

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen

Institut für Pathologie und Neuropathologie

Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie
und Pathologische Anatomie

**Entwicklung und Validierung einer effektiven Methode
zur Bestimmung des Insulin-ähnlichen
Wachstumsfaktors II aus Trockenblutproben**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Epple, Claudia Sibylle

2018

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Klingel

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Wolz

Tag der Disputation: 14.11.2018

Für meine Familie

allen voran meinen Eltern und Großeltern für ihre Unterstützung
und den Glauben an mich

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Zielsetzung der Arbeit.....	1
1.2 Historischer Exkurs	1
1.3 Die Insulin-like Growth Factor (IGF) Familie	1
1.3.1 IGF-I	3
1.3.2 IGF-II	4
1.3.3 Insulin-like Growth Factor binding protein (IGFBP) 1–6	9
1.3.4 Die IGF-Rezeptoren	11
1.3.4.1 IGF1-Rezeptor (IGF1-R)	11
1.3.4.2 Insulinrezeptor-A (IR-A) und Insulinrezeptor-B (IR-B)	12
1.3.4.3 IGF2-Rezeptor (IGF2-R)	12
1.3.4.4 Insulinrezeptor.....	12
1.4 Dried Blood Spots (DBS)	13
1.4.1 Neugeborenen Screening	13
1.4.2 Weitere Anwendungsbereiche von DBS	13
1.4.3 Vor- und Nachteile von DBS	14
1.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	15
1.5.1 Testprinzip des IGF-II-ELISA E30	16
1.6 Fragestellung der Dissertation	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 IGF-II ELISA E30	18
2.1.2 Weitere Reagenzien	19
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.4 Geräte	20

2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Vorbereitung und Ablauf des IGF-II ELISA E30	20
2.2.2 Testprinzip	21
2.2.3 Testdurchführung	21
2.2.4 DBS-Probenvorbereitung	22
2.3 Vorversuche zur Entwicklung der Methode.....	22
2.3.1 Bestimmung der Probenverdünnung und Extraktionszeit	22
2.3.2 Einfluss von Temperatur und Umdrehungsfrequenz	23
2.4 Testvalidierung	24
2.4.1 IGF-II Gewinnung aus Filterpapier- und korrespondierenden Plasmaproben	24
2.4.2 Ermittlung der Probenstabilität	24
2.4.3 Triacylglyceride (TAG)	25
2.4.4 IGF-II-Recovery	25
2.4.5 Kreuzreaktivität des IGF-II ELISA E30	25
2.4.6 Inter- und Intra-Assay-Varianz	26
2.4.7 Analytische Sensitivität und Linearität	26
2.5 Statistik	27
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Methodenvoraussetzungen.....	29
3.1.1 Extraktionszeit und optimale Probenverdünnung	29
3.1.2 Variation der Schüttelfrequenzen	31
3.1.3 Einfluss der Extraktionstemperaturen	33
3.2 IGF-II Gewinnung aus Plasma- vs. DBS-Proben	34
3.2.1 Passing-Bablok Regressionsanalyse	34
3.2.2 Bland-Altman-Plot	38
3.3 Probenstabilität	39
3.4 Einfluss von Triacylglyceriden auf die IGF-II Messung aus DBS	40
3.5 ELISA Validierung.....	41
3.5.1 Inter- und Intra-Assay-Varianz	42
3.5.2 Sensitivität und Linearität	43
3.5.3 IGF-II Recovery	48

3.5.4 IGF-II Kreuzreaktivität	49
4 Diskussion	52
4.1 Relevanz der Untersuchungen	52
4.2 IGF-II Dysregulationen: Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext	52
4.2.1 Fetale Dysregulation	52
4.2.2 Adulte Dysregulation	54
4.3 Missbrauch von Wachstumshormon und dessen Auswirkungen auf das IGF System	56
4.4 Diskussion der eigenen Ergebnisse	56
4.4.1 IGF-II Gewinnung aus DBS	56
4.4.2 Störeffekte auf DBS	58
4.4.2.1 Interferenzen in DBS	58
4.4.2.2 Limitation des Testverfahrens bzgl. des Hämatokritwertes	60
4.4.3 ELISA E30 Leistungsdaten	61
4.4.3.1 Präzision und Reproduzierbarkeit im ELISA E30	61
4.4.3.2 Kreuzreaktivitäten im ELISA E30	64
4.5 Ausblick	65
4.6 Schlussfolgerung	65
5 Zusammenfassung	68
6 Literaturverzeichnis	70
7 Erklärung zum Eigenanteil	81
8 Danksagung	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Abhängigkeit der IGF-II Konzentration von der Extraktionszeit (n = 10).....	29
Abbildung 2 Variation der Schüttelfrequenzen (n = 3).....	31
Abbildung 3 Einfluss der Extraktionstemperaturen auf die gelösten IGF-II Konzentrationen (n = 6).....	33
Abbildung 4 Vergleich der IGF-II Konzentration in Plasma- und Filterpapierproben mittels Passing-Bablok Regressionsanalyse (n = 62).....	34
Abbildung 5 Bland-Altman-Plot (n = 62).....	38
Abbildung 6 DBS-Stabilität in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur bezogen auf Tag 0 (n = 3 pro Tag und Temperatur).....	40
Abbildung 7 Triacylglyzerid Einfluss auf die IGF-II Konzentration (n = 3).....	41
Abbildung 8 Linearität der Plasmaproben 1–32.....	44
Abbildung 9 Linearität der Plasmaproben 33–62.....	46
Abbildung 10 Linearität der Filterpapierproben 1–32.....	47
Abbildung 11 Linearität der Filterpapierproben 33–62.....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 IGF-II induzierte Tumore bei Non-islet-cell tumor hypoglycemia; sinngemäß nach (Dynkevich et al. 2013)	6
Tabelle 2 enthaltene Materialien im ELISA E30 Kits	18
Tabelle 3 weitere Reagenzien	19
Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 5 Geräte	20
Tabelle 6 Temperatur- und Umdrehungsfrequenz	23
Tabelle 7 Kreuzreaktivität	26
Tabelle 8 IGF-II Serumkonzentrationen in ng/ml (Blum und Schweizer 2003 in Ranke MB (Hrsg.): Diagnostics of endocrine function in children and adolescents. Basel, Karger, 2003, pp 166-199)	28
Tabelle 9 Verdünnungseinfluss auf die IGF-II Extraktion aus DBS (n = 9)	30
Tabelle 10 Extraktionseffizienz bei 0 vs. 350 rpm in Bezug auf die Sollkonzentration (n = 19)	32
Tabelle 11 statistische Auswertung der Passing-Bablok Regressionsanalyse .	35
Tabelle 12 statistische Auswertung des Bland-Altman-Plots	39
Tabelle 13 Inter-Assay-Varianz (n _{Proben} = 3 bei n _{Assays} = 5)	42
Tabelle 14 Intra-Assay-Varianz (n = 5)	42
Tabelle 15 Statistik der Linearität der Plasmaproben 33–62	45
Tabelle 16 Statistik der Linearität der Filterpapierproben 33–62	48
Tabelle 17 IGF-II Recovery (n = 3)	49
Tabelle 18 Kreuzreaktivität mit IGF-I	50
Tabelle 19 Kreuzreaktivität mit C-Peptid	50
Tabelle 20 Kreuzreaktivität mit Insulin	51

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
ALS	acid-labile subunit
BWS	Beckwith-Wiedemann syndrome
CI	Konfidenzintervall
Da	Dalton
DBS	Dried Blood Spots
EK	Enzymkonjugat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GH	Growth Hormone
GHRH	Growth-Hormone-Releasing-Hormone
HWZ	Halbwertszeit
IGF1-R	IGF1-Rezeptoren
IGF2-R	IGF2-Rezeptor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor binding protein
IGF-I	Insulin-like Growth Factor-I
IGF-II	Insulin-like Growth Factor-II
IR-A	Insulinrezeptor-A
IR-B	Insulinrezeptor-B
IRS-1	Insulin-related Substrate-1
IRS-2	Insulin-related Substrate-2
kDa	Kilodalton
KS 1	Kontrollserum 1
KS 2	Kontrollserum 2
LOI	loss of imprinting
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTP	Mikrotiterplatte
NIBSC	National Institute for Biological Standard and Control
NICTH	Non-islet-cell tumor hypoglycemia

PI3-Kinase.....	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-4,5-trisphosphat</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat</i>
PP	<i>Probenpuffer</i>
PSA.....	<i>prostataspezifisches Antigen</i>
$R^2_{\text{korr.}}$	<i>korrigiertes Bestimmtheitsmaß</i>
Ras-Raf-MAPK.....	<i>Ras-Raf-mitogen-aktivierte-Proteinkinase</i>
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
rpm.....	<i>revolutions per minute</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
RTK	<i>Tyrosin-Kinase-Rezeptor</i>
RXR α	<i>Retinoid X Rezeptor</i>
S	<i>Substrat</i>
SD	<i>standard deviation</i>
Shh.....	<i>Sonic hedgehog</i>
SL.....	<i>Stopplösung</i>
STD	<i>Standard</i>
T 	<i>Teststatistik</i>
t	<i>kritischer Wert</i>
TAG.....	<i>Triacylglyzerid</i>
TMS.....	<i>Tandem-Massenspektrometrie</i>
TSH	<i>thyreoidea-stimulierendes Hormon</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines schnellen, jederzeit verfügbaren und kostengünstigen Verfahrens zur Bestimmung des Insulin-like Growth Factors-II (IGF-II), zu deutsch Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-II, aus Dried Blood Spots (DBS), auch Trockenblutproben genannt. Als bewährte Testsysteme zur Bestimmung von IGF-II werden seit Jahren Immunassays angewendet. Mit diesen können IGF-II Konzentrationen in Serum- und Plasmaproben gemessen werden. Aufgrund der zunehmenden wissenschaftlichen Bedeutung von IGF-II hinsichtlich des Nachweises von fetalem und onkogenem Wachstum von Körperzellen sowie neurologischen Wirkungen (Livingstone 2013; Livingstone und Borai 2014), erscheint die Vereinfachung und Erweiterung des bisherigen Anwendungsspektrums zur Bestimmung von IGF-II sinnvoll. Hierzu ist die Optimierung von Puffersystemen, Extraktionszeiten, Temperaturabhängigkeiten und Lagerbedingungen unabdingbar. Nach der erfolgreichen Methodenoptimierung soll die Validierung vorgenommen werden.

1.2 Historischer Exkurs

In den 1950er Jahren begannen wissenschaftliche Untersuchungen zur Bedeutung und Funktion des menschlichen Growth Hormone (GH). Diese Arbeiten führten unter anderem zur Identifizierung zweier Peptidhormone. Salmon und Daughaday (1957) beschrieben erstmalig den Insulin-like Growth Factor I (IGF-I). Viele Jahre später konnte auch IGF-II in seiner Funktion und Wirkungsweise nachvollzogen werden (Daughaday et al. 1972).

1.3 Die Insulin-like Growth Factor (IGF) Familie

Bei IGF-I und -II handelt es sich um Peptidhormone, die strukturell ähnlich aufgebaut sind wie Insulin, d.h. sie leiten sich von einem gemeinsamen

Vorläufer-Gen ab. Beide IGFs stimmen in den Aminosäurepositionen 1 bis 29 mit der B-Kette und in den Positionen 42 bis 62 mit der A-Kette von Insulin überein. Daraus ergibt sich, dass 40% der Aminosäuren homolog sind (Rinderknecht und Humbel 1978a; Rinderknecht und Humbel 1978b; Weimann und Kiess 1990; Zapf und Froesch 1986). Da im Unterschied zu Insulin bei den IGFs das C-Peptid nicht abgespalten wird, bestehen IGFs lediglich aus einer Peptidkette (Deutzmann 2016). Weitere Bestandteile des Systems sind IGF-Bindungsproteine (IGFBP-1-6), IGF- und Insulin-Rezeptoren sowie spezifische Enzyme zur Signalübertragung (Weimann und Kiess 1990). IGFs werden sowohl prä- als auch postnatal exprimiert, wobei das pränatale Wachstum beider IGFs nicht von GH reguliert wird (Behrends 2017; Deutzmann 2016). Die pränatale Regulation von IGF-I ist plazentalaktogen induziert, wohingegen der Mechanismus der IGF-II Regulation immer noch ungeklärt ist (Piper 2013). Nahezu alle Gewebe können IGFs produzieren. Den größten Anteil von 75% der Produktion übernimmt beim IGF-I die Leber in Abhängigkeit vom Ernährungsstatus und dem GH-Spiegel (Hammerman et al. 1992; Roberts et al. 1987). Im Blut zirkuliert lediglich 1% der IGFs frei, die übrigen 99% sind an IGFBP 1-6 gebunden. Durch diese Verteilung verlängert sich die Halbwertszeit (HWZ) von knapp zehn Minuten auf mehrere Stunden, wodurch die Bioverfügbarkeit von IGFs reguliert und der Transport zur Zielzelle ermöglicht wird (Doenecke und Karlson 2005). Wie bereits die Nomenklatur vermuten lässt, haben IGFs durch Bindung an IGF1- und Insulinrezeptoren insulinähnliche Effekte, wie beispielsweise die zelluläre Aufnahme von Glukose und Aminosäuren, Zellvermehrung sowie Glykogenese und Lipogenese. Im Gegensatz dazu sind die Wirkungen auf die Zelldifferenzierung und -proliferation, sowie apoptotische Mechanismen IGF spezifisch (Ranke et al. 2009).

Nachweisbar sind die IGFs in der Lymphe (Cohen und Nissley 1975), im cerebralen Liquor (Aberg et al. 2015), in den Follikeln der Ovarien sowie in Sperma (Adashi et al. 1985; Drescher B. et al. 1997), im Speichel (Costigan et al. 1988) und in der Muttermilch (Baxter et al. 1984; Costigan et al. 1988). Darüber hinaus kann IGF-I im Urin (Hizuka et al. 1987) und IGF-II bei malignen Erkrankungen im Tumorgewebe (Li et al. 1998) nachgewiesen werden.

Die Wirkungsweise der IGFs sind vielfältig: Die Leber sezerniert IGFs endokrin, wohingegen im Knochen lokal in der Wachstumsfuge IGF gebildet wird und auf parakrinen Wegen wirkt. Demzufolge sind IGFs am Wachstum des Skeletts, der inneren Organe und der Muskeln beteiligt (Deutzmann 2016). Die autokrine Wirkungsweise kann in Tumoren nachgewiesen werden: Endogen produzierte IGFs stimulieren über gleichzeitig exprimierte IGF1-Rezeptoren (IGF1-R) das maligne Wachstum (Hoeflich et al. 2006).

1.3.1 IGF-I

IGF-I hat ein Molekulargewicht von 7649 Dalton (Da) und besteht aus 70 Aminosäuren, die über drei Disulfidbrücken zur Sekundärstruktur verknüpft sind. Das codierende Gen für IGF-I ist auf Chromosom 12 lokalisiert (Rinderknecht und Humbel 1978a; Rinderknecht und Humbel 1978b; Weimann und Kiess 1990). Postnatal ist IGF-I GH abhängig und wird zeitlebens produziert (Behrends 2017; Deutzmann 2016). Der Referenzbereich für IGF-I beim Menschen variiert alters- und geschlechtsabhängig stark. Die Werte liegen bei Frauen etwas höher als bei Männern (Daughaday und Rotwein 1989). Es gilt, dass die Konzentration bis zum Pubertätsgipfel ansteigt. Hier erreicht sie, hormonell bedingt, ihren Höhepunkt und fällt anschließend kontinuierlich ab (Clemmons und Van Wyk 1984).

IGF-I spielt insbesondere postnatal eine wichtige Rolle für die Zellteilung und Differenzierung. Durch einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert IGF-I zusammen mit anderen Hormonen, wie z.B. Ghrelin, die Sekretion von Somatoliberin, das auch als Growth-Hormone-Releasing-Hormone (GHRH) bezeichnet wird (Behrends 2017). Dahingegen stimuliert Somatotropin die Produktion von IGF in Leber und Knochen. Auch das Gehirn und viele andere Gewebe bilden IGFs. Hauptsächlich üben IGFs ihre Funktion lokal als Gewebshormone aus (Doenecke und Karlson 2005; Carlsson-Skwirut et al. 1986). IGF-I stimuliert das Längenwachstum durch Proliferation von Chondrozyten in der epiphysären Wachstumszone. Des Weiteren verstärkt IGF-I zelluläre Funktionen und inhibiert den programmierten Zelltod (Blum et al. 2011).

Bei pathologisch erhöhten IGF-I Werten zeigt sich im Kindes- und Jugendalter das Krankheitsbild des Riesenwachstums. Im Erwachsenenalter, nach Schluss der Epiphysenfuge, kommt es zum Krankheitsbild der Akromegalie (Schatz et al. 1983; Schulz et al. 2015). Ein verminderter IGF-I Blutspiegel, bei normaler Hypophysenfunktion, verursacht phänotypisch Kleinwuchs (Backeljauw und Underwood 2001). Ursachen für einen IGF-I Mangel sind: Unterernährung bzw. ausgedehntes Fasten, Leber- oder Niereninsuffizienz sowie Hypothyreose (Ranke et al. 2009).

1.3.2 IGF-II

IGF-II ist ein saures Polypeptid und besteht aus 67 Aminosäuren und einer Molmasse von 7471 Dalton (Weimann und Kiess 1990). Das IGF 2-Gen wird auf Chromosom 11 codiert und liegt zwischen dem Insulin- und dem H19-Gen (O'Dell und Day 1998; Sussenbach et al. 1992). Die Expression des IGF 2-Gens wird ausschließlich durch das väterlich vererbte Allel vermittelt. Das maternale Allel ist durch spezifische Methylierung dem Imprinting unterlegen (DeChiara et al. 1991). Die Folgen einer Dysregulation dieses Mechanismus werden zu einem späteren Zeitpunkt ausführlicher erläutert (siehe 1.3.2 Loss of imprinting).

Die Primärstruktur von IGF-I und II ist zu 67% homolog. Im Gegensatz zu IGF-I benötigt IGF-II zur postnatalen Bildung nur geringste GH-Mengen. Eine GH Zunahme bewirkt eine IGF-I Erhöhung, wohingegen die IGF-II Konzentration unverändert bleibt, d.h. GH unabhängig arbeitet (Leroith et al. 1991; Horn 2009). Physiologische Serumkonzentrationen zwischen 521–873 ng/ml (Dynkevich et al. 2013) werden rasch in den ersten Lebensjahren erreicht und stabilisieren sich auf diesem Niveau. Erst im höheren Alter kann ein langsamer Abfall bemerkt werden (Yu et al. 1999; Raynaud-Simon 2003). Hierbei gibt es keine Unterschiede bei den Geschlechtern.

Während der Embryonalentwicklung können große Mengen von IGF-II messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) in Leber, Skelettmuskulatur, Knochen und Haut nachgewiesen werden. Wohingegen im Hypothalamus, Gehirncortex, Hirnstamm (Haselbacher et al. 1985) und Thymus nur geringe Mengen nachweisbar sind (Han et al. 1988; Rotwein et al. 1988).

Die IGF-II Wirkungen sind nicht nur in der pränatalen Entwicklung festzustellen, sondern auch postnatal zu beobachten. Einige Beispiele werden nachfolgend aufgeführt. IGF-II ist an der Muskelentwicklung beteiligt: Dies zeigt sich bei der MyoD-induzierten Differenzierung eines Myoblasten zu einem Myozyten: Über IGF-II Bindung an den IGF1-Rezeptor kommt es zur Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) und des Akt-Signalweges. Folge ist die MyoD-induzierte Proliferation und Differenzierung (Wilson et al. 2003). Bei der Knochenentwicklung wird IGF-II verstärkt exprimiert und vermittelt dadurch pränatal im Knochen Proliferation und Differenzierung. Postnatal hält es das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau aufrecht. Damit ist IGF-II der am meisten von Osteoblasten gebildete Wachstumsfaktor des Menschen (Jehle 2001). Das enge Zusammenspiel von Knochenwachstum und IGF-II wird deutlich, weil bei der Einnahme von Cortison eine IGF-II Abnahme mit gleichzeitiger Reduktion der Knochenmasse assoziiert ist (Minuto et al. 2005).

Neueste Erkenntnisse an Mäusen beschreiben auch neurologische Wirkungen von IGF-II. Hierbei wurde die medikamentöse Ketaminbehandlung und deren Auswirkungen auf depressives Verhalten erforscht. Beobachtungen ergaben, dass es innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ketamingabe zu einer Erhöhung der IGF-II mRNA Bildung im Hippochampus kommt. Die dadurch erhöhten IGF-II Spiegel beeinflussen den antidepressiven Effekt von Ketamin positiv (Grieco et al. 2017).

Neben den vielfältig beschriebenen fetalen und postnatalen Einflüssen spielt IGF-II als onkogener Wachstumsfaktor eine wesentliche Rolle. Hierauf wird im Folgenden genauer eingegangen. Zunächst soll Tabelle 1 einen Überblick über bekannte Tumore mit IGF-II induzierter Hypoglykämie geben:

Tabelle 1 IGF-II induzierte Tumore bei Non-islet-cell tumor hypoglycemia; sinngemäß nach (Dynkevich et al. 2013)

IGF-II induzierte Non-islet-cell tumor hypoglycemia (<i>NICTH</i>)	
Epithelialen Ursprungs	Hepatozelluläres/adrenocorticales Karzinom, Magenkarzinom
Mesenchymalen Ursprungs	Fibrosarkom, Fibrom, Mesotheliom, Hämangiosarkom/- endotheliom/- perizytom, Leukämie, Lymphom, Lymphosarkom, Myelom
Andere	Rhabdomyosarkom, Liposarkom, Neurofibrom, Neurofibrosarkom, Histiozytom, Neuroblastom, mesoblastisches Nephrom, Schwannom, Meningiom, klarzelliges Beckensarkom, retikuläres Zellsarkom

Tumore mit ↑ IGF-II Serumkonzentration:	
	Leberzellkarzinom
	Mammakarzinom
	Ovariakarzinom
	Endometriumkarzinom
	Prostatakarzinom

Trojan et al. (2006) nutzten die IGF-II-Konzentrationsbestimmung in Studien zur Untersuchung von Prostataerkrankungen im Vergleich zum prostataspezifischen Antigen (PSA). Eine IGF-II Erhöhung korreliert mit der Diagnose maligner Prostatakarzinome. Bei benignen Prostatahyperplasien sind die Werte nicht oder nur gering gesteigert. Selbiges Ergebnis gilt für PSA. Ebenso ermöglicht die Bestimmung der IGF-II-Konzentration eine Aussage über die Progression der Karzinomentwicklung. Aggressive Tumorgenese und ein erhöhtes

Metastasierungsrisiko korrelieren mit einem gesteigerten IGF-II Spiegel im Serum (Guo et al. 2003; Trojan et al. 2006).

Darüber hinaus zeigen eine Vielzahl IGF-II assoziierter Tumore dasselbe Symptom: Hypoglykämie ohne erhöhten Insulinspiegel. Tumore mit dieser Eigenschaft werden unter dem Begriff Non-islet-cell tumor hypoglycemia (NICTH) zusammengefasst. Typisches Kennzeichen der NICTH sind eine tumoröse Überproduktion von IGF-II und seltener auch big IGF-II (15 kDa). Unter der Bezeichnung big IGF-II versteht man ein Prohormon des IGF-II. Als Überbegriff aller IGF-II sezernierenden Tumoren wird der Begriff IGF-2-oma eingesetzt. Die Abkürzung „oma“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet Tumor oder Geschwulst. Bei IGF-2-oma handelt es sich im Regelfall um mesenchymale (Ron et al. 1989) und epitheliale Tumore wie Fibrosarkome, Hepatome, Nebennierentumore und Karzinoide. Big IGF-II bindet in stoffwechselaktiven Geweben, wie z.B. in Tumorgeweben an Insulinrezeptoren und erhöht dadurch den Glukoseverbrauch. Folge des gesteigerten Verbrauchs ist die Entwicklung einer Hypoglykämie. Darüberhinaus kann big IGF-II über den IGF1-Rezeptor in Hypophyse und Pankreas die GH- und Insulinsekretion unterdrücken. Durch den daraus resultierenden IGF-I- und GH-Abfall, wird die IGFBP Konzentration verändert. IGFBP-3 sowie acid-labile subunit (ALS) werden weniger und IGFBP-2 verstärkt synthetisiert. Damit kommt es zu einer Verschiebung der ternären und binären IGFBP-Komplexe. Infolgedessen ändern sich die Bindungsaffinitäten, sodass big IGF-II vermehrt an Insulin- und IGF2-Rezeptoren bindet, der Glukoseverbrauch steigt (Ranke und Binder 2001). Bedingt durch den steigenden Glukoseverbrauch fällt der Glukosespiegel im Blut ab. In physiologischer Hinsicht resultiert daraus ein Anstieg der Ketonproduktion, um die Energiezufuhr im Organismus – insbesondere im Gehirn – zu gewährleisten (Cahill, JR et al. 1966). Tumorassoziierte Hypoglykämien führen durch Rezeptoraktivierung nicht zum Ketonanstieg, der Energiemangel vergrößert sich. Folgeerscheinungen des Energiemangels im Gehirn äußern sich durch Verwirrtheit oder Amnesie und können bis zum Tod führen (Fukuda et al. 2006; Cryer 2007). Therapeutische Maßnahmen von IGF-2-oma liegen in der operativen Tumorreduktion. Auf diese Weise wird die IGF-II Menge, die das

Wachstum ermöglicht, vermindert (Ranke und Binder 2001; Shlosberg et al. 2011; Ron et al. 1989; Allolio und Schulte 2010). Eine vollständige Tumorentfernung ist selten möglich, da Tumormassen von mehreren Kilogramm keine Ausnahme darstellen (Dynkevich et al. 2013). Teale und Marks (1998) konnten, durch regelmäßige Mahlzeiten und medikamentöse Glukokortikoid- und GH-Gabe, erfolgreiche Therapien durchführen.

