

Entwicklung einer parallelen Mehrkomponentenanalyse von Antigen-Antikörper-Reaktionen in der Dopinganalyse

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Biochemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Kai Wunderlich

Potsdam, den 29. September 2014

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung – Keine kommerzielle Nutzung – Keine Bearbeitung 4.0
International

Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus4-76869](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-76869)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-76869>

Das Leben ist wie ein Fahrrad. Man muss sich vorwärts bewegen, um das Gleichgewicht nicht zu verlieren.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
1. Motivation	1
1.1. Doping im gesellschaftlichen und sportlichen Kontext	1
1.2. Dopingverbote und die Notwendigkeit von Dopingkontrollen	5
1.3. Möglichkeiten und Perspektiven für Point-of-care-Tests bei Dopingkontrollen	7
2. Grundlagen	9
2.1. Der Begriff Doping und die Einteilung von Substanzklassen in die Verbotsliste der WADA	9
2.2. Analytische Methoden zur Detektion von Dopingmitteln . . .	12
2.2.1. Die Gaschromatographie/Massenspektrometrie als eta- blierte analytische Methode für die Dopinganalytik . .	13
2.2.2. Immunoassay basierende Nachweismethoden für die Detektion von Peptidhormonen und Wachstumsfaktoren	15
2.2.3. Funktionsweise der Antikörper und ihre Rolle in Immunoassays	16
2.3. Peptidhormone als Kandidaten für die Entwicklung eines Multiparameter Dopingtests	19
2.3.1. Das Luteinisierende Hormon (LH) und seine Rolle als Dopingmittel	20
2.3.2. Das humane Chorionogonadotropin (hCG-i) und seine Rolle als Dopingmittel	23
2.3.3. Varianten dieser Peptidhormone und pharmakologische Grenzwerte	24
2.4. Technisches Konzept	25

3. Material und experimentelle Arbeiten	29
3.1. Materialien	29
3.1.1. Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Antikörper/Peptidhormone und Software	29
3.2. Experimentelle Arbeiten	35
3.2.1. Ermitteln der Antikörper-Spezifität über Western Blot Versuche	35
3.2.2. Optimieren der Versuchsparameter auf Mikroarray-Glasobjektträgern	38
3.2.3. Herstellen und Lagerung der Mikroarrays auf Glasobjektträgern als Vorstufe der Assay Durchführung	39
3.2.4. Verifizieren der Western Blot Ergebnisse zur Feststellung der Kreuzreaktivität auf Mikroarray-Glasobjektträger	41
3.2.5. Durchführung des Assays und ermitteln der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze (LOD/LOQ) auf den Mikroarray-Glasobjektträgern	43
3.2.6. Messen von Referenz- und Realproben (Serum/Blut) .	44
3.2.7. Ermitteln der diagnostischen Sensitivität und Spezifität über einen Einfach-Blind-Ansatz	45
3.2.8. Erstellen einer ROC-Analyse aus den Daten des Einfach-Blind-Ansatz	47
3.2.9. Lagerstabilitätstest der Mikroarray-Glasobjektträger über zwölf Wochen	50
4. Ergebnisse	53
4.1. Ergebnisse zur Messung der Kreuzreaktivität über die Western Blot Analyse	53
4.1.1. Auswahl der Antikörper für den Versuchsaufbau . . .	53
4.1.2. Überprüfen der Proteinkonzentration der Peptidhor- mone über SDS-PAGE und Coomassie Färbung	53
4.1.3. Western Blot Versuche zur Ermittlung der spezifischen Bindung an den Untereinheiten der Peptidhormone .	55
4.2. Optimierung der Assay Parameter auf dem Mikroarray	59

4.3.	Mikroarray Versuche zur Ermittlung der Kreuzreaktivität . . .	60
4.3.1.	Mikroarray Versuche mit zeitgleicher Verwendung verschiedener Detektionsantikörper auf Referenzmaterial	63
4.4.	Ermitteln der Bestimmungsgrenze der Peptidhormone auf dem Mikroarray	67
4.4.1.	Konzentrationsreihe des hCG-intakt in 1 x PBS Puffer	67
4.4.2.	Konzentrationsreihe des hCG- β in 1 x PBS Puffer . . .	68
4.4.3.	Konzentrationsreihe des LH in 1 x PBS Puffer	69
4.5.	Vermessen von Realproben auf Glas und Polymer Objektträger	70
4.6.	Durchführen einer Performance-Analyse zur Ermittlung der D-SN und D-SP	72
4.6.1.	Ermittlung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität von LH, hCG-intakt und hCG- β	72
4.7.	Lagerstabilitätstest der Mikroarrays hinsichtlich der Mess- resultate	77
4.7.1.	Lagerstabilitätstest über zwölf Wochen zur Detektion von hCG-intakt	77
4.7.2.	Lagerstabilitätstest über zwölf Wochen zur Detektion von hCG- β	79
4.7.3.	Lagerstabilitätstest über zwölf Wochen zur Detektion von LH	80
5.	Diskussion	83
6.	Ausblick	93
7.	Zusammenfassung	95
	Literaturverzeichnis	99
A.	Anhang	111
A.1.	Puffer und Lösungen	111
A.1.1.	SDS-Gel Zusammensetzung für Trenn- und Sammelgel	113
A.2.	Tabellen	114
A.3.	Publikationen	126
A.3.1.	Peer-reviewed Veröffentlichungen	126

A.3.2. Vorträge sowie Poster und nicht peer-reviewed Veröffentlichungen	127
A.4. Lebenslauf	128
A.5. Danksagung	129
A.6. Eidesstattliche Erklärung	130

Tabellenverzeichnis

3.1.1. Verwendete Geräte	29
3.1.2. Verwendete Verbrauchsmaterialien	30
3.1.3. Verwendete Chemikalien und Lösungen	31
3.1.4. Antikörper	32
3.1.5. Peptidhormone und Probenmaterial	33
3.1.6. Verwendete Software	34
3.2.1. Gelbeladung SDS-PAGE	36
3.2.2. Western Blot Versuchsanordnung	37
3.2.3. Versuchsschema Kreuzreaktivität auf Mikroarray	42
3.2.4. Klassifizieren der Messergebnisse über eine Wahrheitsmatrix	48
3.2.5. Probenumfang zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit über zwölf Wochen	51
4.1.1. Kreuzreaktivitätstest der monoklonalen Fängerantikörper . .	56
4.1.2. Kreuzreaktivitätstest der polyklonalen Detektionsantikörper .	57
4.2.1. Vergleich von Waschlösungen auf prozessierter Mikroarrays .	60
4.3.1. Kreuzreaktivitätsversuch mit hCG-i auf Mikroarrays der Detektions- und des Sekundärantikörper in 1 x PBS	61
4.3.2. Ermitteln von Matrixeffekten und Kreuzreaktivitäten in komplexen Proben	65
4.5.1. Vermessen von Realproben auf Glas und Polymer Objektträger	71
4.6.1. ROC Kurven der Performance-Analyse von 130 Serum Proben	73
4.6.2. Analytische Interpretation der 130 Proben aus dem Einfach-Blind-Ansatz	75
4.6.3. Auswertung der Probenkollektivs vom Institut für Biochemie in Köln	76
4.7.1. Lagerstabilitätstest der Mikroarrays für das hCG-i über zwölf Wochen	78

4.7.2. Lagerstabilitätstest der Mikroarrays für das hCG- β über zwölf Wochen	80
4.7.3. Stabilitätstest der Mikroarrays für das LH über zwölf Wochen	81
A1. Probenschlüssel der 130 Serumproben für die Performance-Analyse	114
A2. Kreuzreaktivitätsversuch auf Mikroarrays der Detektions- und des Sekundärantikörper bei unterschiedlichen hCG-i Konzentrationen in 1 x PBS	118
A3. Kreuzreaktivitätsversuch auf Mikroarrays der Detektions- und des Sekundärantikörper bei unterschiedlichen hCG-i Konzentrationen in Referenzmaterial	119
A4. Kreuzreaktivitätsversuch auf Mikroarrays der Detektions- und des Sekundärantikörper in Referenzmaterial	120
A5. Ermitteln von Matrixeffekten und Kreuzreaktivitäten in komplexen Proben	121
A6. Auswertung der Probenkollektivs vom Institut für Biochemie in Köln	122
A7. Stabilitätstest der Mikroarrays für das hCG-i über zwölf Wochen	123
A8. Stabilitätstest der Mikroarrays für das hCG- β über zwölf Wochen	124
A9. Stabilitätstest der Mikroarrays für das LH über zwölf Wochen	125

Abbildungsverzeichnis

2.1.	Liste der verbotenen Substanzen 2013 der WADA	11
2.2.	Analytik von Dopingproben	13
2.3.	Fließschema der Arbeit	27
3.1.	Spotmuster der Mikroarrays	40
4.1.	SDS-PAGE zur Überprüfung der Proteinkonzentration	54
4.2.	Zusammenfassung des Mikroarray Kreuzreaktivitätstest auf GLYMO modifizierten Glas-Objektträgern	66
4.3.	Konzentrationsreihe des humanes Choriongonadotropin hCG in 1 x PBS	67
4.4.	Konzentrationsreihe des hCG- β in 1 x PBS Puffer	68
4.5.	Konzentrationsreihe des LH in 1 x PBS Puffer	69
4.6.	Konzentrationsreihe des LH in Vollserum	70

1. Motivation

1.1. Doping im gesellschaftlichen und sportlichen Kontext

Die Manipulation mit pharmakologischen Hilfsstoffen, um sich dadurch einen Vorteil im Wettkampf oder Wettbewerb zu verschaffen, ist beinahe so alt wie die Menschheit selbst. [Burstin, 1963] Unter anderem wurden halluzinogene Pilze bereits bei den Olympischen Spielen der Antike (776 v. Chr. und 393 n. Chr.) zur Leistungssteigerung verwendet. [Hanley, 1983; Prokop, 1972; Prokop, 1970; Burstin, 1963] Da aber erst in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts Regeln geschaffen wurden, die Doping einschränken, verbieten und kontrollieren, kann nur vermutet werden, inwiefern vorher sportliche Wettkämpfe unter Hilfe von Doping stattfanden. In den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden auf Grund von Todesfällen im Radsport von Sportverbänden Anti-Dopingregeln aufgestellt. [Bowers, 2012] Stimulanzien und Narkotika waren die ersten Substanzklassen, gegen die Anti-Dopingregeln aufgestellt wurden. [WADA, 2014] Diese Regeln wurden in den folgenden Jahren erweitert und immer wieder angepasst. Auf der im Jahre 2003 durchgeführten Welt-Anti-Doping-Konferenz der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA) in Kopenhagen wurde der Welt-Anti-Doping-Code in Form der Kopenhagener Deklaration seitens des Sports angenommen. Die Dopingbekämpfung wird seitdem weltweit koordiniert und stellt für alle olympischen Verbände eine der Teilnahmevoraussetzung für die Olympischen Spiele dar. [BMI, 2014] Der heutige gültige Anti-Doping-Code wird von der WADA definiert, kontrolliert und regelmäßig gemäß wissenschaftlicher Erkenntnisse erweitert und angepasst.

Dieser Anti-Doping-Code soll die mit dem Sport ursprünglich verbundenen Werte, wie Ethik, Fairness und Ehrlichkeit, Gesundheit, Hochleistung, Teamgeist, Anerkennung von Regeln und Gesetzen, dem

1. Motivation

Respekt gegenüber der eigenen Person und gegenüber anderen sportlichen Wettstreitern sowie Gemeinschaftssinn und Solidarität erhalten. Dem gegenüber steht das Streben nach gesellschaftlicher Anerkennung, Aufstieg, Ruhm und sozialem Wohlstand. Die Zusammenfassung dieser Werte wird allgemein als Sportsgeist bezeichnet und macht das Wesen des Olympischen Gedankens aus. Er entspricht dem Verständnis von Fairness und einem ehrlichen sportlichen Wettbewerb. Demnach steht Doping im grundlegenden Widerspruch zum Geist des Sportes. [WADA, 2015]

In Zeiten des Kalten Krieges stellte Doping eine staatlich angeordnete und zum Teil geförderte Maßnahme unter anderem der Deutschen Demokratischen Republik (DDR) selbst bei unwissenden minderjährigen Sportlern dar. [Franke and Berendonk, 1997] Nach neuen Erkenntnissen spielten sich ähnlich staatlich angeordnete Szenarien auch in den alten Bundesländern ab. Dies geht aus einem vom Bundesinstitut für Sportwissenschaften (BISp) initiierten Forschungsprojekts *“Doping in Deutschland von 1950 bis heute aus historisch-soziologischer Sicht im Kontext ethischer Legitimation”* [BISp, 2013] hervor. In Zeiten des Kalten Krieges war der sportliche Wettkampf bei Weltmeisterschaften und Olympiaden ein Nebenschauplatz, auf dem über den Medaillenspiegel im Ländervergleich die Überlegenheit der eigenen Ideologie über dem Klassenfeind abgebildet werden sollte. Dies steht im Kontrast zu dem vom IOC verfassten Zitat *“The Olympic Games are competitions between athletes in individual or team events and not between countries”* welches zusammengefasst auf Seite 16 der Olympic Charter des Internationalen Olympischen Komitee von 2004 steht.

Vor allem zwischen den USA und der BRD sowie den sozialistischen Staaten der ehemaligen Sowjetunion und DDR, spiegelt sich an dem Beispiel des Medaillenspiegels bei Olympischen Spiele wieder. [Maennig and Wellbrock, 2008; Johnson and Ali, 2004] Nach dem Zusammenbruch der sozialistischen Staaten und dem Ende des Kalten Krieges verschob sich die Motivation für die Einnahme leistungssteigernder Substanzen mehr und mehr in Richtung Geld und Ruhm sowie sozialem Aufstieg für Sportler aus ärmeren Ländern. [Campbell *et al.*, 2005] Gerade für Sportler aus Ländern, die eine schlechte wirtschaftliche Infrastruktur aufweisen, stellt der sportliche Erfolg eine Tür zu einem besseren Leben dar.

Bei Sportarten, die in den vergangenen Jahren vermehrt durch Dopingvergehen aufgefallen sind, nimmt der Radsport eine besondere Rolle ein.

1.1. Doping im gesellschaftlichen und sportlichen Kontext

Gerade in Sportarten mit hohem Medieninteresse und entsprechenden Sponsorverträgen ist der Schritt zum Dopen besonders klein, was dazu führte, dass hier das systematische Dopen zum Teil über die Teamstruktur organisiert und kontrolliert wurde. Das geht aus dem Festina-Skandal bei der Tour de France 1998 und dem Dossier der amerikanischen Anti-Doping Agentur (USADA) im Fall von Lance Armstrong von 2012 hervor. [USADA, 2001]

In der Literatur sind weiterhin Fälle von Hochleistungssportlern beschrieben, die nachweislich durch Medikamentenmissbrauch und Doping mit dem Ziel der Leistungssteigerung zu Tode gekommen sind. Hier sind als Beispiele aus dem Radsport der britische Radrennfahrer Tom Simpson (†13. Etappe Tour de France 1967, Amphetamine und Alkohol) und der Italienische Radrennfahrer Marco Pantani (†2004) zu nennen.

Für Hochleistungssportler gibt es zwei Sportauffassungen, die sich grundlegend voneinander unterscheiden. Dies sind das Coubertin'sche Prinzip und die Lombardi-Grundsätze. Die nach Baron Pierre de Coubertin, dem Gründer des Internationalen Olympischen Komitees (IOK), definierte Sportauffassung besagt *“die oberste Handlungsmaxime des Sportlers ist nicht das Siegen, sondern die Teilnahme am Wettkampf”*. Wo hingegen die Lombardi-Grundsätze vom amerikanischen Football-Trainer Vince Lombardi als *„das Gewinnen zum wichtigsten, ja zum einzigen Ziel des sportlichen Wettbewerbs“* erklärt. [Begov, 2007] Begov führt in diesem Interview auch an, dass für Profisportler der Sport Gelderwerb und Existenzgrundlage ist. Der wie bereits beschriebene gesellschaftliche Aufstieg sowie die Vorteile monetärer und materieller Art, führen unweigerlich zu dem Lombardi-Modell. Begov bezweifelt, dass ebenso bei Zuschauern auf der Tribüne ein ausgeprägtes ethisches Bewusstsein anzutreffen sei. Der Zuschauer erfreut sich am Event und an dem Ergebnis an sich. Sportler, die keinen Erfolg haben und sprichwörtlich hinterherfahren oder laufen, sind für Sponsoren und die Medien uninteressant. Die Medien und der Zuschauer wollen das Spektakuläre, den Erfolg, das Sieges-Ereignis. [Begov, 2007]

Was treibt einen Sportler nun zu diesem gefährlichen Schritt sich zu dopen? Die berichtserstattenden Medien und die Zuschauer wollen immer neue Rekorde sehen und üben somit auf viele Sportarten einen großen Druck aus. Frei nach dem Motto *“Schneller, höher, weiter”* wird auf stagnierende Leistung und das Ausbleiben von Weltrekorden mit

1. Motivation

Unverständnis reagiert. Aber viele Sportarten stehen bereits vor ihrer physischen Leistungsgrenze. Selbst durch modernste Trainingsmethoden, die auf neuesten wissenschaftlichen Studien basieren, lässt sich Erfolg oder ein Olympiasieg nicht garantieren. Somit ist der Schritt eines einzelnen Sportlers, sich durch Zuhilfenahme von verbotenen Mitteln oder Methoden einen entscheidenden Vorteil gegenüber seinen Gegnern zu verschaffen, naheliegend. Begünstigt durch Teammitglieder, Teamärzte und Betreuer, die Zugänge zu entsprechenden Quellen haben und Kontakte vermitteln können, liegt es alleine an der eigenen Courage dem zu widerstehen und womöglich auf Erfolg, Ruhm und Geld zu verzichten.

Jeder Sportler steht und fällt mit seinem Erfolg in der Gunst der Medien. Die Berichterstattung durch Presse und Medien hat einen entscheidenden Einfluss auf die Art der Reflexion der Gesellschaft. Demnach muss auch die Gesellschaft für das Thema Doping sensibilisiert werden. Eine schärfere Gesetzgebung, wie sie schon in einigen Europäischen Staaten greift, wird auch in Deutschland diskutiert. [Deutscher Bundestag, 2014]

Da sich eine solche Gesetzgebung im Falle der Realisierung nur auf dem jeweiligen Staat beschränken würde, stellt es wiederum ein Ungleichgewicht gegenüber Sportlern anderen Ländern dar. Eine für die Zukunft international einheitliche Verfahrensweise ist hierfür zwingend erforderlich.

Unangekündigte Trainings- und Wettkampfkontrollen für International startende Sportler bilden hier eine Möglichkeit. Die Einführung des "Anti-Doping-Administration-and-Management-System" (ADAMS) und der Informationen zu Aufenthaltsort und Erreichbarkeit (Whereabouts) für alle Athleten des Registered Testing Pools (RTP) weltweit, hat sich hierfür bereits erfolgreich etabliert. Hier müssen alle Topathleten jedes Landes für die kommenden drei Monate verbindlich ihren Aufenthalt angeben und jeweils eine Stunde pro Tag für eine unangemeldete Kontrolle zu Verfügung stehen. [WADA, 2015] Einige Sportler sahen diese Art der Kontrolle als einen erheblichen Eingriff in ihre Privatsphäre. Aber durch das Grundverständnis nach dem Coubertin'schen Prinzip und der Hoffnung auf Chancengleichheit durch dieses Kontrollsystem hat sich das ADAMS bereits in vielen Sportarten durchgesetzt.

1.2. Dopingverbote und die Notwendigkeit von Dopingkontrollen

Da das Dopen mit dem missbräuchlichen Verwenden von Arzneimitteln und Gebrauch verbotener Methoden bei gesunden Sportlern ein nicht zu kalkulierendes Gesundheitsrisiko darstellt, sind Dopingkontrollen zum Schutz der Sportler zwingend notwendig. Wie die schon erwähnten Todesfälle von T. Simpson und M. Pantani deutlich machen, sind durch Doping alle sportlichen Werte wie Ethik, Fairness, Ehrlichkeit und Gesundheit gegenüber dem Gegner, der Gesellschaft und nicht zu Letzt der eigenen Gesundheit verletzt. Gerade die Kombination verschiedener Wirkstoffklassen birgt ein unvorhersehbares Risiko. Der am 14. März 1996 an multiplen Organversagen verstorbene österreichische Bodybuilder Andreas Münzer ist ein prominentes Beispiel für die Folgeschäden des Steroidenmissbrauchs und die Verwendung von Dopingpräparaten über mehrere Jahre hinweg. Aus dem Obduktionsbericht geht unter anderem hervor, in welchem Maße die verwendeten Medikamente seine Organe geschädigt haben. Zum Zeitpunkt der Obduktion wurden Spuren von über zwanzig verschiedenen Medikamenten in seinem Körper gefunden. Die Leber war fast vollständig zerfallen und führte zu dem Multiorganversagen. Weiterhin fand man zahlreiche tischtennisballgroße, gut abgekapselte Tumore (Adenome). Der Leberschaden konnte auf den chronischen Missbrauch von Stanozolol, einen synthetischen anabolen Steroid, das sich vom Testosteron ableitet, zurückgeführt werden. Weitere Organveränderungen waren u. a. trübe Schwellungen der Nieren, ein sehr schmales Nebennierenmark, kleine Hoden, Herzhypertrophie und subendokardiale Blutungen. [Clasing, 2010; Franke and Ludwig, 2007; Kistler, 2006]

Um Sportler vor solchen Gefahren zu schützen, reichen präventive Maßnahmen und Aufklärung beginnend im Schul- und Nachwuchssport nicht aus. Neben Dopingkontrollen soll auch eine Gesetzgebung für die strafrechtliche Verfolgung von Dopingvergehen und Arzneimittelmisbrauch geschaffen werden. In einigen Staaten Europas wie Spanien, Schweden, Italien und Dänemark hat sich zur Stärkung des Anti-Dopingkampfes die Rechtslage dahingehend gebessert, dass Gesetze beschlossen wurden, in denen das Beschaffen, Weitervertreiben oder die Verwendung von Dopingmitteln strafrechtlich verfolgt werden kann. In Deutschland steht eine solche

1. Motivation

Gesetzgebung noch aus. Ein entsprechender Antrag vom Deutschen Bundestag für ein Anti-Doping-Gesetz, wurde am 07.08.2014 der Bundesregierung vorgelegt. [Deutscher Bundestag, 2014]

Auf Grund der stetigen Forschung und Entwicklung von pharmakologischen Wirkstoffen müssen auch die Nachweismethoden weiterentwickelt werden. Deutlich wird diese Notwendigkeit am Beispiel des BALCO Skandal 2003 mit dem Designersteroid Tetrahydrogestrinon (THG) sowie der Erythropoetin Derivate (EPO) aus Osteuropa, Asien und EPO-Mimetika. [Teale *et al.*, 2012; Möller *et al.*, 2011]

Dopingkontrollen sind sehr kostenintensiv. Im Jahresbericht von 2013 der Nationalen-Anti-Doping-Agentur (NADA) aus Deutschland wurden für Dopingkontrollen über 2 Mio Euro auf 1260 Wettkampfkontrollen und 8106 Trainingskontrollen aufgewendet. [NADA, 2013] Im Durchschnitt kostet somit eine Dopingkontrolle über 200 Euro. Demnach ist der finanzielle Aufwand, um für einen biologischen Pass ein Langzeit-Profil für möglichst viele Sportler zu erhalten, entsprechend hoch.

Der biologische Pass enthält eine Zusammenfassung unterschiedlicher biologischer Marker, die über Dopingkontrollen ermittelt werden. Hierzu zählen ein Blut- und Steroidprofil. [WADA, 2013a] Durch diesen individuellen biologischen Pass ist es möglich, bei auffälligen Veränderungen gezielt Sportler über unangekündigte Trainingskontrollen zu testen.

Bevor die Möglichkeit bestand den Missbrauch mit EPO oder Blutdoping im Labor nachzuweisen, wurde bei Sportlern am Tag vor den Wettkämpfen im Teamhotel der Hämatokrit-Wert bestimmt und bei Überschreiten eines sportartenspezifischen Grenzwertes eine Schutzsperre ausgesprochen. Der Hämatokrit-Grenzwert des Weltradsportverbands (UCI) und Weltleichtathletikverbands (IAAF) liegt bei 50% für Männer und 47% bei Frauen.

Bei Großveranstaltungen wie den Olympischen Spielen, Weltmeisterschaften oder der Tour de France könnten vor Ort Testsysteme (Point-of-care Test, PoC-Test), die mit geringem Probevolumen aus Urin, Blut oder Serum und zum Teil mit minimalinvasiven Probeentnahmen auskommen, deutlich mehr Kontrollen zulassen und somit verwertbare Daten liefern. Bereits vor Beginn eines Wettkampfes könnten so alle Teilnehmer getestet und bei auffälligen Ergebnissen vom Wettkampf ausgeschlossen werden. Wird nun eine Probe zeitgleich auf mehrere Substanzen getestet, spricht man von der parallelen Mehrkompo-

1.3. Möglichkeiten und Perspektiven für Point-of-care-Tests bei Dopingkontrollen

nentenanalyse. Die Möglichkeit der Entwicklung einer parallelen Mehrkomponentenanalyse auf Basis eines Immunoassays wird Gegenstand dieser Arbeit sein.

1.3. Möglichkeiten und Perspektiven für Point-of-care-Tests bei Dopingkontrollen

In einem klassischen Szenario bei Wettkampfkontrollen werden nach Beenden des Wettkampfes neben dem Sieger meist noch weitere, zuvor ausgeloste Sportler getestet. Der gesamte Prozess und Ablauf der Probenahme ist im WADA Bericht "International Standard for Testing 2012" beschrieben. Bestandteil einer Wettkampf- oder Trainingskontrolle für Urin ist die Probenahme von mindestens 90 mL: 60 mL für die A-Probe und 30 mL für die B-Probe. [WADA Laboratory, 2012] Bereits zu diesem Zeitpunkt wird die Urindichte mittels eines Refraktometers bestimmt und somit ermittelt, ob sich die genommene Urinprobe für die Analyse im Labor eignet. Entspricht die Urinprobe nicht dem geforderten Wert von 1,005 g/mL muss eine weitere Probenahme durchgeführt werden. Bei der Dopingkontrolle mit Blutentnahme bedarf es einer Person mit entsprechender ärztlicher Approbation oder speziell geschulten Personal, (z.B. staatlich anerkannter Heilpraktiker) die durch die jeweilige Anti-Doping-Organisation autorisiert sind. [NADA, 2010] Hier bietet sich die alternative Möglichkeit einer minimalinvasiven Probenahme ohne Arzt von einigen Mikrolitern Blut aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen an und einem entsprechenden Point-of-care Test, um ein Ergebnis bereits in kurzer Zeit zu erhalten. Somit könnte bereits in diesem Stadium einer Dopingkontrolle, über angemessene Sanktionen vor dem Wettkampf und eine umfangreiche Analyse der Probe im Labor befunden werden.

Als Analyten für einen Point-of-care-Test wären Blutparameter, Peptidhormone und Steroide geeignet. Ein wesentlicher Vorteil ist die Möglichkeit der Verwendung eines Multiplex Ansatzes, in dem sich aus einer Probe von z.B. 50 µL, eine Vielzahl der Anti-Doping relevanten Parametern bestimmen lassen. Die notwendige Zeit, die für eine solche Analyse veranschlagt wird soll unter 30 min liegen und deutlich unter 20 Euro pro Test kosten. [Schumacher *et al.*, 2012]

2. Grundlagen

2.1. Der Begriff Doping und die Einteilung von Substanzklassen in die Verbotensliste der WADA

Unter dem Begriff Doping versteht man zusammengefasst die Verwendung von Substanzen zur Leistungssteigerung oder von Substanzen, die zur Maskierung von leistungssteigernden Substanzen oder unerlaubten Methoden benutzt werden können. [WADA, 2015] Die erste von internationalen Fachverbänden zusammengefasste Liste verbotener Substanzen wurde 1966/67 aufgestellt. Zeitgleich wurden im Bereich dieser Fachverbände auch erste Dopingkontrollen durchgeführt. [Clasing, 2010] Zusammengefasst und jährlich aktualisiert werden diese in der WADA-Liste für verbotene Substanzen und Methoden. [WADA, 2013b] Hierunter fallen verschiedene Substanzklassen und Methoden, die zu allen Zeiten bei Trainings- und Wettkampfkontrollen verboten sind. (Abb. 2.1) Für Wettkampfkontrollen gibt es zusätzliche und sportartspezifische Substanzklassen, wie zum Beispiel Alkoholverbot im Automobilsport.

Die Wirkweise der Dopingmittel aus den verschiedenen Substanzklassen ist für die unterschiedlichsten Bereiche während Training oder Wettkampf sowie zur Erholung für den Sportler von Interesse. Zu den in der Abbildung 2.1 nicht aufgeführten Substanzklassen, welche ausschließlich im Wettkampf verboten sind, zählen die spezifischen- und nicht-spezifischen Stimulanzien, Narkotika, Cannabinoide und Glucocorticosteroide. Die zu diesen Substanzklassen zählenden Pharmazeutika und Wirkstoffe werden bei Trainingskontrollen nicht als Dopingvergehen gewertet.

2. Grundlagen

Stimulanzien wie Amphetamine, Kokain, Carphedon (nicht-spezifische Stimulanzien) und Adrenalin, Oxilofrin und Strychnin (spezifische Stimulanzien) zählen zu den klassischen Dopingmitteln im Wettkampf. Sie verzögern die Ermüdungsgrenze. [Clasing, 2010] Die Wirkung solcher Stimulanzien kann mit psychischer Aufgewecktheit, erhöhtem Selbstbewusstsein, sowie erhöhtem Konzentrationsvermögen beschrieben werden. Dem Unterdrücken des Ermüdungsgefühls steht die Zunahme von Leistungsbereitschaft und Aufmerksamkeit gegenüber. [Clasing, 2010]

Narkotika (Betäubungsmittel) und starke Schmerzmittel wie Methadon und Heroin unterliegen den Vorschriften des Betäubungsmittelgesetzes (vom 28.07.1981) und sind ausnahmslos bei Wettkämpfen verboten. Sie dämpfen Angst, wirken beruhigend und heben die Stimmungslage bis zum Glücksgefühl hin an. Bei der Klasse der Cannabinoide (natürlich: Cannabis, Haschisch, Marihuana; synthetisch: Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabinomimetika wie "Spice", JWH018, JWH073, HU-210) handelt es sich nicht um leistungssteigernde Wirkstoffe im Sport. Dennoch sind sie aufgrund der vor allem erhöhten Risikobereitschaft im Rahmen einer globalen Kritikschwäche in Wettkämpfen verboten. [Clasing, 2010]

Anabole Steroide werden vor allem bei Kraft- und Schnellkraftdisziplinen wie Kugelstoßen, Hammer- und Diskuswerfen sowie Gewichtheben und Bodybuilding, angewendet. Ben Jonson stellt hier ein Beispiel für den Missbrauch durch anabole Steroide dar. Über 6 Jahre, von 1982 bis zum positiven Befund bei den Olympischen Spielen 1988 nahm er Stanozolol ein. [Clasing, 2010] Der Missbrauch durch anabole Steroide lässt sich auch an der Entwicklung der Weltrekorde im Kugelstoßen verdeutlichen. Bis zur Einführung von Trainingskontrollen stieg der Weltrekord bis auf 22,63 Meter bei den Frauen (1987) und 23,12 Meter bei den Männern (1990) an. Beide Rekorde wurden bis heute nicht verbessert. Dieses Phänomen lässt sich ebenso beim Diskus- und Hammerwerfen erkennen. [Clasing, 2010]

2.1. Der Begriff Doping und die Einteilung von Substanzklassen in die Verbotliste der WADA

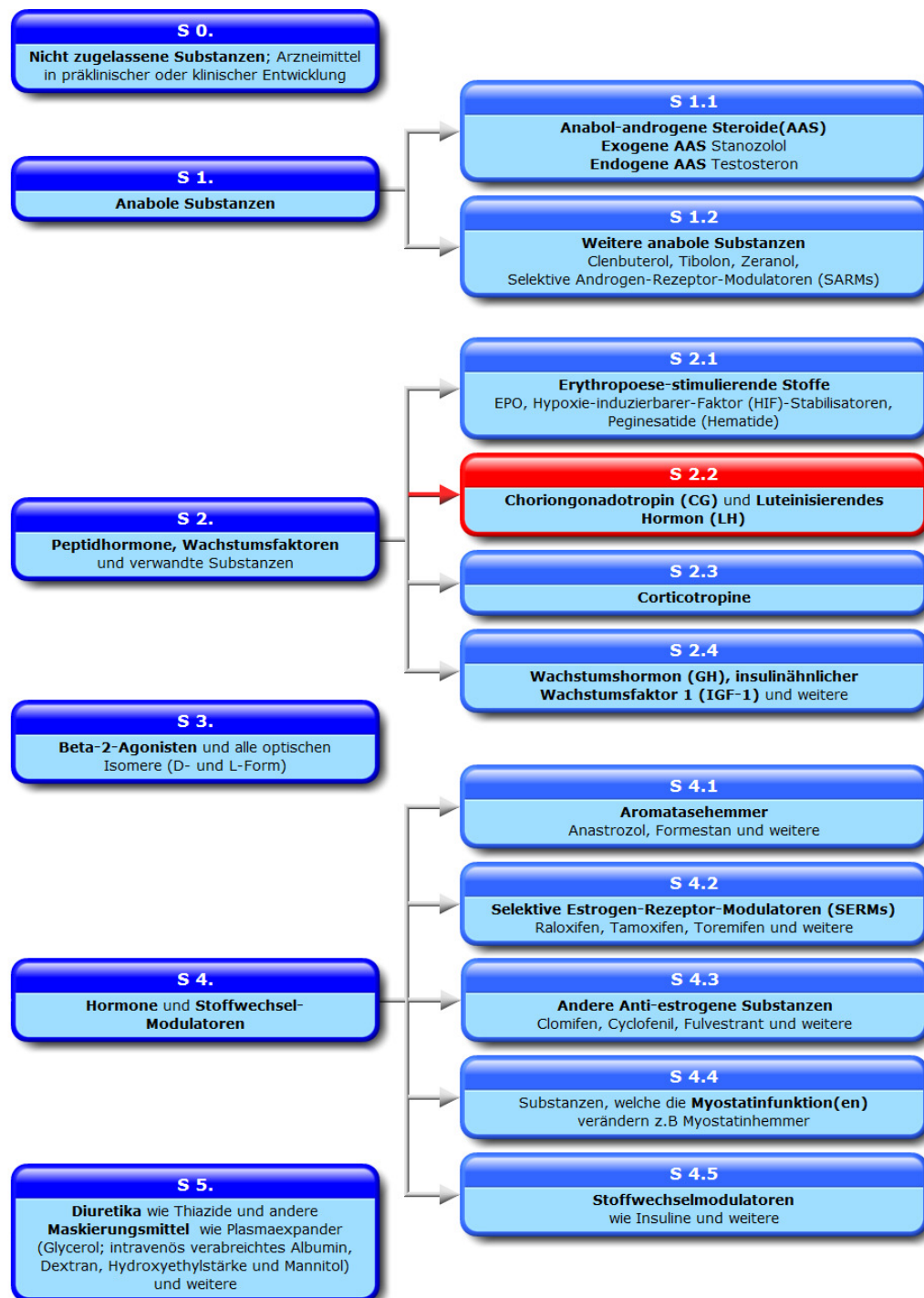


Abb. 2.1.: Liste der verbotenen Substanzen 2013 der WADA (gekürzt). Die hier aufgeführten Substanzklassen (und Beispiele) sind zu allen Zeiten in und außerhalb von Wettkämpfen verboten. Die unter Punkt S 2.2 (roter Kasten) aufgeführten Peptidhormone: Choriongonadotropin (CG) und das luteinisierende Hormon (LH) sind ausschließlich bei Männer verboten da sie regulierend auf die Testosteron Kaskade wirken. Beide Hormone werden über Immunoassays aus Urin bestimmt. [WADA, 2012]

2. Grundlagen

Solch ein Missbrauch von anabolen Steroiden kann zu einer Organveränderung in Leber (Hepatomegalie) und krankhafte Herzmuskelverdickung führen. Parallel zum Missbrauch durch anabole Steroide werden weitere Wirkstoffe wie das humane Choriongonadotropin (hCG-i) verwendet, um Nebenwirkungen zu vermeiden und die endogene Testosteronproduktion zu stimulieren. [Knuth *et al.*, 1989] Neben dem Missbrauch dieser zur Leistungssteigerung verwendeten verbotenen Substanzen, werden einige als therapeutische Mittel bei Erkrankungen angewendet. In diesen Fällen wird ein vom Arzt erteiltes Attest ausgestellt. Der Sportler und sein behandelnder Arzt müssen bei entsprechenden Erkrankungen detaillierte Angaben mit Hinweisen auf Vorgeschichte, Diagnostik und Therapie im Rahmen einer Ausnahmegenehmigung "Therapeutic use exemptions" (TUE) machen. Unter Vorlage einer solchen TUE werden die dort aufgeführten Medikamente und Wirkstoffe zu keinem positiven Dopingbefund führen.

