

DARSTELLUNG VON WACHSTUMSHORMON-ISOFORMEN
MITTELS IMMUNPRÄZIPITATION UND WESTERN BLOT

EINE MÖGLICHE METHODE ZUM NACHWEIS VON
WACHSTUMSHORMONMISSBRAUCH IM LEISTUNGSSPORT

Lukas Burget

Ludwig-Maximilians-Universität München

2008

Aus der Medizinischen Klinik – Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**DARSTELLUNG VON WACHSTUMSHORMON-ISOFORMEN MITTELS
IMMUNPRÄZIPITATION UND WESTERN BLOT**

**EINE MÖGLICHE METHODE ZUM NACHWEIS VON
WACHSTUMSHORMONMISSBRAUCH IM LEISTUNGSSPORT**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lukas Burget
aus Freiburg i. Br.

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. C. J. Strasburger
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Chr. Spitzweg Prof. Dr. P. Lohse Prof. Dr. D. Nowak
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. M. Bidlingmaier Dr. Z. Wu
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	21.02.2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Geschichtlicher Überblick	1
1.2.	Wachstumshormon und seine Genstruktur	2
1.2.1.	Herkunft, Funktion und Regulation des hGH	3
1.2.2.	Aminosäuresequenzen, räumliche Molekülstruktur des Wachstumshormons und Antikörper-Bindungsstellen	5
1.2.3.	Isoformen von hGH	8
1.3.	hGH-Rezeptor und molekulare Interaktion mit hGH	10
1.4.	Missbrauch von rhGH im Leistungssport	11
1.5.	RhGH und Schwierigkeiten beim Nachweis im Rahmen von Dopinguntersuchungen	13
1.6.	Bereits existierende Methoden zum Nachweis von rhGH	14
1.7.	Zielsetzung	16
2.	Material und Methoden	18
2.1.	Materialien	18
2.1.1.	Untersuchte Seren	18
2.1.2.	Untersuchte hGH-Präparationen	18
2.1.3.	Reagenzien	19
2.1.4.	Geräte und andere Materialien	20
2.1.5.	Antikörper	21
2.1.6.	Puffer und Lösungen	23
2.2.	Methoden	25
2.2.1.	Immunpräzipitation (allgemein)	25
2.2.2.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) (allgemein)	27
2.2.3.	Western Blot (allgemein)	28

2.2.4.	sonstige Methoden	30
2.2.5.	Protokoll der etablierten Methode	31
3.	Ergebnisse	36
3.1.	Selektion monoklonaler Antikörper gegen verschiedene hGH-Isoformen	36
3.2.	Selektion enzymkonjugierter Antikörper gegen 1. Antikörper	43
3.3.	Versuche zur Optimierung der hGH-Immunpräzipitation	46
3.4.	Unterschiede zwischen reduzierten und nicht-reduzierten Proben	50
3.5.	Optimierung der Signaldetektion – Vergleich verschiedener Chemielumineszenz-Systeme	52
3.6.	Repräsentative Testergebnisse	55
4.	Diskussion	58
4.1.	Konstanz beim Erscheinen von hGH-Isoformen	58
4.2.	Selektion monoklonaler Antikörper gegen verschiedene hGH-Isoformen	59
4.3.	Selektion enzymkonjugierter Antikörper gegen 1. Antikörper	60
4.4.	Immunpräzipitation	61
4.5.	Reduzierte und nicht-reduzierte Proben	63
4.6.	Signaldetektion	64
4.7.	Repräsentative Ergebnisse	65
4.8.	Wachstumshormon-Dopingtests mittels Isoformenanalyse – kritische Anmerkungen	66

5.	Zusammenfassung	69
6.	Literaturverzeichnis	75
7.	Anhang	86
7.1.	Versuchsprotokolle	86
7.1.1.	Allgemeiner Teil	86
7.1.2.	Spezieller Teil	90
7.2.	Danksagung	109
7.3.	Lebenslauf	110

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
b	biotinyliert
BSA	Bovines Serum Albumin
ECL	Enhanced Chemiluminescence
GH	Growth Hormone
GHBP	Growth Hormone Binding Protein
GHD	Growth Hormone deficiency (Wachstumshormonmangel)
GH-N	Hypophysäres Wachstumshormon
GH-V	Plazentares Wachstumshormon
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
hGH	Human Growth Hormone
Ig	Immunglobulin
IGF	Insuline Like Growth Factor
IGFBP	Insuline Like Growth Factor Binding Protein
kD	Kilodalton
LLP	Lumi-Light-Plus, Western Blotting Kit
mA	Miliampere
mAk	Monoklonaler Antikörper
mIGF-I	Muskelspezifisches IGF-I
mMaGH	Monoklonales Maus anti GH Immunglobulin
MRP	Meerrettichperoxidase
n-red	Nicht reduzierend / nicht reduzierender Puffer
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
phGH	Hypophysäres Wachstumshormon
pKaGH	Polyklonales Kaninchen anti GH Serum
PIIIP	Peptid-TypIII-Kollagen
red	Reduzierend / reduzierender Puffer
RhGH / rec hGH	Rekombinantes humanes Wachstumshormon
RT	Raumtemperatur

SaM	Schaf anti Maus Ig
SDS	Natriumdodecylsulfat
st	Streptavidinbeschichtet
Stav-POD	Streptavidinperoxidase
SS	Super Signal, WesternBlotting Kit
TEMED	Tetramethylathylenediamine
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
V	Volt
WADA	World Anti-Doping Agency
ZaM-Fc-POD	Ziege anti Maus-Fc peroxidasekonjugiertes Ig
ZaK-Fc-POD	Ziege anti Kaninchen Fc-peroxidasekonjugiertes Ig

1. Einleitung

1.1. Geschichtlicher Überblick

Seit mehr als hundert Jahren ist Wachstumshormon für die endokrinologische Forschung von hohem Interesse. Bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts vermutete der französische Arzt Pierre Marie (72), dass die Akromegalie auf einen Hypophysentumor zurückzuführen sei. 1909 gelang dem US-Amerikaner Cushing die Heilung eines Akromegaliepatienten durch Entfernung seines Hypophysentumors. Seine Vermutung, ein Hormon sei für das Wachstum verantwortlich (33), konnte von Evans und Long 1921 im Tiermodell bewiesen werden: Das an Ratten verabreichte Hypophysenextrakt einer Kuh führte zu einer deutlichen Zunahme der Körpergröße der Nager.

Knobil und Greep konnten 1959 durch Untersuchungen an Rhesusaffen beweisen, dass für Wachstumshormon eine strenge Artenspezifität mit nur einer Richtung besteht: Humanes GH beeinflusst das menschliche Wachstum als auch das von niederentwickelten Spezies wie Nagern. Umgekehrt wirkt Maus-GH nicht beim Menschen – die Wirkungsrichtung ist umgekehrt also nicht möglich (59).

1971 wurde von Li und Dixon die chemische Struktur des Wachstumshormons aufgeklärt (70).

1979 gelang es erstmalig, rekombinantes hGH in *E. coli* zu exprimieren (43). 1986 wurde humanes IGF-I durch rekombinante DNS-Techniken synthetisiert (79). 1987 veröffentlichten Abdel-Meguid und Shieh die dreidimensionale Struktur von rekombinantem Schweine-Wachstumshormon (1). Im gleichen Jahr gelang die Klonierung, Sequenzierung und Exprimierung des humanen Wachstumshormon-Rezeptors (68). 1991 identifizierte Cunningham durch systematische Alanin-Mutationen des Wachstumshormons die Struktur und Lokalisation zweier Rezeptor-Bindungsstellen (32). Bestätigt wurde dies durch röntgenkristallographische Strukturanalysen des menschlichen Wachstumshormon-Rezeptor-Komplexes (34).

Weitere Arbeiten von derselben Forschungsgruppe wiesen darauf hin, dass für die intrazelluläre Signalübertragung die Dimerisierung zweier Rezeptoren mit einem hGH-Molekül erforderlich ist (40).

In den Jahren 1990-1996 konzentrierte sich die wissenschaftliche Forschung auf den Bereich der intrazellulären Signal-Transduktion. Es konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von hGH mit zwei Rezeptoren zur intrazellulären Tyrosin-Phosphorylierung der Rezeptoren und der Tyrosin-Kinase JAK2 führt. Dieser Vorgang rekrutiert und aktiviert Signalmoleküle, z.B. STAT, SHC und die Insulin-Rezeptor-Substrate 1 und 2, die zur Freisetzung sekundärer Botenstoffe wie beispielweise Diacylglycerol, Kalzium oder Stickstoffmonoxid führen und eine Aktivierung von Enzymen wie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase, der Proteinkinase C oder der Phospholipase A2 zur Folge haben. Diese Prozesse regulieren Zellfunktionen, darunter die Gen-Transkription, den Transport von Metaboliten und enzymatische Aktivitäten. Auf diese Weise kontrolliert hGH das Körperwachstum und verschiedene metabolische Prozesse (2).

1.2. Wachstumshormon und seine Genstruktur

Wachstumshormon gehört zur GH/Prolaktin Familie, einer Reihe von Hormonen, die aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen stammen. Dazu gehören:

- 1.) Wachstumshormon (Growth Hormone, GH)
- 2.) Chorionsomatototropin (CS, oder Plazentares Laktogen, PL)
- 3.) Prolaktin (PRL)
- 4.) Proliferin und PRL-related Polypeptide

Diese Hormone ähneln sich in ihren Strukturen und einigen Funktionen, wie z.B. Einflüssen auf das Immunsystem und besitzen zum Teil überlappende biologische Aktivitäten. Einige neue, klonierte Proteine, z.B. Prolaktin-related Polypeptide und Proliferin, gehören ebenfalls zur PRL/GH/PL-Familie (44).

Das hGH/hCS-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q22-q24) und hat die Form 5'-(hGH-1(N)/hGH-2(V)/hCS-2(B)/hCS-5(L)). Jedes Gen besteht aus 5 Exons (I-V) und 4 Introns (A-D). Die Positionen und die Länge der 4 Introns sind in den hGH-N, hGH-V und hCS Genen (256, 209, 93, 253 bp) identisch. Exon I kodiert die AS -26 bis -24; Exon II die AS -23 bis -1 und die AS 1 bis 31;

Exon III die AS 32 bis 71; Exon IV die AS 72 bis 126; Exon V die AS 127 bis 191 (47). Die Aminosäuren –26 bis –1 stellen das Signalpeptid dar.

1.2.1. Herkunft, Funktion und Regulation des hGH

Wachstumshormon (hGH-N) wird in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und von dort in den Blutkreislauf sezerniert. Es hält den Metabolismus von Eiweiß, Mineralstoffen, Kohlenhydraten und Fett aufrecht und beeinflusst das Wachstum und die Körperzusammensetzung. Nach neueren Erkenntnissen übt es sowohl Einfluss auf das Immunsystem als auch auf die Zellmitose aus (41,83).

Die GH-Synthese und -Sekretion steht unter dualer Regulation: Einerseits werden sie hauptsächlich durch das Wachstumshormon-freisetzende Hormon (Growth Hormone Releasing Hormone = GHRH) stimuliert, andererseits durch Somatostatine inhibiert. Beide Faktoren stammen aus dem Hypothalamus.

Ferner besitzt Dopamin auf hypophysärer Ebene einen sekretionshemmenden Einfluss, stimuliert aber die Ausschüttung von GH über einen hypothalamischen Angriffspunkt.

GHRH wirkt über spezifische Rezeptoren auf die somatotropen Zellen und setzt GH über Kalzium- und cAMP-vermittelte Wege frei. Die GHRH-produzierenden Neurone des Hypothalamus werden durch GH im Sinne eines ultrakurzen Rückkopplungsweges negativ beeinflusst. Diese Hemmung erfolgt nicht nur auf der Ebene der Sekretion, sondern auch auf der Ebene der Genexpression.

Wesentliche Bedeutung für die Regulation besitzen auch freie Fettsäuren und Glukose, welche hemmend auf die Sekretion von GHRH und folglich hGH wirken (46).

Ein direkter Zusammenhang zwischen Nahrungsaufnahme und GH-Sekretionsregulierung konnte durch das vor wenigen Jahren entdeckte Hormon Ghrelin erklärt werden (60). Dieses im Magen synthetisierte und im Hungerzustand erhöhte Peptidhormon wirkt direkt GH-sekretionsfördernd und stellt einen ganz neuen Aspekt im GH-Regelmechanismus dar.

In der Leber wird durch Wachstumshormon die Produktion von IGF-I (früher Somatomedin C) und IGF-II stimuliert, welche in der juvenilen Phase zusammen mit Wachstumshormon das Längenwachstum bestimmen. Die Somatomedine bilden eine Klasse von Peptiden mit einer Molekülmasse zwischen 7000 und 8000 Dalton und weisen eine partielle Strukturhomologie mit Proinsulin auf. Bisher sind 6 strukturverwandte hochaffine Bindungsproteine für IGF bekannt (IGFBP 1 bis 6), von denen IGFBP 3 die Somatomedine in der Zirkulation hält und die Halbwertszeit dieser Peptide am stärksten beeinflusst.

IGF-I, dessen Synthese durch GH induziert wird, hemmt direkt die Transkription des für GH kodierenden Gens und senkt somit seine hypophysäre Freisetzung. Der Abfall des Glukosespiegels im Blut hingegen führt zu einer vermehrten GH-Ausschüttung. Schlaf fördert die GH-Freisetzung, physischer sowie psychischer Stress führen ebenfalls zu einer Steigerung der GH-Freisetzung aus der Hypophyse. Schilddrüsenhormone, Sexualsteroiden und Cortisol stimulieren die GH-Sekretion durch direkte Beeinflussung der GH-Synthese (67).

hGH-N: hypophysäres 22kD hGH

hGH-V: plazentares 22kD hGH

20kD: 20kD hGH, **12kD:** 12kD hGH, **24kD:** 24kD hGH, **34kD:** 34 kD hGH, **12kD:** 12kD hGH

1-43: hGH-Fragment mit den AS 1-34

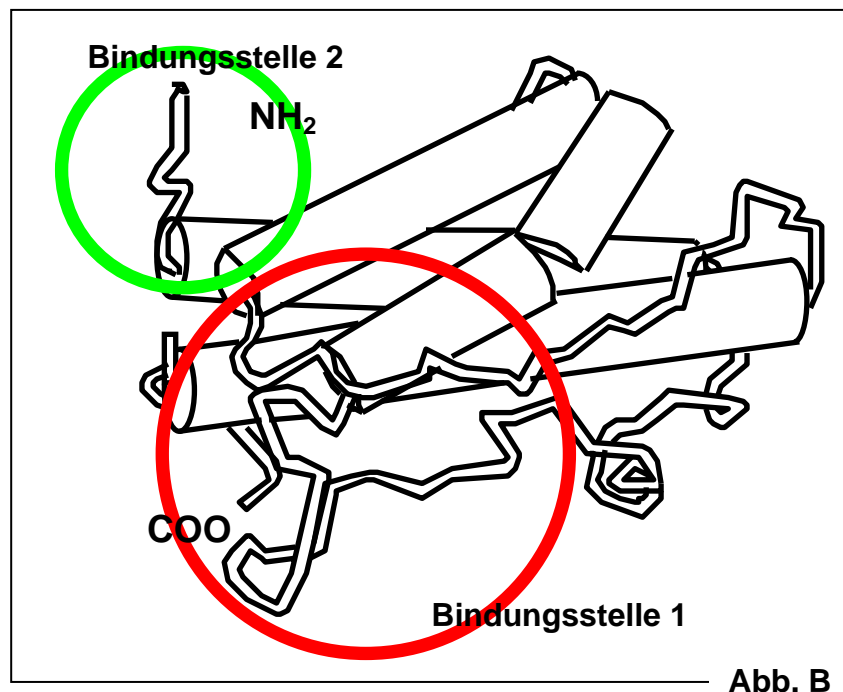
44-191: hGH-Fragment mit AS 44-191

Die entsprechenden Symbole für die Aminosäuren bedeuten: **A**=Alanin, **C**=Cystein, **D**=Asparginsäure, **E**=Glutaminsäure, **F**=Phenylalanin, **G**=Glycin, **H**=Histidin, **I**=Isoleucin, **K**=Lysin, **L**=Leucin, **M**=Methionin, **N**=Aspargin, **P**=Prolin, **Q**=Glutamin, **R**=Arginin, **S**=Serin, **T**=Threonin, **V**=Valin, **W**=Tryptophan, **Y**=Tyrosin.

Cystein 53 und Cystein 165 sowie Cystein 182 und Cystein 189 sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Das Hormon besteht aus vier antiparallel angeordneten alpha-Helices (1,34):

Helix 1 reicht von AS 9 bis 34; Helix 2 von AS 72 bis 92; Helix 3 von AS 106 bis 128 und Helix 4 von AS 155 bis 184. Dies ist die typische „up-up-down-down“-Struktur dieser GH/PRL/PL-Familie.

Das hGH-Molekül besitzt zwei Rezeptor-Bindungsstellen. Beide sind an den jeweiligen Endregionen der AS-kette lokalisiert, am N-Terminus, sowie am C-Terminus (**Abb. B**).



[**Abb. B**] Räumliche Darstellung des hGH-Moleküls mit seinen Antikörper-Bindungsstellen

Die genannten Rezeptorbindungsstellen spielen auch für die Bindung mit diversen monoklonalen Antikörpern - welche im Rahmen dieser Arbeit für die Detektion von hGH benutzt wurden (siehe später) - eine überaus wichtige Rolle.

Die in **Kapitel 2.1.5.** aufgelisteten monoklonalen Antikörper für den Western Blot wurden bezüglich ihres Epitops präzise charakterisiert. Hierbei wurde insbesondere der Bezug des Epitops zu den Bindungsstellen untersucht (**Tab. 1**):

Antikörper-Code	Bezug des Epitops zu den Rezeptorbindungsstellen
D5	unbekannt
10A7	außerhalb
IH6	Bindungsstelle 1 und 2
7F8	außerhalb
6F1	Bindungsstelle 1
3G4	Bindungsstelle 2
6C1	Bindungsstelle 2
7C7	Bindungsstelle 2
7B11	Bindungsstelle 2
5E1	außerhalb
3B4	Bindungsstelle 1
5802	Bindungsstelle 2
7E8	Bindungsstelle 1
6A9	Bindungsstelle 1
5801	Bindungsstelle 1
801	unbekannt
7D5	Bindungsstelle 1
5D7	Bindungsstelle 1

[Tab. 1] Monoklonale Antikörper und ihre Rezeptor-Bindungsstellen (97)

1.2.3. Isoformen von hGH

Wachstumshormon ist ein Protein mit verschiedenen Isoformen (13,82). Diese Isoformen wurden in den letzten Jahren im menschlichen Organismus nachgewiesen. Die Heterogenität von hGH hat mehrere Ursachen:

Auf genetischer Ebene kodieren zwei Gene für das Hormon: GH-N ist das Produkt der hypophysären Genexpression (12), GH-V das plazentare Wachstumshormon, welches nur bei Schwangeren synthetisiert wird (38).

Auf mRNA-Ebene entstehen durch Spleißen aus GH-N die 22 kD- und 20 kD-Isoformen (13).

Im posttranslationalen Stadium kann das 22 kD hGH durch Azetylierung am Aminoende (13) sowie Deamidation (69) oder Oligomeriation (91) weiter verändert werden.

Zusätzlich wird Wachstumshormon in der Zirkulation an zwei verschiedene Bindungsproteine gebunden. Von diesen Bindungsproteinen ist eines hochaffin (11), es entspricht der extrazellulären Domäne des GH-Rezeptors. Das andere Bindungsprotein bindet GH mit niedriger Affinität und wurde als $\alpha 2$ Makroglobulin identifiziert (62). Beide Bindungsproteine besitzen zusätzlich unterschiedliche Affinitäten für die einzelnen GH-Isoformen, so dass auf peripherer Ebene weitere Komplexizität erreicht wird.

Ein stark uneinheitliches Gemisch an Wachstumshormon-Fragmenten ergänzt das heterogene Erscheinungsbild von hGH (10).

monomere Formen

hGH-22 kD oder 22 kD

hGH-20 kD oder 20 kD

Na-azetyliertes hGH oder `schnelles hGH`

Asn¹⁵²-desamidiertes-hGH-22 kDGln¹³⁷-desamidiertes-hGH-22 kD

hGH-V oder plazentares GH

Glyco-hGH-V oder glykosiliertes plazentares GH

oligomere Formen

Dimerisches, trimerisches, tetramerisches und pentamerisches hGH, entstanden durch homopolymerische und heteropolymerische Kombinationen aus oben genannten Monomeren.

- nicht-kovalente Oligomere (~65%)
- Disulfid Oligomere (~33%)
- Andere kovalent gebundene Oligomere (~2%)

Zirkulierende Komplexe

22 kD-GHBP-Komplex

22 kD- α_2 -Makroglobulin-Komplex

20 kD-GHBP-Komplex

20 kD- α_2 -Makroglobulin Komplex

hGH-V-GHBP-Komplex

Andere

Fragmente und/oder niedermolekular-gewichtige hGH-Immunreaktivität

Komponenten aus 16 kD, 12 kD und 30 kD

(13)

Tab. 2

[Tab. 2] hypophysäre, plazentare und Plasma-hGH-Isoformen

1.3. HGH-Rezeptor und molekulare Interaktion mit hGH

Wachstumshormon wirkt auf seine Zielzellen über die Bindung an spezifische Rezeptoren.

Der Wachstumshormonrezeptor gehört zur Klasse 1 der Zytokin/Hämatopoietin Rezeptor-Superfamilie. Nur ein Gen kodiert für den Rezeptor. Das Gen befindet sich mit seinen 9 Exons auf Chromosom 5 (5p13.1-p12) (7).

Der Wachstumshormonrezeptor ist ein Glykoprotein mit insgesamt 620 Aminosäuren. Man unterscheidet einen glykosilierten, extrazellulären und damit hormonbindenden Anteil (246 AS), einen singulär transmembranären Bereich (24 AS) sowie einen zytoplasmatischen Bereich (30 AS). Das Molekulargewicht des GH-Rezeptors beträgt in der SDS-Elektrophorese 130 kD (68).

Untersuchungen des hGH-Rezeptors mit monoklonalen Antikörpern geben Hinweise darauf, dass die extrazelluläre Domäne des Rezeptors mit dem im Serum zirkulierenden hGH-Bindungsprotein identisch ist (68,6). Fast alle Zellen des menschlichen Körpers tragen Wachstumshormonrezeptoren, die größte Rezeptordichte befindet sich jedoch auf den Leberzellen (57).

Das hGH gelangt im Blutkreislauf zur Zielzelle und bindet mit seiner Bindungsstelle 1 zuerst an einen hGH-Rezeptor, anschließend mit Bindungsstelle 2 an einen zweiten hGH-Rezeptor. Nur wenn zwei Rezeptoren von einem hGH dimerisiert werden, kommt es zur Signalübertragung in der Zelle (32).

Nach Erkenntnissen aus Alanin-Mutationen des hGH-Moleküls und Charge-Reversal-Mutations-Experimenten (32, 7) sind die zwei Rezeptor-Bindungsstellen wie in **Abb. B** (s. S. 6) aufgebaut.

Die Rezeptor-Bindungsstelle 1 des hGH besteht aus einem Teil von Helix 1, einem Teil von Helix 4, und einem Teil der Bindungsschleife zwischen Helix 1 und Helix 2. Die Rezeptor-Bindungsstelle 2 besteht aus dem N-Terminus des Wachstumshormons (wichtig sind Phenylalanin 1 und Isoleucin 4) und einem Teil von Helix 3 (wichtig ist hierbei die Asparginsäure an Position 116) (32). Dieses Ergebnis konnte durch röntgenkristallographische Strukturanalysen des hGH und Rezeptor-Komplexes bestätigt werden (34).

1.4. Missbrauch von rhGH im Leistungssport

Als verbotene Substanz erregte rekombinantes Wachstumshormon (rhGH) zum ersten Mal weltweites Aufsehen, nachdem während der Tour de France 1998 eine große Anzahl an rhGH-enthaltenden Ampullen bei Radfahrern und Physiotherapeuten sichergestellt wurde. Bei den in Perth stattfindenden Schwimmweltmeisterschaften 1999 fanden australische Zollbeamte rekombinantes Wachstumshormon im Gepäck einer chinesischen Athletin und während der Olympischen Spiele 2000 in Sydney wurden rechtliche Schritte gegen den Trainer eines usbekischen Athletenteams wegen des illegalen Imports von rhGH eingeleitet. Wenige Monate vor Eröffnung der Spiele in Sydney wurden aus einer australischen Apotheke mehr als 1000 Ampullen verschiedener rhGH-Präparates durch Unbekannte entwendet.

Seit wenigen Jahren wird Wachstumshormon in großer Vielfalt im Internet angeboten und einige Athleten – hauptsächlich Bodybuilder – geben zu, rhGH zur Leistungsförderung und Steigerung der Trainingseffizienz bereits zu sich genommen zu haben.

Bislang fehlen konkrete Beweise für eine leistungsfördernde Wirkung von rhGH im Leistungssport. Allerdings zeigen mehrere Studien bei erwachsenen Patienten mit Wachstumshormonmangel (GHD), dass eine Substitution mit rhGH die herabgesetzte Skelettmuskelmasse sowie reduzierte Muskelkraft rückgängig macht (29,31,50,51,53,87).

Dennoch bestehen berechtigte Zweifel darüber, ob Muskelschwäche und muskuläre Erschöpfungen bei GHD-Patienten ein rein myogenes Problem darstellen (18). So konnte der positive Effekt von rhGH auf die Muskelkraft von trainierten Sportlern bislang in nur einer Studie belegt werden (28). Andere Studien bestreiten einen solchen Effekt bei Gesunden (99,100,35,39).

Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass rhGH-mißbrauchende Athleten mit ziemlicher Sicherheit weitaus höhere Dosen zu sich nehmen als dies in in o.g. Studien der Fall war (36). Dunkelziffern aus Kreisen des Profisports belaufen sich auf 25 IU/Tag, 3 bis 4 mal pro Woche, über 6 bis 12 Wochen oder sogar 6 bis 12 Monate appliziert. Erwachsene GHD-Patienten werden hingegen mit nur 1-2 IU/Tag substituiert.

Da viele medikamentenmissbrauchende Sportler mehr als nur eine verbotene Substanz zu sich nehmen, darf auch ein gewisser Synergismus von rhGH mit z.B. anabolen Steroiden nicht ausgeschlossen werden.

Ein in Athletenkreisen vorhandener Wissensvorsprung über die Effekte von Wachstumshormon scheint denkbar: Das 1982 erschienene 'Underground Steroid Handbook' beschreibt hGH als potentes Anabolikum – lange bevor klinische Endokrinologen hiervon tiefgreifende Kenntnisse besaßen.

Weitere Studien belegen, dass Wachstumshormon das kardio-pulmonale System beeinflusst und somit für Ausdauerathleten von Nutzen sein könnte. Bei Patienten mit seit der Kindheit bestehendem Wachstumshormonmangel fanden sich ein reduziertes Lungenvolumen sowie ein herabgesetzter maximal expiratorischer Lungendruck. GHD-Patienten mit Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter zeigten alleinig einen reduzierten maximal expiratorischen Lungendruck (75). Eine Therapie mit rhGH verbesserte die erniedrigte Ventilationsleistung, Sauerstoffaufnahme und Leistungskapazität der Lunge (75,78).

Des Weiteren wurde bei GHD-Patienten unter hGH-Therapie eine Zunahme des Myokards sowie des maximalen kardialen Schlagvolumens beobachtet (24,30). Andererseits konnten durch Senkung des hGH-Spiegels bei Akromegalie-Patienten die kardialen Funktionen deutlich verbessert werden (74).

HGH beeinflusst zusätzlich den Energiestoffwechsel (52), als auch die Erythropoese und das Plasmavolumen (23). Einen der wohl markantesten Effekte bei GHD-Patienten besitzt hGH in Bezug auf die Körperzusammensetzung: Der Fettanteil des Körpers nimmt ab, fettfreie Masse hingegen unter GH-Substitution signifikant zu (54,87,53,42). Dieses Phänomen dürfte durchaus im Interesse von fast allen Hochleistungssportlern liegen (95).

Daten von gesunden Athleten sind allerdings kontrovers: Eine Studie beschreibt die Abnahme von Körperfett und eine Zunahme fettfreier Körpermasse unter rhGH-Einnahme (28). Eine Placebo-kontrollierte Studie mit Kraftsportlern ergab keinen eindeutigen Hinweis auf dieses Phänomen. Der lipolytische Effekt von hGH hängt folglich von Faktoren wie Körpergewicht und Leistungskapazität ab, fällt also bei GHD-Patienten und Profisportlern unterschiedlich aus.

In der bisher erschienenen Literatur ergibt sich kein klares Indiz, dass rhGH bei Hochleistungssportlern definitiv leistungsfördernd wirkt. Trotzdem ist Wachstumshormon unter Athleten sehr populär. Weitere Effekte wie schnellere Wundheilung, verbesserter Kollagen- und Knochenumsatz, sowie mögliche psychologische Effekte dürften dazu beitragen. Bisher fehlen hierzu jedoch größere Studien.

1.5. RhGH und Schwierigkeiten beim Nachweis im Rahmen von Dopinguntersuchungen

Rekombinantes Wachstumshormon ist chemisch identisch mit der quantitativ bedeutsamsten hypophysären Isoform, dem 22 kD hGH. RhGH und hGH bestehen aus den gleichen 191 Aminosäuren (15).

Rekombinant hergestellte Proteine, wie auch Wachstumshormon, werden meist in *E. coli* Bakterien synthetisiert. Oft unterscheiden sich künstlich angefertigte von in menschlichen Zellen produzierten Proteinen durch verschiedene Glykosylketten, was bei der Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Doping mit rekombinatem Erythropoetin erfolgreich genutzt werden konnte (64).

Da hypophysäres als auch rekombinantes hGH keine dieser Glykosylierungen erhalten, ist hierdurch eine Unterscheidung nicht möglich.

In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte bei einem handelsüblichen rhGH-Präparat eine Veränderung der Aminosäuresequenz mit Austausch einer Aminosäure nachgewiesen werden. Allerdings sind hiervon jeweils nur 1% der GH-Moleküle einer Ampulle betroffen (45). Der *in vivo* Nachweis einer derartigen strukturellen GH-Veränderung stellt damit keine erfolversprechende Alternative bei der Suche nach rhGH-Missbrauch dar.