Bei zahlreichen Erkrankungen ist eine starke IGF-II Überexprimierung nachgewiesen worden. Verantwortlich dafür ist, wie bereits weiter oben erwähnt, das loss of imprinting (LOI). LOI bewirkt, dass für das maternale Gen die Inaktivierung verloren geht und das IGF 2-Gen biallelisch exprimiert, d.h. überexprimiert wird (Kuemmerle 2012). Zu den Erkrankungen, denen ursächlich LOI zugrunde liegt, wird auch das Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) gezählt. BWS äußert sich phänotypisch in fetalem und neonatalem Riesenwuchs und wird mit einem erhöhten Risiko für Krebs im Kindesalter assoziiert (Morison und Reeve 1998). LOI ist ebenfalls in annähernd 90% der Fälle ein Auslöser für Wilms Tumore. Diese sind maligne embryonale Nierentumore und werden als Nephroblastom bezeichnet (Ravenel et al. 2001). LOI ist ebenfalls bei Hepatoblastomen, Rhabdomyosarkomen, Chorionkarzinomen, Lungen-, Gebärmutterhals- und Hodenkrebs zu beobachten (Li et al. 1998; McCann et al. 1996).

Eine verstärkte IGF 2-Gen Expression ist auch bei einer Mutation des Sonic hedgehog (Shh) Gens zu beobachten. Diese Mutation wirkt sich auf die Transkription des IGF 2-Gens aus. Hierbei kommt es ausgehend von Shh zu einer Coexpression von IGF-II und daraus folgernd wird die Tumorgenese induziert. Shh selbst entspricht einem angiogenen Faktor. Auch kann Shh den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) aktivieren. Insbesondere bei Kindern entwickeln sich oft durch ein erhöhtes IGF- II Vorkommen, Medulloblastome und Rhabdomyosarkome (Ingram et al. 2002; Hahn et al. 2000). Durch die verstärkte Vaskularisierung und IGF-II Bildung fördert Shh maßgeblich das Tumorwachstum.

1.3.3 Insulin-like Growth Factor binding protein (IGFBP) 1–6

Bei den IGFBPs handelt es sich um sechs Trägerproteine, die die IGFs im Serum mit einer 2- bis 50-fach höheren Affinität binden, als dies beim IGF1- Rezeptor der Fall ist. Aufgebaut sind die IGFBPs aus drei unterschiedlichen Domänen: N-Terminus, Linker und C-Terminus (Chao und D'Amore 2008). Durch Wechselwirkungen der N- und C-Termini der IGFBPs mit den IGFs, kommt es zur IGF-Rezeptorbindung. Dadurch werden die IGF-Aktivitäten behindert (Forbes et al. 2012). Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeiten unterscheiden sich die IGFBPs deutlich in ihren Aufgaben (Chao und D'Amore 2008). Clemmons (1997) beschreibt die Eigenschaften wie folgt:

- IGFBP-1: physiologische Werte stimulieren die IGF-I Aktivität; Überschüsse inhibieren die mitogenen und insulinähnlichen Aktivitäten von IGF-I und II
- IGFBP-2: reguliert die Aktivität von IGFs; inhibiert die IGF induzierte DNA Synthese
- IGFBP-3: ist Hauptträgerprotein aller IGFs im Serum sowie wichtigster Vermittler der endokrinen Vorgänge; steigert die IGF Aktivitäten
- IGFBP-4: einziges Protein, das die IGF Vorgänge durchgängig inhibiert; Expression ist gewebeabhängig
- IGFBP-5: inhibiert die IGF-I abhängige DNA-Stimulation; assoziiert mit der extrazellulären Matrix, wird die Affinität des Bindungsproteins vermindert und folglich die IGF Aktivität gesteigert
- IGFBP-6: bindet hauptsächlich IGF-II und wirkt auf diese Weise im Körper regulierend bei der Zellproliferation und Differenzierung sowie antiapoptotisch

Die Ausführungen verdeutlichen die Bedeutung der IGFBPs als Regulatoren der IGF-Bioverfügbarkeit.

Im Blutkreislauf liegen 75% der IGFs als ternäre Komplexe von 150 Kilodalton (kDa) vor. Diese Komplexe bestehen aus IGF-I oder -II, IGFBP-3 (53 kDa), seltener auch IGFBP-5 und ALS (85kDa). IGFBP-3 und ALS werden GH abhängig zum größten Teil von der Leber synthetisiert (Firth und Baxter 2002;

Baxter 2001; Ranke und Binder 2001; Isermann et al. 2001). Diese Komplexe können das Kapillarendothel nicht passieren. Des Weiteren gibt es 25% binäre Komplexe, bestehend aus IGFs und IGFBP-1/-2/-4/-5 oder -6. Diese sind mit 40– 50 kDa kleiner als die ternären Komplexe und so deutlich flexibler. Sie können das Kapillarendothel passieren (Juul 2003; Lewitt et al. 1994).

Für die Regulierung der IGFBPs gibt es verschiedene Proteasen, wie z.B. Plasmin, Metallomatrixproteasen. Diese spalten die IGFBPs und setzen IGFs aus den Komplexen frei (Jehle 2001). Auf diese Weise können frei gewordenen IGFs lokal eine Proliferation bewirken (Püschel 2011).

IGFBP-3 spielt eine wichtige Rolle für den menschlichen Organismus. Nach den ersten Lebenswochen hat es die höchste Konzentration in der Zirkulation. Da 80% der IGFs an IGFBP-3 binden, reguliert dieses die Bioverfügbarkeit der IGFs maßgeblich. IGFBP-3 dient mit einer molaren Masse von 28,1 kDa und der Fähigkeit zur Komplexbildung als Speicher und zirkulierendes IGF-Lager (Martin und Baxter 1986; Firth und Baxter 2002; Baxter 1988). Darüber hinaus ist inzwischen die apoptotische Wirkung von IGFBP-3 gesichert (Jogie-Brahim et al. 2009).

IGFBP-1 bis -5 haben nahezu die gleichen Bindungsaffinitäten für IGF-I und IGF- II (Siwanowicz et al. 2005). Hiervon weicht IGFBP-6 mit einer 20 bis 100-fach höheren Affinität für IGF-II stark ab. Verantwortlich für die gesteigerte Affinität ist die NN-Subdomäne (Sitar et al. 2006; Chandrashekar et al. 2007), die als Bindungsregion dient. Es kommt zur Bindung von IGFBP-6 mit IGF-II. Die IGF-II Bioverfügbarkeit und das IGF-II abhängige Tumorwachstum werden vermindert (Headey et al. 2004).

Neben den beschriebenen Wirkungsweisen sind auch IGF-unabhängige Vorgänge von IGFBPs nachgewiesen (Jones et al. 1993; Wheatcroft und Kearney 2009). Unter anderem ist es möglich, dass IGFBPs selbst als Hormone wirken. Außerdem konnten membrangebundene Rezeptoren für IGFBP-3 und -5 nachgewiesen werden. Durch einen Importin- β -abhängigen Mechanismus gelangen IGFBP-3 und -5 in den Zellkern. Innerhalb des Kerns interagiert

IGFBP-3 mit dem Retinoid-X-Rezeptor α (RXR α). Hierbei handelt es sich um einen Kernrezeptor, sodass IGFBP-3 durch die Interaktion direkt an der Entwicklung von Transkriptionseinheiten beteiligt ist und die Gen-Transkription in Gang setzt (Blum et al. 2011).

IGFBP-2, -3, -5 und -6 können kernlokalisiert auftreten und auf diese Weise IGF-unabhängig Genexpression und Zellsignale vermitteln (Xu et al. 2004; Miyako et al. 2009; Lee et al. 2011; Azar et al. 2011).

1.3.4 Die IGF-Rezeptoren

1.3.4.1 IGF1-Rezeptor (IGF1-R)

Hauptsächlich wirken IGFs durch den IGF1-R, der zu 85% homolog zum Insulinrezeptor ist. Hierdurch vermitteln IGFs Zellproliferation, Differenzierung und Stoffwechselprozesse (Denley et al. 2005; Deutzmann 2016). Die höchste Affinität hat der Rezeptor für IGF-I. Die Affinität nimmt für IGF-II und noch mehr für Insulin ab. Der IGF1-R wird, ebenso wie der Insulinrezeptor, zur Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (RTK) gezählt. Es handelt sich um einen membranständigen Hormonrezeptor. Sowohl der Insulinrezeptor, als auch der IGF1-R werden als Rezeptor-Subfamilie bezeichnet. Sie unterscheiden sich in Struktur und Funktion von den übrigen RTKs. In den Zellen liegen diese Typ-I-Rezeptoren bereits ligandenunabhängig als Homo- oder Heterodimere vor. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten mit je einer α - und einer β -Kette, die durch drei Disulfidbrücken verbunden sind. Die α -Kette liegt extrazellulär, während die β -Kette die Membran durchzieht und in das Zellinnere ragt. Durch Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors, indem sich die α - und β -Ketten einander annähern. Es resultiert eine Autophosphorylierung durch die in der β -Kette enthaltene Tyrosinkinase. Anschließend werden 185 kDa schwere Insulin-related Substrates 1 und 2 (IRS-1, IRS-2) phosphoryliert. IRS-1 und IRS-2 werden über SH2-Domänen von anderen Proteinen erkannt und dienen als Adaptorproteine. Als Adaptorproteine gehen sie eine Bindung mit dem Enzym Lipidkinase ein und bringen dieses in Richtung Membran. An der Membran bewirkt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) unter Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) die

Phosphorylierung der IRS. Dadurch wird die membranverankerte PI3-Kinase oder die Ras-Raf-mitogen-aktivierte Proteinkinase (Ras-Raf-MAPK) aktiviert. Auf diese Weise vermitteln zelluläre Signalproteine die gewünschten Hormoneffekte (Schulz et al. 2015; Horn 2009; Berg et al. 2011).

1.3.4.2 Insulinrezeptor-A (IR-A) und Insulinrezeptor-B (IR-B)

Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Splicevarianten des Insulinrezeptors. IR-A dominiert im embryonalen Gewebe und in Tumoren mit überwiegend mitogener Wirkung. IR-B kommt vermehrt in Leber, Fettgewebe und Muskeln mit metabolischen Eigenschaften vor. IGF-II kann seine mitogene Wirkung durch Bindung an den IR-A Rezeptor verstärken. IR-B hat für IGF-II nur eine geringe Affinität (Behrends 2017).

1.3.4.3 IGF2-Rezeptor (IGF2-R)

Durch die Bindung von IGF-II an den IGF2-R, der identisch zum kationenunabhängigen Mannose-6-Phosphat Rezeptor ist, kann der IGF2-R als Clearance Rezeptor wirken. Das bedeutet, dass die Bindung zur Endozytose und zum IGF-II Abbau führt und somit die Bioverfügbarkeit von IGF-II beeinflusst (Brown et al. 2009). Damit ist der IGF-II Effekt proportional zum Angebot der IGF2-R (Saka et al. 1982; Tally et al. 1987). Das IGF2-R Gen wird von mütterlicher Seite aus vererbt (Reik et al. 2000). Der Rezeptor hat keine Tyrosinkinaseaktivität, liegt überwiegend intrazellulär vor und kann Insulin nicht binden. Chemisch betrachtet, hat der Rezeptor drei Bindungsstellen für IGF-II und zwei weitere für Lysozyme (Horn 2009; Weimann und Kiess 1990).

1.3.4.4 Insulinrezeptor

Kommen die IGFs in sehr hohen Konzentrationen, d.h. in der Regel mit mehr als 800 ng/ml vor, so können sie an den Insulinrezeptor binden (Morrione et al. 1997). Hierbei ist die Bindungsaffinität von IGF-II an den Insulinrezeptor zu binden, fünf bis zehnfach höher als die Affinität von IGF-I. Wie bereits zuvor beschrieben, wird dieser Mechanismus insbesondere beim IGF-2-oma beobachtet, wohingegen eine Bindung unter physiologischen Bedingungen nur selten vorkommt (Ranke und Binder 2001).

1.4 Dried Blood Spots (DBS)

In der medizinischen Diagnostik ist die Bestimmung zahlreicher Laborparameter durch venöse oder arterielle Blutabnahme sowie durch Kapillarblutgewinnung häufig anzutreffen. Üblicherweise wird abgenommenes Blut, je nach medizinischer Fragestellung, als Serum oder Plasma untersucht. Weniger bekannt, obwohl seit vielen Jahrzehnten angewendet, ist die Untersuchung von Blutbestandteilen aus DBS, zu deutsch Trockenblutproben. Da die Anwendung von Trockenblutproben als Methode dieser Arbeit genutzt wurde, wird im Folgenden ein Überblick über die Thematik gegeben.

1.4.1 Neugeborenen Screening

Seit den 1960er Jahren werden DBS täglich beim Neugeborenen Screening verwendet. Ziel des Screenings ist es, seltene angeborene Störungen des Stoffwechsels zu erkennen, um frühzeitig geistigen und körperlichen Entwicklungsstörungen entgegenwirken zu können. Während der zweiten Vorsorgeuntersuchung werden wenige Blutropfen aus der Ferse oder Vene eines jeden Neugeborenen entnommen. Das entnommene Blut wird auf eine Filterpapierkarte getropft, so dass DBS entstehen. Nach zweistündiger Trocknung bei Zimmertemperatur, können die gewonnenen Proben, mittels Tandem-Massenspektrometrie (TMS), untersucht werden. Zehn verschiedene Stoffwechselkrankheiten und zwei Hormonstörungen werden verlässlich abgeklärt. Die Teilnahme am Neugeborenen Screening ist freiwillig, die Kosten hierfür übernehmen die gesetzlichen Krankenkassen. Bei positivem Befund wird eine weitere diagnostische Untersuchung erforderlich (Bundesausschuss der Ärzte und Krankenkassen 2011; Zabransky 2012).

1.4.2 Weitere Anwendungsbereiche von DBS

Im Jahre 1998 gelang es Ahluwalia et al. (1998), Ferritinmessungen aus serumgetränkten, getrockneten Filterpapierproben, durchzuführen. Wenig später gelang es auch Flowers und Cook (1999), valide Messungen des Ferritin- und Transferrinrezeptorspiegels mittels DBS zu erhalten. Fortan war es auch in

ländlichen Regionen ohne den Zugang zu Laboratorien möglich, epidemiologische Studien durchzuführen.

Seit Ende des 20. Jahrhunderts können IGF-I, IGFBP-2 und IGFBP-3 sowie Wachstumshormone verlässlich und effizient in Trockenblutproben bestimmt werden. Hierzu werden Vollblutproben durch Venenpunktion oder Kapillarblutproben aus der Fingerbeere entnommen. Im Anschluss an die Blutabnahme wird das Blut im Abstand von 1–2 cm auf Filterpapierkarten getropft. Voraussetzung für die valide Messung ist, dass die präparierten DBS-Proben einen Durchmesser von 1,5 cm aufweisen, zwei bis vier Stunden an der Luft trocknen und direkt verarbeitet oder bei -20°C gelagert werden. Zur Verarbeitung werden mittig der DBS 6–8mm große Proben, abhängig von der Größe des Stanzers, entnommen und in einem sauren oder neutralen Puffer gelöst. Die Messung der gelösten Bestandteile erfolgt mittels ELISA oder RIA (Jones 2001; Schütt et al. 2003; Langkamp et al. 2008).

In einem aktuellen Bericht des Robert Koch Instituts aus dem Jahr 2015 kommen DBS auch bei der Ermittlung von Drogen- und chronischen Infektionskrankheiten wie HIV, Hepatitis B und Hepatitis C zur Anwendung (Robert Koch-Institut 2016).

1.4.3 Vor- und Nachteile von DBS

Aufgrund des langjährig validierten Verfahrens der DBS wird deren Anwendung immer beliebter. Überzeugend ist die unkomplizierte und platzsparende Lagerung, die tagelange Probenstabilität bei unterschiedlichen Temperaturen sowie der kostengünstige und wirtschaftliche Transport. Beschädigungen der Proben durch ungewollte Tauvorgänge oder durch zerbrochene Aufbewahrungsbehälter, können ausgeschlossen werden (Diamandi et al. 1998; Therrell et al. 1996; Europe 2017). Vorteilhaft ist auch die Art der Blutentnahme aus Sicht der Patienten, da nur geringe Blutmengen, im Vergleich zu konventionellen Blutproben, erforderlich sind. Auch ist es möglich, dass sich die Patienten nach einer erfolgten Schulung selbst Blut entnehmen. Das präparierte DBS wird anschließend vom Patienten in einen verschließbaren Plastikbeutel mit Trockenmitteltüte verpackt und in einem Briefumschlag auf postalischem Wege in ein Diagnostiklabor geschickt.

Vor der Anwendung von DBS gilt es den Hämatokritwert im Vollblut kritisch zu beurteilen. Werte zwischen 31–60% beeinflussen den Plasmagehalt nicht signifikant, der nach Präparation der DBS in diesen vorhanden ist. Innerhalb dieses Bereiches ist das Blutvolumen des Blutropfens konstant. Allerdings kann selbst dann noch ein systematischer Fehler von $\pm 10\%$ auftreten (Hoffman et al. 1996; Gressner und Arndt 2013).

1.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um Moleküle wie Proteine, Viren und Hormone in Körperflüssigkeiten nachzuweisen, dienen ELISA's als sensitive Immuntests. Deren hohe Empfindlichkeit beruht auf der spezifischen Bindung eines Antigens (AG) aus einer stark verdünnten Lösung an einen spezifischen Antikörper (AK). Unterschieden wird zwischen nicht-kompetitiven und kompetitiven ELISA's. Darüber hinaus gilt der sogenannte Sandwich-ELISA, ebenfalls nicht-kompetitiv, als gängiges Verfahren zum Nachweis von antigenen Strukturen. Insbesondere dessen Funktionsweise ist zum Verständnis der vorliegenden Arbeit nötig. Aus diesem Grund wird hier exemplarisch das Prinzip des nicht-kompetitiven Sandwich-ELISA's erläutert.

Voraussetzung ist die Bindung eines Fang-AK, auch als Primär-AK bezeichnet, an eine Mikrotiterplatte (MTP). Dieser Fang-AK hat eine Spezifität für das zu erfassende Antigen. Nach Zugabe des gelösten AGs, erfolgt durch den Fang-AK, die AG Bindung. Durch Waschung werden ungebundene Komplexe entfernt, sodass AK-gebundene AG-Komplexe zurückbleiben. Da der Primär-AK blockiert ist, wird ein zweiter AK hinzugegeben. Dieser AK wird als Detektions-AK bezeichnet und richtet sich gegen ein anderes Epitop des AG. An den Detektions- AK ist eine alkalische Phosphatase oder Peroxidase gebunden, die die AG-AK-Reaktion durch Substratumwandlung katalysiert und sichtbar macht. Diese Bestandteile bilden einen AK-AG-AK-Komplex, den Sandwich-ELISA.

1.5.1 Testprinzip des IGF-II-ELISA E30

Für den ELISA E30 der in Reutlingen ansässigen Firma Mediagnost, Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH, gilt das allgemein in der Wissenschaft bekannte ELISA Testprinzip mit kleineren Modifikationen. Eine kurze Beschreibung dieses Sandwich-ELISA's E30 soll Aufschluss über eingesetzte Materialien und Unterschiede geben.

Als Grundlage im E30 werden zwei spezifische und hochaffine Antikörper verwendet. Der aus Mäusen gewonnene Primär-AK ist an die MTP gekoppelt. Der zugesetzte zweite AK ist biotinyliert und aus Ziegen gewonnen. Dieser bindet an ein Epitop des IGF-II der Probe. Im darauffolgenden Schritt wird der Sekundär-AK durch das Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat gebunden. Die Substratreaktion katalysiert den Farbumschlag. Die umgesetzte Substratmenge ist proportional zur vorhandenen AG-Menge der Probe. Mittels Photometer wird der quantitative IGF-II-Probengehalt ermittelt. Um Assay-Interferenzen zu vermeiden, wird im E30 der IGF-II-IGFBP-Komplex durch Verdünnung im sauren Puffer (pH < 2,8) dissoziiert. Die frei gewordenen IGFBPs werden durch Überschusszugabe von IGF-I blockiert (Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH, Testanleitung 2007).

1.6 Fragestellung der Dissertation

Sämtliche Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Sandwich-ELISA E30 der Mediagnost GmbH (Reutlingen) durchgeführt. Seit Jahren ist der E30 kommerziell erhältlich. Angewendet wird der Assay für die Ermittlung der IGF-II Konzentrationen in Serum-, Plasma-, Urin-, Speichel- sowie Liquorproben und im Zellkulturmedium. Zur Anwendungserweiterung wurde die Möglichkeit untersucht, IGF-II aus DBS zu extrahieren und im E30 zu bestimmen. Im Vorhinein wurde festgelegt, dass bei der Konzentrationsbestimmung der DBS-Proben Abweichungen von $\pm 20\%$ zur Sollkonzentration als akzeptabel gelten. Die konkrete Entscheidungsgrenze von $\pm 20\%$ basiert auf klinischen Ergebnissen. Je nach Tumorart sind die IGF-II Werte in Bezug auf die 5. Perzentile erniedrigt (z.B. bei Endometriumkarzinomen, akuter lymphatischer

Leukämie oder Non-Hodgkin-Lymphomen) (Mohnike et al. 1995). Hingegen konnte bei NICTH eine Erhöhung der IGF-II Werte um das 20fache nachgewiesen werden (Frystyk et al. 1998).

Konkret wurden folgende Fragen untersucht:

- Ist, entsprechend dem bei IGF-I etablierten und eingesetzten Verfahren, eine Bestimmung von IGF-II Konzentrationen aus DBS durch einen konventionellen Immunoassay möglich?
- Kann der bereits existierende ELISA E30 zur Bestimmung von humanem IGF-II aus DBS eingesetzt werden?
- Welche Optimierungsschritte bezüglich Puffersystemen, Probenmengen, Extraktionszeiten, Schüttelfrequenzen sowie Temperaturen sind für den Einsatz des ELISA E30 nötig?
- Unter welchen Bedingungen und für welchen Zeitraum können die Filterpapierproben gelagert werden, ohne dass verfälschte Konzentrationsmessungen zu erwarten sind?
- Weichen die gemessenen DBS-Konzentrationen in Bezug auf die korrespondierenden Plasmaproben nicht mehr als $\pm 20\%$ ab?
- Gibt es physiologische Einflussfaktoren, die die Extraktionseffizienz beeinflussen?
- Wie resistent ist das Testsystem in Bezug auf Kreuzreaktivitäten, analytische Sensitivität, Linearität, Inter- und Intra-Assay-Varianz?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 IGF-II ELISA E30

Der verwendete IGF-II ELISA E30 (IGFBP blockiert) ist gegen den internationalen Standard WHO NIBSC 96/538 kalibriert und als Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von Human Insulin-like Growth Factor-II anzuwenden. Zugelassen ist der Assay für die in-vitro Diagnostik.

