Aus dem Institut für Biochemie
der Deutschen Sporthochschule Köln
Geschäftsführender Leiter: Prof. Dr. W. Schänzer

Untersuchungen zur massenspektrometrischen Charakterisierung und Bestimmung dopingrelevanter Peptidhormone

von der Deutschen Sporthochschule Köln
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation

Vorgelegt von

Michael Bredehöft
aus
Wuppertal

Köln 2010

Erster Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. W. Schänzer
Zweiter Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. M. Thevis
Vorsitzende des Promotionsausschusses: Frau Univ.-Prof. Dr. I. Hartmann-Tews
Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2010

Hierdurch versichere ich:
Ich habe diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und technischen Hilfen angefertigt; sie hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitate kenntlich gemacht worden.
Die angefertigte Dissertation ist nicht an anderer Stelle zum Zwecke der Promotion vorgelegt und, abgesehen von vorläufigen Teilergebnissen, noch nicht veröffentlicht worden.
Vor diesem angestrebten Promotionsverfahren habe ich keine anderen Promotionsversuche begonnen oder sind fehlgeschlagen.
Die ‚Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis' der Deutschen Sporthochschule Köln in der aktuellen Fassung wurden eingehalten.

Berichte aus der Biochemie

Michael Bredehöft

Untersuchungen zur massenspektrometrischen Charakterisierung und Bestimmung dopingrelevanter Peptidhormone

Shaker Verlag
Aachen 2011

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Zugl.: Deutsche Sporthochschule Köln, Diss., 2010

Copyright Shaker Verlag 2011
Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-0327-7
ISSN 1434-5536

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Meinen Eltern

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Veröffentlichungen

THEVIS, M., BREDEHÖFT, M., KOHLER, M., SCHÄNZER, W. „Mass Spectrometry-Based Analysis of IGF-1 and hGH“,*Handb Exp Pharmacol* **195**, 201-207 (2009)

BREDEHÖFT, M., SCHÄNZER, W., THEVIS, M., "Quantification of human insulin-like growth factor-1 and qualitative detection of its analogues in plasma using liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry", *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**(4), 477-485 (2008).

THEVIS, M., BREDEHÖFT, M., GEYER, H., KAMBER, M., DELAHAUT, P., SCHÄNZER, W., "Determination of Synacthen in human plasma using immunoaffinity purification and liquid chromatography/tandem mass spectrometry", *Rapid Commun Mass Spectrom* **20**(23), 3551-3556 (2006).

Tagungsbeiträge

BREDEHÖFT, M., GEYER, H., KAMBER, M., DELAHAUT, P., SCHÄNZER, W., THEVIS, M., „Bestimmung von Synacthen in humanem Plasma mittels Immunoaffinitätsaufreinigung und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Tandem Massenspektrometrie“, Poster auf der 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Bremen (2007).

BREDEHÖFT, M., SCHÄNZER, W., THEVIS, M., "Determination of human IGF-1 and analogues in plasma with LC-ESI-MS/MS after immunoaffinity purification (preliminary results)”, Vortrag auf dem Manfred Donike Workshop, 25th Cologne Workshop on Dope Analysis, Köln (2007).

BREDEHÖFT, M., THEVIS, M, DELAHAUT P, KAMBER M, SCHÄNZER W., "Detection of synacthen in human plasma with LC-ESI-MS/MS after immunoaffinity purification", Vortrag auf dem Manfred Donike Workshop, 24th Cologne Workshop on Dope Analysis, Köln (2006).

Auszeichnungen

- Der im Zuge dieser Arbeit veröffentlichte wissenschaftliche Artikel

  BREDEHÖFT, M., SCHÄNZER, W., THEVIS, M., "Quantification of human insulin-like growth factor-1 and qualitative detection of its analogues in plasma using liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry", *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**(4), 477-485 (2008)

  wurde 2010 mit dem *Beynon Prize* des Journals *Rapid Communications in Mass Spectrometry* ausgezeichnet.

  Die Bedingungen des Preises sind im Anhang nachzulesen.

- Die vorliegende Dissertation erhielt den *TOYOTA-Wissenschaftspreis 2010* der Deutschen Sporthochschule Köln und TOYOTA Deutschland GmbH in der Kategorie „Naturwissenschaften".

