immunhistologischen Arbeiten wurden mit dem polyklonalen Antikörper *rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)* durchgeführt. Im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper alle Untereinheiten des Myostatin sowie das Gesamtprotein, aber auch die dimerisierten Abschnitte erkennt. Daher lag der

Schluss nahe, dass es möglich ist, mit diesem Antikörper im Muskelgewebe zu detektieren. Bei der histologischen Untersuchung von Skelettmuskulatur konnte bei Verwendung des Antikörpers zur Anfärbung eine deutliche Lokalisation um den Zellkern herum festgestellt werden (Abb. 34), deren Intensität mit zunehmender Entfernung vom Zellkern abnahm. Bereits Untersuchungen der Skelettmuskulatur von Ratten konnten immunhistologisch die Lokalisation von Myostatin in der Nähe des Zellkerns darstellen (SAKUMA, WATANABE et al. 2000). Neuere Untersuchungen an Rattenmuskulatur zeigen hingegen, dass die stärksten Signale bei der histologischen Untersuchung außerhalb des Sarkolemmas zu erkennen sind (MATSAKAS, BOZZO et al. 2006a). Nach MATSAKAS liegt die Immunoreaktivität von Myostatin eher um die Nuclei der Satellitenzellen, welche zwischen der Plasmamembran und der Basallamina der Muskelzellen liegen.

Die glatte Muskulatur des Uterus konnte nicht angefärbt werden, jedoch war eine Anfärbung in der Umgebung von Gefäßen zu erkennen (Abb. 35). Eine derartige Beobachtung konnte im Gewebe der Nebenschilddrüse ebenso gemacht werden. Größere Gefäße mit einer glatten Muskulatur zeigten in der Parathyroidea eine deutliche Anfärbung mit dem Myostatin-Antikörper, ohne aber das Drüsengewebe oder aber Kapillaren zu markieren. Eine solche Anfärbung kann allerdings auch daher stammen, dass in nekrotischem oder verletztem Gewebe generell deutlich mehr Myostatin lokalisiert werden kann (KIRK, OLDHAM et al. 2000) und im vorliegenden Fall nicht ausgeschlossen werden kann, dass verletztes oder bereits nekrotisches Gewebe vorlag.

Die Immunhistologie von Herzmuskulatur zeigt, dass vor allem in den Glanzstreifen, also in den Zwischenräumen von zwei Herzmuskelzellen, besonders starke Anfärbungen zu beobachten sind (Abb. 36). Dies unterstützt wiederum die Beobachtung von MATSAKAS, dass Myostatin eher außerhalb der Muskelzellen in den Satellitenzellen zu lokalisieren ist. Auf einigen Bildern kann jedoch eine deutliche Anfärbung um die Zellkerne herum gezeigt werden. Myostatin wird im Zellkern exprimiert. Daher kann der hier verwendete polyklonale Kaninchen-Antikörper das Protein um den Zellkern herum

erkennen. Die stärkere Anfärbung entlang der Plasmamembran ist wahrscheinlich darin begründet, dass Myostatin aus der Muskelzelle ausgeschleust und dann hemmend auf den Wachstum der Muskelzellen über verschiedene Wirkmechanismen (siehe 1.2) wirkt, in dem es an membranständige Rezeptoren bindet.

4.5. Immunoassay – Entwicklung

Die vorhergehenden Untersuchungen, insbesondere die Charakterisierung der Antikörper, dienten als Grundlage zur Entwicklung eines Immunoassays zur Quantifizierung von Myostatin in der Zirkulation. Mit dem ersten beschriebenen Assay, bei dem es sich um ein kompetitives Messsystem unter Verwendung eines Peptid-Antikörpers handelte, war es nur möglich, relative Konzentrationen zu erfassen. Die Reproduzierbarkeit von absoluten Konzentrationen ist oftmals bei der Durchführung von kompetitiven Messsystemen nicht gegeben. Aufgrund des großen Interesses zahlreicher Forschungsgruppen an der Bestimmung von Myostatin in der Zirkulation bestand die Möglichkeit, im Verlauf dieser Dissertation auf Probenkollektive zurückzugreifen, anhand derer eine klinische Aussagekraft der Assays überprüft werden sollte. Beispielhaft ist in Abb. 49 eine dieser Untersuchungen von 77 Patientenseren dargestellt. Die Angabe der Konzentration erfolgt hier in frei gewählten U / ml, entspricht in diesem Fall aber etwa den Konzentrationen, die andere Arbeitsgruppen in ng / ml (*myostatin-immunoreactive protein per ml*) angeben (GONZALEZ-CADAVID, TAYLOR et al. 1998). Der hier verwendete Peptid-Antikörper (ID1308/1307) war nahezu gegen dasselbe Peptid generiert worden wie von GONZALEZ-CADAVID beschrieben (Sequenz: NMLYFNGKEQIIYGKI). Wie aus der Abbildung zu erkennen, bewirkte ein muskelaufbauendes Training bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, welche alle unter Muskelschwund litten, einen Abfall der Myostatin Konzentration. Patienten mit einer Fibromyalgie, allerdings ohne Muskelschwund, hatten im Vergleich zu den Patienten mit rheumatoider Arthritis einen deutlich niedrigeren Myostatinwert, der allerdings im Vergleich zu

gesunden Patienten leicht erhöht war. Diese Beobachtungen decken sich mit zahlreichen anderen Untersuchungen. So konnte bei HIV erkrankten Personen eine Erhöhung der Myostatin Konzentration festgestellt werden (GONZALEZ-CADAVID, TAYLOR et al. 1998; MORLEY, THOMAS et al. 2006). Zudem führten mehrere Arbeitsgruppen Untersuchungen zur Überprüfung, wie sich starkes Training auf die Myostatinkonzentration im Serum auswirkt, durch und stellten dabei fest, dass diese in der Regel mit einem gezielten Training zurück geht (IVEY, ROTH et al. 2000; SCHULTE & YARASHESKI 2001; WILLOUGHBY 2004b; WILLOUGHBY 2004a; KOPPLE, COHEN et al. 2006; MATSAKAS, BOZZO et al. 2006b; MATSAKAS, BOZZO et al. 2006a).