Tabelle 2 enthaltene Materialien im ELISA E30 Kits

IGF-II ELISA E30 <ul style="list-style-type: none">- Antikörperkonjugat (6 ml)- Enzymkonjugat (12 ml)- Kontrollseren (lyophilisiert):<ul style="list-style-type: none">KS 1 (250 µl)KS 2 (250 µl)- Probenpuffer (125 ml)- Standards (lyophilisierte):<ul style="list-style-type: none">STD A (0,45 ng/ml)STD B (1,5 ng/ml)STD C (3 ng/ml)STD D (5,63 ng/ml)STD E (9 ng/ml)- Stopplösung (12 ml)- Substrat (12 ml)	Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH (Reutlingen, Deutschland)
---	--

2.1.2 Weitere Reagenzien

Tabelle 3 weitere Reagenzien

Humane Serumproben	verschiedene, kommerzielle Blutbanken
ClinOlic 20% (100ml)	Baxter Deutschland GmbH (Unterschleißheim, Deutschland)
C-Peptid 1mg/ml	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
destilliertes/entmineralisiertes Wasser	Mediagnost (Reutlingen, Deutschland)
Humanes IGF-I (1mg/ml)	PeproTech (Rocky Hill, USA)
Insulin, Zinc human recombinant (10µg/ml)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
NIBSC (rekombinantes humanes IGF-II) (170µg/ml)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien

Abdeckfolie (selbstklebend)	Mediagnost (Reutlingen, Deutschland)
Combitips advanced (1 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Combitips advanced (2,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Combitips advanced (10 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
epT.I.P.S Reloads (0,1–20 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
epT.I.P.S Reloads (2–200–µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
epT.I.P.S Reloads (50–1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Filterpapier (No. 903)	Whatman (Kent, England)
Multipette plus (0,1–20 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Multipette plus (50–1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Multipette plus (2–200 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikropipetten Research plus (0,5–10 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikropipetten Research plus (10–100 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikropipetten Research plus (100–1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikrotiterplatten	Mediagnost (Reutlingen, Deutschland)
Mikrotiterplattenschüttler TiMix Control:	Edmund Bühler GmbH (Hechingen, Deutschland)
Parafilm M	Bemis Company (Wisconsin, USA)

Polyethylen PE Röhrrchen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Polystyrol Röhrrchen	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

2.1.4 Geräte

Tabelle 5 Geräte

Mikrotiterplattenwasher ELx450	BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Paper Punch	Schleier und Schüll (Dassel, Deutschland)
Photometer Synergy 2	BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5424R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Sämtliche Geräte der Mediagnost GmbH werden im Rahmen des Qualitätsmanagements gemäß ISO 13485 überprüft, gewartet und gepflegt.

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung und Ablauf des IGF-II ELISA E30

Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch geschüttelt und auf Raumtemperatur (RT) (= 20–25°C) gebracht werden.

Probenpuffer (PP), AK, Enzymkonjugat (EK), Stopplösung (SL), Substrat (S) sowie die MTP werden bei 2–8°C gelagert.

Standard (STD) A–E, Kontrollseren 1 und 2 (KS 1, KS 2) sowie die humanen Seren werden bei -20°C gelagert.

STD A–E müssen mit je 500 µl Probenpuffer rekonstituiert werden, sodass folgende Endkonzentrationen vorliegen:

STD A: 0,45 ng/ml
 STD B: 1,5 ng/ml
 STD C: 3 ng/ml

STD D: 5,63 ng/ml
STD E: 9 ng/ml

KS 1 und KS 2 werden mit je 250 µl PP zu einer 1:401 Verdünnung rekonstituiert.

Ebenso werden die Kontrollseren humaner Spender im Verhältnis 1:401 mit PP verdünnt.

Alle Proben werden sofort nach dem Verdünnen gemischt und müssen anschließend für mindestens 15 Minuten bis maximal 120 Minuten ruhen, bevor diese erneut gemischt und daraufhin in die Wells der MTP pipettiert werden.

Der PP wird im Verhältnis 1:20 vorab mit destilliertem Wasser verdünnt.

2.2.2 Testprinzip

Die Funktionsweise des ELISA E30 ist im Kapitel Einleitung unter Punkt 1.5.1 dargestellt und beschrieben.

2.2.3 Testdurchführung

1. In alle benötigten Wells werden 50 µl AK pipettiert.
2. In Doppelbestimmung werden in die Positionen
A1/A2 je 50 µl des Probenpuffers PP
B1/B2 je 50 µl STD A (0,45 ng/ml)
C1/C2 je 50 µl STD B (1,5 ng/ml)
D1/D2 je 50 µl STD C (3 ng/ml)
E1/E2 je 50 µl STD D (5,63 ng/ml)
F1/F2 je 50 µl STD E (9 ng/ml)

gegeben.

In die restlichen Positionen werden je 50 µl der zu testenden Proben (in 1:401 Verdünnung mit PP) pipettiert.

3. Die MTP wird mit Klebefolie dicht abgedeckt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Gleichzeitig wird bei einer mittleren Umdrehungsfrequenz von 350 revolutions per minute (rpm) horizontal geschüttelt.
4. Die Lösung aus den Wells wird mittels Mikrotiterplattenwasher abgesaugt und 5x mit 300 µl gewaschen. Es ist darauf zu achten, dass verbleibende Restflüssigkeit durch mehrfaches Ausklopfen der MTP bestmöglichst reduziert wird.

5. Anschließend erfolgt die Zugabe von 100 µl EK in jedes Well; daraufhin wird die MTP erneut dicht mit Klebefolie abgedeckt und für weitere 30 Minuten bei RT und 350 rpm auf dem Mikrotiterplattenschüttler inkubiert.
6. Nach Beendigung der Inkubationszeit wird die MTP, wie unter 4. beschrieben, gewaschen.
7. In jedes Well werden 100 µl S pipettiert und die MTP für 30 Minuten im Dunklen, bei RT ruhend, inkubiert.
8. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jedes Well 100 µl SL pipettiert und die Farbreaktion der Wells binnen 30 Minuten, bei 450 nm im Photometer, bestimmt.

Die rechnerische und graphische Auswertung der Photometermessungen erfolgte mit der Gen5 Secure Imager Software der Firma BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland).

2.2.4 DBS-Probenvorbereitung

DBS müssen für die Bestimmung im E30, in Abweichung zur Schilderung der Vorgehensweise unter Punkt 2.2.1, vorbereitet werden. Für die durchgeführten Versuche wurde aus den DBS je ein Stanzling mittels Paper Punch (Whatman Schleicher und Schuell 903), mittig der getrockneten Blutropfen, entnommen. Dieser Stanzling wurde in einem konischen Röhrchen mit PP gelöst. Ein derartiger Stanzling hat einen Durchmesser von 3,18 mm und enthält damit laut Hersteller 1,54 µl Serum bei einem Hämatokritwert von 55%. Sofern in der Methodik nicht anders beschrieben, wurde die Extraktion des IGF-II aus den DBS in 1:401 Verdünnung, bei 350 rpm und einer Inkubationszeit von 1h durchgeführt. Nach erfolgreicher Lösung des IGF-II aus den DBS-Proben, wurde gemäß der unter Punkt 2.2.3 beschriebenen Testdurchführung, weiter vorgegangen.

2.3 Vorversuche zur Entwicklung der Methode

2.3.1 Bestimmung der Probenverdünnung und Extraktionszeit

Aus bereits vorliegenden, bei -20°C gelagerten DBS, wurde je ein Stanzling verwendet und mit

- 616 µl PP, d.h. im Verhältnis 1:401

- 308 µl PP, d.h. im Verhältnis 1:201

verdünnt.

Anschließend wurden diese Proben bei RT abgedeckt mit Parafilm und für

- 0,25h
- 0,5h
- 1h
- 2h
- über Nacht (18h)

inkubiert.

2.3.2 Einfluss von Temperatur und Umdrehungsfrequenz

Wie tabellarisch (s. Tabelle 6) veranschaulicht, wurden Proben hoher, mittlerer und niedriger Konzentrationen untersucht. Nach einer DBS-Probenextraktionszeit von 1h und 0 bzw. 350 rpm, bei Temperaturen zwischen +4°C und +37°C, in einer 1:401 Verdünnung, wurde das aus den DBS gelöste IGF-II im ELISA E30 weiter bestimmt. Nach Messung der Konzentrationen durch den E30, konnte ein direkter Vergleich zwischen dem Verhalten unterschiedlicher Konzentrationen sowie dem Einfluss von Temperatur- und Schüttelfrequenzunterschieden erhoben werden.

Tabelle 6 Temperatur- und Umdrehungsfrequenz

Probenkonzentration [ng/ml]	952	652	357
Extraktionszeit [h]	1	1	1
Probenverdünnung	1:401	1:401	1:401
Temperatur [°C]	4 / RT / 37	4 / RT / 37	4 / RT / 37
Umdrehungsfrequenz [rpm]	0 / 350	0 / 350	0 / 350

2.4 Testvalidierung

2.4.1 IGF-II Gewinnung aus Filterpapier- und korrespondierenden Plasmaproben

Aus kommerziell erworbenen Proben der Kinderklinik Tübingen lagen bei einer Anzahl von $n = 62$ die korrespondierenden Plasmen mit entsprechenden DBS-Filterpapierkarten vor. Die Proben waren bei -20°C gelagert worden. Daraus wurden die IGF-II Konzentrationen aus den extrahierten Filterpapierkarten und parallel dazu, die entsprechenden Plasmen gemessen. In der Auswertung konnten die Proben im direkten Vergleich miteinander betrachtet werden. Die Konzentrationsbestimmungen der Plasmaproben wurden als Zielwert für die DBS-Proben angenommen, um deren prozentuale Abweichung zu errechnen.

2.4.2 Ermittlung der Probenstabilität

Frisch gewonnenes, kommerziell erworbenes Vollblut, wurde unter Gebrauch von Eppendorf Research Plus Pipetten ($10\text{--}100\ \mu\text{l}$) aus einer Entfernung von $1\text{--}2\ \text{cm}$ auf Filterpapierkarten getropft, so dass der gesamte vorgegebene Kreis mit einem Durchmesser von $1,5\ \text{cm}$ blutgetränkt war. Das Filterpapier wurde für $2\text{--}4$ Stunden bei RT ruhig liegend getrocknet. Anschließend wurde direkt eine Probe (entspricht Tag 0) verwendet. Die übrigen erstellten Proben wurden bei

- -20°C
- $+4^{\circ}\text{C}$
- RT ($+23^{\circ}\text{C}$)
- $+37^{\circ}\text{C}$

gelagert und deren Stabilität an

- Tag 0
- Tag 3
- Tag 5
- Tag 10

ermittelt. Die Versuche wurden mit einer Probenverdünnung von $1:201$ durchgeführt.

Parallel hierzu wurde das entsprechende Vollblut für 10 Minuten bei 3000 rpm und +20°C abzentrifugiert. Aus den so entstandenen Plasmen konnte die IGF-II Sollkonzentration im E30 bestimmt werden und zur prozentualen Berechnung der Abweichungen zwischen Plasma und DBS genutzt werden.

2.4.3 Triacylglyceride (TAG)

Exemplarisch wurde, um den Einfluss einer physiologischen Substanzen auf die IGF-II Konzentration zu untersuchen, 100 µl Blut mit 50 µl ClinOelic 20% (Baxter), in welchem sich 200 mg/ml Fett befinden, durch Schütteln homogen vermischt. Folglich wurde ein fettähnlicher Gehalt von 66,67 mg/ml Fett konstruiert.

Nach demselben Prinzip, wie bereits unter Punkt 2.4.2 beschrieben, wurden auch aus diesen Vollblutproben TAG-DBS hergestellt und in 1:201 Verdünnung für

- 0,5h
- 1h

inkubiert.

2.4.4 IGF-II-Recovery

1 ml Vollblut wurde mit einer kalibrierten Probe des National Institute for Biological Standard and Control (NIBSC) gespiket. Dem Vollblut wurden 8,8 µl NIBSC IGF-II (170 µg/ml) hinzugefügt, sodass eine IGF-II-Konzentration von 1500 ng/ml im Vollblut (zuzüglich des körpereigenen IGF-II-Konzentrationsgehaltes) erreicht wurde. Unter dem Begriff Spiken versteht man das Hinzufügen eines Analyten zu einer Probe. Daraus wurden anschließend DBS hergestellt. Auf dieselbe Weise wurde der PP angereichert.

Parallel dazu wurde sowohl das ungespikete als auch das gespikete Vollblut für 10 Minuten bei 3000 rpm und 20°C zentrifugiert. Diese Proben wurden als Referenz für die DBS-Konzentrationen verwendet.

2.4.5 Kreuzreaktivität des IGF-II ELISA E30

Wie in Tabelle 7 dargestellt, wurden drei Proben verschiedener Konzentrationen im ELISA E30 getestet und bestimmt. Der PP wurde, nach vorangegangener

Berechnung, entsprechend der gewünschten Konzentration, mit dem jeweiligen Kreuzreaktanten gespiket und in dieser Form in die Wells pipettiert.

Tabelle 7 Kreuzreaktivität

	C-Peptid (1 ng/ml)	Rec. humanes IGF-I (1 ng/ml)	Rec. humanes Insulin (10 µg/ml)
Konzentration (ng/ml)	10	250	1
	100	750	10
	500	1250	100

2.4.6 Inter- und Intra-Assay-Varianz

Drei Seren wurden in einem Zeitraum von sechs Tagen gemeinsam in fünf IGF-II ELISA's E30 getestet. Um den Variationskoeffizienten berechnen zu können, wurden die gemessenen Konzentrationen zwischen (=inter) den Assays verglichen.

In einem weiteren Versuch wurden fünf bekannte Seren mit hohen, mittleren und niedrigen IGF-II Konzentrationen innerhalb einer Mikrotiterplatte (=intra) über verschiedene Bereiche hinweg, je fünfmal pipettiert und daraus deren Variationskoeffizienten bestimmt.

2.4.7 Analytische Sensitivität und Linearität

In 8-facher Doppelbestimmung des Leerwertes mit 50 µl PP pro Well wurde die Sensitivität des ELISA E30 bestimmt. Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität wurden die Extinktionswerte der Proben ermittelt.

Der Linearitätsnachweis erfolgte mit vier ELISA E30 Assays, die die Plasmaproben 1–32 und 33–62 sowie die Filterpapierproben 1–32 und 33–62 bestimmten. Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß der Beschreibung in Kapitel 2.2.4. Bei der eingesetzten Probenanzahl waren geringe, mittlere und hohe IGF-II Konzentrationen vorhanden, um die Beurteilung innerhalb eines weiten Konzentrationsbereiches zu ermöglichen. Nach Ausmessung der Farbreaktion wurden die Probenkonzentrationen gegen die Signalintensitäten für

den jeweiligen Assay in ein Diagramm aufgetragen. Die getrennte Assayanalyse wurde durchgeführt, da die Signalintensitäten von Assay zu Assay variieren können. Die Auswertung erfolgte durch die Betrachtung der linearen, quadratischen und kubischen Regressionsmodelle. Für den Nachweis wurde die Regressionsgerade für den linearen Bereich berechnet. Das ermittelte R^2 wurde adjustiert, entspricht somit dem korrigierten Bestimmtheitsmaß und steht für die Kurvensteigung.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit den Programmen Microsoft Excel 2016 und der MedCalc Software Version 17.2, ebenfalls von der Firma Microsoft (Redmond, USA), durchgeführt.

Sämtliche graphische Darstellungen wurden mithilfe der genannten Programme erstellt. Diese wurden auch für metrische Verfahren, wie die Passing-Bablok Regressionsanalyse, die lineare Regressionsanalyse und zur Ermittlung der Korrelationskoeffizienten mittels Bland-Altman Plot, angewendet. Bei letzterem werden die Werte als $\pm 1,96$ Standardfehler des Mittelwerts ($\pm 1,96$ SD) angegeben. In der vorliegenden Arbeit werden Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant beurteilt (Kreienbrock et al. 2012; Hüsler und Zimmermann 2010).

Die Berechnungen der Inter- und Intra-Assay Variationskoeffizienten zur Analyse der Reproduzierbarkeit und Präzision des Verfahrens wurden rechnerisch und formelgetreu vorgenommen. Gleiches gilt für die Auswertung der Sensitivität mittels quadratischen Regressionsmodell und der Kreuzreaktivitäten. Für den Linearitätsnachweis wurde das multivariate (polynomiale) Regressionsmodell angewendet. Werte für das korrigierte Bestimmtheitsmaß R^2 ($R^2_{\text{kor.}}$) von $\geq 0,95-0,999$ wurden als akzeptabel festgelegt (Schneider et al. 2010).

3 Ergebnisse

Tabelle 8 IGF-II Serumkonzentrationen in ng/ml (Blum und Schweizer 2003 in Ranke MB (Hrsg.): Diagnostics of endocrine function in children and adolescents. Basel, Karger, 2003, pp 166-199)

Altersgruppe	5. Perzentile	50. Perzentile	95. Perzentile
Neugeborene	158	284	516
1–4 Wochen	350	486	673
1–6 Monate	348	551	871
6–12 Monate	388	582	876
1–3 Jahre	384	596	926
3–5 Jahre	397	617	920
5–7 Jahre	419	638	973
7–9 Jahre	433	656	997
9–11 Jahre	442	662	994
11–13 Jahre	448	671	1006
13–15 Jahre	455	679	1014
15–17 Jahre	452	686	1042
20–30 Jahre	436	679	1058
30–40 Jahre	442	680	1049
40–50 Jahre	407	650	1039
50–60 Jahre	396	644	1049
60–70 Jahre	373	611	1000

Zunächst gibt Tabelle 8 einen Überblick über das physiologische Vorkommen von IGF-II im Serum. Hierzu ist das Verständnis des Begriffes der Perzentile notwendig. An folgendem Beispiel sei dies verdeutlicht: Die 50. Perzentile entspricht der Medianen. Das heißt, 50% der Bevölkerung weisen höhere und 50% der Bevölkerung weisen niedrigerer Serumkonzentrationen auf. Dementsprechend bedeutet die 5. Perzentile, dass 5% der Allgemeinheit geringere Konzentrationen haben, jedoch 95% höhere Konzentrationen aufweisen. Die oben stehende Tabelle 8 verdeutlicht, dass die IGF-II

Konzentration im Organismus des Menschen einen großen physiologischen Bereich umfasst. Postnatal gelten bei Neugeborenen Konzentrationen zwischen 158–516 ng/ml als physiologisch. Bei Personen zwischen dem 18. und 70. Lebensjahre liegt der Referenzbereich zwischen 373–1058 ng/ml.

3.1 Methodenvoraussetzungen

3.1.1 Extraktionszeit und optimale Probenverdünnung

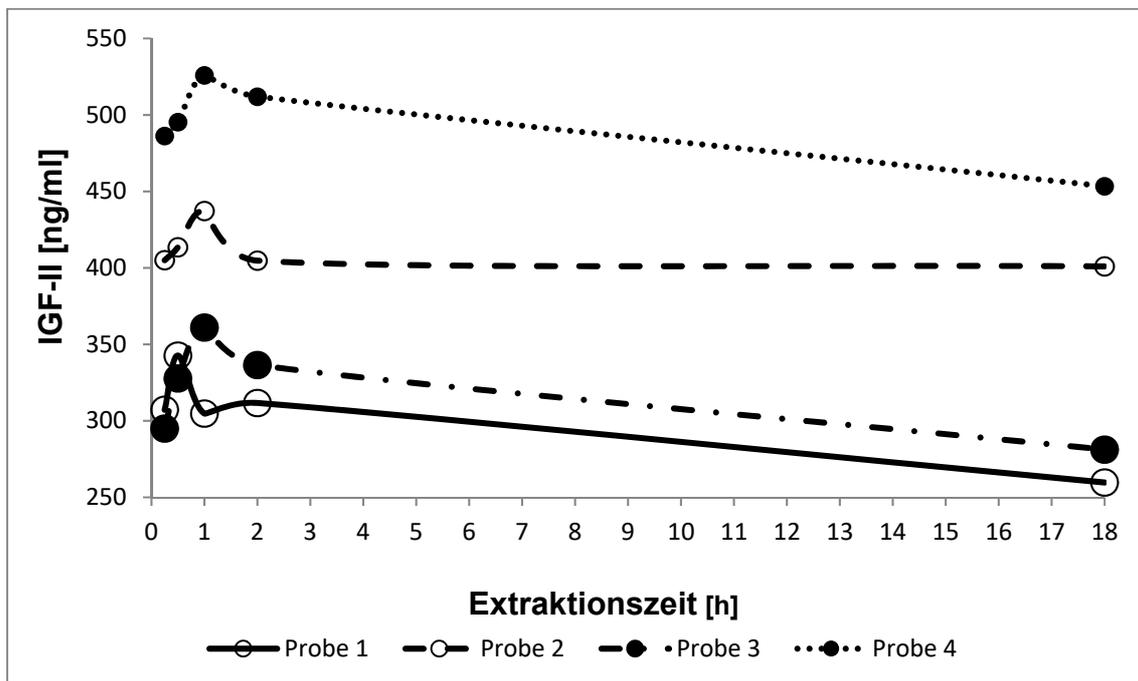


Abbildung 1 Abhängigkeit der IGF-II Konzentration von der Extraktionszeit (n = 10)

Anhand von 4 Proben wird exemplarisch das Verhalten der extrahierten IGF-II Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. 3 der 4 Proben zeigen nach 1h Extraktion die höchsten gemessenen Konzentrationen. Eine längere Versuchsdauer als 1h, bewirkt generell ein Abfallen der Extraktionskonzentrationen.

Zunächst wurde die Effektivität der Extraktion mit dem Probenpuffer des ELISA E30 getestet. Dazu wurden Versuche mit unterschiedlichen Extraktionszeiten (0,25h, 0,5h, 1h, 2h und 18h) bei RT durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass der unveränderte ELISA Kit PP für die Extraktion von IGF-II aus DBS geeignet ist. Abbildung 1 zeigt exemplarisch an vier – von insgesamt zehn – Proben, die Veränderung der gelösten IGF-II Konzentrationen in Abhängigkeit von der

Extraktionszeit. Festgestellt wurde, dass nach einer Extraktionszeit von 1h durchschnittlich die maximale IGF-II Konzentration aus Filterpapieren vorliegt. Auch innerhalb von 0,25h, 0,5h und 2h konnten akzeptable Ergebnisse erzielt werden, wobei hier eine größere Variabilität und Streuung der Konzentrationen zu beobachten waren. Trotz der beschriebenen Variabilitäten konnte festgehalten werden, dass die Konzentrationsabweichungen aller Proben zwischen 0,25-2h, den Referenzbereich von $\pm 20\%$ nicht überschritten. Bereits Inkubationszeiten von $\geq 2h$ zeigten graphisch die Tendenz sinkender Konzentrationen aufgrund von Probeninstabilität. Inkubation der Proben über Nacht, d.h. für 18h, ergaben, dass IGF-II über einen längeren Zeitraum instabil ist und die Konzentrationen abfallen. Schlussfolgernd wurde eine Extraktionszeit von 1h als die verlässlichste Zeitspanne beurteilt. Lösungszeiten zwischen 0,5h und 2h sind aufgrund der Tatsache, dass der Referenzbereich von $\pm 20\%$ eingehalten werden kann, ebenfalls anwendbar.

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellte die Ermittlung der effizientesten Probenverdünnung zur Extraktion von IGF-II aus DBS dar. Neun Proben wurden jeweils in 1:401 und 1:201 Verdünnungen für 1h extrahiert.

Tabelle 9 Verdünnungseinfluss auf die IGF-II Extraktion aus DBS (n = 9)

	Wert bei 1:201 Verdünnung [ng/ml]	Wert bei 1:401 Verdünnung [ng/ml]	Mehrgewinn bei 1:401 Verdünnung [%]
Probe 1	471	593	26
Probe 2	547	689	26
Probe 3	497	647	30
Probe 4	464	550	19
Probe 5	511	590	15
Probe 6	484	654	35
Probe 7	541	667	23
Probe 8	536	735	37
Probe 9	521	693	33

Tabelle 9 macht sowohl in absoluten als auch relativen Werten deutlich, dass die Extraktion von IGF-II bei 1:401 verdünnten Proben ausnahmslos effizienter und quantitativ höher gewesen ist. Relativ betrachtet war es möglich, mit 1:401 verdünnten Proben zwischen 19% und 37% höhere IGF-II-Konzentrationen aus den DBS zu lösen. Daraus ergibt sich, dass eine 1:401 Verdünnung für optimal befunden wurde.