2.2. Analytische Methoden zur Detektion von Dopingmitteln

Die klassische Probenmatrix für die Dopinganalytik ist Urin. Aus diesem lässt sich ein Großteil, der auf der Verbotsliste stehenden Stoffe nachweisen. Nach Einführung des biologischen Passes werden zusätzlich auch Blutproben analysiert.

Blutproben lassen sich im Gegensatz zu Urinproben während der Probenahme schlechter manipulieren. Nach aufgedeckten Urin Manipulationen mittels Rekatheterisieren von sauberen Fremdurin in die Harnblase überführter Sportler wurde der Ablauf einer Dopingkontrolle verschärft. Weitere Möglichkeiten der Manipulation sind die Verwendung eines Whizzinator (Penisimitat) oder das Verstecken einer mit Fremdurin gefüllten Blase am Körper oder in Körperöffnungen (Vagina, After), deren Ausführungsgang am Penis/Vagina entlang gelegt wird. [Clasing, 2010] Zusätzlich zu den Verschärfungen der Probenahme-Prozedur durch Sichtkontrolle bei der Dopingkontrolle zählt die Einführung des Chaperon (franz. Anstandsdame). Unmittelbar nach Beendigung des Wettkampfes nimmt der Chaperon den Sportler in Empfang und schließt durch dessen Aufsicht die Möglichkeit

2.2. Analytische Methoden zur Detektion von Dopingmitteln

der Manipulation bis zur Übergabe an die Kontrollstation aus. Ebenso ist es möglich, die Urinprobe noch vor dem Umfüllen in die Probenbehälter mit Detergenzien oder Proteasen (z.B. mit Waschmittel) zu kontaminieren, um so alle urinären Proteine wie auch EPO zu zerstören. Solche Manipulationen lassen sich aber im Rahmen einer Dopinganalyse im Labor nachweisen. [Thevis *et al.*, 2007]

2.2.1. Die Gaschromatographie/Massenspektrometrie als etablierte analytische Methode für die Dopinganalytik

Die Dopinganalytik aus Urin und Blut setzt sich aus mehreren Analyse-schritten, wie in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt, zusammen.

Laut dem technischen Dokument der WADA [WADA Laboratory Committee, 2010] sind Moleküle mit einer Größe bis 800 Dalton über die Massenspektrometrie im Rahmen einer Dopinganalytik nachweisbar. Für Moleküle mit einer Größe bis zu 8000 Dalton werden massenspektrometrisch sowohl die Top-Down als auch die Bottom-Up Analyse angewendet. Wie in

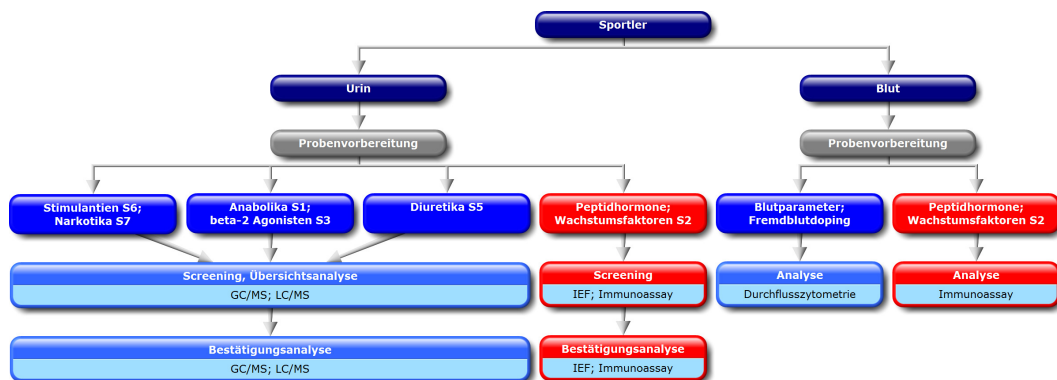


Abb. 2.2.: Analytik von Dopingproben Vereinfachte Darstellung der Analytik von Dopingproben. Beginnend bei der Probenahme vom Sportler bis zur Bestätigungsanalyse im Labor. (Verändert nach www.dopin-info.de) Ausgehend von dem Dokument: "International Standard for Testing 2012" auf Seite 40, beschreibt die WADA die notwendigen Bedingungen und Vorschriften. Die Analytik kann in chromatographische/massenspektrometrische Methoden, isoelektrische Fokussierung, Immunoassay und Fluoreszenz-Durchflusszytometrie eingeteilt werden. Weitere Methoden wie die Isotopen-Bestimmung kommen für einzelne Stoffe zum Einsatz. Die rot dargestellten Rubriken der Peptidhormone und Wachstumsfaktoren S2, bilden die Substanzklasse, die mittels Urin und Blut (Serum/Plasma) über Immunoassays nachgewiesen wird. Hierfür kann in der Screeningebene ein Multiparameter-Assay zur Anwendung kommen.

2. Grundlagen

Abbildung 2.2 dargestellt, werden Dopingproben nach der Eingangskontrolle entsprechend den Anforderungen der zu testenden Substanzklasse aufgearbeitet. Für jede Substanzklasse wird eine entsprechend der chemischen und biochemischen Eigenschaften entwickelte Screeningprozedur eingesetzt. Hierfür wird das Ausgangsmaterial der A-Probe aliquotiert und für die unterschiedlichen Nachweisverfahren mit internen Standards vermessen. Ein Großteil der verbotenen Stoffe kann mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) oder Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS) detektiert werden.

[Clasing, 2010; Thevis, 2010; Thevis and Schänzer, 2007] Als Aufarbeitungsschritte für eine chromatographische/massenspektrometrische Analyse kommen in Abhängigkeit der biochemischen Eigenschaften der gesuchten Stoffe zum Teil Hydrolysen, Extraktionen und Derivatisierungen zum Einsatz. Die anschließende Auftrennung für das Screening wird nicht von der WADA vorgeschrieben. [WADA, 2012] Hier wird in Anlehnung an eine, sich nach einer auffälligen Probe anschließende vorgeschriebene Analytik auf eine gaschromatographische-/massenspektrometrische Methode (GC/MS) zurückgegriffen. Alternativ werden auch flüssigkeitschromatographische-/massenspektrometrische Analysen (LC/MS) verwendet. Nach den Aufarbeitungsschritten wird die zu untersuchende Probe durch Chromatographie aufgetrennt. Das Massenspektrometer dient im Anschluss zur Identifizierung und Quantifizierung der fraglichen Komponenten. Im Chromatographen befindet sich eine Trennsäule, welche die stationäre Phase bildet. Die Probe wird mit einem Trägerstoff, der mobilen Phase, in die Trennsäule injiziert. Durch die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten der Probe interagieren diese unterschiedlich stark mit der festen Phase der Trennsäule. Dadurch treten sie zeitlich versetzt aus der Säule aus und werden anschließend zur Detektion der Massenspektrometrie zugeführt.

Durch eine sich direkt anschließende Ionisierung der aufgetrennten Komponenten über die Massenspektrometrie wird die Probe je nach Ionisierungstechnik protoniert oder deprotoniert und anschließend fragmentiert. Anhand der detektierten Masse-/Ladungsverhältnisse (m/z) dem Isotopenverhältnis und den jeweiligen Fragmenten lassen sich Rückschlüsse auf die vermeintlichen Dopingsubstanzen und ihre Metabolite schließen. Für einen direkten Nachweis werden Fragmentierungs-

muster mit Mustern von Referenzsubstanzen, die zum Teil speziell für diesen Nachweis synthetisiert werden, abgeglichen. [Huebschmann, 2008; Schänzer and Donike, 1993]

2.2.2. Immunoassay basierende Nachweismethoden für die Detektion von Peptidhormonen und Wachstumsfaktoren

Da Methoden der Chromatographie/Massenspektrometrie in der Dopinganalytik für Substanzen in der Größenordnung unter 8000 Dalton Anwendung finden, werden größere Moleküle, wie das luteinisierende Hormon, das humane Choriongonadotropin oder das Erythropoetin (EPO), über einen Affinitätsbindungsassay (Immunoassay) nachgewiesen. Das EPO Molekül mit einer Größe von 165 Aminosäuren und eine Masse von 34.000 Dalton wird beispielsweise über die isoelektrische Fokussierung und Immunoblot-Technik nachgewiesen. Bei der isoelektrischen Fokussierung wird der zuvor über einen Größen cut-off zentrifugierte eingeengte Urin über eine Polyacrylamid Gelmatrix mit pH-Gradient in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die so aufgetrennten EPO Moleküle werden auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) transferiert und mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (EPO-mAK) inkubiert. Um das Hintergrundsignal für die anschließende Auswertung zu minimieren, wird der EPO-mAK auf eine zweite PVDF-Membran gebロットet und von einem markierten Sekundärantikörper gebunden. Über eine Chemilumineszenzreaktion wird der gebildete Komplex detektiert. [Lasne *et al.*, 2007; Lasne *et al.*, 2002; Lasne and de Ceaurriz, 2000]

Das rekombinante Humane Erythropoetin (rHuEPO) kommt in verschiedenen Derivaten auf dem Markt vor, die biotechnologisch durch Fermentation aus unterschiedlichen Zelllinien gewonnen werden. Diese rhEPO-Derivate unterscheiden sich von der körpereigenen Variante vorrangig durch ihr verändertes Glykosylierungsmuster. Durch die Manipulation mit der rhEPO-Variante liegt im Körper eine reduzierte Anzahl von körpereigenen EPO-Molekülen vor, da dieser auf Grund des rhEPO seine Produktion reduziert. Das veränderte Profil der EPO Banden wird so sichtbar und führt zu einem direkten Nachweis bei Missbrauch. [WADA TD2013EPO, 2013; Peltre and Thormann, 2003; Lasne *et al.*, 2002]

2. Grundlagen

Bei der Gruppe der Peptidhormone und Wachstumsfaktoren (2.2 roter Kasten S2) ist eine Analyse über einen Immunoassay wie beim EPO notwendig.

2.2.3. Funktionsweise der Antikörper und ihre Rolle in Immunoassays

Immunoassays basieren auf Antikörper-Liganden-Interaktionen. Die hierfür notwendigen Antikörper erkennen das gesuchte Peptidhormon spezifisch und ermöglichen so einen eindeutigen Nachweis auf dessen Anwesenheit.

Grundlage bildet hier die Entstehung und Herkunft der Antikörper. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von Wirbeltieren. Bei der Entstehung im Körper durchlaufen die Antikörper einen komplexen Prozess, um zu gewährleisten, dass sie keine körpereigenen Strukturen erkennen aber eine größtmögliche Variabilität ihrer Erkennungsstruktur erhalten. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit eine für den Körper unbekannte Struktur in Form eines neuen Immunogens zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen. Die für Immunoassays verwendeten Antikörper werden durch spezielle Immunisierungstechniken mit Tieren, wie Mäusen und Kaninchen gewonnen. Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAK) stellt hierbei eine besondere Herausforderung dar. Antikörper, wie das ImmunglobulinG (IgG) bestehen aus je zwei identischen schweren- und zwei leichten Polypeptidketten. Zusammen bilden sie die Quartärstruktur des IgG, welche stark schematisiert als Y dargestellt wird. Am N-Terminus der vier Ketten befindet sich der variable Bereich, an dem sich in den hypervariablen Regionen die epitopspezifischen Paratope befinden. Diese erkennen eine bestimmte Peptidsequenz auf einem Antigen nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip. Diese Eigenschaft der Paratop-Epitop-Bindung nutzt man in Affinitäts-Bindungs-Assays wie Immunoassays. Durch das Immunisieren eines Tieres mit dem fraglichen Antigen und die Verwendung eines Adjuvanz zur Verstärkung der Immunantwort bildet es dagegen Antikörper. Im Serum befindet sich zunächst eine Mischpopulation von Antikörpern, welche gegen unterschiedliche Epitope des Antigens gerichtet sind. Diese Mischpopulation, auch polyklonale Antikörper (pAK) genannt, bildet die Vorstufe zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern. Die Methode zur Herstellung dieser wurde bereits 1975 von [Köhler and Milstein, 1975] beschrieben, wofür sie 1984 den

2.2. Analytische Methoden zur Detektion von Dopingmitteln

Nobelpreis für Medizin erhalten haben. Es handelt sich um Antikörper, die von ein und demselben B-Zell-Klon gebildet werden. Wurde beispielsweise eine Maus erfolgreich immunisiert und ihr Antigen spezifischer Antikörper-Titer entspricht den Vorgaben, wird ihr die Milz oder die Lymphknoten entnommen und daraus eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese beinhaltet zum größten Teil B-Zellen, die mit neoplastischen Myelomazellen zu Hybridomazellen fusioniert werden. Die so entstandenen Hybridomazellen besitzen die Möglichkeit der Antikörperproduktion und die Eigenschaft der Immortalität. Durch eine anschließende HAT-Selektion (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) überleben ausschließlich die fusionierten Hybridome. Nach zehn Tagen der HAT-Selektion werden die Antikörper bildenden Hybridomazellen durch Einzelzellisolierung vereinzelt. Die daraus entstehenden Hybridomazellklone produzieren Antikörper, die dasselbe Paratop besitzen und geben diese in das Medium ab.

Durch die Verwendung von Tieren und Adjuvanzen zur Antikörperherstellung ist es möglich, Antikörper gegen Peptide humanen Ursprungs zu generieren. So ist es beispielsweise möglich, humanes Choriongonadotropin (hCG-i) oder das Luteinisierende Hormon (LH) mit Antikörpern über Immunoassays aus Urin oder Serum zu messen. Für den biologischen Pass werden neben dem Steroid Profil die Parameter des kleinen Blutbildes und die Anzahl der Retikulozyten gemessen. Die Durchflusszytometrie stellt hierfür die grundlegende Technik dar. Das Blut wird als Zellsuspension durch eine Mikrokanalküvette in eine Durchflussmesszelle geleitet und mittels mehrerer Laser verschiedener Wellenlängen vermessen. Die Durchflussmesszelle ist so dimensioniert, dass die Blutzellen den Strahlengang des Lasers einzeln passieren. Das dabei entstehende Streulicht wird über verschiedene Detektoren, wie den Forward-Scatter und Side-Scatter gemessen. Hierbei bilden die unterschiedliche Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Blutzellen ein charakteristisches Bild und lassen sich so über Histo- und Scattergramme klassifizieren. Weiterhin können verschiedene mit Fluorophoren markierte monoklonale Antikörper unterschiedliche Epitope der Zellen in einer Blutprobe binden und über eine Fluoreszenz-Durchflusszytometrie sichtbar gemacht werden. Die Methode dient dazu, homologe (fremde Person) oder heterologe (nicht menschlichen Ursprungs) Bluttransfusionen zum Zweck des Blutdopings aufzudecken.

Im Unterschied zur Durchflusszytometrie werden aus Blutproben neben

2. Grundlagen

dem Insulin ähnlichen Wachstumsfaktor-1 (IGF-1), dem humanen Wachstumsfaktor (hGH) und einigen EPO Derivaten wie CERA auch Hematide, Blutersatzmittel (engl. Haemoglobin-based oxygen carriers, HBOCs), das humane Choriongonadotropin (hCG-i) und das Luteinisierende Hormon (LH) über Immunoassays gemessen. Solche Affinitätsbindungsassays werden als Antikörper basierende Nachweisverfahren in Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) angewendet. Der ELISA kann, je nach Fragestellung welches Antigen nachgewiesen werden soll, als direkter, kompetitiver oder Sandwich Assay aufgebaut sein. Das können im Fall einer Titerkontrolle, z.B. nach einer Impfung gegen Hepatitis B, die vom körpereigenen Immunsystem gebildeten Antikörper sein. Letztere stellen dabei die Messgröße dar. Diese Titerkontrolle kann in einem direkten ELISA überprüft werden. Über ein Fänger-molekül (Hepatitis B Fragment), das auf eine Oberfläche adsorptiv oder kovalent gebunden vorliegt, binden die sich im Serum befindlichen Antikörper. Dieser so entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird über einen weiteren markierten Antikörper erkannt und über dessen Markierung sichtbar gemacht.

Die kompetitive Methode für Moleküle wie Haptene zeichnet sich durch eine Konkurrenzreaktion aus. Die hier verwendeten Fänger-moleküle sind monoklonale Antikörper. Die in der Probe befindlichen Antigene binden in Konkurrenz mit einer hinzugegebenen definierten Menge markierter Antigene. Der Nachweis des unmarkierten Antigens einer Probe steigt mit abnehmender Signalintensität der Messung proportional an. Der Sandwich-Aufbau bildet die klassische Variante des Immunoassays. Ein Antigen wird von einem Fängerantikörper spezifisch gebunden und von einem weiteren markierten Detektionsantikörper wie ein Sandwich umschlossen. Die Intensität des Signals entspricht der Konzentration des gesuchten Antigens. Für die in dieser Arbeit nachzuweisenden Peptidhormone hCG-i und LH, soll der Sandwich-Aufbau auf ein Mikroarray Format portiert werden. Hierbei stehen die Kreuzreaktivität und die Spezifität des Aufbaus für den Multiplexansatz mit unterschiedlichen Probenmatrizen im Vordergrund.

2.3. Peptidhormone als Kandidaten für die Entwicklung eines Multiparameter Dopingtests

Peptidhormone, die in der Dopinganalytik bereits über Affinitätsbindungsassays nachgewiesen werden, sind für die Portierung auf einen Mikroarray basierenden Multiparameter Dopingtest geeignet. Durch die Verwendung von unterschiedlichen monoklonalen Fängerantikörpern (mAK) ist es möglich, einen Multiplex-Aufbau zu konstruieren. Aufgrund der Spezifität für das Erkennen eines einzelnen Epitops, können mAK gezielt das Peptidhormon aus einer komplexen Matrix binden. Das Auftreten von Kreuzreaktivität muss ausgeschlossen werden, um keine falsch positiven Signale zu generieren. Bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpern kann es zur unspezifischen Erkennung von weiteren Serumbestandteilen (Matrix Effekte) kommen und folglich zu falsch positiven Signalen. Wählt man als Basis die Mikroarray-Technologie, bei der eine Vielzahl von Spots unterschiedlicher monoklonaler Fängerantikörper auf eine Oberfläche gespottet werden, können aus einer Probe gleichzeitig mehrere Antigene in Form von Peptidhormone auf den unterschiedlichen Spots detektiert werden. Bereits verbreitete Anwendungsgebiete erreicht der Bereich der Mikroarray-Technologie, bei dem Nukleinsäuren als Probenmaterial für Genexpressionsanalysen oder Nachweise von Einzelnukleotid-Polymorphismen eingesetzt werden. [Andresen and Bier, 2009; Bier *et al.*, 2008] Die Miniaturisierung einer ELISA-Methode durch die Mikroarray-Technologie ermöglicht einen hohen Parallelisierungsgrad bei gleichzeitig reduziertem Zeitaufwand und Probenmaterial. Großes Potential besteht ebenfalls für die Integration in ein mobiles Messgerät um vor-Ort-Messung (PoC) zu realisieren.

Ein solcher PoC-Test soll so aufgrund des Multiplexansatzes eine Vielzahl von Dopingmitteln bereits Minuten nach dem Zeitpunkt der Probenahme ermitteln. Resultierend daraus kann der Sportler unmittelbar nach Vorlage der Ergebnisse mit einer Schutzsperre sanktioniert und weitere bestätigende Analysen im Labor vorgenommen werden. Als Matrix für einen solchen Nachweis über den Multiplexansatz können Urin, Blut oder Serum dienen. Ziel einer solchen PoC Messung ist, neben einem zeitnahen Ergebnis auch die Verringerung des benötigten Probevolumens, die Reduzierung

2. Grundlagen

der Kosten und die Erhöhung der Testdichte. Als Beispiel könnte so bei sportlichen Großveranstaltungen wie Olympia oder Weltmeisterschaften jeder Teilnehmer zu jedem beliebigen Zeitpunkt kontrolliert werden. Bereits gut untersuchte Dopingparameter sind das Luteinisierende Hormon (LH) und das humane Choriongonadotropin (hCG-i), die für männliche Sportler zu jeder Zeit verboten sind. [WADA, 2004a]

2.3.1. Das Luteinisierende Hormon (LH) und seine Rolle als Dopingmittel

Das luteinisierende Hormon besteht aus einer unspezifischen 92 Aminosäuren (AS) langen α -Untereinheit und einer für das LH spezifischen 121 AS großen β -Untereinheit. Die unspezifische α -Untereinheit ist ebenso Bestandteil weiterer Peptidhormone wie das Follikelstimulierende Hormon (FSH), Humanes Choriongonadotropin (hCG-i) und Thyreotropin (TSH). [Talmadge *et al.*, 1984] Im weiblichen Körper wird das LH in dem Hypophysenvorderlappen gebildet und reguliert die Ovulation. [Hunter *et al.*, 2004] Die Steroid-Biosynthese wird durch die Hypothalamus-Hypophyse-Testikel-Achse reguliert. Im männlichen Körper stimuliert das LH die Testosteronbildung in den Leydig-Zwischenzellen des Hodens und die Spermienreifung. [Rommerts *et al.*, 2004; Rao, 2001] Die Bildung von LH wird durch das am Gonadotropin-Releasing Hormon Rezeptor (GnRH₁) bindende Hormon Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) am Hypophysenvorderlappen reguliert. [Cone *et al.*, 2003; Van Vugt *et al.*, 1985] Das so sezernierte LH wird über den Blutkreislauf zu den Leydig-Zellen des Hodens transportiert, wo es an dem Luteinisierenden Hormon Rezeptor (LH-Rezeptor) bindet und die Synthese von Androgenen, wie Testosteron, induziert. Testosteron wird durch schrittweises Umsetzen von Cholesterin über Pregnenolon und Progesteron gebildet. [Svechnikov *et al.*, 2010] Der LH-Rezeptor wird durch die Bindung von LH oder hCG-i aktiviert, was wiederum zur Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR) führt, der im Zellinneren direkt mit dem LH-Rezeptor verbunden ist. Die durch das Signal induzierte Konformationsänderung des GPCR bewirkt eine Ablösung einer Untereinheit des GPCRs, die zur Aktivierung von Adenylyl-Zyklase und damit zur Bildung von cAMP führt. Das gebildete cAMP wirkt auf Transkriptionsfaktoren, die die Bildung von Testosteron induzieren.

2.3. Peptidhormone als Kandidaten für die Entwicklung eines Multiparameter Dopingtests

[Ascoli *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 1998]

Ist der Testosteron Spiegel durch Testosterondoping erhöht, inhibiert dieses Testosteron die Produktion des GnRH im Hypothalamus.

[Pitteloud *et al.*, 2008] Mit Ausbleiben des GnRH wird kein LH im Hypophysenvorderlappen gebildet und die Aktivierung des LH-Rezeptors in den Leydig-Zellen bleibt aus. Testosteron wirkt somit als Antagonist in Form eines negativen Feedback auf die Bildung von LH. [van Breda *et al.*, 2003]

Das Potential, hier als Dopingmittel missbraucht zu werden, besteht darin, die endogene Testosteron- und Epitestosteron-Produktion zu erhöhen und dabei den Quotient von T/E nicht zu verändern. Bei Doping mit Testosteron steigt dieser T/E Quotient zu Gunsten des gemessenen Testosterons an und die endogene Produktion von Testosteron und Epitestosteron wird unterdrückt. [Anderson *et al.*, 1997] Ab einem Verhältnis von Testosteron zu Epitestosteron von 4/1 oder einer Konzentration von 200 ng/mL für Urin mit einer Dichte von 1,02 g/ml spricht man von einem auffälligen Befund. [WADA, 2004b] Testosteron bindet an den Androgenrezeptor, ein Transkriptionsfaktor, der beim Menschen für die Ausprägung des männlichen Erscheinungsbildes und Verhalten verantwortlich ist. [Kicman, 2008] Das Epitestosteron ist das 17-alpha-Epimer des Testosterons und besitzt keine nachgewiesene androgene Aktivität. [Dehennin and Matsumoto, 1993] Im Körper beträgt die Produktionsrate von Epitestosteron zu der des Testosterons unter 5%. [Basaria, 2010; Wilson and Lipsett, 1966] Da ein von außen zugeführtes Epitestosteron keine androgene Wirkung hat, aber einen Steroidmissbrauch durch Erniedrigen des T/E Verhältnisses verschleiern kann, steht es als Maskierungsmittel auf der Verbotsliste der WADA. Nachgewiesen werden kann ein solcher Missbrauch durch die CG/MS und eine zusätzliche $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometrie (IRMS), welches die Isotope der Kohlenstoff-Atome der Steroide analysiert. [Cawley *et al.*, 2009; Cawley and Flenker, 2008] Die nicht im eigenen Körper synthetisierten Steroide weisen aufgrund ihrer Herkunft ein verändertes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopen-Verhältnis auf, was auf einen exogenen Ursprung hindeutet. Die Verwendung von LH als leistungssteigerndes Mittel regt die endogene Testosteron/Epitestosteron Produktion an und gilt als indirekte Form des Androgen-Dopings. [Handelsman *et al.*, 2009]

Da das Nachweisverfahren für Testosteron-Doping mit exogenen Testosteron und Epitestosteron ein verändertes T/E- oder $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopen-

2. Grundlagen

Verhältnis detektiert und LH keinen dieser Parameter verändert, muss für das LH ein separater Nachweis erfolgen. Über einen Immunoassay kann die LH-Konzentration bestimmt werden. Im Körper werden das LH und das hCG-i mit zwei unterschiedlich schnellen Prozessen abgebaut. Die Halbwertszeit im ersten Prozess von humanen LH in Serum/Urin ist mit >20 min im Vergleich zu hCG-i >11 h verhältnismäßig kurz. Im zweiten, dem langsameren Prozess, beträgt die Serum-Halbwertszeit für LH >230 min und für das hCG-i >23 h. [Kicman *et al.*, 1991; YEN *et al.*, 1968] Rekombinantes LH (rLH) weist aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungen und dem Anteil an Sialinsäure eine 40% höhere Serum-Halbwertszeit auf als natürliches LH, was das Zeitfenster für eine Detektion vergrößert. [Wide *et al.*, 2010] Um einen androgenen Effekt zu erzielen, muss das LH (>10.000 IU) in entsprechend kurzen Abständen bis hin zu mehreren täglichen Dosen hochdosiert appliziert werden. [Handelsman *et al.*, 2009; Mulligan *et al.*, 2001; le Cotonnec *et al.*, 1998] Stenman beschreibt als *maximal effektiv im Vergleich zu Sicherheit* eine Einzel-Dosis von rLH von 15.000–30.000 internationale Einheiten (IU). Eine solche Dosis entspricht im Körper 5.000 IU/L gemessenem hCG-i im Urin, was um den Faktor 1.000 höher ist als der Grenzwert von 5 IU/L. [Stenman *et al.*, 2006]

Eine im Körper erhöhte LH Konzentration bei niedrigen Testosteron-Werten kann auf eine Insuffizienz der Hoden zurückgeführt werden. Durch eine genetisch bedingte Androgenresistenz bis hin zur testikulären Feminisierung kann es zu einer erhöhten LH- und Testosteron-Konzentration im Körper kommen. Hierbei kann aufgrund der veränderten Struktur an den Androgenrezeptoren das Testosteron nicht binden und so nicht androgen wirken. In beiden Fällen würde ein LH-Immunoassay ein auffälliges Ergebnis liefern. Aufgrund des Krankheitsbildes würde dieser Sportler bei jedem Test auf LH positiv sein, was eine Ausnahme Regelung bewirkt. Einen Vorteil haben diese Sportler aufgrund der fehlenden androgenen Wirksamkeit von Testosteron nicht. Weiterhin kann über einen niedrigen LH-Wert in Kombination mit einer auffällig hohen Testosteron-Konzentration der Verdacht auf Testosterondoping bestehen.

2.3.2. Das humane Choriongonadotropin (hCG-i) und seine Rolle als Dopingmittel

Das hCG-i besteht ebenso wie das LH aus zwei Untereinheiten. Dessen unspezifische α -Untereinheit mit 92 AS und einem Molekulargewicht von 14.000 Da ist identisch mit der des LH, TSH und FSH. Die für das hCG-i spezifische β -Untereinheit setzt sich aus 145 AS zusammen, das MW beträgt 23.500 Da [Birken *et al.*, 2003] und besitzt zu 82% Aminosäuresequenzhomologien zu der β -Untereinheit des LH. [Perera-Marin *et al.*, 2007; Talmadge *et al.*, 1984; Pierce and Parsons, 1981] Das C-terminale Ende der β -Untereinheit besitzt 4 O-Glykolysierungen maskiert von Sialinsäure die Einfluss auf die Serumhalbwertszeit haben, welche sich dadurch verlängert. [Handelsman *et al.*, 2009; Gervais *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 1984] Synthetisiert wird das hCG-i im Gegensatz zum LH in der Plazenta der Frau während des ersten Trimesters einer Schwangerschaft. Bei Mann und nichtschwangeren Frauen beträgt die geringe Genexpression für beide Untereinheiten des hCG-i 3 – 10% anteilig der des LH und kommt in Hoden, Brust, Prostata, und Skelettmuskulatur vor. [Bellet *et al.*, 1997; Alfthan *et al.*, 1992] Für therapeutische Zwecke kann hCG-i aus dem Urin von Schwangeren oder rekombinant aus einer immortalisierten Zelllinie von Ovarien des chinesischen Hamsters gewonnen werden. Beide Formen besitzen unterschiedliche Glykolysierungen, die Einfluss auf die Serumhalbwertszeit haben. Therapeutisch wird hCG-i bei künstlicher Befruchtung angewendet. [Stenman *et al.*, 2006] Aufgrund seiner Homologie bindet das hCG-i ebenfalls an dem LH-Rezeptor und aktiviert den Signalweg für die Testosteronbildung. [Ryu *et al.*, 1998] Im männlichen Körper beträgt die Serumhalbwertszeit des exogenen hCG-i mehr als 11 h. Der daraus resultierende Effekt auf die Steroid-Biosynthese durch die längere Bioverfügbarkeit macht das hCG-i als Dopingmittel relevant. [Kicman *et al.*, 1991] Über den Urin werden neben dem hCG-i mit seinen α - und β -Untereinheiten auch teilweise degradiertes oder nicked hCG (hCGn) bzw. nicked β -hCG (hCG- β -n) und ein sogenanntes β -core Fragment (hcg- β -cf) ausgeschieden. [Stenman *et al.*, 1993]

Das Auftreten dieser Fragmente des hCG-i macht einen spezifischen Nachweis aus Urin schwieriger und die Auswahl der Fängerantikörper aufwendiger. Gründe für einen natürlich erhöhten hCG- β Wert können

2. Grundlagen

verschiedene Tumore der Keimdrüsen (Hodenkrebs) oder Plazenta sein. [Stenman *et al.*, 2004] In diesem Fall würde ein Dopingtest für hCG-i einen auffälligen Befund liefern.

Über den in dieser Arbeit zu entwickelnden Schnelltest soll neben LH und hCG-i auch den für Tumore der Keimdrüsen als Tumormarker geltenden hCG- β Wert über einen Multiplex-Ansatz gemessen werden, um zwischen Tumor und Doping zu unterscheiden.

2.3.3. Varianten dieser Peptidhormone und pharmakologische Grenzwerte

Als Tumormarker bei Hodentumor dient die β -Untereinheit des hCG-i. Diese hCG- β Untereinheit wird unter anderem von Tumoren der Keimdrüsen gebildet und kann im Serum oder Urin detektiert werden. [Stenman *et al.*, 2004]

Weitere Möglichkeiten sind die Messung von hCG- β im Rahmen des ersten und zweiten Trimester-Screenings bei Verdacht von Trisomie 21 eines ungeborenen Kindes. [Malone *et al.*, 2005; Macri *et al.*, 1990] Die Referenzwerte von hCG-i und hCG- β werden sowohl in internationalen Einheiten (IU) pro Liter als auch pmol/L angegeben. 1 IU hCG-i entspricht dabei 0,11 μ g und 2,9 pmol. Beim hCG- β entsprechen 1 IU gleich 1 μ g und 42,5 pmol [Stenman *et al.*, 2006; Stenman *et al.*, 1993]. Die Konzentrationen korrelieren stark zwischen Serum/Plasma und Urin. [Stenman *et al.*, 2006] Das LH wird ebenfalls in IU/L angegeben. Hier ist der Umrechnungsfaktor von der konventionellen Einheit hin zur SI-Einheit 7. ([Hiort *et al.*, 2010]; Seite 77, Tabelle 5.2) Grundlegend hierfür ist die Annahme, dass die molare Konzentration nicht die Bioaktivität widerspiegelt. Unterschiedliche Glykolysierungen haben einen geringen Effekt auf die Immunreaktivität aber einen deutlichen Effekt auf die Bioaktivität. [Birken *et al.*, 2003] Die Referenzwerte im Serum und Plasma bei Männern sind für das LH 1,7-8,6 IU/L und < 3 IU/L für das hCG-i und das hCG- β . [Heil and Ehrhardt, 2007] Bei Dopingkontrollen liegt der Grenzwert im Urin für hCG-i bei 5 IU/L. [WADA, 2011]

Zusammenfassend lassen sich die angeführten Argumente der Notwendigkeit von Dopingkontrollen und das Potential, einen Schnelltest auf Basis der Mikroarray-Technologie zu entwickeln, in dieser Arbeit kombinieren.