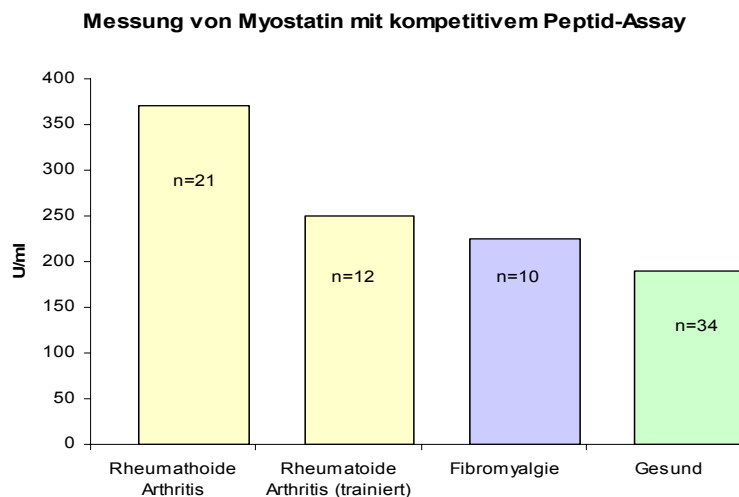


Abb. 49 Graphische Darstellung der Messergebnisse einer Studie zur Messung von Myostatin, durchgeführt mit einem kompetitiven ELISA unter Verwendung eines Peptid-Antikörpers. Untersucht wurden insgesamt 77 Patienten, davon 21 mit rheumatoider Arthritis, 12 mit derselben Erkrankung, jedoch nach Muskeltraining, 10 Patienten, die unter Fibromyalgie litten, sowie 34 gesunde Patienten. Angabe der Konzentration erfolgt in willkürlichen U / ml.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass mit dem Assay eine klinisch relevante Messung möglich war. Der verwendete Antikörper war jedoch sehr niedrigtitrig und musste im Assay 1:100 eingesetzt werden. Da das polyklonale

Antiserum nur in einer begrenzten Menge vorlag, musste nach anderen Alternativen zur Assayentwicklung gesucht werden, da auch durch Optimierung der Assaybedingungen keine stärkere Verdünnung des Antikörpers gewählt werden konnte und so auf absehbare Zeit das Antikörpermaterial nicht in ausreichenden Volumina für Weiterentwicklung und Verkauf vorhanden war.

Mit der Entwicklung eines *Sandwich*-ELISA sollte ein stabiles Messsystem erreicht werden. Im Gegensatz zu einem kompetitiven Assay, bei dem das Gleichgewicht zwischen Antigen und Antikörper sehr empfindlich ist, ist bei dem *Sandwich*-Verfahren der Einfluss minimaler Schwankungen der Antigen- oder Antikörperkonzentration nicht wahrnehmbar. Durch die Verwendung eines polyklonalen Hühnerantikörpers (*chicken- α -rek. Myo (AUG)*) konnte eine Beschichtung erreicht werden, welche aufgrund ihrer polyklonalen Eigenschaft, also die Erkennung unterschiedlicher Epitope, dem Antigen zahlreiche Bindungsmöglichkeiten gibt. Die Verwendung eines weiteren polyklonalen Antikörpers (*rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)*) als Sekundärantikörper sowie ein optimiertes Puffersystem ermöglichte eine Standardkurve in einem Konzentrationsbereich von 65,2 pg / ml bis 16000 pg / ml. Die Durchführung der unterschiedlichen Validierungsschritte wie zum Beispiel die Überprüfung der Linearität von Patientenseren misslang. Weder durch Oxidation der Proben mit Chloramin T noch durch Reduktion von Patientenmaterial mit Natriumborhydrid konnte eine Messung von Proben durchgeführt werden. Der Zusatz von Detergenzien oder Mercaptoethanol in unterschiedlichen Konzentrationen, um eventuelle Komplexbildungen des Myostatin rückgängig zu machen, ebenso wie die Behandlung des Materials mit Hitze und auch die Kombination der verschiedenen Verfahren konnten eine Messung von Myostatin mit diesem Messsystem nicht ermöglichen. Trotz der Verwendung dieser Vorbehandlungsmethoden lagen die Messwerte aller Patientenproben unterhalb des kleinsten Standards (Standard 8; 0 pg / ml). Die Myostatinkonzentration von rekombinantem Myostatin in Puffer kann mit diesem Verfahren zwar auch noch bestimmt werden, wenn dies nur in einer Konzentration von etwa 60 pg / ml

vorliegt, jedoch ruft eine natürliche Probenmatrix wie z.B. Serum oder Plasma Störungen hervor, die eine Messung in diesen Matrices verhindern und bisher nicht beseitigt werden konnten.

Aufgrund der oben erwähnten Schwierigkeiten bei der Entwicklung eines *Sandwich*-ELISA zur Bestimmung von Myostatin wurde ein kompetitiver Immunoassay unter Verwendung des polyklonalen Kaninchen-Antikörpers (*rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)*) entwickelt. Durch zahlreiche Optimierungsversuche, wie die Bestimmung der Beschichtungskonzentration, Blockierungslösungen oder zahlreiche Versuche zur Bindungskinetik von Antikörper und Antigen im kompetitiven Verfahren, konnte ein Messsystem entwickelt werden, welches zwar bei direktem Vergleich der Standarddeichkurven weniger sensitiv war als das *Sandwich*-ELISA Verfahren, jedoch war mit diesem Verfahren eine Messung von Patientenproben möglich. Im Rahmen der Optimierungs- und Validierungsversuche stand in diesem Fall ein Probenkollektiv zur Verfügung, welches bereits im kompetitiven Assay unter Verwendung des Peptid-Antikörpers gemessen worden war (Abb. 50).

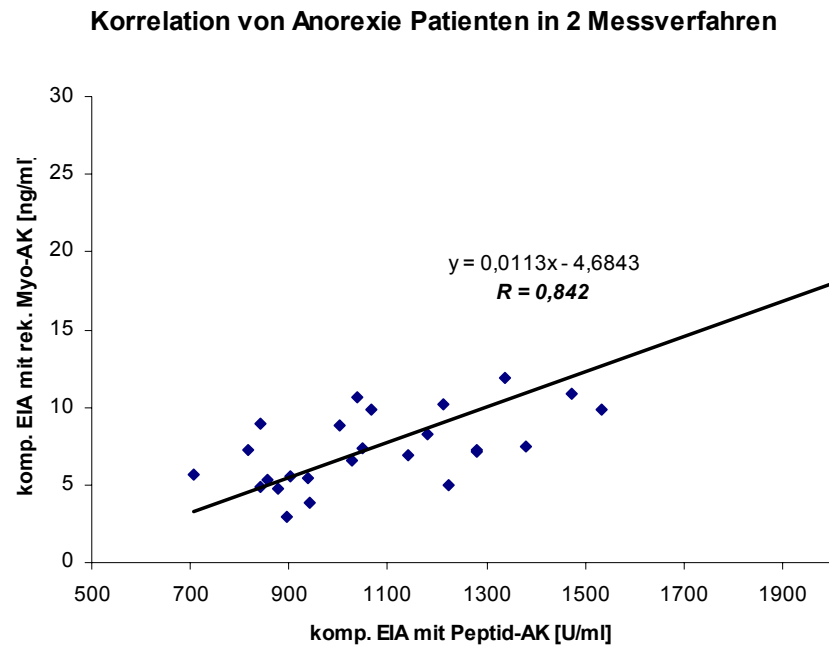


Abb. 50 Graphische Darstellung der Korrelation von Ergebnissen der Messung von Anorexie-Patienten in zwei unterschiedlichen Messsystemen. Auf der X-Achse wurden die Ergebnisse der Messung mit dem kompetitiven Messsystem unter Verwendung des Peptid-Antikörpers aufgetragen [U/ml]. Auf der Y-Achse wurden die Messergebnisse der Bestimmung mit dem kompetitiven EIA unter Verwendung des Antiserums gegen rekombinantes Myostatin aufgetragen. Korrelationskoeffizient $r = 0,842$