3.1.2 Variation der Schüttelfrequenzen

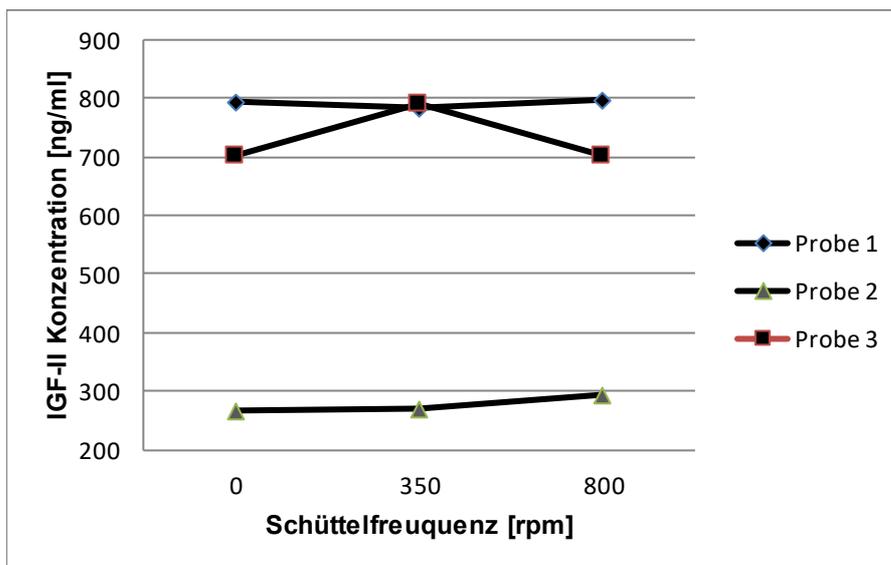


Abbildung 2 Variation der Schüttelfrequenzen (n = 3)

Nach Auftragen der IGF-II Konzentrationen (y-Achse) gegen die Schüttelfrequenzen (x-Achse) zeigt sich, dass sich zwischen 0/350/800 rpm keine eindeutige Aussage über eine präferierte Frequenz treffen lässt. Der Peak in Probe 3 entspricht einem 12%igen Konzentrationsmehrgewinn im Vergleich zu 0 rpm und 800 rpm.

Die Proben 1–3 der Abbildung 2 zeigen, dass durch eine Veränderung der horizontalen Schüttelfrequenz kein Mehrgewinn in der IGF-II Extraktion erzielt wurde. Allerdings bedeutete eine Erhöhung oder Verminderung der rpm-Anzahl auch keine Verschlechterung der Extraktion. Als einzige Auffälligkeit der Grafik ist der Peak bei Probe 3 mit 350 rpm zu nennen. Die extrahierte IGF-II Konzentration von Probe 3 war bei 350 rpm um 12% im Vergleich zu 0 rpm und 800 rpm erhöht. Im Allgemeinen galt für alle Versuche eine Variation der Endergebnisse innerhalb von $\pm 20\%$ als irrelevant.

Da jedoch diese erhöhte Extraktionskonzentration bei 350 rpm im Vergleich zu 0 rpm und 800 rpm nur einmalig gemessen werden konnte, mussten weitere Untersuchungen mit einer größeren Probenanzahl durchgeführt werden. Hierbei wurden aus Gründen der praktischen Anwendbarkeit nur die Extraktionen bei 0 rpm und 350 rpm getestet. Aufgrund der Tatsache, dass auch eine lange Extraktionszeit den IGF-II Zerfall beschleunigte, wurde angenommen, dass eine zu starke Schüttelfrequenz auf Dauer denselben negativen Effekt zeigen würde. Außerdem kann nicht davon ausgegangen werden, dass 800 rpm standardmäßig bei jedem MTP-Schüttler einstellbar sind.

Um eine eindeutige Präferenz bezüglich der optimalen horizontalen Schüttelfrequenz zu erhalten, wurden weitere 19 Proben getestet. Die Probenvorbereitung und der Testablauf blieben unverändert. Tabelle 10 zeigt anhand von 5 der 19 Proben das absolute und relative Ergebnis der Versuche.

Tabelle 10 Extraktionseffizienz bei 0 vs. 350 rpm in Bezug auf die Sollkonzentration (n = 19)

	Sollwert [ng/ml]	Wert bei 0 rpm [ng/ml]	Prozentuale Abweichung bei 0 rpm zum Sollwert [%]	Wert bei 350 rpm [ng/ml]	Prozentuale Abweichung bei 350 rpm zum Sollwert [%]
Probe 1	390	421	7,9	388	0,5
Probe 2	616	628	1,9	615	0,2
Probe 3	676	728	7,7	648	4,7
Probe 4	732	646	11,7	643	12,2
Probe 5	1013	763	24,7	746	26,4

Es konnten auch durch die erhöhte Probenanzahl keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden. Die Gesamtabweichungen, berechnet aus allen prozentualen Abweichungen der 19 Proben für 0 rpm und 350 rpm, unterschieden sich nur geringfügig. Für 0 rpm wurde eine relative Abweichung von 9,7% und für 350 rpm eine relative Abweichung von 9,8% berechnet. Aufgrund dieser zu vernachlässigenden Unterschiede zwischen den horizontalen Schüttelfrequenzen, ist die Extraktion von IGF-II aus DBS sowohl bei 0 rpm als

auch bei 350 rpm möglich. Da sich an die Extraktion aus DBS der ELISA E30 anschließt, wurde entschieden, zur Vereinheitlichung der beiden miteinander verknüpften Methoden, auch die Extraktion aus DBS bei 350 rpm durchzuführen.

3.1.3 Einfluss der Extraktionstemperaturen

Die untenstehende Abbildung 3 zeigt, dass die IGF-II Extraktion aus DBS bei +4°C, RT und +37°C möglich ist. Die maximale absolute und prozentuale Abweichung von der Sollkonzentration (580 ng/ml) ist bei +37°C gemessen worden. Mit einer gemessenen Extraktion von 559,5 ng/ml, weicht das Ergebnis um -3,5% vom Sollwert ab. Als akzeptabel gilt eine Abweichung von $\pm 20\%$ zum Sollwert. Die diagnostische Auswertung der DBS erfolgt üblicherweise in Laboratorien. Mikrotiterplattenschüttler werden hier bei RT gelagert, sodass das Schütteln bei RT als unkompliziert und bedenkenlos anwendbar empfohlen wird.

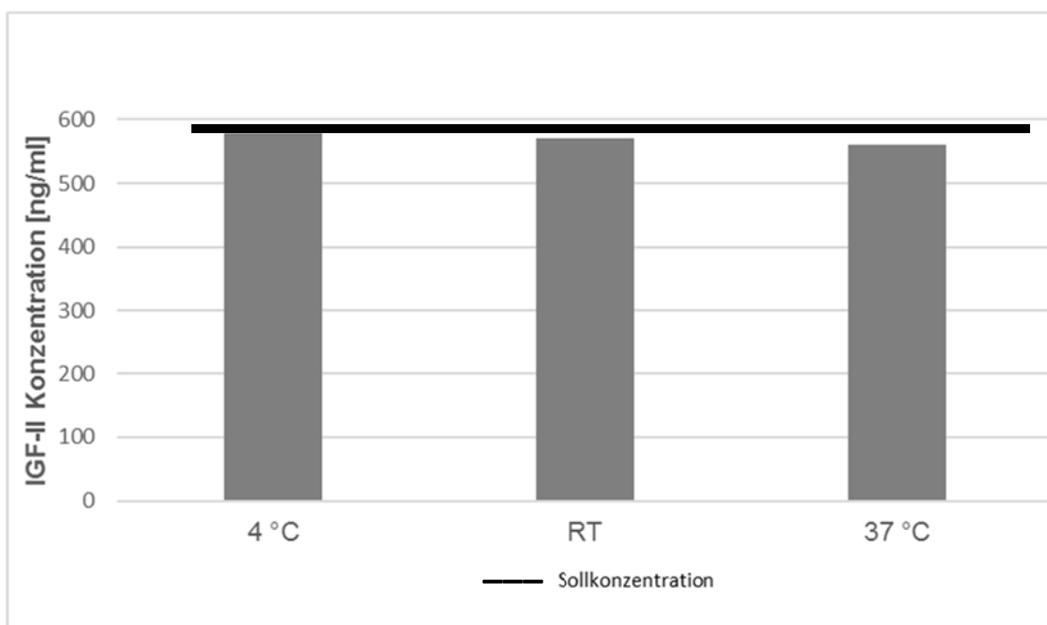


Abbildung 3 Einfluss der Extraktionstemperaturen auf die gelösten IGF-II Konzentrationen (n = 6)

Bei den gezeigten Säulendiagrammen wird klar ersichtlich, dass die erprobten Temperaturen ausnahmslos für die IGF-II Konzentrationsbestimmung, nach zuvor erfolgter Extraktion aus DBS, geeignet sind. Die größte Abweichung in Bezug auf die Sollkonzentration, ist bei +37°C mit -3,5% zu verzeichnen.

Zusammenfassend gilt für die Ergebnisse des Kapitels 3.1, dass als optimale Bedingungen für die Lösung von IGF-II aus DBS Proben eine 1:401 Verdünnung bei einer Extraktionszeit von 1h und 350 rpm angesehen wird. Diese

Erkenntnisse sind folglich in Bezug auf die sich der Extraktion anschließende Anwendung des ELISA E30 angepasst. Geräteeinstellungen und Probenverdünnungen bleiben von Messbeginn bis zum Abschluss unverändert.

3.2 IGF-II Gewinnung aus Plasma- vs. DBS-Proben

3.2.1 Passing-Bablok Regressionsanalyse

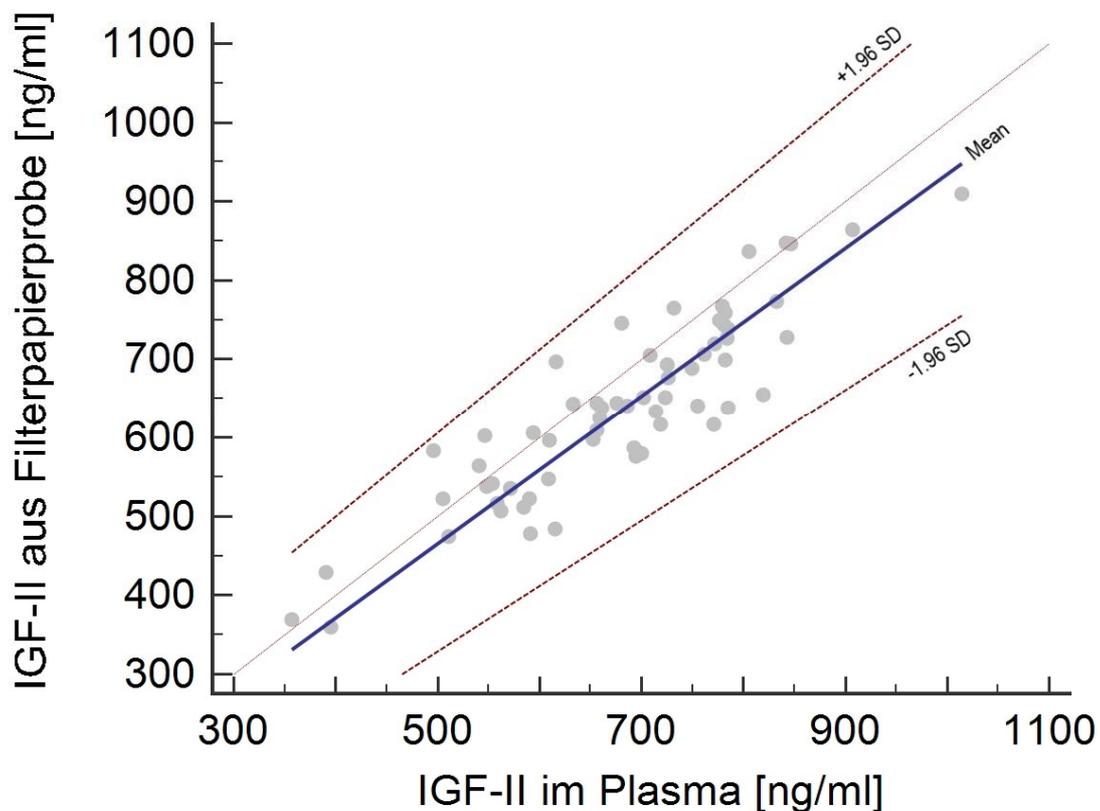


Abbildung 4 Vergleich der IGF-II Konzentration in Plasma- und Filterpapierproben mittels Passing-Bablok Regressionsanalyse (n = 62)

Die Geradengleichung lautet: $y = 0,94 \cdot x - 4,59$. Jeder Wert der dargestellten Punktwolke repräsentiert ein Ergebnis der Proben 1-62 aus Plasma und dem verglichenen DBS. Die Gerade Mean entspricht dem berechneten Mittelwert, der leicht von der hellgrauen Ursprungsgerade abweicht.

Die in Abbildung 4 aufgezeigten Versuchsergebnisse von 62 Plasmaproben und den zu vergleichenden DBS verdeutlichen bereits bei der optischen Betrachtung, dass es mit den eingesetzten Materialien möglich war, verlässlich IGF-II Konzentrationen aus DBS zu messen.

Im Folgenden können aus Tabelle 11 die statistischen Ergebnisse der Passing-Bablok Regressionsanalyse nachvollzogen werden. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse erläutert.

Tabelle 11 statistische Auswertung der Passing-Bablok Regressionsanalyse

Probenanzahl	62
--------------	----

	Variable X [ng/ml]	Variable Y [ng/ml]
Minimum	357,0000	360,0000
Maximum	1014,0000	910,0000
Arithmetisches Mittel	679,1774	638,3226
Median	693,5000	640,000
Standardabweichung	125,5460	115,8280
Standardfehler des Mittelwertes	15,9444	14,7102

Regressionsgleichung

$y = -4,590000 + 0,94000 x$	
Systematische Fehler	
Achsenabschnitt A	-4,5900
95% CI	-86,8789 bis 74,8154
Proportionale Fehler	
Steigung B	0,9400
95% CI	0,8308 bis 1,0632
Zufallsfehler	
Reststandardabweichung (RSD)	39,4966
± 1,96 RSD Intervall	-77,4133 bis 77,4133
Lineare Modellgültigkeit	
Cusum-Test für Linearität	Keine signifikante Abweichung von der Linearität (P=0,59)

Spearman rank Korrelationskoeffizient

Korrelationskoeffizient	0,872
Signifikanzniveau	P<0,0001
95% CI	0,795 bis 0,921

Ziel der Regressionsanalyse nach Passing-Bablok ist es, die Äquivalenz zweier Methoden (Variable X und Variable Y) nachzuweisen. Als Ansatz hierfür gilt:

$$y = a x + b$$

Die Variable a entspricht dem proportionalen Fehler, der Steigung des Graphen und die Variable b dem systematischen Fehler, dem y-Achsenabschnitt der Graphik. Wird gezeigt, dass $y = x$ ist, d.h. $a = 1$ und $b = 0$, dann ist eine völlige Methodenäquivalenz nachweisbar. Dies ist der Fall, wenn das 95%ige Konfidenzintervall (CI) für a die 1 und für b die 0 enthält. Eingesetzt in die Formel ergibt sich auf diese Weise:

$$y = 1 x + 0$$

Die mathematische Auswertung der Regression nach Passing-Bablok ergab eine Regressionsliniengleichung mit einer Steigung von $a = 0,94$ und einem 95%igen CI einschließlich 1 (0,83 bis 1,06). Dies bedeutet, dass 94% des IGF-II Plasmas in den zu vergleichenden Filterpapierproben gemessen wurden. Für $b = -4,59$ sagt der Wert aus, dass die systematische Differenz der beiden Methoden gleich 0 ist. Das 95%ige CI für b liegt zwischen -86,88 und +74,82 und schließt somit die 0 ein. Folglich kann b vernachlässigt werden. Aufgrund der beschriebenen Tatsachen wurde gezeigt, dass es keinen systematischen oder proportionalen Fehler zwischen den Messmethoden gibt.

Folgende Erkenntnisse wurden ebenfalls Tabelle 11 entnommen und werden nun im Einzelnen aufgeführt:

- Die ermittelte Passing-Bablok-Gleichung lautet:

$$y = 0,94 \cdot x - 4,59$$

Die Zahl -4,59 ist, im Bezug auf den angezeigten Messbereich (300–1100 ng/ml), gleich 0 zu setzen. Die Lineare schneidet nicht exakt den Ursprung der Achsen, sondern ist leicht versetzt. In Bezug auf das 95%ige CI weicht der Wert -4,59 geringfügig von der berechneten, idealen Medianen ab. Diese berechnet sich aus den Werten:

$$\frac{74,82 - 86,88}{2} = -6,03.$$

Da die Abweichung gering ist sowie die Hypothese, dass der Achsenabschnitt bei 0 liegt, nicht abgelehnt wird, ist das angewendete Verfahren korrekt.

Mit der Steigung $a = 0,94$ wurde ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis belegt. Wären die Filterpapier- und DBS-Proben exakt linear, so wäre $a = 1$. Betrachtet man die Mediane innerhalb des 95%igen CI:

$$\frac{0,83 + 1,06}{2} = 0,945$$

so wird klar, dass die Steigung a der Mediane entspricht.

- Die Analyse des Cusum Linearitätstestes bestätigt die Annahme, dass keine signifikante Abweichung zwischen den Messmethoden vorliegt. Der berechnete p-Wert liegt mit einem Wert von 0,59 höher als das festgelegte Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. Dies beweist, dass der Test die Nullhypothese nicht ablehnt.
- Bei der Untersuchung des Spearman rank Korrelationskoeffizienten, zeigte $r = 0,872$ eine 87,2%ige Korrelation der untersuchten Methoden an. Eine Übereinstimmung von $r \geq 0,9$ wäre als Testergebnis eindeutiger gewesen, wobei der p-Wert von $< 0,0001$ als höchst signifikant einzuordnen ist. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als 1‰. Der Korrelationskoeffizient entspricht nahezu der Medianen (0,858).

3.2.2 Bland-Altman-Plot

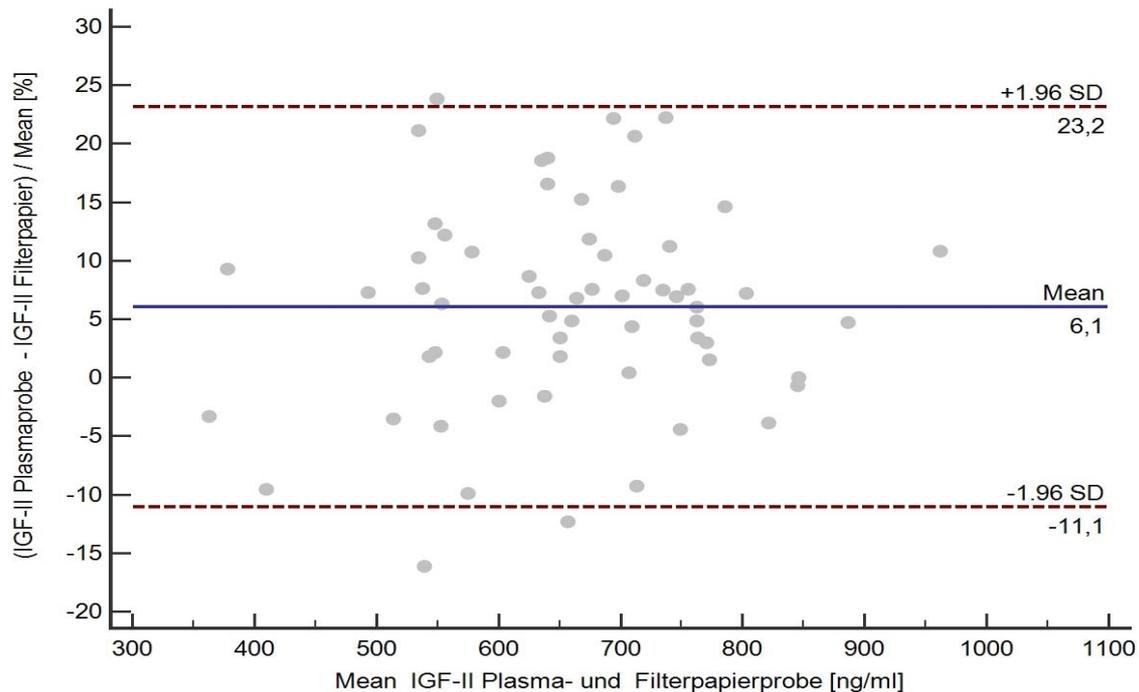


Abbildung 5 Bland-Altman-Plot (n = 62)

Vergleich der 62 IGF-II Konzentrationen in Plasma- und korrespondierenden Filterpapierproben mittels Bland-Altman-Plot. Die Ordinate zeigt die prozentualen Differenzen der beiden Methoden. Mean steht für den Mittelwert der Differenz zwischen den Methoden. Die Konfidenzgrenzen, innerhalb derer 95% aller Differenzen liegen, sind als gestrichelte Linien, parallel zur x-Achse, zu sehen. Diese ergeben sich aus dem Mittelwert der Differenz $\pm 1,96$ x der Standardabweichung der Differenzen.

Abbildung 5 zeigt den Bland-Altman-Plot, der zum Vergleich zweier Messmethoden dient. Hierzu wurden die relativen Differenzen der Messmethoden gegen deren Mittelwert (Mean) aufgetragen, sodass eine Punktwolke entsteht. Die rein visuelle Betrachtung der Punktwolke lässt auf keinen systematischen Fehler schließen. Die Punkte erscheinen normalverteilt und unverzerrt. Mithilfe des Mittelwertes kann eine Aussage über die Richtigkeit der Messgrößen getroffen werden. Bei symmetrischer Verteilung der Differenzen liegen 95% der Werte innerhalb der $\pm 1,96$ SD. Bei einer Probenanzahl von 62 entspricht dies demnach 59 Proben. Die Konfidenzgrenzen stehen für das medizinische Limit of Agreement. Das 95%ige CI ist ein Maß für die Genauigkeit der Methode. Es beschreibt wie genau das gemessene, dem wahren Ergebnis entspricht.

Aus Tabelle 12, der statistischen Auswertung des Plots, ergeben sich die Zahlenwerte der CI-Grenzen. Die Untergrenze mit -11% und die Obergrenze mit +23% besagen, dass IGF-II Messungen aus DBS in 95% der Fälle 11% niedrigere und 23% höhere Konzentrationen messen, als dies der Fall in Plasmaproben ist. Betrachtet man die Streubreite der zugehörigen 95%igen CI, so sind diese 7,62% groß. Die Nullhypothese $H_0: \text{Mean} = 0$ wird mit einem p-Wert von $< 0,0001$ abgelehnt. Die Differenz zwischen den beiden Methoden ist mit einem Mittelwert von $6,0564 \neq 0$. In Bezug auf eine untersuchte Anzahl von 62 Proben ergibt sich ein zuverlässiges Ergebnis.

Tabelle 12 statistische Auswertung des Bland-Altman-Plots

Abweichungen in %

Probenanzahl	62
Arithmetisches Mittel	6,0564
95% CI	3,8390 bis 8,2737
P ($H_0: \text{Mittelwert} = 0$)	0,0001
Untergrenze	-11,0572
95% CI	-14,8671 bis -7,2472
Obergrenze	23,1699
95% CI	19,3600 bis 26,9798

Die Gesamtheit der in Kapitel 3.2 beschriebenen Ergebnisse beweisen, dass DBS-Proben, zur Messung von IGF-II, anwendbar sind.

3.3 Probenstabilität

Bei diesen Versuchen wurden drei Filterpapierproben auf deren Lager- und Temperaturstabilität geprüft. Abbildung 6 zeigt den prozentualen Anteil von IGF-II in Bezug auf Tag 0 durch Einfluss von Zeit und Temperatur auf die Konzentrationsbestimmung. Die Skalierung der y-Achse wurde durch die Vorgabe der Experimente bestimmt, wonach Konzentrationsabweichungen von $\pm 20\%$ zu den gemessenen Ausgangswerten als akzeptabel galten. Zehn Tage nach der Probengewinnung, bei Lagertemperaturen von -20°C , $+4^\circ\text{C}$, RT und $+37^\circ\text{C}$, lagen die gemessenen Konzentrationen der DBS-Proben innerhalb von $\sim 10\%$ der Ausgangsmessung am Tag der Probengewinnung. Es konnte kein

signifikanter Einfluss bzgl. Zeit oder Temperatur innerhalb des genannten Zeitraumes als beeinflussender Faktor für die DBS Messung festgestellt werden.