Danksagung

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von Mai 2005 bis Mai 2008 und von April bis Mai 2010 am Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schänzer und Herrn Prof. Dr. Mario Thevis durchgeführt.
Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schänzer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die konstruktiven Anmerkungen bei der Erstellung der Arbeit.
Bei Herrn Prof. Dr. Mario Thevis vom Institut für Präventive Dopingforschung bedanke ich mich besonders für die intensive Einarbeitung. Sein stets offenes Ohr für Fragen und Vorschläge sowie die Bereitschaft, sein Wissen zu teilen und zu diskutieren, haben erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. P. Delahaut von den CER Laboratorien, Belgien für ein hervorragendes Antikörpergel, welches die Analyse von Synacthen® erleichterte.
Weiterhin danke ich der endokrinologischen Praxis von Dr. M. von Hülst-Schlabrendorff und Dr. W. Ehses, Köln und ihrem Praxisteam für die Bereitstellung von Plasmaproben und Vergleichswerten sowie die freundliche Unterstützung.
Vielen Dank sage ich der Tierärztlichen Hochschule Hannover sowie dem Institut für Kardiologie und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln für die Überlassung von Ziegen- und Schafplasma bzw. Humanplasma.

Den Kollegen im Institut für Biochemie danke ich für die langjährige Zusammenarbeit. Dabei möchte ich im Speziellen Herrn Dr. Hans Geyer für seine stets aufmunternden und motivierenden Worte danken. Auch an Herrn Dr. Andreas Thomas und Herrn Dipl.-Chem. G. Opfermann geht mein Dank für zahlreiche Momente fruchtbarer Diskussion.
Den Mädels von den „Anabolen“ danke ich für vielschichtige Gespräche über „Wonder Woman“, an Vassi geht mein Dank für die Idee zu spätabendlichen Pasta-Orgien, gute Tipps zum Tee und Einblicke in die leckere griechische Küche (Gruß an Vassis Mutter !).
Und last but not least ein Gruß an die IT-Crowd (ey Mann, wir sind die EDV !!!).

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **XV**

1 EINLEITUNG **1**

2 LITERATURBESPRECHUNG **3**

2.1 HISTORISCHES ZUM THEMA DOPING 3
2.2 PEPTIDE UND HORMONE 6
2.3 MASSENSPEKTROMETRIE 7
2.3.1 Allgemeines *7*
2.3.2 Triple-Quadrupole *10*
2.3.3 Ionenfallen *11*
2.3.4 Detektor *12*
2.3.5 Orbitrap-Massenspektrometer *13*
2.3.6 Massenspektrometrische Identifizierung und Charakterisierung von Peptiden *13*
2.3.7 Tandem-Massenspektrometrie und Fragmentierung von Peptiden *14*
2.4 IMMUNOAFFINITÄTSREINIGUNG 15
2.5 DER INSULIN-ÄHNLICHE WACHSTUMSFAKTOR-1 18
2.5.1 Eine Substanz – zwei Entdeckungen – viele Namen *18*
2.5.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen *20*
2.5.3 IGF-1-Analoga *22*
2.5.3.1 Des(1-3)IGF-1 22
2.5.3.2 R^3IGF-1 22
2.5.3.3 LONG™R^3IGF-1 25
2.5.4 Bildung und Physiologie von IGF-1 ..... *25*
2.5.5 Wachstumsrelevante Effekte von IGF-1 ..... *28*
2.5.6 Metabolische Effekte von IGF-1 ..... *30*
2.5.7 Rezeptor und Signalkaskade *31*
2.5.8 Anwendung und Pharmakologie von IGF-1 und seinen Analogen *32*
2.5.8.1 Humanes IGF-1 32
2.5.8.2 IGF-1-Analoga 35
2.5.9 IGF-1 und Doping *38*
2.5.9.1 IGF-1 als Biomarker für GH-Doping 38
2.5.9.2 rhIGF-1 und seine Analogen als direktes Doping-Agens 39
2.5.9.3 Gendoping 40
2.5.10 Die Analytik von IGF-1 ..... *41*
2.5.10.1 Allgemeines 41
2.5.10.2 Einflussfaktoren auf die Bestimmung von IGF-1 43
2.5.10.3 IGF-1 im Urin 53
2.5.10.4 IGF-1 als Marker für Doping mit GH 54
2.6 SYNTHETISCHES ACTH (SYNACTHEN®) 56
2.6.1 Biosynthese und Physiologie von ACTH *56*
2.6.2 Struktur und Wirkungsbeziehungen *57*