Durch Korrelation der Messungen in den beiden Messsystemen ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,842$. Bei dem Patientenkollektiv handelte es sich um Patienten, die unter Anorexie litten. Auffällig ist, dass der Konzentrationsbereich der Proben, welcher mit dem „neuen“ Testsystem unter Verwendung des Antikörpers *rabbit- α -rek. Myo (3.Abn)* erhalten wurde (zwischen 0,5 und 15 ng / ml) deutlich unter dem Bereich des Assays unter Verwendung des Peptid-Antikörpers (zwischen 700 und 1600 U / ml) lag. Die Reproduzierbarkeit der Standarddeichkurve, die lineare Verdünnbarkeit von Patientenproben, aber auch die gute Korrelation der Daten mit anderen bereits verwendeten Messsystemen zeigten deutlich, dass hier ein Messsystem

vorliegt, mit dem erstmals reproduzierbar die Konzentration von Gesamt-Myostatin in der Zirkulation gemessen werden kann.

Myostatin wurde erst vor 10 Jahren entdeckt und hat seitdem das Interesse zahlreicher Forschungsgruppen geweckt. Die Masse an Publikationen (> 450 Publikationen bei *PubMed* aufgelistet) über Myostatin in wissenschaftlichen Fachzeitschriften, aber auch das Interesse der Öffentlichkeit, welches sich in Berichten über Kinder mit einem Defekt im Myostatin – Gen widerspiegelt (z.B. „19-month old Incredible Hulk, Liam Hoekstra, auf: <http://www.thebizofknowledge.com/2007/06/>) an Myostatin hat in den letzten Jahren immer weiter zugenommen. Das hier entwickelte Testsystem wird nicht nur seinen Platz in verschiedenen Forschungsgruppen einnehmen, sondern kann möglicherweise auch in der Therapiekontrolle eingesetzt werden. Große Pharmazieunternehmen (Fa. Wyeth, USA) arbeiten an therapeutischen Antikörpern und anderen Medikamenten zur Blockade oder Hemmung von Myostatin. Hier muss ein geeignetes Testsystem existieren, mit dem behandelnde Ärzte ihre Therapien schnell und kostengünstig überprüfen können. Die in dieser Arbeit entwickelten monoklonalen Antikörper können eventuell die Möglichkeit bieten, zudem einen *Sandwich*-ELISA zu entwickeln, mit dem nur die Bestimmung der Pro-Domäne von Myostatin möglich ist.

Auch die Messung von Myostatin in anderen Spezies gewinnt immer mehr Interesse. Nicht nur Forschungsgruppen, welche in der Regel Mäuse oder Ratten als Modellorganismen verwenden, sondern auch die Messung von Myostatin bei Renn-Kamelen oder in der Pferdezucht (CVRL, Dubai) wird stärker nachgefragt. Möglicherweise könnte der hier beschriebene Assay auch in der Rinderzucht oder bei der Kreuzung von neuen Schweinerassen zur Fleischproduktion eingesetzt werden.

Bei dem hier entwickelten Testsystem konnten bislang keine Versuche zur Bestimmung der Kreuzreaktivität zu anderen Spezies durchgeführt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Messung von Myostatin mit den hier vorliegenden

Antikörpern möglich ist, ist jedoch aufgrund der großen Sequenzidentität, also der guten Konservierung der Aminosäuresequenz, sehr gut.

Mit den im Verlauf dieser Arbeit entwickelten Antikörpern könnte es möglich sein, natives Myostatin aus humaner Skelettmuskulatur zu isolieren. Hierfür müsste jedoch eine größere Menge an Muskulatur zur Verfügung stehen, wobei sich hier die Frage der ethischen Vertretbarkeit und Notwendigkeit stellen würde. Für die Isolierung von Myostatin aus anderen Spezies könnten jedoch ebenfalls diese Antikörper verwendet werden und damit ein natives Myostatin zur erneuten Immunisierung gewonnen werden.

Der C-Terminale Teil des Myostatin ist zwar der biologisch aktive Teil, jedoch wird eine Bestimmung nur von diesem Teil schwer möglich sein, da dieser vermutlich nie frei im Serum zirkuliert, sondern stets mit der Pro-Domäne in einem lockeren Komplex vorliegt. Es könnte jedoch nützlich sein, einen Antikörper zu entwickeln, welcher nur den C-Terminus erkennt, und dann mit Hilfe einer Affinitätschromatographie das zirkulierende Myostatin aus dem Serum zu gewinnen und dieses dann in einem Assay spezifisch zu bestimmen. Mit weiteren spezifischen monoklonalen Antikörpern könnten hier im Serum, aber auch in der Immunhistologie weiterführende Versuche zur Aufklärung der Wirkungsweise oder dem genauen Wirkungsort durchgeführt werden. Die vorliegenden Antikörper und Messsysteme können einen großen Schritt dazu beitragen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte ein kompetitives Testsystem zur Messung der Myostatinkonzentration in humanem Serum entwickelt werden.

Zur Generierung der benötigten Antikörper wurde zunächst versucht, natives Myostatin aus humaner Skelettmuskulatur zu gewinnen. Da die Konzentration an Myostatin in der Muskulatur jedoch relativ gering ist und die verwendeten Antikörper gegen ein Myostatin-Peptid keine ausreichende Spezifität besaßen, wurde zusätzlich dazu rekombinantes Myostatin hergestellt.