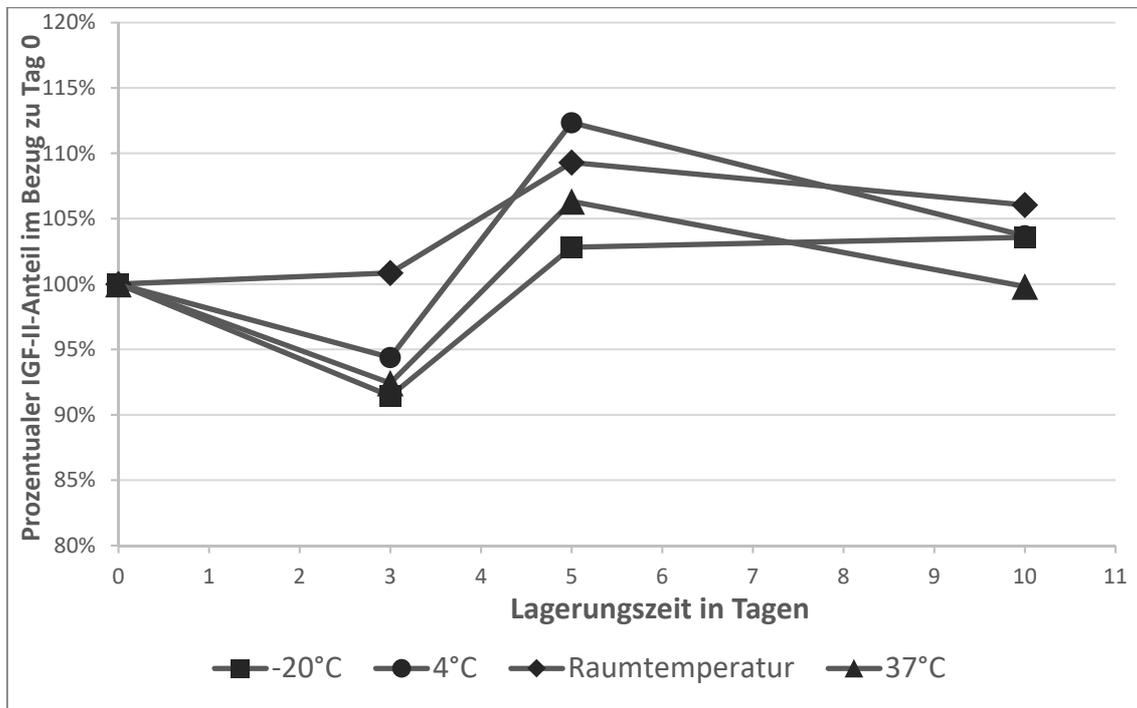


Abbildung 6 DBS-Stabilität in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur bezogen auf Tag 0 (n = 3 pro Tag und Temperatur)

Die gezeichneten Liniendiagramme zeigen das Verhalten von DBS bei Lagerungstemperaturen von -20°C, +4°C, RT und +37°C über einen Zeitraum von 10 Tagen. Die y-Achse definiert die Grenzen der zulässigen Messabweichungen zum Ausgangswert an Tag 0.

3.4 Einfluss von Triacylglyceriden auf die IGF-II Messung aus DBS

Das in Abbildung 7 gezeigte Säulendiagramm vergleicht die IGF-II Konzentrationen von DBS mit reinem Vollblut und mit DBS-Proben, die mit einem Fettzufuhrpräparat versetzt wurden. Die verglichenen Proben stammten als exemplarisches Beispiel von einer Person. Deutlich gezeigt werden konnte, dass 66,67 mg/ml triglyzeridähnliche Substanz keinen Einfluss auf die IGF-II Messung hat. Die Messwerte wurden durch den simulierten Fettzusatz nicht verfälscht. Ein Einfluss des Zusatzes hätte sich durch einen Messfehler gezeigt. Bei einer Extraktionszeit von 1h wurden in den gespikten DBS (n = 3) 102,06%, bei 2h 100,8% der IGF-II-Sollkonzentration gemessen. Aufgrund der minimalen Konzentrationsabweichungen kann davon ausgegangen werden, dass keinerlei

Einfluss von Fett auf die Plasma-IGF-II Menge zu erwarten ist. Abweichungen von $\pm 20\%$, in Bezug auf die reine Vollblutkonzentration, sind akzeptabel. Physiologische TAG-Konzentrationen bei Kindern bis 14 Jahre betragen 30-130 mg/dl. Für Erwachsene liegen die Werte zwischen 50-150 mg/dl. Daher gelten die Ergebnisse lediglich für TAG-Konzentrationen $\leq 66,67$ mg/ml als verlässlich. Für Konzentrationen oberhalb des angewendeten Wertes sind die oben beschriebenen Aussagen ungültig.

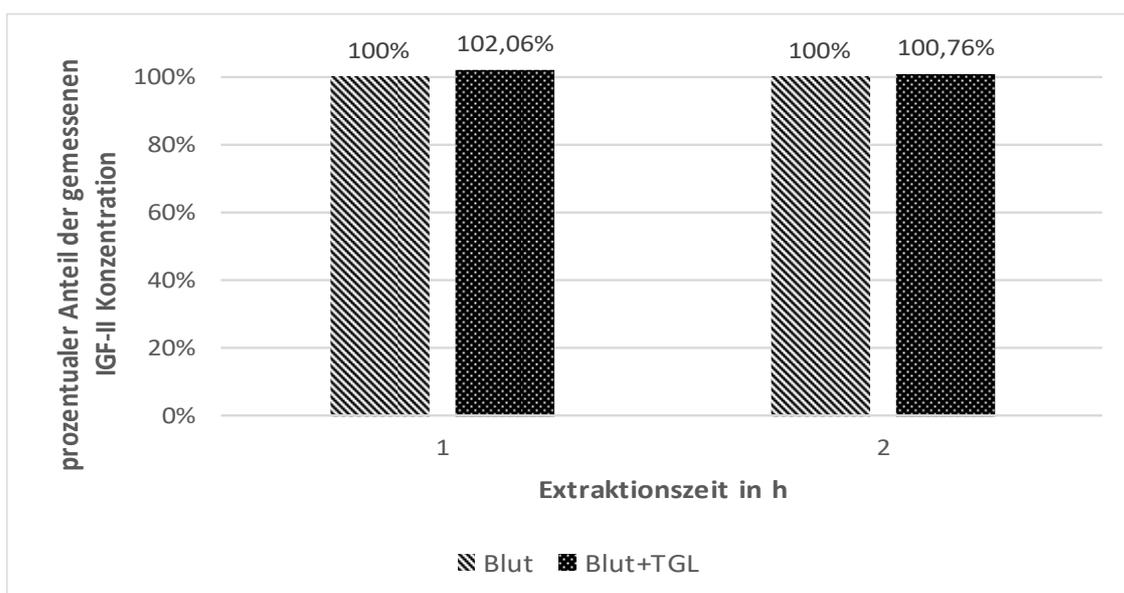


Abbildung 7 Triacylglycerid Einfluss auf die IGF-II Konzentration (n = 3)

Die dargestellten Säulendiagramme vergleichen sowohl die reinen Vollblut-DBS-Proben mit den gespickten DBS-Proben (Schatz et al. 1983) als auch die Effekte der unterschiedlichen Extraktionszeiten auf die gelösten IGF-II Konzentrationen in Prozent.

3.5 ELISA Validierung

Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf das Testsystem des Immunassays ELISA E30 und nur, wenn explizit genannt, auf die Messungen der IGF-II Konzentrationen aus DBS. Die Kenntnis über die verschiedenen Leistungsdaten des ELISA E30 sollte der Reflexion und Unterstützung des neu gewonnenen Anwendungsbereiches dienen. Zudem konnten auf diese Weise die Herstellerangaben nachvollzogen und überprüft werden.

3.5.1 Inter- und Intra-Assay-Varianz

Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse zwischen fünf Assays, in welchen die Proben 1–3 jeweils gemessen wurden. Aus den ermittelten Werten wurde der Variationskoeffizient (V_k) berechnet. Dafür wurde die Standardabweichung (s) im Verhältnis zum Mittelwert (\bar{x}) betrachtet und mit 100 multipliziert. Es ergab sich ein Variationskoeffizient $\leq 4,6\%$.

Tabelle 13 Inter-Assay-Varianz (n_{Proben} = 3 bei n_{Assays} = 5)

	Mittelwert \bar{x} [ng/ml]	Standardabweichung s [ng/ml]	Variationskoeffizient V_k [%]
Probe 1	828,5	16,9	2,0
Probe 2	843,0	24,1	2,7
Probe 3	692,1	31,6	4,6

Innerhalb eines Assays wurden die Proben 1–5, siehe Tabelle 14, mehrfach bestimmt. In Anlehnung an die Berechnung des Variationskoeffizienten für die Bestimmung der Inter-Assay-Varianz, ergab sich für die Intra-Assay-Varianz ein Variationskoeffizient $\leq 6,2\%$.

Tabelle 14 Intra-Assay-Varianz (n = 5)

	Mittelwert \bar{x} [ng/ml]	Standardabweichung s [ng/ml]	Variationskoeffizient V_k [%]
Probe 1	911	20	2,2
Probe 2	657	13	2,0
Probe 3	554	20	3,6
Probe 4	610	23	3,8
Probe 5	674	42	6,2

Die Ergebnisse liegen unterhalb der Herstellerangaben, die in der Gebrauchsanweisung des ELISA-Kits angegeben sind. Hier wurden Variationskoeffizienten $\leq 7,2\%$, für die Inter-Assay-Varianz und $\leq 6,6\%$, für die Intra-Assay-Varianz, ermittelt.

3.5.2 Sensitivität und Linearität

Die Sensitivität (Nachweisgrenze/Empfindlichkeit) ist definitionsgemäß die geringste Konzentration, die noch eine deutlich höhere Extinktion (OD) als der Leerwert hervorruft. Die analytische Sensitivität des ELISA E30 wurde mit 0,027 ng/ml des zweifachen Null-Standards in 8-fach Bestimmung bei einer 1:401 Verdünnung gemessen. Verglichen mit den Herstellerangaben zur Sensitivität (= 0,02 ng/ml), ist das Ergebnis um 0,007 ng/ml erhöht. Allerdings wurde nach Herstellerangaben in 20-fach Bestimmung bei einer 1:401 Verdünnung ermittelt, sodass aufgrund der größeren Probenzahl, der Unterschied erklärbar sein könnte. Eine Abweichung von 0,007 ng/ml ist, bezogen auf den breiten Referenzbereich des IGF-II, zu vernachlässigen. Zur Ermittlung der Sensitivität wurden die in zweifach Bestimmung gemessenen Extinktionen der Leerwerte gemittelt und gegen die bekannten STD Konzentrationen (entspricht der abhängigen Variable) der STD A–E aufgetragen. Das errechnete Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9961$ zeigt, dass das gewählte Regressionsmodell die erhobenen Daten gut erklärt.

Für den Linearitätsnachweis der Plasma- und Filterpapierproben wurde ein (multivariates) polynomiales Regressionsmodell bis zur dritten Ordnung von der Form:

$$y_i = a_m \cdot x_i^m + \dots + a_1 \cdot x_i + a_0 + \epsilon_i, 1 \leq i \leq n, m \in \{1, 2, 3\}$$

verwendet, wobei für die Fehler ϵ_i die üblichen Voraussetzungen gemacht wurden. Die Fehler sind also normalverteilt, unkorreliert und homoskedastisch. Unter diesen Voraussetzungen lassen sich die Hypothesen:

$$H_0: a_1 = 0 \text{ gegen } H_1: a_1 \neq 0 \text{ im linearen Modell } (m = 1)$$

$$H_0: a_2 = 0 \text{ gegen } H_1: a_2 \neq 0 \text{ im quadratischen Modell } (m = 2)$$

$$H_0: a_3 = 0 \text{ gegen } H_1: a_3 \neq 0 \text{ im kubischen Modell } (m = 3)$$

mittels eines t-Tests zum Niveau α überprüfen.

Wird H_0 im linearen Modell abgelehnt, im quadratischen und kubischen Modell aber nicht, so ist aus entscheidungstheoretischer/statistischer Sicht rational eine Entscheidung zugunsten des linearen Modells zu treffen. Es sei angemerkt, dass diese Modellselektion zwar nicht zum Niveau α der einzelnen Tests gesichert ist, aber ein linearer Zusammenhang zwischen Messsignal und Konzentration hierdurch im Sinne der statistischen Entscheidungstheorie gezeigt wird.

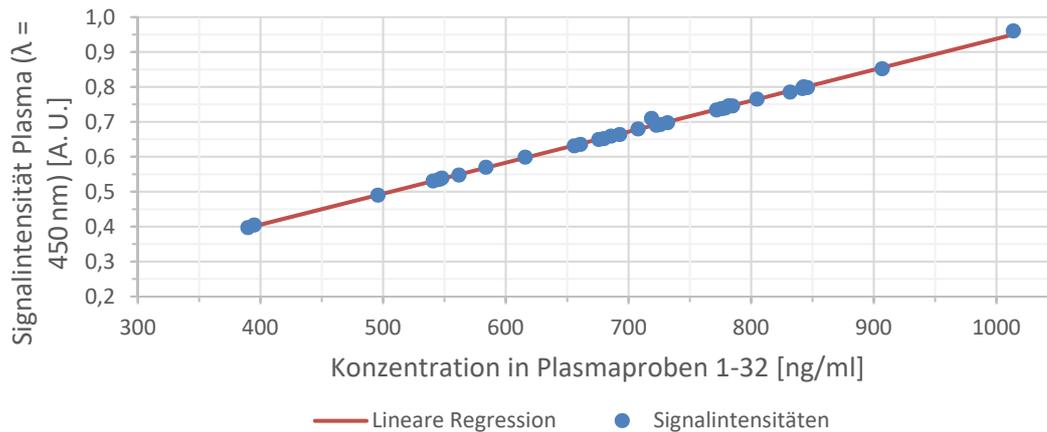


Abbildung 8 Linearität der Plasmaproben 1–32

Die Regressionsanalyse zeigt eine Gerade, um welche die gemessenen Signalintensitäten angeordnet sind. Das korrigierte Bestimmtheitsmaß ergibt sich zu $R^2_{\text{kor}} = 0,9986$. Bei $R^2 = 1$ würden alle Messpunkte exakt auf der Geraden liegen und somit das verwendete Modell die Daten zu 100% erklären.

Für die Plasmaproben 1–32 konnte die Linearität wie beschrieben für Konzentrationsbereiche von 390 ng/ml bis 1014 ng/ml in Plasmaproben bei Einsatz des ELISA E30 gezeigt werden. Abbildung 8 zeigt die dazugehörige lineare Regressionsanalyse. Die konkreten Werte werden nachfolgend aufgeführt. Für das lineare Regressionsmodell ($m = 1$) ergab sich ein p-Wert $< 0,00001$, was die hohe statistische Signifikanz des linearen Koeffizienten a_1 zeigt. Der Wert der Teststatistik ($|T|$) beträgt $|T| = 148,91$ und der kritische Wert (t) $t_{30;0,975} = 2,0423$. Dagegen ergab sich für den Koeffizienten a_2 im quadratischen Modell ($m = 2$) ein p-Wert von 0,1986 ($|T| = 1,3157$ und $t_{29;0,975} = 2,0452$). Der Koeffizienten a_3 des kubischen Modells ($m = 3$) hat einen p-Wert von 0,2225 ($|T| = 1,2478$ und $t_{28;0,975} = 2,0484$), so dass die

Nullhypothese für die Koeffizienten a_2 und a_3 in beiden Modellen nicht abgelehnt wurde. Diese Koeffizienten sind somit in den jeweiligen Modellen statistisch nicht signifikant, was das lineare Modell als angemessene Beschreibung des beobachteten Zusammenhangs bestätigt. Dies wird weiterhin dadurch gezeigt, dass der lineare Koeffizient im quadratischen Modell mit einem p-Wert $< 0,00001$ statistisch signifikant ist, der Koeffizient a_2 im kubischen Modell mit einem p-Wert von $0,2715$ jedoch nicht. Zudem ist der lineare Koeffizient im kubischen Modell mit einem p-Wert von $0,000035$ ebenfalls wieder statistisch signifikant. Insgesamt ergab die statistische Modellselektion unter den oben aufgeführten Modellen, dass nur das lineare Modell statistisch signifikant ist und den beobachteten Zusammenhang angemessen beschreibt.

Die Berechnung des korrigierten Bestimmtheitsmaßes ergab für die Plasmaproben 1–32 das Ergebnis $R_{\text{kor.}}^2 = 0,9986$. Dieser Wert zeigt eine sehr geringe Varianz der abhängigen Variable (Signalintensität) und unterstützt die graphische Versuchsauswertung in ihrer Aussage. Es besagt, dass 99,86% der Streuung durch das angenommene (lineare) Modell erklärt wird. Für die betrachteten Modelle wurde durchgängig das korrigierte/adjustierte Bestimmtheitsmaß betrachtet, um eine mögliche Überanpassung (Overfitting) erkennen zu können.

Im Einzelnen ergaben sich für die Plasmaproben 33–62 folgende Werte:

Tabelle 15 Statistik der Linearität der Plasmaproben 33–62

Modell	Modell-parameter	Teststatistik T 	Kritischer Wert	p-Wert
Linear	a_1	263,1479	$t_{27;0,975} = 2,0518$	$< 0,0001$
quadratisch	a_2	1,7349	$t_{26;0,975} = 2,0555$	0,0946
	a_1	14,8179		$< 0,0001$
Kubisch	a_3	0,6053	$t_{25;0,975} = 2,0595$	0,5504
	a_2	0,6817		0,5016

Auch hier ist der lineare Koeffizient des linearen und quadratischen Modells statistisch signifikant, während dies auf die Koeffizienten a_2 des quadratischen und kubischen und des Koeffizienten a_3 des kubischen Modells nicht zutrifft. Die

durchgeführte statistische Modellselektion bestätigt den linearen Zusammenhang und damit die Angemessenheit des linearen Modells. Abbildung 9 zeigt den linearen Verlauf der untersuchten Proben in einer graphische Darstellung. Das korrigierte Bestimmtheitsmaß der gezeigten Geraden beträgt $R^2_{\text{korrt.}} = 0,9996$, was den linearen Zusammenhang ebenfalls bestätigt.

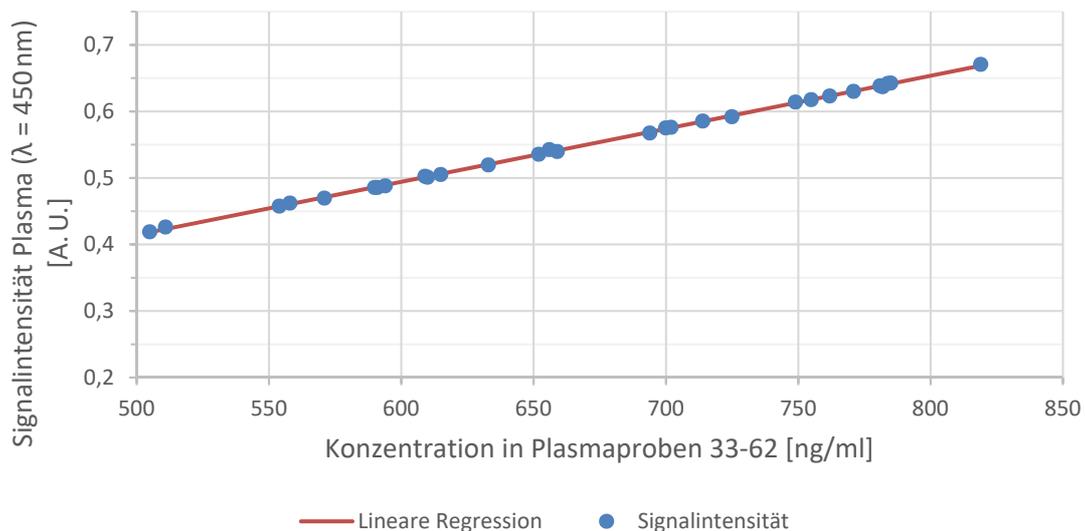


Abbildung 9 Linearität der Plasmaproben 33–62

Die Regressionsanalyse zeigt eine Gerade, um welche die gemessenen Signalintensitäten angeordnet sind. Die Abstände der Signalintensitäten zur Geraden entsprechen den Fehlern. Das korrigierte Bestimmtheitsmaß beträgt $R^2_{\text{korrt.}} = 0,9996$

Für die Filterpapierproben 1–32 und 33–62 ist ein linearer Zusammenhang ebenfalls nach dem beschriebenen Verfahren überprüft worden. Dabei konnte die Linearität bei den Filterpapierproben 1–32, die in Abbildung 10 wiedergegeben sind, für Konzentrationen im Bereich von 538 ng/ml bis 910 ng/ml nachgewiesen werden. Bei Einschluss weiterer vier Proben unterhalb der Grenze von 538 ng/ml mit den Konzentrationen 360 ng/ml (Probe 32), 429 ng/ml (Probe 17), 507 ng/ml (Probe 28) und 512 ng/ml (Probe 4) waren auch die höchsten Koeffizienten im quadratischen und kubischen Modell signifikant. Genauer ergab sich unter der genannten Einschränkung der Stichprobe für den linearen Koeffizienten a_1 des linearen Modells ein statistisch hoch signifikanter p-Wert $< 0,00001$ ($|T| = 223,5442$ und $t_{26,0,975} = 2,0555$). Der Koeffizient a_2 des quadratischen Modells war mit einem p-Wert von 0,1385 ($|T| = 1,5301$ und

$t_{25,0,975} = 2,0595$) genauso wie der Koeffizient a_3 des kubischen Modells mit einem p-Wert von 0,1604 ($|T| = 1,4486$ und $t_{24,0,975} = 2,0639$) nicht statistisch signifikant. Gleiches gilt für den Koeffizienten a_2 des kubischen Modells mit einem p-Wert von 0,1420 ($|T| = 1,5183$ und $t_{24,0,975} = 2,0639$). Der lineare Koeffizient a_1 ist auch im quadratischen Modell (p-Wert $< 0,00001$) statistisch signifikant ($|T| = 14,8512$ und $t_{25,0,975} = 2,0595$), so dass die durchgeführte Modellselektion auch hier den linearen Zusammenhang bestätigt. Dies zeigt auch das korrigierte Bestimmtheitsmaß mit einem außerordentlich hohen Wert von $R_{\text{kor.}}^2 = 0,9996$.

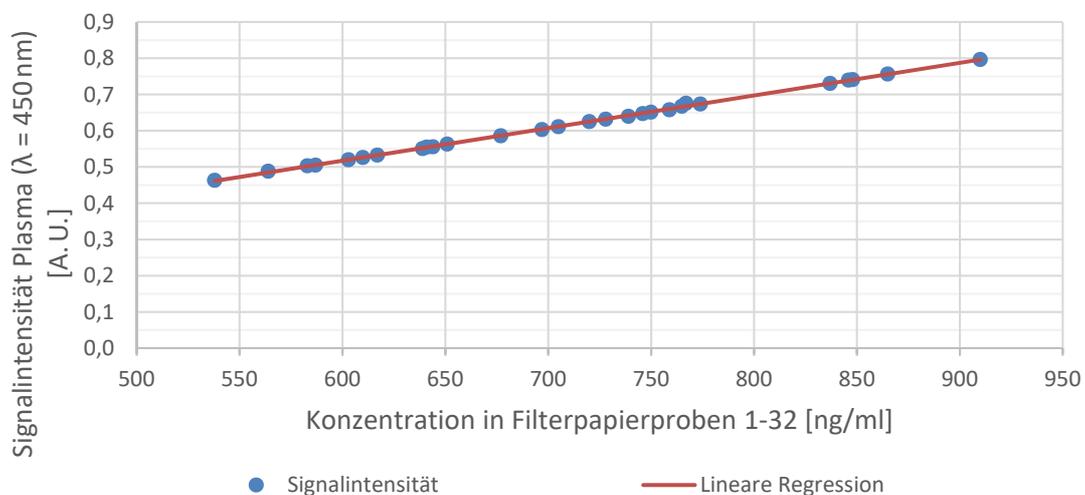


Abbildung 10 Linearität der Filterpapierproben 1–32

Die Regressionsanalyse zeigt eine Gerade, um welche die gemessenen Signalintensitäten angeordnet sind. Das korrigierte Bestimmtheitsmaß beträgt $R_{\text{kor.}}^2 = 0,9996$.

Auch bei den Filterpapierproben 33–62 kann ein linearer Zusammenhang in Konzentrationsbereichen von 475 ng/ml bis 744 ng/ml gezeigt werden. Mit einem Bestimmtheitsmaß von $R_{\text{kor.}}^2 = 0,9992$ ergibt sich auch hier ein hoher Wert.