2.6.2.1 ACTH-Fragmente 59
2.6.2.2 Modifizierte Peptide 60
2.6.3 Anwendung und Pharmakologie von ACTH(-Derivaten) 61
2.6.3.1 Anwendung 62
2.6.3.2 Pharmakologie 63
2.6.4 ACTH und seine Derivate als Dopingmittel 67
2.6.4.1 Grundlagen für die Wirkung als Dopingmittel 67
2.6.4.2 Fälle (potenzieller) Synacthenanwendung im Sport 70
2.6.5 Die Analytik von ACTH / Synacthen® 70
2.6.5.1 Allgemeines 70
2.6.5.2 Einflussfaktoren auf die Bestimmung von ACTH und seinen Derivaten 71

3 EXPERIMENTELLER TEIL 75

3.1 BESTIMMUNG VON IGF-1 UND SEINEN ANALOGA IN PLASMA 75
3.1.1 Methodenentwicklung 75
3.1.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von IGF-1 und seinen Analoga mittels ESI-MS(/MS) 75
3.1.3 Standard- und Arbeitslösungen von IGF-1 und seinen Analoga 76
3.1.4 Wahl des Internen Standards (ISTD) 77
3.1.5 Vergleich verschiedener Arten der Dekomplexierung von hIGF-1 78
3.1.6 Flüssigkeitschromatographische Trennung 79
3.1.7 Immunoaffinitätsextraktion 79
3.1.7.1 Allgemeines 79
3.1.7.2 Immobilisierung von Antikörpern an oberflächenaktivierte Mikropartikel 82
3.1.8 Quantitative Bestimmung von humanem IGF-1 in Plasma mittels LC-ESI-MS(/MS) 82
3.1.8.1 Probenvorbereitung 82
3.1.8.2 LC-MS-Analytik 84
3.1.8.3 Methodenvalidierung 86
3.1.8.4 Vergleichsstudie 89
3.1.9 Qualitative Bestimmung von des(1-3)IGF-1 und LONG™R³IGF-1 in Plasma mittels LC-ESI-MS(/MS) 90
3.1.9.1 Probenvorbereitung 90
3.1.9.2 LC-MS-Analytik 90
3.1.9.3 Methodenvalidierung 91
3.1.10 Untersuchungen des alten (87/518) und neuen (02/254) Internationalen Referenzstandards für IGF-1 der WHO 95
3.1.11 Untersuchung von Schwarzmarktprodukten der IGF-1-Stoffgruppe 95
3.2 BESTIMMUNG VON SYNACTHEN® IN PLASMA 96
3.2.1 Methodenentwicklung 96
3.2.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von Synacthen® mittels ESI-MS(/MS) 96
3.2.3 Standard- und Arbeitslösungen Synacthen® 97
3.2.4 Wahl des Internen Standards 97
3.2.5 Flüssigkeitschromatographische Trennung 98

3.2.6 Immunoaffinitätsextraktion 98
3.2.7 Festphasenextraktion 99
3.2.8 Qualitative Bestimmung von Synacthen® in Plasma mittels LC-ESI-MS(/MS) 100
3.2.8.1 Probenvorbereitung 100
3.2.8.2 LC-MS-Analytik 100
3.2.8.3 Methodenvalidierung 102
3.2.8.4 Analyse von Proben einer Ausscheidungsstudie mit Synacthen® 104