Als Peptidhormon kann rhGH nicht peroral oder sublingual eingenommen werden; vollständige Verdauung und Zerlegung in einzelne Aminosäuren wären die Folge. RhGH muss daher entweder subkutan oder intramuskulär verabreicht werden.

Mehrere Faktoren erschweren die Möglichkeit, eine Einnahme mit rekombinatem Wachstumshormon nachzuweisen:

- Biochemisch ist rekombinantes hGH mit der 22 kD-Hauptfraktion des hypophysären hGH identisch (s. o.).
- Die Ausschüttung von phGH aus der Hypophyse geschieht pulsatil, seine Serumkonzentration variiert hierdurch stark. Faktoren wie psychischer oder physischer Stress, Hypoglykämie und Schlaf lösen eine vermehrte Ausschüttung aus (61,55,19,22,85).
- Die Sekretionsmenge von hGH ist bei den einzelnen Individuen sehr unterschiedlich.
- Die Halbwertszeit von hGH beträgt weniger als 20 Minuten (79). 1 – 3 Stunden nach Injektion ist das Konzentrationsmaximum erreicht, nach 24 Stunden ist das Protein im Blut nicht mehr nachweisbar (90).
- Urinalysen - üblich bei Nachweismethoden anderer leistungsfördernder Präparate - dürften sich wegen der sehr geringen Harnkonzentration von hGH als äußerst schwierig gestalten (66,37). Da Blutabnahmen als Eingriff in die körperliche Unversehrtheit gelten, stellen sie zur Dopinguntersuchung bei Athleten bisher immer noch ein juristisches Problem dar, werden aber mittlerweile von einer wachsenden Anzahl an Spitzenverbänden genehmigt.

1.6. Bereits existierende Methoden zum Nachweis von rhGH

Trotz der bereits skizzierten Schwierigkeiten haben verschiedene Forschungsgruppen zwei voneinander unabhängige Methoden entwickeln können, welche vielversprechende Ansätze zum Nachweis von hGH-Missbrauch darstellen:

Eine Methode konzentriert sich auf verschiedene GH-sensitive Komponenten der Wachstumshormon/IGF-I – Achse sowie auf biochemische Marker des Knochen- und Kollagenumsatzes: In einer placebokontrollierten Doppelblindstudie wurden nach großer körperlicher Belastung die Spiegel von IGF-I, IGF-bindende Proteine (IGFBPs) und säurelabilen Untereinheiten (acid labile subunits = ALS) bestimmt. Beide Studiengruppen erhielten 7 Tage zuvor entweder rhGH-Injektionen (0.15 IU/kg/Tag) oder Placeboinjektionen. In beiden Gruppen konnte ein belastungsabhängiger Anstieg aller IGF-abhängigen Faktoren beobachtet werden.

Der rhGH-behandelte Probandenteil der Studie zeigte allerdings höhere Spiegel als die placebokontrollierte Gruppe (94). Ferner kam es bei allen Probanden zu einem Konzentrationszuwachs für Marker des Kollagen- und Knochenumsatzes: Knochenspezifische alkalische Serumphosphatase, Carboxyl-terminales Propeptid Typ I Prokollagen (PICP), Prokollagen Typ III N-terminales Extensionspeptid (PIIIP) und Carboxyl-terminales „cross-linked“ Telopeptid Typ I Kollagen (ICTP). Die PIIIP- und ICTP-Spiegel fielen in der rhGH-Gruppe jedoch deutlich höher aus (95).

Ein weiterer Teil der Studie untersuchte bei 99 gesunden weiblichen und männlichen Probanden den Effekt von rhGH auf PIIIP und ICTP. Erhöhungen dieser Werte nach rhGH-Applikation konnten bestätigt werden, wobei Frauen nach rhGH-Gabe einen geringeren Anstieg der Marker von Kollagen- und Knochenumsatz zeigten als Männer (71). Studien bei GHD-Patienten zeigen ähnliche Ergebnisse (20). Insgesamt ließ sich mit dieser Methode – insbesondere bei Männern – die Applikation von rhGH eindeutig nachweisen. Die Vorteile dieser Methode liegen - verglichen mit der kurzen Halbwertszeit von hGH - in der langen Zeitperiode, in welcher diese Markerveränderungen beobachtet werden können. Allerdings können Weichteil- sowie Knochenverletzungen das Ergebnis verfälschen (95). Zusätzlich müssen die geschlechts- und altersabhängige Unterschiede der Markerspiegel in Betracht gezogen werden.

Eine zweite - von der ersten unabhängige Methode - untersucht Veränderungen der hGH-Isoformen:

Hypophysäres hGH besteht aus einer großen Anzahl von Isoformen (13,82) (s. 1.2.3.). RhGH besteht ausschließlich aus 22 kD hGH-Monomeren.

Mittels verschiedener monoklonaler Antikörper entwickelte die Arbeitsgruppe an der Medizinischen Klinik – Innenstadt, in welcher die vorliegende Dissertation entstand, zwei Immunoassays: Der eine erkennt möglichst viele hGH-Isoformen („permissiver Assay“), ein zweiter hauptsächlich 22 kD hGH („22 kD spezifischer Assay“).

Durch Messung einer Serumprobe mit beiden Assays lässt sich der relative Anteil des 22 kD hGH errechnen. Exogen zugeführtes rhGH unterdrückt durch den negativen Rückkopplungsmechanismus die hypophysäre hGH-Sekretion, daher verschwinden die meisten Isoformen und es liegt überproportional viel 22 kD hGH vor.

In Untersuchungen mit geblindeten Analysen von 40 Serumproben – gewonnen entweder nach Hypophysenstimulation (n=20) oder nach rhGH-Applikation (n=20) – konnte dies bestätigt werden. Sämtliche Probanden, die rhGH erhielten, konnten einwandfrei identifiziert werden (98).

Allerdings ist das Zeitfenster für diese Methode sehr begrenzt. Die eingeschränkte Sensitivität von Immunoassays ermöglicht den Nachweis von Veränderungen bei hGH-Isoformen nur innerhalb von 24 bis 36 Stunden nach der letzten Injektion.

Der Nachweis von injiziertem menschlichem hGH aus Leichenhypophysen ist mit dieser Methode natürlich nicht möglich. Diese Art der hGH-Injektion ist jedoch mit der Gefahr einer Creutzfeld-Jacob-Erkrankung sowie anderen Infektionen verbunden und dürfte die Anwendung derartiger Präparate zumindest im Profisport unwahrscheinlich machen.

1.7. Zielsetzung

Ziel der hier durchgeführten Arbeit war es zu bestätigen, dass die hGH-Isoformenmuster von hGH-behandelten und nichtbehandelten Individuen morphologisch grundsätzlich unterschiedlich sind. Dies sollte mit einer von der Assaymethode unabhängigen Vorgehensweise geschehen.

Im Rahmen einer hierfür vorgesehenen Western Blot Methode sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden und zur Etablierung einer Methode führen:

- Mit welchen Antikörpern kann im Rahmen des Western Blots eine optimale und aussagekräftige Bildgebung erzielt werden?
- Welche methodischen Möglichkeiten im Rahmen des Western Blots gibt es, experimentelle Aussagen bzgl. unterschiedlicher hGH-Isoformen zu verdeutlichen oder zu verbessern?
- Inwiefern kann die Konzentration von zu untersuchendem hGH pro Probe gesteigert werden und welche Optimierungen sind bei diesem Arbeitsschritt (Immunpräzipitation) möglich?

Ferner sollte nach Abschluss der Methodenetablierung folgendes untersucht werden:

- Sind unterschiedliche hGH-Bandenmuster in den einzelnen Proben zu erkennen?
- Können diese Ergebnisse eindeutig Aufschluss über eine Verwendung mit extern zugeführtem hGH geben?
- Kann die etablierte Methode als hGH-Dopingtest eingesetzt werden?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Untersuchte Seren

1. Serumproben von Akromegaliepatienten nach Stimulation mit Arginin.
2. Serumproben von gesunden Kontrollprobanden (hGH-Konz. <0,2 ng/ml).
3. Serumproben von Patienten nach Hypophysektomie unter Substitution mit rekombinantem Wachstumshormon.
4. Serumproben aus internationalen Studien mit Athleten nach Injektion von rekombinantem Wachstumshormon / nach Injektion von Placebo.

Der „Gesamtgehalt“ an Wachstumshormon aus sämtlichen Proben wurde vor den Untersuchungen in den hier beschriebenen Verfahren mit einem kommerziell erhältlichen Assay-System (‘Nicols-Advantage hGH’) gemessen.

Alle Studien wurden vorab von der jeweils lokalen Ethik-Kommission genehmigt. Den Teilnehmern wurde erst nach Unterzeichnung einer Einverständniserklärung Blut abgenommen.

2.1.2. Untersuchte hGH-Präparationen

Standard für hypophysäres hGH Code 80/505

National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)

Standard für rekombinantes hGH Code 88/624

National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)

Standard für 20 kD hGH

MS-706

Mitsui Chemical Corporation (Japan)

Fragment I	Festphasensynthetisiertes Peptid, Sequenz entspricht AS 1 bis 43 des hGH. Bissendorf Biochemicals GmbH, Bachem Inc. (Hannover, Deutschland)
Fragment II	S-carbamidomethyliertes Fragment AS 141 bis 191, isoliert aus C-Typ hGH, vermutlich bereits in Hypophyse plasmingespalten. Freundlicherweise von Dr. J. Kostyo, Ann Harbour (Michigan, USA) als Geschenk überlassen.
Leichenhypophysen-hGH (aufgereinigt)	Somatotropin from human pituitary. Sigma (St. Louis, MO, USA)

2.1.3. Reagenzien

(A) für Immunpräzipitation

Streptavidin Magnesphere[®], Paramagnetic Particles – Promega Corp. (Wi, USA)
Dynabeads - sheep anti-mouse[®], Dynal (Oslo, Norwegen)

(B) für Elektrophorese

Natriumdodecylsulfat (SDS), BioRad (Richmond, CA, USA)
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris), BioRad (Richmond, WI, USA)
Acrylamide / Bis (30%), BioRad (Richmond, CA, USA)
Tetramethylathylenediamine (TEMED), BioRad (Richmond, CA, USA)
Ammonium Persulfate, BioRad (Richmond, CA, USA)
Sucrose (50%)
Kaleidoscope Polypeptide Standards, BioRad (Richmond, CA, USA)
ImmunoPure[®], Lane Marker Reducing Sample Buffer, Pierce (Rockford, Irland)
ImmunoPure[®], Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer, Pierce (Rockford, Irland)

(C) für Western Blot

Enhanced Chemiluminescence (ECL) Kit[®], Amersham (Buckinghamshire, England)
 Lumi-Light-Plus[®], Western Blotting Kit (Maus / Kaninchen), Roche Diagnostics Corp.
 (IN, USA)
 Super Signal[®], West Femto, Pierce (Rockford, Irland)

2.1.4. Geräte und andere Materialien

(A) für Immunpräzipitation

Dynal MPC-1[®], Magnetic Particle Concentrator, Dynal (Oslo, Norwegen)
 Magnesphere[®], Magnetic Separation Stand, Promega Corp. (WI, USA)
 Eppendorf Thermomixer 5463[®], Eppendorf GmbH (Hamburg, Deutschland)
 Eppendorf Centrifuge 5415C[®], Eppendorf GmbH (Hamburg, Deutschland)

(B) für Elektrophorese

Mini-Protean II Dual Slab Cell, BioRad (Richmond, CA, USA)
 Mini-Protean 3 Cell, BioRad (Richmond, CA, USA)

(C) für Western Blot

Hybond ECL[®], Amersham (Buckinghamshire, England)
 Hybond-P[®], Amersham (Buckinghamshire, England)
 Extra Thick Blot Paper[®], BioRad (Richmond, CA, USA)
 Trans Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BioRad (Richmond, CA,
 USA)
 Power Supply Model 200/2.0[®], BioRad (Richmond, CA; USA)
 Rocky[®], Biometra
 Hyperfilm[®], Amersham (Buckinghamshire, England)
 Typhoon 8600[®], Dektionsscanner, Amersham (Buckinghamshire, England)

(D) sonstiges

Chemiluminescence Immunoassay for quantitative determination of human growth hormone in serum, Nichols Advantage (San Juan Capistrano, CA, USA)

Typhoon 8600, Amersham (Buckinghamshire, England)

2.1.5. Antikörper

(A) für Immunpräzipitation

Kaninchen-Antiserum gegen humanes hypophysäres hGH, polyklonal (pKaGH) über Protein-A-Säule aufgereinigt,

Dr. Z. Wu, Medizinische Klinik - Innenstadt, LMU München (München, Deutschland)

Kaninchen-Antiserum gegen humanes hypophysäres hGH, polyklonal, biotinyliert (pKaGH-b) über Protein-A-Säule aufgereinigt,

Dr. Z. Wu, Medizinische Klinik - Innenstadt, LMU München (München, Deutschland)

Maus-Antikörper gegen humanes hypophysäres hGH, monoklonal (mMaGH) [7B11], mit Protein-A-Säule aufgereinigt

Dr. Z. Wu, Medizinische Klinik - Innenstadt, LMU München (München, Deutschland)

Maus-Antikörper gegen humanes hypophysäres hGH, monoklonal, biotinyliert (mMaGH-b) [7B11], mit Protein-A-Säule aufgereinigt

Dr. Z. Wu, Medizinische Klinik - Innenstadt, LMU München (München, Deutschland)

(B) für Western Blot

[1. Antikörper]

Anti-hGH IgG / Maus, monoklonal (mMaGH)

[D5, 10A7, 1H6, 7F8, 6F1, 3G4, 6C1, 7C7, 7B11, 5E1, 3B4, 5802, 7E8, 6A9, 5801, 8B1, 7D5, 5D7] - mit Protein-A-Säule aufgereinigt.

Dr. Z. Wu, Medizinische Klinik - Innenstadt, LMU München (München, Deutschland)

Anti-hGH IgG / Maus, monoklonal, biotinyliert (mMaGH-b)

[7B11] - mit Protein-A-Säule aufgereinigt.

Dr. Z. Wu, Medizinische Klinik - Innenstadt, LMU München (München, Deutschland)

Anti-hGH Antiserum / Kaninchen, polyklonal (pKaGH)

Prof. K. von Werder, (Berlin, Deutschland) / aufgereinigt von Dr. Z. Wu, Medizinische Klinik - Innenstadt, LMU München (München, Deutschland)

Anti-hGH IgG / Kaninchen, polyklonal (pKaGH) – K5

Dr. Z. Wu, Medizinische Klinik - Innenstadt, LMU München (München, Deutschland)

[Detektionsantikörper / sonstiges]

Anti-Maus IgG / Schaf, Meerrettichperoxidase-konjugiert (SaM-MRP)

Amersham (Buckinghamshire, England)

Streptavidin, Peroxidase-konjugiert (Stav-POD)

Zymed (Ca, USA)

Anti-Maus-Fc IgG / Ziege, Peroxidase-konjugiert (ZaM-Fc-POD)

Sigma (St. Louis, Mo, USA)

Anti-Kaninchen-Fc IgG / Ziege, Peroxidase-konjugiert (ZaK-Fc-POD)

Sigma (St. Louis, Mo, USA)

Protein A, mit Meerrettichperoxidase

2.1.6. Puffer und Lösungen

PBS Puffer:

1,42 g Na₂HPO₄ (10 mmol/l), 8,8 g NaCl (0,15 mol/l), 0,2 g NaN₃ (0,02%), 900 ml aqua bidest, mit H₃PO₄ auf pH 7,4 einstellen, mit aqua bidest auf 1000 ml auffüllen.

Elektrophorese Puffer:

3,02 g Tris, 14,4 g Glycin, 1 g SDS, 1000 ml aqua bidest.

Towbin Puffer:

3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 200 ml Methanol, 1000 ml aqua bidest.

Blockmilch:

5% Magermilchpulver, 1 % BSA, in PBS (ohne NaN₃).

Waschpuffer:

0,5% Magermilchpulver, 0,1 % Polyoxyethylensorbitan Monolaurat 20 (Tween 20) in PBS (ohne NaN₃).

Antikörperlösung:

0,5% Magermilchpulver, 1 % BSA, 0,1 % Polyoxyethylensorbitan Monolaurat 20 (Tween 20) in PBS (ohne NaN₃).

Natriumdodecylsulfat (SDS) (20%):

20 g SDS, 100 ml aqua bidest.

3M Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris) -HCl (pH 8.8):

1,817 g Tris, 400 ml aqua bidest, mit HCl auf pH 8,8 einstellen, mit aqua bidest auf 500 ml auffüllen.

0,5M Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris) -HCl (pH 6,8):

30,28 g Tris, 400 ml aqua bidest, mit HCl auf pH 6,8 einstellen, mit aqua bidest auf 500 ml auffüllen.

LKC Puffer:

45,0 g NaCl, 30 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 2,5 g NaN₃, 0,5 g Tween 40 in 3 l aqua bidest. Mit HCl auf pH 7,75 einstellen. 25,0 g BSA, 2,5 g Bovines Gamma-Globulin, 39,35 mg Diethylenetriaminepentaacetat. Mit aqua bidest auf 5 l auffüllen.

Über Nacht quellen lassen und dann filtrieren: Zuerst über 8 µ-Filter, anschließend über 0,8 µ-Filter.

LKC Puffer (20%):

10 ml LKC Puffer, 40 ml PBS (NaN₃-frei)

PBS-V:

100 ml PBS-Lösung (ohne NaN₃), 7 g BSA

PBS-W:

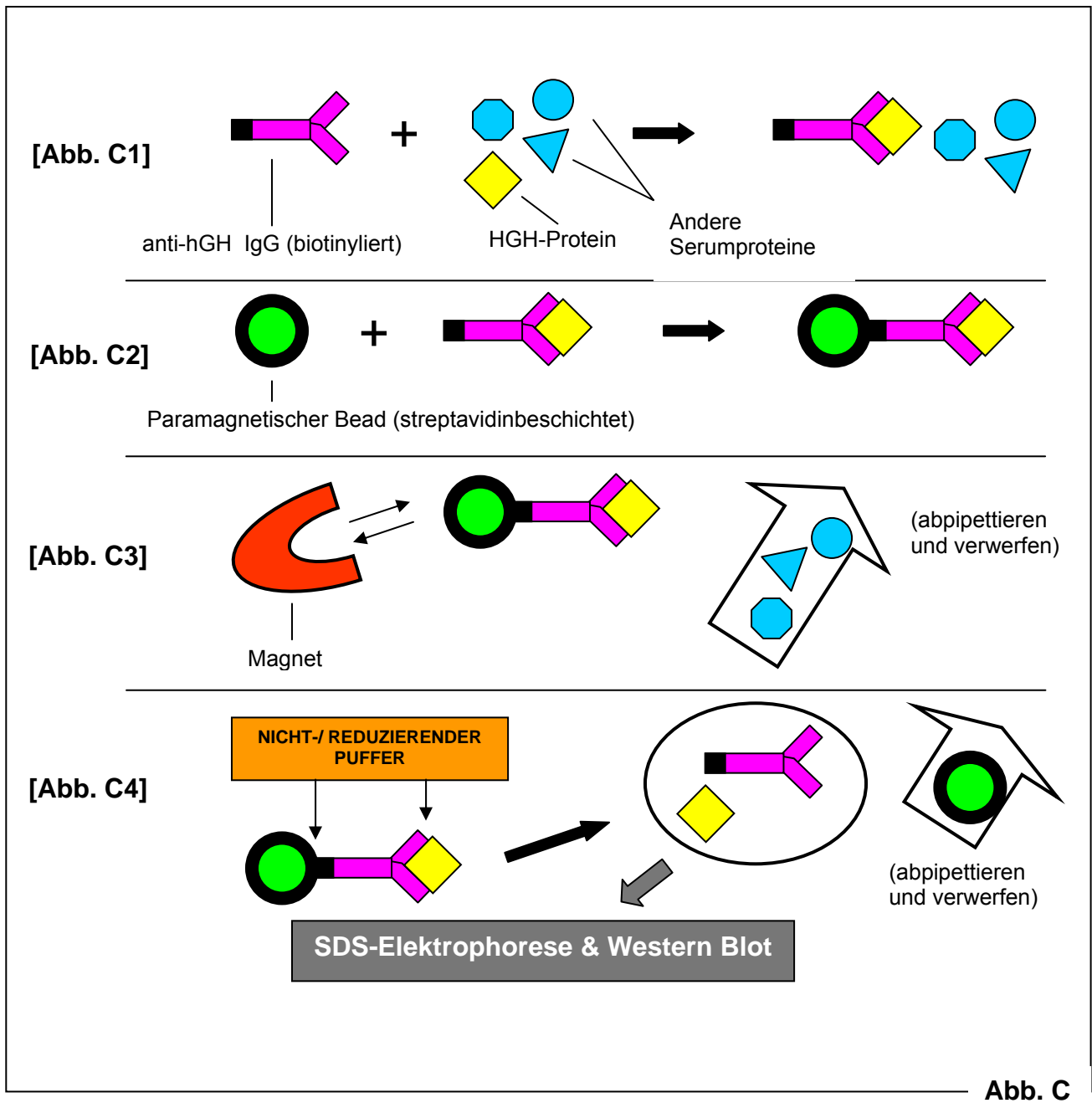
100 ml PBS-Lösung (ohne NaN₃), 0,2 g BSA, 100 µl Tween 20.

2.2. Methoden

2.2.1. Immunpräzipitation (allgemein)

Zur Anreicherung der hGH-Moleküle in der zu untersuchenden Probe wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt: Das zu untersuchende Serum wird mit einem gegen Wachstumshormon gerichteten Antikörper sowie einer Puffersubstanz für einen bestimmten Zeitraum im Schüttelinkubator inkubiert (**Abb. C1**). Im Anschluss werden antikörperaffine paramagnetische Beads sowie weiterer Puffer hinzugegeben und im Schüttelinkubator erneut inkubiert (**Abb. C2**). Nachdem Serum, Antikörper und Beads miteinander inkubiert wurden, folgen ein bis mehrere Waschgänge, wobei der Komplex aus Wachstumshormon, Antikörper und Bead aufgrund seiner paramagnetischen Eigenschaften mit einem Magneten an der Gefäßwand fixiert wird und die verbleibende flüssige Phase abpipettiert werden kann (**Abb. C3**). Der Magnet wird entfernt und verdünnter Puffer hinzugegeben. Der Vorgang kann mehrere Male wiederholt werden. Nach Beendigung des Waschvorgangs gibt man reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Puffer hinzu. Proben mit reduzierendem Puffer werden für 5 Minuten im Schüttelinkubator gekocht, nicht-reduzierte Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur (**Abb. C4**).

Alle Proben werden hierauf für 3 Minuten bei 7000g zentrifugiert. Nach Abkühlung werden die in getrennter Form vorliegenden Antikörper- und Wachstumshormon-Proteine abpipettiert. Ein am äußeren Gefäßboden befestigter Magnet fixiert die dissoziierten magnetischen Bead-Partikel. Die abpipettierten Proben können nun in die Probetaschen der SDS-Gele eingefüllt werden (**Abb. C4**).



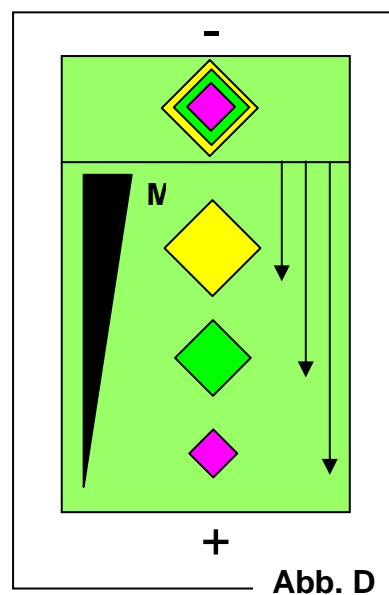
[Abb. C] Schematische Darstellung der Immunpräzipitation

2.2.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) (allgemein)

Bei der Elektrophorese werden Moleküle einem elektrischen Feld ausgesetzt. Aufgrund ihrer Größe und elektrischen Ladung wandern alle Moleküle unterschiedlich schnell.

Nachdem das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) hinzugefügt wurde, ist die Eigenladung der Proteinen überdeckt. Es entstehen sog. anionische Mizellen, wobei das Protein negativ geladen wird. Die Ladung des Proteins ist folglich nur noch von der Proteingröße abhängig. Diese konstante Nettoladung pro Masseneinheit führt zu einer eigenladungs-unabhängigen und molekulargewichts (MG)-abhängigen Differenzierung der einzelnen Proteingruppen in der SDS-Elektrophorese. Hierdurch bestimmt fast ausschließlich die Größe des Moleküls seine Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Große Proteine wandern pro Zeiteinheit langsamer als kleinere. (**Abb. D**).

Für die SDS-Elektrophorese fanden die Elektrophoresekammern *Mini-Protean II* und im *Mini-Protean 3 Cell* (beide BioRad) Verwendung. Das Gel lief bei unterschiedlichen Spannungen, wobei 100 Volt als Minimum und 200 Volt als Maximum galt. Es wurden 10%ige und 15%ige Gele gegossen und verwendet, als auch kommerzielle Gele (BioRad) zur Anwendung gebracht.



[Abb. D] Schematische Darstellung der Proteinauftrennung nach ihrem Molekulargewicht (MG)

2.2.3. Western Blot (allgemein)

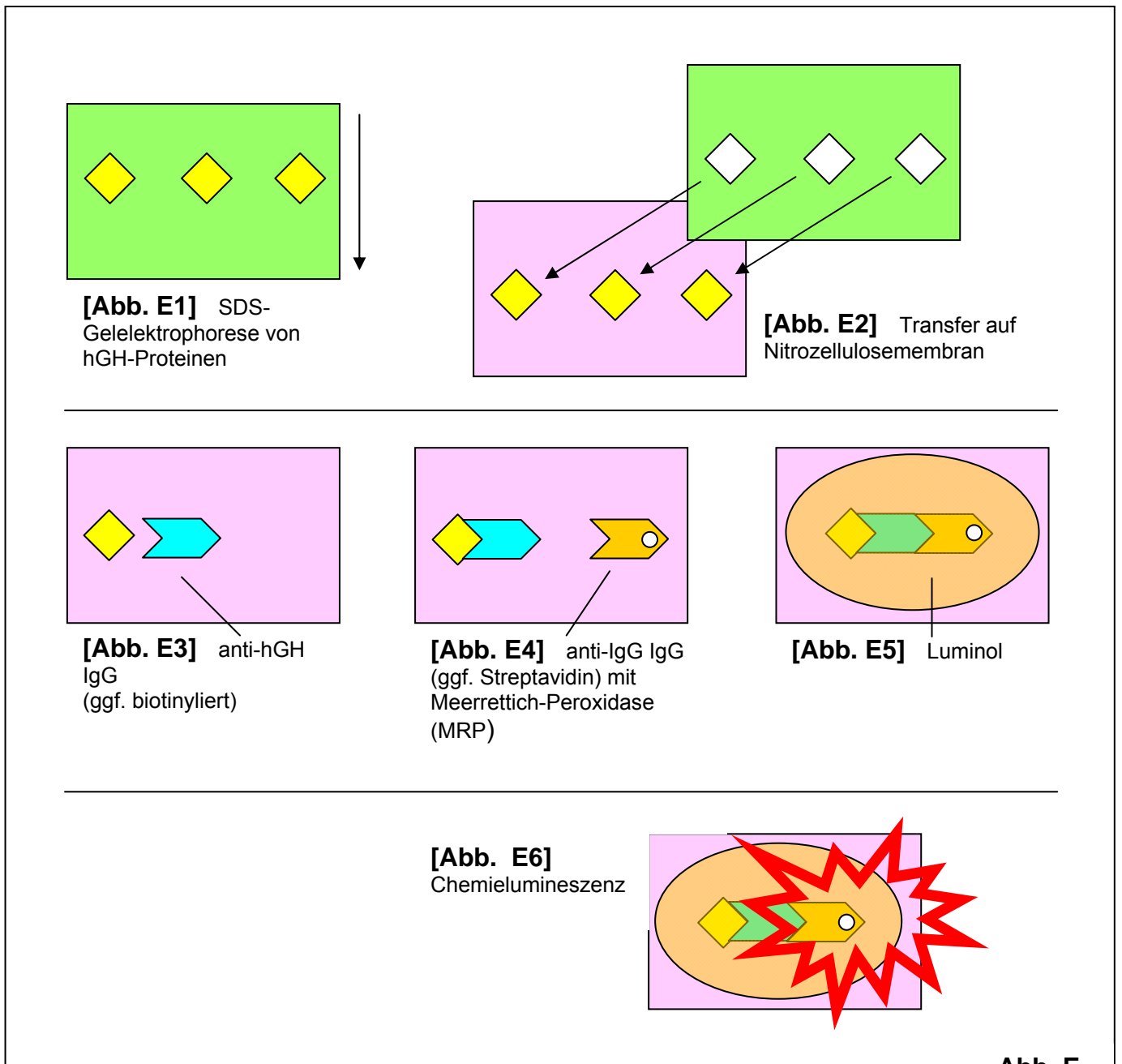
Nachdem die Proteine in der Elektrophorese gewichtsspezifisch aufgetrennt wurden, (**Abb. E1**), werden sie auf eine Nitrozellulose-Membran (*Hybond-ECL* bzw. *Hybond-P*, *Amersham*) transferiert (**Abb. E2**). Gel, Membran und zwei umgebende Blotpapiere (*Blot paper*, *BioRad*) werden in den *Trans Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell*, *BioRad* gelegt und einem Stromfeld bei konstanter Stromstärke für eine bestimmte Zeit ausgesetzt.

Nach Beendigung des durch die Stromspannung hervorgerufenen Proteintransfers werden mittels Transferpuffer-Neutralisation durch *Blockmilch* sämtliche Proteinbewegungen zum Stillstand gebracht. Die Membran kann jetzt mit hGH-spezifischen Antikörpern für einen definierten Zeitraum inkubiert werden (**Abb. E3**).

Es folgen ein Waschvorgang mit *Waschlösung* und eine darauf folgende Inkubation eines zweiten Antikörpers mit Affinität gegen den ersten (**Abb. E4**).