Im Einzelnen ergaben sich für die Filterpapierproben 33–62 die nachfolgend aufgeführten Werte:

Tabelle 16 Statistik der Linearität der Filterpapierproben 33–62

Modell	Modellparameter	Teststatistik $ T $	Kritischer Wert	p-Wert
linear	a_1	190,0175	$t_{27;0,975} = 2,0518$	$< 0,0001$
quadratisch	a_2	0,6552	$t_{26;0,975} = 2,0555$	0,5181
	a_1	11,3280		$< 0,0001$
kubisch	a_3	1,4382	$t_{25;0,975} = 2,0595$	0,1628
	a_2	1,4634		0,1558

Auch hier ist der lineare Koeffizient des linearen und quadratischen Modells statistisch signifikant, während dies auf die Koeffizienten a_2 des quadratischen und kubischen und des Koeffizienten a_3 des kubischen Modells nicht zutrifft. Die durchgeführte statistische Modellselektion bestätigt den linearen Zusammenhang und damit die Angemessenheit des linearen Modells. Abbildung 11 verdeutlicht das Ergebnis auf graphische Weise.

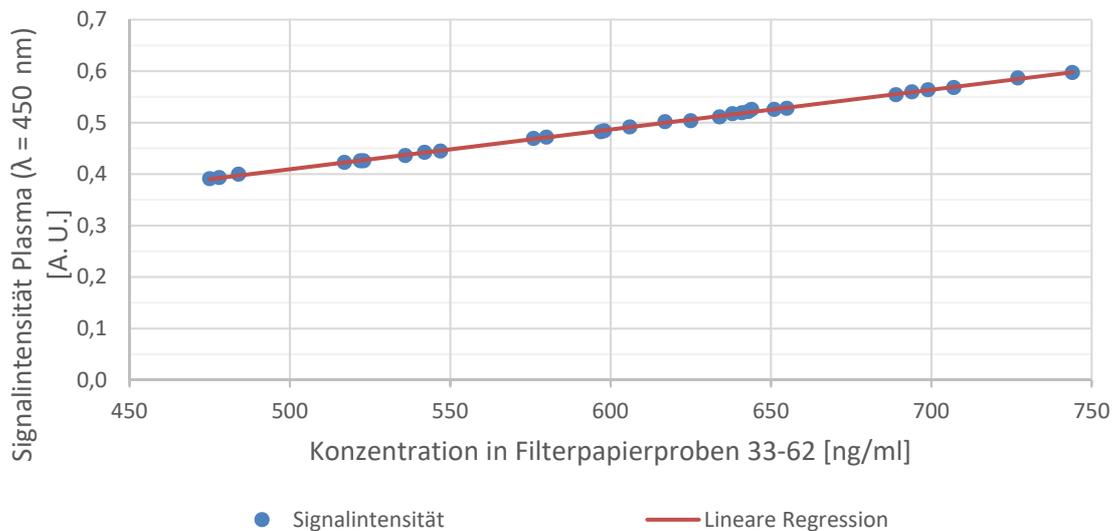


Abbildung 11 Linearität der Filterpapierproben 33–62

Die Regressionsanalyse zeigt eine Gerade, um welche die gemessenen Signalintensitäten angeordnet sind. Das korrigierte Bestimmtheitsmaß beträgt $R^2_{\text{kor.}} = 0,9992$.

3.5.3 IGF-II Recovery

Mit einem humanen rekombinanten Analyten wurde das Probenmaterial und vergleichsweise der Probenpuffer, mit 1500 ng/ml NIBSC IGF-II angereichert und

gemäß des Testsystemes eingesetzt. Die relative Wiederfindung wurde in Bezug auf die Analytenkonzentration im PP berechnet. Eine relative Abweichung von $\pm 20\%$ der Sollwerte galt als akzeptabel. Die gewonnenen Ergebnisse, die in Tabelle 17 aufgelistet sind, zeigen maximale Abweichungen von $+9\%$. Daraus folgt, dass im ELISA E30 eine korrekte Wiederfindung des IGF-II problemlos möglich ist.

Tabelle 17 IGF-II Recovery (n = 3)

	Sollwert [ng/ml]	Sollwert mit NIBSC [ng/ml]	Gemessene Werte im E30 [ng/ml]	Wiederfindung [%]
PP+NIBSC	1894			
Probe 1	711	2605	2845	109
Probe 2	736	2630	2745	104
Probe 3	832	2726	2807	103

3.5.4 IGF-II Kreuzreaktivität

Nachdem der Probenpuffer mit supraphysiologischen Konzentrationen der Kreuzreaktivitätenproben (C-Peptid, Insulin und IGF-I) versetzt worden ist, wurden die einzelnen Substanzen getestet. Die supraphysiologischen Konzentrationen sollten gewährleisten, dass eine Messung nicht aufgrund einer zu geringen Probenmenge scheiterte. Die Kreuzreaktivität gibt an, wieviel Prozent der strukturverwandten Antigene fähig sind, anstelle des eigentlichen Antigens, an den Zielanalyten zu binden.

Der Nachweis einer IGF-I Kreuzreaktivität im E30 war trotz extrem hoher IGF-I Zugabe nicht möglich. Das bedeutet, dass die im Assay gebundenen IGF-I Mengen kleiner als die analytische Sensitivität (0,027 ng/ml) des E30 war. Da keine Konzentrationen messbar waren, wurde die analytische Sensitivität als Bezugsgröße zur Ermittlung der maximal möglichen Kreuzreaktivität in Tabelle 18 angenommen.

Tabelle 18 Kreuzreaktivität mit IGF-I

Zusatz IGF-I [ng/ml]	Gemessene Konzentration [ng/ml]	Anteil in [%]
250	0,027	0,011
750	0,027	0,004
1250	0,022	0,002

Die extrem niedrige Kreuzreaktivität der IGF-II-AK mit IGF-I, ermöglicht das Prinzip des Assays. Durch überschüssige IGF-I Konzentrationen, werden IGFBPs nach der Dissoziation durch den sauren PP blockiert und deren Interferenzen im ELISA E30 unterbunden. Wie die Ergebnisse zeigten, stört der nötige IGF-I Überschuss die spezifische IGF-II Bindung nicht.

Auch die Erkenntnisse zur Kreuzreaktivität des E30 mit dem C-Peptid, siehe Tabelle 19, zeigten eindeutige Ergebnisse. Aufgrund eines maximalen Bindungsanteiles von 1,1% konnte eine Bindung von C-Peptid an den Zielanalyten für die Messungen vernachlässigt werden.

Tabelle 19 Kreuzreaktivität mit C-Peptid

Zusatz C-Peptid [ng/ml]	Gemessene Konzentration [ng/ml]	Anteil in [%]
500	0,099	0,02
100	0,121	0,12
10	0,110	1,10

Auffälligkeiten konnten bei den Insulinproben beobachtet werden. Tabelle 20 zeigt bei einer Insulinkonzentration von 1 ng/ml eine Bindungswahrscheinlichkeit von 18,1% zwischen Zielanalyten und Kreuzreaktant. Wohingegen die übrigen Konzentrationen, die um den Faktor 10 und 100 größer waren, keinen Hinweis auf eine Kreuzreaktivität ($\leq 1,32\%$) gaben. Nüchterne Blutserumwerte von Insulin liegen mit Konzentrationen zwischen 0,13-0,7 ng/ml unterhalb der als Proben eingesetzten supraphysiologischen Mengen.

Tabelle 20 Kreuzreaktivität mit Insulin

Zusatz Insulin [ng/ml]	Gemessene Konzentration [ng/ml]	Anteil in [%]
100	0,105	0,11
10	0,132	1,32
1	0,181	18,1

4 Diskussion

4.1 Relevanz der Untersuchungen

Bei Tumorerkrankungen, wie beispielsweise Non-Hodgkin-Lymphomen, Nephroblastomen und anderen soliden Tumoren, lassen sich veränderte Serum- und Plasmakonzentrationen der Bestandteile des IGF-Systems nachweisen. Die beschriebenen Tatsachen sind wissenschaftlich mehrfach überprüft und bestätigt (Elminger et al. 2001; Elminger et al. 1999; Mohnike et al. 1995). Auf dieser Erkenntnis aufbauend, wurde in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit zur Erweiterung des ELISA E30 IGF-II Testverfahrens untersucht und entwickelt. Neben dem eingesetzten ELISA E30 waren zur Methodenentwicklung auch DBS unabdingbar. DBS auf Filterpapierkarten stellen eine gut etablierte und valide Methode dar. Seit vielen Jahren werden DBS für das Neugeborenen-Screening, zur Nährstoffmangelerfassung, bei Infektionskrankheiten und zum Nachweis von Wachstumshormonen und -faktoren standardisiert eingesetzt (Guthrie und Susi 1963; Missler et al. 1994; Hoxie et al. 1992; Schütt et al. 2003). Das verwendete Filterpapier von Whatman Schleicher und Schuell 903 gilt als anerkannter internationaler Standard (Schütt et al. 2003). Physikalische Parameter wie Luft-/Wasserdurchfluss sowie Wasseraufnahme sind bekannt. Der lockere Papieraufbau aus Baumwollfasern kann Blutropfen schnell aufnehmen (Zabransky et al. 2001; Gakhar und Holodniy 2014).

4.2 IGF-II Dysregulationen: Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

4.2.1 Fetale Dysregulation

In den vergangenen Jahren hat der Wissenszuwachs bezüglich des IGF-II Vorkommens zu gehäuftem Messungen des Wachstumsfaktors geführt. IGF-II wirkt von der Embryonalentwicklung bis zum Erwachsenenalter auf eine Vielzahl von Organen und Geweben regulierend (Livingstone 2013; Livingstone und Borai 2014). Livingstone und Borai (2014) forderten 2014 explizit in einem

zusammenfassenden Artikel die Dringlichkeit der Anwendung der IGF-II Messungen sowie eine Methodenoptimierung. Gestützt waren deren Aussagen auf eine Darstellung der Folgen von IGF-II Dysregulationen. Ein Überblick hierüber und deren Nachweis durch den ELISA E30 werden im Folgenden diskutiert:

Der IGF-II Einfluss auf Interstitium, Lunge, Leber und Gehirn beim Kind und Erwachsenen ist bereits intensiv untersucht. Der IGF-II Einfluss auf den Fötus ist bisher ausschließlich an Tieren untersucht worden. Pränatal werden IGF-I, IGF-II und IGF-Rs um das 5 bis 8-fache, verstärkt exprimiert (Freier et al. 2005). In utero unterstützt IGF-II das Wachstum des Mesoderms. Es vermittelt das Einwachsen sowie die Proliferation der Trophoblasten in die Gebärmutterschleimhaut und den Nahrungstransport. Eine IGF-II Fehlregulation zeigt sich in embryonaler Wachstumsverzögerung (Livingstone und Borai 2014).

Von theoretischer Seite aus wäre die fetale IGF-II Bestimmung nach einer Cordozentese im E30 durchführbar, wohingegen Fruchtwasser, laut Hersteller, im Assay nicht untersucht werden kann (Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH, Testanleitung 2007). Durch Punktion der Vena umbilicalis kann Nabelschnurblut gewonnen und zur Diagnostik verwendet werden. Abzuwägen sind die 1-2%igen Abortraten sowie die Punktionsrisiken, wie z.B. intrauterine Infektionen oder vorzeitiger Blasensprung. Das Risiko im Vergleich zum Nutzen, muss für den Fötus individuell abgewogen werden (Strauss 2008).

Genetische Dispositionen können sich auf die folgende Generation auswirken. Deutlich wird dies bei Neugeborenen von adipösen Müttern. Erhöhte IGF-II Spiegel im Nabelschnurblut wirken sich positiv auf das Geburtsgewicht des Säuglings aus. Hingegen kann Fettleibigkeit des Vaters zu Mutationen des IGF 2-Gens führen. Infolge dessen wird der fetale Stoffwechsel beeinträchtigt (Hoyo et al. 2012). Anwendbar ist der E30 für die IGF-II Messung aus Nabelschnurblut auf DBS. Eine praktische Anwendung der Untersuchung wäre möglich und könnte ergänzend zum Neugeborenenenscreening durchgeführt werden. Sollte bereits zu diesem Zeitpunkt eine maligne Entartung oder

Prädisposition vorliegen, wird ein verminderter IGF-II Wert gemessen werden (Mohnike et al. 1995), wohingegen bei einem erhöhten Geburtsgewicht ein erhöhter IGF-II Wert zu erwarten wäre.

Tierexperimente in Feten zeigten, dass die IGF-II Konzentrationen sowie eine Überexpression von IGF2-R als Prävalenz für Herz-Kreislauf-Erkrankungen gelten. Proliferation und Hypertrophie der Kardiomyozyten sind die auslösenden Faktoren (Wang et al. 2011).

4.2.2 Adulte Dysregulation

Präpubertär ist bei gesunden Frauen IGF-II in den Ovarien nicht nachweisbar. Während der Pubertät kommt es ausschließlich zu einem lokalen Konzentrationsanstieg. Nach Abschluss der Pubertät manifestieren sich konstante IGF-II Blutwerte. Eine zyklusabhängige Veränderung der IGF-II Spiegel ist unphysiologisch (El-Roeiy et al. 1993). Um eine mögliche zyklusbedingte Veränderung nachzuweisen, würde sich die Verwendung der entwickelten Methode anbieten. Aufgrund der bestätigten DBS Lagerstabilität von zehn Tagen könnten mit Hilfe des ELISA E30 direkte Vergleiche über das Verhalten der IGF-II Konzentrationen des genannten Zeitraumes erhoben werden. In Anbetracht dessen, dass der am häufigsten tödlich verlaufende Tumor der Frau das Ovarialkarzinom ist, für welches IGF-II ein molekularer Marker darstellt (Sayer et al. 2005), wären auch hierfür längere Beobachtungszeiträume von Nutzen.

Einen weiteren großen Anwendungsbereich des E30 stellen die NICTH dar. Aktuell wird vermutet, dass viele IGF-2-oma assoziierte Tumore immer noch unbemerkt bleiben. Insbesondere, da hypoglykämische Zustände oft mit Diabetes oder Fastenzuständen diagnostiziert werden (Brabant et al. 1998). Hypoglykämische Symptome, etwa mentale Veränderungen, werden daher häufig fehlinterpretiert. Es ist erforderlich, das allgemeine Bewusstsein zu sensibilisieren, in Anbetracht der Tatsache, dass IGF-II als onkogener Wachstumsfaktor auftritt. Bei Erkrankungen mit Persönlichkeitsveränderungen unklaren Ursprungs, sollte die Abklärung eines entarteten IGF-II Spiegels in Betracht gezogen werden (Dahiya et al. 2013).

Da die IGF-II Konzentrationen bei einigen systemischen Erkrankungen verändert sind, können durch die Ermittlung im E30 frühzeitig Rückschlüsse auf die Prognose der Krankheit gezogen werden. Gesteigerte IGF-II Konzentrationen gelten als Prädisposition für die Entwicklung von Typ-I Diabetes. Dies darf nicht mit den klinischen Parameter von Typ-I Diabetikern verwechselt werden. Im Blutbild von Typ-I Diabetikern werden erniedrigte freie IGF-II Werte nachgewiesen, wohingegen die totale IGF-II Konzentration unverändert ist (Frystyk et al. 1999). Osteoporose Patienten werden üblicherweise mit Glucocorticoiden behandelt, die die IGFBP-1 Produktion erhöhen. Daraus resultiert eine IGF-II Reduktion. IGF-II Messungen können hier als Frakturvorhersage genutzt werden (Minuto et al. 2005).

Die vorangegangenen Beispiele offenbaren die Tragweite von IGF-II Veränderungen. Es wird deutlich, dass die entwickelte Methode in der Lage ist, einen breiten Anwendungsbereich abzudecken. Die Extraktion von IGF-II aus DBS sowie die totale IGF-II Konzentrationsmessung, sind mit dem E30 verlässlich, schnell und unkompliziert durchführbar. Durch die Nutzung von DBS ist es möglich, Proben für die Diagnostik in weit entfernte Regionen zu verschicken. Lediglich die Möglichkeit zur Blutabnahme und ein Zugang zur Post, müssen gewährleistet sein. Damit relativiert sich das von Seeber et al. (1998) beschriebene Problem, dass IGF-II Testverfahren nicht auf der ganzen Welt zu finden sind. Hingegen ist die Ermittlung des IGF 2-Gens und der Vorläuferproteinen im E30 ausgeschlossen. Aus diesem Grund kann der E30 nicht als universeller Test eingesetzt werden. Freies IGF-II, gebundenes IGF-II sowie big-IGF-II sind meist bei onkogenen Erkrankungen erhöht (Frystyk et al. 1998). Des Weiteren kann wegen der alleinigen Veränderung des IGF-II Wertes nicht mit hundertprozentiger Sicherheit eine Erkrankung bestätigt oder ausgeschlossen werden. Beispielsweise konnte in Untersuchungen zur extrapancreatischen Tumorhypoglykämie nachgewiesen werden, dass bei einer Mehrzahl der Erkrankten die big-IGF-II Konzentrationen erhöht waren, wohingegen gleichzeitig die IGF-II Werte verringert gemessen wurden (Zapf et al. 1992). Auch Teale und Marks (1990) betrachteten in Untersuchungen, aufgrund der aufgeführten Problematik, weitere IGF-II Interaktionen, wie das

Verhältnis von IGF-II zu IGF-I. Oftmals kann dieses auf eine maligne Entartungen, wie z.B. NICTH, hindeuten. In solchen Fällen ist der IGF-II Plasmaspiegel nicht oder nur geringfügig erhöht, wohingegen der IGF-I Spiegel sowie die GH-Konzentration deutlich zu gering ausfallen. Die IGF-II Werte sind dadurch, in Relation gesehen, erhöht und auffällig. Aus diesem Grund sollte bei Untersuchungen stets das Verhältnis von IGF-I zu IGF-II betrachtet werden.

4.3 Missbrauch von Wachstumshormon und dessen Auswirkungen auf das IGF System

Neben physiologischen IGF-II Effekten gibt es Fallkonstellationen, die eine IGF Erhöhung künstlich herbeiführen. Dazu zählt der Gebrauch von GHs beim Doping. GHs wirken sowohl direkt als auch indirekt über IGF-I und IGF-II. Im Blut gedopter Sportler können erhöhte IGF-Werte nachgewiesen werden (Schanzer und Thevis 2007). Der Nachweis von Dopingmissbrauch ist schwierig, da GHs eine sehr kurze HWZ von 20–25 Minuten haben. Die HWZ von gebundenen IGF- II, ist mehrere Stunden lang. Die HWZ wird beim Doping zusätzlich verlängert, da neben den IGF-II Spiegeln auch die IGFBP-2 Konzentrationen ansteigen (Doenecke und Karlson 2005). Außerdem kann bei exzessivem Abusus phänotypisch ein Akrenwachstum beobachtet werden (Abellan et al. 2008). Dementsprechend kann die Bestimmung des IGF-II Spiegels ein Indiz für einen Missbrauch sein. Zum vereinfachten Nachweis würde sich solch eine Überprüfung mit DBS und dem E30 durchführen lassen.

4.4 Diskussion der eigenen Ergebnisse

4.4.1 IGF-II Gewinnung aus DBS

Unter Beachtung der genannten Besonderheiten stellen die aufgeführten Ergebnisse eine verlässliche Messmethode von DBS aus Filterpapier dar. Aus den Filterpapierkarten von 62 Proben konnten, unter Anwendung der Regressionsanalyse nach Passing-Bablok, IGF-II Plasmawerte von 94% gewonnen werden. Eine Korrelation zwischen den DBS-Messungen und der

Plasmakonzentrationen ist mit $r = 0,872$ und einer Signifikanz von $p < 0,0001$ akzeptabel. Mittels Passing-Bablok Regressionsanalyse konnte ein systematischer und proportionaler Fehler des Verfahrens ausgeschlossen werden. Der Cusum Linearitätstest zeigte ebenfalls keine signifikante Abweichung der Messmethoden (Passing und Bablok 1983). Bezugnehmend auf die Ergebnisse des Bland-Altman-Plots konnte eine Abweichung von $\pm 20\%$ nicht eingehalten werden. Betrachtet man die statistischen Ergebnisse, so lehnt der Plot die Nullhypothese ab und kann keine Äquivalenz der beiden Verfahren nachweisen. Die Obergrenze weicht innerhalb eines 95%igen CI mit $+23\%$ um $+3\%$ von dem medizinisch festgelegten Limit ab. Ein Überschreiten von $+3\%$ ist aus klinischer Sicht bzw. für den einzelnen Patienten als eher unproblematisch einzuschätzen. Betrachtet man die extrem hohen IGF-II Konzentrationen bei Tumoren, so sind $+23\%$, anstelle von $+20\%$ Abweichung, vertretbar (Dynkevich et al. 2013). Das Einfügen eines Korrekturfaktors in den Bland-Altman-Plot stellt eine weitere Möglichkeit der Testanpassung dar. Bei der Passing-Bablok Regressionsanalyse sind 94% der Plasmawerte in DBS gemessen worden. Damit fehlen 6% für eine 100%ige Messung. Betrachtet man die Werte des Bland-Altman-Plots, so sind auch hier die fehlenden 6%, als Abweichung des Mittelwertes zu finden. Da die angewendeten statistischen Verfahren sehr sensitiv sind und eine Abweichung des Mittelwertes von $+6\%$ akzeptabel ist, ist es möglich die Differenz der beiden Messverfahren durch einen konstanten Korrekturfaktor zu berücksichtigen. Der zugrunde liegende proportionale Fehler wird durch die Korrektur des Mittelwertes ausgeglichen. Daraus ergibt sich für diesen ein Wert von 0%, anstelle von $+6\%$. Folglich würden sich die Konfidenzgrenzen auf $\pm 17\%$ verändern und damit dem Limit of Agreement entsprechen. Aus statistischer Sicht erscheint diese Korrektur sinnvoll, insbesondere da mithilfe der Messergebnisse der Passing-Bablok Regressionsanalyse die Berechnung des Bland-Altman Plots möglich ist (Carey 2005).

Darüber hinaus sind die DBS-Proben mindestens bis zu 10 Tage nach Probengewinnung, bei Lagertemperaturen zwischen -20°C bis $+37^{\circ}\text{C}$, ohne relevante Veränderung stabil. Die minimal zu beobachtenden Effekte differierten

innerhalb von $\pm 10\%$ zum Ausgangswert. Auf postalischem Weg ist ein Versand unter diesen Bedingungen ohne Verfälschung der Messergebnisse möglich. Kritisch betrachtet werden muss, dass insbesondere im Hochsommer, $+37^{\circ}\text{C}$ während des Transports nicht auszuschließen sind. Resümierend gilt, dass im Hinblick auf Deutschland eine uneingeschränkte Empfehlung für die DBS-Übermittlung per Post, nur bei entsprechenden Temperaturen gegeben werden kann. In Bezug auf die Extraktion von IGF-II aus DBS mit PP, sind Temperaturen zwischen $+4^{\circ}\text{C}$ bis $+37^{\circ}\text{C}$ unproblematisch. Im Vergleich zu den Beschreibungen anderer Autoren, die ähnliche Methoden für die Extraktion, z.B. von IGF-I aus DBS untersucht haben, sind die gewonnenen Ergebnisse ebenfalls zufriedenstellend. Jones (2001) gelang es 2001 zwischen 92–107% IGF-I aus DBS, verglichen mit den korrespondierenden Blutproben zu gewinnen. Für die Methodenkorrelation wurden mit $r = 0,98$ und $p < 0,0001$ noch bessere und eindeutigere Ergebnisse erzielt. Bezüglich der Lagerungszeiten der Filterpapiere wichen auch hier die Konzentrationsveränderungen bei -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ und RT um nicht mehr als 10% von der Ausgangsmessung ab. Allerdings erstreckte sich der beobachtete Zeitraum auf 40 Tage und nicht, wie hier untersucht, auf zehn Tage. Darüber hinaus unterscheiden sich die Untersuchungen bezüglich der Blutproben. Jones führte alle Versuche mit Kapillarblut aus der Fingerbeere durch.

Unterschiedliche Methoden zur optimierten Durchführung der IGF-II Gewinnung in Bezug auf Verdünnung, Schüttelfrequenz und Extraktionszeiten, brachten keinen Mehrgewinn hervor, sodass die Herstellerangaben für den vorgegebenen ELISA möglichst unverändert beibehalten wurden. Im Gegensatz zu den hier ermittelten Ergebnissen beschrieben Diamandi et al. (1998), dass eine Änderung der PP-Menge, d.h. des Verdünnungsverhältnisses, keine Veränderungen der Extraktionskonzentration ergaben.