Für die Entwicklung von rekombinantem Myostatin wurde eine Zelllinie humanen Ursprungs gewählt, damit die posttranslationalen Modifikationen dem nativen Myostatin besonders ähnlich sind. Für die einfache und kostengünstige Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem Zellkulturüberstand wurde bei der Erstellung des Konstrukts eine Sequenz für einen 6 x His-Tag eingefügt. Nach Immunisierung von Hühnern, Kaninchen und Mäusen mit rekombinantem Myostatin konnten aus diesen Tieren Antikörper gewonnen werden. Die Charakterisierung der Antikörper ergab, dass die polyklonalen IgY-Antikörper aus den Hühnereiern und die polyklonalen IgG-Antikörper aus dem Kaninchenserum rekombinantes Myostatin und alle Untereinheiten und Dimere erkennen. Die monoklonalen IgG-Antikörper, welche durch Fusionierung zu einer Hybridoma-Zelllinie erhalten wurden, erkennen einen Sequenzabschnitt aus der Pro-Domäne von Myostatin.

Bei der Verwendung des polyklonalen Kaninchen-Antikörpers auf histologischen Präparaten konnte eine Anfärbung von Muskelzellen erreicht werden. Diese Anfärbung konnte vor allem in der Nähe von Zellkernen und der Plasmamembran verstärkt beobachtet werden. Mit dem verwendeten Antikörper war es möglich, auch in Herzmuskulatur die Zwischenräume der Herzmuskelzellen, also die Glanzstreifen, anzufärben.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über die Antikörper konnte ein Immunoassay zur Messung von Myostatin entwickelt und erste Validierungen in klinischen Studien durchgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Amthor, H., R. Huang, I. McKinnell, B. Christ, R. Kambadur, M. Sharma and K. Patel (2002). "The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis." Dev Biol **251**(2): 241-57.
2. Amthor, H., G. Nicholas, I. McKinnell, C. F. Kemp, M. Sharma, R. Kambadur and K. Patel (2004). "Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis." Dev Biol **270**(1): 19-30.
3. Azzazy, H. M., M. M. Mansour and R. H. Christenson (2005). "Doping in the recombinant era: strategies and counterstrategies." Clin Biochem **38**(11): 959-65.
4. Baumann, A. P., C. Ibebunjo, W. A. Grasser and V. M. Paralkar (2003). "Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy." J Musculoskelet Neuronal Interact **3**(1): 8-16.
5. Bellinge, R. H., D. A. Liberles, S. P. Iaschi, A. O'Brien P and G. K. Tay (2005). "Myostatin and its implications on animal breeding: a review." Anim Genet **36**(1): 1-6.
6. Biga, P. R., K. D. Cain, R. W. Hardy, G. T. Schelling, K. Overturf, S. B. Roberts, F. W. Goetz and T. L. Ott (2004). "Growth hormone differentially regulates muscle myostatin1 and -2 and increases circulating cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Gen Comp Endocrinol **138**(1): 32-41.
7. Biga, P. R., S. B. Roberts, D. B. Iliev, L. A. McCauley, J. S. Moon, P. Collodi and F. W. Goetz (2005). "The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **141**(2): 218-30.
8. Bishop, A., R. Kambadur and M. Sharma (2005). "The therapeutic potential of agents that inactivate myostatin." Expert Opin Investig Drugs **14**(9): 1099-106.
9. Blum, H., H. Beier and H. J. Gross (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." Electrophoresis **8**(2): 93-99.

10. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
11. Bullough, W. S. (1962). "The control of mitotic activity in adult mammalian tissues." Biol Rev Camb Philos Soc **37**: 307-42.
12. Carlson, C. J., F. W. Booth and S. E. Gordon (1999). "Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading." Am J Physiol **277**(2 Pt 2): R601-6.
13. Castelhana-Barbosa, E. C., J. E. Gabriel, L. E. Alvares, C. B. Monteiro-Vitorello and L. L. Coutinho (2005). "Temporal and spatial expression of the myostatin gene during chicken embryo development." Growth Dev Aging **69**(1): 3-12.
14. Chakkalakal, J. V., J. Thompson, R. J. Parks and B. J. Jasmin (2005). "Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies." Faseb J **19**(8): 880-91.
15. Chang, H., C. W. Brown and M. M. Matzuk (2002). "Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily." Endocr Rev **23**(6): 787-823.
16. Coffey, V. G., A. Shield, B. J. Canny, K. A. Carey, D. Cameron-Smith and J. A. Hawley (2006). "Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(5): E849-55.
17. Daopin, S., K. A. Piez, Y. Ogawa and D. R. Davies (1992). "Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily." Science **257**(5068): 369-73.
18. Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." Nature **425**(6958): 577-84.
19. Dickman, S. (1997). "Gene mutation provides more meat on the hoof." Science **277**(5334): 1922-3.
20. Edman, P. and G. Begg (1967). "A protein sequenator." Eur J Biochem **1**(1): 80-91.

21. Fonseca, S., I. J. Wilsons, G. W. Horgan and C. A. Maltin (2003). "Slow fiber cluster pattern in pig longissimus thoracis muscle: implications for myogenesis." J Anim Sci **81**(4): 973-83.
22. Forbes, D., M. Jackman, A. Bishop, M. Thomas, R. Kambadur and M. Sharma (2006). "Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism." J Cell Physiol **206**(1): 264-72.
23. Franzen, P., P. ten Dijke, H. Ichijo, H. Yamashita, P. Schulz, C. H. Heldin and K. Miyazono (1993). "Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor." Cell **75**(4): 681-92.
24. Gamer, L. W., N. M. Wolfman, A. J. Celeste, G. Hattersley, R. Hewick and V. Rosen (1999). "A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord, and tail bud is a potent mesoderm inducer in *Xenopus* embryos." Dev Biol **208**(1): 222-32.
25. Ge, G. and D. S. Greenspan (2006). "Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases." Birth Defects Res C Embryo Today **78**(1): 47-68.
26. Gholami, S. S., N. F. Gonzalez-Cadavid, C. S. Lin, J. Rajfer and T. F. Lue (2003). "Peyronie's disease: a review." J Urol **169**(4): 1234-41.
27. Gonzalez-Cadavid, N. F. and S. Bhasin (2004). "Role of myostatin in metabolism." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **7**(4): 451-7.
28. Gonzalez-Cadavid, N. F., W. E. Taylor, K. Yarasheski, I. Sinha-Hikim, K. Ma, S. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa, M. Mamita, G. Nair, S. Arver and S. Bhasin (1998). "Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14938-43.
29. Grobet, L. (2000). "[Positional clonage and characterization of the bovine myostatin gene]." Bull Mem Acad R Med Belg **155**(10-12): 330-8; discussion 338-40.
30. Grobet, L., L. J. Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Menissier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset and M. Georges (1997). "A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle." Nat Genet **17**(1): 71-4.
31. Gu, Z., Y. Zhang, P. Shi, Y. P. Zhang, D. Zhu and H. Li (2004). "Comparison of avian myostatin genes." Anim Genet **35**(6): 470-2.