Der zweite Antikörper ist mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert, diese kann nach Abschluss der Antikörperinkubation und einem erneuten Waschvorgang wie folgt reagieren: Zum Detektieren des Hormon-Antikörper-Komplexes bedient man sich dem System der `enzymatischen Chemielumineszenz`. Hierbei wird die Nitrozellulose-Membran in luminolhaltiger Flüssigkeit inkubiert (**Abb. E5**). Das Enzym Meerrettich-Peroxidase oxidiert Luminol. Diese chemische Veränderung führt zu einem Freiwerden von Energie in Form von Licht (**Abb. E6**). Eine zusätzliche Verstärkungsflüssigkeit erhöht den Lumineszenzeffekt um das 1000-fache, womit Antigenmengen von < 1pg detektiert werden können. Im Vergleich hierzu benötigen radioaktive Detektiersysteme die 10-fache Menge an Antigen. Die Lichtsignale werden mittels einem speziellen Film (*Hyperfilm-ECL*, *Amersham*) nach dessen Entwicklung sichtbar gemacht bzw. durch einen Chemielumineszenz-Scanner (*Typhoon 8600*, *Amersham*) eingefangen, verstärkt und digital konvertiert.

(s. Kap. 2.2.4. sonstige Methoden).



[Abb. E 1-6] Schematische Darstellung des Western Blots

2.2.4. sonstige Methoden

Bestimmung der Konzentration von Wachstumshormon im Serum mittels Chemieluminescence-Assay:

Um die Wachstumshormonkonzentration im Serum zu bestimmen, wurde der *Chemiluminescence Immuno-Assay*, Nichols Advantage hGH (San Juan Capistrano, CA, USA) ein sogenannter 'Sandwich-Chemilumineszenz Assay' verwendet:

Ein monoklonaler, biotinylierter Antikörper (Maus), sowie ein polyklonaler, Acridinium-beschichteter Antikörper (Ziege) binden das Wachstumshormon. Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel können nun durch die hohe Affinität von Avidin zu Biotin an den Hormon-Antikörperkomplex binden. Die magnetische Eigenschaft des neuen Komplexes erlaubt mittels Magnet eine Präzipitierung von anderen, nicht-gebundenen Serumbestandteilen.

Zugabe von Hydrogen-Peroxid (Lösung 1) und Natrium-Hydroxid (Lösung 2) oxidieren Acridinium und versetzen es in einen angeregten Zustand. Die Emission von Lichtsignalen ist die Folge und kann im Luminometer quantifiziert werden. Hierbei ist die Signalmenge proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge hGH.

Dieser Assay wird an der Medizinischen Klinik – Innenstadt auch in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt.

Signaldetektion mittels Typhoon 8600

Der *Imager Typhoon 8600*, Amersham (Buckinghamshire, England) ist in der Lage, die Lichtemissionen chemielumineszierender Protein-Antikörper-Komplexe mittels optischem System zu erfassen und zu filtern. Ein Umwandler (photomultiplier tube) konvertiert anschließend die Lichtsignale in elektrische Impulse, deren Intensität proportional zu der Menge an Lichtsignalen ist. Analoge Signale von der Blot-Membran werden so in digitale umgewandelt und können nach dem Scannen mittels spezieller Software (*ImageQuant™*) weiterverarbeitet werden.

2.2.5. Protokoll der etablierten Methode

I. Proben herstellen:

- Eingefrorenes **Serum** bei RT auftauen lassen.
- 100 bis 200 µl Serum (Mindestgehalt 1,5 ng hGH) entnehmen und in Eppendorfgefäß pipettieren.
- PBS-V im Verhältnis 1:1 zugeben.
- 2 µg polyklonales IgG (Kaninchen), biotinyliert zugeben.
- 1 h 30 min bei RT im Schüttelinkubator inkubieren (Zeit für Herstellung der SDS-Gele, s.u.).
- 50 µl *Streptavidin Magnesphere®*, *Paramagnetic Particles* zugeben.
- 50 µl Puffer (PBS-V) zugeben.
- 1 h 30 min bei RT im Schüttelinkubator inkubieren, c.a. alle 15 min kurz vortexen um Präzipitatablagerungen an Gefäßwänden zu vermeiden.
- Proben 3 min in *Magnesphere®*, *Magnetic Separation Stand* stellen.
- Flüssige Phase von magnetisch gebundener fester Phase abpipettieren und verwerfen.
- Magnet entfernen.
- 600 µl PBS-W zugeben.
- Magnet anlegen.
- Flüssige Phase von magnetisch gebundener fester Phase abpipettieren und verwerfen (Waschvorgang (letzte 3 Schritte) insgesamt 3 mal durchführen).
- Proben für wenige Sekunden bei 14000 g zentrifugieren um Präzipitat von Gefäßwänden zu lösen.
- 3 µl *ImmunoPure®*, *Lane Marker Reducing Sample Buffer*, *Pierce* zugeben.
- 5 min bei 95°C im Schüttelinkubator inkubieren.
- Proben für 3 min bei 7000 g zentrifugieren.
- Proben einige Minuten weiter abkühlen lassen.

- Gesamte flüssige Phase (ca. 20 µl) unter Zuhilfenahme des *Dynal MPC-1®*, *Magnetic Particle Concentrator*, *Dynal* von fester Phase abpipettieren und in Geltasche einfüllen.
- **PhGH- RhGH- und Fragmentstandards** mit PBS-V auf gewünschte Konzentration verdünnen (1 µg/ml, 100 ng/ml, ...) und jew. 10 µl der Standardprobe mit 3 µl *ImmunoPure®*, *Lane Marker Reducing Sample Buffer*, *Pierce* versehen. Anschließend ebenfalls 5 min bei 95°C im Schüttelinkubator inkubieren und vor Einfüllen in Geltasche abkühlen lassen.
- **Referenz-Molekulargewichte** (*Kaleidoscope Polypeptide Standards*, *BioRad*) mit 10 µl in erste Geltasche pipettieren.

II. Herstellung SDS-Minigele (15%): (Mengenangabe für 2 Gele)

Trenngele

- 2,5 ml Tris (3M)
 - 100 µl SDS
 - 5 ml Acrylamid/Bisphosphat
 - 2,33 ml H₂O bidest
- } in Vakuum-Erlenmayerkolben mischen
- Mit Vakuumpumpe für 15 min entgasen.
 - 50 µl Ammoniumpersulfat (10%ig, in H₂O bidest gelöst) zugeben.
 - 5 µl TEMED zugeben.
 - leicht schwenken und mit Pasteur-Pipette zwischen Mini-Protean-Glasplatten einfüllen.
 - Gel-Oberfläche sofort mit Propanol bedecken und fest werden lassen.

Sammelgele

- 2,5 ml Tris (0,5M)
 - 50 µl SDS
 - 1,3 ml Acrylamid/Bisphosphat
 - 10,4 ml H₂O bidest
- } in Vakuum-Erlenmayerkolben mischen

- 860 µl Sucrose zugeben.
- mit Vakuumpumpe für 15 min entgasen.
(*Propanolfilm auf jetzt fester Trenngel-Oberfläche mit Filterpapier absaugen, mit H₂O bidest spülen, H₂O mit Filterpapier absaugen*)
- 50 µl Ammoniumpersulfat (10%ig, in H₂O bidest gelöst) zugeben.
- 5 µl TEMED zugeben.
- Leicht schwenken und mit Pasteur-Pipette auf feste Trenngelschicht füllen
- Geltaschenkämme vorsichtig (Luftblasen!) in Sammelgel einführen und Gel erstarren lassen
- Nach Erstarren des flüssigen Gelkomplexes, Einsetzen in Elektrophoresekammer, Elektrophorese-Puffer in innere und äußere Elektrophoresekammer gießen.
- Fertige Gelkassette bis zum Beginn der Elektrophorese an kühlem, schattigen Platz lagern.

III. Gel-Elektrophorese:

- Gel-Elektrophorese bei 100 V für ca. 2h 30 min (bis der *Lane Marker* am unteren Ende des Gels angekommen ist).

IV. Western Blot:

- Ca. 15 min vor Beendigung der Elektrophorese werden die *Hybond-P* Blotmembranen kurz in einigen Millilitern Methanol angefeuchtet, anschließend für ca. 10 min in Towbin-Puffer gelegt.
- In den letzten Minuten wird das Blotpapier (*extra thick blot paper*) ebenfalls in Towbin-Puffer inkubiert.
- Einzelne Proteintransfer-Elemente von unten nach oben wie folgt in *Trans Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BioRad* legen: Blotpapier – Blot-Membran – SDS-Gel – Blotpapier.

- Vorsichtig ausrollen, um Luftblasen zu vermeiden und mit etwas Towbin-Puffer begießen.
- *Trans Blot*[®] SD schließen und **Proteintransfer** 2 h bei 100 mA pro Membran laufen lassen.
- **Blocken:** Membranen entnehmen, von Gelresten säubern und 1 h bei RT in Blockmilch unter *Bewegung (Rocky, Biometra)* inkubieren.
- **1. Antikörperinkubation** in 10 ml Antikörperlösung mit 10 µg *monoklonalem IgG von Maus (7B11)* pro Membran für mindestens 16 h bei 4°C.
- **Waschen** Membran mit Waschlösung: 3 mal 5 ml kurz spülen, 3 mal 10 ml für 15, 10 und 5 min bei *Bewegung (Rocky, Biometra)* inkubieren.
- **2. Antikörperinkubation** in 10 ml Antikörperlösung mit 2,5 µg *Anti-mouse IgG von Schaf, Meerretich-Peroxidase-konjugiert, Amersham* pro Membran für mindestens 16 h bei 4°C.
- **Waschen** Membran mit Waschlösung: 3 mal 5 ml kurz spülen, 3 mal 10 ml für 15, 10 und 5 min bei *Bewegung (Rocky, Biometra)* inkubieren.

V. Detektieren / Entwickeln:

- Membran auf saubere aufgeschnittene Klarsichtfolien-Hälfte legen.
- Jeweils 1 ml aus Reagenz-Flasche 1 und Reagenz-Flasche 2 des *Enhanced Chemiluminescence (ECL) Kit, Amersham* entnehmen und miteinander mischen.
- 2 ml auf jede Membran auftragen, mit sauberer zweiter Klarsichtfolien-Hälfte bedecken und 5 min bewegungsfrei inkubieren (Luftblasen und Gelreste vermeiden!).
- Membran entnehmen, verbleibende Flüssigkeit auf sauberes Papier abklopfen.
- Membran in neue Klarsichtfolie legen und weiterhin verbleibende Flüssigkeit mit Rolle ausrollen.
- Membran in Klarsichtfolie einschweißen, Folie mit Papier gut trocknen und anschließend in Filmkassette legen.

- In Dunkelkammer Film (*Hyperfilm-ECL, Amersham*) einlegen und nach 5, 10 und 15 min oder nach Bedarf entwickeln.
-

3. Ergebnisse

Es werden jeweils repräsentative Blots aus verschiedenen Experimentengruppen gezeigt. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Experimenten in Form von Versuchsprotokollen finden sich im Anhang.

3.1. Selektion monoklonaler Antikörper gegen verschiedene hGH-Isoformen

In einem ersten Arbeitsschritt werden unterschiedliche monoklonale Antikörper bezüglich ihrer Affinität zu verschiedenen hGH-Isoformen im Western Blot untersucht (**Abb. 1, 2, 3, 4**).

Auf den in **Abb. 1** und **2** dargestellten Western Blots enthalten die einzelnen Banden folgende Proben: **(a)** hypophysäres hGH (phGH) Standard, **(b)** 20 kD hGH Standard und **(c)** hGH-haltiges Nativserum.

Deutliche hGH-Isoformen sind mit den monoklonalen Antikörpern 6F1 (**2**), 7B11 (**3,9**), 7D5 (**6/10**) sowie 5D7 (**7/11**) erkennbar. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um 22 **(a)**, 20 **(b)** und 36 kD **(d)** -hGH-Isoformen.

Mit mAk 7B11 gelingt die Visualisierung einer weiteren Bande im Bereich 17 kD **(c)**, die für eine 17 kD hGH-Isoform spricht.

Insgesamt ist mit mAk 7B11 das größte Spektrum an hGH Unterbanden darzustellen. (Protokoll 3.1.1)

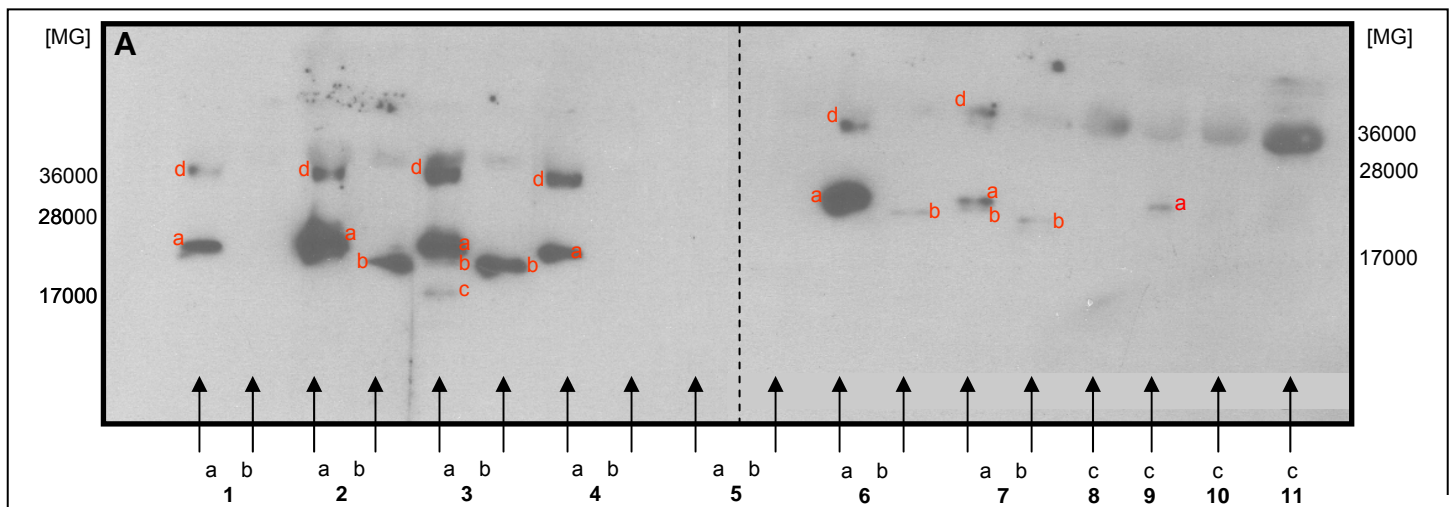


Abb.1
[monoklonale Antikörper] 1: 1H6, 2: 6F1, 3: 7B11, 4: 10A7, 5: 3B4, 6: 7D5, 7: 5D7, 8: 1H6, 9: 7B11, 10:7D5, 11: 5D7(**a**) hypophysäres hGH (phGH) Standard, (**b**) 20 kD hGH Standard (**c**) hGH-haltiges Nativserum.

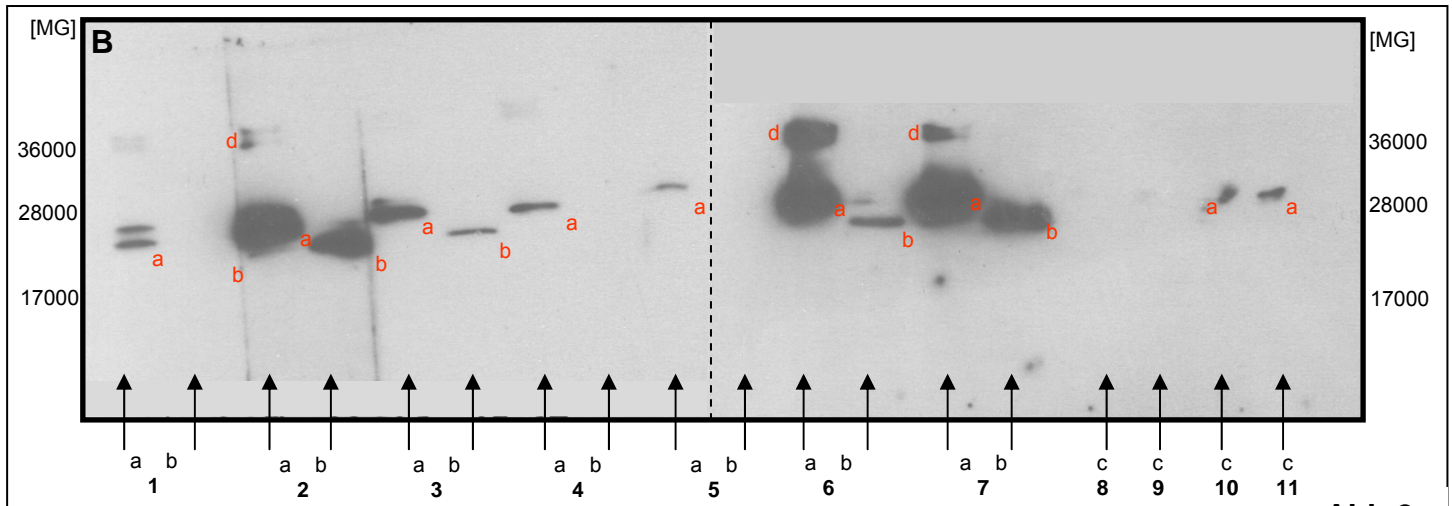


Abb.2

[monoklonale Antikörper] 1: 1H6, 2: 6F1, 3: 7B11, 4: 10A7, 5: 3B4, 6: 7D5, 7: 5D7, 8: 1H6, 9: 7B11, 10:7D5, 11: 5D7(a) hypophysäres hGH (phGH) Standard, **(b)** 20 kD hGH Standard **(c)** hGH-haltiges Nativserum.

Weitere monoklonale Antikörper wurden bzgl. ihrer Affinität zu hGH untersucht (**Abb. 3 und 4**). Als Proben werden hypophysäres hGH (phGH) in **(a)**, sowie hGH-enthaltendes Nativserum **(b)** verwendet.

Gute Ergebnisse werden mit den bereits in Abb. 1 und 2 gezeigten, erfolgreich getesteten monoklonalen Antikörpern 7D5 **(8)**, 5D7 **(9)**, 6F1 **(14)**, sowie 7B11 **(18)** erzielt. Deutliche Bandensignale sind im 22 **(a)** und z.T. auch im 20 **(b)** kD-Bereich zu erkennen. Ferner sind in **(8)** und **(9)** jeweils eine 36-kD-Bande **(c)** sichtbar.

MAk 5802 **(3)** sowie 7E8 **(4 / 13)** führen zu deutlichen Signalen im 22 kD-Bereich **(a)**. 7E8 **(4 / 13)** lässt außerdem eine 20 kD-Bande **(b)** erkennen.

Die mit großer Häufigkeit auftretenden Signale im 36 – 40 kD-Bereich **(*)** sind bei fast allen eingesetzten Antikörpern zu erkennen und entweder als dimerisiertes 22 kD-hGH mit hoher Affinität zu fast allen mAk oder als unspezifische Signale zu werten.

Zusammenfassend sind von den hier verwendeten monoklonalen Antikörpern 5802, 7E8, 7D5, 5D7, 6F1 und 7B11 für die Detektion von hGH-Isoformen im Blot geeignet.

(Protokoll 3.1.2)

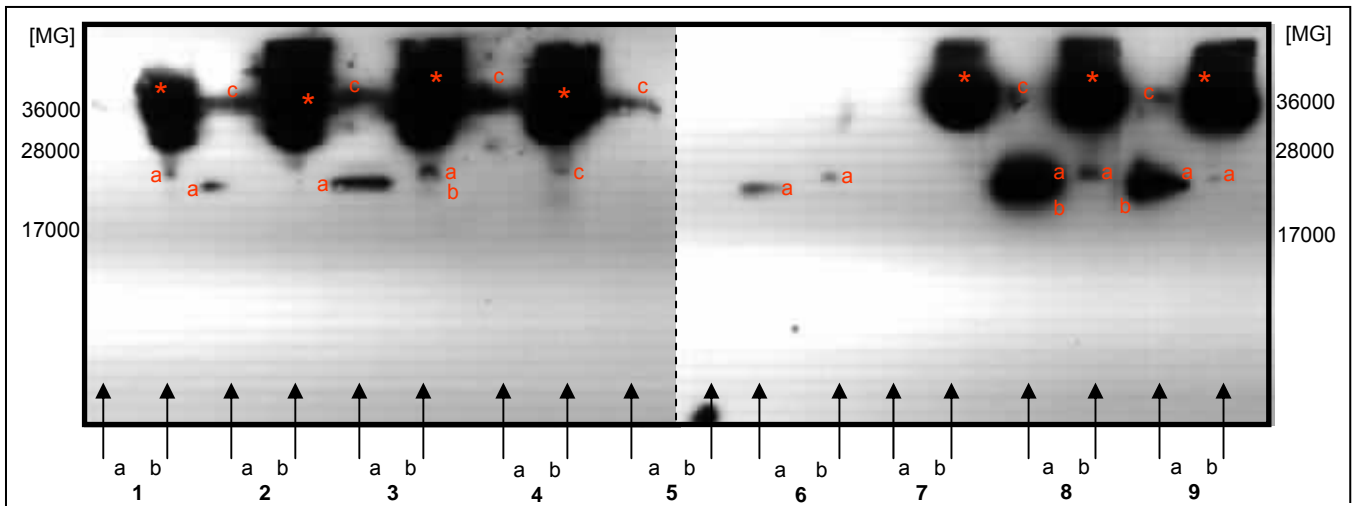


Abb. 3

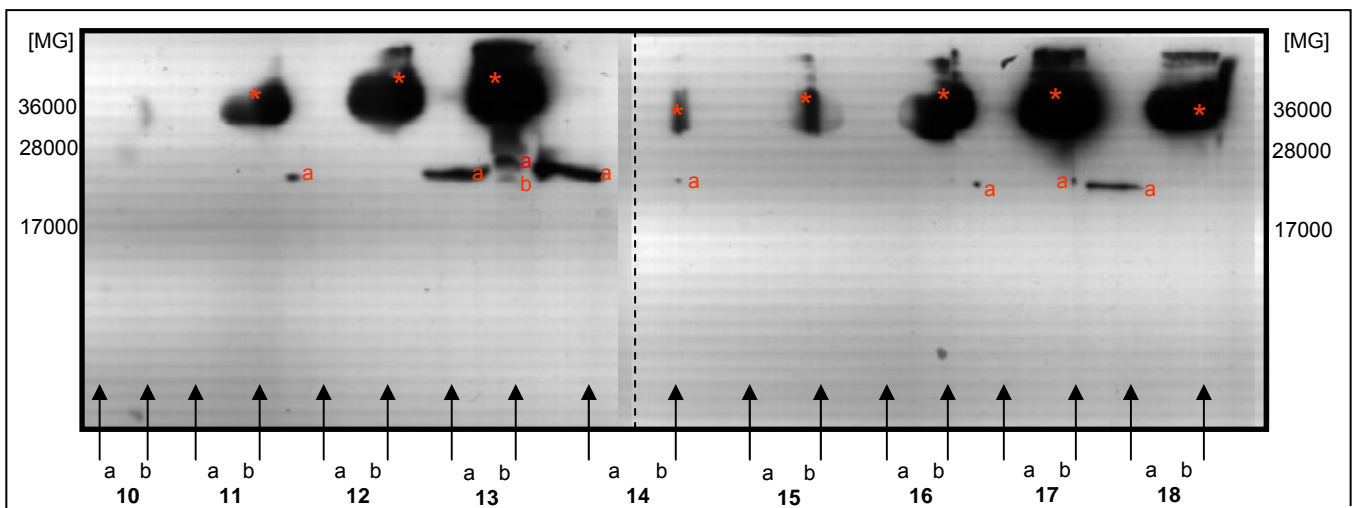


Abb. 4

[monoklonale Antikörper] 1: 5E1, 2: 3B4, 3: 5802, 4: 7E8, 5: 6A9, 6: 5809, 7: 8B11, 8: 7D5, 9:

10: D5, 11: 10A7, 12: 1H6, 13: 7E8, 14: 6F1, 15: 3G4, 16: 6C1, 17: 7C7, 18: 7B11

(a) hypophysäres hGH (phGH) (b) hGH-haltiges Nativserum

Mak 7B11 fällt in allen durchgeführten Western-Blots als äußerst affin gegenüber verschiedenen Isoformen von Wachstumshormon auf. Zusätzlich zeichnete sich 7B11 im Western Blot durch eine hohe Zuverlässigkeit bei der Wiederholbarkeit aus. Diese beiden Kriterien haben später dazu geführt, mAk 7B11 als ersten Blot-Antikörper in der zu etablierenden Methode einzusetzen.

Unter der Annahme, dass ein polyklonales Antiserum gegen hypophysäres hGH mehr Isoformen erkennen kann als ein sehr spezifischer monoklonaler Antikörper, wurden zusätzlich monoklonale und polyklonale Antikörper als 1. Antikörper im Western Blot miteinander verglichen.

Abb. 5 zeigt zwei Western-Blots deren **Proben 1 – 5** hGH-Standards in abnehmender Konzentration enthalten. Die **Proben 6** bestehen aus wachstumshormonfreiem Serum, die **Proben 7** enthalten Serum von Akromegaliepatienten. Sämtliche Serumproben wurden zuvor immunpräzipitatorisch behandelt.

Der in **A** eingesetzte 1. Antikörper ist ein aus Mäuseserum gewonnener monoklonaler Ak (mMaGH). In **B** wurde ein aus Kaninchenserum stammender polyklonaler Ak verwendet (pKaGH).

In **A** sind wie schon in den vorherigen Abbildungen typische Bandensignale bei 22 (**a**), 20 (**b**) und 17 kD (**c**) zu erkennen.

Keinerlei Signale können in **B** detektiert werden.

Polyklonale Antikörper weisen als 1. Antikörper keine ausreichende Sensitivität im Western Blot für hGH-Proteine auf.

(Protokoll 3.1.3.)

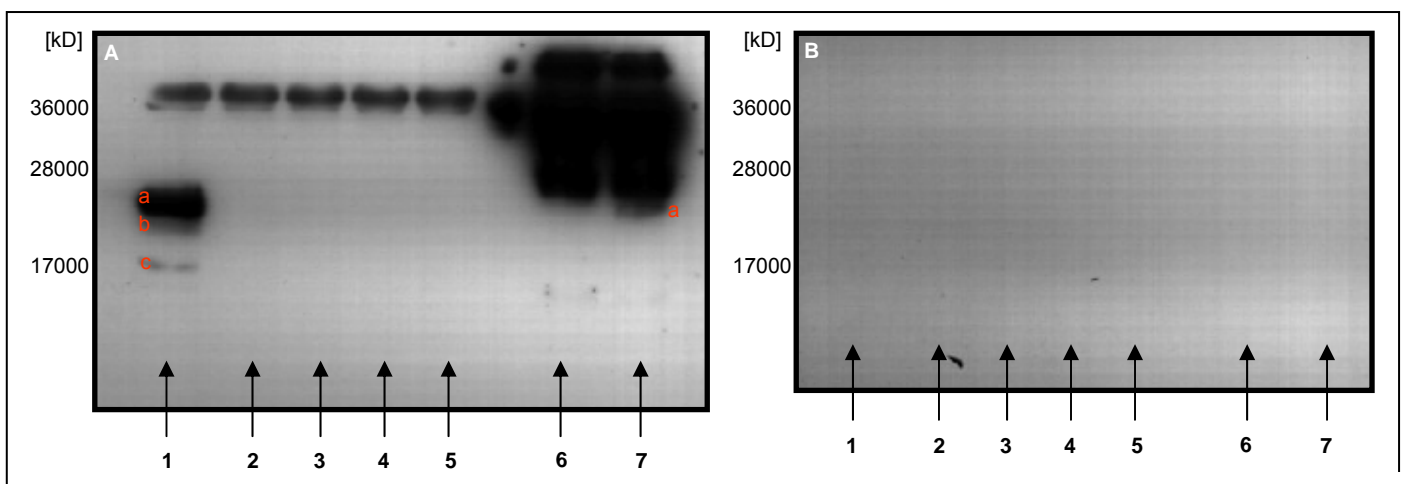


Abb. 5

1 – 5: hGH-Standards in abnehmender Konzentration, **6:** hGH-freies Serum, **7:** hGH-haltiges Serum

A: anti-hGH Ak monoklonal, **B:** polyklonale anti-hGH-Seren Ak polyklonal

In einem weiteren Optimierungsversuch wurden die bereits in Abb 1 - 5 gezeigten sensitivsten monoklonalen Antikörper direkt miteinander verglichen.

In **Abb. 6** enthalten die **Proben 1** hGH-freies Serum, die **Proben 2** Serum eines Wachstumshormon-behandelten Probanden und **Probe 3** jeweils Serum eines Akromegaliepatienten. (Alle Seren wurden zuvor immunpräzipitatorisch behandelt). Der Blot in **A** wurde mit mAk 7D5 als 1. Antikörper, in **B** mit 7B11 inkubiert. Mit 7B11 (**B**) sind deutlichere Bandensignale als mit 7D5 (**A**) zu erkennen. Dies gilt in den Proben **2** und **3** für die Banden im 22 (**a**) und 20 kD-Bereich (**b**), vor allem aber im 17 kD-Bereich (**c**).

7B11 bringt im Vergleich zu 7D5 bessere Bandensignale zum Vorschein.

(Protokoll 3.1.4.)

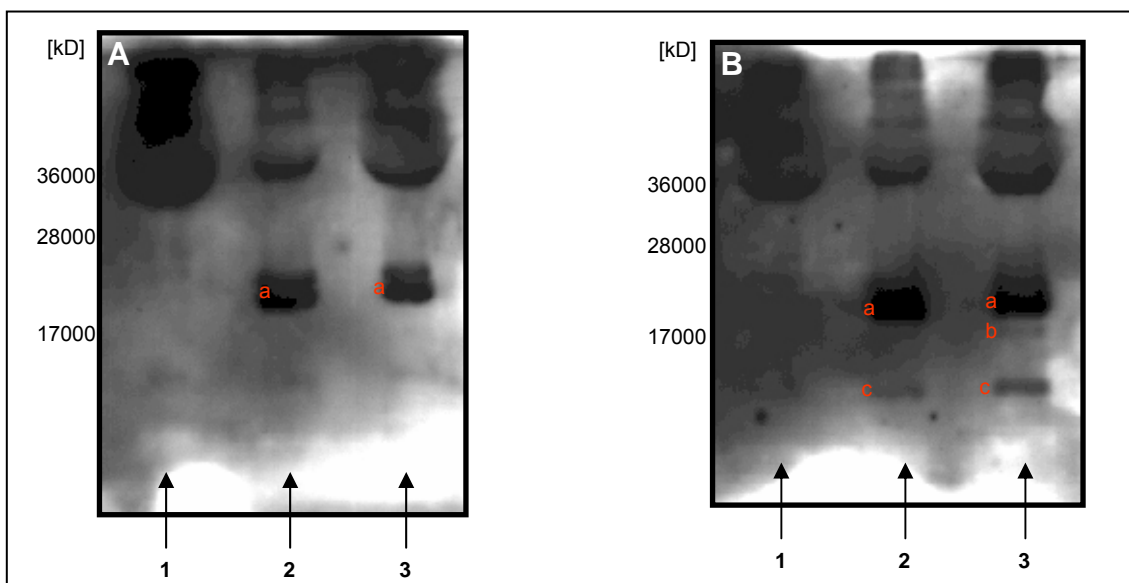


Abb. 6

1: hGH-freies Serum, **2:** hGH-haltiges Serum **3:** hGH-haltiges Serum

A: anti-hGH Ak 7D5, **B:** anti-hGH Ak 7B11

Ferner wurde versucht, durch Kombination verschiedener Antikörper eine verbesserte Darstellung zu erreichen (**Abb. 7 und 8**).