4.4.2 Störeffekte auf DBS

4.4.2.1 Interferenzen in DBS

Interferenzen wurden durch die Zugabe der physiologischen Einflussgröße TAG getestet, die mit einer triglyzeridähnlichen Substanz nachgeahmt wurde. Als

solche Substanz wurde ClinOelic 20% der Firma Baxter eingesetzt. Handelsüblich wird ClinOelic 20% als Fettzufuhrpräparat zur künstlichen Ernährung eingesetzt. Es enthält 4 g ungesättigte Fettsäuren in Form von Oliven- und Sojaöl sowie 47 mg/ml Phospholipide. Diese sind aufgebaut aus Eilecithin, Glycerol und Natriumoleat (Baxter Deutschland GmbH 2014). Das Ergebnis zeigt eine klare Tendenz dahingehend, dass TAGs ($\leq 66,67$ ng/ml) keinen Einfluss auf die IGF-II Konzentration haben. Aussagen über die Auswirkung höherer TAG-Konzentrationen können nicht getroffen werden. Die eingesetzte Konzentration entspricht einer niedrigeren physiologischen Menge. Laut Empfehlungen der American Heart Association gelten TAG-Konzentrationen ≤ 150 mg/dl als physiologisch (Fritschka 2009). Da es sich um ein synthetisches Präparat handelt, können die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf physiologische Vorgänge übertragen werden. Andere Ergebnisse zeigten einen signifikanten Einfluss von TAG auf die humanen GH Messungen. Allerdings wurden in den zitierten Untersuchungen keine Nahrungsergänzungsmittel, sondern wasserfreies Butterfett als TAG-Präparat verwendet. Diese Materialabweichung könnte der Grund sein für die unterschiedlichen Ergebnisse bzgl. des Triglyzerideinflusses bei Immunassays (Langkamp et al. 2008). Einflüsse von Bilirubin und Prolactin wurden nicht ermittelt. Folglich ist hierzu keine Aussage möglich.

Diskutiert wird auch, ob die Durchführung der Blutentnahme bei DBS eine Rolle spielt. Die Verwendung von Heparin-, Citrat- und EDTA-Blut wurde in der Literatur überprüft. Bisher aber konnten die Ergebnisse nicht für die verschiedenen Immunassayarten vereinheitlicht werden. Beschrieben wird, dass je nach eingesetztem Immunassay, Heparinproben zu leichten Messverfälschungen, bis hin zur völligen Assay-Inhibition führen (Gakhar und Holodniy 2014). Citratproben zeigen keinerlei Einfluss auf die Messergebnisse von Immunassays. Selbiges gilt, bis auf wenige Ausnahmen, für EDTA-Proben. Teilweise wurde eine ungleichmäßige Blutvolumenverteilung in EDTA-DBS nachgewiesen. Bei Einhaltung, der für hämatologische Untersuchungen vorgegebenen Materialmengen sowie für deren erlaubte Anwendungsbereiche, sind keine Messverfälschungen zu erwarten (Gakhar und Holodniy 2014; Janzen

et al. 2007). Versuche, die einen direkten Vergleich zwischen Kapillarblut- und EDTA-Vollblutproben in einem IGF-I-ELISA darstellen, zeigten keinerlei Messunterschiede (Diamandi et al. 1998). Dem gegenüber stehen Erkenntnisse, die reines Vollblut zur Probengewinnung bei Anwendung von immunfluoreszierenden Assays voraussetzen. Bei Verwendung von EDTA- sowie Citratproben, wurden falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse für Fluoreszenzimmunassays gemessen (Holtkamp et al. 2008; Janzen et al. 2007; Kohek et al. 2002). Auch für das ubiquitär angewendete Neugeborenencreening sind keine EDTA-Proben zugelassen, da diese falsch-negative Befunde des thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH), 17-OH-Progesteron und Galaktosämie bewirken (Harms und Olgemoller 2011).

Aufgrund der aktuellen Datenlage kann abschließend keine eindeutige Empfehlung zur Art der Blutentnahme gegeben werden. Daher sollten, um mögliche Messverfälschungen auszuschließen, reine Vollblutproben für DBS verwendet werden. Für die Serum- und Plasmaproben sind EDTA, Heparin und Citrat als Zusätze für die Bestimmung in ELISA's uneingeschränkt geeignet. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erworbene Proben eingesetzt. Zur Probenpräparation von DBS wird hier, im Gegensatz zu Plasma- und Serumproben, Vollblut ohne Gerinnungshemmer angewendet. Die Richtigkeit der kommerziell erworbenen Proben wurde vorausgesetzt – es fand keine Überprüfung der Herstellerangaben statt. Bei den korrespondierenden Plasmaproben handelte es sich um ausgewiesene EDTA-Plasmaproben. Laut Herstellerangaben können EDTA-, Heparin- und Citrat-Plasmaproben problemlos eingesetzt werden (Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH, Testanleitung 2007). Daher sind die erzielten Ergebnisse, in Bezug auf den Einfluss der genannten Zusätze, nachweislich fehlerfrei.

4.4.2.2 Limitation des Testverfahrens bzgl. des Hämatokritwertes

Auf ältere Radioimmunoassay (RIA)-Untersuchungsergebnisse basierend, wurden die DBS Proben – so weit möglich – mittig entnommen. Mögliche chromatografische Effekte oder Diffusionsfehler sollen so vermieden werden.

Denn in den vorliegenden Daten nahmen die chromatografischen Effekte in DBS von der Mitte zum Rand hin um 12–15% zu. Somit wird die höchste Reproduzierbarkeit der DBS Messungen ermöglicht, wenn mittig gestanzt wird (Schütt et al. 2003). Zu beachten ist, dass bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen nicht alle Stanzlinge exakt mittig aus den DBS entnommen werden konnten. Zur Überprüfung der Assayergebnisse war es erforderlich, mehrere Stanzlinge aus ein und derselben DBS Probe zu verwenden. Das mögliche Auftreten chromatografischer Effekte oder Diffusionsfehler, war in diesen Versuchen, der Notwendigkeit, mehrere Vergleichsmessungen aus einer einzigen DBS-Probe zu erheben, untergeordnet.

Basierend auf Erkenntnissen bekannter, vergleichbarer Studien wurde angenommen, dass Hämatokritwerte zwischen 31–60% keinen signifikanten Einfluss auf DBS-Messungen haben. Proben mit höheren oder geringeren Hämatokritwerten sollten nicht verwendet werden (Hoffman et al. 1996). Hämatokritwerte sind geschlechterspezifisch unterschiedlich. Im normalen Bereich liegen bei Frauen die Werte zwischen 36–45%, bei Männern etwas höher, zwischen 42–50% (Behrends 2017). Der vorgegebene Hämatokritbereich ist weitgefasst, sodass selbst unphysiologische Werte nur in Ausnahmefällen eine Ergebnisverfälschung bewirken (Denniff und Spooner 2010). Abnorme Werte sind bei Erkrankungen des Herzens, der Lunge oder der Nieren zu beobachten. Auch der Missbrauch beim Doping führt zu einer Hämatokriterhöhung. Hämatokritsenkend wirken beispielsweise Anämien und eine Überwässerung des Körpers (Hokema et al. 2008). Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Proben wurden nicht auf ihren Hämatokritwert untersucht. Da das Probenmaterial von kommerziellen Blutbanken bezogen wurde, wurde angenommen, dass die Hämatokritwerte innerhalb der physiologischen Grenzen liegen.

4.4.3 ELISA E30 Leistungsdaten

4.4.3.1 Präzision und Reproduzierbarkeit im ELISA E30

Die Genauigkeit der Messergebnisse hängt weniger von den Assayeigenschaften als vielmehr vom menschlichen Einfluss ab. Der ELISA E30

ist nämlich in der Lage, selbst geringste Konzentrationen von IGF-II aufgrund seiner hohen Sensitivität (0,027 ng/ml) zu messen. Limitierend auf die Messergebnisse wirken daher vor allem Pipettierungenauigkeiten und verunreinigte Proben. Inter- (< 4,6%) und Intra-Assay-Varianzen (< 6,2%) wurden unterhalb der Herstellerangaben bestimmt. Die niedrigen Variationskoeffizienten zeigen, dass eine geringe Streuung der Werte und folglich eine hohe Messpräzision des Testsystems nachweisbar sind (Kromidas 2011). Die Wiederfindung von IGF-II variierte zwischen 103–109%. Generell haben kommerzielle ELISA's hervorragende Leistungsdaten. Auch wissenschaftliche Arbeiten von Langkamp et al. (2008) konnten bei der Verwendung des herstellergleichen ELISA E022 bei der DBS-Messung von GH, vergleichbar überzeugende Assaycharakteristika verzeichnen: Sensitivität (0,0016µg/l), Inter- (< 5,98%) und Intra-Assay-Varianz (< 3,56%) und Recovery (> 89,5%). Bei der Betrachtung der Recovery Versuche zeigen beide Assays eine hohe Präzision, auch wenn im E30 mehr (> 100%) und im E022 weniger (< 100%) gesuchte Konzentrationen wiedergefunden wurden. Die Messwerte bestätigen, für sich gesehen, eine hohe Assayverlässlichkeit.

Die korrekte Probenlagerung und das Durchführen von Gefrier-/ Tauzyklen beeinflusst die Messungen. Das wiederholte Auftauen von Proben sollte auf ein Minimum reduziert werden. Aus diesem Grund durchliefen alle Materialien nicht mehr als drei Gefrier-/Tauzyklen, bevor sie entsorgt wurden. Außerdem sind, wie in der Literatur verzeichnet, die Temperaturbedingungen während der Testdurchführung ausschlaggebend. Der Hersteller des ELISA E30 empfiehlt die Messungen bei RT durchzuführen sowie Gefrier-/Tauzyklen, durch Probenaliquotierung, zu minimieren (Schneider und Grandke 2012; Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH, Testanleitung 2007). Betrachtet man die durchgeführten Versuche zur Extraktion von IGF-II aus DBS-Proben, kann allerdings kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen bei Temperaturen zwischen +4°C bis +37°C festgestellt werden. Die maximale Abweichung der extrahierten Konzentrationen vom Sollwert, nach Extraktion bei +37°C und anschließender Messung im E30 bei RT, zeigte sich mit +3,5%. Die Empfehlung der E30 Packungsbeilage ist eine Messung bei RT.

Da die Messergebnisse der Extraktion mit folgender E30 Messung bei RT mit +0,4% die geringsten Schwankungen aufwiesen, wurde für die DBS Extraktionen festgelegt, diese bei RT durchzuführen.

Die Linearitätsversuche der Plasmaproben dienten der Überprüfung des kommerziellen ELISA E30-Testkits. Die erhobenen Daten belegen die angenommenen Herstellerangaben. Wie in der Literatur beschrieben, wurden auch bei den durchgeführten Versuchen die geringsten Schwankungen des Messsignals bei RT konstatiert (Schneider und Grandke 2012). Des Weiteren gilt für den E30, dass bei den genannten Bedingungen sowie bei einer 1:401 Verdünnung, ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen Messsignal und Analytenkonzentration besteht. Das lineare Verhalten ist ein weiterer Ausdruck für die hohe E30 Testpräzision und für die Ermittlung verlässlicher Ergebnisse. Das lineare Verhalten der Filterpapierproben wurde nachweislich gezeigt. Einschränkend gilt, dass für Konzentrationen ≤ 512 ng/ml, widersprüchliche Beobachtungen gemacht wurden. Während für die Filterpapierproben 1–32 unterhalb einer IGF-II Konzentration von 512 ng/ml keine Linearität nachweisbar ist, verhalten sich die Filterpapierproben 33–62 bereits ab Konzentrationen von 369 ng/ml linear. Die sich gegenüberstehenden Versuchsergebnisse zeigen, dass grundsätzlich auch eine Linearität bei geringen IGF-II Konzentrationen nachweisbar ist. Da sich die voneinander abweichenden Ergebnisse auf niedrige IGF-II Werte beschränken, erscheinen als Erklärungsansätze Verdünnungs- oder Pipettierfehler unwahrscheinlich. Solche Fehler wären auf alle Proben verteilt. Festzuhalten ist somit, dass das untersuchte Probenmaterial von verschiedenen anonymen Spendern stammt. Störsubstanzen wie Bilirubin, Hämoglobin oder Triglyzeride können daher nicht ausgeschlossen werden (Dimeski 2008). Wissenschaftlich untersucht ist der High-dose-hook-Effekt in Sandwich-ELISA's zum Nachweis von AK, der z.B. bei unphysiologisch hohen Prolactin- und GH-Werten auftritt und zu falsch niedrigen Messwerten führt (Werder 2005). Ebenfalls ist in der vorliegenden Arbeit das Verhalten der genannten Substanzen, die einen High-dose hook Effekt verursachen können, auf die IGF-II Messung nicht bekannt. Weiterhin ist lediglich gesichert, dass TAG-Konzentrationen $\leq 66,67$ ng/ml Messveränderungen ausschließen. Vor der endgültigen klinischen

Anwendung des Tests erscheint eine erneute Abklärung bzgl. des linearen Verhaltens von niedrigen IGF-II Konzentrationen sinnvoll.

4.4.3.2 Kreuzreaktivitäten im ELISA E30

Es konnte keine Kreuzreaktivität zwischen C-Peptiden, Insulin oder IGF-I-Proteinen und dem ELISA E30 festgestellt werden. Da alle drei Substanzen eine große strukturelle Übereinstimmung mit dem Zielanalyten IGF-II haben, war eine Abklärung nötig. Als einzige Ergebnisabweichung ist die Abhängigkeit der IGF-II Konzentrationsbestimmung bei einem Insuligehalt von 1 ng/ml zu erwähnen. Hier wurde eine Kreuzreaktivität von 0,181 ng/ml gemessen, d.h. der AK ist in 18,1% der Assayproben eine Bindung mit Insulin anstelle des Zielanalyten IGF-II eingegangen. Dies steht im Gegensatz zu den Messungen der übrigen eingesetzten Insulinkonzentrationen, die um den Faktor 10 und 100 größer waren und keinen Hinweis auf eine Kreuzreaktivität ($\leq 1,32\%$) geben. Da ausschließlich ein einziger Wert von den übrigen Ergebnissen abweicht, muss hier ein Mess-, Verdünnungs- oder Pipettierfehler vorliegen. Daher wurde der entsprechende Wert nicht berücksichtigt. Generell sind kommerzielle Immunassays mit ihren Bestandteilen und deren Vorbehandlung so optimiert, dass Kreuzreaktivitäten äußerst selten vorkommen. Dies gilt insbesondere für nicht kompetitive Immunassays, zu denen auch der E30 zählt. Kompetitive Assays, die lediglich einen AK beinhalten, sind häufiger von Kreuzreaktivitäten betroffen. Diese werden allerdings in den Herstellerangaben eindeutig gekennzeichnet (Langkamp et al. 2008; Rauch et al. 2005). Der ELISA E30 ist, laut Mediagnost GmbH, IGFBP blockiert. Die extrem geringe Kreuzreaktivität des IGF-II-AK mit IGF-I wird genutzt, um nach der Komplexdissoziation von IGF-II und IGFBP durch Ansäuerungsschritte, freiwerdende IGFBPs durch IGF-I zu blockieren (Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH, Testanleitung 2007). Demzufolge bestätigen die gewonnenen Ergebnisse des E30 die Angaben des Assayherstellers.

4.5 Ausblick

Folgende Aspekte sind kritisch zu sehen und können daher die Grundlage für weitere Untersuchungen sein:

1. Die positiven Resultate gelten spezifisch für den IGF-II ELISA E30 der Firma Mediagnost. Für diesen Assay wurde eine Methode zur Messung der IGF-II Konzentration aus DBS entwickelt.
Weitere Versuche mittels RIA könnten den Wissensstand erweitern. Auch der Einsatz anderer Primär- und Detektor-AK und den somit modifizierten Assaycharakteristika, könnten neue Erkenntnisse hervorbringen.
2. Zur Erweiterung der Flexibilität des Verfahrens könnte die Probenstabilität für mehr als 10 Tage getestet werden.
3. Die Probengewinnung lässt noch Optimierungsschritte offen, beispielsweise die Blutentnahme aus der Fingerbeere. Die IGF-II Bestimmung würde auf diese Weise aus Kapillarblut ermittelt werden. Die Patienten könnten selbst zu Hause Proben erstellen und per Post verschicken. Zeitliche, personelle und finanzielle Einsparungen könnten dadurch verwirklicht werden.
4. Aufgrund der widersprüchlichen Linearitätsergebnisse in Bezug auf niedrige IGF-II Konzentrationen wäre vor der klinischen Anwendung eine erneute Untersuchung geringer Konzentrationen empfehlenswert.
5. Der Einfluss weiterer physiologischer Einflussgrößen, wie Bilirubin, Prolactin und Hämoglobin, könnte untersucht werden.

4.6 Schlussfolgerung

Auf die Fragestellung der Arbeit bezogen, lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Basierend auf dem Stand der Wissenschaft zur Messung von IGF-I aus DBS mittels ELISA, konnte ein effizientes Verfahren für die IGF-II Bestimmung entwickelt werden. Der ELISA E30 ist ein konventioneller Immunassay und ein verlässliches Testsystem für den Konzentrationsnachweis von IGF-II.

- Die vorliegenden Resultate sind speziell auf den ELISA E30 zu beziehen. Mit dem PP dieses Assays kann verlässlich humanes IGF-II aus DBS extrahiert werden. Daran anschließend kann der E30 ohne Modifikationen der Assaybestandteile nach Herstellerangaben durchgeführt werden.
- Als erfolgreich gelten Messungen dann, wenn die Ergebnisse nicht mehr als $\pm 20\%$ von den ermittelten Sollkonzentrationen abweichen. In Bezug auf Extraktionszeiten, Schüttelfrequenzen und Temperatureinflüsse ist der ELISA E30 unanfällig. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Extraktionszeiten von 0,5h bis zu 2h auf die Messungen geringe, zu vernachlässigende Auswirkungen zeigen. Ähnlich verhält es sich bei den Schüttelfrequenzen. Zu empfehlen sind 350 rpm. Sofern dies nicht umsetzbar ist, sind Frequenzen zwischen 0 rpm bis 800 rpm akzeptabel. Sowohl Extraktionstemperaturen von $+4^{\circ}\text{C}$ bis $+37^{\circ}\text{C}$ als auch Lagertemperaturen zwischen -20°C bis $+37^{\circ}\text{C}$ haben auf DBS keine nachteiligen Auswirkungen. Innerhalb dieses Temperaturbereiches sind die DBS für 10 Tage lagerstabil. Mit Ausnahme des Hämatokriteinflusses auf die DBS-Messungen, konnten keine weiteren physiologischen Faktoren die Extraktionseffizienz beeinflussen.
- Die Leistungsdaten des E30 verdeutlichen die optimalen Eigenschaften des Testsystems. Die hohe analytische Sensitivität ermöglicht es auch, geringste IGF-II Konzentrationen nachzuweisen. Das lineare Verhalten der ermittelten DBS-Konzentrationen zu den gemessenen Signalintensitäten wurde für IGF-II Konzentrationen $> 512 \text{ ng/ml}$ eindeutig bestätigt. Kreuzreaktivitäten mit IGF-I, Insulin oder C-Peptid, konnten ausgeschlossen werden. Die Inter- und Intra-Assay-Varianz entsprechen den für Immunoassays üblichen Werten.

Im Allgemeinen bringen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse praktische, finanzielle sowie wirtschaftliche Vorteile. Die Menge des nötigen Probenmaterials kann im Vergleich zur bisherigen Anwendung von Serum- oder Plasmaproben deutlich reduziert werden. Für die Probenpräparation sind wenige

Bluttropfen ausreichend. Zukünftige Untersuchungen können damit minimalinvasiver und patientenfreundlicher gestaltet werden. Kostenaufwändige Gefriertrocknungsprozesse oder das Einhalten kontinuierlicher Kühlketten, wie es bei Blutproben nötig ist, sind obsolet. Filterpapierkarten sind über mehrere Tage stabil. Der Probenumgang wird für alle Beteiligten – Patienten, Arzt und das beauftragte Labor – erleichtert.

5 Zusammenfassung

Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor II (IGF-II) beeinflusst in der Embryogenese die frühe Zellentwicklung sowie postnatal die Knochen-, Muskel- und Organentwicklung. IGF-II ist zu 67% strukturhomolog zum Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I (IGF-I). Der IGF-I hat postnatal maßgeblichen Einfluss auf das Längenwachstum von Kindern. IGF-I und IGF-II sind in ihrer chemischen Struktur mit Insulin verwandt, sodass beide Faktoren ähnliche Eigenschaften (zelluläre Aufnahme von Glukose und Aminosäuren, Zellvermehrung, Glykogenese und Lipogenese) wie Insulin aufweisen. Konzentrationsabhängig können IGF-I, IGF-II und Insulin über dieselben Rezeptoren wirken. Primär jedoch binden die IGFs an den IGF1- Rezeptor. Im Plasma sind IGF-I und IGF-II zu 99% an die Insulin-like-growth-factor-binding proteins 1–6 (IGFB 1–6) gebunden. Diese steigern die Halbwertszeit, regulieren die IGF Verfügbarkeit und ermöglichen den Transport zu den Zielzellen. Der Forschungs- und Wissensstand über den postnatalen Einfluss von IGF-II ist wesentlich geringer als der des IGF-I. Seit Anfang des 21. Jahrhunderts stellen Forschungsergebnisse und Berichte aus der Onkologie jedoch IGF-II, dort als IGF-2-oma bezeichnet, vermehrt in den Mittelpunkt des gesellschaftlichen Interesses. In einer beachtlichen Zahl von malignen Tumoren, wie beispielsweise Leber-, Brust-, Ovar- und Prostatakarzinomen sowie bei Hirntumoren im Kindes- und Jugendalter, wird IGF-II verstärkt als ursächlich benannt. Damit generieren das vermehrte klinische Auftreten unphysiologischer IGF-II Konzentrationen und dessen Folgen sowie der Wunsch nach Vereinfachung bisheriger IGF-II Bestimmungsmethoden die Motivation für die durchgeführten Versuche.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine verlässliche Messung der IGF-II Konzentration aus Trockenblutproben, sogenannten Dried Blood Spots (DBS), möglich ist. Das genannte Verfahren wird zur Messung des IGF-I bereits seit Jahren erfolgreich angewendet. Die Bestimmung des IGF-II aus DBS ist jedoch nicht verbreitet. Die starke strukturelle und funktionelle Übereinstimmung der IGFs legte es nahe, der Fragestellung nachzugehen, ob die DBS-Methode auch

zur Bestimmung des IGF-II tauglich ist. Als Testsystem der Versuchsreihe diente der IGF-II ELISA E30, ein Sandwich-Enzyme linked Immunosorbent Assay (Sandwich-ELISA) der Firma Mediagnost GmbH (Reutlingen). Der E30 wird in-vitro zur wissenschaftlichen und diagnostischen Messung von IGF-II in humanen Serum- und Plasmaproben eingesetzt. Nach Ermittlung der optimalen Extraktionsmethode und -zeit, der Lagerbedingungen und des optimalen Probenverdünnungsverhältnisses konnten die IGF-II Konzentrationen der DBS im IGF-II ELISA E30 bestimmt und mit den korrespondierenden Plasmakonzentrationen verglichen werden. Nach der Assayoptimierung erfolgte die Testvalidierung. Die hierbei erhobenen Versuchsergebnisse sind vielversprechend. Es konnte nachgewiesen werden, dass es mit Hilfe des verwendeten IGF-II ELISA E30 möglich ist, verlässlich IGF-II Konzentrationen aus DBS zu messen. Bedingt durch die hohe Assaysensitivität können selbst geringe Konzentrationen bestimmt werden. Die Ergebnisse der Passing-Bablok Regressionsanalyse sind signifikant ($p < 0,0001$) und zeigen eine gute Korrelation ($r = 0.872$) zwischen den beiden Messtechniken aus Plasma- und Filterpapierproben. Es ist möglich, 94% des Plasma-IGF-II aus DBS zu messen. Darüber hinaus ist es möglich, die IGF-II Konzentration aus DBS bis zu 10 Tage nach der Probengewinnung, bei Lagertemperaturen zwischen -20°C bis $+37^{\circ}\text{C}$, verlässlich zu messen. Hierbei liegt der Wiedergewinnungswert innerhalb von $\pm 10\%$ der Ausgangsmessung am Tag der Probenentnahme. Der Einfluss von Störfaktoren und Kreuzreaktivitäten auf die IGF-II Konzentrationsmessung konnte ausgeschlossen werden. Sowohl in Plasma- als auch in Filterpapierproben wurde die Linearität der Messungen mittels E30 ELISA nachgewiesen.