2.4. Technisches Konzept

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer parallelen Mehrkomponentenanalyse von hCG-i und LH als Dopingparameter über Antigen-Antikörper-Reaktionen. Im Fokus soll hierbei die Machbarkeit eines Multiparameter-Ansatzes liegen, um parallel verschiedene Dopingparameter zu messen. Bei dem zu entwickelnden Assay soll ein geringes Probevolumen von unter 100 μl verwendet werden. Ebenfalls soll die Versuchszeit minimiert werden, um schnellstmöglich verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Die hierfür gewählten Peptidhormone: das LH, das hCG-i und dessen β -Untereinheit (hCG- β) sind in ihrer Primärstruktur partiell gleich und wurden bisher nicht parallel in Form eines Multiplexansatzes gemessen. Zur zweifelsfreien Bestimmung eines Dopingvergehens ist es zwingend notwendig, die drei Varianten in Plasma, Serum oder Vollblut nachweisen zu können. Nur so ist die Unterscheidung eines potentiellen Arzneimittelmissbrauchs von einem möglichen Tumor gewährleistet. Der entwickelte Assay soll nach einer Validierungsphase, die das Hauptaugenmerk dieser Arbeit darstellt, zukünftig in ein Point-of-Care Testsystem wie das der Fraunhofer In-vitro-Diagnostik Plattform (IvD) implementiert werden. [Schumacher *et al.*, 2012]

Als spezifisches Detektionselement soll ein Antigen-Antikörper System gewählt werden, das den Nachweis über Fluoreszenz markierte Sekundärantikörper erbringt. Die in Frage kommenden Antikörper für diesen Sandwich-Assay werden zunächst hinsichtlich ihrer Spezifität und Kreuzreaktivität über Western Blot geprüft. Die für den weiteren Prozess in Frage kommenden Antikörper werden auf dem Mikroarray mit unterschiedlichen Probenmatritzen auf Glasobjektträgern validiert. Im Vergleich zum herkömmlich verwendeten ELISA kann über die Verwendung eines Mikroarrays eine Vielzahl von Messungen parallel aus einer einzigen Probe gewonnen werden. Durch die von Roger Ekins bereits Ende der 80er Jahre beschriebenen *ambient analyte theory* für Ligandenbindungsassays, lässt sich durch Miniaturisierung eines oberflächenbasierenden Assays eine höhere Sensitivität erreichen, weshalb in diesem Kontext ein Mikroarray als Assayformat verwendet werden soll. [Ekins, 1989; Ekins *et al.*, 1989] Für die Verwendung von Mikroarrays auf Glasobjektträgern ist eine Modifikation in Form einer Silanisierung der Glasfläche notwendig. Maßgeblich für die in dieser Arbeit ausgewählten Modifizierung für die Glasobjektträger ist die

2. Grundlagen

Vergrößerung des Kontaktwinkels und die Hintergrundfluoreszenz, die im Vergleich zu der Fluoreszenzintensität der Mess- und Kontrollspots nach durchgeführten Assay möglichst gering sein sollte. Neben der Untersuchung des Detektions- und Quantifizierungsgrenzwertes im Puffersystem soll in anschließenden Versuchen die Lagerstabilität des Mikroarrays über einen Zeitraum von zwölf Wochen sowie eine Performance-Analyse durchgeführt werden. Bereits in diesem Validierungsstadium werden neben dem Puffersystem auch komplexe Standardproben in Form von Serum und Blut direkt und unter Zusatz der Peptidhormone (LH, hCG-i und hCG- β) gemessen. Für einen Dopingschnelltest als Point-of-care-Variante in der IvD-Plattform sind die Lagerstabilität des Mikroarray und die daraus resultierenden Ergebnisse maßgebend. Behandelte Standards versetzt mit den betreffenden Parametern haben nur eine bedingte Aussagekraft. Hierfür soll dieser Test aus einer Stichprobe mit Plasmaproben von zwei weiblichen und einer männlichen Person angewendet und die Leistungsfähigkeit untersucht werden. Eine der weiblichen Personen befand sich zum Zeitpunkt der Probenahme im zweiten Trimester einer Schwangerschaft. Die Untersuchung dieses Kollektivs dient dazu, Interferenzen bei späteren Dopingproben auszuschließen, da Sportler, die die genannten Merkmale (hCG- β) aufweisen, nicht als positiv ermittelt werden sollen. Abschließend sollen über eine Performance-Analyse 130 Serumproben über einen Einfach-Blind-Ansatz mit unterschiedlichen Konzentrationen der drei Peptidhormone versetzt und vermessen werden. Ebenfalls sollen bereits analysierte Proben aus Dopingkontrollen, die für Forschungszwecke zu Verfügung gestellt wurden, mit dem hier entwickelten Assay getestet und verglichen werden. Für die Auswertung dieser Performance-Analyse soll die Receiver-Operating-Characteristic (ROC) Analyse zur Validierung und Optimierung analytischer Systeme angewendet werden.

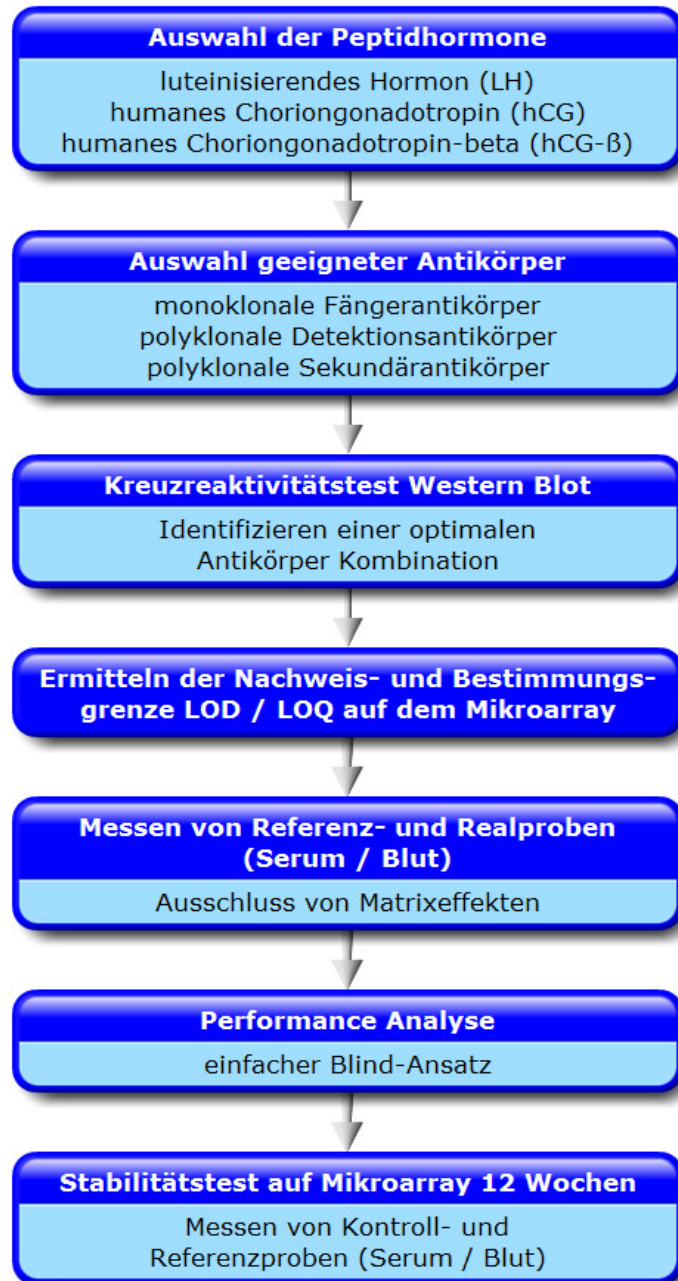


Abb. 2.3.: Fließschema der Arbeit Überschriften kennzeichnen den jeweiligen Arbeitsschritt, konkretisiert durch die in den hellblauen Kästen dargestellten Kommentare.

3. Material und experimentelle Arbeiten

3.1. Materialien

3.1.1. Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Antikörper/Peptidhormone und Software

Tab. 3.1.1.: Geräte

Geräteart	Bestell-Nr.	Hersteller /Vertrieb
Gießvorrichtung 8 x 10 cm SDS-Gel	10665103	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Mikrotitration Kamm, 18 Taschen 1 mm	10041742	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Gelelektrophoresekammer "Mighty Small II"	10550503	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Western Blot - Blotapparatur sciFLEXARRAYER S11		Eigenbau MPI MolGen, Berlin Scienion AG, Berlin
TECAN LS-Reloaded		TECAN, Crailsheim
16-Well Inkubationskammer	10486046	Maine Manufacturing, USA
FAST Frame Mikroarray Halter BCR604 Reader	10486001	Maine Manufacturing, USA IPM FhG, Freiburg
Schüttler ELMI S3.01		ELMI Ltd., Lettland
Kombischüttler KL 2	6115000	E. Bühler GmbH, Hechingen
Vortex-Genie 2 (Model G560E)	SI-0256	Scientific Industries, USA
Rollenschüttler	444-0819P	VWR, Darmstadt
Vakuum Verpackungsmaschine		BOSS, Bad Homburg

3. Material und experimentelle Arbeiten

Tab. 3.1.2.: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialart	Bestell-Nr.	Hersteller
Nitrozellulose Membran	RPN203E	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Filterpapier	3030917	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Proteinleiter-Mix	26619	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Glasobjektträger	631-1316	VWR-International, Dresden
Simple-Slide (TOPAS)	SL000001	ibidi GmbH, Martinsried
50 ml Reaktionsgefäß	91050	TPP Techno Plastic Product AG, Klettgau
15 ml Reaktionsgefäß	91015	TPP Techno Plastic Product AG, Klettgau
2,0 ml Reaktionsgefäß	S1620-2700	STARLAB, Hamburg
1,5 ml Reaktionsgefäß	S1615-5550	STARLAB, Hamburg
0,5 ml Reaktionsgefäß	S1605-0000	STARLAB, Hamburg

Tab. 3.1.3.: Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Bestell-Nr.	Hersteller
4-Chlor-1-naphthol	C8890	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammonium Persulfate (APS)	161-0700	Bio-Rad, München
Milchpulver	170-6404	Bio-Rad, München
Phosphate Buffered Saline (PBS)	L 182-01	Biochrome, Berlin
Rotiphorese Gel	3029.1	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	15596026	Invitrogen, Darmstadt
Western Blue	S3841	Promega, Mannheim
Ponceau S - Lösung	A2935.0500	Applichem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	648309	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	A1502,1000	Applichem, Darmstadt
Glycerol	356350-500ml	Merck, Darmstadt
beta-Mercaptoethanol	444203	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	1081220025	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	1063920500	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	1063290500	Merck, Darmstadt
Tween 20	A4974,0250	Applichem, Darmstadt
Glycin	3570-500GM	Merck, Darmstadt
Aceton	20.065.327	VWR, Dresden
3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GLYMO)	440167-100ML	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	A3648-500ML	Sigma-Aldrich, Steinheim
entionisiertes Wasser	—	HAUSANLAGE

3. Material und experimentelle Arbeiten

Tab. 3.1.4.: Fänger-, Detektions- und Sekundärantikörper

	Wirt	Hersteller	Sub- klasse	Katalog Nr.	Lot#/ Klon#	Batch
Fängerantikörper						
anti-LH β	Maus	Fitzgerald	IgG	10-L15A	M94186	711
anti-hCG β	Maus	Fitzgerald	IgG1	10-C25C	M705159	3814
anti-hCG β	Maus	Fitzgerald	IgG1	10-C25H	M94141	145
anti-hCG β	Maus	Fitzgerald	IgG1	10-C25FS	M15294	3910
anti-PSA	Maus	Fitzgerald	IgG1	10-P20B	M612152	210
anti-CRP	Maus	Meridian	IgG1	M86842M	4B04213/C2	
Detektionsantikörper						
anti-LH	Ziege	Fitzgerald		70-XG60	X8013599	
anti-hCG α	Ziege	Fitzgerald		70-XG35S	X11030601	
anti-hCG α	Ziege	Fitzgerald		70-XG35		
anti-hCG β	Ziege	Fitzgerald		70-XG45	X8013658	
anti-hCG β	Ziege	Fitzgerald		20-CG35	P8013411	
anti-CRP	Ziege	Meridian		K62350G	2C06105	
Markierte Sekundärantikörper						
Alexa Fluor [®] 647-konjugierter anti-Ziege	Maus	Jackson Immuno-Research	IgG (H&L)	205-605-108	99752	
DyLight [™] 649-konjugierter anti-Schaf	Maus	Jackson Immuno-Research	IgG1 κ	213-492-177	98624	
Cy [™] 5-konjugierter anti-Maus	Schaf	Jackson Immuno-Research	IgG	515-175-071	78866	
ALP-konjugierter anti-Maus	Ziege	Sigma	IgG	A1293		
HRP-konjugierter anti-Ziege	Kaninchen	Sigma	IgG	A5420		

Tab. 3.1.5.: Peptidhormone und Probenmaterial

	Wirt	Hersteller	Katalog Nr.	Lot#/ Klon#
Peptidhormone				
humanes luteinisierendes Hormon	human	Fitzgerald	30-AL20S	A07022713
humanes Choriongonadotropin intakt	human	MPBio	150683	212068301
humanes Choriongonadotropin β	human	Fitzgerald	30-AC50S	A07022708
Referenzmaterial				
Serum Immunoassay Premium Level 3		RANDOX	IA2640	
Serum Seronorm Human High	human	SERO	203005	1003179
Serum Basis-line Leerserum	human	Medidrug	40151	BB147
Serum Basis-line Leervollblut		Medidrug	40161	BC205
Kontroll-Kollektiv				
Serum männlich	human	intern		
Serum weiblich	human	intern		
Serum weiblich schwanger	human	intern		

3. Material und experimentelle Arbeiten

Tab. 3.1.6.: Software

Softwareart	Softwarebezeichnung	Hersteller
Laborsteuerungssoftware	BCR604 System Plattform	Fraunhofer Institut für physikalische Messtechnik, Freiburg
Bildbearbeitungssoftware	BCR604 Image Analysis	Fraunhofer Institut für physikalische Messtechnik, Freiburg
Laborsteuerungssoftware	sciFLEXARRAYER 2.07.002	Scienion AG, Berlin
Kalkulationssoftware	Origin 8.5G	OriginLab, USA
Microarray-Analyse-Software	ArrayPro 4.5	Media Cybergenetics, USA

3.2. Experimentelle Arbeiten

3.2.1. Ermitteln der Antikörper-Spezifität über Western Blot Versuche

Hierfür wurden zunächst das LH, hCG-i, hCG- β , Serum Immunoassay Premium Level 3, Serum Basis-line Leerserum sowie das Blut Basis-line Leervollblut über die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in ihrer Molekularmasse aufgetrennt [Laemmli, 1970] und im Anschluss auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Für die denaturierende SDS-PAGE sind 15% SDS-Trenngele mit 5% SDS-Sammelgel und einem Mikrotitrations-Kamm (18 Taschen, 1 mm) in einer Größe von 10 x 8 cm mit der Gießvorrichtung für SDS-Gele angefertigt worden.

(siehe Gelzusammensetzung: A.1.1) Nach dem Auspolymerisieren der Gele, wurden diese über Nacht mit bi-dist. H₂O getränkten Tüchern und Frischhaltefolie umwickelt und bei 4°C gelagert. Für die Probenvorbereitung der SDS-PAGE wurden die Peptidhormone und das Referenzmaterial mit 1 x PBS wie folgt verdünnt und mit Probenpuffer versetzt. (Tab. 3.2.1)

Anschließend wurden die Proben bei 95°C für 5 min aufgekocht. Diese werden nach dem Abkühlen auf Eis zu je 10 μ l pro Tasche in die Gele pipettiert und bei einer Stromstärke von 120 V für 60 min aufgetrennt. Zur Feststellung der Beladung der SDS-Page wurde ein Vorversuchsgel in der Coomassie-Färbelösung für 30 min auf dem Kombischüttler bei 100 rpm inkubiert. Das anschließende Entfärben mit der Coomassie-Entfärbelösung wurde ebenfalls auf dem Kombischüttler bei 100 rpm für 30 min und mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung durchgeführt. Die für den Western Blot benötigten Gele wurden nicht mit Coomassie angefärbt. Der sich dem SDS-PAGE anschließende Western Blot ist nach dem Semi-Dry Verfahren durchgeführt worden. Hierfür wurden 1,5 mA/cm² für 90 min an die Blotapparatur angelegt. Die angelegte Stromstärke berechnet sich aus der Gesamtfläche aller auf der Blotapparatur befindlichen Gele. Durch den Strom werden die zuvor der Größe nach getrennten Proteine auf die Nitrozellulose Membran transferiert. Die Nitrozellulose Membranen werden im Anschluss für 15 min in einer Schale mit Ponceau S auf den Schüttler bei 100 rpm Schwenkbewegung gelegt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren und das Hintergrundsignal zu verringern, wurden die Nitrozellulose Membranen über Nacht bei 4°C geblockt. Hierfür wurde

3. Material und experimentelle Arbeiten

Tab. 3.2.1.: Gelbeladung der Peptidhormone und Referenzmaterial für den SDS-PAGE Vorversuch und der SDS-PAGE für den Western Blot.
Für die entsprechenden Taschen wurde jeder Probe (8 µl) 2 µl Probenpuffer zugegeben. Der Marker wurde mit 5 µl aufgetragen.

Peptidhormone/ Probe	SDS-PAGE Vorversuch			SDS-PAGE Western Blot		
	Tasche	Verdün- nung	Konz. in mU/ml	Tasche	Verdün- nung	Konz. in mU/ml
Proteinleiter-Mix	M	-	-	M	-	-
hCG-i	1	-	14.000	1	-	14.000
hCG-β	2	-	1.000	2	-	1.000
LH	3	-	14.285,7	3	-	14.285,7
<i>Serum</i> Immunoas- say Premium Le- vel 3	4	-	-	4	1:20	-
<i>Serum</i> Seronorm Human High	-	-	-	5	1:20	-
<i>Blut</i> Basis-line Leervollblut	-	-	-	6	1:20	-
Proteinleiter-Mix	M	-	-	M	-	-
hCG-i	5	1:10	1.400	1	-	14.000
hCG-β	6	1:10	100	2	-	1.000
LH	7	1:10	1.428,57	3	-	14.285,7
<i>Serum</i> Immunoas- say Premium Level 3	8	1:10	-	4	1:20	-
<i>Serum</i> Seronorm Human High	9	1:10	-	5	1:20	-
<i>Blut</i> Basis-line Leervollblut	10	1:10	-	6	1:20	-
Proteinleiter-Mix	M	-	-	M	-	-

jede Nitrozellulose Membran in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit der Proteinsei-
te nach innen hineingelegt und in 1 x PBS + 0,05% Tween + 10% Milchpulver
auf dem Rollenschüttler inkubiert. Durch zweimaliges Waschen der Mem-
branen mit dem Waschpuffer wurden diese für die Inkubation mit den
Detektionsantikörpern (Tab. 3.2.2) vorbereitet. Die Antikörper wurden auf

eine Konzentration von 1 µg/ml in Blockpuffer verdünnt und mit jeweils einer Membran für 90 min bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen der Membranen mit dem Waschpuffer wurden diese mit dem Sekundärantikörper (1 µg/ml in Blockpuffer) für 60 min bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert. (Tab. 3.2.2)

Tab. 3.2.2.: Western Blot Versuchsanordnung

Membran	Detektionsantikörper 1 µg/ml	Sekundärantikörper 1 µg/ml
1	hCG-β mAK 10-C25C	ALP-konjugierter Ziege anti-Maus A1293
2	hCG-β mAK 10-C25FS	ALP-konjugierter Ziege anti-Maus A1293
3	Kontrolle	ALP-konjugierter Ziege anti-Maus A1293
4	LH mAK 10-L15A	ALP-konjugierter Ziege anti-Maus A1293
5	Kontrolle	HRP-konjugierter Kaninchen anti-Ziege A5420
6	hCG-α pAK 70-XG35S	HRP-konjugierter Kaninchen anti-Ziege A5420
7	hCG-β pAK 70-XG45	HRP-konjugierter Kaninchen anti-Ziege A5420
8	LH pAK 70-XG60	HRP-konjugierter Kaninchen anti-Ziege A5420

Im Anschluss des zweiten Inkubationsschrittes mit den Sekundärantikörpern wurde erneut zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Der ALP-konjugierte Sekundärantikörper zum Nachweis der monoklonalen Fängerantikörper (Tab. 3.2.2, Zeile 1 – 4) ist durch die Inkubation der Membranen für 20 min mit Western Blue und dessen Farbreaktion sichtbar gemacht worden. Abgestoppt wurde die Reaktion mit bi-dist. H₂O. Der mit HRP konjugierte Sekundärantikörper zum Nachweis der polyklonalen Detektionsantikörper (Tab. 3.2.2, Zeile 5 – 8) wurde mit der Peroxidase-Substratlösung nachgewiesen. Diese Nachweislösung wurde für 20 min zu je 10 ml auf die Blots gegeben. Nach sichtbar werden der Banden durch die Farbreaktion wurden die Membranen mit H₂O gewaschen, eingescannt und

3. *Material und experimentelle Arbeiten*

optisch ausgewertet. Die Kreuzreaktivität wird darüber bestimmt, inwiefern die getesteten Antikörper neben der zu erwartenden noch weitere Banden unspezifisch detektieren. Hierfür wurden neben den jeweils einzeln getesteten Peptidhormone auch komplexe Proben gemessen. Neben dem Testen auf Kreuzreaktivität wurde auch auf das spezifische Erkennen der α - oder β -Untereinheit der Peptidhormone, welche aufgrund der denaturierenden SDS-PAGE und ihrer unterschiedlichen Größe getrennt im Gel vorliegen, bewertet.

3.2.2. **Optimieren der Versuchsparameter auf Mikroarray-Glasobjektträgern**

Um im Rahmen der Assay-Optimierung die Versuchsbedingungen zu erhalten, welche die Auswahl von Reagenzien und die Standardisierung von Protokollen einschließt, wurden unterschiedliche Spot-Puffer und Spot-Volumina sowie unterschiedliche Konzentrationen der Fänger-Antikörper getestet. Weiterhin wurde der gesamte Prozessablauf vom Spotten bis zum Auslesen der Mikroarray-Glasobjektträger am TECAN-LS in folgenden Punkten optimiert. Der Blockpuffer wurde in drei unterschiedlichen Milchpulverkonzentrationen mit 1, 5 und 10% in 1 x PBS variiert. Als Oberfläche wurden Glasobjektträger mit folgenden Oberflächen Modifizierungen verwendet. Glasobjektträger mit einer APTES modifizierten Oberfläche besitzen eine Amino-Gruppe, welche für kovalente oder adsorptive Bindung von Peptiden, Proteinen, DNA oder andere biologische oder chemische Strukturen zu Verfügung steht. Im Gegensatz zum APTES haben GLYMO modifizierte Oberflächen einen Epoxid Ring an dem ein nukleophiler Angriff erfolgen kann und dadurch eine kovalente Bindung resultiert. Versuche auf TOPAS Objektträgern (Thermoplastic Olefin Polymer of Amorphous Structure) bilden die Schnittstelle, diesen Assay auf die IvD-Plattform und die dort verwendeten Prismenslide zu transferieren. Um die Spot-Antikörperkonzentration zu erhalten, bei der es nicht zu einer Überladung der Spots kommt, wurden Antikörperkonzentrationen 0,001, 0,01, 0,1, 1 und 2 mg/ml getestet. Die Konzentration der Detektion- und Sekundäranantikörper wurde in Konzentrationen von 1, 10, 20, 50 und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ getestet. Unter stabile Signalintensität fällt hier, dass die Detektion- und Sekundäranantikörper keinen limitierenden Faktor für die Signalintensität darstellen. Die

für die Detektion- und Sekundärantikörper getesteten Puffer sind 1 x PBS, 1 x PBS + 1% MP, 1 x PBS + 5% MP und 1 x PBS + 10% MP. Als Waschpuffer wurde 1 x PBS mit 0,01, 0,05 und 0,1% Tween 20 geprüft. Der Waschvorgang zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde durch folgende Schritte validiert. Der Waschpuffer nach Absaugen der Probe, Detektion- und Sekundärantikörperlösung durch einmaliges Einfüllen von 100 µl und entfernen auf seine Wascheffizienz hin getestet. Weitere für den Waschschrift getestete Abläufe waren Verdoppeln des bereits beschriebenen Waschschriftes sowie das zusätzliche fünf-malige auf- und abpipettieren der Waschlösung in der Inkubationskammer. Die Inkubationszeiten der Proben, der Detektion- und Sekundärantikörper stellten einen weiteren wichtigen Faktor bei der Assay-Validierung dar. Diese wurde in den Schritten 15, 30, 45, 60, 90 und 120 min getestet. Nach Beenden des Assay und dem Zerlegen der Inkubationsapparatur wurde ein weiterer Waschschrift getestet. Für diesen wurde die Anzahl der Wiederholungen für das Eintauchen der Mikroarray-Glasobjektträger 5, 10 und 20 x und die Anzahl der Messbecher mit bi-dist. H₂O 1 und 2 variiert. Um zu gewährleisten, dass alle Proben aus derselben Quelle stammen und die Anzahl an Einfrier-Auftau Zyklen identisch sind, wurden die Peptidhormone zu je 10 µl aliquotiert und gemäß Herstellerangaben bei -18°C gelagert. Die als Lyophilisat vorliegenden Proben-Standards wurden an jedem Versuchstag rekonstituiert. Das daraus resultierende optimierte Protokoll dient der Durchführung aller in dieser Arbeit gezeigten Versuche mit Mikroarray-Glasobjektträgern und Mikroarray-TOPAS Objektträgern.

3.2.3. Herstellen und Lagerung der Mikroarrays auf Glasobjektträgern als Vorstufe der Assay Durchführung

Für die Durchführung der Mikroarray-Versuche wurden Glasobjektträger verwendet, welche im Fraunhofer Institut für biomedizinische Technik (Potsdam-Golm) oberflächenmodifiziert worden sind. Diese Oberflächenmodifizierung mit einem 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GLYMO) dient über den Epoxid Ring als Haftvermittler für das kovalente Binden der gespotteten Antikörper und dem Vergrößern des Kontaktwinkels von unter 20° bei unbehandelten Glasobjektträgern auf 60 – 70° der GLYMO-modifizierten Glasobjektträger. Der für die Herstellung der Mikroarrays

3. Material und experimentelle Arbeiten

verwendete SciFLEXARRAYER ist ein kontaktfreier Spotter. Für die in dieser Arbeit verwendeten Mikroarrays wurden Spotvolumina von 1 nl verwendet. Der Abstand von Spotmittelpunkt zu Spotmittelpunkt beträgt 500 µm bei einem Spotdurchmesser von 220 µm (± 10 µm). Als Layout der Mikroarrays wurde ein spiegelgleiches 8 x 8 Spotmuster gewählt.

(exemplarisch Abb. 3.1)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Maus anti-Schaf	mAK LH-beta	mAK hCG-beta-c	mAK hCG-beta-h	mAK hCG-beta-h	mAK hCG-beta-c	mAK LH-beta	Maus anti-Schaf
2	mAK LH-beta	Bicarbonat-Puffer	mAK hCG-beta-fs	mAK PSA	mAK PSA	mAK hCG-beta-fs	Bicarbonat-Puffer	mAK LH-beta
3	mAK hCG-beta-c	mAK hCG-beta-fs	pAK CRP	mAK CRP	mAK CRP	pAK CRP	mAK hCG-beta-fs	mAK hCG-beta-c
4	mAK hCG-beta-h	mAK PSA	mAK CRP	Maus anti-Schaf	Maus anti-Schaf	mAK CRP	mAK PSA	mAK hCG-beta-h
5	mAK hCG-beta-h	mAK PSA	mAK CRP	Maus anti-Schaf	Maus anti-Schaf	mAK CRP	mAK PSA	mAK hCG-beta-h
6	mAK hCG-beta-c	mAK hCG-beta-fs	pAK CRP	mAK CRP	mAK CRP	pAK CRP	mAK hCG-beta-fs	mAK hCG-beta-c
7	mAK LH-beta	Bicarbonat-Puffer	mAK hCG-beta-fs	mAK PSA	mAK PSA	mAK hCG-beta-fs	Bicarbonat-Puffer	mAK LH-beta
8	Maus anti-Schaf	mAK LH-beta	mAK hCG-beta-c	mAK hCG-beta-h	mAK hCG-beta-h	mAK hCG-beta-c	mAK LH-beta	Maus anti-Schaf

Abb. 3.1.: Spotmuster der Mikroarrays Spotmuster der Mikroarrays auf den modifizierten Glasobjektträgern. Der Nachweis für jedes Peptidhormon wurde durch jeweils 8 Spots über die Fluoreszenz gemessen und der daraus gebildete Mittelwert für die Auswertung verwendet. Dieses exemplarische Spottmuster wurde für das Ermitteln der Kreuzreaktivität, der LOQ sowie das Messen von Referenz- und Real-Proben verwendet.

Der Vorteil bei der Verwendung eines spiegelgleichen Spotmusters besteht darin, dass die Auswertung unabhängig von dem Auslesegerät angewendet werden kann. Beim späteren Auslesen der IvD-Kartuschen wird dieses Spotmuster horizontal gespiegelt und um 90° nach rechts gedreht ausgelesen. Um einer aufwendigen Spotzuordnung in der Auswertung zuvor zu kommen, wurde dieses spiegelgleiche Spotmuster erstellt. Die für den Assay relevanten Fänger-Antikörper sind in einer Konzentration von 1 mg/ml verdünnt in einem Carbonat-Bicarbonat Puffer gespottet worden. Die Kontrollen mAK PSA (1 mg/ml), mAK CRP und der pAK CRP (beide mit 0,1 mg/ml) wurden ebenfalls in einem Carbonat-Bicarbonat Puffer pH 9,6 verdünnt und gespottet. Das in Abbildung 3.1 exemplarisch gezeigte Spotmuster wurde auf den modifizierten Glasobjektträger als zwölffache Wiederholung gespottet. Somit können je Objektträger zwölf Versuche zeitgleich durchgeführt werden. Nach dem Aufbringen der Spots auf die Glasobjektträger wurden diese über Nacht bei 4°C und einer Luftfeuchte von >80% waagrecht gelagert. Um das Hintergrundsignal der Glasobjektträger für die Auswertung zu minimieren wurden die Objektträger im folgendem Schritt mit 1 x PBS + 10% Milchpulver für 2 h auf dem Kombischüttler bei 100 rpm geblockt. Nach mehrmaligen Waschen (20 maliges Eintauchen in zwei Bechergläser) der Objektträger mit bi-dist. H₂O wurden diese mit

Druckluft getrocknet und im TECAN LS mit 16 bit Farbtiefe, welche einem Wertebereich von 65.535 Graustufen entspricht und einer Auflösung von 10 µm ausgelesen. Somit lassen sich die Spotqualität und der Hintergrund anhand der gemessenen Signalintensität beurteilen. Die Spotqualität und der Hintergrund lassen sich dahingehend bewerten, ob die Spots eine einheitliche Morphologie haben und nicht ineinander gelaufen sind. Ebenso sind auftretende Satelliten ein Kriterium für eine schlechte Spotqualität. Das Hintergrundsignal wurde über das Signalverhältnis zwischen der gespotteten Leerkontrolle mit dem Bicarbonat-Puffer und der Spotkontrolle mit dem DyLight™649-konjugierter Maus anti-Schaf mAK ermittelt. Ein berechneter Wert von > 5% stellt für die Leerkontrolle im Verhältnis zur Spotkontrolle das Ausschlusskriterium für einen Glasobjektträger dar. Die Beurteilung der Oberflächenmodifizierung bezüglich des Signal-Hintergrund-Verhältnisses als Qualitätsmerkmal ist sowohl bei kommerziell erhältlichen als auch bei selbst modifizierten Glasobjektträgern notwendig. Die Objektträger wurden mit einem Vakuumgerät mit 80% Vakuumpumpenleistung und einer Schweißzeit von 1,2 s eingeschweißt und die Mikroarray-Glasobjektträger bis zu den Versuchen bei 4°C eingelagert.

3.2.4. Verifizieren der Western Blot Ergebnisse zur Feststellung der Kreuzreaktivität auf Mikroarray-Glasobjektträger

Um die Ergebnisse der Western Blot Versuche zu überprüfen, wurden umfangreiche Kreuzreaktivitätstest durchgeführt. Die hierfür gewählten Peptidhormon-Konzentrationen sind mit 500 mU/ml für das hCG- α und das hCG- β sowie 100 mU/ml für das LH detektierbar. Der Umfang dieser Kreuzreaktivitätsversuche beinhaltet neben dem in 1 x PBS Puffer durchgeführten Versuchen weitere mit Standardserum/-blut sowie Kontrollserum/-blut. Hierbei galt es ein falsch positives Messsignal, welches durch Kreuzreaktivität einzelner Assaybestandteile hervorgerufen wird, zu erkennen und durch den Einsatz alternativer Antikörper zu verhindern. Der hierfür gewählte Versuchsansatz beinhaltet unterschiedliche Kombinationen zwischen Probenmatrix, Peptidhormon und Detektionsantikörper. (Tab. 3.2.3) Die Umrechnung der Peptidhormon Konzentrationen wurde folgendermaßen berechnet. Das hCG- α liegt in einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml

3. Material und experimentelle Arbeiten

und einer Bioaktivität von 14.000 U/mg vor. Dies entspricht einer Bioaktivität von 14.000 mU/ μ l in der Stammlösung. Die β -Untereinheit des hCG liegt als Stammlösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml vor. Der Hersteller gibt hierfür keine Bioaktivität an. Nach [Stenman *et al.*, 2006] wird die Bioaktivität für das hCG- β mit 1 U/ μ g angegeben. Demnach beinhaltet die Stammlösung des hCG- β 100 U/ml oder 100 mU/ μ l. Das LH lag in einer Konzentration von 0,1 mg/ml vor.

Tab. 3.2.3.: Versuchsschema zur Detektion möglicher Kreuzreaktivität der Assaybestandteile. Als Probenmatrix wurde analog zu dem 1 x PBS Puffer auch das Standardserum/-blut sowie Kontrollserum/-blut nach gleichem Schema getestet. Die Kreuze stehen für die Kombinationen von Peptidhormon und Detektionsantikörper.

Peptidhormon	polyklonale Detektionsantikörper gegen			
	hCG- α	hCG- β	LH	CRP
-	-	-	-	-
	x	-	-	-
	-	x	-	-
	-	-	x	-
	-	-	-	x
100 mU/ml LH	-	-	-	-
	x	-	-	-
	-	x	-	-
	-	-	x	-
	-	-	-	x
500 mU/ml hCG	-	-	-	-
	x	-	-	-
	-	x	-	-
	-	-	x	-
	-	-	-	x
36 mU/ml hCG- β	-	-	-	-
	x	-	-	-
	-	x	-	-
	-	-	x	-
	-	-	-	x

3.2.5. Durchführung des Assays und ermitteln der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze (LOD/LOQ) auf den Mikroarray-Glasobjektträgern

Um die Nachweis- und Quantifizierungsgrenze (LOD/LOQ) auf den Mikroarray-Glasobjektträgern zu ermitteln, wurden folgende Versuchsanordnungen gewählt. Der getestete Konzentrationsbereich für das LH liegt bei 0-100 mU/ml, für hCG-i 0-500 mU/ml und hCG- β 0-300 mU/ml. Diese Bereiche schließen die klinisch relevanten Grenzwerte mit ein, jedoch sind bei einem Dopingvergehen deutlich höhere Werte für das hCG-i von über 5.000 mU/ml zu erwarten. [Stenman *et al.*, 2006] Für die unterschiedlichen Konzentrationen wurde jeweils ein Mikroarray-Glasobjektträger mit zwölf Sub-Arrays prozessiert. Hierfür wurde auf dem Mikroarray-Glasobjektträger die 16-Well Inkubationskammer gelegt und zusammen in den FAST Frame Mikroarray Halter fixiert. Der FAST Frame Mikroarray Halter hat eine Kapazität von vier Glasobjektträgern in Kombination mit den 16-Well Inkubationskammern. Die Peptidhormone wurden entsprechend der Versuchsanordnung in 1 x PBS verdünnt. Für jeden Versuch in einem Sub-Array wurden 100 μ l Endvolumen benötigt. Gemäß der Versuchsanordnung wurden die Peptidhormone und Kontrollen in die Inkubationskammern der entsprechenden Sub-Arrays gefüllt. Nach der Inkubationszeit von 15 min wurden die Lösungen abgenommen und mit der Waschlösung gespült. Dafür wurde der Waschpuffer in die Inkubationskammern gegeben und durch fünfmaliges resuspendieren, ungebundenen Restbestandteile der Lösung entfernt. Dieser Waschschrift wurde bei Serum-/Blutproben bis zu dreimal wiederholt. Die Detektions- und der Sekundärantikörper wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in Blockpuffer verdünnt und analog zu den Peptidhormonen nacheinander in die Inkubationskammern gefüllt. Nach jedem Inkubationsschritt von 15 min mit dem Detektions- und Sekundärantikörper wurde ebenfalls mit dem Waschpuffer durch fünfmaliges resuspendieren gespült. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Apparatur zerlegt und die Mikroarray-Glasobjektträger durch jeweils zwanzigfaches Eintauchen in zwei mit bi-dist. H₂O gefüllten Bechergläsern erneut gewaschen. Dieser Waschschrift sollte den Mikroarray-Glasobjektträger von verbliebenen Assay-Bestandteilen säubern. Jedes

3. Material und experimentelle Arbeiten

Peptidhormon wurde durch die Signalintensität über 8 Spots auf einem Mikroarray gemessen ($n = 8$) und daraus der Mittelwert sowie die Standardabweichung für den jeweiligen Versuch gebildet. Die Kreuzreaktivitätsversuche welche parallel zu allen Konzentrationsreihen durchgeführt wurden, belaufen sich auf 15 Versuche je getesteten Detektionsantikörper. Die Anzahl der Wiederholungen von Konzentrationsreihen der einzelnen Peptidhormone zur Ermittlung der LOD/LOQ belaufen sich auf drei. Die analytische Sensitivität lässt sich so aus der LOD ableiten, wobei sie die geringste detektierbare Konzentration jedes Parameters bestimmt. Die analytische Spezifität bestimmt wie stark der Einfluss von anderen Peptidhormonen auf das Messsignal des fraglichen Parameters ist.