32. Gu, Z. L., H. F. Zhang, D. H. Zhu and H. Li (2002). "[Single nucleotide polymorphism analysis of the chicken Myostatin gene in different chicken lines]." Yi Chuan Xue Bao **29**(7): 599-606.
33. Haisma, H. J. and O. de Hon (2006). "Gene doping." Int J Sports Med **27**(4): 257-66.
34. Hanada, T. and A. Yoshimura (2002). "Regulation of cytokine signaling and inflammation." Cytokine Growth Factor Rev **13**(4-5): 413-21.
35. Harper, G. S. and D. W. Pethick (2004). "Fatness in production animals: using genetic and environmental levers to meet consumer demand." Asia Pac J Clin Nutr **13**(Suppl): S37.
36. Hefti, F. (1982). "High-performance size-exclusion chromatography: a buffer for the reliable determination of molecular weights of proteins." Anal Biochem **121**(2): 378-81.
37. Hill, J. J., M. V. Davies, A. A. Pearson, J. H. Wang, R. M. Hewick, N. M. Wolfman and Y. Qiu (2002). "The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum." J Biol Chem **277**(43): 40735-41.
38. Hill, J. J., Y. Qiu, R. M. Hewick and N. M. Wolfman (2003). "Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains." Mol Endocrinol **17**(6): 1144-54.
39. Ivey, F. M., S. M. Roth, R. E. Ferrell, B. L. Tracy, J. T. Lemmer, D. E. Hurlbut, G. F. Martel, E. L. Siegel, J. L. Fozard, E. Jeffrey Metter, J. L. Fleg and B. F. Hurley (2000). "Effects of age, gender, and myostatin genotype on the hypertrophic response to heavy resistance strength training." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **55**(11): M641-8.
40. Jeanplong, F., J. J. Bass, H. K. Smith, S. P. Kirk, R. Kambadur, M. Sharma and J. M. Oldham (2003). "Prolonged underfeeding of sheep increases myostatin and myogenic regulatory factor Myf-5 in skeletal muscle while IGF-I and myogenin are repressed." J Endocrinol **176**(3): 425-37.
41. Ji, S., R. L. Losinski, S. G. Cornelius, G. R. Frank, G. M. Willis, D. E. Gerrard, F. F. Depreux and M. E. Spurlock (1998). "Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation." Am J Physiol **275**(4 Pt 2): R1265-73.

42. Jiang, M. S., L. F. Liang, S. Wang, T. Ratovitski, J. Holmstrom, C. Barker and R. Stotish (2004). "Characterization and identification of the inhibitory domain of GDF-8 propeptide." Biochem Biophys Res Commun **315**(3): 525-31.
43. Jin, H. J., M. A. Dunn, D. Borthakur and Y. S. Kim (2004). "Refolding and purification of unprocessed porcine myostatin expressed in *Escherichia coli*." Protein Expr Purif **35**(1): 1-10.
44. Kambadur, R., M. Sharma, T. P. Smith and J. J. Bass (1997). "Mutations in myostatin (GDF8) in double-musced Belgian Blue and Piedmontese cattle." Genome Res **7**(9): 910-6.
45. Karim, L., W. Coppeters, L. Grobet, A. Valentini and M. Georges (2000). "Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay." Anim Genet **31**(6): 396-9.
46. Kawada, S., C. Tachi and N. Ishii (2001). "Content and localization of myostatin in mouse skeletal muscles during aging, mechanical unloading and reloading." J Muscle Res Cell Motil **22**(8): 627-33.
47. Kerr, T., E. H. Roalson and B. D. Rodgers (2005). "Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish." Evol Dev **7**(5): 390-400.
48. Kirk, S., J. Oldham, R. Kambadur, M. Sharma, P. Dobbie and J. Bass (2000). "Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration." J Cell Physiol **184**(3): 356-63.
49. Kocamis, H., S. A. Gahr, J. Richter, D. C. Kirkpatrick-Keller and J. Killefer (2002). "Myostatin and TGF-beta2 gene expression patterns in response to in ovo administration of rhIGF-I during chicken embryonic development." Growth Dev Aging **66**(1): 3-10.
50. Kocamis, H., D. C. Kirkpatrick-Keller, J. Richter and J. Killefer (1999). "The ontogeny of myostatin, follistatin and activin-B mRNA expression during chicken embryonic development." Growth Dev Aging **63**(4): 143-50.
51. Kocamis, H., D. C. McFarland and J. Killefer (2001). "Temporal expression of growth factor genes during myogenesis of satellite cells derived from the biceps femoris and pectoralis major muscles of the chicken." J Cell Physiol **186**(1): 146-52.

52. Kopple, J. D., A. H. Cohen, H. Wang, D. Qing, Z. Tang, M. Fournier, M. Lewis, R. Casaburi and T. Storer (2006). "Effect of exercise on mRNA levels for growth factors in skeletal muscle of hemodialysis patients." J Ren Nutr **16**(4): 312-24.
53. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
54. Langley, B., M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma, S. Gilmour and R. Kambadur (2002). "Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression." J Biol Chem **277**(51): 49831-40.
55. Larsson, A., R. M. Balow, T. L. Lindahl and P. O. Forsberg (1993). "Chicken antibodies: taking advantage of evolution--a review." Poult Sci **72**(10): 1807-12.
56. Lawrence, D. A. (2001). "Latent-TGF-beta: an overview." Mol Cell Biochem **219**(1-2): 163-70.
57. Lee, S. J. and A. C. McPherron (1999). "Myostatin and the control of skeletal muscle mass." Curr Opin Genet Dev **9**(5): 604-7.
58. Lee, S. J. and A. C. McPherron (2001). "Regulation of myostatin activity and muscle growth." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9306-11.
59. Lin, J., H. B. Arnold, M. A. Della-Fera, M. J. Azain, D. L. Hartzell and C. A. Baile (2002). "Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis." Biochem Biophys Res Commun **291**(3): 701-6.
60. Maccatrozzo, L., L. Bargelloni, B. Cardazzo, G. Rizzo and T. Patarnello (2001). "A novel second myostatin gene is present in teleost fish." FEBS Lett **509**(1): 36-40.
61. Maccatrozzo, L., L. Bargelloni, G. Radaelli, F. Mascarello and T. Patarnello (2001). "Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern." Mar Biotechnol (NY) **3**(3): 224-30.
62. Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu Rev Biochem **67**: 753-91.
63. Massague, J. (2000). "How cells read TGF-beta signals." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(3): 169-78.
64. Massague, J. and D. Wotton (2000). "Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system." Embo J **19**(8): 1745-54.