Die Western Blots in **Abb. 7** enthalten in den **Proben 1 - 5** hGH Standards in absteigender Konzentration, in **Probe 6** die Serumprobe eines rec hGH-behandelten Athleten und in **7 - 9** Serumproben von Akromegaliepatienten in aufsteigender hGH-Konzentration.

In **A** wird als 1. Antikörper im Western Blot eine Kombination aus zwei monoklonalen Antikörpern, 7B11 und 7D5, eingesetzt, in **B** mengengleich nur ein mAK, 6F1.

Die Unterschiede bezüglich der dargestellten Banden sind zwischen 7B11+7D5 und 6F1 als 1. Ak gering. 22- (**a**), 20- (**b**) und eine 36 kD-Bande (**c**) in beiden Abbildungen sichtbar. Nur in **A** ist eine 22 kD-Bande auch in **Probe 4** und **Probe 6** zu erkennen.

Ähnliche Bandenmuster können mit beiden Antikörperkombinationen erzielt werden. Die Kombination aus 7B11 und 7D5 (**A**) bringt eine leicht erhöhte Sensitivität mit sich.

(Protokoll 3.1.5.)

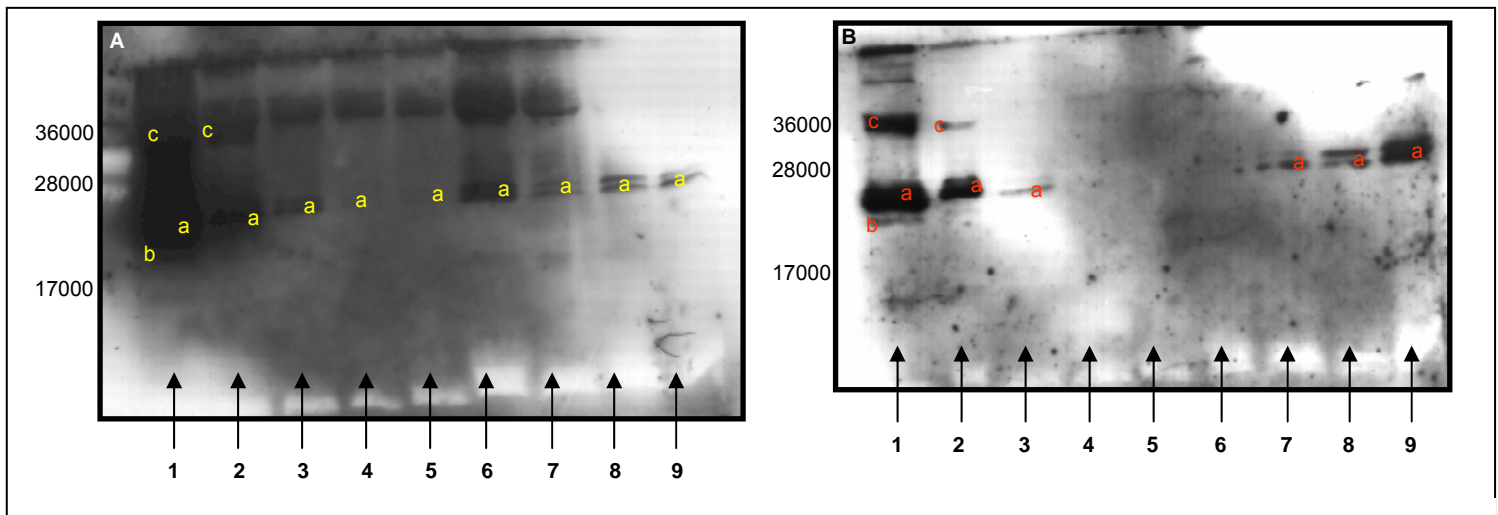


Abb. 7

1 - 5: hGH Standards, **6:** rec hGH-haltiges Serum, **7 - 9:** hGH-haltiges Akromegalenserum .

A: Anti-hGH Ak 7B11 + 7D5, **B:** Anti-hGH Ak 6F1

In **Abb. 8** dargestellte Western Blots enthalten in den **Proben 1 – 5** hGH-Standards in absteigender Konzentration. **Probe 6** enthält hGH-haltiges Serum eines Kontrollprobanden, **Probe 7** rec. hGH-haltiges Serum eines GH-behandelten Probanden (Alle Seren immunpräzipitatorisch vorbehandelt).

In **A1 und A2** stellt der 1. Antikörper eine Kombination aus mAk 7B11 und 7D5 dar, in **B1 und B2** wird nur mAk 7B11 verwendet (insgesamte Ak-Menge identisch).

Die 22 kD-Bande (**a**) ist in allen 4 Blots in **Probe 1 und 2** zu sehen. Die 20 kD-Bande (**b**) kann man in **Probe 2** auf **A1, B1 und B2** erkennen, in **Probe 1** ist sie mglw. durch eine 22 kD-Bande überlagert. 17 kD-Banden (**c**) sind nur in **B1 und B2** in **Probe 1** zu erkennen.

Ähnliche Resultate sind mit der Kombination aus mAk 7B11+7D5 und mAk 7B11 alleine zu erzielen. Die 17 kD-Bande ist nur durch größere Menge an 7B11 erkennbar.

(Protokoll 3.1.6.)

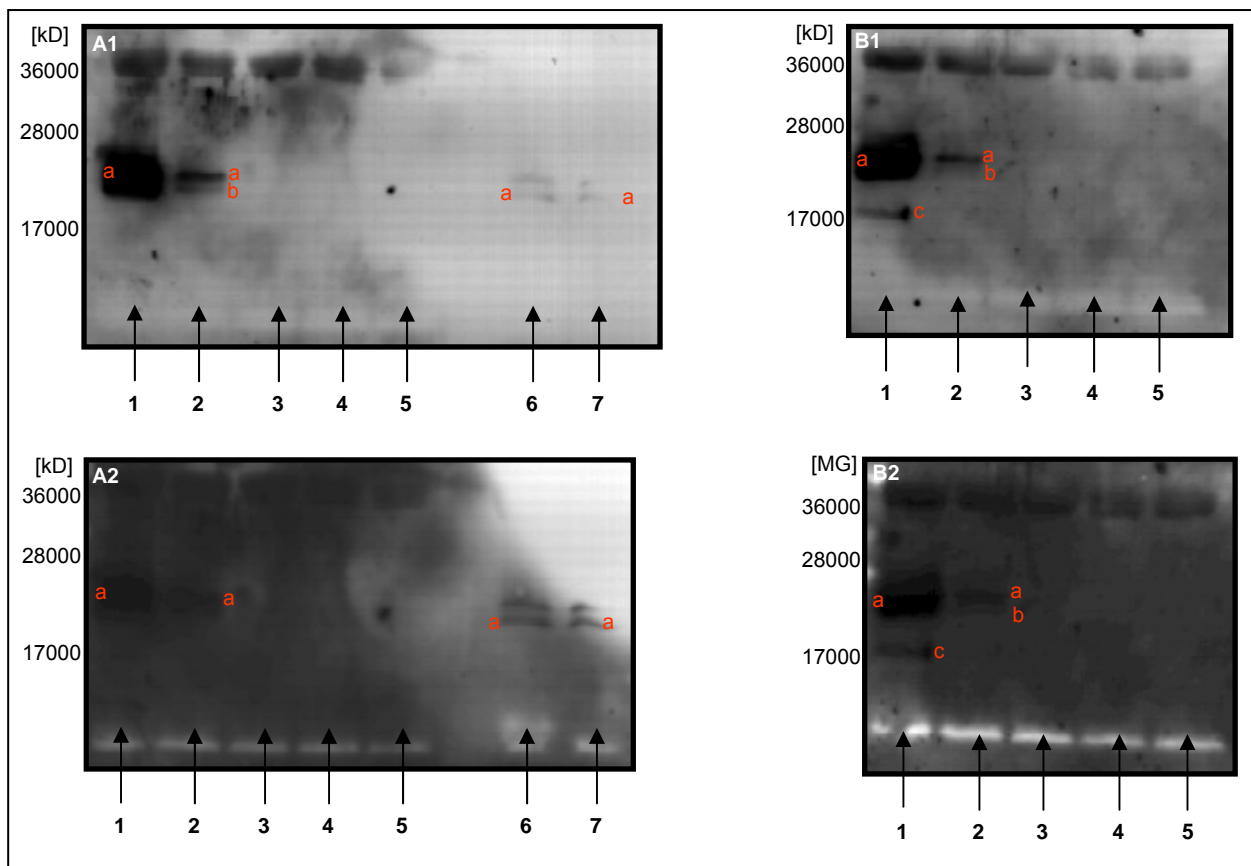


Abb. 8

1 – 5: hGH-Standards, **6:** hGH-haltiges Serum, **7:** rec hGH-haltiges Serum

A1/A2: anti-hGH mAk 7B11 + 7D5, **B1/B2:** anti-hGH mAk 7B11

3.2. Selektion enzymkonjugierter Antikörper gegen 1. Antikörper

In folgenden Telexperimenten werden verschiedene enzymkonjugierte Antikörper auf ihre Affinität zum 1. Antikörper und ihre Fähigkeit ein möglichst intensives Signal bei niedrigem Hintergrund zu produzieren, untersucht.

Auf den in **Abb. 1** dargestellten Western Blots enthalten die **Proben 1 – 5** und **7 - 9** hGH-Standards in verschiedenen Konzentrationen. **Probe 6** und **10** Serum eines Akromegaliepatienten, in welchem zuvor hGH-Proteine durch Immunpräzipitation isoliert wurden.

In Blot **A** wird als 1. Antikörper ein biotinylierter mAk (7B11-b), als 2. Antikörper Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Stav-POD) eingesetzt.

In Blot **B** als 1. Antikörper ein wie in **A** identischer mAk, allerdings nicht biotinyliert (7B11), als 2. Antikörper ein Meerrettichperoxidase-konjugierter anti-Maus Antikörper (aus Schafserum) (SaM-MRP) benutzt.

Insgesamt sind die Signale mit SaM-MRP als 2. Antikörper stärker als mit Stav-POD. Bei den Standardproben erkennt man in **A** nur bei der höchsten Standard-hGH-Konzentration (**3**) 22-kD-hGH (**a**), sowie sehr schwach 24-kD-hGH (**b**). Im Gegensatz dazu ist auf dem in **B** abgebildeten Blot 22 kD-hGH (**a**) auch in niedrigeren Konzentrationen zu erkennen (**7 und 8**). 24-kD-hGH (**b**) sogar eine Verdünnungsstufe weiter in **9**. Zusätzlich erkennt man 17-kD-hGH (**c**) in **7**.

Auch bei den Serumproben werden mit SaM-MRP im Western-Blot mehr Wachstumshormon und mehrere Isoformen dargestellt, als mit Stav-POD. So sind bei der Serumprobe in **A** (**6**) 24-(**d**), 22-(**c**) und 36-kD-hGH (**e**) zu erkennen. In **B** (**10**) ist jedoch ein großer hGH-Komplex zwischen 22 und 24 kD (**d**), 20 kD-hGH (**e**), sowie eine signalreiche Bande bei 12 kD (**f**) erkennbar.

Zusammenfassend scheint beim Vergleich Stav-POD / SaM-MRP letzterer deutliche Vorteile als 2. Antikörper bei der Detektion von hGH-Isoformen im Western-Blot zu besitzen.

(Protokoll 3.2.1.)

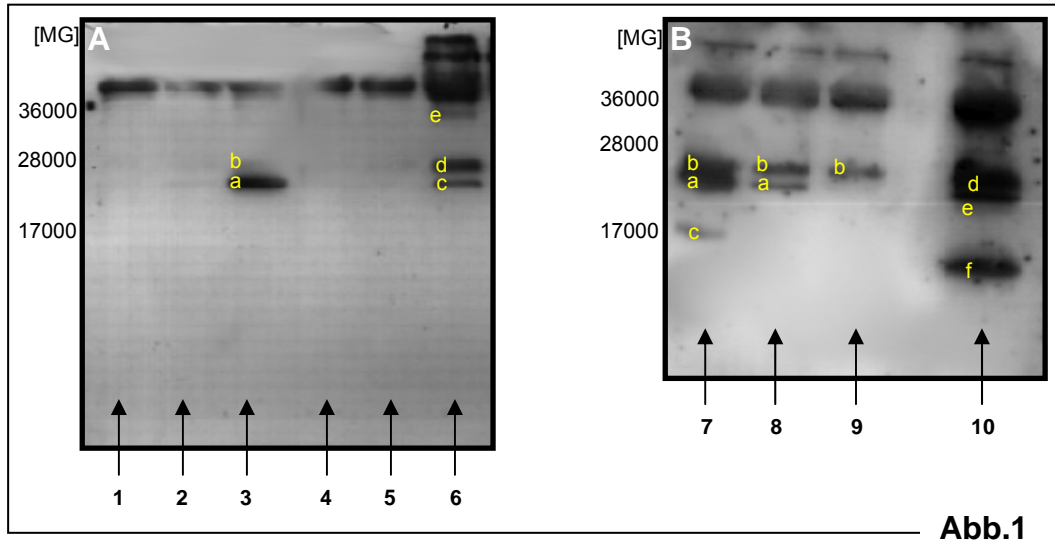


Abb.1

1 – 5 / 7 - 9: hGH-Standards, 6 / 10: hGH-haltiges Serum

A: anti-hGH mAk 7B11-b / Stav-POD, B: anti-hGH mAk 7B11 / SaM-MRP

In einem weiteren Experiment (**Abb. 2**) wird die Menge an 2. Antikörper (SaM-MRP) analysiert, welche notwendig ist, um einerseits eine ausreichend starke Signalgebung von detektierten Wachstumshormonen zu bekommen, andererseits unspezifische Hintergrundsignale möglichst gering zu halten.

Zusätzlich werden die im Detektions-Kit mitgelieferten Antikörper mit separat erworbenen Antikörpern verglichen.

Die **Proben 1 – 3** enthalten hGH Standards in abnehmender Konzentration, die **Proben 4** und **5** immunpräzipitiertes Serum von einem Akromegaliepatienten, die **Proben 6** und **7** immunpräzipitiertes Serum von einem Kontrollprobanden ohne hGH. Die Blots **A** und **B** wurden mit jeweils 3,33 µg SaM-MRP, die Blots **C** sowie **D** mit jeweils 2 µg SaM-MRP inkubiert.

Die Antikörper der Blots **A** und **C** sind käuflich erworben, diejenigen der Blots **B** und **D** entstammen dem ECL-Detektionskit.

Deutliche Unterschiede sind bei den Western-Blots in den **Proben 1 – 4** nicht zu erkennen. Die 22 kD-Bande (**a**) ist bei allen hGH Standards der höchsten Konzentration (**1**) zu erkennen. Allerdings ist in **C** auch bei kleinerer Standard-hGH-Konzentration (**2**) eine 22 kD-Bande zu erkennen (**a**). Eine 24 kD-Bande (**b**) ist bei den Standardproben höchster Konzentration (**1**) in allen Blots und bei den nächstkleineren Konzentrationen in **B** und **C** zu sehen.

Bei den immunpräzipitierten Seren (**4 – 7**) sind die Signale der 22 kD-Banden in **4** und **5** schwach bis nicht sichtbar, wobei diese in **B** und **C** etwas deutlicher hervortreten. Aufgrund der Tatsache, dass 24 (**b**) – und ca. 12 kD-Banden (**c**) in den **Proben 4 – 7** auftreten, kann man hier von nicht-hGH-spezifischen Signalen ausgehen.

Insgesamt erhält man im Vergleich mit den mitgelieferten Antikörpern und gekauften SaM-MRP Antikörpern eine minimal verbesserte Signalstärke.

Bei Verwendung von 2 µg 2. Antikörper lassen sich hGH-typische Bandensignale genauso gut erkennen wie mit 3,33 µg. Zusätzlich können durch Verwendung geringerer Mengen an 2. Antikörper unspezifische Hintergrundsignale minimiert werden.

(Protokoll 3.2.2.)

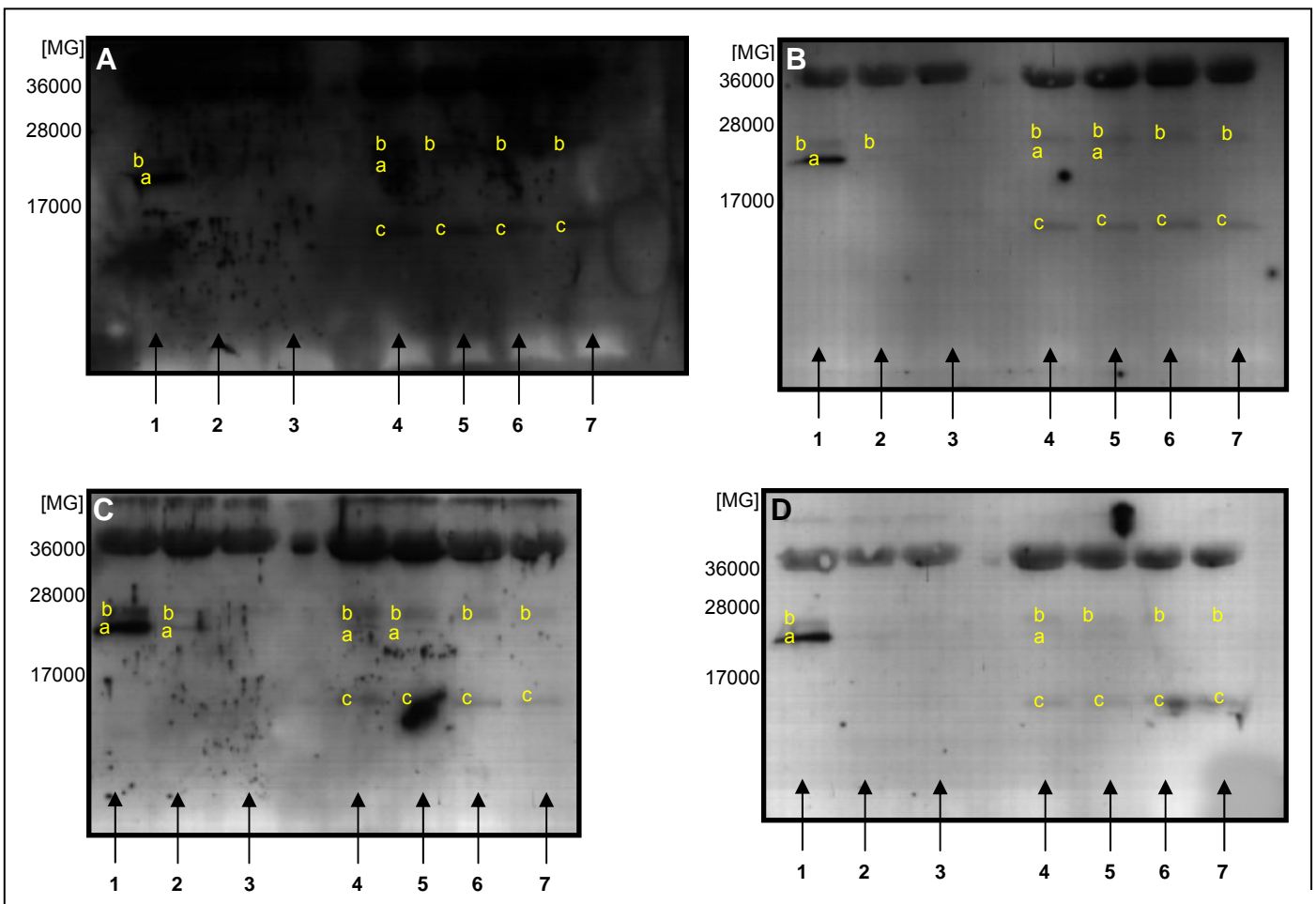


Abb. 2

1–3: hGH-Standards, **4/5:** hGH-haltiges Serum, **6/7:** hGH-freies Serum

A/B: 3,33 µg 2.Ak, **C/D:** 2,0 µg 2.Ak

3.3. Versuche zur Optimierung der hGH-Immünpräzipitation

In weiteren Experimenten werden Bedingungen geschaffen, die es ermöglichen, mit möglichst geringen Mengen an zu untersuchendem Serum auszukommen. Hierzu wurde das Verfahren der Immunpräzipitation eingeführt und im weiteren Verlauf optimiert.

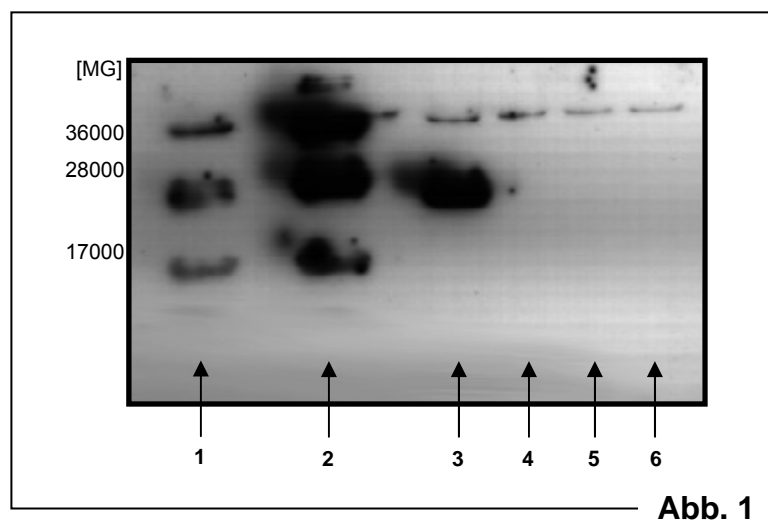
In **Abb. 1** ist ein Western Blot dargestellt, in dem untersucht wird, ob eine Immunpräzipitierung von Wachstumshormon mit poly- oder monoklonalen Antikörpern zu besseren Ergebnissen führt.

Hierbei werden jeweils zwei identische Serumproben mit verschiedenen Ak inkubiert: In **Probe 1** die Serumprobe eines Akromegaliepatienten mit monoklonalen Aks / Maus, biotinyliert (mMaGH-b). In **Probe 2** die Serumprobe eines Akromegaliepatienten mit polyklonalen Aks / Kaninchen, biotinyliert (pKaGH-b). Die **Proben 3 – 6** enthalten hGH-Standards in abnehmender Konzentration.

Bei der Immunpräzipitierung ist die hGH-Affinität der polyklonalen Antikörper (**2**) höher als bei den monoklonalen Antikörpern (**1**).

Offenbar können hGH-Isoformen bei Einsatz von polyklonalen Antikörpern besser isoliert und angereichert werden.

(Protokoll 3.3.1.)



- 1:** hGH-haltiges Serum, Immunpräzipitation mit monoklonalen anti hGH-Ak,
2: hGH-haltiges Serum, Immunpräzipitation mit polyklonalen anti hGH-Ak,
3-6: hGH-Standards

In **Abb. 2** sind vier Western Blots abgebildet, bei denen die Menge benötigter paramagnetischer Beads und polyklonaler Antikörper untersucht wird, um hGH-Isoformen optimal zu präzipitieren.

Die **Proben 1 – 3** enthalten hGH-Standards in abnehmender Konzentration.

Probe 4 enthält jeweils Serum eines Akromegaliepatienten und **Probe 5** hGH-freies Serum eines rec hGH-behandelten Patienten.

In **Blot A** wird mit 50 µl streptavidinbeschichteten paramagnetischen Beads und 2 µg polyklonalen biotinylierten Antikörpern aus Kaninchenserum (pKaGH-b) präzipitiert, **Blot B** mit 50 µg Beads und 4 µg Ak, **Blot C** mit 200 µl Beads sowie 2 µg Ak und **Blot D** mit 200 µl Beads plus 4 µg Ak.

Differenzierte Bandenstrukturen erkennt man hauptsächlich in den **Blots A** und **B**, bei denen 50 µl Beads verwendet wurden – etwas weniger differenziert bei den **Blots C** und **D** mit 200 µl Beads.

Prinzipiell sind alle Bandenstrukturen in gleicher Deutlichkeit und Verteilung vorhanden. In **A** und **B** zeigen sich jedoch geringere Hintergrundsignale.

Eine Verdopplung der Menge an präzipitierenden Antikörpern (**A/C**: 2 µg, **B/D**: 4 µg) hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Aussagekraft des Blots.

(Protokoll 3.3.2)

Eine Steigerung der Menge an paramagnetischen Beads führt zu keiner nennenswerten Erhöhung der detektierten hGH-Moleküle, erhöht jedoch die unspezifischen Hintergrundsignale. Ebenso wird keine Verbesserung der Signaldetektion mittels Zunahme der verwendeten präzipitierenden Antikörpern erreicht.

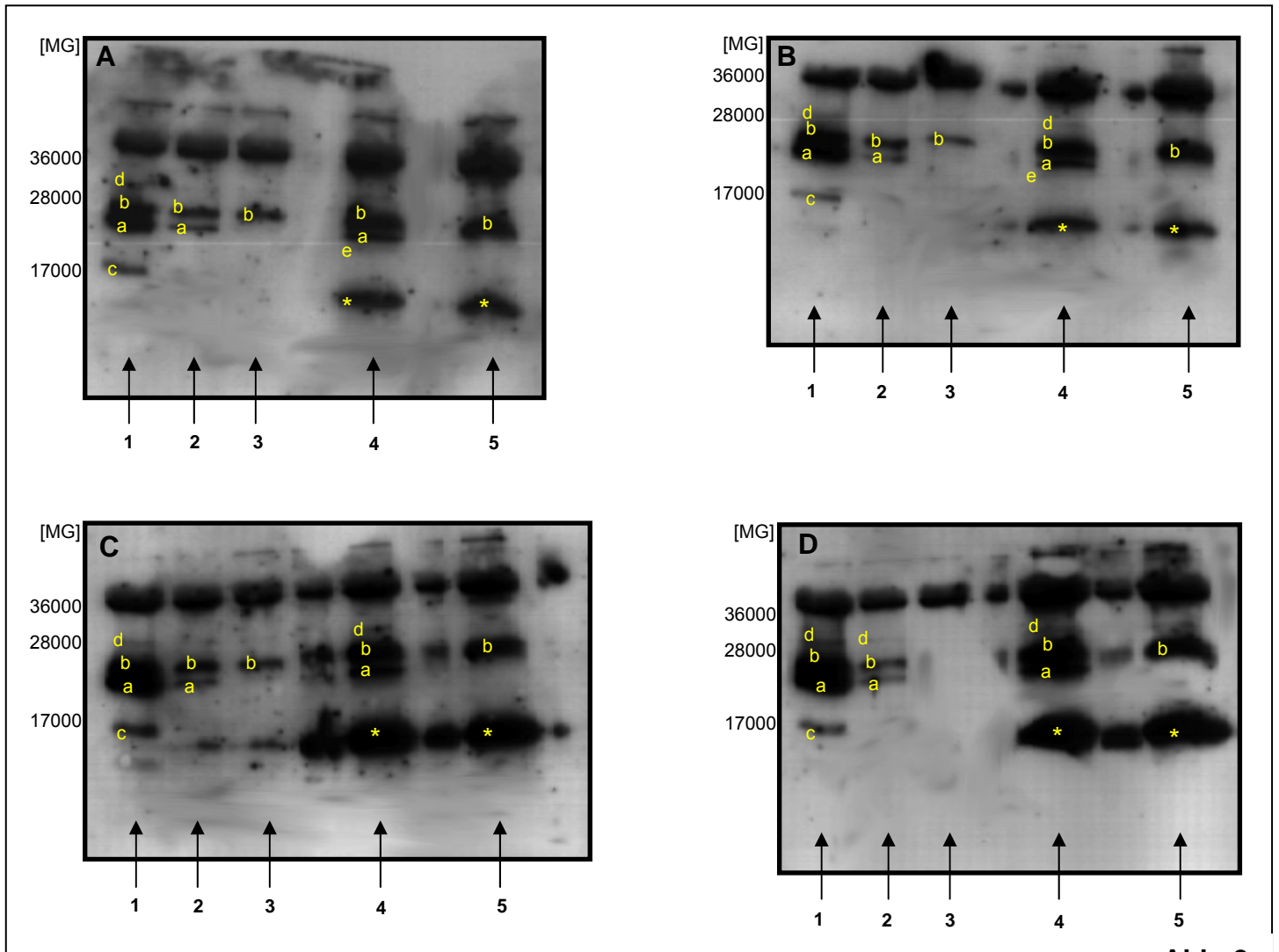


Abb. 2

1-3: hGH-Standards, 4:hGH-haltiges Serum, 5: rec hGH-haltiges Serum

A: 50 μ l Beads/2 μ g Ak, B: 50 μ l Beads/4 μ g Ak, C: 200 μ l Beads/2 μ g Ak, D: 200 μ l Beads/4 μ g Ak

In **Abb. 3** sind zwei Western Blots dargestellt. Im Rahmen des Präzipitationsverfahrens wird bei ihnen die Reihenfolge der Inkubationsschritte und -zeiten variiert. Zusätzlich werden die Proben mit reduzierendem Probenpuffer (**A**) sowie nichtreduzierendem Probenpuffer (**B**) für den Western-Blot vorbereitet.