3.2.6. Messen von Referenz- und Realproben (Serum/Blut)

Angelehnt an die Versuchsdurchführung zur Ermittlung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze (LOD/LOQ) auf den Mikroarray-Glasobjektträgern wurden die Referenzproben als Proben-Standards Basis-line Leerserum (Leerserum), Seronorm Human High (Vollserum) und Basis-line Leervollblut (Leerblut) unbehandelt und mit 100 mU/ml LH, 100 und 500 mU/ml hCG sowie 100 und 500 mU/ml hCG- β versetzt gemessen. Die unterschiedlichen Proben-Standards sollten reale Testbedingungen simulieren. Das Leerserum bildete die Negativkontrolle. Gemäß Herstellerangaben beinhaltet dieses Leerserum keinen der hier untersuchten Parameter. Nach Zugabe der zu untersuchenden Peptidhormone bildete das Leerserum eine komplexe Matrix, aus dem die jeweiligen Peptidhormone über den Assay detektiert wurden. Das Vollserum bildete die Positivkontrolle. In diesem Proben-Standard befand sich bereits das hCG-i in einer Konzentration von 191 mU/ml plus minus 14% gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer (RiLiBÄK) zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen.

Über diese Positivkontrolle konnten Inkubationszeiten optimiert werden. Hierfür wurde das Vollserum 15, 30, 45, 60, 90 und 120 min auf dem Assay inkubiert. Eine weitere Optimierung erfolgte hinsichtlich des gemessenen Signals des hCG-i auf diesem Assay und der Einfluss von 0, 2,5, 100 mU/ml LH oder 100, 500 mU/ml hCG- β . Das Basis-line Leervollblut stellte ei-

nen weiteren Probenstandard auf Basis von Vollblut dar, der auf mögliche Verwendung für diesen Assay getestet werden sollte. Die als Referenzmaterial lyophilisierte Vollblutkontrolle ist auf Basis von Humanblut hergestellt worden und beinhaltet keinen, der für diesen Assay fraglichen Parameter. Durch Zugabe von 100 mU/ml LH, 100 und 500 mU/ml hCG- α sowie 100 und 500 mU/ml hCG- β in Einzelversuchen wurde Blut als Matrix getestet.

Weitere Proben für die Assay Optimierung stellten Realproben von drei Probanden dar. Diese Proben wurden den Personen in Form von 10 ml Vollblut in Serum-Gel-Monovetten abgenommen. Die ersten 15 Minuten nach der Blutentnahme wurden die Monovetten für den Gerinnungsprozess stehend gelagert. Anschließend wurde durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 2.500 g bei Raumtemperatur das Serum und der Blutkuchen durch eine Gelschicht getrennt. Das so erhaltene Serum wurde abgenommen und bei -18°C rückgestellt.

3.2.7. Ermitteln der diagnostischen Sensitivität und Spezifität über einen Einfach-Blind-Ansatz

Die Durchführung einer Performance-Analyse unter Verwendung eines Klassifikationsverfahrens hat den Vorteil, diskret zwischen zwei Zustände zu unterscheiden. Hier kommt es darauf an, zwischen negativen und positiven Proben differenzieren zu können. Jede gemessene Probe lieferte für die drei Parameter jeweils einen gemittelten Fluoreszenzwert ($n = 8$). Für jede Probe wurde der zugehörige Status für die jeweiligen Parameter den gemittelten Fluoreszenzwerten zugewiesen. Um verwertbare Ergebnisse zu erhalten, muss sich die Verteilung des Einfach-Blind-Ansatzes in die entsprechenden Gruppen positive Probe ($S = 1$) und negative Probe ($S = 0$) unterscheiden lassen. 30 Proben bildeten in jedem Probenpool die negative Gruppe. Für eine Diagnose R, muss eine Zuordnungsregel definiert werden. Das Ermitteln eines Grenzwertes (cut-off), ab dem eine Probe als richtig positiv (Sensitivität) oder als richtig negativ (Spezifität) gewertet wurde, stellt demnach die Zuordnungsregel dar. Für den Fall, dass sich die gemittelten Fluoreszenzwerte der Proben überlappen, entstanden Fehlklassifikationen. Hierüber wurden aufgrund des tatsächlichen Status die Wahrscheinlichkeiten für eine korrekte Klassifikation verwendet. Über den

3. Material und experimentelle Arbeiten

cut-off wurde so die Sensitivität und die Spezifität ermittelt. Für das Beurteilen einer Probe als positiv, sollte der Test möglichst spezifisch ausgelegt sein. Ein falschnegativer Befund (eine positive Probe als negativ gewertet) war in diesem Kontext vertretbar, im Gegensatz zu einer falsch positiven Probe (eine negative Probe als positiv gewertet).

Für eine Performance-Analyse und dem Ermitteln der diagnostischen Sensitivität und Spezifität in Serum wurde für jedes Peptidhormon ein Probenumfang von 130 Proben mit folgenden Konzentrationen hergestellt. (Tab. A1, Anhang) Jedes Replikat aller Peptidhormon Konzentrationen des hCG-i wurde randomisiert eine hCG- β (n-1) und eine LH-Konzentration (n+1) zugewiesen. Somit ist gewährleistet, dass jede Peptidhormon Konzentration in diesem Panel zehn Mal vertreten ist und jede Probe eine einzigartige Kombination aller drei Peptidhormone aufweist.

Für den Einfach-Blind-Ansatz wurden 130 Reaktionsgefäße mit je 120 μ l Leerserum vorgelegt. Für die jeweilige Peptidhormon Kombination wurden von jedem Peptidhormon und der entsprechenden Konzentration 10 μ l in das vorgelegte Serum pipettiert. Das Gesamtvolumen jeder Probe belief sich so auf 150 μ l. Das Pipettieren der Peptidhormonkombinationen wurde durch eine versuchsunabhängige Person durchgeführt. Dabei wurde willkürlich ein zuvor durchnummeriertes Reaktionsgefäß einer Probe zugeordnet und dieses protokolliert. Somit ließen sich die so anonymisierten Proben nach der Auswertung wieder entschlüsseln.

Die so hergestellten 130 Proben wurden bei -18°C bis zur Durchführung der Versuche gelagert. Des Weiteren standen für diesen Versuch zehn männliche, zehn weibliche und drei Kontrollproben aus dem Institut für Biochemie/Zentrum für Präventive Dopingforschung als anonymisierte Proben zu Verfügung.

Ebenfalls wurde in diesem Versuch für jedes Peptidhormon eine Konzentrationsreihe mitgeführt. Hierfür wurde für das LH die Konzentrationen 0, 2, 4, 10, 20, 30, 50 und 100 mU/ml in Leerserum verwendet. Für das hCG-i und das hCG- β sind folgende Konzentrationen in Leerserum verwendet worden: 0, 2, 4, 10, 20, 50, 100 und 300 mU/ml.

Die Durchführung des Versuchs zur Ermittlung der Assay Performance entsprach dem im Abschnitt 3.2.5 auf den Mikroarray-Glasobjektträgern beschriebenen Protokoll. Die bei 6°C gelagerten Glasobjektträger wurden vor der Installation in die Halterung für 30 min auf Raum-Temperatur

erwärmt. Die 130 Serumproben, die 23 Realproben und die 25 Proben für die Verdünnungsreihe wurden ebenfalls bei Raum-Temperatur aufgetaut und vor dem Auftragen auf ein Sub-Array für zehn Sekunden mit dem Vortexer gemischt. Die folgenden Schritte sind unverändert nach dem Protokoll unter Abschnitt 3.2.5 durchgeführt worden.

3.2.8. Erstellen einer ROC-Analyse aus den Daten des Einfach-Blind-Ansatz

Das Anwenden der Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Analyse zur Validierung und Optimierung analytischer Systeme lässt eine qualitative Bewertung eines Test-Systems zu. [Fawcett, 2006] Zusätzlich kann über eine solche Analyse je nach Fragestellung der optimale Grenzwert (cut-off) bestimmt werden. Im Bereich der Medizin wurden ROC-Analysen ab Ende der 1960er Jahre zunehmend angewendet.

[Hanley, 1989; Hanley and McNeil, 1982; Metz, 1978] Ziel ist es falsch positive und falsch negative Befunde identifizieren und darüber hinaus in Abhängigkeit einer definierten Sensitivität und Spezifität für jeden Parameter individuelle, optimierte Grenzwerte zu bestimmen.

Aus den Messwerten der 64 Spots jedes Sub-arrays welche über die Fluoreszenzintensität abgebildet werden, wurden nach dem Auslesen der Glas-Slides im TECAN-LS der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die 130 Proben wurde über den Pipetierschlüssel und der ursprünglichen Peptidhormon Konzentration in positiv oder negativ eingeteilt. Diese Einteilung wurde für jeden Parameter separat durchgeführt. Durch die Interpretation der Messergebnisse wurden alle 130 Proben in einer Konfusionsmatrix (Tab. 3.2.4) mit den entschlüsselten Probeneigenschaften zusammengestellt. Die 20 Realproben wurden ebenfalls nach Interpretation der Messergebnisse in einer solchen Konfusionsmatrix eingetragen.

Für die Durchführung einer ROC-Analyse wurde zunächst eine ROC-Kurve erstellt. Hierbei wurde das Verhältnis zwischen Spezifität und Sensitivität gegeneinander aufgetragen. Die Anzahl der gemessenen positiven Seren wurde in "richtig positiv" (RP) und "falsch positiv" (FP) sowie die gemessenen negativen Seren in "richtig negativ" (RN) und "falsch negativ" (FN) für jeden Parameter und Probe aufgeteilt. Anschließend konnte die Sensitivität, welche die Fähigkeit definiert einen tatsächlich

3. Material und experimentelle Arbeiten

Tab. 3.2.4.: Klassifizieren der Messergebnisse in Form der ermittelten Klasse und der tatsächlichen Klasse über eine Wahrheitsmatrix.
(Verändert nach [Fawcett, 2006])

		Serum mit definierter AG Konzentration	
		Positiv	Negativ
Testresultat	Positiv	Richtig Positiv (RP)	Falsch Positiv (FS)
	Negativ	Falsch Negativ (FN)	Richtig Negativ (RN)
Gesamtzahl		100	30

gedopten Probanden als gedopt zu klassifizieren, bestimmt werden. Berechnet wurde die diagnostische Sensitivität (D-SN) die gleichbedeutend mit der Trefferquote oder der Richtig Positiv Rate (RP Rate) ist, mit folgender Formel:

$$\text{Diagnostische Sensitivität} = \frac{RP}{RP + FN} \quad (2.1)$$

Die Spezifität stellt die Anzahl dar, in den über diesen Assay negative Seren als "falsch positiv" und somit Sportler als "falsch positiv" gemessen werden. Berechnet wird die diagnostische Spezifität (D-SP) aus:

$$\text{Diagnostische Spezifität} = \frac{RN}{RN + FP} \quad (2.2)$$

In einem Dopingtest liegt das Gewicht auf der Spezifität. Bei sensitiven Messungen wird der cut-off ermittelt an der jede positive Probe auch positiv gemessen werden würde. In diesem Bereich fallen dann auch negative Proben die dann als falsch positiv gelten. Somit liefert die Sensitivität deutlich mehr positive Fälle. Um dieses zu vermeiden, soll die Spezifität keinen falsch positiven Fall diagnostizieren, was zu Lasten von falsch negativen Proben realisiert wird. Das bedeutet, das Proben negativ diagnostiziert wurden, welche aber ursprünglich positiv sind.

Wie verlässlich die Ergebnisse des Assays sind, wird aus der Korrektklassifikationsrate oder Vertrauenswahrscheinlichkeit (ACC) berechnet:

$$\text{Vertrauenswahrscheinlichkeit} = \frac{RP + RN}{RP + FN + FP + RN} \quad (2.3)$$

Ein weiteres Kriterium für die Qualität der Analyse ist die Fläche unter der Kurve (AUC-Wert). Diese Kennzahl gibt an wie weit sich die aufgetragenen Messdaten von der Diagonalen entfernen. Bei einem Wert von 1 weißt der Test die perfekte Diskriminierung oder auch 100%ige Trennschärfe auf. Was für eine entsprechend hohe Aussagekraft des diagnostischen Tests spricht. Im Gegensatz würde ein AUC-Wert von 0,5 den ungünstigsten Fall widerspiegeln. In einem solchen Fall verläuft die Kurve auf der Diagonalen und positive Proben können von negativen Proben nicht unterschieden werden. [Bamber, 1975] Somit lässt sich über dem AUC-Wert genau die Wahrscheinlichkeit vorhersagen, mit der ein zufällig ausgewählter gedopter und ein zufällig ausgewählten ungedopter Sportler eindeutig den gedopten zu ermitteln. Die Darstellung der Versuchsergebnisse über eine ROC-Kurve ermittelt die Konzentrationen der gemessenen Parameter, bei der mit einer 100% Wahrscheinlichkeit keine falsch positiven oder falsch negativen Fälle mehr detektiert werden. Bei einer 100%igen Trennschärfe erhält man einen cut-off für beide Fälle. Gibt es Überschneidungen bei den Signalintensitäten für positive und negative Proben erhält man jeweils einen cut-off für die 100%ige Sensitivität und einen für die 100%ige Spezifität.

Die gemessenen Serum-Proben wurden für jeden Parameter entsprechend separat als positiv oder negativ entsprechend dem Versuchsschema bewertet. Die 130 Proben wurden über eine Wahrheitsmatrix (siehe Tabelle 3.2.4) für jeden der drei Peptidhormone ausgewertet. Für jedes Peptidhormon wurde so die diagnostische Sensitivität und diagnostische Spezifität ermittelt. Diese für jede Klasse errechneten Werte wurden in einer ROC-Kurve aufgetragen. Die Spezifität ($1 - \text{diagnostische Spezifität}$) wurde auf der Abszissenachse und die Sensitivität auf der Ordinatenachse aufgetragen. Somit befinden sich 13 Punkte in dem Diagramm. Je nach Fragestellung wurde nun im Rahmen der Versuchsanordnung zwei Grenzwerte ermittelt. Der berechnete cut-off an der die diagnostische Sensitivität 100% erreichte, bildete den Grenzwert an der alle positiven Proben erfasst wurden. Würde an diesen Grenzwert ebenfalls noch negative Proben als falsch positiv gemessen, ist die Spezifität $<100\%$. Ein Dopingtest muss zu 100% spezifisch sein.

3. Material und experimentelle Arbeiten

3.2.9. Lagerstabilitätstest der Mikroarray-Glasobjektträger über zwölf Wochen

Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit über einen definierten Zeitraum dieses Assay treffen zu können, wurde ein zwölf Wochen Versuchsansatz mit folgenden Versuchstagen angesetzt. An den Tagen 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 und 84 wurde der Assay mit 1 x PBS, Leerserum, Vollserum und Leerblut in einem Doppelansatz durch zwei Laboranten unabhängig voneinander prozessiert. Neben dem Messen der unbehandelten Proben wurden zusätzlich jeder Probenmatrix jeweils 100 mU/ml LH, 100 mU/ml hCG-i, 500 mU/ml hCG-i, 7 mU/ml hCG- β und 36 mU/ml hCG- β wie in Tabelle 3.2.5 exemplarisch gezeigt, zugegeben und vermessen. Die für jeden Versuchstag notwendigen Probenmatrizen wurden jeweils neu angesetzt.

Für diesen Versuch wurde für jede Kombination ein Volumen von 250 μ l vorgelegt und das entsprechende Peptidhormon in der geforderten Konzentration aus einer Vorverdünnung zugegeben. Die Durchführung des Stabilitätstest wurde wie im Abschnitt 3.2.5 beschrieben durchgeführt. Untersucht wurde, wie sich der Assay für die unterschiedlichen Matrizen und die Peptidhormon Detektion über die Zeit verhält. Die Durchführung dieses Assays von zwei Laboranten als Doppelansatz soll zeigen, wie robust dieser ist. Die prozessierten Mikroarrays wurden mit dem TECAN-LS ausgelesen und ausgewertet. Die Mittelwerte für jeden Parameter eines Sub-arrays wurden über die Versuchstage in einem Diagramm zusammengefasst, verglichen und ausgewertet.

Tab. 3.2.5.: Probenumfang zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit. Für jeden Versuchstag wurden 24 verschiedene Proben als Doppelansatz gemessen.

Probenmatrix	Peptidhormone		
	LH	hCG-i	hCG- β
1 x PBS	-	-	-
	100 mU/ml	-	-
	-	100 mU/ml	-
	-	500 mU/ml	-
	-	-	7 mU/ml
	-	-	36 mU/ml
Leerserum	-	-	-
	100 mU/ml	-	-
	-	100 mU/ml	-
	-	500 mU/ml	-
	-	-	7 mU/ml
	-	-	36 mU/ml
Vollserum	-	-	-
	100 mU/ml	-	-
	-	100 mU/ml	-
	-	500 mU/ml	-
	-	-	7 mU/ml
	-	-	36 mU/ml
Leervollblut	-	-	-
	100 mU/ml	-	-
	-	100 mU/ml	-
	-	500 mU/ml	-
	-	-	7 mU/ml
	-	-	36 mU/ml

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse zur Messung der Kreuzreaktivität über die Western Blot Analyse

4.1.1. Auswahl der Antikörper für den Versuchsaufbau

Um einen möglichst spezifischen Nachweis der Peptidhormone LH, hCG- α und hCG- β zu erhalten, wurden verschiedene monoklonale und polyclonale Antikörper ausgewählt und auf ihre Verwendbarkeit hin getestet. Als Vorversuche wurden die Fänger- und Detektionsantikörper über einen Western Blot hinsichtlich ihrer Bindeeigenschaften an die Peptidhormone überprüft. Wie bereits erwähnt, bestehen das LH und das hCG- α aus jeweils zwei Untereinheiten α und β . Da die α -Untereinheit bei beiden Peptidhormonen identisch ist, war die Auswahl von spezifischen Fängerantikörpern ein entscheidender Schritt. Ziel war es, simultan einen spezifischen Nachweis für die Anwesenheit jedes einzelnen Parameters zu erhalten. Weiterhin sollte zur Vereinfachung des Systems eine Reihe von Detektionsantikörpern auf ihre Eigenschaften hinsichtlich der Spezifität getestet werden, um im Idealfall mit nur einem Detektionsantikörper diese drei Peptidhormone nachweisen zu können.

4.1.2. Überprüfen der Proteinkonzentration der Peptidhormone über SDS-PAGE und Coomassie Färbung

Um ein Überladen der einzelnen Taschen auf der SDS-PAGE durch eine zu hohe Proteinkonzentration zu vermeiden, wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen der Peptidhormone über die SDS-PAGE aufgetrennt.

4. Ergebnisse

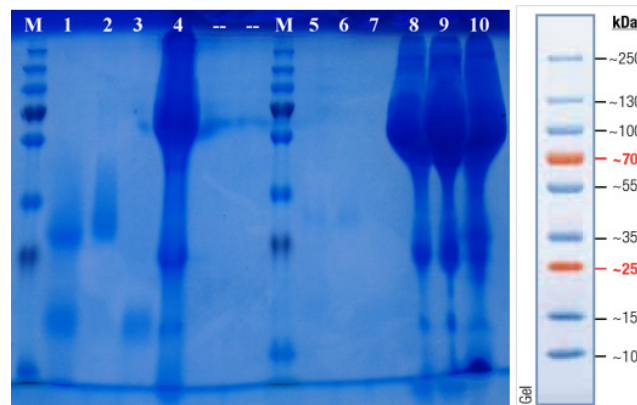


Abb. 4.1.: SDS-PAGE zur Überprüfung der Proteinkonzentration 15% SDS-PAGE mit Coomassie Färbung und Größenstandard zur Überprüfung der Proteinkonzentration und der notwendigen Verdünnung der Kontrollseren und Leervollblut. Aufgetragen wurden: in Tasche M = Größenstandard; Proben in Tasche 1 bis 4 unverdünnt und in Taschen 5 bis 10 in einer 1:10 Verdünnung. Taschen: 1 und 5 = hCG-i; 2 und 6 = hCG- β ; 3 und 7 = LH; 4 und 8 = Serumprobe (RANDOX); 9 = Serum (Seronorm); 10 = Leervollblut

(Tab. 3.2.1) Zusätzlich sollten zwei Kontrollseren und eine Leervollblutkontrolle mitgeführt werden um in dem sich anschließenden Western Blot Versuchen Kreuzreaktivitäten festzustellen. Die unverdünnten Serumproben und das Leervollblut aggregierten bei 95°C. Das Radox Serum high (4.1; Lane 4) wurde unverdünnt auf das Gel aufgetragen. Die weiteren Kontrollproben, Seronorm high und das Leervollblut, wurden in einer 1:10 Verdünnung (4.1; Lane 9 und 10) aufgetragen. Durch das Färben der SDS-PAGE mit Coomassie wurden die aufgetrennten Proteine sichtbar gemacht. Nach dem Waschen mit der Coomassie Entfärbelösung wurden die Konzentrationen für die SDS-PAGE und Western Blot Versuche anhand des Gelbildes (Abb.4.1) festgelegt.

Die Interpretation des Coomassie gefärbten SDS-Gel zeigt, dass die Peptidhormone in Tasche 1 hCG-i, Tasche 2 hCG- β und Tasche 3 LH nicht überladen sind. In den Taschen 5, 6 und 7 sind die Peptidhormone aufgrund ihrer 1:10 Verdünnung schwächer. Die in Tasche 8, 9 und 10 aufgetragenen Serumproben und das Leervollblut waren auch in der 1:10 Fachen Verdünnung überladen, was durch die Form einer Sanduhr charakteristisch wird. Die SDS-Gele für den Western Blot konnten somit mit unverdünnten Peptidhormonen in den Konzentrationen: hCG-i = 14.000 mU/ml; hCG- β = 1.000 mU/ml; LH = 14.285,7 mU/ml beladen werden. Die Kontrollseren und das Leervollblut wurden 1:20 fach verdünnt aufgetragen.

4.1.3. Western Blot Versuche zur Ermittlung der spezifischen Bindung an den Untereinheiten der Peptidhormone

Die Peptidhormone hCG-i und LH wurden durch das denaturierende SDS-Gel in ihrer Größe und der beiden Untereinheiten aufgetrennt. Dadurch soll über den Western Blot Versuch die Spezifität der Fänger- und Detektionsantikörper gegen die Untereinheiten ermittelt werden.

Die Ergebnisse aus den Western Blot Versuchen zeigen keine Kreuzreaktivitäten bei den verwendeten Kontrollseren und Leervollblut wobei zu beachten ist, dass diese in einer 1:20 Fachen Verdünnung getestet wurden. (Tabelle 4.1.1 und 4.1.2 Spalte: Western Blot; Taschen: 4, 5 und 6) In der Spalte Ponceau S in den Tabellen 4.1.1 und 4.1.2 sind die Blots vor den Kreuzreaktivitätstest reversibel mit Ponceau S angefärbt worden um den Proteintransfer von dem SDS-Gel auf die Membran zu überprüfen. In der Spalte Western Blot sind die Blots nach dem Kreuzreaktivitätstest dargestellt. Auf dem Blot eins in Tabelle 4.1.1 detektiert der getestete monoklonale hCG- β Antikörper (10-C25C) die in den Taschen eins und zwei aufgetragenen hCG Varianten an der β -Untereinheit. Das LH in Tasche drei detektiert dieser hingegen nicht. Der im Blot zwei getestete monoklonale hCG- β Antikörper (10-C25FS) soll nach Herstellerangaben die β -Untereinheit des hCG-i nur dann detektieren, wenn das entsprechende Epitop nicht durch die α -Untereinheit verdeckt wurde. Durch das getrennte Vorliegen der beiden Untereinheiten ist das Epitop an der β -Untereinheit für diesen Antikörper zugänglich. Somit detektiert der monoklonale hCG- β Antikörper (10-C25FS) auch die β -Untereinheit des hCG-i in der ersten Tasche. (Tab. 4.1.1)

Im Blot vier detektierte der monoklonale LH- β Antikörper (10-L15A) spezifisch das in Tasche drei aufgetragene LH an dessen β -Untereinheit. Wäre die α -Untereinheit detektiert worden, müsste ebenfalls die identische α -Untereinheit des hCG-intakt in Tasche eins erkannt werden.

Als Kontrolle wurde der Blot drei ausschließlich mit dem ALP konjugierten Sekundär Antikörper anti-Maus IgG inkubiert, um eine Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit den Peptidhormonen oder Referenzproben auszuschließen. Diese Kontrolle zeigt kein Signal und lässt somit den Schluss zu, dass dieser Antikörper für diese Versuche kein falsch positives Signal lieferte. Für den spezifischen Nachweis des hCG- β in Tasche zwei als Tumormarker,

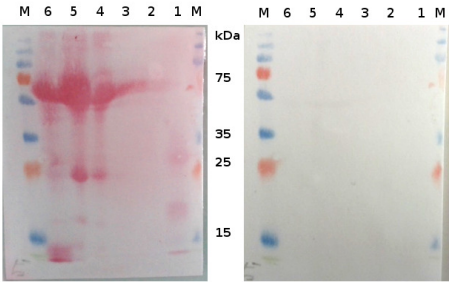
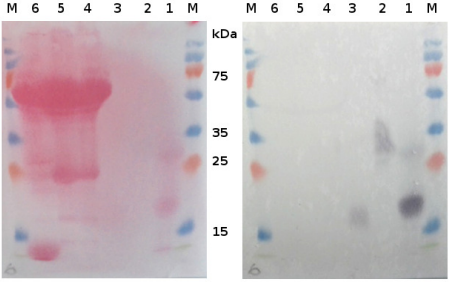
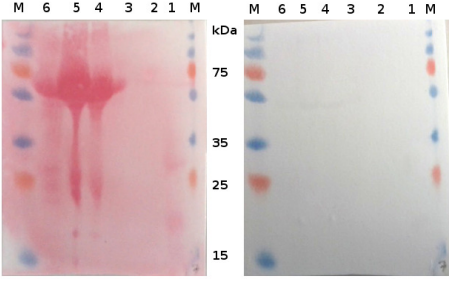
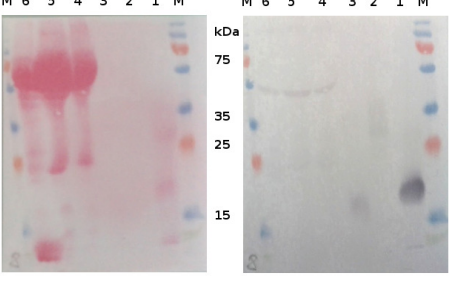
4. Ergebnisse

Tab. 4.1.1.: Kreuzreaktivitätstest der monoklonalen Fängerantikörper. Die in der Spalte Ponceau S abgebildeten Blots, dienen der Kontrolle für den Proteintransfer vom SDS-Gel auf die Membran. Taschen: 1 = hCG-i AG; 2 = hCG- β AG; 3 = LH AG; 4 = Radox Serum 1:20; 5 = Seronorm high 1:20; 6 = Leervollblut 1:20. Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 1 μ g/ml verwendet.

Fängerantikörper	Sekundärantikörper	Ponceau S / Western Blot
Blot 1		
hCG- β mAK 10-C25C	Anti-Maus pAK ALP A1293	
Blot 2		
hCG- β mAK 10-C25FS	Anti-Maus pAK ALP A1293	
Blot 3		
Kontrolle	Anti-Maus pAK ALP A1293	
Blot 4		
LH- β mAK 10-L15A	Anti-Maus pAK ALP A1293	

4.1. Ergebnisse zur Messung der Kreuzreaktivität über die Western Blot Analyse

Tab. 4.1.2.: Kreuzreaktivitätstest der polyklonalen Detektionsantikörper. Die in der Spalte Ponceau S abgebildeten Blots, dienen der Kontrolle für den Proteintransfer vom SDS-Gel auf die Membran. Taschen: 1 = hCG- α AG; 2 = hCG- β AG; 3 = LH AG; 4 = Radox Serum 1:20; 5 = Seronorm high 1:20; 6 = Leervollblut 1:20. Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 1 μ g/ml verwendet.

Detektions-antikörper	Sekundärantikörper	Ponceau S / Western Blot
Blot 5		
Kontrolle	Anti-Ziege pAK HRP A5420	
Blot 6		
hCG- α pAK 70-XG35S	Anti-Ziege pAK HRP A5420	
Blot 7		
hCG- β pAK 70-XG45	Anti-Ziege pAK HRP A5420	
Blot 8		
LH pAK 70-XG60	Anti-Ziege pAK HRP A5420	

4. Ergebnisse

konnte im Western Blot Versuch kein geeigneter Fängerantikörper ermittelt werden. Für die anschließend durchgeführten Mikroarray Versuche ist ein weiterer monoklonaler hCG- β spezifischer Antikörper (10-C25H) dem Setup hinzugefügt worden. Dieser ist ab den Kreuzreaktivitätstest im Abschnitt 3.2.4 mitgeführt worden.

Um falsch positive Signale durch den HRP-konjugierten sekundärem Antikörper auszuschließen, ist die Kontrolle nur mit dem markierten Antikörper durchgeführt worden. Ein falsch positives Signal kann hier auf Blot fünf ausgeschlossen werden. Für den in Blot sechs getesteten polyklonalen hCG- α Antikörper (70-XG35S) wird deutlich, dass dieser aufgrund der Polyklonalität neben der α -Untereinheit in Tasche eins und drei auch die β -Untereinheit in Tasche eins und zwei detektiert. Somit erkennt dieser Antikörper beide Untereinheiten des hCG-i sowie die α -Untereinheit des LH. Der im Blot sieben getestete polyklonale hCG- β Antikörper (70-XG45) zeigt kein Signal worauf sich schließen lässt, dass dieser Antikörper die denaturierte und linearisierte Struktur auf dem Western Blot nicht erkennt, was aber im nativen Zustand der Peptidhormone wieder möglich sein könnte.

Um das LH zu detektieren, wurde der polyklonale LH Antikörper (70-XG60) in Blot acht getestet. Dieser erkennt die α -Untereinheit des hCG-i in Tasche eins und des LH in Tasche drei. Die β -Untereinheit des hCG-i wurde indes nicht erkannt.

Um eine mögliche Komplexität des Systems zu minimieren, soll in weiteren Versuchen die Möglichkeit untersucht werden, alle drei Peptidhormone mit dem polyklonalen hCG- α Antikörper (70-XG35S) zu detektieren. Durch die Verwendung eines einzelnen Detektionsantikörper für den Nachweis von drei Parametern erreicht man so neben Kosteneinsparungen auch ein homogenes System. Jeder weitere Detektionsantikörper unterschiedlicher Herkunft und Eigenschaften wird auch durch unterschiedliche Affinitätskonstanten und Spezifitäten an das Peptidhormon definiert, was wiederum zu verschiedenen Inkubationszeiten und -bedingungen des gesamten Aufbaus führen würde.

4.2. Optimierung der Assay Parameter auf dem Mikroarray

Für die Versuche auf Mikroarrays sind bereits im Vorfeld durchgeführte Optimierungen durch im Haus angefertigte Protokolle übernommen worden. Hinsichtlich des Spotpuffers ist für die hier durchgeführten Versuche ein Karbonat-Bikarbonat Puffer pH 9,6 verwendet worden. Die Antikörper Konzentration der gespotteten Fängerantikörper sowie der internen Kontrollen und Markerspots wurde auf 1 mg/ml für die Fängerantikörper, 0,1 mg/ml für die internen Kontrollen und 0,008 mg/ml für die Markerspots festgelegt. Bei dem Spottvolumen von 1 nl beträgt der Spotdurchmesser ca. 220 µm bei einem Spotabstand von 500 µm. Diese Spotparameter wurden für alle getesteten Oberflächen übernommen. Die Antikörperkonzentration der Detektions- und Sekundärantikörper beträgt 10 µg/ml in 1 x PBS + 5% MP.

Als Waschpuffer für die hier durchgeführten Versuche ist zwischen den Inkubationsschritten 1 x PBS mit 0,05% Tween getestet worden. Das zugesetzte Tween verbesserte die Waschleistung nach der Inkubation von komplexen Proben wie Serum oder Blut. Der Vergleich zweier Sub-Arrays, welche mit 1 x PBS oder mit 1 x PBS + 0,05% Tween gewaschen wurden, zeigt einen deutlichen Unterschied im Signal/Hintergrund Verhältnis. (Tabelle 4.2.1) Hierfür wurden 100 mU/ml LH in 1 x PBS auf einem GLYMO modifizierten Glas Objektträger und Objektträger aus einem Cycloolefin Copolymer (COC) gemessen.

In Tabelle 4.2.1 ist im Versuch eins mit 1 x PBS als Waschlösung das Signal zu Hintergrund Verhältnis ermittelt worden. Das Signal zu Hintergrund Verhältnis wurde mit 2 auf dem GLYMO modifizierten Objektträger und 1,5 auf dem Polymer deutlich geringer gemessen als die im Versuch zwei mit 27,6 auf GLYMO und 24,7 auf Polymer bei der Verwendung mit 0,05% Tween haltiger Waschlösung.

4. Ergebnisse

Tab. 4.2.1.: Vergleich zweier prozessierter Mikroarrays mit 1 x PBS oder 1 x PBS + 0,05% Tween Waschlösungen als Vergleich auf modifizierten Glas und polymer (Cycloolefin copolymer TOPAS) Objektträger. Die Werte sind in relative fluoreszenz Einheiten (RFU) angegeben.

Waschlösung	Versuch 1		Versuch 2	
	1 x PBS		1 x PBS + 0,05% Tween	
100 mU/ml LH AG in 1 x PBS	GLYMO	TOPAS	GLYMO	TOPAS
	Mittelwert n = 8		Mittelwert n = 8	
LH Signal	2.972	3.245	9.658	19.335
LOD	1.347	2.180	350	784
Signal/Hintergrund Verhältnis	2,2	1,5	27,6	24,7

4.3. Mikroarray Versuche zur Ermittlung der Kreuzreaktivität

Um die aus den Western Blots gewonnenen Daten zu verifizieren, wurden Kreuzreaktivitätstests auf Mikroarrays durchgeführt. Hierfür wurden GLYMO modifizierte Glasobjektträger verwendet. Folgende Versuche sollen das Spektrum der Möglichkeiten über Kreuzreaktivität abdecken. Ein exemplarischer Versuchsaufbau hierfür ist im Material und Methoden Kapitel 3.2.4 beschrieben. In den Spalten sind die Fänger Antikörper angegeben, welche auf dem Mikroarray gespottet wurden. In den Zeilen sind jeweils für verschiedene hCG Peptidhormon Konzentrationen (0 mU/ml, 50 mU/ml, 500 mU/ml in 1 x PBS) die getesteten Detektions- und der Sekundärantikörper aufgeführt. In der Zeile für den Sekundärantikörper anti-Ziege (205-605-108) ist der Versuch ohne Detektionsantikörper durchgeführt worden. In Tabelle A2 im Anhang ist die gemessenen Signale in relativen fluoreszenz Einheiten (engl. RFU) der getesteten Kombinationen und in Tabelle 4.3.1 die Messwerte im Verhältnis zur LOQ zusammengefasst. Für jeden getesteten Detektions- oder Sekundärantikörper ist ein Sub-Array auf dem Mikroarray-Glasobjektträger prozessiert worden.