65. Mateescu, R. G. and M. L. Thonney (2002). "Gene expression in sexually dimorphic muscles in sheep." J Anim Sci **80**(7): 1879-87.
66. Matsakas, A., C. Bozzo, N. Cacciani, F. Caliaro, C. Reggiani, F. Mascarello and M. Patrino (2006a). "Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats." Exp Physiol **91**(6): 983-94.
67. Matsakas, A., C. Bozzo, N. Cacciani, F. Caliaro, C. Reggiani, F. Mascarello and M. Patrino (2006b). "Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of the rats." Exp Physiol.
68. McCroskery, S., M. Thomas, L. Maxwell, M. Sharma and R. Kambadur (2003). "Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal." J Cell Biol **162**(6): 1135-47.
69. McPherron, A. C., A. M. Lawler and S. J. Lee (1997). "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member." Nature **387**(6628): 83-90.
70. McPherron, A. C. and S. J. Lee (1997). "Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12457-61.
71. McPherron, A. C. and S. J. Lee (2002). "Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice." J Clin Invest **109**(5): 595-601.
72. Mendler, L., E. Zador, M. Ver Heyen, L. Dux and F. Wuytack (2000). "Myostatin levels in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures." J Muscle Res Cell Motil **21**(6): 551-63.
73. Minetti, G. C., C. Colussi, R. Adami, C. Serra, C. Mozzetta, V. Parente, S. Fortuni, S. Straino, M. Sampaolesi, M. Di Padova, B. Illi, P. Gallinari, C. Steinkuhler, M. C. Capogrossi, V. Sartorelli, R. Bottinelli, C. Gaetano and P. L. Puri (2006). "Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors." Nat Med **12**(10): 1147-50.
74. Morley, J. E., D. R. Thomas and M. M. Wilson (2006). "Cachexia: pathophysiology and clinical relevance." Am J Clin Nutr **83**(4): 735-43.
75. Mosher, D. S., P. Quignon, C. D. Bustamante, N. B. Sutter, C. S. Mellersh, H. G. Parker and E. A. Ostrander (2007). "A mutation in the

- myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs." PLoS Genet **3**(5): e79.
76. Munger, J. S., X. Huang, H. Kawakatsu, M. J. Griffiths, S. L. Dalton, J. Wu, J. F. Pittet, N. Kaminski, C. Garat, M. A. Matthay, D. B. Rifkin and D. Sheppard (1999). "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis." Cell **96**(3): 319-28.
77. Nakashima, M., T. Toyono, A. Akamine and A. Joyner (1999). "Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis." Mech Dev **80**(2): 185-9.
78. Neuhoff, V., R. Stamm, I. Pardowitz, N. Arold, W. Ehrhardt and D. Taube (1990). "Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution." Electrophoresis **11**(2): 101-17.
79. Nishiyama, A., Y. Takeshima, K. Saiki, A. Narukage, Y. Oyazato, M. Yagi and M. Matsuo (2007). "Two novel missense mutations in the myostatin gene identified in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy." BMC Med Genet **8**: 19.
80. Ostbye, T. K., T. F. Galloway, C. Nielsen, I. Gabestad, T. Bardal and O. Andersen (2001). "The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues." Eur J Biochem **268**(20): 5249-57.
81. Pie, M. R. and L. E. Alvares (2006). "Evolution of myostatin in vertebrates: Is there evidence for positive selection?" Mol Phylogenet Evol.
82. Rehemtulla, A. and R. J. Kaufman (1992). "Preferred sequence requirements for cleavage of pro-von Willebrand factor by propeptide-processing enzymes." Blood **79**(9): 2349-55.
83. Rescan, P. Y., I. Jutel and C. Ralliere (2001). "Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*)." J Exp Biol **204**(Pt 20): 3523-9.
84. Rifkin, D. B. (2005). "Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability." J Biol Chem **280**(9): 7409-12.

85. Roberts, S. B. and F. W. Goetz (2001). "Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms." FEBS Lett **491**(3): 212-6.
86. Rodgers, B. D. and G. M. Weber (2001). "Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **129**(2-3): 597-603.
87. Saharinen, J., M. Hyytiainen, J. Taipale and J. Keski-Oja (1999). "Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action." Cytokine Growth Factor Rev **10**(2): 99-117.
88. Sakuma, K., R. Nakao, S. Inashima, M. Hirata, T. Kubo and M. Yasuhara (2004). "Marked reduction of focal adhesion kinase, serum response factor and myocyte enhancer factor 2C, but increase in RhoA and myostatin in the hindlimb dy mouse muscles." Acta Neuropathol (Berl) **108**(3): 241-9.
89. Sakuma, K., K. Watanabe, M. Sano, I. Uramoto and T. Totsuka (2000). "Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles." Biochim Biophys Acta **1497**(1): 77-88.
90. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, A laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press,.
91. Schakman, O. and J. P. Thissen (2006). "Gene therapy with anabolic growth factors to prevent muscle atrophy." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **9**(3): 207-13.
92. Schuelke, M., K. R. Wagner, L. E. Stolz, C. Hubner, T. Riebel, W. Komen, T. Braun, J. F. Tobin and S. J. Lee (2004). "Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child." N Engl J Med **350**(26): 2682-8.
93. Schulte, J. N. and K. E. Yarasheski (2001). "Effects of resistance training on the rate of muscle protein synthesis in frail elderly people." Int J Sport Nutr Exerc Metab **11 Suppl**: S111-8.
94. Schultz-Cherry, S., S. Ribeiro, L. Gentry and J. E. Murphy-Ullrich (1994). "Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system." J Biol Chem **269**(43): 26775-82.

95. Sharma, M., B. Langley, J. Bass and R. Kambadur (2001). "Myostatin in muscle growth and repair." Exerc Sport Sci Rev **29**(4): 155-8.
96. Shi, Y. and J. Massague (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell **113**(6): 685-700.
97. Sillence, M. N. (2004). "Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock." Vet J **167**(3): 242-57.
98. Slack, J. M. (1997). "Growth control: action mouse." Curr Biol **7**(8): R467-9.
99. Smith, J. A., A. M. Lewis, P. Wiener and J. L. Williams (2000). "Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon." Anim Genet **31**(5): 306-9.
100. Smith, T. P., N. L. Lopez-Corrales, S. M. Kappes and T. S. Sonstegard (1997). "Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus." Mamm Genome **8**(10): 742-4.
101. Taylor, W. E., S. Bhasin, J. Artaza, F. Byhower, M. Azam, D. H. Willard, Jr., F. C. Kull, Jr. and N. Gonzalez-Cadavid (2001). "Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **280**(2): E221-8.
102. Tellgren, A., A. C. Berglund, P. Savolainen, C. M. Janis and D. A. Liberles (2004). "Myostatin rapid sequence evolution in ruminants predates domestication." Mol Phylogenet Evol **33**(3): 782-90.
103. Thies, R. S., T. Chen, M. V. Davies, K. N. Tomkinson, A. A. Pearson, Q. A. Shakey and N. M. Wolfman (2001). "GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding." Growth Factors **18**(4): 251-9.
104. Tsuchida, K., Y. Sunada, S. Noji, T. Murakami, A. Uezumi and M. Nakatani (2006). "Inhibitors of the TGF-beta superfamily and their clinical applications." Mini Rev Med Chem **6**(11): 1255-61.
105. Vogel, G. (2004). "A race to the starting line." Science **305**(5684): 632-5.
106. Voisin, V. and S. de la Porte (2005). "[Pharmacological treatments for Duchenne and Becker dystrophies]." J Soc Biol **199**(1): 17-28.