Die **Proben 1 – 4** stammen von einem Akromegaliepatienten und werden wie folgt immunpräzipitiert:

Probennummer	Inkubationsschritte	Dauer (h)
1	(1) Ak + Serum	3
	(2) Ak-Proteinkomplex + Bead	1
2	(1) Ak + Serum	1
	(2) Ak-Proteinkomplex + Bead	1
3	(1) Ak + Bead	1
	(2) Ak-Beadkomplex + Serum	3
4	(1) Ak + Bead	1
	(2) Ak-Beadkomplex + Serum	1

Die **Proben 5 – 9** enthalten hGH-Standards in verschiedenen Konzentrationen.

Die 22 kD-Bande (**a**), sowie eine 24 kD- Bande (**b**) sind in **Probe 2** am deutlichsten zu sehen. Auch eine 36 kD-Bande (**c**) erscheint in **Probe 2** deutlicher als in den übrigen Proben. Allerdings kommen unspezifische Banden (**d**) ebenfalls deutlicher in **2** zum Vorschein.

Die reduzierten Proben (**A**) weisen deutlich bessere Ergebnisse auf, als die nicht-reduzierten Proben (**B**), bei denen beinahe keine hGH-typischen Bandenstrukturen zu erkennen sind.

(Protokoll 3.3.3.)

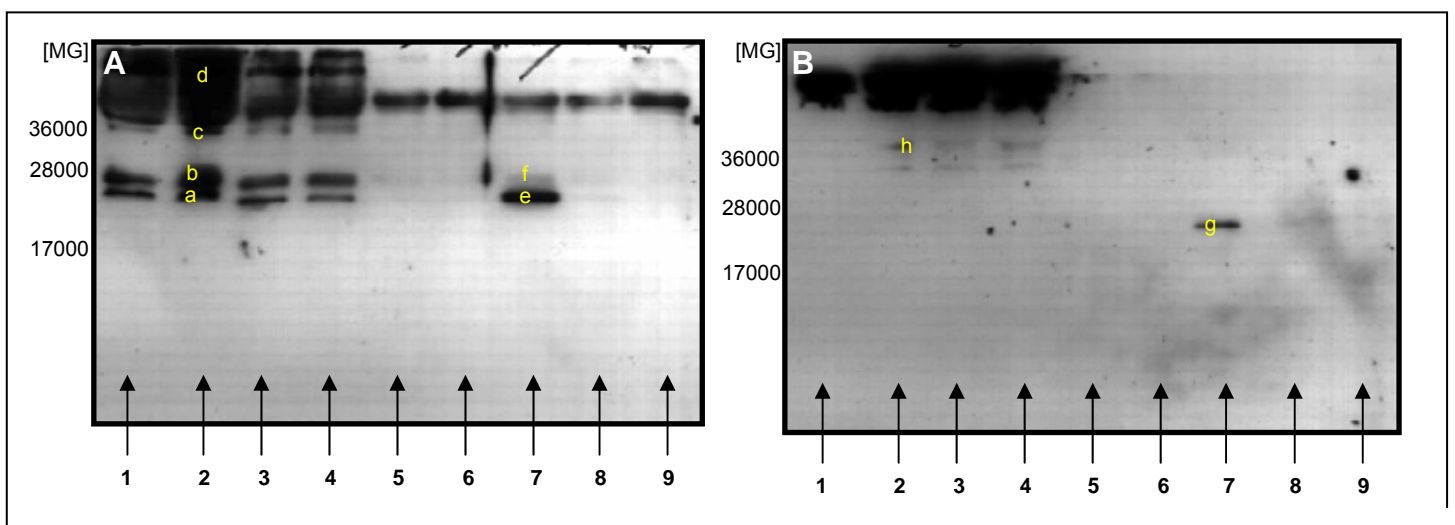


Abb. 3

1/2: Ak-Serum (3/1) +Bead (1), **3/4:** Ak-Bead (1/3) + Serum (1), **5-9:** hGH-Standards

A: reduziert, **B:** nicht-reduziert

3.4. Unterschiede zwischen reduzierten und nicht-reduzierten Proben

Durch Probenaufbereitung mittels reduzierendem bzw. nicht-reduzierendem Probenpuffer werden die hGH-Moleküle unterschiedlich entfaltet und dadurch verschiedene Epitope für verschiedene Antikörper zugänglich gemacht.

Um diese Bedingungen bzgl. der Erkennbarkeit von Isoformen zu vergleichen, werden in folgenden abgebildeten Versuchen die Standard- und Serumproben vor ihrer Separierung in der Gelelektrophorese mit reduzierendem bzw. nicht-reduzierendem Puffer behandelt:

In **Abb. 1 und 2** enthalten die **Proben 1 – 5** jeweils hGH-Standards in abnehmender Konzentration in **Abb. 2** zusätzlich immunpräzipitiertes Serum eines Akromegaliepatienten (**6 und 7**)

In beiden Abbildungen werden die Proben der Western Blots in **A** mit reduzierendem Probenpuffer behandelt, sowie in **B** mit Probenpuffer ohne reduzierende Eigenschaften.

In **Abb. 1** ist in **A** bei den reduzierten Proben die 22 kD-Bande (**a**) noch in der vorletzten Probe (**4**) mit einem Gesamt-hGH-Gehalt von 10 pg zu sehen. Ferner sind bei höchster hGH-Konzentration Banden bei 36 kD (**b**) und andeutungsweise bei 20 kD (**c**) zu erkennen.

Bei den nicht-reduzierten Proben (**B**) wirkt die Auftrennung der einzelnen Banden insgesamt weniger deutlich. Die 22 kD-Bande ist nur in den ersten 3 Proben zu erkennen. Allerdings ist eine 36 kD-Bande bis in die dritte Probe zu sehen.

(Protokoll 3.4.1.)

In **Abb. 2** ist die 22 kD-Bande (**a**) in den ersten beiden Proben (**1 und 2**) sowie allen Serumproben (**6 und 7**) zu erkennen. Die 20 kD-Bande (**b**) nur bei **A** in **1** und **7**. Die 36 kD-Bande (**c**) wiederum bei **A** deutlich und **B** fraglich, in **1** und den Serumproben (**6 und 7**). Unspezifische Banden (*) sind in **A** bei allen Proben, in **B** nur bei den Serumproben zu erkennen.

Die gelelektrophoretische Auftrennung ist mit reduzierendem Puffer (**A**) deutlich ausgeprägter als mit nicht-reduzierendem Puffer (**B**)

(Protokoll 3.4.2)

Insgesamt erreicht man mit reduzierendem Puffer im Western Blot eine bessere Sensitivität und damit mehr Bandensignale als mit nicht-reduzierendem Puffer. Zusätzlich werden einzelne Banden mit reduzierendem Puffer elektrophoretisch besser aufgetrennt.

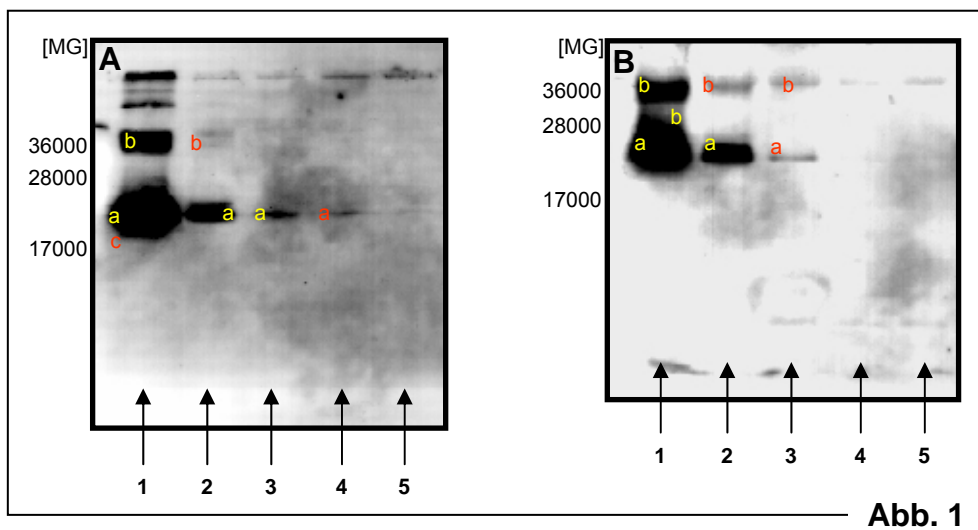


Abb. 1

1-5: hGH-Standards

A: reduziert, B: nicht-reduziert

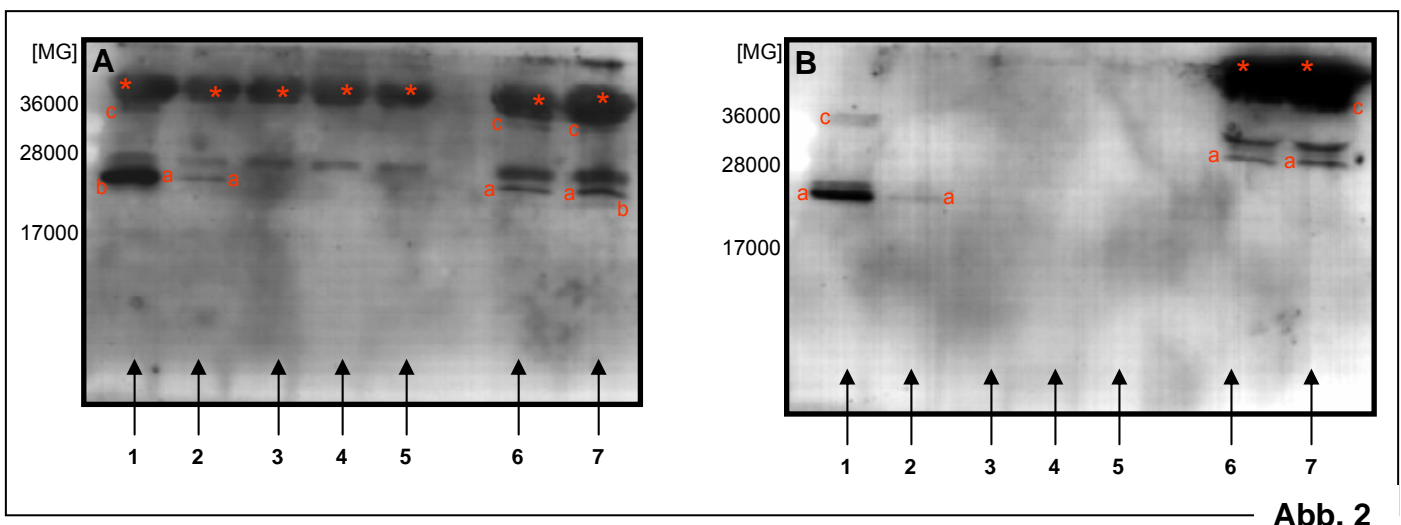


Abb. 2

1-5: hGH-Standards, 6/7: hGH-haltiges Serum

A: reduziert, B: nicht-reduziert

3.5. Optimierung der Signaldetektion – Vergleich verschiedener Chemielumineszenz-Systeme

Im Folgenden werden verschiedene Produkte zur Signalgenerierung mittels 'enzymatischer Chemielumineszenz' miteinander verglichen.

Zusätzlich wird in diesem Kapitel die Signaldetektion durch einen speziellen Scanner der herkömmlichen Filmbelichtung gegenübergestellt.

Abb. 1 zeigt zwei Western Blots, deren **Proben 1 – 5** hGH-Standards in abnehmender Konzentration enthalten.

Abb. 2 enthält zwei Blots mit hGH-Standards in den **Proben 1** und **2**, hGH-freies Serum in **Probe 3** und Serum eines Akromegaliepatienten in **Probe 4** (Serum zuvor immunpräzipitiert).

Bei dem in **Abb. 1** dargestellten Versuch erfolgt die Signaldetektion in **Blot A** (links) mittels Chemielumineszenz-Detektionskit von *Pierce* (Super Signal[®], West Femto) in **Blot B** (rechts) durch einen Kit von *Amersham* (Enhanced Chemiluminescence Kit – ECL).

Bei den Blots in **Abb. 2** erfolgt die Signaldetektion links (**A**) mittels bereits erwähntem *Amersham*-Kit (Enhanced Chemielumineszenz – ECL) und rechts (**B**) durch einen Detektions-Kit von *Roche Diagnostics Corp.* (Lumi-Light-Plus, Western Blotting Kit (Maus / Kaninchen)).

In **Abb. 1** ist das Ergebnis deutlich: Mit dem *Amersham-Kit* (**B**) ist die Detektion von 22- (**a**), 20- (**b**) und 36 kD-Banden (**c**) sehr klar zu erkennen. Mit dem *Pierce-Kit* (**A**) ist hingegen nur eine sehr zarte 22 kD-Bande (**a**) bei größter hGH-Konzentration (**1**) sichtbar. In **Abb. 2** sind auf den beiden Western Blots (**A** und **B**) beinahe identische Bandenmuster zu erkennen: 22 kD-Bande (**a**) in **1** und **2**, 20 kD-Bande (**b**) in **1**, 17 kD-Bande (**c**) in **1**. Bei den Serumproben gibt es eine 22 (**a**), 20 (**b**) sowie 17 kD-Bande (**c**) in **4**. Bandenanzahl und Signalstärke sind bei beiden Blots annähernd gleich.

Zusammenfassend eignen sich die Detektionssysteme von *Amersham* und *Roche* gleichermaßen. Die Detektionsmöglichkeiten mit dem *Pierce-Kit* waren im Vergleich dazu ungenügend.

(Protokolle 3.5.1 und 3.5.2)

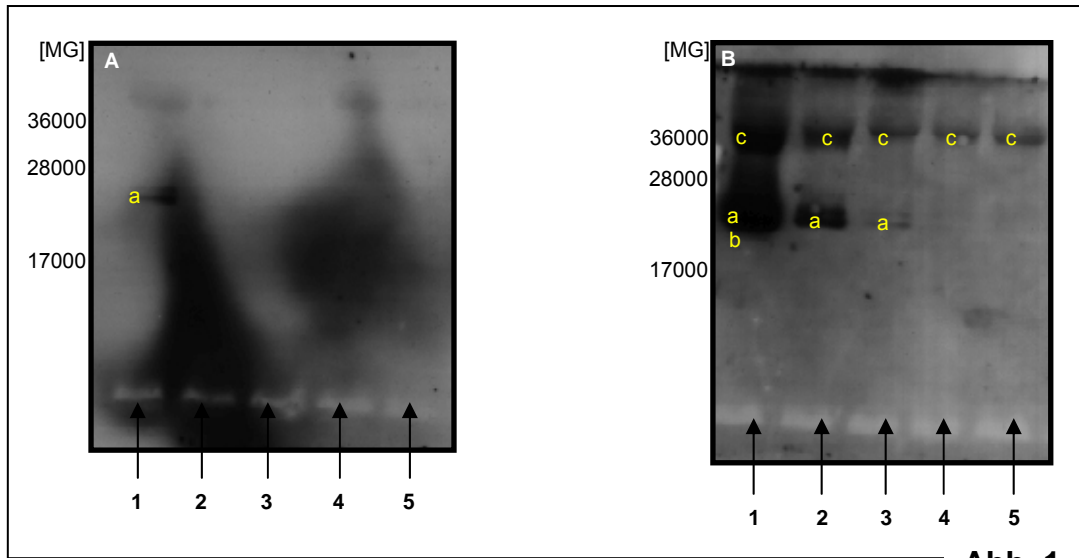


Abb. 1

1-5: hGH-Standards, 6/7: hGH-haltiges Serum

A: Pierce-Kit, B: Amersham-Kit

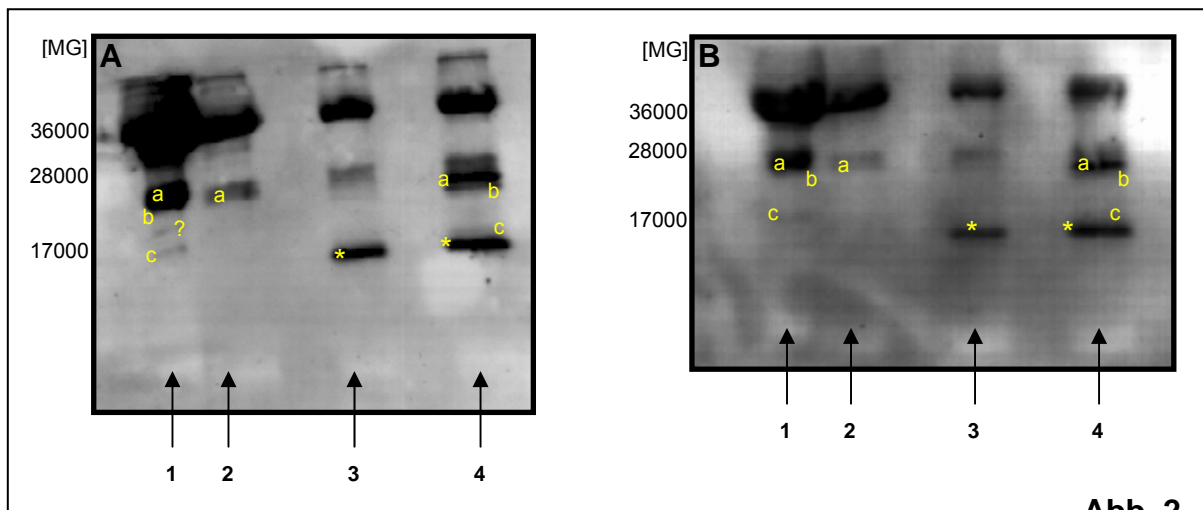


Abb. 2

1/2: hGH-Standards 3: hGH-freies Serum, 4: hGH-haltiges Serum

A: Amersham-Kit, B: Roche-Kit

In einem weiteren Versuch (**Abb. 3**) werden verschiedene Detektionsmedien miteinander verglichen: Chemielumineszenz-spezifisches Filmmaterial (Hyperfilm-ECL, Amersham) (**A**) versus Chemielumineszenz-spezifischer Scanner mit digitaler Verarbeitungssoftware (*Typhoon 8600*, Amersham) (**B**).

Die **Proben 1 – 5** enthalten bei den Blots in **Abb. 3** hGH-Standards in abnehmender Konzentration, die **Proben 6 und 7** bestehen aus immunpräzipitiertem Serum eines Akromegaliepatienten.

Blot A besitzt in mehreren Proben deutliche Bandenkomplexe zwischen 20 und 24 kD (**a**) und 17 kD-Bande (**b**) in **1** sowie 22 kD-Bande (**c**) in **2**. Die Serumproben (**6** und **7**) zeigen deutliche Bandenkomplexe zwischen 24 und 20 kD (**a**) sowie jeweils eine 17 kD-Bande (**b**). **Blot B** zeigt in **1** eine deutliche 22 kD-Bande (**c**) sowie eine fragliche 24 kD-Bande (**d**). Auch in **2** und bei den Serumproben (**6 und 7**) sind schwache 22 kD-Banden (**c**) zu erkennen.

Die Signaldetektion mittels Film (**A**) führt zu stärkeren Banden, aber auch ausgeprägteren Hintergrundsignalen als beim Scanner (**B**). Trotzdem sind Bandenanzahl und Bandendeutlichkeit auf den entwickelten Filmen aussagekräftiger als im digitalen Bild.

Mit der bisher angewandten Methode kann der Scanner das Filmmaterial nicht ersetzen.

(Protokoll 3.5.3.)

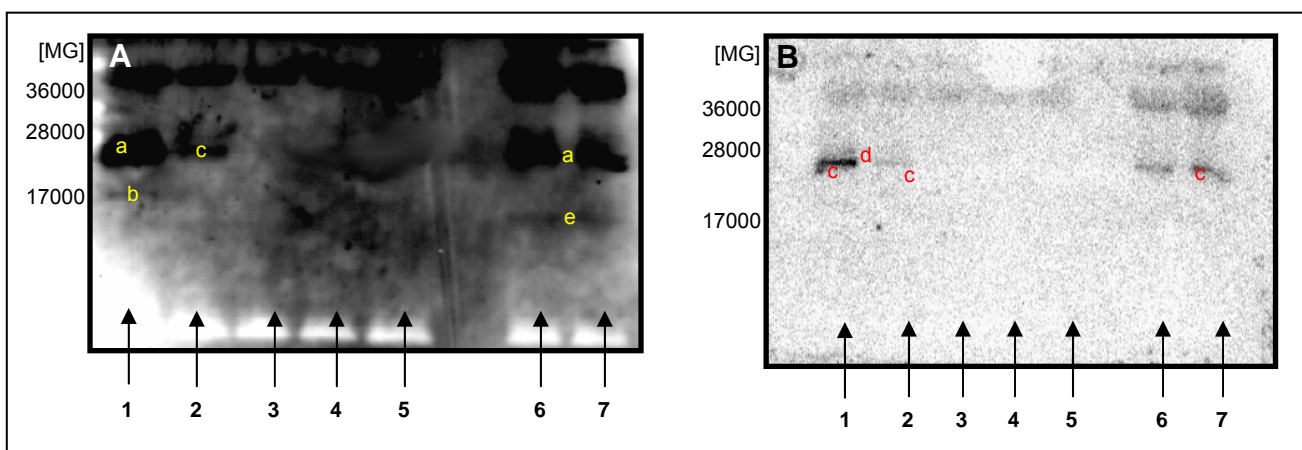


Abb. 3

1-5: hGH-Standards, **6/7:** hGH-Serum

A: Analog-Film, **B:** Digital-Scanner

3.6. Repräsentative Testergebnisse

Der Inhalt vorangegangener Kapitel beschäftigte sich mit der Optimierung einzelner Abschnitte eines zusammenhängenden mehrstufigen Experiments.

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse von Versuchen beschrieben, bei denen mit den im ersten Teil erarbeiteten optimalen Teilprotokollen nun Unterschiede der hGH-Isoformenkomposition in Proben von Athleten und Probanden im Western Blot dargestellt werden.

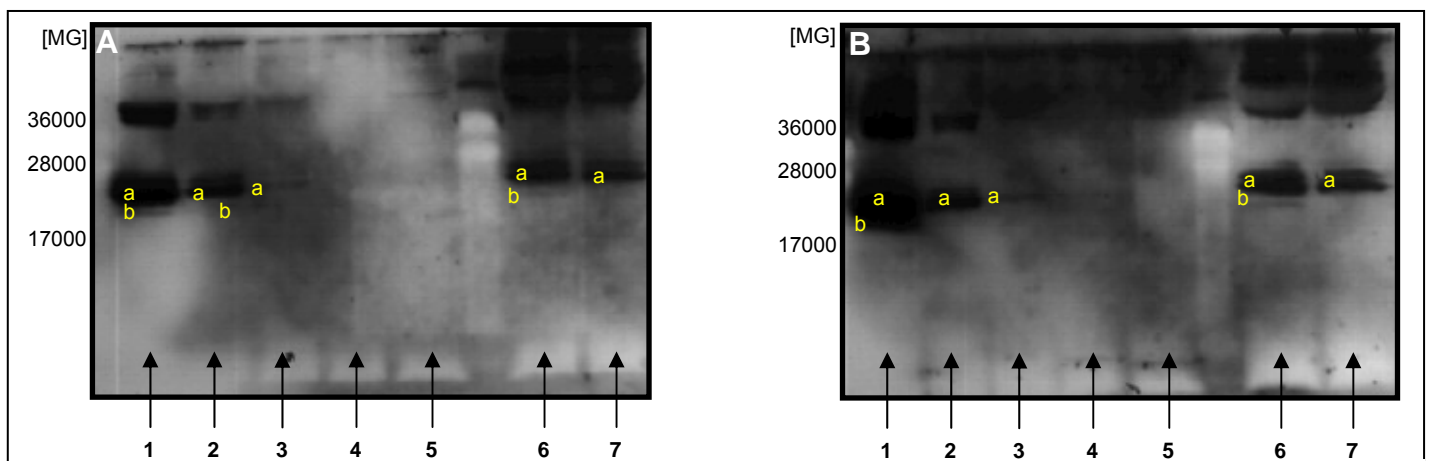
In **Abb. 1** enthalten die **Proben 1 – 5** jeweils hGH-Standards in abnehmender Konzentration. Die **Proben 6** enthalten zuvor immunpräzipitiertes Serum eines Akromegaliepatienten, die **Proben 7** immunpräzipitiertes Serum eines hGH-substituierten Patienten.

Während bei den ersten hGH-Standards in **Probe 1** und **2** jeweils typische hGH-Bandenmuster im 22 kD-(**a**) und 20 kD-Bereich (**b**) zu sehen sind, kann man diese Muster auch bei den Serumproben des Akromegaliepatienten in **Probe 6** erkennen.

Die Serumprobe des hGH-behandelten Probanden (**7**) weist nur eine deutliche 22 kD-Bande (**a**) auf.

Aufgrund des Fehlens der 20 kD-Bande in der Probe des hGH-behandelten Probanden (**7**), kann mittels Western Blot unterschieden werden, ob hGH-Unterbanden vorhanden sind oder nicht. Hohe hGH-Spiegel in den Proben, hervorgerufen durch rekombinantes 22kD-hGH, können damit von natürlichen hGH-Spiegeln unterschieden werden. Letztere zeigen mehrere Banden.

(Protokoll 3.6.1.)



1-5: hGH-Standards, 6: hGH-haltigesSerum, 7: rec hGH-haltigesSerum

Abb. 1

In **Abb. 2** enthalten die **Proben 1** jeweils hGH-freies, immunpräzipitiertes Serum, die **Proben 2** immunpräzipitiertes Serum von hGH-behandelten Athleten und die **Proben 3** immunpräzipitiertes Serum von Akromegaliepatienten. Die **Proben 4** und **5** bestehen aus hGH-Standards in abnehmender Konzentration.

In allen hGH-enthaltenden Serumproben ist die 22 kD-Bande (**a**) zu erkennen. Die 20 kD-Bande (**b**) ist bei den Serumproben der Akromegaliepatienten (**3**) in **A** und **B** fraglich und in **C** deutlicher zu sehen. Weitere Banden im 36 kD-Bereich (*) könnten aufgrund ihres Erscheinens in sämtlichen Serumproben als unspezifisch gedeutet werden.

(Protokoll 3.6.2.)

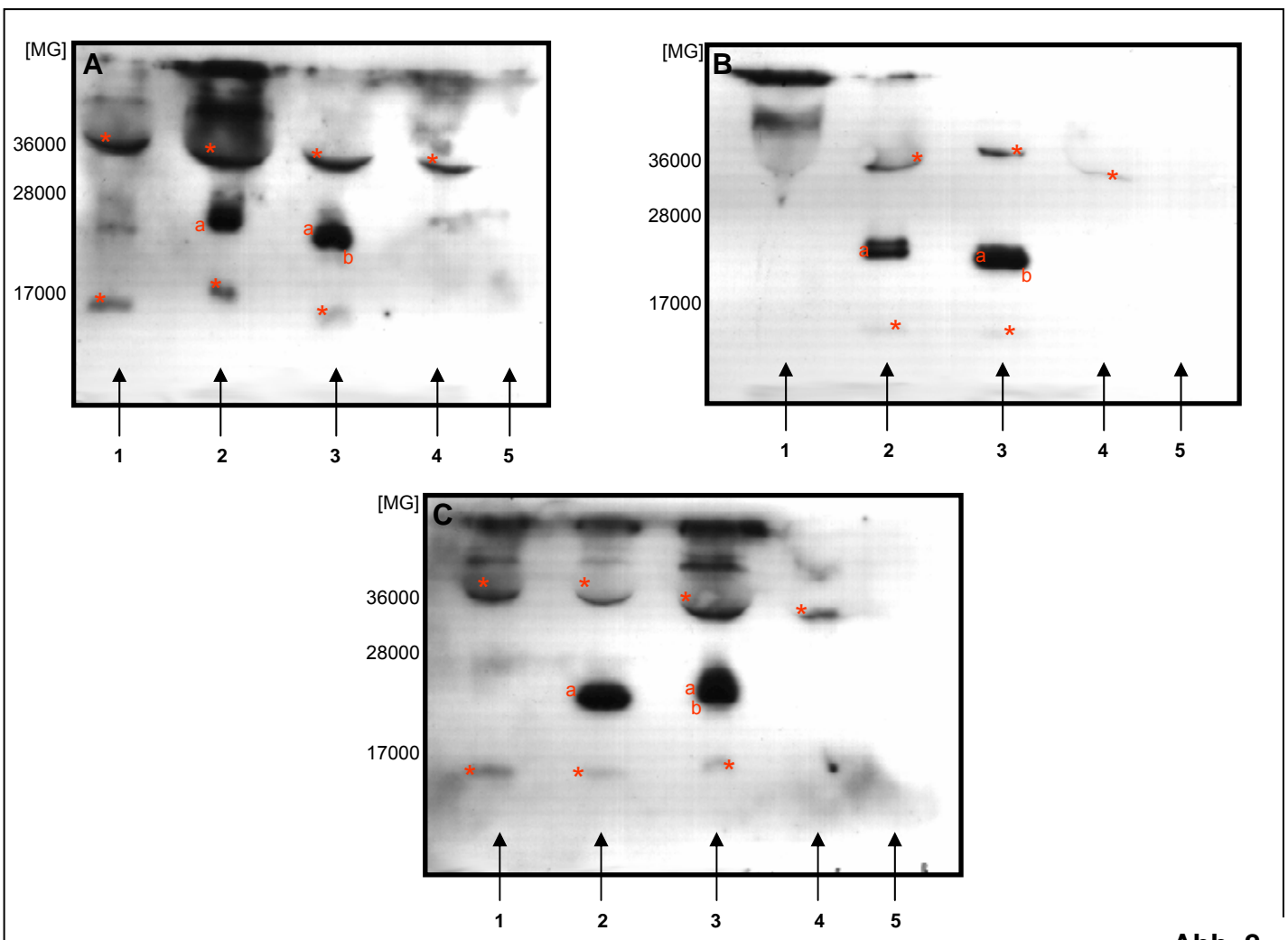


Abb. 2

1: hGH-freies Serum, 2: rec hGH-Serum, 3:hGH-Serum, 4/5: hGH-Standards

Abb. 3 zeigt einen zweigeteilten Western Blot mit immunpräzipitierten Seren hGH-behandelter Athleten in den **Proben 1** sowie **6, 7 und 8**; mit immunpräzipitierten Seren von Akromegaliepatienten in den **Proben 2, 3, 4** und **9, 10, 11** sowie immunpräzipitierte hGH-freie Seren in den **Proben 5** und **12**.