Für das in diesem Kreuzreaktivitätsversuch gewählte hCG-i in unterschiedlichen Konzentrationen, ist aufgrund der erwarteten Spezifität ein ansteigendes Signal bei dem Fängerantikörper hCG- β (10-C25C) in der jeweiligen Kombination mit den Detektionsantikörpern LH (70-XG60),

4.3. Mikroarray Versuche zur Ermittlung der Kreuzreaktivität

Tab. 4.3.1.: Kreuzreaktivitätsversuch mit hCH-i auf Mikroarrays der Detektions- und des Sekundärantikörper in 1 x PBS. Die Werte für die getesteten Antikörperkombinationen setzen sich aus den in Tabelle A2 (Anhang) gezeigten Werten und dem Verhältnis der zugehörigen LOQ zusammen.

	Detektion/ Sekundär AK	Fänger Antikörper			
		LH- β 10-L15A	hCG- β 10-C25C	hCG- β 10-C25FS	CRP M86842M
ohne AG 1 x PBS	LH 70-XG60	0,9	0,9	1,0	0,9
	hCG- α 70-XG35S	0,9	0,8	1,0	0,9
	hCG- β 20-CG35	2,6	3,7	5,2	5,2
	CRP K62350G	0,8	0,8	0,9	0,8
	anti-Ziege 205-605-108	0,7	0,7	1,0	0,7
50 mU/ml hCG-i AG in 1 x PBS	LH 70-XG60	0,9	1,6	0,6	0,9
	hCG- α 70-XG35S	0,8	1,3	1,1	0,7
	hCG- β 20-CG35	3,9	6,0	5,7	7,2
	CRP K62350G	0,8	0,8	0,9	0,8
	anti-Ziege 205-605-108	0,7	0,7	1,0	0,7
500 mU/ml hCG-i AG in 1 x PBS	LH 70-XG60	0,7	4,6	1,0	0,6
	hCG- α 70-XG35S	0,7	3,8	1,9	0,5
	hCG- β 20-CG35	2,0	6,6	6,5	3,2
	CRP K62350G	0,8	0,8	1,0	0,8
	anti-Ziege 205-605-108	0,7	0,7	1,0	0,7

4. Ergebnisse

hCG- α (70-XG35S) und hCG- β (20-CG35) zu erwarten. (Tabelle 4.3.1) Bei den Detektionsantikörpern LH (70-XG60) und hCG- α (70-XG35S) ist die gemessene Signalintensität bei der Peptidhormon Konzentration von 500 mU/ml um den Faktor 4,6 (LH 70-XG60) und 3,8 (hCG- α 70-XG35S) höher als der Vergleichswert bei 0 mU/ml. Vergleicht man die Mittelwerte mit den zugehörigen LOQ Werten der Versuche, stellt die Bestimmungsgrenze einen ersten Grenzwert dar, ab dem ein Peptidhormon zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Der hCG- β (20-CG35) Detektionsantikörper reagiert auch bei Abwesenheit eines Peptidhormons bereits mit allen gespotteten Fängerantikörpern. Das Signal ist hier >2,5 fach höher als die Bestimmungsgrenze. Durch die gemessene Kreuzreaktivität des hCG- β (20-CG35) Detektionsantikörpers eignet sich dieser nicht für die Verwendung in diesem Assayaufbau.

Der Sekundärantikörper anti-Ziege (205-605-108) weist weder bei Abwesenheit noch bei 500 mU/ml hCG-i Peptidhormon Konzentration eine Kreuzreaktivität zu den einzelnen Fängerantikörpern oder dem Peptidhormon auf. Es liegen somit alle gemittelten Messwerte unter der Bestimmungsgrenze. Der als positiv Kontrolle verwendete CRP Detektionsantikörper wird bei Messungen von komplexen Proben wie Serum, das CRP qualitativ nachweisen und so als Assaykontrolle dienen.

Um in weiterführenden Versuchen die Kreuzreaktivität mit unbekannt Komponenten, sogenannte Matrixeffekte, in komplexen Proben wie Serum oder Blut festzustellen, wurden neben den Versuchen in 1 x PBS, zusätzlich kommerziell erhältliches Kontrollserum und Kontrollvollblut (Referenzmaterial) getestet. In den Tabellen A3 und A4 im Anhang sind Leerserum, Vollserum und Leervollblut jeweils ohne Zugabe eines Peptidhormons sowie unter Zugabe von 500 mU/ml hCG-i vermessen worden. Das Leervollblut beinhaltet keine messbare Konzentration von LH, hCG-i und hCG- β . Aufgrund von Matrixeffekten ist sowohl ein Anstieg der Hintergrundfluoreszenz als auch die Signalintensität der Messspots zu erkennen. Ohne zugegebenes Peptidhormon liegen die gemittelten Fluoreszenzwerte der Messspots für die vermessenen Referenzmaterialien bei maximal zweifacher Fluoreszenzintensität über der Bestimmungsgrenze. Im Vollserum ist bereits eine hCG-i Konzentration von 191 mU/ml enthalten. Dieses hCG-i wurde auch durch den hCG- β (10-C25C) Fängerantikörper in Kombination mit dem hCG- α Detektionsantikörper gemessen und liegt so um den Faktor

4.3. Mikroarray Versuche zur Ermittlung der Kreuzreaktivität

>16 über der Bestimmungsgrenze. Durch Zugabe von 500 mU/ml hCG-i steigt die Signalintensität auf das > 17-Fache an. Der hCG- α (70-XG45) erreicht unter gleichen Assaybedingungen eine 9-Fache Signalintensität für diesen Messparameter.

4.3.1. Mikroarray Versuche mit zeitgleicher Verwendung verschiedener Detektionsantikörper auf Referenzmaterial

Um die Verwendbarkeit des hCG- α Detektionsantikörpers (70-XG35S) in Kombination mit dem CRP pAK (K62350G) auch in komplexen Proben zu testen, wurden Versuche auf Kreuzreaktivität mit Referenzmaterial durchgeführt. In Tabelle 4.3.2 sind die in Tabelle A5 zusammengefassten Daten über das Verhältnis zur zweifachen LOQ berechnet worden. In der Abbildung 4.2 sind die Versuche mit 1 x PBS Puffer und dem verschiedenen Referenzmaterialien aus den Originaldaten zusammengefasst. Neben den unbehandelten Proben sind in diesen Versuchen die Peptidhormone den Proben jeweils pro Versuch einzeln zugegeben worden. Für die Versuche mit 1 x PBS ohne Peptidhormon sowie hinzu gegebenen 500 mU/ml hCG-i, decken sich die Messwerte für diesen Detektionsantikörper mit denen aus den Vorversuch. (Tabelle 4.3.2) Um den variierenden Signal/Hintergrund Verhältnis bei Serum oder Vollblut Rechnung zu tragen, wurde der cut-off auf die zweifache Bestimmungsgrenze festgesetzt (2 x LOQ).

Bei dem Kontrollserum Medidrug Basis-line S (Leerserum) befindet sich in der unbehandelten Probe laut Herstellerangaben weder LH noch eine der beiden hCG Varianten. Somit wurde im zweiten Versuchsansatz der unbehandelten Leerserumprobe (Tabelle A5; Spalte Kontrolle; Leerserum) kein Signal gemessen. Für die Versuche mit den mit Peptidhormone versetzten Leerserumproben ist ein Anstieg für das luteinisierende Hormon um das 27-Fache, für das hCG-i um das 16-Fache und für das hCG- β um das 5-Fache bezogen auf 2 x LOQ gemessen worden.

Ein weiterer serumbasierender Versuchsansatz mit SeronormTM Human High (Vollserum) soll zeigen, wie sich das bereits im Serum befindliche hCG-i in einer Konzentration von 191 mU/mL bei Zugabe von LH und hCG- β in seiner Signalstabilität verhält. Weiterhin soll nach Erhöhen der hCG-i Konzentration durch Zugabe des Peptidhormons hCG-i die Signalin-

4. Ergebnisse

tensität gemessen werden. In der unbehandelten Probe liegt die Intensität für hCG-i bei dem 7-Fachen über der $2 \times \text{LOQ}$. (Tabelle 4.3.2; Spalte Kontrolle; Vollserum) In der Probe mit 100 mU/ml LH liegt der Messwert um den Faktor 16 und für das hCG-i stabil bei dem 7-Fachen über der $2 \times \text{LOQ}$. Nach Zugabe von 500 mU/ml hCG-i in das Vollserum, steigt das Fluoreszenzsignal auf das 10-Fache bezogen auf $2 \times \text{LOQ}$ an. In dem hCG- β versetzten Vollserum liegt dessen Wert bei dem 4-fachen und der der hCG-i Wert stabil bei dem 7-Fachen über der $2 \times \text{LOQ}$. Demnach hat die Anwesenheit von LH in einer Probe keinen Einfluss auf das hCG-i Signal.

Die Anwesenheit von zwei Parametern in diesem Assay lässt sich somit getrennt voneinander detektieren.

Mit der Verwendung des Medidrug Basis-line VB (Leervollblut) soll eine Vollblut-Probenmatrix auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, die Peptidhormone in ihr zu detektieren. In diesem Leervollblut befindet sich laut Herstellerangaben keiner der Peptidhormone. Im Versuch mit dem unbehandelten Leervollblut ist im entsprechenden Kontrollversuch kein Signal gemessen worden. (Tabelle 4.3.2; Spalte Kontrolle; Leervollblut) Für die präparierten Leervollblutproben ist ein Anstieg für das LH um das 42-Fache, für das hCG-i und das hCG- β jeweils um das 6-Fache bezogen auf $2 \times \text{LOQ}$ gemessen worden.

Durch die hier gewählte Versuchsanordnung kann demnach auch aus komplexen Proben, wie Serum oder Blut, ein spezifisches Signal detektiert werden. (Abbildung 4.2) Die Kreuzreaktivität oder Matrixeffekte lassen sich auch für real nahe Proben ausschließen. Deutlich wird auch, dass verschiedene Matrizen unterschiedliche Signalintensitäten trotz identischer Konzentration für die fraglichen Parameter lieferten.

4.3. Mikroarray Versuche zur Ermittlung der Kreuzreaktivität

Tab. 4.3.2.: Ermitteln von Matrixeffekten und Kreuzreaktivitäten in komplexen Proben über Kontrollmessungen und nach Zugabe der Peptidhormone auf alle Messparameter. der Versuche unter Zugabe der Peptidhormone in unterschiedlichen Probenmatrizen. Durchgeführt auf GLYMO modifizierten Glas-Slides. Als Detektionsantikörper wurden der hCG- α (70-XG35S) in Kombination mit dem CRP pAK (K62350G) in allen Versuchen verwendet. Als Sekundärantikörper wurde der Alexa Fluor konjugierte anti-Ziege Antikörper verwendet. Die Werte für die getesteten Proben und Peptidhormone setzen sich aus den in Tabelle A5 (Anhang) gezeigten Werten und dem Verhältnis der zugehörigen zweifachen LOQ zusammen.

	Kontrolle	100 mU/ml LH AG	500 mU/ml hCG-i	35,7 mU/ml hCG- β
1 x PBS				
LH	1,4	49,5	0,9	0,6
hCG-i	0,8	1,1	9,3	1,3
hCG- β	1,4	0,4	2,7	6,9
Leerserum				
LH	0,7	27,6	2,0	0,6
hCG-i	0,4	2,4	16,1	1,5
hCG- β	0,5	0,9	3,6	5,0
Vollserum				
LH	0,7	16,3	0,6	0,7
hCG-i	6,8	6,8	10,0	7,0
hCG- β	1,0	0,9	1,5	3,9
Leervollblut				
LH	0,7	42,1	0,7	0,6
hCG-i	0,7	3,2	6,2	2,2
hCG- β	0,7	1,1	1,9	6,3

4. Ergebnisse

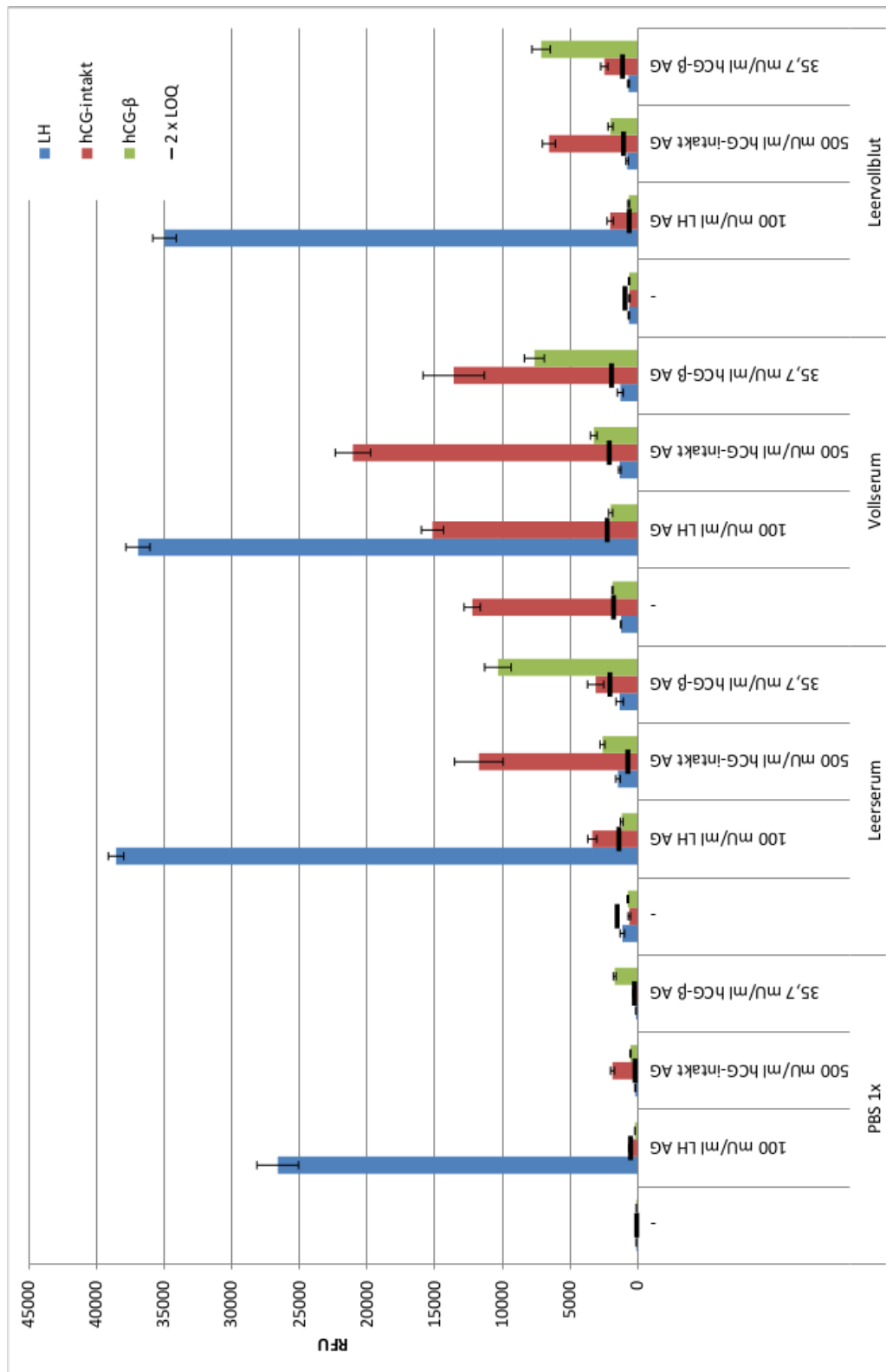


Abb. 4.2.: Zusammenfassung des Mikroarray Kreuzreaktivitätstest auf GLYMO modifizierten Glas-Objektträgern. Dargestellt sind die Signalintensitäten in RFU der verschiedenen Probenmatrizen als Kontrolle sowie mit Peptidhormonen versetzte Proben über den jeweiligen Fängerantikörpern. Als cut-off wurde der Wert der LOQ verdoppelt ($2 \times \text{LOQ}$). Dieser bildet somit den statistisch abgesicherten Grenzwert für den Nachweis der Peptidhormone.

4.4. Ermitteln der Bestimmungsgrenze der Peptidhormone auf dem Mikroarray

4.4. Ermitteln der Bestimmungsgrenze der Peptidhormone auf dem Mikroarray

4.4.1. Konzentrationsreihe des hCG-intakt in 1 x PBS Puffer

Nachdem die Assaykomponenten, bestehend aus Fänger- und Detektionsantikörpern aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche festgelegt und Kreuzreaktivitäten sowie Matrixeffekte ausgeschlossen werden konnten, sollten die Peptidhormone möglichst konzentrationsabhängig gemessen werden. In Abbildung 4.3 ist das hCG-i in 1 x PBS Puffer verdünnt worden. Jede gemessene Konzentration entspricht einem Versuch auf jeweils einem Subarray. Die Messgröße ist die relative Fluoreszenzeinheit welche über die markierten Sekundärantikörper ermittelt wurde.

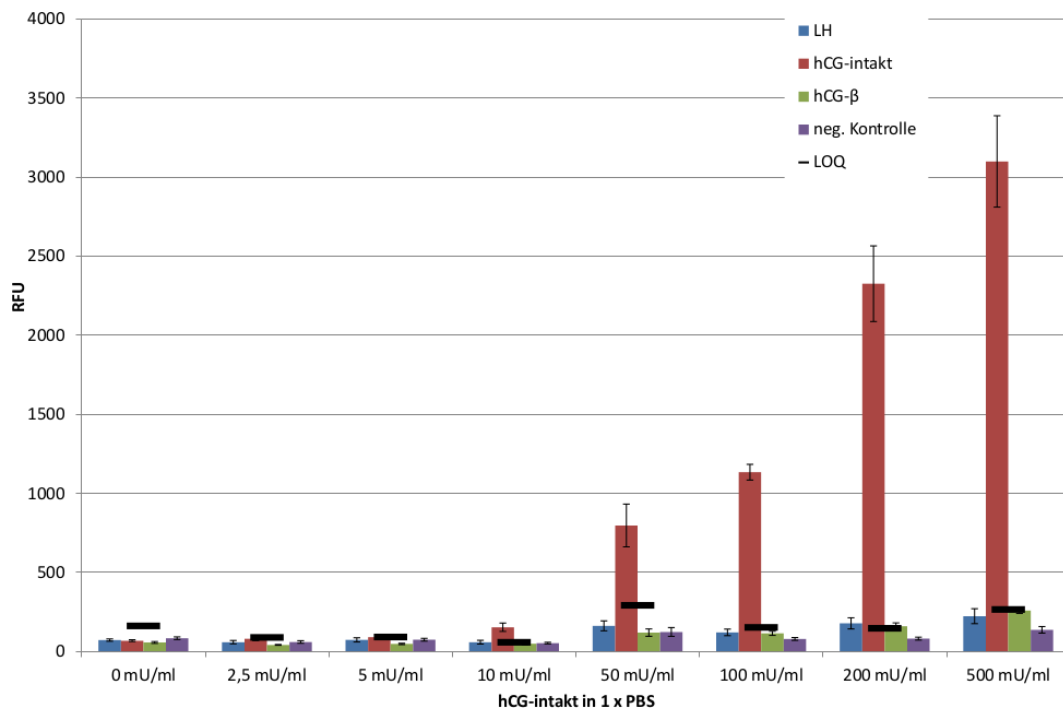


Abb. 4.3.: Konzentrationsreihe des humanes Choriongonadotropin hCG in 1 x PBS. Die aufgetragenen Werte entsprechen der gemessenen Fluoreszenzintensität aus dem Mittelwert von 8 Messspots jedes Parameter. Die Werte sind in relative fluoreszenz Einheiten (RFU) aufgetragen.

4. Ergebnisse

Ein konzentrationsabhängiger Signalanstieg für das hCG-i im 1 x PBS Puffer wird in Abbildung 4.3 deutlich. Ab einer Konzentration von 10 mU/ml wurde das hCG-i in 1 x PBS Puffer gemessen. Die für jeden Versuch zugehörige LOQ ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet.

4.4.2. Konzentrationsreihe des hCG- β in 1 x PBS Puffer

Die für das hCG- β vermessene Konzentrationsreihe ist in 1 x PBS Puffer durchgeführt worden. (Abbildung 4.4)

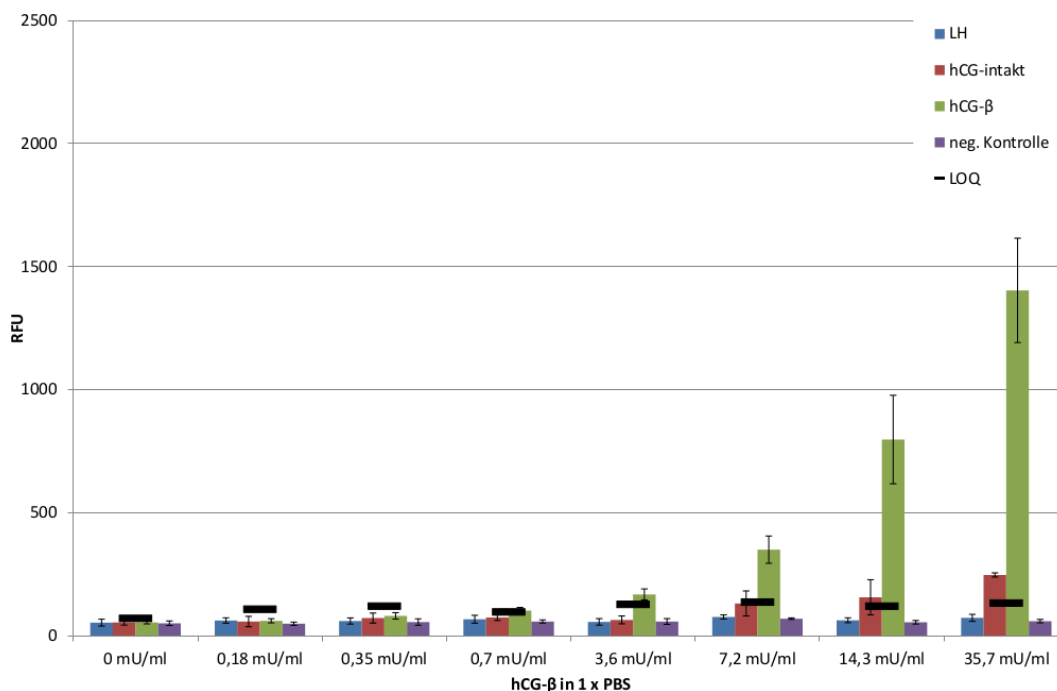


Abb. 4.4.: Konzentrationsreihe des hCG- β in 1 x PBS Puffer. Die aufgetragenen Werte entsprechen der gemessenen Fluoreszenzintensität aus dem Mittelwert von 8 Messspots jedes Parameter. Die Werte sind in relative fluoreszenz Einheiten (RFU) aufgetragen.

Der hCG-i Fängerantikörper weist ein Signal für ein kreuzreagieren ab einer hCG- β Konzentration von 37,5 mU/ml auf. Dies ist auf die Antikörperauswahl zurückzuführen. Der für das hCG- β ausgewählte Fängerantikörper detektiert die β -Untereinheit an einem Epitop, welches im hCG-i durch die α -Untereinheit maskiert ist. Tritt in einer Probe die hCG- β Untereinheit in Form eines Tumormarkers einzeln auf, erkennt neben dem spezifischen hCG- β Fängerantikörper auch der Fängerantikörper für das hCG-i diesen Tumormarker. Die ermittelte Bestimmungsgrenze für das hCG- β in

4.4. Ermitteln der Bestimmungsgrenze der Peptidhormone auf dem Mikroarray

1 x PBS Puffer liegt bei 3,6 mU/ml. (Abbildung 4.4) Die für jeden Versuch zugehörige LOQ ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet.

4.4.3. Konzentrationsreihe des LH in 1 x PBS Puffer

Wie schon bei dem hCG-i und dessen Untereinheit hCG- β angefertigten Konzentrationsreihen, wurde für das ermitteln der Bestimmungsgrenze eine solche auch für das LH gemessen. Als Matrix wurde hier für das Erstellend der Konzentrationsreihe ebenfalls der 1 x PBS Puffer verwendet.

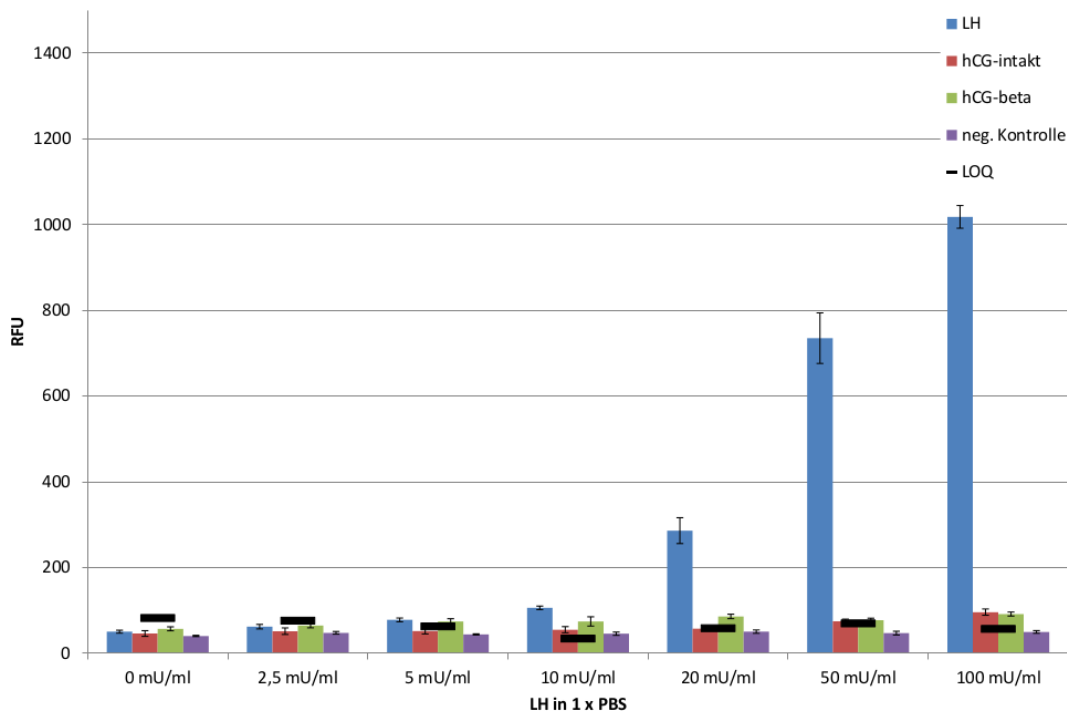


Abb. 4.5.: Konzentrationsreihe des LH in 1 x PBS Puffer. Die aufgetragenen Werte entsprechen der gemessenen Fluoreszenzintensität aus dem Mittelwert von 8 Messspots jedes Parameter. Die Werte sind in relative fluoreszenz Einheiten (RFU) aufgetragen.

Die ermittelte Bestimmungsgrenze für das LH in 1 x PBS Puffer liegt bei 10 mU/ml. (Abbildung 4.5) In einem weiteren Versuch wurde die LH Konzentrationsreihe im Vollserum vermessen. Hierbei lässt sich der Einfluss der ansteigenden LH Konzentration auf die sich bereits im Vollserum befindliche 191 mU/ml hCG-i AG Konzentration messen (Abbildung 4.6). Neben dem zu prüfenden Einfluss der unterschiedlichen LH Konzentrationen auf das hCG-i Signal soll ebenfalls der Messwert für das hCG- β bewertet werden.

4. Ergebnisse

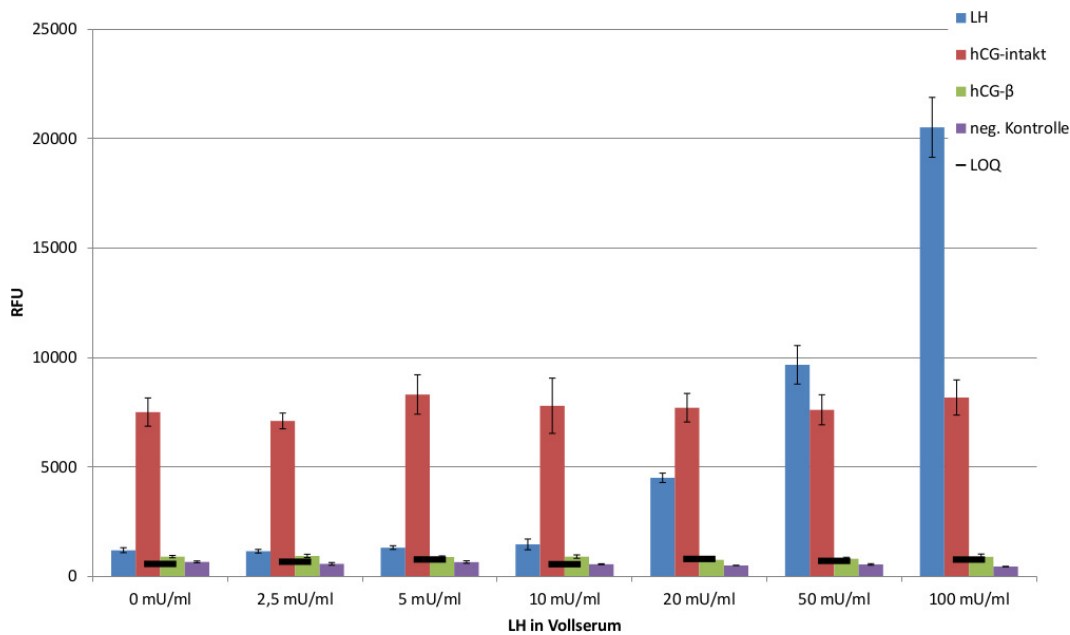


Abb. 4.6.: Konzentrationsreihe des LH in Vollserum. Neben der LH Konzentrationsreihe, wird ebenfalls das bereits in dem Serum befindliche hCG-i detektiert. Die aufgetragenen Werte entsprechen der gemessenen Fluoreszenzintensität aus dem Mittelwert von 8 Messspots jedes Parameter. Die Werte sind in relative fluoreszenz Einheiten (RFU) aufgetragen.

Die in Abbildung 4.6 aufgetragenen Daten sind im Vollserum durchgeführt worden. In diesem Serum befinden sich, neben dem für diesen Multiplex Ansatz relevanten hCG-i, noch eine Reihe weiterer Bestandteile. Diese sollen die Robustheit des Setup bestätigen, indem gezeigt werden kann, dass eine realitätsnahe Matrix wie dieses Vollserum keinen Einfluss auf die für den Multiplex Ansatz gewählten Parameter hat. Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, ist in dem unbehandelten Ansatz (0 mU/ml LH) ausschließlich das bereits in dem Vollserum befindliche hCG-i gemessen worden. Diese Signalintensität bleibt über die gesamte Versuchsreihe stabil. Für das LH ist ab einer Konzentration von 10 mU/ml ein verlässlicher Nachweis messbar.

4.5. Vermessen von Realproben auf Glas und Polymer Objektträger

Um den Versuchsaufbau auch mit realen Proben zu testen, stand hierfür ein Kollektiv von einer männlichen und zwei weiblichen Probanden zu Verfügung. Da sich der Zugang zu positiven Proben für die hier gewählten

4.5. Vermessen von Realproben auf Glas und Polymer Objektträger

Parameter als schwierig erwiesen hat, stellt die positive Kontrolle eine schwangere Frau welche einen erhöhten hCG-i Wert haben sollte. Dieser Versuch ist ebenfalls auf einer Polymer Oberfläche prozessiert worden. Für das Übertragen des Assayaufbaus in eine Point-of-Care Anwendung, welche anstelle von Glas polymerbasierte Objektträger nutzen können, stellt ein solches Polymer eine zu prüfende Oberfläche für den Mikroarray dar.

Tab. 4.5.1.: Realversuch mit Serumproben einer schwangeren Frau und zwei Kontrollpersonen (je eine weiblich und eine männlich) auf Glas und Polymer Oberfläche prozessiert. Neben den gemessenen Signalen, angegeben in RFU, sind diese (kursiv dargestellt) ebenfalls relativ zum jeweiligen $2 \times \text{LOQ}$ Wert ins Verhältnis gesetzt worden.

	GLYMO Glas			TOPAS		
	weiblich schwanger	weiblich Kontrolle	männlich Kontrolle	weiblich schwanger	weiblich Kontrolle	männlich Kontrolle
LH	2.124 <i>2,4</i>	989 <i>0,4</i>	1.375 <i>0,8</i>	4.441 <i>2,3</i>	598 <i>0,3</i>	1.028 <i>0,5</i>
hCG-i	16.492 <i>18,4</i>	865 <i>0,4</i>	1.680 <i>1,0</i>	25.283 <i>13,1</i>	391 <i>0,2</i>	1.556 <i>0,8</i>
hCG- β	1.804 <i>2,0</i>	888 <i>0,4</i>	1.803 <i>1,1</i>	2.255 <i>1,2</i>	380 <i>0,2</i>	2.163 <i>1,1</i>
$2 \times \text{LOQ}$	897	2.349	1.713	1.923	1.767	1.884

Das Kollektiv wurde mit jeweils einem Test vermessen. Die in Tabelle 4.5.1 aufgeführten Daten zeigen für den weiblich schwangeren Probanden deutlich das um den Faktor 18 erhöhte hCG-i Signal gegenüber der $2 \times \text{LOQ}$. Die beiden Kontrollen hingegen zeigen bei keinem der Messparameter ein Signal, welches über der jeweiligen zweifachen Bestimmungsgrenze liegt. Weiterhin zeigt sich hier exemplarisch, dass dieser Versuchsaufbau auf modifizierten Glasobjektträgern robust und spezifisch ist. Im Versuch auf dem Cycloolefin copolymer (TOPAS) ist die gemessene Signalintensität höher als auf Glas, was auf dem auf Glas optimierten Versuchsaufbau zurück zuführen ist.

4. Ergebnisse

4.6. Durchführen einer Performance-Analyse zur Ermittlung der D-SN und D-SP

Nachdem dieser Assayaufbau zeigen konnte, dass das Messen einer konzentrationsabhängigen Signalintensität für diese drei Peptidhormone in Puffer und Serum möglich ist, soll über eine Performance-Analyse als Einfach-Blind-Ansatz die diagnostische Sensitivität und Spezifität ermittelt werden. Der Einfach-Blind-Ansatz umfasste 130 Serumproben, welche aus einer randomisierten Anordnung von unterschiedlichen Konzentrationen der drei Peptidhormone in sich nicht wiederholender Kombinationen bestand. Die 130 Serumproben wurden durch eine versuchsunabhängige Person vorbereitet und die Proben anonymisiert. Die Vorbereitung und Durchführung der Mikroarray-Glasobjektträger entsprach dem Standardprotokoll.