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 105

4.1 IGF-1 UND SEINE ANALOGEN 105
4.1.1 Massenspektrometrische Charakterisierung mittels LTQ Orbitrap 105
4.1.1.1 Humanes IGF-1 106
4.1.1.2 Des(1-3)IGF-1 107
4.1.1.3 LONG™R³IGF-1 109
4.1.1.4 R³IGF-1 111
4.1.2 Massenspektrometrische Charakterisierung mittels API 4000 QTRAP 112
4.1.2.1 Humanes IGF-1 112
4.1.2.2 Humanes IGF-1 (reduziert) 116
4.1.2.3 Des(1-3)IGF-1 117
4.1.2.4 Des(1-3)IGF-1 (reduziert) 120
4.1.2.5 LONG™R³IGF-1 121
4.1.2.6 LONG™R³IGF-1 (reduziert) 125
4.1.2.7 R³IGF-1 126
4.1.2.8 R³IGF-1 (reduziert) 130
4.1.3 Vergleich verschiedener Arten der Dekomplexierung von hIGF-1 131
4.1.4 Flüssigkeitschromatographische Trennung 132
4.1.5 Immunoaffinitätsextraktion 134
4.1.6 Abschätzung des Arbeitsbereiches für humanes IGF-1 in biologischen Proben 139
4.1.7 Methodenvalidierung für die quantitative Bestimmung von hIGF-1 in Plasma 141
4.1.7.1 Linearität 141
4.1.7.2 Nachweisgrenze (LLOD) 142
4.1.7.3 Präzision am LLOD 143
4.1.7.4 Bestimmungsgrenze (LLOQ) 143
4.1.7.5 Präzision 143
4.1.7.6 Wiederholpräzision 144
4.1.7.7 Wiederfindung 144
4.1.7.8 Richtigkeit 145
4.1.7.9 Spezifität 145
4.1.7.10 Stabilität 146
4.1.8 Messung realer Plasmaproben und Vergleichsstudie 148
4.1.9 Methodenvalidierung für den qualitativen Nachweis von des(1-3)IGF-1 und LONG™R³IGF-1 in Plasma 152
4.1.9.1 Linearität 152
4.1.9.2 Nachweisgrenze (LLOD) 153

4.1.9.3 Präzision am LLOD und bei höherer Konzentration 155
4.1.9.4 Wiederfindung 156
4.1.9.5 Spezifität 156
4.1.9.6 Stabilität 157
4.1.10 Untersuchung des alten (87/518) und neuen (02/254) Internationalen Referenzstandards für IGF-1 der WHO 158
4.1.11 Untersuchung von Schwarzmarktprodukten 163
4.2 SYNACTHEN® 167
4.2.1 Massenspektrometrische Charakterisierung mittels LTQ Orbitrap 167
4.2.1.1 Synacthen® 167
4.2.1.2 SynVL 170
4.2.1.3 Humanes ACTH 172
4.2.2 Massenspektrometrische Charakterisierung mittels API 4000 QTRAP 174
4.2.2.1 Synacthen® 174
4.2.2.2 Maus-ACTH 176
4.2.3 Flüssigkeitschromatographische Trennung 180
4.2.4 Methodenvalidierung für den qualitativen Nachweis von Synacthen® in Plasma 183
4.2.4.1 Linearität 183
4.2.4.2 Wiederfindung 184
4.2.4.3 Nachweisgrenze (LLOD) 184
4.2.4.4 Präzision am LLOD und bei höherer Konzentration 185
4.2.4.5 Spezifität 185
4.2.4.6 Stabilität 186
4.2.5 Analyse von Proben einer Ausscheidungsstudie mit Synacthen® 192

5 ZUSAMMENFASSUNG / AUSBLICK 195

6 ANHANG 199

6.1 STATISTISCHE KENNGRÖßEN 199
6.1.1 Standardabweichung (SD): 199
6.1.2 Variationskoeffizient (CV): 199
6.1.3 Anpassungstest (Test auf Linearität) nach MANDEL: 199
6.2 CHEMIKALIEN UND REFERENZMATERIALIEN 201
6.3 THE RCM BEYNON PRIZE 202

7 LITERATURVERZEICHNIS 203

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
CE	Kollisionsenergie
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
CS	Corticosteroid
DP	Declustering Potential
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray Ionisation
FAB	Fast Atom Bombardement
GH	Wachstumshormon
IAE	Immunoaffinitätsextraktion
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
IOC	Internationales Olympisches Kommitee
IRMA	Immunoradiometrischer Assay
ISTD	Interner Standard
LIT	Lineare Ionenfalle
LLOD	Verfahrensnachweisgrenze
LLOQ	Verfahrensbestimmungsgrenze
mAK	Monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation
MGF	Mechano Growth Factor
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MSIA	Massenspektrometrischer Immunoassay
pAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-Gepufferte Saline
rhIGF-1	Rekombinantes humanes IGF-1
RIA	Radioimmunoassay
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Festphasenextraktion
SST	Standard-Synacthen®-Test
WADA	Welt Anti-Doping Agentur
WHO	Weltgesundheitsbehörde