107. Walker, K. S., R. Kambadur, M. Sharma and H. K. Smith (2004). "Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men." Med Sci Sports Exerc **36**(5): 787-93.
108. Walling, G. A., P. M. Visscher, A. D. Wilson, B. L. McTeir, G. Simm and S. C. Bishop (2004). "Mapping of quantitative trait loci for growth and carcass traits in commercial sheep populations." J Anim Sci **82**(8): 2234-45.
109. Welle, S., K. Bhatt, B. Shah and C. Thornton (2002). "Insulin-like growth factor-1 and myostatin mRNA expression in muscle: comparison between 62-77 and 21-31 yr old men." Exp Gerontol **37**(6): 833-9.
110. Westhusin, M. (1997). "From mighty mice to mighty cows." Nat Genet **17**(1): 4-5.
111. Willoughby, D. S. (2004a). "Effects of an alleged myostatin-binding supplement and heavy resistance training on serum myostatin, muscle strength and mass, and body composition." Int J Sport Nutr Exerc Metab **14**(4): 461-72.
112. Willoughby, D. S. (2004b). "Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression." Med Sci Sports Exerc **36**(4): 574-82.
113. Wintgens, K. F. (2002). Untersuchungen zur Identifizierung von Hämolympfhaktoren, die bei *Manduca sexta* einen Einfluss auf die Aktivität der Hämocyten besitzen. Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie. Giessen, Justus-Liebig-Universität Giessen. **Diplomarbeit**: 1-88.
114. Wolfman, N. M., A. C. McPherron, W. N. Pappano, M. V. Davies, K. Song, K. N. Tomkinson, J. F. Wright, L. Zhao, S. M. Sebald, D. S. Greenspan and S. J. Lee (2003). "Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15842-6.
115. Wood, W. and G. Sokolowski (1981). Radioimmunoassay in theory and practice. A handbook for laboratory personnel. Konstanz, Schnetztor Verlag.
116. Wu, H. H., S. Ivkovic, R. C. Murray, S. Jaramillo, K. M. Lyons, J. E. Johnson and A. L. Calof (2003). "Autoregulation of neurogenesis by GDF11." Neuron **37**(2): 197-207.

117. Yalow, R. S. and S. A. Berson (1959). "Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods." Nature **184 (Suppl 21)**: 1648-9.
118. Yang, W., H. X. Wang, Y. Chen, Y. Zhang and D. H. Zhu (2001). "[Cloning, expression and purification of the chicken growth and differentiation factor-8]." Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao **17(4)**: 460-2.
119. Yarasheski, K. E., S. Bhasin, I. Sinha-Hikim, J. Pak-Loduca and N. F. Gonzalez-Cadavid (2002). "Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting." J Nutr Health Aging **6(5)**: 343-8.
120. Zachwieja, J. J., S. R. Smith, I. Sinha-Hikim, N. Gonzalez-Cadavid and S. Bhasin (1999). "Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration." J Gravit Physiol **6(2)**: 11-5.
121. Zammit, P. S. and T. A. Partridge (2002). "Sizing up muscular dystrophy." Nat Med **8(12)**: 1355-6.
122. Zhang, Y. and R. Derynck (1999). "Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk." Trends Cell Biol **9(7)**: 274-9.
123. Zhu, X., M. Hadhazy, M. Wehling, J. G. Tidball and E. M. McNally (2000). "Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle." FEBS Lett **474(1)**: 71-5.
124. Zhu, X., S. Topouzis, L. F. Liang and R. L. Stotish (2004). "Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism." Cytokine **26(6)**: 262-72.
125. Zimmers, T. A., M. V. Davies, L. G. Koniaris, P. Haynes, A. F. Esquela, K. N. Tomkinson, A. C. McPherron, N. M. Wolfman and S. J. Lee (2002). "Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin." Science **296(5572)**: 1486-8.

7. Anhang

DNA-Sequenzierung Konstrukt 1 (M13 forward)

```
1 ATGATTACGC CAAGCGCGCA ATTAACCCTC ACTAAAGGGA ACAAAGCTG
51 GGTAC GCCA CCATGGAAAA ACTGCAACTC TGTGTTTATA TTTACCTGTT
101 TATGCTGATT GTTGCTGGTC CAGTGGATCT AAATGAGAAC AGTGAGCAAA
151 AAGAAAATGT GGAAAAAGAG GGGCTGTGTA ATGCATGTAC TTGGAGACAA
201 AACACTAAAT CTTCAAGAAT AGAAGCCATT AAGATACAAA TCCTCAGTAA
251 ACTTCGCTCTG GAAACAGCTC CTAACATCAG CAAAGATGTT ATAAGACAAC
301 TTTTACCCAA AGCTCCTCCA CTCCGGGAAC TGATTGATCA GTATGATGTC
351 CAGAGGGATG ACAGCAGCGA TGGCTCTTTG GAAGATGACG ATTATCACGC
401 TACAACGGAA ACAATCATT AACAATCATT CCATGCCTAC AGAGTCTGAT TTTCTAATGC
451 AAGTGGATGG AAAACCCAAA TGTGCTTCT TTAATTTAG CTCTAAAATA
501 CAATACAATA AAGTAGTAAA GGCCCAACTA TGGATATATT TGAGACCCGT
551 CGAGACTCCT ACAACAGTGT TTGTGCAAAT CCTGAGACTC ATCAAACCTA
601 TGAAAGACGG TACAAGGTAT ACTGGAATCC GATCTCTGAA ACTTGACATG
651 AACCCAGGCN CTGGTATTTG GCAGAGCATT GATGTGAAGA CAGTGTTGCA
701 AAATTGGCTC AAACAACCTG AATCCCCTT ANGCATTTGA AATAAAAGCT
751 TTANATGANA AAGGGCATGA TCTTGCTGNA CCTTCCANGA CCAGANAANA
801 GGGCTGATCC NTTTTNAGGC AGGGNACCNA CCCCCAAAAN ANCCNAAGGG
851 ATTGGCTTGA CTGGGATGAA CCCNNACNAA TCCCC
```