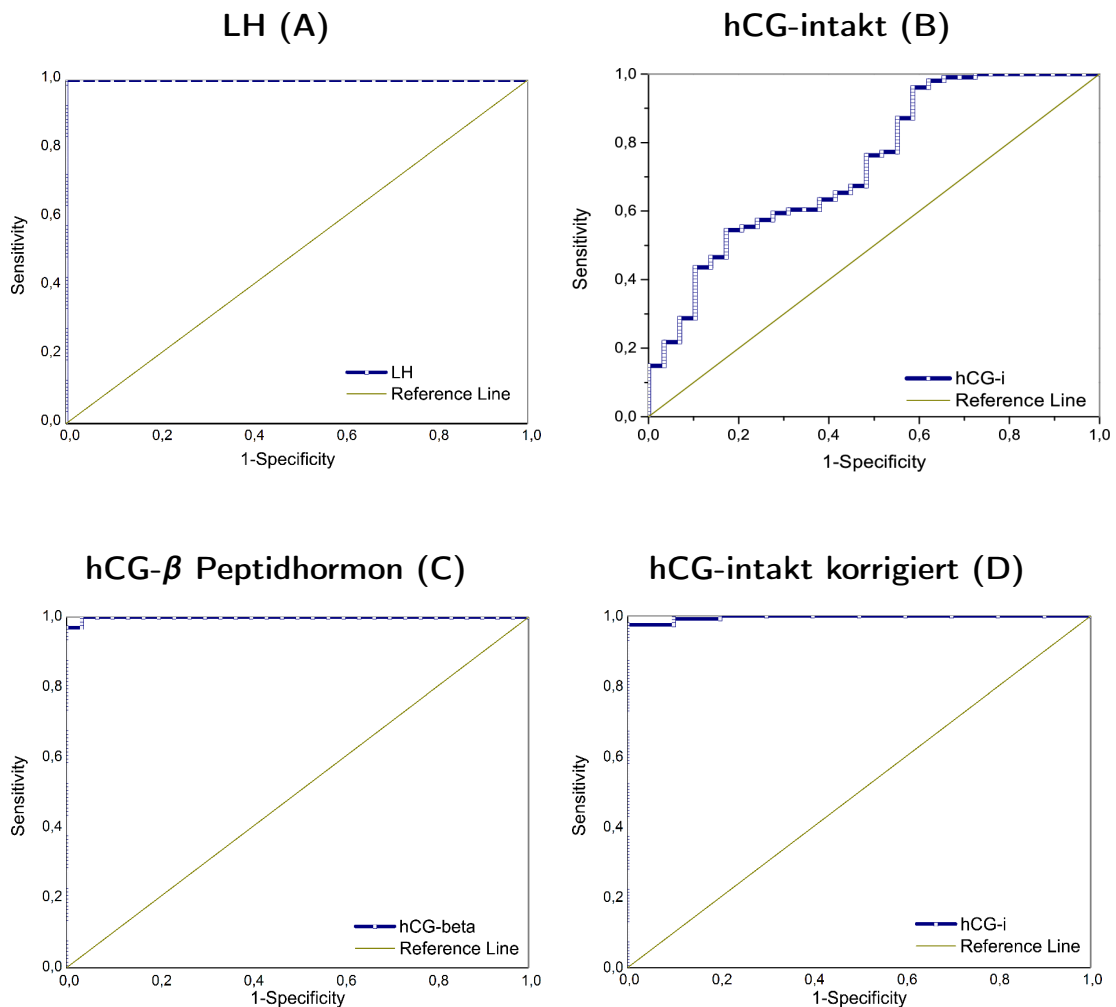
4.6.1. Ermittlung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität von LH, hCG-intakt und hCG- β

Das Erstellen der Grenzwertoptimierungskurven für die getesteten Peptidhormone und ihrer zugeordneten Konzentrationen erfolgte über die tatsächliche Zuordnung für positiv und negativ. Für das LH wurden Proben ($n = 130$) mit 30 negativ (23,1%; Konzentrationsbereich 0 – 4 mU/ml) und 100 positiven Proben (76,9%; Konzentrationsbereich 10 – 100 mU/ml) und einem cut-off von 10 mU/ml prozessiert. Für das hCG-i sind 130 Proben mit 29 negativen (22,3%; Konzentrationsbereich 0 – 4 mU/ml) und 101 positiven Proben (77,7%; Konzentrationsbereich 10 – 300 mU/ml) bei einem cut-off von 200 mU/ml gemessen worden. Das hCG- β wurde mit 130 Proben mit 30 negativen (23,1%; Konzentrationsbereich 0 – 4 mU/ml) und 100 positiven Proben (76,9%; Konzentrationsbereich 10 – 300 mU/ml) und einem cut-off von 10 mU/ml prozessiert. Für die angepasste hCG-i Messung wurden die Proben als negativ gewertet, welche ebenfalls negativ für das hCG- β waren. Das hierfür korrigierte Kollektiv beinhaltete 130 Proben mit 10 negativen (7,7%; Konzentrationsbereich 0 – 4 mU/ml für hCG-i und hCG- β) und 120 positiven Proben (92,3%; Konzentrationsbereich 10 – 300 mU/ml für hCG-i und hCG- β) und einem cut-off von 10 mU/ml. Die Grenzwertoptimierungskurven sind in Tabelle 4.6.1 zusammengefasst.

Für die verschiedenen LH Konzentrationen und den vorgegebenen

4.6. Durchführen einer Performance-Analyse zur Ermittlung der D-SN und D-SP

Tab. 4.6.1.: ROC Kurven der Performance-Analyse von 130 Serum Proben. Diese setzen sich aus 13 unterschiedlichen Konzentrationen mit jeweils zehn Replikaten der verschiedenen Peptidhormone zusammen. (siehe Tabelle A1) LH mit 30 negativen und 100 positiven Proben (A). hCG-i mit 29 negativen und 101 positiven Proben (B). hCG- β mit 30 negativen und 100 positiven Proben (C). Korrigiertes hCG-i Kollektiv mit 10 negativen und 120 positiven Proben (D).



Bereichen für die positive und negative Klassifizierung, liegt der optimale cut-off bei einer RFU von 16.180. (Tabelle 4.6.2) Proben die eine geringere oder gleiche Signalintensität lieferten, sind als negativ und bei einer Signalintensität >16.180 (≥ 10 mU/ml) als positiv interpretiert worden. Für das LH sind an diesem cut-off eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 100% erreicht worden (Tabelle 4.6.2). An diesem cut-off ist keine falsch negative oder falsch positive Probe gemessen worden. Für das hCG-i

4. Ergebnisse

liegt der cut-off bei 21.376 RFU und einer Konzentration von >200 mU/ml hCG-i. Die Sensitivität an diesem cut-off lag bei 14,9% und die Spezifität bei 100% (Tabelle 4.6.2). Für das hCG-i sind an diesem cut-off 86 Proben falsch negativ und null Proben falsch positiv diagnostiziert worden. Aufgrund der Spezifität des monoklonalen hCG-i Antikörpers gegen die β Untereinheit, detektiert dieser ebenfalls das als Tumormarker separat vorliegende hCG- β Fragment. Um den Einfluss dieser Kreuzreaktivität auf die Auswertung zu berücksichtigen, ist in einer erneuten Zuordnung der positiven und negativen Proben nur die Proben als negativ gewertet worden, welche für beide Parameter (hCG-i und hCG- β) jeweils eine Konzentration von unter 10 mU/ml beinhalten. Dadurch reduzierte sich der Anteil an negativen Proben von 30 auf 10 und der Anteil von positiven Proben stieg von 100 auf 120. Nach dieser Anpassung liegt der cut-off für das hCG-i bei 6.806 RFU und einer Konzentration von ≥ 10 mU/ml. Die Sensitivität an diesem cut-off beträgt 97,5% und die Spezifität 100% (Tabelle 4.6.2). Die Anzahl an falsch negativen Proben an diesem cut-off beträgt nach der Anpassung drei Proben. Falsch positiv sind keine Proben gemessen worden.

Für die hCG- β Messungen liegt der ermittelte cut-off bei 14.978 RFU und die Konzentration bei ≥ 10 mU/ml. Die Sensitivität für das hCG- β an diesem cut-off beträgt 97,0% und die Spezifität 100%. Die Anzahl an falsch negativen Proben an diesem cut-off beträgt nach der Anpassung drei Proben. Falsch positiv sind keine Proben gemessen worden. Die Anpassung der positiven und negativen Proben für das hCG-i war damit zu rechtfertigen, da das zeitgleiche Auftreten der beiden hCG Varianten, hCG-i und hCG- β in einer Dopingkontrolle ausgeschlossen werden kann. [Stenman *et al.*, 2008; Stenman *et al.*, 2004; Alfthan *et al.*, 1992]

Basierend auf der Fläche unter der Kurve (AUC) von $>0,995$ für das LH, hCG- β und der angepassten hCG-i Peptidhormone, lässt sich eine unbekannte Serumprobe spezifisch in positiv oder negativ klassifizieren. Für das hCG- β und die angepassten hCG-i Proben sind drei Proben als falsch negativ gemessen worden.

Die gemittelten Fluoreszenzwerte des Probenkollektivs vom Institut für Biochemie/Zentrum für Präventive Dopingforschung wurden über den Werten der Konzentrationsreihen und der für die einzelnen Peptidhormone entsprechenden cut-off Werte interpretiert. (Tabelle A6) Hier konnte für die männlichen Serumproben kein auffälliger Befund ermittelt werden was

4.6. Durchführen einer Performance-Analyse zur Ermittlung der D-SN und D-SP

Tab. 4.6.2.: Analytische Interpretation der diagnostischen Sensitivität und Spezifität der 130 Proben aus dem Einfach-Blind-Ansatz

	LH	Serum (n = 130)		
		hCG-i	hCG-i korrigiert	hCG- β
Fläche unter der Kurve (AUC)	1	0,735	0,997	0,999
Standard Fehler	0	0,049	0,007	0,001
95% Konfidenzintervall	1	0,637	0,983	0,997
Vertrauenswahrscheinlichkeit (ACC)	1	0,338	0,977	0,977
optimaler cut-off (mU/ml)	10	>200	10	10
optimaler cut-off (RFU)	16.180	21.376	6.806	14.978
Sensitivität am optimalen cut-off (%)	100	14,9	97,5	97
Spezifität am optimalen cut-off (%)	100	100	100	100
# FN am cut-off	0	86	3	3
# FP am cut-off	0	0	0	0

durch die Ergebnisse der Referenzanalyse (nicht gezeigt) bestätigt wurde. Die Werte der weiblichen Serumproben lieferten ebenfalls keinen auffälligen Befund. In allen Messungen wurde ebenfalls das CRP als interne Referenz mit ausgewertet.

Über die Messung von realen Proben aus Dopingkontrollen zeigt dieser Test seine Einsatzfähigkeit in einem Anti-Dopinglabor. Neben der Durchführung der Versuche unter Laborbedingungen soll in einem weiteren Versuch die Lagerstabilität der Mikroarrays getestet werden.

4. Ergebnisse

Tab. 4.6.3.: Auswertung des Probenkollektivs vom Institut für Biochemie in Köln.

Gemessen wurden je zehn männliche und weibliche Serumproben. Die Werte für die getesteten Proben setzen sich aus den in Tabelle A6 (Anhang) gezeigten Werten und dem Verhältnis der zugehörigen zweifachen LOQ zusammen.

Köln	LH	hCG-i	hCG- β	CRP
M 1	0,8	0,7	0,8	11,3
M 2	0,5	0,7	0,7	0,6
M 3	0,5	0,6	0,6	7,2
M 4	0,3	0,3	0,6	1,8
M 5	2,1	0,8	0,8	2,5
M 6	0,8	0,7	0,6	1,0
M 7	0,9	0,9	0,9	1,5
M 8	1,1	0,6	0,6	1,5
M 9	1,4	1,0	0,8	8,3
M 10	1,1	0,7	0,9	4,4
W 1	1,7	1,7	1,7	21,2
W 2	1,4	1,0	0,9	21,6
W 3	0,5	0,3	0,4	1,8
W 4	0,4	0,4	0,4	3,7
W 5	14,4	18,9	20,6	30,3
W 6	0,5	0,3	0,4	5,7
W 7	0,5	0,5	0,4	0,4
W 8	0,7	0,5	0,5	5,4
W 9	0,6	0,4	0,4	6,5
W 10	0,3	0,3	0,3	4,8

4.7. Lagerstabilitätstest der Mikroarrays hinsichtlich der Messresultate

4.7.1. Lagerstabilitätstest über zwölf Wochen zur Detektion von hCG-intakt

Die Stabilität des gesamten Setups soll nun über einen längeren Zeitraum und zusätzlich in komplexen Medien getestet werden. Für die routinemäßige Anwendung eines solchen Assays soll geprüft werden ob nach Herstellung der Mikroarrays diese über einen Zeitraum von drei Monaten gleichbleibende Ergebnisse liefert. Wie im Kapitel 3.2.3 beschrieben, sind am Tag null alle Mikroarray gespottet und für die jeweiligen Versuchstage rückgestellt worden. Für jeden Versuchstag wurden ungeöffnete lyophilisierte Referenzmaterialien (Leer-, Vollserum und Leervollblut) verwendet. Die verwendeten Peptidhormone und Antikörper sind ebenfalls aus rückgestellten Aliquots angesetzt worden. Über einen Zeitraum von zwölf Wochen wurde an insgesamt neun Versuchstagen das hCG-i in unterschiedlichen Matrizen vermessen.

In der Tabelle A7 sind die RFU der Lagerstabilitätsmessungen über den Zeitraum von zwölf Wochen in $1 \times$ PBS Puffer und dem Referenzmaterial zusammengefasst. Das Verhältnis dieser Werte und der zugehörigen zweifachen LOQ sind in Tabelle 4.7.1 dargestellt. Das intakte hCG mit seinen beiden Untereinheiten stellt in diesem Versuch die Messgröße dar. Diese Lagerstabilitätsmessung soll zeigen wie sich das gemessene Signal vom hCG-i über die Zeit verhält. Zusätzlich zu den vier Proben mit jeweils 500 mU/ml hCG-i wurde die Probenmatrix ebenfalls unbehandelt vermessen (Daten nicht gezeigt). In dem vermessenen Vollserum befand sich bereits 191 mU/ml des hCG-i. Um die mit Peptidhormon versetzten und unbehandelten Vollserum Versuche zu vergleichen, ist die Leermessung des Vollserums mit aufgeführt. In der Messung des hCG-i im $1 \times$ PBS Puffer sind die Fluoreszenzwerte für das LH über die zwölf Wochen vergleichbar mit der zweifachen LOQ für den zugehörigen Versuchstag. Für den Versuch in Woche Null liegt die Signalintensität um den Faktor 1,8 welcher in der Versuchswoche zwölf auf das 0,9-Fache bezogen auf die zweifache LOQ fällt.

4. Ergebnisse

Tab. 4.7.1.: Lagerstabilitätstest der Mikroarrays für das hCG-i über zwölf Wochen auf GLYMO modifizierten Glas-Objektträgern. Als Probenmatrix wurden 1 x PBS; Leerserum; Vollserum und Leervollblut verwendet. Die Werte für die Versuchstage setzen sich aus den in Tabelle A7 (Anhang) gezeigten Werten und dem Verhältnis der zugehörigen zweifachen LOQ zusammen.

Probe	Mess-signal	Woche									
		0	1	2	3	4	6	8	10	12	
1 x PBS + 500 mU/ml hCG-i AG	LH	1,8	1,6	1,4	1,0	1,5	0,9	1,2	0,8	0,9	
	hCG-i	15,0	18,8	15,5	7,4	21,7	10,6	10,4	5,0	8,6	
	hCG- β	6,1	6,9	5,8	6,8	6,3	3,4	3,2	2,2	3,3	
Leerserum + 500 mU/ml hCG-i AG	LH	2,0	1,3	1,2	0,8	2,0	0,7	0,8	0,6	1,8	
	hCG-i	21,5	13,8	11,8	3,3	16,1	7,3	5,9	3,3	5,2	
	hCG- β	9,3	5,6	3,7	1,0	3,6	1,7	1,6	0,9	1,4	
Vollserum	LH	1,0	0,4	0,8	0,6	0,7	0,6	0,5	0,6	0,8	
	hCG-i	10,5	3,2	8,3	4,4	6,8	3,9	3,0	3,7	7,7	
	hCG- β	1,9	0,6	1,3	0,8	1,0	0,7	0,5	0,7	1,2	
Vollserum + 500 mU/ml hCG-i AG	LH	1,3	0,8	0,7	1,1	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	
	hCG-i	17,0	8,9	8,0	9,0	10,0	7,1	5,3	7,0	5,8	
	hCG- β	3,8	1,7	1,5	1,7	1,5	1,4	0,8	1,2	1,0	
Blut + 500 mU/ml hCG-i AG	LH	1,2	1,0	0,8	0,7	0,8	1,0	0,9	0,6	0,9	
	hCG-i	11,6	6,4	6,2	6,2	6,4	7,7	3,0	2,2	5,6	
	hCG- β	5,2	2,6	2,4	1,9	1,5	1,5	0,9	0,7	1,3	

Die Messwerte für das hCG- β liegen in den ersten fünf Versuchstagen (Woche null bis vier) um das 6-Fache über der zweifachen LOQ. Der gemessene hCG-i Wert für diese Versuchstage bewegt sich zwischen max. 5.560 RFU und min. 1.562 RFU. (Tab. A7) Setzt man diese RFU mit der zugehörigen zweifachen LOQ ins Verhältnis, bewegt sich die Messung des Peptidhormon hCG-i bis zum fünften Versuchstag in Woche vier um den Faktor 7 bis 21 über der 2 x LOQ. In den Messungen bis zur zwölften Woche sinken die Messwerte auf den Faktor 8,6 ab.

Die Signalintensität nimmt über die Zeit von zwölf Wochen um ein Drittel ab. Da es sich hier um einen idealen Versuchsaufbau handelt, in dem Matrixeffekte keine Rolle spielen, ist das Umfeld für das Peptidhormon kein natürliches. Um dieses zu testen wurden verschiedene Referenzmaterialien

4.7. Lagerstabilitätstest der Mikroarrays hinsichtlich der Messresultate

ebenfalls unbehandelt sowie mit 500 mU/ml hCG versetzt, vermessen. Für das Leerserum, welches keinen der hier gesuchten Peptidhormone beinhaltet, ist nach Zugabe des hCG-i die RFU auf das 21-Fache am Tag null der 2 x LOQ gemessen worden. Über den Zeitraum von zwölf Wochen wird eine abfallende Tendenz der Signalintensitäten deutlich. Einen ähnlichen Verlauf wird ebenfalls für das unbehandelte Vollserum und die mit 500 mU/ml hCG-i versetzten Vollserum und Leervollblut Versuche deutlich.

4.7.2. Lagerstabilitätstest über zwölf Wochen zur Detektion von hCG- β

Parallel zu der Versuchsreihe des hCG-i soll auch unter gleichen Bedingungen das hCG- β in vier unterschiedlichen Referenzmaterialien über einen Zeitraum von zwölf Wochen vermessen werden. Der Versuchsaufbau und die Durchführung erfolgte analog zu dem Lagerstabilitätstest für das hCG-i. Die in Tabelle A8 zusammengefassten RFU zeigen für die in 1 x PBS Puffer durchgeführten Versuche ein stabiles Signal über die Zeit. Bezogen auf die zweifache LOQ bewegt sich die Signalintensität für den hCG- β Wert um den Faktor fünf. In Woche vier und sechs liegen die Fluoreszenzwerte um den Faktor >15. (Tab. 4.7.2)

Für die mit 37 mU/ml hCG- β versetzte 1 x PBS-, Leerserum-, Vollserum- und Blutprobe bewegen sich die Fluoreszenzwerte für das LH um den Wert der zweifachen LOQ. Die Signalintensitäten für das hCG-i bewegt sich über den Zeitraum von zwölf Wochen gemessen im 1 x PBS Puffer um den Faktor <4,7 über der zweifachen LOQ. Der hCG-i Wert für die Leerserumprobe variiert um den Faktor <2,4. Beim Leervollblut beträgt die Signalintensität für das hCG-i unter dem 4,4-Fachen der 2 x LOQ. Der hCG- β Messwert im Leerserum steigt über den gesamten Zeitraum von >2 Fachen nach der ersten Woche auf das 8-Fache in Woche zwölf an. Im Vollserum und Leervollblut bewegen sich die gemessenen Fluoreszenzwerte für das hCG- β stabil um den Faktor >3 über der zweifachen LOQ.

4. Ergebnisse

Tab. 4.7.2.: Lagerstabilitätstest der Mikroarrays für das hCG- β über zwölf Wochen auf GLYMO modifizierten Glas-Objektträgern. Als Probenmatrix wurden 1 x PBS; Leerserum; Vollserum und Leervollblut verwendet. Die Werte für die Versuchstage setzen sich aus den in Tabelle A8 (Anhang) gezeigten Werten und dem Verhältnis der zugehörigen zweifachen LOQ zusammen.

Probe	Mess-signal	Woche									
		0	1	2	3	4	6	8	10	12	
1 x PBS + 37 mU/ml hCG- β AG	LH	1,1	1,4	1,1	0,8	1,3	1,6	0,6	1,1	0,6	
	hCG-i	2,1	2,7	2,7	1,2	4,7	4,6	1,4	1,7	1,3	
	hCG- β	6,3	7,4	9,9	3,2	16,7	15,5	4,7	5,0	6,9	
Leerserum + 37 mU/ml hCG- β AG	LH	1,2	0,6	0,8	0,8	0,9	0,5	0,8	0,5	0,7	
	hCG-i	1,4	0,7	0,9	2,4	2,0	1,9	2,1	1,5	1,8	
	hCG- β	4,8	2,0	3,1	8,3	6,2	7,4	7,4	8,5	8,0	
Vollserum	LH	1,0	0,4	0,8	0,6	0,7	0,6	0,5	0,6	0,8	
	hCG-i	10,5	3,2	8,3	4,4	6,8	3,9	3,0	3,7	7,7	
	hCG- β	1,9	0,6	1,3	0,8	1,0	0,7	0,5	0,7	1,2	
Vollserum + 37 mU/ml hCG- β AG	LH	1,2	0,4	0,6	1,1	0,7	0,7	0,7	0,7	1,0	
	hCG-i	11,1	3,1	5,4	10,6	7,0	5,5	3,7	4,4	8,1	
	hCG- β	3,4	1,2	2,0	5,2	3,9	3,7	2,8	2,3	7,2	
Blut + 37 mU/ml hCG- β AG	LH	0,9	1,1	1,0	0,6	1,1	1,0	1,2	1,0	0,8	
	hCG-i	1,0	1,1	1,1	2,2	4,4	1,9	2,4	1,0	1,1	
	hCG- β	2,4	2,2	2,4	6,3	15,1	6,0	7,0	2,4	4,5	

4.7.3. Lagerstabilitätstest über zwölf Wochen zur Detektion von LH

Der Stabilitätstest um das LH auf dem Mikroarray in unterschiedlichen Proben über einen Zeitraum von zwölf Wochen zu messen, entspricht dem Versuchsaufbau für die Messung des hCG-i und hCG- β und ist im Anhang in Tabelle A9 zusammengefasst. Das Verhältnis dieser Werte und der zugehörigen zweifachen LOQ sind in Tabelle 4.7.3 dargestellt.

Die gemessene Signalintensität für das LH in 1 x PBS Puffer ist über den gesamten Zeitraum von zwölf Wochen messbar. Im Vergleich zu den parallel durchgeführten Versuchen in Serum und Blut, schwanken die RFU des LH im Verhältnis zur zweifachen LOQ über die Zeit. Im Leerserum lässt sich

4.7. Lagerstabilitätstest der Mikroarrays hinsichtlich der Messresultate

Tab. 4.7.3.: Stabilitätstest über zwölf Wochen verschiedener mit 100 mU/ml LH versetzter Proben auf GLYMO modifizierten Glas-Objektträgern. Als Probenmatrix wurden 1 x PBS; Leerserum; Vollserum und Leervollblut verwendet. Die Werte für die Versuchstage setzen sich aus den in Tabelle A9 (Anhang) gezeigten Werten und dem Verhältnis der zugehörigen zweifachen LOQ zusammen.

Probe	Mess-signal	Woche									
		0	1	2	3	4	6	8	10	12	
1 x PBS + 100 mU/ml LH AG	LH	109	15,4	34,4	37,7	87,5	71,6	41,2	21,0	78,3	
	hCG-i	6,3	1,5	1,2	1,3	2,2	1,8	1,2	0,6	2,3	
	hCG-β	2,9	0,3	0,5	0,7	0,7	0,4	0,7	0,4	1,0	
Leerserum + 100 mU/ml LH AG	LH	33,5	34,5	41,0	25,7	27,6	33,3	18,5	12,9	27,0	
	hCG-i	5,0	3,8	3,7	2,9	2,4	3,2	1,8	0,3	1,4	
	hCG-β	0,8	0,8	1,0	0,8	0,9	1,1	0,7	0,4	0,5	
Vollserum	LH	1,0	0,4	0,8	0,6	0,7	0,6	0,5	0,6	0,8	
	hCG-i	10,5	3,2	8,3	4,4	6,8	3,9	3,0	3,7	7,7	
	hCG-β	1,9	0,6	1,3	0,8	1,0	0,7	0,5	0,7	1,2	
Vollserum + 100 mU/ml LH AG	LH	20,5	22,1	15,3	17,7	16,3	13,4	21,5	21,5	15,5	
	hCG-i	9,5	8,2	5,8	6,7	6,7	5,1	7,6	5,5	3,6	
	hCG-β	1,6	1,2	0,9	1,1	0,9	0,9	1,1	0,8	0,6	
Blut + 100 mU/ml LH AG	LH	34,0	36,0	68,5	55,3	52,3	28,8	30,6	45,5	37,2	
	hCG-i	3,6	3,0	3,7	3,2	3,0	1,8	2,0	1,9	1,5	
	hCG-β	0,8	0,8	1,2	1,1	1,1	0,7	0,8	0,9	0,6	

das zugegebene 100 mU/ml LH an allen Versuchstagen in gleichbleibender Intensität messen. Die Messsignale für das hCG-i steigt bei dieser LH Konzentration an den ersten zwei Wochen auf das 5-Fache der 2 x LOQ an und nimmt über die zwölf Wochen stetig ab. Im dritten Versuchsmonat fällt die Signalintensität für das hCG-i auf das Niveau der zweifachen LOQ. Die Messwerte für das hCG-β bewegen sich in diesem Versuch auf Höhe der zweifachen LOQ.

Das in das Vollserum zugegebene LH lässt sich ebenfalls über den Zeitraum von zwölf Wochen detektieren. Die gemessene Signalintensität von durchschnittlich 36.000 RFU entsprechen einen Faktor von >15 über der zweifachen LOQ. Vergleicht man die Signalintensitäten des hCG-i aus der

4. Ergebnisse

unbehandelten mit der LH präparierten Vollserumprobe, sind diese annähernd gleich. Das hCG- β Signal in der LH präparierten Vollserumprobe liegt auf Höhe der zweifachen LOQ.

In Blut lässt sich das LH ebenfalls über den gesamten Versuchszeitraum messen. Das Signal für das hCG- β liegt unter der zweifachen LOQ. Die Signalintensität des hCG-i bewegt sich um den Faktor <3 bezogen auf die zweifache LOQ.

5. Diskussion

Eine parallele Mehrkomponentenanalyse von Antigen-Antikörper Reaktionen zu entwickeln, beinhaltet zahlreiche Entwicklungsschritte. Die Notwendigkeit eines solchen Dopingschnelltests besteht in dem Erhalten des Sportsgeistes und des Olympischen Gedankens sowie den damit verbundenen Werten. Neben diesen ethischen Aspekten spielt die Gesundheit des einzelnen Sportlers ebenfalls eine zentrale Rolle.

Die Verbotliste der WADA umfasst neben Substanzen und Methoden, welche während eines Wettkampfes verboten sind, auch jene, die außerhalb von Wettkämpfen kontrolliert werden. [WADA, 2013b] In den vergangenen Jahren gewinnen Trainingskontrollen immer mehr an Bedeutung. Der Ansatz, einen Point-of-care Test (PoC-Test) als Teilelement einer Dopingkontrolle zu entwickeln, würde die Effizienz von Trainings- oder Wettkampfkontrollen anheben. Gleichzeitig soll resultierend aus den Ergebnissen eine weitere Analytik im Labor gezielter beauftragt und durchgeführt werden können.

In dieser Arbeit wurde am Beispiel von zwei Peptidhormonen, dem LH und dem hCG- α sowie einem Tumormarker, dem hCG- β exemplarisch ein Multiparameter Assay entwickelt. Die Entwicklung dieses Testes bis hin zum Messen von Serumproben aus Dopingkontrollen aktiver Sportler ist in dem Fließschema der Arbeit zusammengefasst. (Abbildung: 2.3)

Die Herausforderung in dieser Arbeit war es, strukturell verwandte Stoffe spezifisch nachzuweisen und Kreuzreaktivitäten sowie Matrixeffekte, welche bereits wissenschaftliche diskutierte Probleme darstellen, zu ermitteln. [Emerson *et al.*, 2003; Selby, 1999] Sowohl das LH als auch das hCG- α bestehen aus jeweils einer α und einer β Untereinheit, wobei die α Untereinheit bei beiden identisch ist. Für einen eindeutigen Nachweis wurden monoklonale Fängerantikörper gewählt, die β spezifisch binden. Um bei dem Nachweis des hCG- α diesen vom Tumormarker unterscheiden zu können, wurde ein spezifischer monoklonaler β hCG Antikörper dahingehend ausge-

5. Diskussion

wählt, dass ein Epitop an der hCG- β Untereinheit durch die α Untereinheit verdeckt ist. So bindet dieser Fänger-Antikörper ausschließlich das hCG- β in Abwesenheit der α -Untereinheit.

Um die Qualität, Spezifität und Kreuzreaktivität der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zu testen, wurde die Western Blot Methode verwendet und anschließend Antikörper Kombinationen für den Mikroarray zusammengestellt. In den Western Blot Versuchen wurden neben den Peptidhormonen ebenfalls Serum- und Blutproben vermessen. Eine Detektion von unspezifischen Banden innerhalb der Serum- oder Blutprobe würde für eine Kreuzreaktivität des Antikörpers auf Serum oder Blut Bestandteile sprechen. Die prozessierten Antikörper wiesen keine unspezifischen Banden in den getesteten Serum- oder Blutproben auf. Einen spezifischen Nachweis der Peptidhormone ist durch folgende monoklonale Fängerantikörper gegeben:

- mAK LH- β (10-L15A) für das LH
- mAK hCG- β (10-C25C) für das hCG-i
- mAK hCG- β (10-C25FS) für das hCG- β (Tumormarker)

Bei dem monoklonalen Fängerantikörper für das hCG-i und das hCG- β Peptidhormon ist eine Kreuzreaktivität gemessen worden, da beide β -spezifisch binden. Der mAK LH erkennt ausschließlich die β Untereinheit des LH. Der hCG- β mAK (10-C25FS) detektiert die hCG- β Untereinheit als Tumormarker spezifisch. Das Epitop des mAK hCG β (10 C25C) liegt an einer Position, welche sowohl bei dem hCG-i als auch bei der β Untereinheit zugänglich ist. Demnach würden bei einem Tumor und der Anwesenheit von hCG- β beide Fängerantikörper ein Signal liefern.

Der Nachweis über ausschließlich einen polyklonalen Detektionsantikörper erweist sich durch den polyklonalen hCG- α Antikörper (70-XG35S) als geeignet. Durch die Polyklonalität dieses Antikörpers erkennt dieser neben der α Untereinheit ebenfalls die β Untereinheit, was durch die Ergebnisse der Western Blot Versuche geschlussfolgert werden konnte. Durch diese Erkenntnis reduziert sich die Anzahl der Detektionsantikörper für die Peptidhormone auf drei auf einen.

Nach Zusammenstellen der Assaykomponenten wurden Mikroarray Versuche durchgeführt und die Versuche auf Kreuzreaktivität wiederholt.

Das Testen von verschiedenen Waschlösungen für die Verwendung auf einem Mikroarray Assay sollte das Signal zu Hintergrund Verhältnis vergrößern. (Tab. 4.2.1) Vor allem bei komplexem Probenmaterial, wie Serum oder Blut, war mit einer Erhöhung der Signalintensität des Hintergrundes zu rechnen. [Schiettecatte *et al.*, 2012; Tate and Ward, 2004; Emerson *et al.*, 2003]

Durch die Verwendung einer 0,05% Tween haltigen Waschlösung ließ sich das Hintergrundsignal am Beispiel des LH in 1 x PBS sowohl auf den modifizierten Glasobjektträger als auch auf den polymer Objektträger reduzieren. Das dadurch vergrößerte Signal zu Hintergrund Verhältnis ermöglichte ein sensitiveres Messen der Peptidhormone. (Tab. 4.2.1)

Im folgenden Versuchsabschnitt sollte die Kreuzreaktivität ermittelt werden. Die Versuche ohne Peptidhormon als auch mit 500 mU/ml hCG-i in 1 x PBS zeigte bereits eine Kreuzreaktivität des hCG- β Antikörper (20-XG35) mit allen Fängerantikörpern auf dem Mikroarray. (Tab. 4.3.1) Die Kreuzreaktivität lag in der Kontrollmessung mit 1 x PBS Puffer für das LH um das 2,6-Fache, beim hCG-i um den Faktor 3,7 und für das hCG- β sowie dem CRP über dem 5-Fachen der Bestimmungsgrenze.

Alle weiteren Kombinationen zwischen Fängerantikörper und Detektions-/Sekundärantikörper bestätigten die Ergebnisse der Western Blot Versuche. Neben den Versuchen auf Kreuzreaktivität in 1 x PBS Puffer wurde ebenfalls unbehandeltes Referenzmaterial (kommerzielles Vollserum und -blut) hinsichtlich der Matrixeffekte und Kreuzreaktivität auf Mikroarrays prozessiert und in der Tabelle A3 und Abbildung 4.2 zusammengefasst. Hierbei wurde das Leervollblut unbehandelt und mit 500 mU/ml hCG-i vermessen. Unter Verwendung des Detektionsantikörpers hCG- α (70-XG35S) wurde in der unbehandelten Leervollblutprobe kein Signal detektiert. In der mit hCG-i versetzten Probe wurde dieses Peptidhormon über den Fängerantikörper hCG- β (10-C25C) gemessen. Bei Verwendung des CRP (K62350G) Detektionsantikörper wurde das in dem Blut befindliche CRP über den CRP-spezifischen Fängerantikörper detektiert. Eine Kreuzreaktivität wurde für das Leervollblut und der getesteten Assaykomponenten nicht gemessen. Der parallel durchgeführte Versuch für das Leerserum als weiteres Referenzmaterial wies vergleichbare Ergebnisse auf. Im Vollserum wurde das hCG-i bereits in der unbehandelten Probe über den hCG- β (10-C25C) Fängerantikörper und dem hCG- α (70-XG35S) Detektionsantikörper um

5. Diskussion

den Faktor 6,8 gemessen. Nach Zugabe von 500 mU/ml hCG-i stieg die gemessene Fluoreszenzintensität somit um das 3,2-Fache auf den Faktor 10 bezogen auf die zweifache LOQ an. Bei Verwendung des Detektionsantikörpers für das CRP wurde das im Vollserum befindliche CRP nachgewiesen. In den Versuchen mit Vollserum wurden ebenfalls keine Matrixeffekte oder Kreuzreaktivitäten gemessen.

Neben weiterer Optimierungen hinsichtlich des Assayprotokolls wurde die Bestimmungsgrenze der Peptidhormone über unterschiedliche Konzentrationen ermittelt. In dem Versuch zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurde über eine Konzentrationsreihe in 1 x PBS das hCG-i ab 10 mU/ml eindeutig nachgewiesen. Zur sensitiven Bestimmung des hCG-i in 1 x PBS wurde die LOQ als cut-off verwendet.