Die 22 kD-Bande (**a**) ist in allen hGH-enthaltenden Proben (**1, 2, 3, 4** und **6, 7, 8, 9, 10, 11**) sichtbar. Eine 17 kD-Bande (**b**) sieht man nur bei den Seren von Akromegaliepatienten (**2, 3, 4** und **9, 10, 11**). 36 kD-Banden (**c**) sind in allen 12 Proben sichtbar, allerdings nur bei den Akromegalen-Seren deutlich ausgeprägt.

Die Differenzierung zwischen einem natürlich hervorgerufenen hGH-Serumspiegel und einem exogen provozierten Spiegel sind mit dieser Methode anhand verschiedener Bandenmuster möglich.

Das Fehlen der 17 kD-Bande in den Proben der hGH-behandelten Athleten, sowie eine weitaus schwächere 36 kD-Bande sind eindeutig. Das Fehlen einer 20 kD-Bande kann nicht bewiesen werden. Da diese aber in sämtlichen hGH-enthaltenden Proben fehlt, kann man bei den Akromegalenproben von einem Überlappen durch die 22 kD-Bande ausgehen.

(Protokoll 3.6.3.)

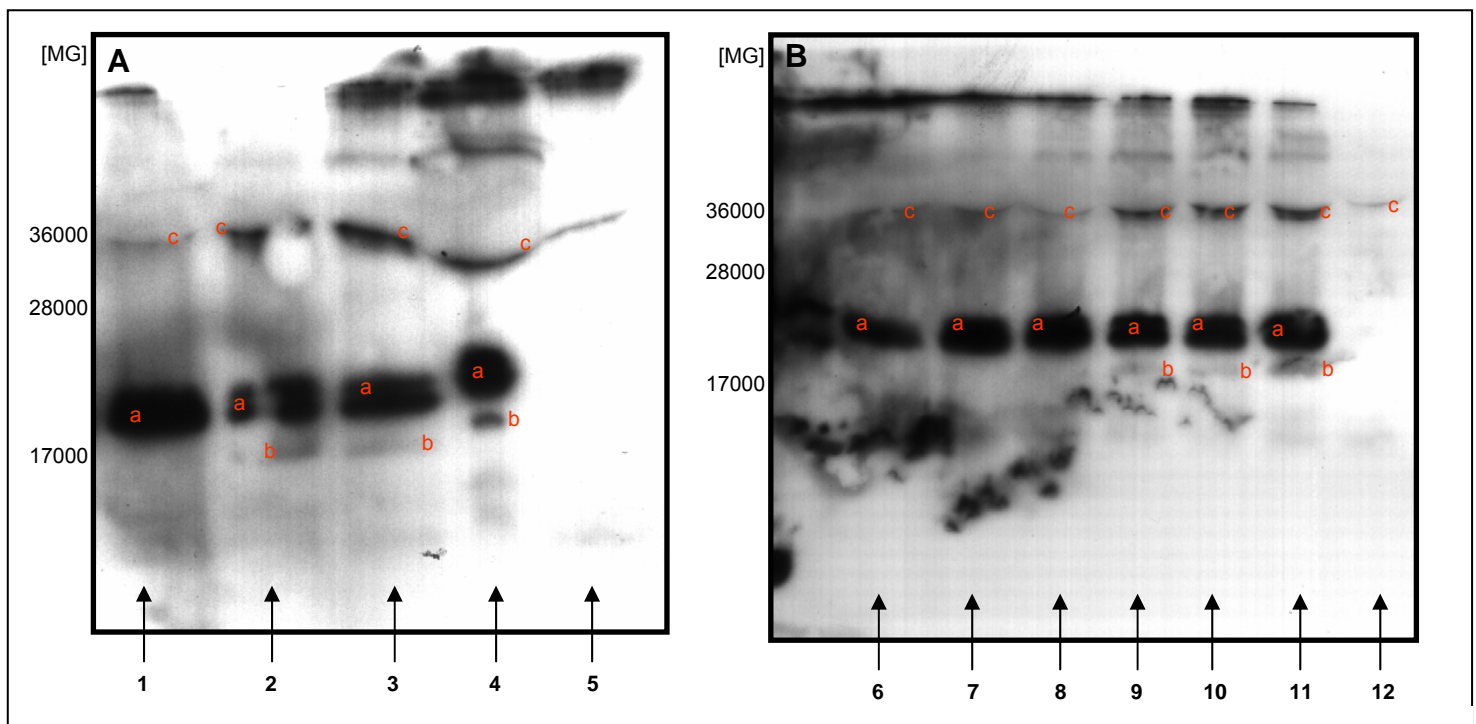


Abb. 3

1/6/7/8: rec. hGH-Serum, **2/3/4/9/10/11:** hGH-Serum, **5/12:** hGH-freies Serum

4. Diskussion

4.1. Konstanz beim Erscheinen von hGH-Isoformen

Proteinanalysen mittels Western Blot unterliegen wegen ihrer vielfältigen Arbeitsschritte immer der Gefahr von Verzerrungen.

Ferner werden in zahlreichen Veröffentlichungen, die sich mit hGH-Isoformen befassen, je nach Probenmaterial und Methode unterschiedliche hGH-Isoformen beschrieben.

Bereits vor einigen Jahren wurde dieses Problem von Reiter (84) und Chatelain (21) erkannt. Hierbei wurden verschiedene Radioimmunoassays bzw. Immunoassays, bei denen unterschiedliche Assaykit-Tracer jeweils unterschiedliche hGH-Isoformen detektierten, miteinander verglichen.

Erste Arbeiten, die sich mit dem Phänomen von hGH-Isoformen in humanem Serum beschäftigen und heute noch als Referenz zur Beschreibung von hGH-Isoformen im Serum gelten, beweisen ein konstantes Auftreten von 22, 20 sowie 30, 16 und 12 kD Isoformen. Auch hier geschahen die Analysen mittels Gelelektrophorese, jedoch nach zuvoriger Affinitätschromatographischer Trennung und unter Benutzung von bis zu 300 ml großen Serenvolumina (10).

In der hier vorgestellten Arbeit mag die Analyse kleinster Probenvolumina - im Gegensatz zu den von Bauman benutzten Serummengen - dazu führen, dass bei den verwendeten individuellen Kontrollprobanden-Seren nur dann hGH-Fragmente detektiert werden konnten, wenn diese in ausreichender Form in den kleinen Probenvolumina vorhanden waren.

Trotz enger Korrelationen zwischen den in den genannten Arbeiten und nun hier vorgestellten Ergebnissen, können zusätzliche Artefakte als mögliche hGH-Bandenmuster nicht ausgeschlossen werden: Die Verwendung von polyklonalen anti hGH-Seren im Rahmen der Immunpräzipitation und dadurch möglicherweise entstehende Kreuzreaktionen könnten hierfür ursächlich sein.

4.2. Selektion monoklonaler Antikörper gegen verschiedene hGH-Isoformen

Wie in **Abb. 1 und 2** dargestellt, werden die hGH-Isoformen von verschiedenen monoklonalen Antikörpern unterschiedlich stark detektiert. 7B11 scheint unter reduzierenden Bedingungen derjenige monoklonale Antikörper zu sein, welcher die beste Darstellung von Isoformen erlaubt. In der phGH-Probe erkennt man die dominierende 22 kD-Bande, dicht darunter die 20 kD-Bande und etwas entfernter eine 17 kD-Bande. Eine deutliche Bande im 36 kD-Bereich könnte einem Heterodimer entsprechen (30), jedoch lässt sich nicht ausschliessen, dass es sich um ein unspezifisches Artefakt handelt.

Mak 7B11 gehört zu den Antikörpern, die 20 kD-hGH am besten detektieren können. Durch die identische Vorbehandlung von phGH- und 20 kD-hGH-Standards wurde sichergestellt, dass alle dargestellten Banden bei phGH durch das Auftreten von hGH-Isoformen zustandekommen und keine Artefakte darstellen.

Bei den Serumproben erkennt man auch mit 7B11 eine schwache 22 kD-Bande. Erneut zeigt sich darüber eine Bande im 36 kD-Bereich, die entweder einem Heterodimer oder aber einer unspezifischen Reaktion des mAK mit anderen Serumkomponenten entsprechen könnte.

Einige weitere mAks stellten sich in den Analysen (**Abb. 3 und 4**) als sehr hGH-sensitiv dar. Mit mAK 6F1, 7D5, 5D7, 5802 und 7E8 ließen sich z.T. noch stärkere hGH-Banden darstellen als mit 7B11. Gründe für den Einsatz von 7B11 in der etablierten Methode waren schließlich die Konstanz und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Diese war bei den anderen mAks später schlechter (**Abb. 6 und 7**).

Auch bei der Darstellung von rekombinantem Wachstumshormon, dem 22 kD-hGH-Standard (**Abb. 5**), fielen die Ergebnisse für 7B11 am besten aus und lassen eine deutliche 22 kD-Bande erkennen. Bessere Detektionseigenschaften besitzt hier nur 6F1 mit einer ausgeprägten Darstellung von 22 kD-hGH sowie einem 36 – 40 kD-Oligomer.

Trotzdem konnte in späteren Versuchen (**Abb. 8**) mit einer Kombination aus 7B11 und 7D5 im Vergleich zu 6F1 eine höhere Sensitivität gegenüber hGH erzielt werden. Versuche mit 7B11 zu späteren Zeitpunkten bestätigen seine Eignung auch für die Analyse von Serumproben, da im Gegensatz zu 7D5 nur mit 7B11 eine einzelne

klare 20 kD-Bande (**Abb. 6**) und eine deutliche 17 kD-Bande (**Abb. 7**) in immunpräzipitierten Serumproben dargestellt werden konnte.

Die guten Darstellungen verschiedener hGH-Isoformen mit 7B11 sind auf eine sehr hohe Affinität des mAb zu der N-terminalen Bindungsstelle des hGH-Moleküls zurückzuführen (92). Zudem scheint dieses Epitop auch im Gel gut erhalten zu bleiben.

Die Testung von polyklonalen Antiseren im Western Blot (**Abb. 5**) ergab – entgegen der ursprünglichen Annahme – keine höhere Sensitivität. Bei wiederholten Versuchen konnte mit den getesteten polyklonalen Antiseren keine ausreichende Detektionsfähigkeiten für hGH gezeigt werden. Der Versuch bestätigt, dass monoklonale Antikörper Mittel der Wahl zur Detektion von hGH-Isoformen im Western Blot sind und durch polyklonale Antiseren nicht ersetzt werden können.

4.3. Selektion enzymkonjugierter Antikörper gegen 1. Antikörper

Der Vergleich von zwei verschiedenen Detektionsverfahren (**Abb. 1**) zeigt, dass die Verwendung eines HRP-gekoppelten Detektionsantikörpers (7B11 + SaM-HRP) stabilere und bessere Ergebnisse gibt, als die Verwendung eines biotinylierten Erstantikörpers mit Streptavidin-HRP (7B11-b + Stav.-HRP).

Bei den Standardpräparationen ist mit der Kombination aus 2 Antikörpern (7B11 + SaM-HRP) die nur schwer darstellbare 17 kD-Bande zu erkennen, bei den Serumproben eine 20 kD-Bande. Beide genannten Banden sind mit dem Streptavidin-Biotin-System nicht erkennbar.

Das Auftreten einer deutlichen 12 kD-Bande ist nicht eindeutig zu erklären. Einerseits sprechen Ausgeprägtheit und ausschließliches Vorkommen in den immunpräzipitierten Serumproben für ein unspezifisches Signal - hervorgerufen durch die Präzipitierungsmaterialien selbst. Andererseits kann sie als ein echtes 12 kD-hGH-Fragment interpretiert werden. Dieses Fragment ist zwar in der Literatur bereits beschrieben, seine Existenz jedoch nicht endgültig gesichert (13).

Beachtet man, dass in Kapitel 3.1. in **Abb. 7/B** bei den hGH-positiven Proben eines rhGH-behandelten und eines nichtbehandelten Probanden gleiche Bandenstrukturen auftreten, so fällt auf, dass die Darstellung der 12 kD-Bande antikörperabhängig ist und nur bei Verwendung von mAk 7B11 auftritt. Die 12 kD-Bande ist in hGH-freiem

Serum nicht sichtbar, ihr Auftreten könnte daher tatsächlich auf ein gespaltenes 22 kD-hGH-Molekül hinweisen.

Bei dem Vergleich der Mengen an Zweit-Antikörpern führte eine vom Hersteller empfohlene Menge (3,33 µg) zu stärkeren Hintergrundsignalen, die aus einer stärkeren Kreuzreaktion der peroxidasekonjugierten Antikörper mit hGH-unabhängigen Materialien resultieren dürfte. Leicht erhöhte Sensitivität bei der Darstellung der Isoformen erhält man durch den Einsatz von unabhängig zum Detektions-Kit erworbenen Schaf-anti-Maus-meerrettichperoxidasekonjugierten Antikörpern.

Niedrigere Konzentrationen und eine bessere Qualität der peroxidasekonjugierten Antikörper führten in den vorliegenden Experimenten zu den besten Ergebnissen.

4.4. Immunpräzipitation

Während sich beim Western Blot monoklonale Antikörper als deutlich sensitiver in der Detektion von hGH-Isoformen darstellen, sind bei der Immunpräzipitation polyklonale Antiseren, die mehrere Epitope und daher mehrere hGH-Isoformen erkennen, von Vorteil (**Abb. 1**). Die hGH-Präzipitation mit polyklonalen Antiseren führt zu intensiveren Banden im Western Blot. Atypische Banden, die auf eine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen hinweisen, sind nicht zu erkennen.

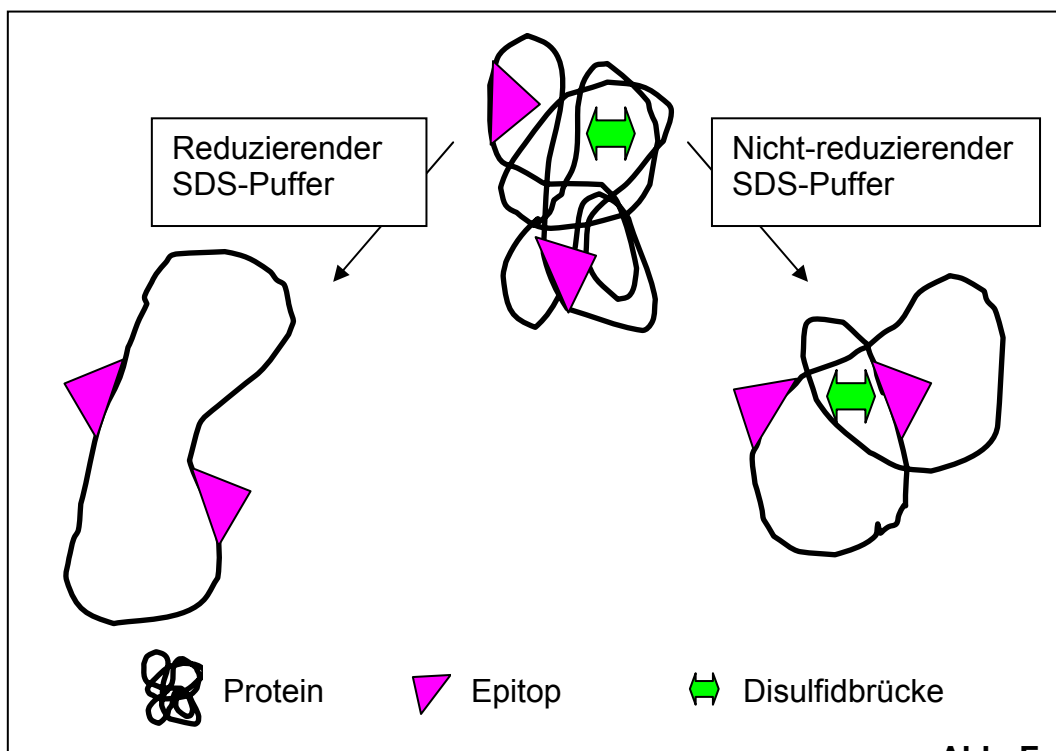
Bei der Suche nach den benötigten Mengen an polyklonalen Antikörpern und streptavidinbeschichteten Beads (**Abb. 2** entspr. Kapitel), war die kleinste getestete Dosis beider Reagenzien auch diejenige, welche zu den besten Ergebnissen führte. Insbesondere eine Erhöhung der Beadmenge führte zu undifferenzierteren Banden.

Bei der Frage, ob Unterschiede in der Inkubationsreihenfolge und Inkubationsdauer das Ergebnis im Western Blot beeinflussen (**Abb. 3**), stellte sich folgendes heraus: Eine Inkubation, beginnend mit Antikörpern, hGH-haltigem Serum und erst folgend mit Beads führt zu stärkeren Bandensignalen im Blot als umgekehrt (Antikörper und Beads, gefolgt von Serumzugabe). Die relative Immobilität der Bead-Antikörperkomplexe im Gegensatz zu den kleinen hGH-Antikörperkomplexen und damit eine schlechtere Durchmischung der einzelnen Reagenzien könnte dieses

Phänomen erklären. Längere Inkubationszeiten haben keinen Einfluss auf die Qualitäten der Endergebnisse.

4.5. Reduzierte und nicht-reduzierte Proben

Bei der Reduktion der Proben werden die in ihr enthaltenden Polypeptide durch Spaltung ihrer Disulfidbrücken vollständig gestreckt. Verantwortlich dafür ist das im Reduktionspuffer enthaltene Reagenz Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol. Bei einer Inkubation in nicht-reduzierendem SDS-Puffer können die Proteine nicht vollständig aufgespalten werden. Potentielle Epitope für später hinzugefügte Antikörper können sich daher im Inneren des Proteins befinden und für eine Antikörper-Antigenbindung nicht zur Verfügung stehen (**Abb. F**). Andererseits können natürlich auch Epitope, die an die korrekte 3-dimensionale Struktur gebunden sind, verloren gehen. Daher kann nicht a priori aus rein theoretischen Erfahrungen heraus oder aufgrund von Erfahrungen aus nativen Serumproben geschlossen werden, welche Antikörper unter welchen Bedingungen optimal binden.



Die Verwendung von reduzierendem SDS-Puffer führt bei hGH-Standards und Serumproben zu deutlicheren Bandensignalen. Durch die komplette Auffaltung der Proteine können die selektiven monoklonalen Antikörper im Western-Blot später offenbar besser an ihre Epitope binden, dadurch wird quantitativ mehr Protein sichtbar. HGH-Isoformen, die in geringer Menge vorkommen (z.B. 20 kD-hGH) können somit im Western Blot sichtbar gemacht werden. (**Abb. 1 und 2**).

4.6. Signaldetektion

Das Prinzip der Chemielumineszenz erlaubt eine Visualisierung der hGH-Banden. Um die Sensitivität und Spezifität der bisher etablierten Methode zu optimieren, wurden drei verschiedene Chemielumineszenz-Systeme (*Amersham, Roche, Pierce*) miteinander verglichen. Trotz gleichen Mechanismen waren z.T. große qualitative Differenzen zwischen den einzelnen Kits zu beobachten (**Abb. 1 und 2**). Die wichtigsten Kriterien, ein geringes Hintergrundsignal und deutliche Banden sowie ein guter Kontrast zwischen Hintergrund und Banden, erfüllte der *Amersham-ECL-Kit*. Auch kleine Untergruppen von hGH-Isoformen können sichtbar gemacht werden und helfen so bei dem Hauptanliegen der Methode: *Die Klare Darstellung möglichst vieler hGH-Isoformen im Normalserum, um diese von Seren, die nur eine Isoform (22kD) enthalten, zu unterscheiden.*

In Anbetracht der Etablierung einer möglicherweise später international in verschiedenen Laboratorien angewandten Methode und angesichts der juristischen Bedeutung ihrer Ergebnisse, ist es nötig, möglichst viele Arbeitsschritte zu standardisieren.

Diesbezüglich wurde versucht, die bisher analog gestaltete Bildgebung mit vielen manuellen Einzelschritten durch eine digitale Methode (*Amersham, Typhoon*) zu ersetzen (**Abb. 3**). Mit diesem speziell für Western Blots entwickelten Digitalscanner wurden Sensitivität und Qualitätsstandards der herkömmlich entwickelten Bilder jedoch nicht erreicht. Obwohl die auf digitalem Weg mögliche Eliminierung verschiedener Bildartefakte, die durch Verschmutzung von Probefolien oder ungenaue Belichtungszeiten entstehen können, muss die Gesamtmethode für eine digitale Bildauswertung insgesamt deutlich verbessert und insbesondere ihre Sensitivität weiter erhöht werden. Nach wie vor ist derzeit die konventionelle Filmentwicklung deutlich sensitiver.

4.7. Repräsentative Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode, um hGH-Isoformen im Western Blot sowohl bei der Verwendung von Standardpräparationen, als auch bei der Verwendung von Serumproben von Athleten vor und nach rhGH-Applikation darzustellen. Die prinzipielle Möglichkeit eines solchen Verfahrens konnte an einigen Proben demonstriert werden:

In **Abb. 1** ist für den Betrachter ein klarer Unterschied zwischen dem Serum hGH-behandelter und nichtbehandelter Athleten zu erkennen:

Im Serum des gedopten Athleten fehlt die 20kD-Bande. Hochmolekulare Banden im 36-40 kD-Bereich zeigen sich bei behandelten wie unbehandelten Probanden. Daher ist eine hGH-Dimerisierung post-injectionem in der Peripherie auch für rhGH anzunehmen – vorausgesetzt diese Banden sind hGH-spezifisch.

In **Abb. 2** gibt es nur spärliche Unterschiede innerhalb der verschiedenen Serumproben. In den Seren der Akromegaliepatienten kann eine 20 kD-Bande kaum festgestellt werden. Eine Unterscheidung zwischen Seren von Akromegaliepatienten und Seren rhGH behandelter Athleten ist hier kaum möglich.

Die Ergebnisse in **Abb. 3** verdeutlichen allerdings, dass exogen appliziertes Wachstumshormon zu Veränderung im Verhältnis der einzelnen hGH-Isoformen führt. Hier kann sehr gut beobachtet werden, dass die Seren rhGH-behandelter Athleten durch ein Fehlen der 17 kD-Bande charakterisiert sind, 36 kD-Banden sind in allen Seren vorhanden, jedoch nur bei den Seren von Akromegaliepatienten in ausgeprägter Form.

Bei der Vielzahl der für die Methodenentwicklung durchzuführenden Experimente musste aus Praktikabilitätsgründen mit Minigelen (15 X 12 cm) gearbeitet werden.

Natürlich bereitet die Frage, welche Bande im Western Blot exakt welcher Isoform entspricht, gewisse Probleme. Die hier angewandte und relativ ungenaue Methode der Molekulargewichtsbestimmung erlaubt eher qualitative als quantitative Unterscheidungen. Auch kommt es gerade bei hohen hGH-Konzentrationen zu Überlagerungen, womit eine exakte Isoformdifferenzierung nicht vorgenommen werden kann. Die exakte Größe der als 12 kD, 17 kD oder 20 kD-Bande sowie der 36 oder 40 kD-Bande müssen den in der Literatur entsprechenden hGH-Isoformen

nicht exakt entsprechen. Prinzipiell konnte jedoch gezeigt werden, dass exogen zugeführtes hGH morphologische Veränderungen in den Bandenstrukturen der einzelnen Western Blots zur Folge hat (s. **Abb. 1 und 3**). Das Hauptmerkmal ist ein Verschwinden der kleinmolekularen Bande (20kD, 17kD).

4.8. Wachstumshormon-Dopingtests mittels Isoformenanalyse – kritische Anmerkungen

Unfreiwillige Blutabnahmen verstoßen prinzipiell gegen das Recht auf die körperliche Unversehrtheit des Athleten. Sie stellen bis vor kurzem - im Gegensatz zu Urinentnahmen - noch keine Standardmethode bei der Gewinnung von Probenmaterial für dopingrelevante Screeninguntersuchungen dar. Wie bereits in Kapitel 2 erwähnt, scheint der Nachweis von rhGH im Urin wegen ausgeprägter intraindividuelle Konzentrationsschwankungen und durchschnittlich 100 – 1000-fach geringeren Konzentration im Vergleich zum Serum, keine Alternative zur Blutuntersuchung zu bieten (88). Eine wachsende Anzahl an Sportverbänden akzeptiert jedoch mittlerweile Blutentnahmen. So konnte der assaytechnische hGH-Dopingtest zum ersten Mal 2004 bei den Olympischen Sommerspielen in Athen als offizieller Test angewandt werden (16). Das Fehlen positiver Testergebnisse damals (88) ist nicht auf eine Zurückhaltung beim hGH-Missbrauch zurückzuführen, sondern spricht für taktisch kluge Applikationszeitpunkte und eine sorgfältige Berücksichtigung der relativ kleinen Zeitfenster für den Nachweis von hGH-Isoformenveränderungen: *Nach einmaliger Injektion von 0,083 mg/kg rhGH bleibt die 20kD-hGH-Isoform für maximal 34 Stunden supprimiert* (56).

Ferner zeigen Athleten, die präpariertes Wachstumshormon aus Leichenhypophysen zu sich nehmen, heterogene hGH-Isoformenmuster. Im Rahmen eines hGH-Dopingtests ist ein Dopingnachweis mit der Isoformenanalyse in diesem Fall natürlich nicht möglich.

Unklar ist bisher, ob alle ethnischen Gruppierungen gleiche hGH-Isoformenmuster aufweisen oder gewisse Gruppen unterschiedliche Isoformenverteilungen besitzen (93). Umfassende multi-ethnische hGH-Isoformenanalysen müssen hier zusätzliche Klarheit verschaffen.

Da Wachstumshormon der Familie der Stresshormone zugerechnet wird, müssen endogen erhöhte Wachstumshormonspiegel - z. B. durch starke körperliche oder seelische Beanspruchungen, eine ausgeprägte hypoglykämische Stoffwechsellage oder im Rahmen einer Verletzung - ebenfalls als Unsicherheitsfaktor gewertet werden. In einzelnen Fällen zeigte sich bei extremer körperlicher Anstrengung eine überproportionale Erhöhung der 22-kD Isoform von hGH (4). Allerdings fällt dieser Anstieg weit geringer aus, als nach Injektion von rekombinantem Wachstumshormon und führt zu keiner messbaren Suppression der endogenen hGH-Sekretion.

Zusätzlich wurde in den letzten Jahren eine zweite und isoformenunabhängige Methode entwickelt, hGH-Missbrauch nachzuweisen. Bei dem bereits in Kapitel 1 skizzierten Ansatz werden die Konzentrationen hGH-abhängiger Faktoren, insbesondere IGF-I, IGFBP und PIIP gemessen. Diese sind auch noch Tage nach einer Behandlung mit Wachstumshormon erhöht. Die zum Teil erheblichen intraindividuellen Schwankungen der einzelnen Parameter (88), vom Probandenalter abhängige Messwerte sowie unterschiedliche Konzentrationen in einzelnen ethnischen Gruppierungen limitieren die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode auch weiterhin (17).

Neue Technologien und Wege, die GH-IGF-I Achse zu beeinflussen, führen zu kleinern oder nur minimalen Veränderungen des physiologischen hGH-Isoformenmusters im Serum. Sie entziehen sich somit einer klassischen hGH-Isoformenanalyse, wie sie durch die Western Blot Methode erzielt werden kann:

Wie bereits erwähnt, vermittelt hGH seine physiologischen Wirkungen über die Regulation von IGF-I und das IGF-bindende Protein (IGFBP). Für beide Parameter existieren bereits rekombinant hergestellte Varianten, die zumindest experimentell im Gebrauch sind (86,25). Ein Missbrauch dieser Substanzen im Leistungssport ist noch nicht bekannt oder nachgewiesen, scheint zumindest jedoch heute schon denkbar.

Ferner entziehen sich sogenannte GH-Sekretagoga, wie die Aminosäuren Arginin, Ornithidin und Tryptophan (63), einer quantitativen und qualitativen hGH-Isoformenanalyse, da sie mittels hypophysärer Stimulation zu einer hGH-Sekretion führen und eine Erhöhung von endogenem hGH zur Folge haben.

Das sogenannte „Gen-Doping“ bietet einen neuen Ansatz, körperliche Leistungspotenziale zu verbessern. Das genetische Erbgut sowie eine damit modifizierte Genexpression und Proteinsynthese wird hierbei gezielt verändert (89). Aus diesem Grund wurde im Jahr 2003 die Liste der verbotenen Substanzen durch

die WADA um folgenden Punkt ergänzt: „*Der nicht-therapeutische Einsatz von Zellen, Genen, genetischen Elementen als auch Veränderungen der Genexpression, welche eine Verbesserung sportlicher Leistung bei Athleten zur Folge haben könnte, ist verboten*“ (81). Obwohl das vektorgebundene Einbringen von Fremd-DNA in eine Zielzelle auch heute bei verschiedenen Erbkrankheiten - zum Beispiel Mukoviszidose - noch nicht routinemäßig geschieht, konnten auf diesem Gebiet bereits eine Reihe von tierexperimentellen Daten publiziert und dopingrelevante Manipulationen an murinem Erbgut erfolgreich durchgeführt werden (5): In transgenen Mäusen gelang beispielsweise eine Überexpression von mIGF-I, welches eine muskelspezifische Unterform des IGF-I darstellt. Das Resultat dieser genetischen Manipulation zeigte bei den Versuchstieren eine im Vergleich zu den Kontrolltieren ausgeprägte Muskelhypertrophie, einhergehend mit gesteigerter Muskelkraft (77,65). In weiteren transgenen Tiermodellen konnte durch die Überexpression von IGF-I und die Beeinflussung verschiedener Zytokine eine deutliche Reduktion des physiologisch altersbedingten Skelettmuskelabbaus (8) und eine signifikant raschere muskuläre Regeneration gezeigt werden (80).

Ebenso gelang es mittels Gentransfer im Tierexperiment, gesteigerte Expressions- und Sekretionsraten von GH (49) und GHRH (58) zu erzielen.

Obwohl sich die genannten genmanipulatorischen Möglichkeiten einer hGH-Isoformenanalyse mittels Immunoassay als auch Western Blot vollständig entziehen, ist Gen-Doping mit höchster Wahrscheinlichkeit aktuell kein Bestandteil der üblichen und verbreiteten Doping-Praxis (5). Ungeachtet dessen, bestehen auf diesem Gebiet bereits Anstrengungen zur Etablierung verschiedener Testmethoden, um diese zeitgerecht den bereits etablierten Dopingtests später beifügen zu können (81).