DNA-Sequenzierung Konstrukt II (M13 forward)

```
1  ATTGAGCGCG CGTAATACGA CTCACTATAG GCGAATTGG AGCTCCACCG
51  CGGTGGCGGC CGCTGAGCAC CCACAGCGGT CTACTACCAT CGCTGGAATT
101 TTCCCATATA TTATTTGTTC TTTGCCATTA AAATATAGCA TATTAATTGG
151 AGACATCTTT GTGGGAGTAC AGCAAGGGCC TGCTGAACCT CTGGGGTTTG
201 CTTGGTGTAC CAGATGAGTA TGAGGATATT TTTGTAAAA TACAAATTCA
251 CACTCTCCAG AGCAGTAATT GGCCTTATAT CTTTTAGGAG CGATAATCCA
301 ATCCCATCCA AAAGCTTCAA AATCCACAGT TAGAGGGTAA CGACAGCATC
351 GTGATTCTGT TGAGTGCTCA TCACAGTCAA GACCAAATC CCTTCTGGAT
401 CTTTTTGGTG TGTCTGTTAC CTTGACCTCT AAAAACGGAT TCAGCCCATC
451 TTCTCCTGGT CCTGGGAAGG TTACAGCAAG ATCATGACCA TTCTCATCTA
501 AAGCTTTTAT TTCAATGCCT AAGTTGGATT CAGGTTGTTT GAGCCAATTT
551 TGCAACACTG TCTTCACATC AATGCTCTGC CAAATACCAG TGCCTGGGTT
601 CATGTCAAGN TTCAGAGATC GGATTCCAGT ATACCTTGGA CCGTCTTTNA
651 TAGGTTTGAT GAGTNTNAGA TTTGCACAAA CACTTGNTNG ANGANTCTTC
701 GACGGGTCTT CAAATATATT CCATAGNTGG GCCNTTACTA CTTTATTGGG
751 NTTGNATTTN ANANCTAAAT TTAAGAANCN ACCNTTTGGG GNTTNCCTCC
801 CTTGCATNAA AAANCANACT NTGTNGGCTG GNAATGANTN NNTNCCNTNG
851 NCCNNGAANA TNGNNTNTT TNAAAAACC TTNNNNTTTTN NNTTC
```

DNA-Sequenzierung Konstrukt II (M13 reverse)

```
1 ATGATTACGC CAAGCGCGCA ATTAACCCTC ACTAAAGGGA ACAAAGCTG
51 GGTACCGGGC CCCCCCTCGA GGTCGACGGT ATCGATAAGC TAGCTTGATA
101 TCGAATTCCT GCAGCCCGGG GGATCCACTA GTTAATGAGA ACAGTGAGCA
151 AAAAGAAAAT GTGGAAAAAG AGGGGCTGTG TAATGCATGT ACTTGAGAC
201 AAAACACTAA ATCTTCAAGA ATAGAAGCCA TTAAGATACA AATCCTCAGT
251 AAAGTTCGTC TGGAAACAGC TCCTAACATC AGCAAAGATG TTATAAGACA
301 ACTTTTACCC AAAGCTCCTC CACTCCGGGA ACTGATTGAT CAGTATGATG
351 TCCAGAGGGA TGACAGCAGC GATGGCTCTT TGGAAGATGA CGATTATCAC
401 GCTACAACGG AAACAATCAT TACCATGCCT ACAGAGTCTG ATTTTCTAAT
451 GCAAGTGGAT GGAAAACCCA AATGTTGCTT CTTTAAATTT AGCTCTAAAA
501 TACAATACAA TAAAGTAGTA AAGGCCAAC TATGGATATA TTTGAGACCC
551 GTCGAGACTC CTACAACAGT GTTTGTGCAA ATCCTGAGAC TCATCAAACC
601 TATGAAAGAC GGTACAAGGT ATACTGGAAT CCGATCTCTG AAAGTTGACA
651 TGAACCCAGG CACTGGTATT TGGCAGAGCA TTGATGTGAA NACAGTGTTG
701 CAAAATTGGC TCAAACAACC TGAATCCAAC TTANGCATTG AAATAAAANC
751 TTTANATGAG AATGGNCTTG AACTTGCTGN ACCTTCCCNG AACANGAAAA
801 NANGGGCTGA ATCCGTTTTT ANAGGCAAGG GNNCANNACCN CCNAAAAGAT
851 CCCNAAGGGG ATTTGGNCTT GCTGGGATNA NCNCTCACNN AANTT
```

8. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei:

- Frau Prof. Dr. T. Trenczek und Herrn Prof. Dr. A. Dorresteijn für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit und die Unterstützung schon während meiner Diplomarbeit
- Frau Prof. Dr. S. Stoeva, Universität Tübingen und Fa. Immundiagnostik, für die Übernahme des 3. Gutachtens und ihre Unterstützung bei allen Fragen, die im Laboralltag auftauchten
- Herrn Prof. Dr. B. Allolio, Universität Würzburg, für die Bereitstellung des Themas und Unterstützung mit Ratschlägen zur Assayentwicklung während der Anfertigung dieser Arbeit
- Herrn Prof. Dr. M. Paulsson und Herrn Dr. Neil Smyth, Universität Köln, für die Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten.
- Frau Prof. Dr. H. Hilbig, Universität Leipzig, für die Hilfe bei der Durchführung der immunhistologischen Arbeiten

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. F.P. Armbruster, der mir die Durchführung dieser Arbeit in der Firma Immundiagnostik, Bensheim, ermöglicht hat und stets hilfreiche Ratschläge zur Assayentwicklung und Antikörpercharakterisierung hatte.

Frau Claudia Schumann und Frau Kerstin Reuter sei herzlichst für ihre gute Laune, unbezahlbare Hilfe und wertvollste Tips bei Proteinaufreinigung, Assayentwicklung und vielem mehr gedankt.

Allen anderen Kollegen der Firma Immundiagnostik danke ich für ein herzliches Arbeitsklima und die entgegengebrachte Unterstützung.

Allen meinen Eltern danke ich für ihre mentale Unterstützung.

Jutta Weckmann, die niemals aufgegeben hat, an mich zu glauben, mir den Rücken gestärkt und freigehalten hat und einfach immer mit einer unglaublichen Geduld für mich da war: DANKE!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Gießen, im August 2007