Der so konstruierte Aufbau ermöglicht die Detektion dieser Peptidhormone im Rahmen ihrer klinisch relevanten Grenzwerte von >5 mU/ml. Bei einem Dopingmissbrauch mit dem LH erzielt man einen wirksamen androgenen Effekt erst bei applizieren einer Einzel-Dosis LH von 15.000 – 30.000 IU oder mehrerer täglicher Dosen LH > 10.000 IU. [Handelsman *et al.*, 2009; Stenman *et al.*, 2006] Bei Konzentrationen dieser Größenordnung sind Werte von über 5.000 mU/ml gemessenem LH im Serum zu erwarten. [le Cotonnec *et al.*, 1998] Nach Cotonnec beträgt die Serumhalbwertszeit für das LH 1.000 IU * h/L. Dieses bestätigt die Vermutung von Stenman und Kollegen, einen physikalischen Effekt nur durch applizieren hoher LH Konzentrationen zu erreichen. [Stenman *et al.*, 2006]

Im Organismus eines Mannes, denn nur für diesen gelten das LH und das hCG-i als Dopingmittel, liegen die natürlichen Konzentrationen im Serum auf Höhe der Bestimmungsgrenze von <5 IU/L.

Um nun einen direkten Einfluss der Peptidhormonkonzentration auf die Signalintensität eines bereits vorhandenen Peptidhormons zu prüfen, wurde ein Versuchsaufbau gewählt, bei dem ein Peptidhormon mit gleichbleibender Konzentration und ein weiteres Peptidhormon mit unterschiedlicher Konzentration vermessen wurde. Hierfür wurden Versuchsaufbauten konstruiert, in denen die zu untersuchenden Parameter zeitgleich gemessen wurden. Als Modell wurde hierfür das Seronorm high Vollserum verwendet. Dieses Standardserum, welches bereits das hCG-i beinhaltet, sollte nun über unterschiedliche Konzentration von LH der Einfluss dieses Peptidhormons auf das gemessene hCG-i Signal untersucht werden. Wie in der

Abbildung 4.6 zeigt, korrelieren diese beiden Parameter bezüglich ihrer Nachweisbarkeit in diesem Assayaufbau nicht. So lassen sich das LH und das hCG-i parallel in einer Probe nachweisen.

In einem weiteren Teilversuch sollten erstmalig Serumproben von drei Personen vermessen werden. Die Auswahl beschränkte sich auf eine männliche und zwei weibliche humane Serumproben, wovon eine weibliche Serumprobe einer im zweiten Trimester schwangeren Frau stammte. Im Hinblick auf die zukünftige Integration dieses Assays in eine IvD-Plattform wurde dieser Versuchsaufbau ebenfalls auf einem Polymer als Matrix für den Mikroarray durchgeführt. Im Vergleich dieser beiden Matrizen ist das Signal-Hintergrund Verhältnis sowie die Signalintensität bezogen auf die zweifache LOQ auf gleichem Niveau. Im Versuch auf dem Cycloolefin Copolymer (TOPAS) ist die gemessene Signalintensität höher als auf Glas, was auf dem auf Glas optimierten Versuchsaufbau zurück zu führen ist. Die hier gezeigten Ergebnisse auf einem Polymer als Matrix, sind auf einem TOPAS Chip (Objekträgergröße) prozessiert worden.

Ebenfalls wurde die Serumprobe der schwangeren Person eindeutig identifiziert. Die beiden Kontroll-Serumproben wiesen keine Signale für das LH oder hCG- β auf. Demnach kann geschlossen werden, dass das weibliche Kontrollserum einer Person entnommen wurde die zum Zeitpunkt der Probenahme weder schwanger noch einen Eisprung hatte. Bei dem männlichen Kontrollserum kann aufgrund der unauffälligen Signalintensitäten aller Messparameter eine Tumorerkrankung basierend auf dem hCG- β Wert oder ein Medikamentenmissbrauch zur Leistungssteigerung mittels LH oder hCG-i ausgeschlossen werden.

Um falsch positive Resultate zu vermeiden, muss ein notwendiger cut-off anhand von randomisiert kontrollierten Studien mit Realproben weiter angepasst werden.

Die Durchführung einer Performance-Analyse in Form eines Einfach-Blind-Ansatzes sollte die diagnostische Sensitivität und Spezifität aller drei Parameter ermitteln. Die für diese Analyse prozessierten 130 Serumproben mit randomisierten Kombinationen aller drei Peptidhormone in unterschiedlichen Konzentrationen wurden hierfür vermessen. Die Messwerte für die Peptidhormone aller 130 Serumproben wurden anschließend in Grenzwertoptimierungskurven dargestellt. Hierbei konnte für das LH ein cut-off ermittelt werden, welcher zu 100% diskret zwischen positiv und negativ

5. Diskussion

für diesen Versuchsansatz unterscheiden konnte. Somit lag der gemessene cut-off für das LH bei einer Peptidhormon Konzentration von >5 mU/ml bei 16.180 RFU. Für das hCG-i konnte, aufgrund des Kompromisses bezüglich der Auswahl der Fängerantikörper, kein spezifischer Nachweis ermittelt werden, da dieser Fängerantikörper ebenfalls die bei einem Tumor einzeln vorkommende β -Untereinheit detektieren. Unter Berücksichtigung dieses Aspektes wurden für die Auswertung des "hCG-i korrigiert" nur die hCG-i Proben als negativ gewertet, welche beim Peptidhormon hCG- β ebenfalls eine als negativ gewertete Peptidhormon Konzentration beinhalteten. Somit konnte die Spezifität deutlich verbessert werden. Der hierbei ermittelte cut-off lag bei einer Peptidhormon Konzentration von >10 mU/ml bei 6.806 RFU. Für das hCG- β wurde ein cut-off von >10 mU/ml bei 14.978 RFU ermittelt. In einem realen Szenario für männliche Serumproben, sollte unter unauffälligen Bedingungen keines dieser drei Peptidhormone vorhanden sein. Entsprechend steigen die Signale der einzelnen Messparameter je nach Dopingvergehen für das LH und das hCG-i an. Das Signal für den Tumormarker hCG- β , welcher ebenfalls ein Signal beim hCG-i liefert, würde im Anti-Dopingtest entsprechend bewertet werden können.

Über einen Test von 20 anonymisierter Serumproben vom Institut für Biochemie/Zentrum für Präventive Dopingforschung in Köln (DSHS-Köln) sollte dieses Verfahren mit dem standardmäßig bei einer Dopinganalyse durchgeführten Verfahren und dessen Ergebnisse verglichen werden. Die ermittelten Fluoreszenzwerte für die drei Peptidhormone wurden über die in der Performance-Analyse festgesetzten cut-off Werte zugeordnet. Die 20 Serumproben, welche von je zehn männlichen und zehn weiblichen Sportlern stammten, wurden in allen Parametern als negativ bewertet. Diese Bewertung der 20 Proben entsprach den Ergebnissen der Referenzmethode vom DSHS-Köln.

Grundsätzlich ist bei einer Dopingkontrolle mit diesem Assayaufbau bei Männern mit keinem Signal für die drei Peptidhormone auszugehen. Wie aus den Ergebnissen im Versuch des Probenkollektivs vom Institut für Biochemie in Köln bei den männlichen Proben deutlich wurde (Tab. 4.6.3), liegen unter folgenden Umständen negative Ergebnisse vor. Bei männlichen Sportlern ohne LH und hCG-i Doping sind die Werte für alle drei Peptidhormon unter der zweifachen LOQ. Für den Fall eines Doping Vergehens mit einem der beiden Peptidhormone würde der entsprechende Nachweis

ein Signalanstieg erkennen lassen. Ein solches Szenario wurde in dieser Arbeit mit einem Versuch über drei Serumproben (Abschnitt 4.5) nachgestellt, bei der eine natürlich erhöhte hCG-i Konzentration aufgrund einer Schwangerschaft eindeutig identifiziert wurde.

Einen weiteren Bestandteil der Assayentwicklung bildete die Lagerstabilität eines solchen Aufbaus über einen Zeitraum von mehreren Wochen. Ziel dieses Versuches war es, festzustellen, ob die Lagerung der Mikroarrays auf den Glassobjektträger unter definierten Bedingungen einen Einfluss auf das Messergebnis hat. Das hCG-i wurde in diesem Versuch neben dem beiden Standardseren und -blut ebenfalls 1 x PBS getestet. Die in Tabelle A7 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass sich das Peptidhormon hCG-i über den gesamten Zeitraum von zwölf Wochen nachweisen lässt. Eine Abnahme der Signalintensität über den gesamten Zeitraum vor allem aber an den letzten beiden Messungen in Woche zehn und zwölf, lässt sich auf die mangelnde Lagerstabilität zur Messung dieses Peptidhormons zurückführen.

Der durchgeführte Lagerstabilitätstest über zwölf Wochen für die β Untereinheit zeigt im Versuch mit 1 x PBS ein konstantes Signal. In den Serumproben und dem Vollblut verhält sich das zugegebene hCG- β divergent. Bei der Versuchsreihe mit dem Leerserum steigt die Signalintensität für das hCG- β über die zwölf Wochen um den Faktor fünf an. Hingegen verhält sich die Signalintensität bei der im Vollserum versetzten Proben über den Verlauf von zwölf Wochen annähernd stabil. Die im Vollblut durchgeführte hCG- β Versuchsreihe über diesen Zeitraum zeigt ebenfalls einen gleichbleibende Signalintensität. Unterschiedliche Signalintensitäten an einzelnen Versuchstagen sind auf Schwankungen der Messgenauigkeit sowie auf die Komplexität des Prozessablauf zurück zu führen. Schlussfolgernd kann über den Lagerstabilitätsversuch in allen vier Matrizen das hCG- β über den gesamten Zeitraum von zwölf Wochen detektiert werden.

In dem ebenfalls durchgeführten Lagerstabilitätstest über zwölf Wochen für das LH, wurden dieser in allen Proben durchgehend in einer Konzentration von 100 mU/ml verlässlich detektiert. Die auch hier auftretenden Streuung der Signale sind auf Schwankungen der Messgenauigkeit sowie auf die Komplexität des Prozessablauf zurück zu führen.

Um diesen Assayaufbau und speziell das Mikroarray über einen Zeitraum von mehr als acht Wochen zu stabilisieren, müssen weitere Ansätze

5. Diskussion

verfolgt werden wie beispielsweise die Stabilisierung der gespotteten Antikörper. [Lee and Kim, 2002] Um eine Marktakzeptanz zu erzielen, sollte eine Verwendbarkeit von mindestens sechs Monaten erreicht werden.

Für einen verlässlichen Nachweis dieser Peptidhormone ist es zu diesem Zeitpunkt notwendig, parallel mehrere Standards am Versuchstag zu messen. Über diese Standards in Form einer Konzentrationsreihe für das Erstellen einer Eichgeraden lassen sich die Proben anschließend bewerten. In Hinblick auf die Integration dieses Assays in eine PoC-Anwendung muss eine intelligente Kalibrierung gefunden werden. Zur Wahl stehen hier zwei Ansätze. Das Integrieren von Kalibrierspots in das Spotmuster des Mikroarrays über denen ein Referenzwert aus der Probe gemessen wird. Hierfür kommen Serumbestandteile in Frage, welche keinen natürlichen Schwankungen in Tageszeit, Ernährung, Alter oder Herkunft des Probanden aufweist. Man kann diesen Standard aber auch auf den jeweiligen Probanden individualisieren und so das Alter und die Herkunft vernachlässigen.

Mit dem Schritt diesen Multiplex Assay in ein PoC-Gerät zu überführen, sollen die notwendigen Assayschritte vollständig automatisiert ablaufen. In ersten Versuchen in einem miniaturisierten System auf einem Glassobjektträger konnte die benötigte Assayzeit im Vergleich zu einem kommerziellen ELISA von >60 min auf unter 50 min mit dem Glasobjektträger verringert werden. Ebenfalls betrug das benötigte Probenmaterial in den hier durchgeführten Versuchen pro Messung 100 µl. Weiterhin ergeben sich durch diese Art die Miniaturisierung und dem damit verbundenen geringem Probenvolumen Möglichkeit einer Anwendung als Screening Methode.

Mit dem nächsten Schritt der Miniaturisierung in ein PoC-Gerät reduziert sich das benötigte Probenvolumen auf unter 100 µl. Ein solch geringes Probenvolumen könnte vor Ort minimalinvasiv und ohne Arzt über die Fingerbeere abgenommen werden, was die Kosten einer Dopingkontrolle verringern würde. Diese Screening Methode kann somit parallel zu einer Probenahme durchgeführt werden. Mittels der Ergebnisse des Schnelltests soll so über weitere gezielte Laboruntersuchungen entschieden werden. Das Entwickeln eines solchen Schnelltests mit mehreren Parametern stellt einen ersten Abschnitt in der Realisierung einer Vielzahl von möglichen Anwendungen dar. Neben den in dieser Arbeit gezeigten Nachweis der Peptidhormone sollen weitere Parameter auf ihre Verwendbarkeit in einem solchen Aufbau getestet werden.

Interessante Fragestellungen könnten weitere auf der Verbotsliste stehende Wirkstoffe oder Methoden sein, welche sich durch immunologische Testverfahren nachweisen lassen. Neben der immunologischen Detektion könnte der Nachweis fraglicher Parameter zukünftig ebenfalls elektrochemisch stattfinden. [Schumacher *et al.*, 2012] Hierfür wurden bereits in weiteren Arbeiten entsprechende Ergebnisse erbracht.

[Kozma *et al.*, 2013] Weitere Parameter, die in einem Dopingtest integriert werden könnten, sind rekombinante Peptidhormone sowie Wachstumsfaktoren, wie das humane Growth Hormone (hGH) oder den insulinähnliche Wachstumsfaktoren (engl. Insulin-like growth factors, IGF-1).

Ein Vorteil im Nachweis von rekombinanten Wirkstoffen kann dessen verändertes Glykosylierungsmuster sein, welches sich über spezifische Antikörper eindeutig nachweisen lässt. Eine größere Herausforderung stellt der Nachweis von Parametern dar, welche im Körper selber produziert werden. Als Beispiel soll hier das Erythropoetin (EPO) Molekül als Wachstumsfaktor für die Bildung der Erythrozyten dienen. Die heute auf dem Markt befindlichen EPO-Präparate werden vorrangig rekombinant hergestellt. Ein möglicher Ansatz für den Nachweis von EPO als Dopingmittel wäre ein Multiplex Ansatz in dem man neben der humanen Variante und dessen unterschiedliche Iso Formen ebenfalls gängige EPO-Varianten orts aufgelöst messen könnte. Erreicht man über die Qualität der verwendeten Fänger Antikörper den benötigten spezifischen Nachweis, könnte man diesen Multiplex Ansatz um weitere rekombinante EPO-Präparate erweitern. Ein Beispiel wäre hierfür das EPO-Derivat CERA (Continuous Erythropoiesis Receptor Activator). Diese EPO-Variante wurde über ein Methoxypolyethylenglycolpolymer zur Verlängerung der Serumhalbwertszeit verknüpft (PEGylierung). Eine solche PEGylierung ließe sich elegant in einem solchen System nachweisen. Ein weiteres Indiz für EPO-Doping ist die Reduzierung der körpereigenen EPO-Produktion, welche sich über die entsprechenden spezifischen Fängerantikörper widerspiegeln würde. Aufgrund der reduzierten Kosten pro Schnelltest könnten Sportler regelmäßiger getestet und über die Ergebnisse ein individuelles Profil erstellt werden. Bei einem Vergehen würde dieses bereits in diesem Schnelltest deutlich werden. Eine anschließende umfangreiche Laboruntersuchung könnte dieses Resultat untermauern. Das zukünftige Ziel dieses Testsystems ist die Integration weiterer relevanter Parameter im Rahmen der Dopinganalytik.

5. *Diskussion*

Um diesen Multiplex Assay in nächster Zukunft auch im Rahmen einer Dopingkontrolle einsetzen zu können, ist die Integration in ein PoC-Gerät notwendig. Erste Versuche wurden bereits in einer In-vitro Diagnostik Plattform durchgeführt. Je nach Assayaufbau ist in diesem System eine effektive Versuchszeit von voraussichtlich 15 min realisierbar. Ebenfalls können die aufzuwendenden Kosten hierdurch reduziert werden.

6. Ausblick

Es wurde ein Versuchsaufbau konstruiert, mit dem es möglich ist parallel und als Multiplex Messung LH, hCG-i und hCG- β aus einer Probe und unterschiedlicher Matrix semi-quantitativ nachzuweisen. Ein Überführen dieses Assayaufbaus in eine Point-of-care Lösung soll zeitnahe realisiert werden. Hierfür können Aufbauten wie das der Fraunhofer IvD-Plattform [Schumacher *et al.*, 2012] genutzt werden, welche in Kombination mit einer deutlich kleineren Ausleseeinheit einen weiteren Schritt darstellen, diesen Schnelltest auch mobil vor Ort einsetzen zu können. [Kozma *et al.*, 2013] Durch Validieren des so entstehenden Anti-Doping-PoC Test über Versuchselemente, wie die Performance-Analyse und dem Stabilitätstest über einen realistischen Zeitraum, soll ein Einstieg in das Anti-Doping-PoC Testsystem der WADA vorbereitet werden. Weiterhin soll der Anti-Doping-PoC Test in einem Antidoping Institut parallel zu der Standarduntersuchung eine umfangreiche Anzahl von Realproben messen.

Dieser in der Arbeit konstruierte Multiplex Assay soll exemplarisch für die Realisierung eines Schnelltests für weitere Serum oder Blutparameter stehen. Hierfür könnten die unterschiedlichen rekombinanten EPO Varianten, EPO-Analoga oder EPO-Mimetics sowie Wachstumsfaktoren in Frage kommen. Ebenfalls elegant nachweisen lassen sich eine Vielzahl von Stoffen, welche nicht endogen im Körper vorkommen. Für einen solchen Nachweis benötigt man keine konzentrationsabhängige Signalintensität. Die Kombination von mehreren nachzuweisenden Parametern in einem Test erhöht die Aussagekraft der Ergebnisse und helfen bei der Entscheidung, weitere Analysen in den Dopinglaboren durchzuführen.

Dieser hier etablierte Testansatz basiert auf eine Antigen-Antikörper Bindung, welche mit der Qualität der Bindungspartner direkt zusammenhängt. Über hoch spezifische Fängerantikörper oder -moleküle lassen sich gezielt die entsprechenden Antigene aus Blut oder Serumproben detektieren.

Ein weiterer Ansatz für ein Anti-Dopingtest wäre die Möglichkeit, diesen

6. *Ausblick*

Aufbau ebenfalls mit Urin als Probenmatrix nutzen zu können. Hierfür müsste über eine Machbarkeitsstudie ein Teil der in dieser Arbeit für Serum und Blut durchgeführten Versuche auf Urin angewendet werden. Bei erfolgreichen Ergebnissen könnte so der Nachweis fraglicher Parameter ohne Kapillarblut erfolgen. Vielversprechend ist die Methode den Nachweis über Urin zu führen auch dahingehend, dass der Sportler bei der Probenahme nicht punktiert werden muss.

7. Zusammenfassung

Weltweit streben Anti-Doping Institute danach jene Sportler zu überführen, welche sich unerlaubter Mittel oder Methoden bedienen. Die hierfür notwendigen Testsysteme werden kontinuierlich weiterentwickelt und neue Methoden aufgrund neuer Wirkstoffe der Pharmaindustrie etabliert.

Gegenstand dieser Arbeit war es, eine parallele Mehrkomponentenanalyse auf Basis von Immunoassays zu entwickeln, bei dem es primär um Verringerung des benötigten Probevolumens von mehreren Millilitern auf 100 µl pro Versuch und dessen Versuchszeit im Vergleich zu einem Standard ELISA Verfahren ging. Neben der Verwendung eines Multiplex Ansatzes und der Mikroarraytechnologie stellten ebenfalls die Spezifität aller Messparameter, die Stabilität des Versuchsaufbaus sowie die Performance über einen Einfach-Blind-Ansatz Herausforderungen dar.

Die Anforderung an den Multiplex Ansatz, keine Kreuzreaktivitäten trotz partiell homologer Strukturen zu messen, konnte durch die gezielte Kombination von spezifischen monoklonalen Fängerantikörpern realisiert werden. Hierfür wurden neben Kreuzreaktivitätstests auf dem Mikroarray parallel erfolgreich Western Blot Versuche durchgeführt. Jene Antikörper, welche in diesen Versuchen die gesetzten Anforderungen erfüllten, wurden für das Ermitteln der Bestimmungsgrenze verwendet. Über das Optimieren der Assaybedingungen konnte unter Verwendung von 0,05% Tween in der Waschlösung sowohl auf modifizierten Glas Objektträger als auch auf Objektträger aus Kunststoff (Cycloolefin Copolymer, COC) eine Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz und somit eine Steigerung des Signal/Hintergrundverhältnisses erreicht werden. Weiterhin konnte das Probenvolumen in dieser Arbeit auf 100 µl pro Messung auf einem Mikroarray reduziert werden. In den Versuchen zu Ermittlung der Bestimmungsgrenze in 1 x PBS wurde für das hCG- α eine Konzentration von 10 mU/ml, für das hCG- β eine Konzentration von 3,6 mU/ml und für das LH eine Konzentration von 10 mU/ml bestimmt. Den ermittelten Wert im Serum für das hCG- α

7. Zusammenfassung

entspricht dem von der WADA geforderten Wert in Urin von 5 mU/ml.

Neben der Ermittlung von Bestimmungsgrenzen im Puffer wurden die fraglichen Parameter hinsichtlich auftretender Matrixeffekten in komplexen Proben wie Serum und Blut gemessen. Zugunsten der Spezifität und dem Vermeiden von falsch positiven Fällen wurde der cut-off und die daraus resultierende geringere Sensitivität des Assays auf die zweifache Bestimmungsgrenze festgesetzt. Wie aus den Versuchen zur Ermittlung von Kreuzreaktivitäten auf dem Mikroarray zu entnehmen ist, lassen sich das LH, das hCG-i und hCG- β ebenfalls komplexen Proben detektieren. Ein Einfluss auf das Messsignal durch unterschiedliche Konzentrationen eines der Parameter auf einen zweiten konstanten Parameter konnte im Versuch mit verschiedenen LH Konzentrationen in Vollserum ausgeschlossen werden.

Nachdem Kreuzreaktivitätsversuche und Versuche zum Festsetzen des cut-off abgeschlossen werden konnten, wurde erstmals ein Kollektiv von Realproben vermessen. Hierbei konnte in der Serumprobe einer schwangeren Frau eindeutig der erhöhte hCG-i Wert nachgewiesen werden. In den Kontrollen dieses Kollektivs welche aus Serumproben männlicher und weiblicher Probanden bestand, wurden hingegen keine erhöhten Werte gemessen.

Die Durchführung einer Performance-Analyse über einem Einfach-Blind-Ansatz mit 130 Serum Proben welche ein umfangreicheres Probenkollektiv darstellen, wurde ebenfalls über dieses System realisiert. Die ausgewerteten Proben wurden anschließend über eine Grenzwertoptimierungskurve analysiert und die diagnostische Spezifität ermittelt. Um falsch positive Proben auszuschließen, wurde der cut-off so festgesetzt, dass alle negativen Proben unter <10 mU/ml lagen. Für die Messungen des LH konnte eine Sensitivität und Spezifität von 100% am optimalen cut-off erreicht werden. Demnach wurden alle negativen und positiven Proben eindeutig interpretiert. Für das hCG- β konnte ebenfalls am ermittelten optimalen cut-off eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 97% erreicht werden. Nach Anpassen des Probenpools der hCG-i Proben wurde eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 97,5% erreicht. Über einen Probenkollektiv vom Institut für Biochemie/Zentrum für Präventive Dopingforschung in Köln konnten mit jeweils zehn männlichen und zehn weiblichen Probanden erste Messungen mit Realproben aus Dopingkontrollen vermessen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse soll in weiterführenden Studien mit deutlich

höherer Probenanzahl dieser Versuchsaufbau weiter validiert werden.

Um den Nachweis zu erbringen, dass dieser Versuchsaufbau über mehrere Wochen stabile Signale bei Vermessen von identischen Proben liefert, wurde ein über zwölf Wochen angesetzter Stabilitätstest für alle Parameter erfolgreich in Serum und Blut durchgeführt. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wird die Lagerfähigkeit der Objektträger geprüft. In den Serum Versuchen mit hCG- α , hCG- β und LH konnten konstante Signalintensitäten über einen Zeitraum von acht Wochen gemessen werden. Bis zur zwölften Woche, dem letzten Versuchstag, nahmen die Signalintensitäten für alle Parameter in den unterschiedlichen Probenmatrizen ab.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erfolgreich eine Mehrkomponentenanalyse als Multiplex Ansatz auf einem Mikroarray entwickelt werden. Über die durchgeführten Versuche konnten Kreuzreaktivitäten ausgeschlossen und die Spezifität der einzelnen Parameter ermittelt werden. Die Durchführung der Performance-Analyse und des Stabilitätstests zeigen bereits die mögliche Einsatzfähigkeit dieses Tests im Kontext einer Dopinganalyse.

Literaturverzeichnis

- [Alfthan *et al.*, 1992] H Alfthan, C Haglund, J Dabek, and U H Stenman. Concentrations of human choriogonadotropin, its beta-subunit, and the core fragment of the beta-subunit in serum and urine of men and non-pregnant women. *Clinical chemistry*, 38(10):1981–7, October 1992.
- [Anderson *et al.*, 1997] R a Anderson, a M Wallace, a T Kicman, and F C Wu. Comparison between testosterone oenanthate-induced azoospermia and oligozoospermia in a male contraceptive study. IV. Suppression of endogenous testicular and adrenal androgens. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(8):1657–1662, August 1997.
- [Andresen and Bier, 2009] Heiko Andresen and Frank F Bier. Peptide microarrays for serum antibody diagnostics. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, volume 509, pages 123–34. January 2009.
- [Ascoli *et al.*, 2002] Mario Ascoli, Francesca Fanelli, and Deborah L Segaloff. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine reviews*, 23(2):141–74, April 2002.
- [Bamber, 1975] Donald Bamber. The area above the ordinal dominance graph and the area below the receiver operating characteristic graph. *Journal of mathematical psychology*, 12(4):387–415, November 1975.
- [Basaria, 2010] Shehzad Basaria. Androgen abuse in athletes: detection and consequences. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(4):1533–43, April 2010.
- [Begov, 2007] Franz Begov. Doping und die Zuschauer. Website, 2007. http://www.focus.de/sport/tourdefrance/tid-6768/sporthistoriker_aid_65703.html; visited on August 31th 2014.
- [Bellet *et al.*, 1997] D Bellet, V Lazar, I Bièche, V Paradis, Y Giovangrandi, P Paterlini, R Lidereau, P Bedossa, J M Bidart, and M Vidaud. Mali-

- gnant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin beta genes normally transcribed in trophoblastic cells. *Cancer research*, 57(3):516–523, 1997.
- [Bier *et al.*, 2008] Frank F Bier, Markus von Nickisch-Rosenegk, Eva Ehrentreich-Förster, Edda Reiss, Jörg Henkel, Rothin Strehlow, and Dennie Andresen. DNA microarrays. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 109(November 2007):433–453, 2008.
- [Birken *et al.*, 2003] Steven Birken, Peter Berger, Jean-Michel Bidart, Matthias Weber, Adrian Bristow, Rob Norman, Catharine Sturgeon, and Ulf-Håkan Stenman. Preparation and characterization of new WHO reference reagents for human chorionic gonadotropin and metabolites. *Clinical chemistry*, 49(1):144–154, 2003.
- [BISp, 2013] BISp. Doping in Deutschland von 1950 bis heute aus historisch-soziologischer Sicht im Kontext ethischer Legitimation. website, 2013. http://www.bisp.de/SharedDocs/Downloads/Aktuelles/Zusammenfassender_Bericht_WWU_HU.pdf?__blob=publicationFile; visited on August 30th 2014.
- [BMI, 2014] BMI. Dopingbekämpfung auf internationaler Ebene. Website, 2014. http://www.bmi.bund.de/DE/Themen/Sport/Dopingbekaempfung/Dopingbekaempfung-International/dopingbekaempfung-international_node.html; visited on August 31th 2014.
- [Bowers, 2012] Larry D Bowers. Anti-dope testing in sport: the history and the science. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(10):3933–3936, 2012.
- [Burstin, 1963] S Burstin. La Lucha contra el Dopage. *Revista de Derecho Sportiva*, pages 583–636, 1963.
- [Campbell *et al.*, 2005] Lindsay M. Campbell, Franklin G. Mixon, and W. Charles Sawyer. Property Rights and Olympic Success: An Extension. *Atlantic Economic Journal*, 33(2):243–244, June 2005.
- [Cawley and Flenker, 2008] Adam T Cawley and Ulrich Flenker. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. *Journal of mass spectrometry : JMS*, 43(7):854–64, July 2008.

- [Cawley *et al.*, 2009] Adam T Cawley, Graham J Trout, Rymantas Kazlauskas, Christopher J Howe, and Adrian V George. Carbon isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$) values of urinary steroids for doping control in sport. *Steroids*, 74(3):379–392, 2009.
- [Clasing, 2010] Dirk Clasing. *Doping und seine Wirkstoffe: Verbotene Arzneimittel im Sport*. Spitta, 2 edition, 2010.
- [Cone *et al.*, 2003] RD Cone, MJ Low, JK Elmquist, and JL Cameron. Williams textbook of endocrinology. In PR Larsen, HM Kronenberg, S Melmed, and KS Polonsky, editors, *Williams Textbook of Endocrinology*, chapter Neuroendoc, pages 81–176. Saunders, Philadelphia, 10th edition, 2003.
- [Dehennin and Matsumoto, 1993] L Dehennin and A M Matsumoto. Long-term administration of testosterone enanthate to normal men: alterations of the urinary profile of androgen metabolites potentially useful for detection of testosterone misuse in sport. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 44(2):179–189, 1993.
- [Deutscher Bundestag, 2014] Deutscher Bundestag. Anti-Doping-Gesetz für den Sport. Website, 2014. <http://dip21.bundestag.de/dip21/btd/18/023/1802308.pdf> visited on August 31th 2014.
- [Ekins *et al.*, 1989] R Ekins, F Chu, and J Micallef. High specific activity chemiluminescent and fluorescent markers: their potential application to high sensitivity and ‘multi-analyte’ immunoassays. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence*, 4(1):59–78, July 1989.
- [Ekins, 1989] R P Ekins. Multi-analyte immunoassay. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 7(2):155–68, January 1989.
- [Emerson *et al.*, 2003] Jane F. Emerson, Gilda Ngo, and Scott S. Emerson. Screening for interference in immunoassays. *Clinical chemistry*, 49(7):1163–9, 2003.
- [Fawcett, 2006] Tom Fawcett. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters*, 27(8):861–874, June 2006.
- [Franke and Berendonk, 1997] W W Franke and B Berendonk. Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German

- Democratic Republic government. *Clinical chemistry*, 43(7):1262–79, July 1997.
- [Franke and Ludwig, 2007] Werner Franke and Udo Ludwig. *Der verratene Sport*. Zabert Sandmann, 1st edition, 2007.
- [Gervais *et al.*, 2003] Annick Gervais, Yves-Alexis Hammel, Sophie Pelloux, Pierre Lepage, Gianni Baer, Nathalie Carte, Odile Sorokine, Jean-Marc Strub, Roman Koerner, Emmanuelle Leize, and Alain Van Dorselaer. Glycosylation of human recombinant gonadotrophins: characterization and batch-to-batch consistency. *Glycobiology*, 13(3):179–89, March 2003.
- [Handelsman *et al.*, 2009] David J Handelsman, Catrin Goebel, Amanda Idan, Mark Jimenez, Graham Trout, and Rymantas Kazlauskas. Effects of recombinant human LH and hCG on serum and urine LH and androgens in men. *Clinical endocrinology*, 71(3):417–28, September 2009.
- [Hanley and McNeil, 1982] J A Hanley and B J McNeil. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, 143(1):29–36, April 1982.
- [Hanley, 1983] D F Hanley. *Drogen und Drogenmissbrauch.*, page 402. Enke Verlag Stuttgart, 1983.
- [Hanley, 1989] JA Hanley. Receiver operating characteristic (ROC) methodology: the state of the art. *Crit Rev Diagn Imaging*, 29(3):307–35, January 1989.
- [Heil and Ehrhardt, 2007] Wolfgang Heil and Volker Ehrhardt. *Referenzbereiche für Kinder und Erwachsene*. Roche Diagnostics, 2007.
- [Hiort *et al.*, 2010] Olaf Hiort, Thomas Danne, and Martin Wabitsch. Grundlagen der Hormonbestimmung in der pädiatrischen Endokrinologie. In *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie*, chapter 5, pages 69–79. Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- [Huebschmann, 2008] Hans-Joachim Huebschmann. *Handbook of GC/MS*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, October 2008.

- [Hunter *et al.*, 2004] M G Hunter, R S Robinson, G E Mann, and R Webb. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal reproduction science*, 82-83:461–477, 2004.
- [Johnson and Ali, 2004] Daniel K. N. Johnson and Ayfer Ali. A Tale of Two Seasons: Participation and Medal Counts at the Summer and Winter Olympic Games*. December 2004.
- [Kicman *et al.*, 1991] A T Kicman, R V Brooks, and D A Cowan. Human chorionic gonadotrophin and sport. *British journal of sports { . . . }*, 25(2):73–80, 1991.
- [Kicman, 2008] a T Kicman. Pharmacology of anabolic steroids. *British journal of pharmacology*, 154(3):502–21, July 2008.
- [Kistler, 2006] Luitpold Kistler. *Todesfälle bei Anabolikamissbrauch; Todesursache, Befunde und Rechtsmedizinische Aspekte*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität zu München, 2006.
- [Knuth *et al.*, 1989] U A Knuth, H Maniera, and E Nieschlag. Anabolic steroids and semen parameters in bodybuilders. *Fertility and sterility*, 52(6):1041–7, December 1989.
- [Köhler and Milstein, 1975] G Köhler and C Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–497, August 1975.
- [Kozma *et al.*, 2013] Peter Kozma, A. Lehmann, Kai Wunderlich, Dirk Michel, Soeren Schumacher, Eva Ehrentreich-Förster, and F F Bier. A novel handheld fluorescent microarray reader for point-of-care diagnostic. *Bio-sensors & bioelectronics*, 47:415–20, September 2013.
- [Laemmli, 1970] U K Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [Lasne and de Ceaurriz, 2000] F Lasne and J de Ceaurriz. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*, 405(6787):635, June 2000.
- [Lasne *et al.*, 2002] Françoise Lasne, Laurent Martin, Nathalie Crepin, and Jacques de Ceaurriz. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Analytical biochemistry*, 311(2):119–126, 2002.

- [Lasne *et al.*, 2007] Françoise Lasne, Laurent Martin, Jean Antoine Martin, and Jacques de Ceaurriz. Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *International journal of biological macromolecules*, 41(3):354–357, August 2007.
- [le Cotonnec *et al.*, 1998] Jean-Yves le Cotonnec, HervéClaude Porchet, Vanya Beltrami, and Alain Munafò. Clinical pharmacology of recombinant human luteinizing hormone: Part II. Bioavailability of recombinant human luteinizing hormone assessed with an immunoassay and an in vitro bioassay. *Fertility and Sterility*, 69(2):195–200, February 1998.
- [Lee and Kim, 2002] Chang-Soo Lee and Byung-Gee Kim. Improvement of protein stability in protein microarrays. *Biotechnology Letters*, 24(10):839–44, 2002.
- [Macri *et al.*, 1990] James N. Macri, Ramana V. Kasturi, David A. Krantz, Edward J. Cook, Norman D. Moore, Jean A. Young, Kathleen Romero, and John W. Larsen. Maternal serum Down syndrome screening: Free β -protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 163(4):1248–1253, October 1990.
- [Maennig and Wellbrock, 2008] Wolfgang Maennig and Christian Wellbrock. Sozio-ökonomische Schätzungen olympischer Medaillengewinne: Analyse-, Prognose- und Benchmarkmöglichkeiten. Technical report, University of Hamburg, Hamburg, 2008.
- [Malone *et al.*, 2005] Fergal D Malone, Jacob A Canick, Robert H Ball, David A Nyberg, Christine H Comstock, Radek Bukowski, Richard L Berkowitz, Susan J Gross, Lorraine Dugoff, Sabrina D Craigo, Ilan E Timor-Tritsch, Stephen R Carr, Honor M Wolfe, Kimberly Dukes, Diana W Bianchi, Alicja R Rudnicka, Allan K Hackshaw, GERALYN Lambert-Messerlian, Nicholas J Wald, and Mary E D’Alton. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down’s syndrome. *The New England journal of medicine*, 353(19):2001–11, November 2005.
- [Metz, 1978] CE Metz. Basic principles of ROC analysis. *Seminars in nuclear medicine*, 8(4):283–98, October 1978.