5. Zusammenfassung

Einleitung:

Der Wunsch nach einem fairen Leistungssport ist so alt wie der Leistungssport selbst. Den Schriften des griechischen Arztes Galen (300 v. Chr.) zufolge nutzten bereits Athleten der griechischen Antike 'magische Substanzen' wie Stierhodenextrakte, um ihre körperliche Leistung während der Olympischen Spiele zu verbessern. Wurde dies publik, waren den Sportlern Hohn und Spott der Zuschauer sicher (76). Der Appell von Pierre de Coubertin, dem Begründer der Olympischen Spiele der Neuzeit, Eigenschaften des Sports wie Ehre und Rittertum zu bewahren, damit dieser weiterhin und wie zu Zeiten der griechischen Antike eine erziehende Rolle auf die Menschen ausübe (27), scheint unter Berücksichtigung von Galens Berichten eher der Etablierung eines antiken Mythos zu dienen. Leistungssport an sich unterlag wohl immer schon 'unritterlichen' Gesetzen, wie Ruhm- und Gewinnsucht. Wurden in der Antike 'magische Substanzen' wie testosteronhaltige Tierextrakte zur Leistungssteigerung benutzt, so führte die Kommerzialisierung als auch die Politisierung des Leistungssports im letzten Jahrhundert zu einer gezielten Nutzung synthetisch hergestellter Mittel – hauptsächlich Steroidhormonen. Eine neue Ära des Dopings wurde durch die Möglichkeit der rekombinanten Herstellung von Peptidhormonen ermöglicht. Erythropoetin als auch Wachstumshormon sind die zwei wichtigsten Vertreter.

Die überwiegend gebildete Form von hGH ist das 22100 Dalton große 191 AS-Peptidhormon, welches biochemisch zur GH/Prolaktinfamilie gehört und in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet wird. Daneben existieren noch eine Reihe von hGH-Isoformen, welche durch verschiedene Prozessierungen weniger Aminosäuren aufweisen und dementsprechend kleiner ausfallen. Neben einer 20 kD-Isoform, existieren noch kleinere Fragmente (16kD, 12kD). Zusätzlich können hGH-Moleküle zu Oligomeren fusionieren (82). HGH besitzt für seinen spezifischen Rezeptor zwei Bindungsstellen, welche an den jeweiligen Endregionen der AS-Kette lokalisiert sind. Nur die vollständige Bindung beider Bindungsstellen mit dem Rezeptor führt zu einer hGH-induzierten intrazellulären Signalkaskade.

Die Bildung und Sekretion von hHG unterliegt, wie andere Hormone im Sinne der Rückkopplung, verschiedenen hemmenden und stimulierenden Regelmechanismen:

Das hypothalamische GHRH, Ghrelin und andere Hormone wie Cortisol und Schilddrüsenhormone, aber auch Stress, Schlaf und niedrige Blutzuckerspiegel fördern die Bildung und Sekretion hGH. Somatostatine, IGF-I und hGH selbst supprimieren diese.

Die physiologische Wirkung von hGH wird über das vornehmlich in der Leber gebildete IGF-I vermittelt. Seine Wirkung beschränkt sich nicht nur auf das Längenwachstum von Kindern, sondern hat auch lebenslangen Einfluss auf den menschlichen Körper wie Fettverbrennung, Muskel- und Knochenaufbau. Von Leistungssportlern wird Wachstumshormon hauptsächlich wegen seiner anabolen und lipolytischen Eigenschaften verwendet (88), obwohl weiterhin konkrete Beweise für eine leistungsfördernde Wirkung hierfür im Leistungssport fehlen (14). Zurzeit sind bezüglich metabolischer, kardiologischer und respiratorischer Verbesserungen nur ausreichend Daten bei GHD-Patienten im Rahmen einer rec hGH-Therapie bekannt. Dennoch gibt es bei Athleten unterschiedlichster Disziplinen recht eindeutige Hinweise für die Verwendung supraphysiologischer Dosen gentechnisch hergestellter 22kD-Wachstumshormon-Präparate. Aus diesem Grund wurden diese 1989 durch das IOC offiziell verboten und stehen auf der von der 'World Anti Doping Agency' (WADA) publizierten Liste verbotener Substanzen (96).

Der Nachweis von hGH-Doping gelingt wegen der pulsatischen Hormonausschüttung, individuell stark variierenden Sekretionsmengen, einer kurzen Molekül-Halbwertszeit und der geringen Urinkonzentration nur schwer. Die größte Problematik besteht jedoch darin, dass rec hGH und hGH chemisch weitgehend identisch sind, indem sie gleiche Aminosäuresequenzen aufweisen und keine weiteren biochemischen Charakteristika tragen. Ferner sind die klassischen gaschromatographischen und massenspektrometrischen Verfahren für Eiweißhormone bislang nicht oder nur eingeschränkt anwendbar. Lösungsansätze konzentrieren sich einerseits auf Veränderungen von hGH/IGF-I-abhängigen Parameter, zum anderen auf Veränderungen des Isoformenverhältnisses. Hierzu existiert bereits seit wenigen Jahren ein Immunoassay, mit welchem das Verhältnis von 22kD-Isoformen zu anderen Isoformen analysiert wird. Grundlage ist, dass hohe hGH-Spiegel in vivo zu einer verminderten hypophysären Synthese führen und folglich ein natürlich heterogenes Gemisch an hGH-Isoformen durch die Injektion von 22kD rec hGH in seinem Isoformenmuster verändert wird (17). Vom IOC wurde diese Methode

akkreditiert und sie wird nun seit 2004 bei den Olympischen Spielen als offizieller Wachstumshormon-Dopingtest angewendet.

Material und Methoden:

In der SDS-Gelelektrophorese werden die Serumproteine und einzelnen hGH-Isoformen ihrer Molekülgröße entsprechend in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Eigenladung der Proteine wird hierfür mittels SDS-Detergenz überdeckt. Anschließend werden die Proteine im Western Blot auf Nitrozellulose-Membranen fixiert und die hGH-Moleküle mit hGH-spezifischen Antikörpern (mono- und polyklonal) und Tracern - als Träger einer chemielumineszenten Komponente - gebunden. Aufgrund z.T. sehr niedriger hGH-Gesamt Mengen in den Serumproben (<10ng/ml) und wegen der durch die SDS-Minigele bedingten geringen Probenvolumina (10-15µl), wurde der Einsatz eines immunpräzipitatorischen Anreicherungsverfahrens notwendig. Hierbei konnten im Western Blot Signalstärken erzielt werden, die mit hGH-Standarddosen von 1µg/ml vergleichbar sind. Insgesamt wird hiermit eine ca. 100-fache Sensitivitätssteigerung erzielt. Bei diesem Verfahren werden hGH-Proteine mittels biotinylierten polyklonalen Antikörpern und streptavidinbeschichteten magnetischen Partikeln (Beads) präzipitiert und in der anschließenden Elektrophorese und im Western Blot weiter analysiert.

Die untersuchten Serumproben entstammen Akromegaliepatienten, hypophysectomierten GHD-Patienten, Probanden denen rec hGH einmalig injiziert wurde und Kontrollprobanden mit physiologischen hGH-Spiegeln. Als Referenz wurden verschiedene Wachstumshormon-Standards verwendet. Für die Immunpräzipitation wurde hauptsächlich anti-hGH IgG aus Kaninchenserum benutzt. Im Western Blot wurden im Rahmen der Versuchsreihen poly- (Kaninchen) und monoklonale Antikörper (Maus) getestet und verwendet.

Signaldetektionen wurden mittels induzierter Chemielumineszenz auf Filmfolien und durch einen digitalen Detectionsscanner festgehalten.

Ergebnisse:

In ersten Versuchsreihen wurde die Affinität verschiedener poly- (Kaninchen) und monoklonaler (Maus) anti-hGH Antikörper für unterschiedliche hGH-haltige Proben (hGH-Standards, hGH-haltige Seren) untersucht. Mit einzelnen monoklonalen Antikörpern konnten z.T. verschiedene hGH-Isoformen dargestellt werden. Mit

polyklonalen Antikörpern gelang dies jedoch nicht. Mit 10 µg 7B11 (Maus), einem monoklonalen anti-hGH Antikörper mit hoher Affinität zur N-terminalen hGH-Rezeptorbindungsstelle, konnten in immunpräzipitatorisch aufkonzentrierten hGH-haltigen Seren (Nativserum: 15ng/ml) neben ausgeprägten 22kD-Isoformen auch kleinere Isoformen (20kD, 17/16kD) visualisiert werden.

Bei der Wahl der Tracer führte der Einsatz peroxidasehaltiger polyklonaler anti-Maus Antikörper (SAM-MRP) in Verbindung mit 7B11 zu hGH-Detektionen bis in den Pikogrammbereich (hGH-Standard – 100pg/Probe) sowie zur Visualisierung verschiedener Isoformen in den Serumproben (22, 20, 17/16 kD). Mit einem Streptavidin-Biotin gekoppelten System (1. Antikörper: biotinyliertes 7B11, Tracer: Stav-POD) gelang nur eine hGH-Standarddetektion im Nanogrammbereich (10ng/Probe). Größere Mengen an Tracer (SAM-MRP / 3,33µg) führten im Vergleich mit niedrigeren Dosen (SAM-MRP / 2µg) zu keinen besseren Bandensignalen, hatten aber stärkere Hintergrundsignale zur Folge.

Bei der Immunpräzipitation konnten mit polyklonalen anti-hGH Antikörpern im anschließenden Western Blot deutlich mehr hGH-Moleküle detektiert werden, als bei der Verwendung von monoklonalen anti-hGH Präzipitierungsantikörpern. Die Verwendung höherer Dosen paramagnetischer Beads (200µl) als auch polyklonaler Antikörper (pKaGH-b / 4µg) zeigte im Vergleich mit niedrigeren Dosen (Beads / 50µl, pKaGH-b / 2µg) keine Verbesserung und führte zu einer Erhöhung unspezifischer Bandensignale. Günstig auf die hGH-Detektion wirkte sich jedoch die primäre Inkubation mit Antikörpern und Serum und die anschließende Zugabe der Beads aus.

Bei der Verwendung verschiedener kommerziell erwerblicher Chemielumineszenz-Kits konnten mit den *Enhanced Chemiluminescence Kit – ECL* von *Amersham* und dem *Lumi-Light-Plus, Western Blotting Kit* von *Roche* verschiedene hGH-Isoformen (22, 20, 17/16 kD) in ähnlicher Qualität detektiert werden. Mit *Super Signal® West Femto* von *Pierce* gelang nur die Visualisierung einer 22kD hGH-Isoform. Bei dem Vergleich verschiedener Detektionsmedien zeigten Chemielumineszenz-spezifische Filmmaterialien (*Hyperfilm-ECL, Amersham*) deutlich stärkere Bandensignale als ein Chemielumineszenz-spezifischer Digitalscanner mit integrierter Verarbeitungssoftware (*Typhoon 8600, Amersham*). Im Gegensatz zu den Digitalbildern konnten mit Filmmaterial die verschiedenen hGH-Isoformen deutlicher dargestellt werden.

Nach Beendigung der verschiedenen Vorexperimente und Zusammenfügung der herausgearbeiteten optimalen experimentellen Teilbedingungen wurden im Rahmen einer etablierten Testmethode hGH-haltige, rec hGH-haltige und hGH-freie Seren miteinander verglichen. In allen hGH-haltigen Seren konnte die 20kD hGH-Isoform nachgewiesen werden. Dies war in den rec hGH-haltigen Seren nicht möglich. Ferner zeigten die Proben hGH-haltiger Seren häufig eine 17 bzw. 16kD Bande, die in keiner der rec hGH-haltigen Seren nachweisbar war. 36kD Banden zeigten sich in unterschiedlicher Ausprägung in allen Serumproben. Trotz bereits beschriebener Di- und Oligomerkomplexe (82) muss in diesen Fällen von unspezifischen Bandenkomplexen ausgegangen werden, da 36kD Banden auch in hGH-freien Seren nachgewiesen werden konnten. In allen Experimenten der bisher etablierten Methode korrelierten fehlende 20- und 17/16kD hGH-Isoformen mit einer vorangegangenen Injektion von rekombinantem Wachstumshormon.

Diskussion:

Probenmaterial und Untersuchungsmethoden haben großen Einfluss auf die Darstellung einzelner hGH-Isoformen. 22, 20, 30, 16 und 12kD hGH-Isoformen wurden bereits in anderen Arbeiten wiederholt beschrieben. Artefakte und Interaktionen von Antikörpern mit unspezifischen Serumproteinen können bei Proteinanalysen aber nie vollständig ausgeschlossen werden. Intermittierend auftretende Banden im 12 kD-Bereich konnten in diesen Experimenten, wie in bereits publizierten Arbeiten, nicht sicher als hGH Fragmente identifiziert werden.

Die hohe Affinität des monoklonalen anti-hGH Antikörper 7B11 zu hGH-Molekülen ist bekannt. Die überdurchschnittlichen hGH-Detektionseigenschaften von 7B11 im Western Blot lassen auf eine gute Konservierung des vom Antikörper gebundenen Epitops im Gel schließen.

Die Verwendung polyklonaler anti-hGH Antikörper in der Immunpräzipitation führte im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern in den Western Blots zu ausgeprägteren hGH-spezifischen Bandensignalen. Eine mögliche Erklärung ist durch die Vielfalt an Epitopbindungsstellen gegeben, an welche die verschiedenen Antikörper binden können. Klare molekularbiologische Erklärungsansätze fehlen jedoch.

Die Spaltung intramolekularer Disulfidbrücken mittels reduzierender Reagenzien (reduzierende SDS-Puffer) führte im Western Blot zu deutlich stärkeren Bandensignalen und Darstellungen mehrerer hGH-Isoformen. Monoklonale

Antikörper können nach vollständiger Molekülauffaltung offensichtlich besser an die einzelnen Epitope binden.

In den abschließenden Ergebnissen korrelieren fehlende 20- und 17/16kD hGH-Isoformen sowie die alleinige Präsenz von 22kD hGH-Isoformen in Seren rec hGH behandelter Probanden mit den Ergebnissen assaytechnischer Untersuchungen. Eine Injektion von rekombinantem Wachstumshormon konnte insbesondere durch den Nachweis einer abwesenden 20kD Bande im Western Blot eindeutig nachgewiesen werden.

Die Schwierigkeiten beim Nachweis von Wachstumshormon im Urin dürften durch die zunehmende Akzeptanz von Blutentnahmen bei Leistungssportlern an Bedeutung verloren haben. Herausforderungen sind allerdings weiterhin die relativ kurze biologische Halbwertszeit des Wachstumshormons. Zusätzlich muss geklärt werden, ob eine Konstanz der physiologischen hGH-Isoformenmuster in physischen und psychischen Extremsituationen gewährleistet ist und alle ethnischen Gruppierungen vergleichbare Muster aufweisen.

Rekombinantes Wachstumshormon stellt mit Abstand das unter Athleten am häufigsten verwendete Präparat dar, mit welchem die GH / IGF-I – Achse manipuliert wird. Dennoch können hGH-Isoformenanalysen einen Missbrauch mit hGH-Sekretagoga und rekombinantem IGF-I nicht nachweisen. Aus dem gleichen Grund sind genmanipulatorische Methoden mit diesen Methoden ebenfalls nicht analysierbar. Letztere dürften jedoch aktuell keinen Bestandteil der gängigen Dopingpraxis darstellen.

Diese Methode erlaubt es, Veränderungen des hGH-Isoformenmusters visuell darzustellen und kann im Gegensatz zum Immunoassay die absolute Veränderung einzelner Isoformen qualitativ sichtbar machen. Aufgrund technischer Unterschiede stellt sie eine im Vergleich zum Immunoassay unabhängige Methode zum Nachweis von exogen zugeführtem rekombinantem Wachstumshormon dar.

Prinzipiell ist Wachstumshormon-Doping mit der in dieser Arbeit etablierten Methode möglich.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Abdel-Meguid SS, Shieh HS, Smith WW, Dayringer HE, Violand BN, Bentle LA.
Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Sep;84(18):6434-7.
- 2 Argetsinger LS, Carter-Su C.
Mechanism of signaling by growth hormone receptor.
Physiol Rev. 1996 Oct;76(4):1089-107.
- 3 Argetsinger LS, Carter-Su C.
Mechanism of signaling by growth hormone receptor.
Physiol Rev. 1996 Oct;76(4):1089-107.
- 4 Banfi G, Marinelli M, Roi GS, Colombini A, Pontillo M, Giacometti M, Wade S.
Growth hormone and insulin-like growth factor I in athletes performing a marathon at 4000 m of altitude.
Growth Regul. 1994 Jun;4(2):82-6.
- 5 Baoutina A, Alexander IE, Rasko JE, Emslie KR.
Potential use of gene transfer in athletic performance enhancement.
Mol Ther. 2007 Oct;15(10):1751-66.
- 6 Barnard R, Bundesen PG, Rylatt DB, Waters MJ.
Evidence from the use of monoclonal antibody probes for structural heterogeneity of the growth hormone receptor.
Biochem J. 1985 Oct 15;231(2):459-68.
- 7 Barnard R, Rowlinson SW, Brinkworth R, Bastiras S, Robins A, Wells JR, Waters MJ.
The search for receptor-interactive regions in growth hormone: historical perspectives and novel strategies.
Acta Paediatr Suppl. 1994 Apr;399:33-41.
- 8 Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL.
Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15603-7.
- 9 Barton DE, Foellmer BE, Wood WI, Francke U.
Chromosome mapping of the growth hormone receptor gene in man and mouse.
Cytogenet Cell Genet. 1989;50(2-3):137-41.

- 10 Baumann G, Stolar MW, Amburn K.
Molecular forms of circulating growth hormone during spontaneous secretory episodes and in the basal state.
J Clin Endocrinol Metab. 1985 Jun;60(6):1216-20.
- 11 Baumann G, Amburn K, Shaw MA.
The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man.
Endocrinology. 1988 Mar;122(3):976-84.
- 12 Baumann G.
Growth hormone binding proteins and various forms of growth hormone: implications for measurements.
Acta Paediatr Scand Suppl. 1990;370:72-80; discussion 81.
- 13 Baumann G.
Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma.
Horm Res. 1999;51 Suppl 1:2-6.
- 14 Berggren A, Ehrnborg C, Rosen T, Ellegard L, Bengtsson BA, Caidahl K.
Short-term administration of supraphysiological recombinant human growth hormone (GH) does not increase maximum endurance exercise capacity in healthy, active young men and women with normal GH-insulin-like growth factor I axes.
J Clin Endocrinol Metab. 2005 Jun;90(6):3268-73.
- 15 Bidlingmaier M, Wu Z, Strasburger CJ.
Doping with growth hormone.
J Pediatr Endocrinol Metab. 2001 Sep-Oct;14(8):1077-83.
- 16 Bidlingmaier M, Strasburger CJ.
Growth hormone assays: current methodologies and their limitations.
Pituitary. 2007;10(2):115-9.
- 17 Bidlingmaier M, Strasburger CJ.
Technology insight: detecting growth hormone abuse in athletes
Nat Clin Pract Endocrinol Metab. *Accepted July 2007*
- 18 Bottinelli R, Narici M, Pellegrino MA, Kayser B, Canepari M, Faglia G, Sartorio A.
Contractile properties and fiber type distribution of quadriceps muscles in adults with childhood-onset growth hormone deficiency.
J Clin Endocrinol Metab. 1997 Dec;82(12):4133-8.
- 19 Brenner IK, Zamecnik J, Shek PN, Shephard RJ.
The impact of heat exposure and repeated exercise on circulating stress hormones.
Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 1997;76(5):445-54.

- 20 Burman P, Johansson AG, Siegbahn A, Vessby B, Karlsson FA.
Growth hormone (GH)-deficient men are more responsive to GH replacement therapy than women.
J Clin Endocrinol Metab. 1997 Feb;82(2):550-5.
- 21 Chatelain P, Bouillat B, Cohen R, Sassolas G, Souberbielle JC, Ruitton A, Joly MO, Job JC.
Assay of growth hormone levels in human plasma using commercial kits: analysis of some factors influencing the results.
Acta Paediatr Scand Suppl. 1990;370:56-61; discussion 62.
- 22 Chatterton RT Jr, Vogelsong KM, Lu YC, Hudgens GA.
Hormonal responses to psychological stress in men preparing for skydiving.
J Clin Endocrinol Metab. 1997 Aug;82(8):2503-9.
- 23 Christ ER, Cummings MH, Westwood NB, Sawyer BM, Pearson TC, Sonksen PH, Russell-Jones DL.
The importance of growth hormone in the regulation of erythropoiesis, red cell mass, and plasma volume in adults with growth hormone deficiency.
J Clin Endocrinol Metab. 1997 Sep;82(9):2985-90.
- 24 Cittadini A, Cuocolo A, Merola B, Fazio S, Sabatini D, Nicolai E, Colao A, Longobardi S, Lombardi G, Sacca L.
Impaired cardiac performance in GH-deficient adults and its improvement after GH replacement.
Am J Physiol. 1994 Aug;267(2 Pt 1):E219-25
- 25 Clemmons DR, Slevi M, Allan G, Sommer A.
Effects of combined recombinant insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 in type 2 diabetic patients on glycemic control and distribution of IGF-I and IGF-II among serum binding protein complexes.
J Clin Endocrinol Metab. 2007 Jul;92(7):2652-8.
- 27 Coubertin, Baron de (1892)
<http://www.olympic.org/uk/passion/museum>
Homepage des IOC, Stand 2002
- 28 Crist DM, Peake GT, Egan PA, Waters DL.
Body composition response to exogenous GH during training in highly conditioned adults.
J Appl Physiol. 1988 Aug;65(2):579-84.
- 29 Cuneo RC, Salomon F, Wiles CM, Sonksen PH.
Skeletal muscle performance in adults with growth hormone deficiency.
Horm Res. 1990;33 Suppl 4:55-60.

- 30 Cuneo RC, Salomon F, Wilmshurst P, Byrne C, Wiles CM, Hesp R, Sonksen PH.
Cardiovascular effects of growth hormone treatment in growth-hormone-deficient adults: stimulation of the renin-aldosterone system.
Clin Sci (Lond). 1991 Nov;81(5):587-92.
- 31 Cuneo RC, Salomon F, Wiles CM, Round JM, Jones D, Hesp R, Sonksen PH.
Histology of skeletal muscle in adults with GH deficiency: comparison with normal muscle and response to GH treatment.
Horm Res. 1992;37(1-2):23-8.
- 32 Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA. s
Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule.
Science. 1991 Nov 8;254(5033):821-5.
- 33 Cushing H.
The pituitary body and its disorders.
Philadelphia: Lippincot (1912).
- 34 de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA.
Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex.
Science. 1992 Jan 17;255(5042):306-12.
- 35 Deyssig R, Frisch H, Blum WF, Waldhor T.
Effect of growth hormone treatment on hormonal parameters, body composition and strength in athletes.
Acta Endocrinol (Copenh). 1993 Apr;128(4):313-8.
- 36 Ehrnborg C, Bengtsson BA, Rosen T.
Growth hormone abuse.
Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2000 Mar;14(1):71-7.
- 37 Flanagan DE, Taylor MC, Parfitt V, Mardell R, Wood PJ, Leatherdale BA.
Urinary growth hormone following exercise to assess growth hormone production in adults.
Clin Endocrinol (Oxf). 1997 Apr;46(4):425-9.
- 38 Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal J, Hennen G.
The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant.
J Clin Endocrinol Metab. 1988 Jun;66(6):1171-80.
- 39 Frisch H.
Growth hormone and body composition in athletes.
J Endocrinol Invest. 1999;22(5 Suppl):106-9.

- 40 Fuh G, Cunningham BC, Fukunaga R, Nagata S, Goeddel DV, Wells JA.
Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor.
Science. 1992 Jun 19;256(5064):1677-80.
- 41 Gala RR.
Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system.
Proc Soc Exp Biol Med. 1991 Oct;198(1):513-27.
- 42 Gibney J, Wallace JD, Spinks T, Schnorr L, Ranicar A, Cuneo RC, Lockhart S, Burnand KG, Salomon F, Sonksen PH, Russell-Jones D.
The effects of 10 years of recombinant human growth hormone (GH) in adult GH-deficient patients.
J Clin Endocrinol Metab. 1999 Aug;84(8):2596-602.
- 43 Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itakura K, Yansura DG, Ross MJ, Miozzari G, Crea R, Seeburg PH.
Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone.
Nature. 1979 Oct 18;281(5732):544-8.
- 44 Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA.
Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals.
Endocr Rev. 1996 Aug;17(4):385-410.
- 45 Hepner F, Czaszar E, Roitinger E, Lubec G.
Mass spectrometrical analysis of recombinant human growth hormone (Genotropin(R)) reveals amino acid substitutions in 2% of the expressed protein.
Proteome Sci. 2005 Feb 11;3(1):1.
- 46 Hesch RD, Becker H, Brabant EG, Schulte HM.
Erkrankung des Hypothalamus-Hypophysen-Systems
Gross R, Schölmerich P, Gerok W. Die Innere Medizin. Stuttgart, New York: Schattauer, F.K.; 872-845. (1994).
- 47 Hirt H, Kimelman J, Birnbaum MJ, Chen EY, Seeburg PH, Eberhardt NL, Barta A.
The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations.
DNA. 1987 Feb;6(1):59-70.
- 48 Holl RW, Schwarz U, Schauwecker P, Benz R, Veldhuis JD, Heinze E.
Diurnal variation in the elimination rate of human growth hormone (GH): the half-life of serum GH is prolonged in the evening, and affected by the source of the hormone, as well as by body size and serum estradiol.
J Clin Endocrinol Metab. 1993 Jul;77(1):216-20.

- 49 Inazawa T, Tanabe T, Yamada H, Nakaoka T, Hashimoto Y, Yamasaki T, Kotaki H, Tani K, Asano S, Yamashita N.
Glucocorticoid-regulated expression of exogenous human growth hormone gene in rats.
Mol Ther. 2001 Sep;4(3):267-72.
- 50 Janssen YJ, Doornbos J, Roelfsema F.
Changes in muscle volume, strength, and bioenergetics during recombinant human growth hormone (GH) therapy in adults with GH deficiency.
J Clin Endocrinol Metab. 1999 Jan;84(1):279-84.
- 51 Johannsson G, Grimby G, Sunnerhagen KS, Bengtsson BA.
Two years of growth hormone (GH) treatment increase isometric and isokinetic muscle strength in GH-deficient adults.
J Clin Endocrinol Metab. 1997 Sep;82(9):2877-84.
- 52 Jorgensen JO, Moller J, Alberti KG, Schmitz O, Christiansen JS, Orskov H, Moller N.
Marked effects of sustained low growth hormone (GH) levels on day-to-day fuel metabolism: studies in GH-deficient patients and healthy untreated subjects.
J Clin Endocrinol Metab. 1993 Dec;77(6):1589-96.
- 53 Jorgensen JO, Thuesen L, Muller J, Ovesen P, Skakkebaek NE, Christiansen JS.
Three years of growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults: near normalization of body composition and physical performance.
Eur J Endocrinol. 1994 Mar;130(3):224-8.
- 54 Jorgensen JO, Vahl N, Hansen TB, Thuesen L, Hagen C, Christiansen JS.
Growth hormone versus placebo treatment for one year in growth hormone deficient adults: increase in exercise capacity and normalization of body composition.
Clin Endocrinol (Oxf). 1996 Dec;45(6):681-8.
- 55 Kanaley JA, Weatherup-Dentes MM, Jaynes EB, Hartman ML.
Obesity attenuates the growth hormone response to exercise.
J Clin Endocrinol Metab. 1999 Sep;84(9):3156-61.
- 56 Keller A, Wu Z, Kratzsch J, Keller E, Blum WF, Kniess A, Preiss R, Teichert J, Strasburger CJ, Bidlingmaier M.
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GH: dependence on route and dosage of administration.
Eur J Endocrinol. 2007 Jun;156(6):647-53.
- 57 Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M.
The prolactin/growth hormone receptor family.
Endocr Rev. 1991 Aug;12(3):235-51.

- 58 Khan AS, Brown PA, Draghia-Akli R.
Plasmid-based growth hormone-releasing hormone supplementation and its applications.
Curr Opin Mol Ther. 2005 Aug;7(4):306-16.
- 59 Knobil E, Greep R.
The physiology of growth hormone with specific reference to its action in Rhesus monkey and the `species specificity problem`.
Rec. Progr. Hormon. Res.; 15:1-25 (1959)
- 60 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K.
Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.
Nature. 1999 Dec 9;402(6762):656-60
- 61 Kraemer WJ, Hakkinen K, Newton RU, Nindl BC, Volek JS, McCormick M, Gotshalk LA, Gordon SE, Fleck SJ, Campbell WW, Putukian M, Evans WJ.
Effects of heavy-resistance training on hormonal response patterns in younger vs. older men.
J Appl Physiol. 1999 Sep;87(3):982-92.
- 62 Kratzsch J, Selisko T, Birkenmeier G.
Identification of transformed alpha 2-macroglobulin as a growth hormone-binding protein in human blood.
J Clin Endocrinol Metab. 1995 Feb;80(2):585-90.
- 63 Laos C, Metz J.
Performance-enhancing drug use in young athletes.
Adolesc Med Clin. 2006 Oct;17(3):719-31
- 64 Lasne F, de Ceaurriz J.
Recombinant erythropoietin in urine.
Nature. 2000 Jun 8;405(6787):635.
- 65 Lee S, Barton ER, Sweeney HL, Farrar RP.
Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats.
J Appl Physiol. 2004 Mar;96(3):1097-104.
- 66 Leger J, Reverchon C, Porquet D, Noel M, Czernichow P.
The wide variation in urinary excretion of human growth hormone in normal growing and growth hormone-deficient children limits its clinical usefulness.
Horm Res. 1995;44(2):57-63.
- 67 Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A.
The somatomedin hypothesis: 2001.
Endocr Rev. 2001 Feb;22(1):53-74.