- [Möller *et al.*, 2011] Ines Möller, Andreas Thomas, Hans Geyer, Wilhelm Schänzer, and Mario Thevis. Synthesis, characterisation, and mass spectrometric detection of a pegylated EPO-mimetic peptide for sports drug testing purposes. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 25(15):2115–2123, August 2011.
- [Mulligan *et al.*, 2001] T Mulligan, a Iranmanesh, and J D Veldhuis. Pulsatile iv infusion of recombinant human LH in leuprolide-suppressed men unmasks impoverished Leydig-cell secretory responsiveness to midphysiological LH drive in the aging male. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(11):5547–5553, November 2001.
- [NADA, 2010] NADA. Standard für Dopingkontrollen. Website, July 2010. http://www.nada.de/fileadmin/user_upload/nada/Downloads/Regelwerke/100630_Standard_fuer_Dopingkontrollen.pdf; visited on August 31st 2014.
- [NADA, 2013] NADA. NADA Jahresbericht 2013; ALLES GEBEN, NICHTS NEHMEN. Website, 2013. http://www.nada.de/fileadmin/user_upload/nada/Downloads/Jahresberichte/NADA_Jahrebericht-2013.pdf; visited on August 31st 2014.
- [Peltre and Thormann, 2003] G Peltre and W Thormann. Evaluation of Membrane Assisted Isoform Immunoassay (MAIIA) for direct detection of rhEPO in doping, a new rapid method with potential for on-the-site as well as for out-of- competition testing. Technical Report 2002, 2003.
- [Perera-Marin *et al.*, 2007] G Perera-Marin, C Murcia, and E González-Padilla. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: characterization and physiological relevance. *Animal reproduction science*, 101(3-4):187–207, 2007.
- [Pierce and Parsons, 1981] J G Pierce and T F Parsons. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual review of biochemistry*, 50:465–95, January 1981.
- [Pitteloud *et al.*, 2008] Nelly Pitteloud, Andrew a Dwyer, Suzzunne DeCruz, Hang Lee, Paul a Boepple, William F Crowley, and Frances J Hayes. Inhibition of luteinizing hormone secretion by testosterone in men requires aromatization for its pituitary but not its hypothalamic effects:

- evidence from the tandem study of normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(3):784–791, 2008.
- [Prokop, 1970] Ludwig Prokop. The struggle against doping and its history. *The Journal of sports medicine and physical fitness*, 10(1), 1970.
- [Prokop, 1972] Ludwig Prokop. *Zur Geschichte des Dopings.*, page 22. Deutsche Verlags-Anstalt, 1972.
- [Rao, 2001] C V Rao. Multiple novel roles of luteinizing hormone. *Fertility and sterility*, 76(6):1097–100, December 2001.
- [Rommerts *et al.*, 2004] F F G Rommerts, L Kühne, G W A van Cappellen, D M Stocco, S R King, and A Jankowska. Specific dose-dependent effects of ethane 1,2-dimethanesulfonate in rat and mouse Leydig cells and non-steroidogenic cells on programmed cell death. *The Journal of endocrinology*, 181(1):169–78, April 2004.
- [Rosa *et al.*, 1984] C Rosa, S Amr, S Birken, R Wehmann, and B Nisula. Effect of desialylation of human chorionic gonadotropin on its metabolic clearance rate in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 59(6):1215–1219, 1984.
- [Ryu *et al.*, 1998] KS Ryu, RL Gilchrist, YB Koo, I Ji, and TH Ji. Gene, interaction, signal generation, signal divergence and signal transduction of the LH/CG receptor. *International Journal of . . .*, 60 Suppl 1(1):S9–20, April 1998.
- [Schänzer and Donike, 1993] Willi Schänzer and Manfred Donike. Metabolism of anabolic steroids in man : synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Analytica chimica acta*, 275(1-2):23–48, 1993.
- [Schiettecatte *et al.*, 2012] Johan Schiettecatte, Ellen Anckaert, and Johan Smits. *Interferences in Immunoassays*. InTech, 2012.
- [Schumacher *et al.*, 2012] Soeren Schumacher, Jörg Nestler, Thomas Otto, Michael Wegener, Eva Ehrentreich-Förster, Dirk Michel, Kai Wunderlich, Silke Palzer, Kai Sohn, Achim Weber, Matthias Burgard, Andrzej Grzesiak,

- Andreas Teichert, Albrecht Brandenburg, Birgit Koger, Jörg Albers, Eric Nebling, and Frank F Bier. Highly-integrated lab-on-chip system for point-of-care multiparameter analysis. *Lab on a chip*, 12(3):464–73, February 2012.
- [Selby, 1999] C. Selby. Interference in immunoassay. *Annals of clinical biochemistry*, 36:407–21, 1999.
- [Stenman *et al.*, 1993] U H Stenman, J M Bidart, Steven Birken, Klaus Mann, Bruce Nisula, and J O'Connor. Standardization of protein immunoprocures. Choriogonadotropin (CG). *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*, 216:42–78, January 1993.
- [Stenman *et al.*, 2004] Ulf-Håkan Stenman, Henrik Alfthan, and Kristina Hotakainen. Human chorionic gonadotropin in cancer. *Clinical biochemistry*, 37(7):549–561, July 2004.
- [Stenman *et al.*, 2006] Ulf-Håkan Stenman, Aila Tiitinen, Henrik Alfthan, and Leena Valmu. The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. *Human reproduction update*, 12(6):769–84, 2006.
- [Stenman *et al.*, 2008] U-H Stenman, K Hotakainen, and H Alfthan. Gonadotropins in doping: pharmacological basis and detection of illicit use. *British journal of pharmacology*, 154(3):569–83, June 2008.
- [Svechnikov *et al.*, 2010] K Svechnikov, L Landreh, J Weisser, G Izzo, E Colón, I Svechnikova, and O Söder. Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Hormone research in paediatrics*, 73(2):93–101, January 2010.
- [Talmadge *et al.*, 1984] Karen Talmadge, Nikos C Vamvakopoulos, and John C Fiddes. Evolution of the genes for the β subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature*, 307(5946):37–40, January 1984.
- [Tate and Ward, 2004] Jill Tate and Greg Ward. Interferences in Immunoassay. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 25(2):105–20, 2004.

- [Teale *et al.*, 2012] P Teale, J Scarth, and S Hudson. Impact of the emergence of designer drugs upon sports doping testing. *Bioanalysis*, 4(1):71–88, January 2012.
- [Thevis and Schänzer, 2007] Mario Thevis and Wilhelm Schänzer. Mass spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays. *Mass spectrometry reviews*, 26(1):79–107, 2007.
- [Thevis *et al.*, 2007] M Thevis, J Maurer, M Kohler, H Geyer, and W Schänzer. Proteases in doping control analysis. *International journal of sports medicine*, 28(7):545–9, July 2007.
- [Thevis, 2010] Mario Thevis. *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, June 2010.
- [USADA, 2001] USADA. Report on proceedings under the world anti-doping code and the usada protocol. Website, 2001. <http://www.usada.org/lance-armstrong-receives-lifetime-ban-and-disqualification-of-competitive-results-for-doping-violations-stemming-from-his-involvement-in-the-united-states-postal-service-pro-cycling-team-doping-conspi/>; visited on August 30th 2014.
- [van Breda *et al.*, 2003] E van Breda, H a Keizer, H Kuipers, and B H R Wolffenbuttel. Androgenic anabolic steroid use and severe hypothalamic-pituitary dysfunction: a case study. *International journal of sports medicine*, 24(3):195–6, April 2003.
- [Van Vugt *et al.*, 1985] D A Van Vugt, W D Diefenbach, E Alston, and M Ferrin. Gonadotropin-releasing hormone pulses in third ventricular cerebrospinal fluid of ovariectomized rhesus monkeys: correlation with luteinizing hormone pulses. *Endocrinology*, 117(4):1550–8, October 1985.
- [WADA Laboratory Committee, 2010] WADA Laboratory Committee. Technical Document for the identification criteria for quantitative assays. Website, 2010. https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays_May%2008%202010_EN.doc.pdf; visited on August 31st 2014.
- [WADA Laboratory, 2012] WADA Laboratory. International Standard for Testing. Technical report, 2012.

- [WADA TD2013EPO, 2013] WADA TD2013EPO. WADA Technical Document – TD2013EPO WADA Technical Document – TD2013EPO. Website, 2013. <https://elb.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2013-epo>; visited on August 31st 2014.
- [WADA, 2004a] WADA. THE 2004 Prohibited List - International Standard. Website, 2004. https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_Prohibited_List_2004_EN.pdf; visited on August 31st 2014.
- [WADA, 2004b] Laboratory Committee WADA. WADA Technical Document-TD2004EAAS. Technical Report 1.0, WADA, 2004.
- [WADA, 2011] WADA. Guidelines for Reporting & Management of Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) Findings, 2011. https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_Guidelines_Reporting_Management_hCG_findings_v1.0_EN.pdf; visited on August 31st 2014.
- [WADA, 2012] WADA. International Standard for Laboratories. Website, 2012. https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_Int_Standard_Laboratories_2012_EN.pdf; visited on August 31st 2014.
- [WADA, 2013a] WADA. Athlete Biological Passport; Operating Guidelines and Compilation of Required Elements. Website, 2013. https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-ABP-Operating-Guidelines_v4.0-EN.pdf; visited on August 31st 2014.
- [WADA, 2013b] WADA. THE 2014 Prohibited List; International Standard. Website, September 2013. <http://list.wada-ama.org/wp-content/uploads/2013/11/2014-Prohibited-List-ENGLISH-FINAL.pdf>; visited on August 31st 2014.
- [WADA, 2014] WADA. A brief history of anti-doping, 2014. <https://www.wada-ama.org/en/who-we-are/a-brief-history-of-anti-doping>; visited on August 31st 2014.
- [WADA, 2015] WADA. World Anti-Doping Code 2015, 2015. <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2015-world-anti-doping-code.pdf>; visited on August 31st 2014.

Literaturverzeichnis

- [Wide *et al.*, 2010] Leif Wide, Karin Eriksson, Patrick M Sluss, and Janet E Hall. The common genetic variant of luteinizing hormone has a longer serum half-life than the wild type in heterozygous women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(1):383–389, 2010.
- [Wilson and Lipsett, 1966] H Wilson and M B Lipsett. Metabolism of epitestosterone in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 26(8):902–14, August 1966.
- [YEN *et al.*, 1968] S S C YEN, O LLERENA, B LITTLE, and O H PEARSON. Disappearance Rates of Endogenous Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin in Man. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(12):1763–1767, 1968.

A. Anhang

A.1. Puffer und Lösungen

Elektrophoresepuffer	25 mM TRIS pH 8.5 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Western Blot Blockin Puffer	39 mM Glycin 48 mM TRIS 0,0375% SDS 20% (v/v) Methanol
CCE Puffer (Probenpuffer)	90 mM TRIS pH 6,8 5,7% SDS 23% Glycerol 0,07% β -Mercaptoethanol 0,25% Bromphenolblau ad Aqua bidest.
Coomassie-Färbelösung	40% Methanol 10% Eisessig 0,25% w/v Coomassie Blue G250
Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Essigsäure 50% Ethanol ad Aqua bidest.

A. Anhang

Peroxidase Substratlösung	2 µg Naphtol gelöst in 7,5 ml 4 °C MeOH auf 50 ml mit PBS 1x aufgefüllt 30 µl H ₂ O ₂
Waschpuffer	1 x PBS + 0,05% Tween-20
Blockpuffer	1 x PBS + 5% Milchpulver + 0,05% Tween-20
Carbonat-Bicarbonat Puffer pH 9,6 (200 ml)	16 ml 0,1 M Natriumcarbonat 34 ml 0,1 M Natriumhydrogencarbonat ad Aqua bidest.

A.1.1. SDS-Gel Zusammensetzung für Trenn- und Sammelgel

	15% Trenngel	5% Sammelgel
bi dest H ₂ O	11,5 ml	6,8 ml
30% Acrylamid	25 ml	1,7 ml
1 M TRIS (pH 6,8)	12,5 ml	1,25 ml
10% SDS	0,5 ml	0,1 ml
10% Ammonium persulfat	0,5 ml	0,1 ml
TEMED	0,02 ml	0,01 ml
Bromphenolblau		0,1 ml

A.2. Tabellen

Tab. A1.: Schlüssel für die 130 Proben aus dem Einfach-Blind-Ansatz zur Ermittlung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität. Jeder hCG-i Konzentration wurde randomisierend eine hCG- β und LH Konzentration jeweils in mU/ml zugeordnet. Somit sind alle gewählten Konzentrationen aller Peptidhormone in diesem Ansatz zehn Mal vertreten und jede Probe besteht aus einer individuellen Kombination aus allen drei Peptidhormonen.

Probe	hCG-i	n-1 hCG- β	n+1 LH
1	0	0	0
2	0	2	2
3	0	4	4
4	0	10	10
5	0	20	20
6	0	30	30
7	0	40	40
8	0	50	50
9	0	75	60
10	0	100	70
11	2	150	80
12	2	200	90
13	2	300	100
14	2	300	2
15	2	0	4
16	2	2	10
17	2	4	20
18	2	10	30
19	2	20	40
20	2	30	50
21	4	40	60
22	4	50	70
23	4	75	80
24	4	100	90
25	4	150	100
26	4	200	0
27	4	200	4

Probe	hCG-i	hCG- β	LH
28	4	300	10
29	4	0	20
30	4	2	30
31	10	4	40
32	10	10	50
33	10	20	60
34	10	30	70
35	10	40	80
36	10	50	90
37	10	75	100
38	10	100	0
39	10	150	2
40	10	150	10
41	20	200	20
42	20	300	30
43	20	0	40
44	20	2	50
45	20	4	60
46	20	10	70
47	20	20	80
48	20	30	90
49	20	40	100
50	20	50	0
51	30	75	2
52	30	100	4
53	30	100	20
54	30	150	30
55	30	200	40
56	30	300	50
57	30	0	60
58	30	2	70
59	30	4	80
60	30	10	90
61	40	20	100
62	40	30	0

A. Anhang

Probe	hCG-i	hCG- β	LH
63	40	40	2
64	40	50	4
65	40	75	10
66	40	75	30
67	40	100	40
68	40	150	50
69	40	200	60
70	40	300	70
71	50	0	80
72	50	2	90
73	50	4	100
74	50	10	0
75	50	20	2
76	50	30	4
77	50	40	10
78	50	50	20
79	50	50	40
80	50	75	50
81	75	100	60
82	75	150	70
83	75	200	80
84	75	300	90
85	75	0	100
86	75	2	0
87	75	4	2
88	75	10	4
89	75	20	10
90	75	30	20
91	100	40	30
92	100	40	50
93	100	50	60
94	100	75	70
95	100	100	80
96	100	150	90
97	100	200	100

Probe	hCG-i	hCG- β	LH
98	100	300	0
99	100	0	2
100	100	2	4
101	150	4	10
102	150	10	20
103	150	20	30
104	150	30	40
105	150	30	60
106	150	40	70
107	150	50	80
108	150	75	90
109	150	100	100
110	150	150	0
111	200	200	2
112	200	300	4
113	200	0	10
114	200	2	20
115	200	4	30
116	200	10	40
117	200	20	50
118	200	20	70
119	200	30	80
120	200	40	90
121	300	50	100
122	300	75	0
123	300	100	2
124	300	150	4
125	300	200	10
126	300	300	20
127	300	0	30
128	300	2	40
129	300	4	50
130	300	10	60

A. Anhang

Tab. A2.: Kreuzreaktivitätsversuch auf Mikroarrays der Detektions- und des Sekundärantikörper bei unterschiedlichen hCG-i Konzentrationen in 1 x PBS. Die Werte sind in relative fluoreszenz Einheiten (RFU) angegeben.

	Detektion/ Sekundär AK	Fänger Antikörper				LOQ
		LH- β 10-L15A	hCG- β 10-C25C	hCG- β 10-C25FS	CRP M86842M	
ohne AG 1 x PBS	LH 70-XG60	210	231	243	231	244
	hCG- α 70-XG35S	174	168	191	186	197
	hCG- β 20-CG35	1.014	1.473	2.067	2.047	395
	CRP K62350G	176	161	184	161	210
	anti-Ziege 205-605-108	60	59	82	61	81
50 mU/ml hCG-i AG in 1 x PBS	LH 70-XG60	238	438	171	262	279
	hCG- α 70-XG35S	191	321	263	180	246
	hCG- β 20-CG35	1.669	2.568	2.455	3.113	431
	CRP K62350G	168	160	191	160	207
	anti-Ziege 205-605-108	60	59	82	61	81
500 mU/ml hCG-i AG in 1 x PBS	LH 70-XG60	389	2.548	552	353	560
	hCG- α 70-XG35S	434	2.318	1.190	331	611
	hCG- β 20-CG35	1.882	6.044	5.942	2.899	918
	CRP K62350G	169	167	198	165	202
	anti-Ziege 205-605-108	58	55	86	58	80

Tab. A3.: Kreuzreaktivitätsversuch auf Mikroarrays der Detektions- und des Sekundärantikörper in Leermessungen und bei 500 mU/ml hCG-i in Referenzmaterial. Die Werte sind in relative fluoreszenz Einheiten (RFU) angegeben.

Detektion/ Sekundär AK		Fänger Antikörper				LOQ
		LH- β 10-L15A	hCG- β 10-C25C	hCG- β 10-C25H	CRP M86842M	
Leervollblut ohne AG	hCG- α 70-XG35S	368	470	378	252	248
hCG-i AG in Leervollblut	hCG- α 70-XG35S	354	1.121	376	349	283
	CRP K62350G	337	378	337	47.648	368
Leerserum ohne AG	hCG- α 70-XG35S	782	615	665	646	706
hCG-i AG in Leerserum	hCG- α 70-XG35S	887	1.585	700	627	663
	CRP K62350G	602	494	464	47.400	626
Vollserum ohne AG	hCG- α 70-XG35S	1.651	15.336	1.255	716	920
hCG-i AG in Vollserum	hCG- α 70-XG35S	1.834	16.948	1.607	919	995
	hCG- α 70-XG45	690	5.364	669	578	586
	CRP K62350G	575	454	454	47.170	424

Tab. A4.: Kreuzreaktivitätsversuch auf Mikroarrays der Detektions- und des Sekundärantikörper mit Leer- und Vollserum sowie Leervollblut. Als Kontrolle wurden den Proben 500 mU/ml hCG-i zugegeben und ebenfalls vermessen. Die Werte für die getesteten Antikörperkombinationen setzen sich aus den in Tabelle A3 gezeigten Werten und dem Verhältnis der zugehörigen LOQ zusammen.

Detektion/ Sekundär AK		Fänger Antikörper			
		LH- β 10-L15A	hCG- β 10-C25C	hCG- β 10-C25H	CRP M86842M
Leervollblut ohne AG	hCG- α 70-XG35S	1,5	1,9	1,5	1,0
hCG-i AG in Leervollblut	hCG- α 70-XG35S	1,3	4,0	1,3	1,2
	CRP K62350G	0,9	1,0	0,9	129,5
Leerserum ohne AG	hCG- α 70-XG35S	1,1	0,9	0,9	0,9
hCG-i AG in Leerserum	hCG- α 70-XG35S	1,3	2,4	1,1	0,9
	CRP K62350G	1,0	0,8	0,7	75,7
Vollserum ohne AG	hCG- α 70-XG35S	1,8	16,7	1,4	0,8
hCG-i AG in Vollserum	hCG- α 70-XG35S	1,8	17,0	1,6	0,9
	hCG- α 70-XG45	1,2	9,2	1,1	1,0
	CRP K62350G	1,4	1,1	1,1	111,3

Tab. A5.: Ermitteln von Matrixeffekten und Kreuzreaktivitäten in komplexen Proben über Kontrollmessungen und nach Zugabe der Peptidhormone auf alle Messparameter. der Versuche unter Zugabe der Peptidhormone in unterschiedlichen Probenmatrizen. Durchgeführt auf GLYMO modifizierten Glas-Slides. Die Werte sind in relative fluoreszenz Einheiten (RFU) angegeben.

	Kontrolle	100 mU/ml LH AG	500 mU/ml hCG-i	35,7 mU/ml hCG- β
1 x PBS				
LH	116	26.594	187	137
hCG-i	67	608	1.867	323
hCG- β	114	212	537	1.706
2 x LOQ	81	537	201	247
Leerserum				
LH	1.135	38.536	1.463	1.335
hCG-i	626	3.359	11.740	3.110
hCG- β	734	1.187	2.608	10.333
2 x LOQ	1.523	1.394	730	2.059
Vollserum				
LH	1.244	36.920	1.333	1.291
hCG-i	<i>12.227</i>	<i>15.165</i>	21.040	<i>13.597</i>
hCG- β	1.865	2.003	3.253	7.638
2 x LOQ	1.789	2.259	2.107	1.943
Leervollblut				
LH	662	26.594	784	683
hCG-i	617	2.036	6.564	2.474
hCG- β	641	671	2.015	7.140
2 x LOQ	946	632	1.055	1.125

Tab. A6.: Fluoreszenzwerte in RFU des Probenkollektivs vom Institut für Biochemie in Köln. Gemessen wurden zehn männliche und zehn weibliche Serumproben. Die Serumprobe **W 5** weist erhöhte Werte für das hCG- β und hCG-i auf welche aber unter den ermittelten cut-off Werten der Performance-Analyse liegen. Die Werte sind in relative fluoreszenz Einheiten (RFU) angegeben.

Köln	LH	hCG-i	hCG- β	CRP	2 x LOQ
M 1	819	758	804	11.674	1.036
M 2	1.374	1.683	1.862	1.664	2.565
M 3	514	616	596	7284	1010
M 4	432	450	821	2.448	1.396
M 5	1.223	448	442	1.459	589
M 6	869	784	739	1.119	1.153
M 7	759	788	769	1.247	832
M 8	965	485	521	1.316	853
M 9	782	535	442	4.687	562
M 10	542	365	454	2.156	494
W 1	659	658	643	8.112	382
W 2	560	415	383	8.775	406
W 3	765	546	633	2.931	1.585
W 4	1.131	1.140	1.062	10.057	2.717
W 5	8.305	10.907	11.892	17.476	576
W 6	696	465	489	7.549	1.336
W 7	1.775	1.936	1.450	1.419	3.924
W 8	640	474	452	4.961	923
W 9	678	501	494	7.883	1.220
W 10	431	393	367	6.713	1.410

Tab. A7.: Stabilitätstest der Mikroarrays für das hCG-i über zwölf Wochen auf GLYMO modifizierten Glas-Objektträgern. Die gemessenen Fluoreszenz Werte sind als RFU angegeben. Die zweifache LOQ bildet die erweiterte Bestimmungsgrenze.

Probe	Mess-signal	Woche									
		0	1	2	3	4	6	8	10	12	
1x PBS + 500 mU/ml hCG-i AG	LH	407	462	276	218	310	245	298	293	217	
	hCG-i	3.339	5.560	3.151	1.562	4.420	2.829	2.532	1.867	2.044	
	hCG- β	1.353	2.053	1.177	1.425	1.295	909	767	812	781	
	2 x LOQ	222	296	203	210	204	268	243	377	238	
Leerserum + 500 mU/ml hCG-i AG	LH	1.685	1.290	1.305	1.611	1.463	1.827	1.580	1.500	3.391	
	hCG-i	18.220	13.771	13.232	7.266	11.740	17.881	11.257	7.786	9.560	
	hCG- β	7.924	5.638	4.192	2.179	2.608	4.128	2.997	2.143	2.675	
	2 x LOQ	848	998	1.120	2.103	730	2.443	1.915	2.336	1.857	
Vollserum	LH	1.333	1.327	1.184	1.466	1.244	1.891	1.732	1.378	729	
	hCG-i	14.505	11.986	12.229	11.772	12.227	11.985	11.295	7.987	6.691	
	hCG- β	2.650	2.240	1.936	2.075	1.865	2.192	1.988	1.549	1.058	
	2 x LOQ	1.381	3.727	1.480	2.646	1.789	3.069	3.805	2.186	865	
Vollserum + 500 mU/ml hCG-i AG	LH	1.556	1.365	1.262	2.066	1.333	1.829	1.505	1.151	846	
	hCG-i	20.951	15.589	15.126	16.435	21.040	18.480	14.766	10.892	8.413	
	hCG- β	4.740	2.887	2.768	3.030	3.253	3.699	2.343	1.931	1.478	
	2 x LOQ	1.233	1.744	1.898	1.833	2.107	2.621	2.778	1.556	1.463	
Blut + 500 mU/ml hCG-i AG	LH	949	826	690	784	872	902	956	661	464	
	hCG-i	9.385	5.573	5.081	6.564	6.609	6.827	3.294	2.147	2.805	
	hCG- β	4.185	2.216	1.951	2.015	1.492	1.370	1.027	746	672	
	2 x LOQ	806	868	819	1.055	1.028	890	1.089	997	498	

Tab. A8.: Stabilitätstest über zwölf Wochen verschiedener mit 37 mU/ml hCG- β versetzter Proben auf GLYMO modifizierten Glas-Objektträgern. Als Probenmatrix wurden 1 x PBS; Leerserum; Vollserum und Leervollblut verwendet. Die gemessenen Fluoreszenz Werte sind als RFU angegeben. Die zweifache LOQ bildet die erweiterte Bestimmungsgrenze.

Probe	Mess-signal	Woche								
		0	1	2	3	4	6	8	10	12
1 x PBS + 37 mU/ml hCG- β AG	LH	279	247	226	212	269	238	258	257	137
	hCG-i	520	473	562	314	1.010	698	594	391	323
	hCG- β	1.586	1.318	2.089	833	3.580	2.344	2.022	1.189	1.706
	2 x LOQ	250	177	211	258	214	151	431	236	247
Leerserum + 37 mU/ml hCG- β AG	LH	1.062	958	1.303	1.253	1.792	1.287	1.683	1.278	937
	hCG-i	1.303	1.099	1.480	3.696	3.783	4.670	4.619	3.584	2.542
	hCG- β	4.359	3.047	5.293	12.865	11.825	17.723	15.940	19.870	11.357
	2 x LOQ	906	1.534	1.707	1.548	1.916	2.397	2.163	2.344	1.426
Vollserum	LH	1.333	1.327	1.184	1.466	1.244	1.891	1.732	1.378	729
	hCG-i	14.505	11.986	12.229	11.772	12.227	11.985	11.295	7.987	6.691
	hCG- β	2.650	2.240	1.936	2.075	1.865	2.192	1.988	1.549	1.058
	2 x LOQ	1.381	3.727	1.480	2.646	1.789	3.069	3.805	2.186	865
Vollserum + 37 mU/ml hCG- β AG	LH	1.557	1.439	1.232	1.268	1.291	1.707	2.774	1.229	676
	hCG-i	14.175	12.220	10.429	12.012	13.597	12.726	13.803	8.253	5.391
	hCG- β	4.320	4.666	3.890	5.891	7.638	8.462	10.315	4.340	4.797
	2 x LOQ	1.279	3.991	1.949	1.129	1.943	2.316	3.751	1.858	664
Blut + 37 mU/ml hCG- β AG	LH	769	771	630	683	870	927	1.005	711	422
	hCG-i	801	794	732	2.474	3.646	1.826	2.084	751	618
	hCG- β	1.939	1.599	1.576	7.140	12.404	5.701	5.954	1.735	2.515
	2 x LOQ	818	712	658	1.125	821	951	851	716	558

Tab. A9.: Stabilitätstest über zwölf Wochen verschiedener mit 100 mU/ml LH versetzter Proben auf GLYMO modifizierten Glas-Objektträgern. Als Probenmatrix wurden 1 x PBS; Leerserum; Vollserum und Leervollblut verwendet. Die gemessenen Fluoreszenz Werte sind als RFU angegeben. Die zweifache LOQ bildet die erweiterte Bestimmungsgrenze.

Probe	Mess-signal	Woche									
		0	1	2	3	4	6	8	10	12	
1 x PBS + 100 mU/ml LH AG	LH	37.065	38.899	33.383	12.280	29.842	36.248	18.901	22.931	24.272	
	hCG-i	2.132	3.800	1.155	440	741	914	528	627	713	
	hCG-β	996	852	451	236	244	191	321	386	309	
	2 x LOQ	340	2.526	970	326	341	506	459	1.093	310	
Leerserum + 100 mU/ml LH AG	LH	38.743	37.755	38.074	38.152	38.536	38.660	36.551	38.451	34.313	
	hCG-i	5.839	4.155	3.393	4.356	3.359	3.691	3.547	805	1.767	
	hCG-β	984	852	908	1.261	1.187	1.285	1.410	1.054	588	
	2 x LOQ	1.158	1.094	929	1.486	1.394	1.160	1.975	2.971	1.270	
Vollserum	LH	1.333	1.327	1.184	1.466	1.244	1.891	1.732	1.378	729	
	hCG-i	14.505	11.986	12.229	11.772	12.227	11.985	11.295	7.987	6.691	
	hCG-β	2.650	2.240	1.936	2.075	1.865	2.192	1.988	1.549	1.058	
	2 x LOQ	1.381	3.727	1.480	2.646	1.789	3.069	3.805	2.186	865	
Vollserum + 100 mU/ml LH AG	LH	36.453	37.488	36.216	36.092	36.920	37.267	35.615	35.059	26.075	
	hCG-i	16.883	13.954	13.823	13.562	15.165	14.063	12.663	9.046	5.987	
	hCG-β	2.807	2.054	2.092	2.168	2.003	2.521	1.785	1.378	1.016	
	2 x LOQ	1.781	1.693	2.374	2.039	2.259	2.774	1.656	1.632	1.680	
Blut + 100 mU/ml LH AG	LH	36.987	38.030	35.595	34.958	37.103	36.162	35.441	30.321	24.799	
	hCG-i	3.961	3.181	1.949	2.036	2.095	2.204	2.370	1.283	992	
	hCG-β	866	856	605	671	767	854	936	589	423	
	2 x LOQ	1.088	1.056	520	632	709	1.256	1.159	666	667	

A.3. Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden auch in den hier aufgeführten Arbeiten veröffentlicht:

A.3.1. Peer-reviewed Veröffentlichungen

[Brandenburg et al., 2009] A. Brandenburg, F. Curdt, G. Sulz, F. Ebling, J. Nestler, **K. Wunderlich**, and D. Michel. Biochip readout system for point-of-care applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 139(1):245–251, May 2009.

[Nestler et al., 2010] J. Nestler, A. Morschhauser, T. Otto, B. Koger, A. Brandenburg, **K. Wunderlich**, E. Ehrentreich-Förster, F. F. Bier, and T. Gessner. Highly-integrated, low-cost in-vitro diagnostic platform for miniaturized assay development. *14th International Conference on Miniaturized Systems, MicroTAS, 2010 Oct 3-7, Groningen (The Netherlands)*, pages 1223–1225, October 2010.

[Brandenburg et al., 2009] A. Brandenburg, F. Curdt, J. Nestler, T. Otto, **K. Wunderlich**, and D. Michel. Integrated point of care testing system based on low cost polymer biochips. *SPIE Photonics West, San Diego, Proceedings*, 7169 p 716902, Jan 24-29 2009

[Schumacher et al., 2012] S. Schumacher, J. Nestler, T. Otto, M. Wegener, E. Ehrentreich-Förster, D. Michel, **K. Wunderlich**, S. Palzer, K. Sohn, A. Weber, M. Burgard, A. Grzesiak, A. Teichert, A. Brandenburg, B. Koger, J. Albers, E. Nebling, and F. F. Bier. Highly-integrated lab-on-chip system for point-of-care multiparameter analysis. *Lab on a chip*, 12(3):464–73, February 2012.

[Kozma et al., 2013] P. Kozma, A. Lehmann, **K. Wunderlich**, D. Michel, S. Schumacher, E. Ehrentreich-Förster, and F. F. Bier. A novel handheld fluorescent microarray reader for point-of-care diagnostic. *Biosensors & bioelectronics*, 47:415–20, September 2013.

A.3.2. Vorträge sowie Poster und nicht peer-reviewed Veröffentlichungen

[Wunderlich K. et al., 2010] **K. Wunderlich**, D. Michel, S. Schumacher, and E. Ehrentreich-Förster. Möglichkeit für die (patienten-) nahe Multiparameteranalyse. *Poster auf dem 5. Senftenberger Innovationsforum: Multiparameteranalytik*, 5, 2010.

[Wunderlich, K. et al., 2011] **K. Wunderlich**, D. Michel, M. Schellhase, and E. Ehrentreich-Förster. Doping Tests mittels Lab on Chip-Technologie. *Poster auf dem 7. Deutschen BioSensor Symposium*, 7, April 2011.

[Wunderlich, K. et al., 2012a] **K. Wunderlich**, D. Michel, and E. Ehrentreich-Förster. Paralleler Multiparameternachweis verschiedener Glykoproteine mittels Mikroarray. *In 4. Dresdner Medizintechnik - Symposium, pages 182–184. Dresdner Beiträge zur Medizintechnik*, 2012.

[Wunderlich, K. et al., 2012b] **K. Wunderlich**, D. Michel, E. Ehrentreich-Förster, and F. F. Bier. Development of a protein-assay for glycoproteins on a microarray. *Poster auf dem Advances in Microarray Technology Kongress in Edinburgh*, UK, 2012.

[Wunderlich, K. , 2013] **K. Wunderlich**. Entwicklung einer Multiparameteranalyse als Lab-on-Chip Messung mittels Antigen-Antikörper-Reaktion in der Antidopinganalyse. *Vortrag anlässlich des 8. Deutschen BioSensor Symposium*, 8, March 2013.

A. Anhang

A.4. Lebenslauf

Die Seite 128 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Potsdam, den 29. September 2014

A.5. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank Bier für die Themenstellung und Betreuung dieser Doktorarbeit.

Frau Dr. Ehrentreich-Förster danke ich für ihre Tätigkeit als Betreuerin, ihr Vertrauen und den Beistand in schwierigen Situationen.

Besonderen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Mario Thevis aussprechen, der mir zur rechten Zeit mit maßgeblichen Hinweisen weiter half und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Michaela Schellhase und Dirk Michel danke ich für die Erfahrung, die sie mit mir teilten und ohne derer die Herstellung der Mikroarrays und somit die Basis dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Einen besonderen Dank möchte ich Dr. Matthias Griessner und Dr. Axel Warsinke für ihre aufrichtige und wichtige Kritik in vielen Bereichen dieser Arbeit richten, welche immer zu einer Verbesserung der erreichten Qualität führte.

Den Doktoranden Henry Memczak, Sarah Schumacher möchte ich für die konstruktiven und kritischen Anregungen sowie Jörg Schenk und Dr. Frank Sellrie für die konstruktiven und kritischen Anregungen bei der Konstruktion des Assays danken.

Danken möchte ich auch Dr. Peter Kozma, Dr. Sebastian Hoppe, Dr. Harald Seitz, Dr. Soeren Schumacher, Dr. Katja Uhlig sowie Dr. Harald Peter, André Lehmann, Alexander Christmann und Erik Rümpel die mir bei fachlichen Fragestellungen zur Seite standen sowie Kathi Grossmann und Beate Morgenstern für ihre oft so wichtige administrative Hilfe danken.

Mein persönlicher Dank gilt von ganzem Herzen Carola und ihrer Familie sowie meiner Tochter Klara und meiner Schwester Anja für ihre ununterbrochene Unterstützung.

A.6. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Potsdam, den 29. September 2014