- 68 Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, Barnard R, Waters MJ, Wood WI.
Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression.
Nature. 1987 Dec 10-16;330(6148):537-43.
- 69 Lewis UJ, Singh RN, Bonewald LF, Seavey BK.
Altered proteolytic cleavage of human growth hormone as a result of deamidation.
J Biol Chem. 1981 Nov 25;256(22):11645-50.
- 70 Li CH, Dixon JS.
Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone
Arch Biochem Biophys. 1971 Sep;146(1):233-6.
- 71 Longobardi S, Keay N, Ehrnborg C, Cittadini A, Rosen T, Dall R, Boroujerdi MA, Bassett EE, Healy ML, Pentecost C, Wallace JD, Powrie J, Jorgensen JO, Sacca L.
Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study. The GH-2000 Study Group.
J Clin Endocrinol Metab. 2000 Apr;85(4):1505-12.
- 72 Marie, P.
Sur deux cas d'acromegalie, hypertrophie singuliere non congenital des extremités superieures, inferieures et cephaliques
Rev. Med. 6 :297-333(1886).
- 73 McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ.
Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.
Nature. 1997 May 1;387(6628):83-90.
- 74 Merola B, Cittadini A, Colao A, Ferone D, Fazio S, Sabatini D, Biondi B, Sacca L, Lombardi G.
Chronic treatment with the somatostatin analog octreotide improves cardiac abnormalities in acromegaly.
J Clin Endocrinol Metab. 1993 Sep;77(3):790-3.
- 75 Merola B, Longobardi S, Sofia M, Pivonello R, Micco A, Di Rella F, Esposito V, Colao A, Lombardi G.
Lung volumes and respiratory muscle strength in adult patients with childhood- or adult-onset growth hormone deficiency: effect of 12 months' growth hormone replacement therapy.
Eur J Endocrinol. 1996 Nov;135(5):553-8.
- 76 Mullis P.E.
Doping in sport – preface
Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism Vol. 14 (2000)

- 77 Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N.
Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle.
Nat Genet. 2001 Feb;27(2):195-200.
- 78 Nass R, Huber RM, Klauss V, Muller OA, Schopohl J, Strasburger CJ.
Effect of growth hormone (hGH) replacement therapy on physical work capacity and cardiac and pulmonary function in patients with hGH deficiency acquired in adulthood.
J Clin Endocrinol Metab. 1995 Feb;80(2):552-7.
- 79 Niwa M, Sato S, Saito Y, Uchiyama F, Ono H, Yamashita M, Kitaguchi T, Shiga Y, Notani J, Yamada H, et al.
Chemical synthesis, cloning, and expression of genes for human somatomedin C (insulin-like growth factor I) and 59Val-somatomedin C.
Ann N Y Acad Sci. 1986;469:31-52.
- 80 Pelosi L, Giacinti C, Nardis C, Borsellino G, Rizzuto E, Nicoletti C, Wannenes F, Battistini L, Rosenthal N, Molinaro M, Musaro A.
Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines.
FASEB J. 2007 May;21(7):1393-402.
- 81 Pincock S.
Feature: Gene doping.
Lancet. 2005 Dec;366 Suppl 1:S18-19.
- 82 Popii V, Baumann G.
Laboratory measurement of growth hormone.
Clin Chim Acta. 2004 Dec;350(1-2):1-16.
- 83 Postel-Vinay MC, de Mello Coelho V, Gagnerault MC, Dardenne M.
Growth hormone stimulates the proliferation of activated mouse T lymphocytes.
Endocrinology. 1997 May;138(5):1816-20.
- 84 Reiter EO, Morris AH, MacGillivray MH, Weber D.
Variable estimates of serum growth hormone concentrations by different radioassay systems.
J Clin Endocrinol Metab. 1988 Jan;66(1):68-71.
- 85 Richter SD, Schurmeyer TH, Schedlowski M, Hadicke A, Tewes U, Schmidt RE, Wagner TO.
Time kinetics of the endocrine response to acute psychological stress.
J Clin Endocrinol Metab. 1996 May;81(5):1956-60.

- 86 Rosenbloom AL.
The role of recombinant insulin-like growth factor I in the treatment of the short child.
Curr Opin Pediatr. 2007 Aug;19(4):458-64.
- 87 Salomon F, Cuneo RC, Hesp R, Sonksen PH.
The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency.
N Engl J Med. 1989 Dec 28;321(26):1797-803.
- 88 Saugy M, Robinson N, Saudan C, Baume N, Avois L, Mangin P
Human growth hormone doping in sport.
Br J Sports Med. 2006 Jul;40 Suppl 1:i35-9.
- 89 Schneider AJ, Friedmann T.
Gene doping in sports: the science and ethics of genetically modified athletes.
Adv Genet. 2006;51:1-110.
- 90 Sonksen PH.
Insulin, growth hormone and sport.
J Endocrinol. 2001 Jul;170(1):13-25.
- 91 Stolar MW, Amburn K, Baumann G.
Plasma "big" and "big-big" growth hormone (GH) in man: an oligomeric series composed of structurally diverse GH monomers.
J Clin Endocrinol Metab. 1984 Aug;59(2):212-8.
- 92 Strasburger CJ, Wu Z, Pflaum CD, Dressendorfer RA.
Immunofunctional assay of human growth hormone (hGH) in serum: a possible consensus for quantitative hGH measurement.
J Clin Endocrinol Metab. 1996 Jul;81(7):2613-20.
- 93 Thorner MO, Vance ML, Law ERJ, Horvath E, Kovacs K
The anterior pituitary.
Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. Williams textbook of endocrinology, 9th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998:259-63
- 94 Wallace JD, Cuneo RC, Baxter R, Orskov H, Keay N, Pentecost C, Dall R, Rosen T, Jorgensen JO, Cittadini A, Longobardi S, Sacca L, Christiansen JS, Bengtsson BA, Sonksen PH.
Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: a potential test for GH abuse in sport.
J Clin Endocrinol Metab. 1999 Oct;84(10):3591-601.

- 95 Wallace JD, Cuneo RC, Lundberg PA, Rosen T, Jorgensen JO, Longobardi S, Keay N, Sacca L, Christiansen JS, Bengtsson BA, Sonksen PH.
Responses of markers of bone and collagen turnover to exercise, growth hormone (GH) administration, and GH withdrawal in trained adult males.
J Clin Endocrinol Metab. 2000 Jan;85(1):124-33.
- 96 World Anti Doping Agency:
Prohibited List
[http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2007_List_En.pdf]
- 97 Wu Z.
Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von monoklonalen anti-hGH-, anti-hGG-Rezeptor- und idiotypischen anti-hGH-Antikörpern.
Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität zu München (1998)
- 98 Wu Z, Bidlingmaier M, Dall R, Strasburger CJ.
Detection of doping with human growth hormone.
Lancet. 1999 Mar 13;353(9156):895.
- 99 Yarasheski KE, Campbell JA, Smith K, Rennie MJ, Holloszy JO, Bier DM.
Effect of growth hormone and resistance exercise on muscle growth in young men.
Am J Physiol. 1992 Mar;262(3 Pt 1):E261-7.
- 100 Yarasheski KE, Zachweija JJ, Angelopoulos TJ, Bier DM.
Short-term growth hormone treatment does not increase muscle protein synthesis in experienced weight lifters.
J Appl Physiol. 1993 Jun;74(6):3073-6.

7. Anhang

7.1. Versuchsprotokolle

7.1.1. Allgemeiner Teil

I. PROBENHERSTELLUNG

Herstellung der hGH-Standards

Entnahme von standardisiertem hypophysärem hGH (1 µg/ml) und Verdünnung auf 100 ng/ml, 10 ng/ml, 10 ng/ml, 1ng/ml mit LKC oder PBS-V (LKC-frei). Je 10 µl pro hGH-Standard abpipettieren >>> hGH-Standard-Mengen mit 10,1,100,10 und 1 ng.	
Inkubation jeder Probe mit 3 µl reduzierendem Puffer (5 Min, 95°C). red	Inkubation jeder Probe mit 3 µl nicht-reduzierendem Puffer (30 Min, RT). n-red
Nach Abkühlen in Geltasche pipettieren.	In Geltasche pipettieren.

Herstellung weiterer GH-Standards sowie sonstiger Proben

Entnahme und evtl. Verdünnung wie bei hGH-Standards.	
Inkubation jeder Probe mit 3 µl reduzierendem Puffer (5 Min, 95°C). red	Inkubation jeder Probe mit 3 µl nicht-reduzierendem Puffer (30 Min, RT). n-red
Nach Abkühlen in Geltasche pipettieren.	In Geltasche pipettieren.

Herstellung der Nativproben

Serumproben entnehmen und mit H ₂ O dest. verdünnen: Hierzu 1 µl Serum + 9 µl H ₂ O dest	
Inkubation jeder Probe mit 3 µl reduzierendem Puffer (5 Min, 95°C). red	Inkubation jeder Probe mit 3 µl reduzierendem Puffer (5 Min, 95°C). n-red
Nach Abkühlen in Geltasche pipettieren.	In Geltasche pipettieren.

Immunpräzipitation der Serumproben (Version A)

+ Puffer (LKC oder PBS-V (LKC-frei)) + Paramagnetische Beads (st = streptavidinbeschichtet SaM = Schaf, anti-Maus)	} im Volumen-Verhältnis 1:1
+ Antikörper (pKaGH-b = polyklonal / Kaninchen, anti-hGH, biotinyliert, mMaGH = monoklonal / Maus, anti-hGH, mMaGH-b = monoklonal / Maus, anti-hGH, biotinyliert) [Code bei monoklonalen Antikörpern]	
Schüttelinkubation (RT)	
+ Serum + Puffer (LKC oder PBS-V (LKC-frei))	} im Volumen-Verhältnis 1:1
Schüttelinkubation (RT)	
Waschvorgang (s.u.) im Anschluss	

Immunpräzipitation der Serumproben (Version B)

+ Serum + Puffer (LKC oder PBS-V (LKC-frei))	} im Volumen-Verhältnis 1:1
+ Antikörper pKaGH-b = polyklonal / Kaninchen, anti-hGH, biotinyliert, mMaGH = monoklonal / Maus, anti-hGH, mMaGH-b = monoklonal / Maus, anti-hGH, biotinyliert) [Code bei monoklonalen Antikörpern]	
Schüttelinkubation (RT)	
+ Puffer (LKC oder PBS-V (LKC-frei)) + Paramagnetische Beads (st = streptavidinbeschichtet SaM = Schaf, anti-Maus)	} im Volumen-Verhältnis 1:1
Schüttelinkubation (RT)	
Waschvorgang (s.u.) im Anschluss	

Waschvorgang:

- Ak-Hormon-Bead-Komplex mit Magnet von Restflüssigkeit trennen und diese verwerfen.
- + 600 µl bis 1 ml LKC (20%) oder PBS-W (**LKC-frei**)
- Komplex mit Magnet von Flüssigkeit trennen und verwerfen dieser.
(Vorgang kann bis zu 3 mal wiederholt werden)
- Probengefäße für wenige Sekunden bei 14000 g zentrifugieren.

Inkubation jeder Probe mit 3 µl reduzierendem Puffer (5 Min, 95°C).	Inkubation jeder Probe mit 3 µl nicht- reduzierendem Puffer (30 Min, RT).
--	--

red**n-red**

Probengefäße für 3 Min bei 7000 g zentrifugieren.

Nach Abkühlen in Geltasche
pipettieren.

In Geltasche pipettieren.

II. SDS-GELELEKTROPHORESE

<i>in Mini-Protean II Dual Slab Cell, BioRad bzw. Mini-Protean 3 Cell, BioRad</i>	
Gele	15 %ige SDS-Gele, selbsthergestellt
Dauer	Zwischen 1 und 2 Stunden
Stromspannung	Zwischen 100 und 200 Volt

III. WESTERN-BLOT

Proteintransfer

<i>in Trans Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BioRad</i>	
Stromstärke (Ampere [A])	0,1 A pro Membran
Dauer	2 h
Membran	Hybond-P, Amersham oder Hybond-ECL, Amersham
Transferstopp mit Blockmilch für 1h bei RT unter Bewegung.	

1. Antikörper-Inkubation

Bezeichnung	mMaGH = monoklonale Antikörper / Maus, anti-hGH pKaGH = polyklonale Antikörper / Kaninchen, anti-hGH (-b = biotinyliert) [Code bei monoklonalen Antikörpern]
Dauer der Inkubation	>12 h, < 24 h
Inkubationstemperatur	4°C

Membran mit Waschlösung inkubieren:
3 mal 5 ml (wenige Sekunden), 3 mal 10 ml (1 mal 15 Min, 10 Min, 5 Min).

2. Antikörper-Inkubation

Bezeichnung	Stav-POD : Streptavidin mit Peroxidase konjugiert SaK-MRP : Ig / Schaf, anti-Kaninchen mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ZaM-Fc-POD : Anti-Maus-Fc IgG / Ziege, Peroxidase-konjugiert ZaK-Fc-POD : Anti-Kaninchen-Fc IgG / Ziege, Peroxidase-konjugiert
Dauer der Inkubation	>12 h, < 24 h
Inkubationstemperatur	4°C

Membran mit Waschlösung inkubieren:
3 mal 5 ml (wenige Sekunden), 3 mal 10 ml (1 mal 15 Min, 10 Min, 5 Min).

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz (Marke, Hersteller)	ECL: <i>Enhanced Chemiluminescence (ECL) Kit</i> , Amersham LLP: <i>Lumi-Light-Plus, Western Blotting Kit (Maus / Kanichen)</i> , Roche Diagnostics Corp. SS: <i>Super Signal®</i> , West Femto, Pierce
Signaldetektion i.d.R. auf <i>ECL-Hyperfilm</i> , Amersham.	
Filmbelichtung variabel zwischen wenigen Minuten bis mehreren Stunden (ECL) und wenigen Sekunden bis Minuten (LLP)	

7.1.2. Spezieller Teil

[Protokoll 3.1.1.]

I. PROBENHERSTELLUNG

Herstellung der hGH-Standards

14x hGH-Standard (10 ng)	
7 x red	7 x n-red

Herstellung weiterer GH-Standards

14x 20kD-hGH-Standard (10 ng)	
7 x red	7 x n-red

Herstellung der Nativproben

8 x 1 µl Serum / Akromegaliepatient (100 ng/ml)	
4 x red	4 x n-red

II. SDS-GELELEKTROPHORESE

III. WESTERN-BLOT

1. Antikörperinkubation

Bezeichnung	mMaGH [1: 1H6, 2: 6F1, 3: 7B11, 4: 10A7, 5: 3B4, 6: 7D5, 7: 5D7, 8: 1H6, 9: 7B11, 10:7D5, 11: 5D7]
Menge (Konz.*)	5 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 5 ml Antikörperlösung pro Membranstreifen)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaM-MRP
Menge (Konz.*)	3,33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 5 ml Antikörperlösung pro Membranstreifen)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	1

[Protokoll 3.1.2.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

36x hGH-Standard (10 ng)
red

Herstellung der Nativproben

36x 1 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 100 ng/ml)
red

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH [1: 5E1, 2: 3B4, 3: 5802, 4: 7E8, 5: 6A9, 6: 5809, 7: 8B11, 8: 7D5, 9: 5D7, 10:D5, 11: 10A7, 12: 1H6, 13: 7E8, 14:6F1, 15: 3G4, 16: 6C1, 17: 7C7, 18: 7B11]
Menge (Konz.*)	5 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 5 ml Antikörperlösung pro Membranstreifen)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaM-MRP
Menge (Konz.*)	3,33 µg (1:3000)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	1

[Protokoll 3.1.3.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung des rekombinanten hGH-Standards**

18x rekombinanter hGH-Standard (10ng)
red

II. SDS-GELELEKTROPHORESE

III. WESTERN-BLOT**1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH [1: 5E1, 2: 3B4, 3: 5802, 4: 7E8, 5: 6A9, 6: 5801, 7: 8B11, 8: 7D5, 9: 5D7, 10: D5, 11: 10A7, 12: 1H6, 13: 7F8, 14: 6F1, 15: 3G4, 16: 6C1, 17: 7C7, 18: 7B11]
Menge (Konz. *)	5 µg / Membranstreifen (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 5 ml Antikörperlösung pro Membranstreifen)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaM-MRP
Menge (Konz. *)	3,33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 5 ml Antikörperlösung pro Membranstreifen)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	1

[Protokoll 3.1.4.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

2x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg)
red

Immunpräzipitierung der Serumproben

4x + 2 µg pKaGH-b + 50 µl Beads-st	
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min	
2x + 150 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 15 ng/ml)	2x + 150 µl Serum / Kontrollproband (hGH-Konz.: <0,2 ng/ml)
Schüttelinkubation bei RT für 1h 30 Min	
Waschvorgang	
red	

II. SDS-GELELEKTROPHORESE

III. WESTERN-BLOT**1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]	pKaGH
Menge (Konz. *)	10 µg (1:1000)	

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	ZaM-Fc-POD	ZaK-Fc-POD
Menge (Konz. *)	3,33 µg (1:3000)	

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	LLP
Volumen / Flüssigkeit (ml)	2,5
Inkubationszeit (Min)	5

[Protokoll 3.1.5.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Immunpräzipitierung der Serumproben**

6x + 2 µg pKaGH-b		
2x +150 µl Serum / Kontrollproband (hGH-Konz.: <0,2 ng/ml)	2x + 150 µl Serum / hGH-behandelter Athlet / Kreisha (hGH-Konz.: 10 ng/ml)	2x + 150 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 10,1 ng/ml)
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min		
+ 50 µl Beads-st		
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min		
Waschvorgang		

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]	mMaGH, [7D5]
Menge (Konz. *)	10 µg (1:1000)	

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaK-MRP
Menge (Konz. *)	2,5 µg (1:4000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membranstreifen)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	5

[Protokoll 3.1.6.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

2x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg)
red

Immunpräzipitierung der Serumproben

8x + 2 µg pKaGh-b + 50 µl Beads-st			
Schüttelinkubation bei RT für 30 Min			
2x + 200 µl Serum / GH-behandelter Proband / Dall (Ges.-GH-Konz.: 12 ng/ml)	2x + 100 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 3 ng/ml)	2x + 100 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 10 ng/ml)	2x + 100 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 30 ng/ml)
Schüttelinkubation bei RT für 1 h			
Waschvorgang			
red			

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11] + mMaGH, [7D5]	mMaGH, [6F1]
Menge (Konz.*)	5 µg/Ak, 10 µg (1:1000)	10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaK-MRP
Menge (Konz.*)	3,33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	5

[Protokoll 3.1.7.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

4x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg)
red

Immunpräzipitierung der Serumproben

2x + 2 µg pKaGH-b + 50 µl Beads-st	
Schüttelinkubation bei RT für 30 Min	
1x + 500 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 5 ng/ml) / GH2000	1x + 500 µl Serum / GH-substituierter Athlet / GH2000 (Ges.-GH-Konz.: 5 ng/ml)
Schüttelinkubation bei RT für 1h	
Waschvorgang	
red	

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]	mMaGH, [7B11] + mMaGH [7D5]
Menge (Konz.*)	10 µg (1:1000)	5 µg/Ak, 10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaK-MRP
Menge (Konz.*)	3,33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	1

[Protokoll 3.2.1.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

2x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg 10 pg, 1 pg)
red

Immunpräzipitierung der Serumproben

2x	
+ 2 µg pKaGH-b	
+ 50 µl Beads-st	
Schüttelinkubation bei RT für 1h 20 Min	
+ 250 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 8,2 ng/ml)	+ 250 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 8,6ng/ml)
Schüttelinkubation bei RT für 1h 30 Min	
Waschvorgang	
red	

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH-b, [7B11]	1.2 mMaGH, [7B11]
Menge (Konz. *)	10 µg (1:1000)	

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	Stav-POD	SaK-MRP
Menge (Konz. *)	3,33 µg (1:3000)	

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	5

[Protokoll 3.2.2.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

4x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg 10 pg)
red

Immunpräzipitierung der Serumproben

4x + 2 µg pKaGH-b + 100 µl Serum / Kontrollproband (hGH-Konz.: <0,2 ng/ml)	4x + 2 µg pKaGH-b + 100 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 10 ng/ml)
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min	
+ 50 µl Beads-st	
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min	
Waschvorgang	
red	

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]
Menge (Konz. *)	10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaM-MRP (gekauft)		SaM-MRP (im Detektions-Kit mitgeliefert)	
Menge (Konz. *)	3,33 µg (1:3000)	2 µg (1:5000)	3,33 µg (1:3000)	2 µg (1:5000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	5

[Protokoll 3.3.1.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

1x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg 10 pg)
red

Immunpräzipitierung der Serumproben

1x + 2 µg pKaGh-b	1x + 2 µg mMaGH-b, [7B11]
+ 40 µl Beads-st	
Schüttelinkubation bei RT für 30 Min	
jeweils + 100 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 15,1 ng/ml)	
Schüttelinkubation bei RT für 1h	
Waschvorgang	
red	

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]
Menge (Konz.*)	10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaM-MRP
Menge (Konz.*)	3.33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	5

[Protokoll 3.3.2.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

4x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg)
red

Immunpräzipitierung der Serumproben

4x + 2 µg pKaGH-b				4x + 4 µg pKaGH-b			
2x + 50 µl Beads-st		2x + 200 µl Beads-st		2x + 50 µl Beads-st		2x + 200 µl Beads-st	
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min							
+ 150 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 8,6 ng/ml)	+ 150 µl Serum / rec hGH subst. Patient (hGH-Konz.: 8,2 ng/ml)	+ 150 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 8,6 ng/ml)	+ 150 µl Serum / rec hGH subst. Patient (hGH-Konz.: 8,2 ng/ml)	+ 150 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 8,6 ng/ml)	+ 150 µl Serum / rec hGH subst. Patient (hGH-Konz.: 8,2 ng/ml)	+ 150 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 8,6 ng/ml)	+ 150 µl Serum / rec hGH subst. Patient (hGH-Konz.: 8,2 ng/ml)
Schüttelinkubation bei RT für 2 h 30 Min							
Waschvorgang							
red							

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]
Menge (Konz.*)	10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaM-MRP
Menge (Konz.*)	2,5 µg (1:4000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	5

[Protokoll 3.3.3.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

2x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg)	
red	n-red

Immunpräzipitierung der Serumproben

4x + 250 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 8,2 ng/ml) + 0,2 µg mMaGH [7B11]		4x + 25 µl Beads-SaM + 0,2 µg mMaGH [7B11]					
Schüttelinkubation für							
3 h (2x)	1 h (2x)	1 h (2x)	1 h (2x)				
pro Probe: + 25 µl Beads-SaM		pro Probe: + 250 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 8,2 ng/ml)					
Schüttelinkubation für							
1 h (2x)	1 h (2x)	3 h (2x)	1 h (2x)				
Waschvorgang							
red	n-red	red	n-red	red	n-red	red	n-red

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH-b, [7B11]
Menge (Konz. *)	10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	Stav-POD
Menge (Konz. *)	3,33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	5

[Protokoll 3.4.1.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

2x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg 10 pg, 1 pg)	
red	n-red

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11] + mMaGH, [7D5]
Menge (Konz. *)	5 µg / Ak, 10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaK-MRP
Menge (Konz. *)	3,33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	0,75
Inkubationszeit (Min)	1

[Protokoll 3.4.2.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

2x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg 10 pg, 1 pg)	
red	n-red

Immunpräzipitierung der Serumproben

4x	
+ 2 µg mMaGH, [7B11]	
+ 195 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 13,2 ng/ml)	
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min	
+ 50 µl Beads-SaM	
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min	
Waschvorgang	
red	n-red

II. SDS-GELELEKTROPHORESE

III. WESTERN-BLOT**1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH-b, [7B11-b]
Menge (Konz. *)	10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	Stav-POD
Menge (Konz. *)	3,33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0
Inkubationszeit (Min)	1

[Protokoll 3.5.1.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

2x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg 10 pg, 1 pg)
red

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11] + mMaGH, [7D5]
Menge (Konz. *)	10 µg (1:1000), pro Ak 5 µg

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaK-MRP
Menge (Konz. *)	3,33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL	SS
Volumen / Flüssigkeit (ml)	0,75	0,1
Inkubationszeit (Min)	1	6

[Protokoll 3.5.2.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

2x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg 10 pg, 1 pg)
red

Immunpräzipitierung der Serumproben

8x + 2 µg pKaGh-b + 50 µl Beads-st		
Schüttelinkubation bei RT für 1h 20 Min		
2x + 150 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH- Konz.: 10 ng/ml)	2x + 100 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH- Konz.: 10 ng/ml)	4x + 100 µl Serum / Kontrollproband (hGH-Konz.: <0,2 ng/ml)
Schüttelinkubation bei RT für 1h 30 Min		
Waschvorgang		
red		

II. SDS-GELELEKTROPHORESE

III. WESTERN-BLOT**1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]
Menge (Konz. *)	10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaK-MRP
Menge (Konz. *)	2,5 µg (1:4000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

V. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL	LLP
Volumen / Flüssigkeit (ml)		1,0
Inkubationszeit (Min)		5

[Protokoll 3.5.3.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

2x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg)
red

Immunpräzipitierung der Serumproben

4x
+ 50 µl Beads-st
+ 2 µg pKaGH-b
Schüttelinkubation für 1h
jeweils
+ 200 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 6,7 ng/ml)
Schüttelinkubation für 1h 30 Min
Waschvorgang
red

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]
Menge (Konz. *)	10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaM-MRP
Menge (Konz. *)	3,33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL	LLP
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1,0	1,0
Inkubationszeit (Min)	1	1
Signale sichtbar machen durch	belichten und entwickeln von Hyperfilm-ECL, Amersham	einscannen mit Typhoon, Amersham

[Protokoll 3.6.1.]**I. PROBENHERSTELLUNG****Herstellung der hGH-Standards**

2x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg)	
red	n-red

Immunpräzipitierung der Serumproben

4x + 2 µg pKaGH-b + 50 µl Beads-st	
Schüttelinkubation bei RT für 30 Min	
2x + 250 µl Serum / Akromegaliepatient (hGH-Konz.: 11,7 ng/ml)	2x + 250 µl Serum / GH-substituierter Patient (Ges-GH-Konz.: 4 ng/ml)
Schüttelinkubation bei RT für 1h	
red	n-red
Waschvorgang	

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11] + mMaGH, [7D5]
Menge (Konz.*)	5 µg/Ak, 10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaK-MRP
Menge (Konz.*)	3,33 µg (1:3000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	0,75
Inkubationszeit (Min)	1

[Protokoll 3.6.2.]**I. PROBENHERSTELLUNG** (LKC-frei)**Herstellung der hGH-Standards**

3x hGH-Standard (10 ng, 1 ng, 100 pg 10 pg, 1 pg)
red

Immunpräzipitierung der Serumproben

9x + 2 µg pKaGH-b						
3x Serum / Kontrollproband mit hGH-Konz. / Volumen:	3x Serum / hGH-behandelterAthlet / Kreischa mit Ges.GH-Konz. / Volumen:			3x Serum / Akromegaliepatient mit Ges.GH-Konz. / Volumen:		
<0,2 ng/ml / 150 µl	10 ng/ml / 150 µl	30 ng/ml / 50 µl	16 ng/ml / 95 µl	14,8 ng/ml / 100 µl	10,1 ng/m / 150 µl	9,3 ng/ml / 160 µl
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min						
+ 50 µl Beads-st						
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min						
Waschvorgang						
red						

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]
Menge (Konz. *)	10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	SaK-MRP
Menge (Konz. *)	2,5 µg (1:4000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	1
Inkubationszeit (Min)	5

[Protokoll 3.6.3.]**I. PROBENHERSTELLUNG** (LKC-frei)**Immunpräzipitierung der Serumproben**

8x + 2 µg pKaGH-b					
2x + Serum / Kontrollproband	4x + Serum / hGH-behandelter Athlet / Kreisch		6x + Serum / Akromegaliepatient		
hGH-Konz / Volumen:	hGH-Konz / Volumen:		hGH-Konz / Volumen:		
<0,2 ng/ml / 150 µl	2x 12,7 ng/ml / 118 µl	2x 19,1 ng/ml / 78 µl	2x 12,1 ng/ml / 123 µl	2x 13,6 ng/ml / 110 µl	2x 11,1 ng/ml / 135 µl
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min					
+ 50 µl Beads-st					
Schüttelinkubation bei RT für 1 h 30 Min					
Waschvorgang					
red					

II. SDS-GELELEKTROPHORESE**III. WESTERN-BLOT****1. Antikörperinkubation**

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]
Menge (Konz.*)	10 µg (1:1000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

2. Antikörperinkubation

Bezeichnung	mMaGH, [7B11]
Menge (Konz.*)	2,5 µg (1:4000)

(*Konzentration bezogen auf 10 ml Antikörperlösung pro Membran)

IV. SIGNALDETEKTION

Chemielumineszenz-Reagenz	ECL
Volumen / Flüssigkeit (ml)	2,0
Inkubationszeit (Min)	5

7.2. Danksagung

Danken möchte ich im Besonderen:

Herrn Prof. Dr. med. Christian J. Strasburger für die Überlassung des Themas, die engagierte und hervorragende Unterstützung bei der Arbeit sowie seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und Großzügigkeit,

Herrn Dr. med. Martin Bidlingmaier für die hervorragende Betreuung der Arbeit sowie mehrfache Durchsicht und Korrektur der schriftlichen Entwürfe,

Herrn Dr. med. Zida Wu für die ebenso hervorragende Arbeitsbetreuung und seine unendliche Geduld beim Vermitteln der Arbeitstechniken,

Frau Rita Schwaiger für ihre stete Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

7.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lukas Burget
 Geburtsdatum: 30.12.1974
 Geburtsort: Freiburg i. Br.
 Nationalität: Deutsch
 Eltern: Dr. Artur Burget
 Gertraud Burget
 Familienstand: Ledig

Ausbildung

09/81 – 07/85 Grundschule Kirchzarten
 09/85 – 06/94 Kolleg St. Sebastian, Stegen
 02/95 – 07/95 Geschichtswissenschaft
 Universidad de Chile, Santiago, Chile
 08/96 – 02/97 Humanmedizin
 Semmelweis-Universität, Budapest, Ungarn
 05/97 – 03/2000 Humanmedizin
 Georg-August-Universität, Göttingen
 03/99 Physikum
 03/2000 1. Staatsexamen
 04/2000 – 07/04 Humanmedizin
 Ludwig-Maximilian-Universität, München
 03/03 2. Staatsexamen
 04/03 – 03/04 Praktisches Jahr:
 04/03 – 08/03 Anästhesiologie, Krankenhaus Starnberg
 08/03 – 11/03 Chirurgie, Hospital San Pau, Barcelona
 11/03 – 03/04 Innere Medizin, Poliklinik der LMU München
 04/04 3. Staatsexamen
 06/04 – 11/04 Forschungsaufenthalt
 University of Cincinnati, Cincinnati, USA
 01/05 – 03/07 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik – Innenstadt,
 Ludwig-Maximilians-Universität München
 Seit 05/07 Assistenzarzt am Département Medizin,
 Kantonsspital Luzern, Schweiz