Diese Erkenntnisse bringen finanzielle, wirtschaftliche sowie praktische Vorteile. Einschränkend ist jedoch zu konstatieren, dass die positiven Resultate spezifisch für den IGF-II ELISA E30 der Firma Mediagnost GmbH gültig sind. Weitere vergleichende Versuchsreihen mittels Radioimmuno-Assay wären daher angezeigt. Darüber hinaus könnte auch ein verlängerter Lagerzeitraum untersucht werden. Ebenfalls könnten sich aus der Optimierung der Probengewinnung, z.B. mit Kapillarblut, weiterführende Erkenntnisse ergeben.

6 Literaturverzeichnis

- Abellan, R., Ventura, R., Palmi, I., Di Carlo, S., Bacosi, A., Bellver, M., Olive, R., Pascual, J.A., Pacifici, R., Segura, J., Zuccaro, P., Pichini, S. (2008) "Immunoassays for the measurement of IGF-II, IGFBP-2 and -3, and ICTP as indirect biomarkers of recombinant human growth hormone misuse in sport. Values in selected population of athletes." *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis* 48:844–852.
- Aberg, D., Johansson, P., Isgaard, J., Wallin, A., Johansson, J.-O., Andreasson, U., Blennow, K., Zetterberg, H., Aberg, N.D., Svensson, J. (2015) "Increased Cerebrospinal Fluid Level of Insulin-like Growth Factor-II in Male Patients with Alzheimer's Disease." *Journal Of Alzheimer's Disease* 48:637–646.
- Adashi, E.Y., Resnick, C.E., D'Ercole, A.J., Svoboda, M.E., Van Wyk, J.J. (1985) "Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function." *Endocrine Reviews* 6:400–420.
- Ahluwalia, N., Lonnerdal, B., Lorenz, S.G., Allen, L.H. (1998) "Spot ferritin assay for serum samples dried on filter paper." *The American Journal Of Clinical Nutrition* 67:88–92.
- Allolio, B., Schulte, H.M. (2010) "Glukose und Lipidstoffwechsel." p.513-586; *Praktische Endokrinologie. Elsevier Urban and Fischer, München.*
- Azar, W.J., Azar, S.H.X., Higgins, S., Hu, J.-F., Hoffman, A.R., Newgreen, D.F., Werther, G.A., Russo, V.C. (2011) "IGFBP-2 enhances VEGF gene promoter activity and consequent promotion of angiogenesis by neuroblastoma cells." *Endocrinology* 152:3332–3342.
- Backeljauw, P.F., Underwood, L.E. (2001) "Therapy for 6.5-7.5 years with recombinant insulin-like growth factor I in children with growth hormone insensitivity syndrome: a clinical research center study." *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 86:1504–1510.
- Baxter, R.C. (1988) "Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex." *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 67:265–272.
- Baxter, R.C. (2001) "Changes in the IGF-IGFBP axis in critical illness." *Best Practice And Research Clinical Endocrinology And Metabolism* 15:421–434.
- Baxter, R.C., Zaltsman, Z., Turtle, J.R. (1984) "Immunoreactive somatomedin-C/insulin-like growth factor I and its binding protein in human milk." *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 58:955–959.
- Baxter Deutschland GmbH (2014) "ClinOleic® 20 %." *Gebrauchsinformation, Zulassungsnummer: 41266.00.00.*
- Behrends, J.C. (2017) "Hormonelle Regulation I." p.337-416; Deutzmann, R., *Physiologie. Thieme, Stuttgart.*
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2011) "Signaltransduktionswege." p.427-457; *Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, München.*

- Blum, W.F., Böttcher, C., Wudy, S.A. (2011) "Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins." p.157-182; Ranke, M.B., Mullis, P.E., Diagnostics of endocrine function in children and adolescents. *Karger, Basel*.
- Brabant, G., Schöfl, C., Zur Mühlen, A. von (1998) "Hypoglykämien beim Erwachsenen : Nicht Diabetes-assoziierte Formen." *Deutsches Ärzteblatt* 95:A-1022–1026.
- Brown, J., Jones, E.Y., Forbes, B.E. (2009) "Keeping IGF-II under control: lessons from the IGF-II-IGF2R crystal structure." *Trends In Biochemical Sciences* 34:612–619.
- Bundesausschuss der Ärzte und Krankenkassen (2011) "Früherkennung von Krankheiten bei Kindern bis zur Vollendung des 6. Lebensjahres („Kinder-Richtlinien“)." *Bundesanzeiger*.
- Cahill, G.F., JR, Herrera, M.G., Morgan, A.P., Soeldner, J.S., Steinke, J., Levy, P.L., Reichard, G.A., JR, Kipnis, D.M. (1966) "Hormone-fuel interrelationships during fasting." *The Journal Of Clinical Investigation* 45:1751–1769.
- Carey, R.N. (2005) "User verification of performance for precision and trueness. Approved guideline." *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa*.
- Carlsson-Skwirut, C., Jornvall, H., Holmgren, A., Andersson, C., Bergman, T., Lundquist, G., Sjogren, B., Sara, V.R. (1986) "Isolation and characterization of variant IGF-1 as well as IGF-2 from adult human brain." *FEBS Letters* 201:46–50.
- Chandrashekar, I.R., Yao, S., Wang, C.C., Bansal, P.S., Alewood, P.F., Forbes, B.E., Wallace, J.C., Bach, L.A., Norton, R.S. (2007) "The N-terminal subdomain of insulin-like growth factor (IGF) binding protein 6. Structure and interaction with IGFs." *Biochemistry* 46:3065–3074.
- Chao, W., D'Amore, P.A. (2008) "IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease." *Cytokine And Growth Factor Reviews* 19:111–120.
- Clemmons, D.R. (1997) "Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions." *Cytokine And Growth Factor Reviews* 8:45–62.
- Clemmons, D.R., Van Wyk, J.J. (1984) "Factors controlling blood concentration of somatomedin C." *Clinics In Endocrinology And Metabolism* 13:113–143.
- Cohen, K.L., Nissley, S.P. (1975) "Comparison of somatomedin activity in rat serum and lymph." *Endocrinology* 97:654–658.
- Costigan, D.C., Guyda, H.J., Posner, B.I. (1988) "Free insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II in human saliva." *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 66:1014–1018.
- Cryer, P.E. (2007) "Hypoglycemia, functional brain failure and brain death." *The Journal Of Clinical Investigation* 117:868–870.
- Dahiya, D., Bhadada, S., Nahar, U., Garg, M., Kaman, L., Behera, A. (2013) "IGF-II-secreting pelvic tumor presenting with neuropsychiatric symptoms." *Journal Of Surgical Case Reports*.

- Daughaday, W.H., Rotwein, P. (1989) "Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations." *Endocrine Reviews* 10:68–91.
- Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M.S., Salmon, W.D., JR, Van den Brande, J.L., Van Wyk, J.J. (1972) "Somatomedin: proposed designation for sulphation factor." *Nature* 235:107.
- DeChiara, T.M., Robertson, E.J., Efstratiadis, A. (1991) "Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene." *Cell* 64:849–859.
- Denley, A., Cosgrove, L.J., Booker, G.W., Wallace, J.C., Forbes, B.E. (2005) "Molecular interactions of the IGF system." *Cytokine And Growth Factor Reviews* 16:421–439.
- Denniff, P., Spooner, N. (2010) "The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs." *Bioanalysis* 2:1385–1395.
- Deutzmann, R. (2016) "Hormone." p.566-626; Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R., Biochemie. *Thieme, Stuttgart*.
- Diamandi, A., Khosravi, M.J., Mistry, J., Martinez, V., Guevara-Aguirre, J. (1998) "Filter paper blood spot assay of human insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 and preliminary application in the evaluation of growth hormone status." *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 83:2296–2301.
- Dimeski, G. (2008) "Interference Testing." *The Clinical Biochemist Reviews*:29(Suppl 1), 43–48.
- Doenecke, D., Karlson, P. (2005) "Karlsons Biochemie und Pathobiochemie." *Thieme, Stuttgart*.
- Drescher B., Lauke H., Hartmann M., Davidoff M.S., Zumkeller W. (1997) "Immunohistochemical pattern of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF II and IGF binding proteins 1 to 6 in carcinoma in situ of the testis." *Molecular Pathology*:298–303.
- Dynkevich, Y., Rother, K.I., Whitford, I., Qureshi, S., Galiveeti, S., Szulc, A.L., Danoff, A., Breen, T.L., Kaviani, N., Shanik, M.H., Leroith, D., Vigneri, R., Koch, C.A., Roth, J. (2013) "Tumors, IGF-2, and hypoglycemia: insights from the clinic, the laboratory, and the historical archive." *Endocrine Reviews* 34:798–826.
- Elminger, M.W., Bell, M., Schütt, B.S., Langkamp, M., Kutoh, E., Ranke, M.B. (2001) "Transactivation of the IGFBP-2 promoter in human tumor cell lines." *Molecular And Cellular Endocrinology* 175:211–218.
- Elmlinger, M.W., Rauschnabel, U., Koscielniak, E., Weber, K., Ranke, M.B. (1999) "Secretion of noncomplexed 'Big' (10-18 kD) forms of insulin-like growth factor-II by 12 soft tissue sarcoma cell lines." *Hormone Research* 52:178–185.
- El-Roeiy, A., Chen, X., Roberts, V.J., LeRoith, D., Roberts, C.T., JR, Yen, S.S. (1993) "Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products

- in the human ovary." *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 77:1411–1418.
- Europe, U.N.C.f.i.A. (2017) "European Agreement Concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road." *United Nations Publication, New York and Geneva*.
- Firth, S.M., Baxter, R.C. (2002) "Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins." *Endocrine Reviews* 23:824–854.
- Flowers, C.H., Cook, J.D. (1999) "Dried plasma spot measurements of ferritin and transferrin receptor for assessing iron status." *Clinical Chemistry* 45:1826–1832.
- Forbes, B.E., McCarthy, P., Norton, R.S. (2012) "Insulin-like growth factor binding proteins: a structural perspective." *Frontiers In Endocrinology* 3:38.
- Freier, S., Eran, M., Reinus, C., Ariel, I., Faber, J., Wilschanski, M., Braverman, D. (2005) "Relative expression and localization of the insulin-like growth factor system components in the fetal, child and adult intestine." *Journal Of Pediatric Gastroenterology And Nutrition* 40:202–209.
- Fritschka, E. (2009) "Hohe Triglyzeride sind Prädiktoren der Progression." *Info Diabetologie* 3:28–30.
- Frystyk, J., Skjaerbaek, C., Zapf, J., Orskov, H. (1998) "Increased levels of circulating free insulin-like growth factors in patients with non-islet cell tumour hypoglycaemia." *Diabetologia* 41:589–594.
- Frystyk, J., Skjaerbaek, C., Vestbo, E., Fisker, S., Orskov, H. (1999) "Circulating levels of free insulin-like growth factors in obese subjects: the impact of type 2 diabetes." *Diabetes/Metabolism Research And Reviews* 15:314–322.
- Fukuda, I., Hizuka, N., Ishikawa, Y., Yasumoto, K., Murakami, Y., Sata, A., Morita, J., Kurimoto, M., Okubo, Y., Takano, K. (2006) "Clinical features of insulin-like growth factor-II producing non-islet-cell tumor hypoglycemia." *Growth Hormone And IGF Research* 16:211–216.
- Gakhar, H., Holodniy, M. (2014) "Use of dried blood spot samples in HCV-, HBV- and influenza-related epidemiological studies." p.95-113; Li, W., Lee, M. S., Dried Blood Spots. *John Wiley and Sons, Hoboken*.
- Gressner, A.M., Arndt, T. (2013) "Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik." p.600. *Springer, Berlin*.
- Grieco, S.F., Cheng, Y., Eldar-Finkelman, H., Jope, R.S., Beurel, E. (2017) "Up-regulation of insulin-like growth factor 2 by ketamine requires glycogen synthase kinase-3 inhibition." *Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry* 72:49–54.
- Guo, N., Ye, J.-J., Liang, S.-J., Mineo, R., Li, S.-L., Giannini, S., Plymate, S.R., Sikes, R.A., Fujita-Yamaguchi, Y. (2003) "The role of insulin-like growth factor-II in cancer growth and progression evidenced by the use of ribozymes and prostate cancer progression models." *Growth Hormone And IGF Research* 13:44–53.

- Guthrie, R., Susi, A. (1963) "A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants." *Pediatrics* 32:338–343.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Specht, K., Kappler, R., Calzada-Wack, J., Potter, D., Zimmer, A., Muller, U., Samson, E., Quintanilla-Martinez, L. (2000) "Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma." *The Journal Of Biological Chemistry* 275:28341–28344.
- Hammerman, M.R., Ryan, G., Miller, S.B. (1992) "Expression of insulin-like growth factor in adult and embryonic kidney." *Mineral And Electrolyte Metabolism* 18:253–255.
- Han, V.K., Lund, P.K., Lee, D.C., D'Ercole, A.J. (1988) "Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution." *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 66:422–429.
- Harms, E., Olgemoller, B. (2011) "Neonatal screening for metabolic and endocrine disorders." *Deutsches Ärzteblatt International* 108:11-21.
- Haselbacher, G.K., Schwab, M.E., Pasi, A., Humbel, R.E. (1985) "Insulin-like growth factor II (IGF II) in human brain: regional distribution of IGF II and of higher molecular mass forms." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 82:2153–2157.
- Headey, S.J., Keizer, D.W., Yao, S., Wallace, J.C., Bach, L.A., Norton, R.S. (2004) "Binding site for the C-domain of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-6 on IGF-II; implications for inhibition of IGF actions." *FEBS Letters* 568:19–22.
- Hizuka, N., Takano, K., Tanaka, I., Asakawa, K., Miyakawa, M., Horikawa, R., Shizume, K. (1987) "Demonstration of insulin-like growth factor I in human urine." *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 64:1309–1312.
- Hoeflich, A., Lahm, H., Wolf, E. (2006) "Molekulare Mechanismen der Wachstumswirkung des IGF-Systems." p.109-126; Ganten, D., Adamski, J., Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen. *Springer, Berlin*.
- Hoffman, B.R., Yu, H., Diamandis, E.P. (1996) "Assay of prostate-specific antigen from whole blood spotted on filter paper and application to prostate cancer screening." *Clinical Chemistry* 42:536–544.
- Hokema, F., Pietsch, U.-C., Führer, D., Kaisers, U. (2008) "Anästhesie und Bodybuilding - Risiken des Medikamentenmissbrauchs." *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* 43:354–358.
- Holtkamp, U., Klein, J., Sander, J., Peter, M., Janzen, N., Steuerwald, U., Blankenstein, O. (2008) "EDTA in dried blood spots leads to false results in neonatal endocrinologic screening." *Clinical Chemistry* 54:602–605.
- Horn, F. (2009) "Molekulare Hormonwirkung." p.339-347; "Wachstum und Fortpflanzung." p.395-406; Biochemie des Menschen. *Thieme, Stuttgart*.

- Hoxie, N.J., Vergeront, J.M., Pfister, J.R., Hoffman, G.L., Markwardt-Elmer, P.A., Davis, J.P. (1992) "Improving estimates of HIV-1 seroprevalence among childbearing women: use of smaller blood spots." *American journal of public health* 82:1370–1373.
- Hoyo, C., Fortner, K., Murtha, A.P., Schildkraut, J.M., Soubry, A., Demark-Wahnefried, W., Jirtle, R.L., Kurtzberg, J., Forman, M.R., Overcash, F., Huang, Z., Murphy, S.K. (2012) "Association of cord blood methylation fractions at imprinted insulin-like growth factor 2 (IGF2), plasma IGF2, and birth weight." *Cancer Causes And Control* 23:635–645.
- Hüsler, J., Zimmermann, H. (2010) "Analyse von gepaarten Stichproben." p.95-110; Statistische Prinzipien für medizinische Projekte. *Huber, Bern*.
- Ingram, W.J., Wicking, C.A., Grimmond, S.M., Forrest, A.R., Wainwright, B.J. (2002) "Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells." *Oncogene* 21:8196–8205.
- Isermann, B., Brado, M., Herbay, A. von, Nawroth, P.P. (2001) "Andere Formen der Hypoglykämie." p.643-653; Nawroth, P.P., Ziegler, R., *Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel. Springer, Berlin*.
- Janzen, N., Peter, M., Sander, S., Steuerwald, U., Terhardt, M., Holtkamp, U., Sander, J. (2007) "Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia; Additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 92:2581–2589.
- Jehle, P.M. (2001) "Pathophysiologie." p.3-24; Jehle, P.M., Deuber, H.J., *Renale Osteopathie. Thieme, Stuttgart*.
- Jogie-Brahim, S., Feldman, D., Oh, Y. (2009) "Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease." *Endocrine Reviews* 30:417–437.
- Jones, J.I., Gockerman, A., Busby, W.H., JR, Wright, G., Clemmons, D.R. (1993) "Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 90:10553–10557.
- Jones, J.S. (2001) "Insulin-Like Growth Factor I Measurement on Filter Paper Blood Spots." *Hormone Research In Paediatrics* 55:80–83.
- Juul, A. (2003) "Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease." *Growth Hormone and IGF Research* 13:113–170.
- Kohek, M., Leme, C., Nakamura, I.T., Oliveira, S.A. de, Lando, V., Mendonca, B.B. (2002) "Effects of EDTA and sodium citrate on hormone measurements by fluorometric (FIA) and immunofluorometric (IFMA) methods." *BMC Clinical Pathology* 2:2.
- Kreienbrock, L., Pigeot, I., Ahrens, W. (2012) "Statistische Grundlagen." p.373-440; Epidemiologische Methoden. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*.

- Kromidas, S. (2011) "Präzision." p.47-76; Validierung in der Analytik. *Wiley-VCH, Weinheim*.
- Kuemmerle, J.F. (2012) "Insulin-like growth factors in the gastrointestinal tract and liver." *Endocrinology And Metabolism Clinics Of North America* 41:409-23.
- Langkamp, M., Weber, K., Ranke, M.B. (2008) "Human growth hormone measurement by means of a sensitive ELISA of whole blood spots on filter paper." *Growth Hormone And IGF Research* 18:526–532.
- Lee, Y.-C., Jogie-Brahim, S., Lee, D.-Y., Han, J., Harada, A., Murphy, L.J., Oh, Y. (2011) "Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) blocks the effects of asthma by negatively regulating NF-kappaB signaling through IGFBP-3R-mediated activation of caspases." *The Journal Of Biological Chemistry* 286:17898–17909.
- Leroith, D., Adamo, M., Werner, H., Roberts, C.T. (1991) "Insulin-like growth factors and their receptors as growth regulators in normal physiology and pathologic states." *Trends In Endocrinology And Metabolism* 2:134–139.
- Lewitt, M.S., Saunders, H., Phuyal, J.L., Baxter, R.C. (1994) "Complex formation by human insulin-like growth factor-binding protein-3 and human acid-labile subunit in growth hormone-deficient rats." *Endocrinology* 134:2404–2409.
- Li, S.-L., Goko, H., Xu, Z.-D., Kimura, G., Sun, Y., Kawachi, M.H., Wilson, T.G., Wilczynski, S., Fujita-Yamaguchi, Y. (1998) "Expression of insulin-like growth factor (IGF)-II in human prostate, breast, bladder, and paraganglioma tumors." *Cell And Tissue Research* 291:469–479.
- Livingstone, C. (2013) "IGF2 and cancer." *Endocrine-Related Cancer* 20:R321-39.
- Livingstone, C., Borai, A. (2014) "Insulin-like growth factor-II: its role in metabolic and endocrine disease." *Clinical Endocrinology* 80:773–781.
- Martin, J.L., Baxter, R.C. (1986) "Insulin-like growth factor-binding protein from human plasma. Purification and characterization." *The Journal Of Biological Chemistry* 261:8754–8760.
- McCann, A.H., Miller, N., O'Meara, A., Pedersen, I., Keogh, K., Gorey, T., Dervan, P.A. (1996) "Biallelic expression of the IGF2 gene in human breast disease." *Human Molecular Genetics* 5:1123–1127.
- Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH, Testanleitung (2007) "IGF-II-ELISA Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von Human Insulin-like Growth Factor-II (IGFBP blockiert)." *Gebrauchsinformation, E30 d/e 221211 Version 7*.
- Minuto, F., Palermo, C., Arvigo, M., Barreca, A.M. (2005) "The IGF system and bone." *Journal Of Endocrinological Investigation* 28:8–10.
- Missler, U., Gutekunst, R., Wood, W.G. (1994) "Thyroglobulin is a more sensitive indicator of iodine deficiency than thyrotropin: development and evaluation of dry blood spot assays for thyrotropin and thyroglobulin in iodine-deficient geographical areas." *European Journal Of Clinical Chemistry And Clinical*

Biochemistry : Journal Of The Forum Of European Clinical Chemistry Societies 32:137–143.

- Miyako, K., Cobb, L.J., Francis, M., Huang, A., Peng, B., Pintar, J.E., Ariga, H., Cohen, P. (2009) "PAPA-1 is a nuclear binding partner of IGFBP-2 and modulates its growth-promoting actions." *Molecular Endocrinology* 23:169–175.
- Mohnike, K., Kluba, U., Blum, W.F., Aumann, V., Vorwerk, P., Mittler, U. (1995) "Serumkonzentrationen der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF)-I und IGF-II sowie der IGF Bindungsproteine (IGFBP)-2 und IGFBP-3 bei 49 Kindern mit ALL, NHL oder soliden Tumoren." *Klinische Pädiatrie* 207:225–229.
- Morison, I.M., Reeve, A.E. (1998) "Insulin-like growth factor 2 and overgrowth: molecular biology and clinical implications." *Molecular Medicine Today* 4:110–115.
- Morrione, A., Valentinis, B., Xu, S.Q., Yumet, G., Louvi, A., Efstratiadis, A., Baserga, R. (1997) "Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 94:3777–3782.
- O'Dell, S.D., Day, I.N.M. (1998) "Molecules in focus Insulin-like growth factor II (IGF-II)." *The International Journal Of Biochemistry And Cell Biology* 30:767–771.
- Passing, H., Bablok (1983) "A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I." *Journal Of Clinical Chemistry And Clinical Biochemistry* 21:709–720.
- Piper, W. (2013) "Krankheiten des endokrinen Systems." p.509-594; Innere Medizin. *Springer, Berlin*.
- Püschel, G. (2011) "Hormonsystem." p.574-631; Püschel, G.; Kühn, H., Taschenlehrbuch Biochemie. *Thieme, Stuttgart*.
- Ranke, M.B., Binder, G. (2001) "Physiologie des Wachstumshormons (GH)." p.3-6; Nawroth, P.P., Ziegler, R., *Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel. Springer, Berlin*.
- Ranke, M.B., Wolffe, J., Schnabel, D., Bettendorf, M. (2009) "Treatment of dwarfism with recombinant human insulin-like growth factor-1." *Deutsches Ärzteblatt International* 106:703–709.
- Rauch, P., Zellmer, A., Dankbar, N., Specht, C., Sperling, D. (2005) "Assayoptimierung: Störeffekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden." *Laborwelt - Das BioTechnologie-Themenheft* 6,4;33–46.
- Ravenel, J.D., Broman, K.W., Perlman, E.J., Niemitz, E.L., Jayawardena, T.M., Bell, D.W., Haber, D.A., Uejima, H., Feinberg, A.P. (2001) "Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor." *Journal Of The National Cancer Institute* 93:1698–1703.

- Raynaud-Simon, A. (2003) "Levels of plasma insulin-like growth factor I (IGF I), IGF II, IGF binding proteins, type 1 IGF receptor and growth hormone binding protein in community-dwelling elderly subjects with no malnutrition and no inflammation." *The Journal Of Nutrition, Health and Aging* 7:267–273.
- Reik, W., Constancia, M., Dean, W., Davies, K., Bowden, L., Murrell, A., Feil, R., Walter, J., Kelsey, G. (2000) "Igf2 imprinting in development and disease." *The International Journal Of Developmental Biology* 44:145–150.
- Rinderknecht, E., Humbel, R.E. (1978a) "Primary structure of human insulin-like growth factor II." *FEBS Letters* 89:283–286.
- Rinderknecht, E., Humbel, R.E. (1978b) "The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin." *The Journal Of Biological Chemistry* 253:2769–2776.
- Robert Koch-Institut (2016) "Abschlussbericht der Studie "Drogen und chronischen Infektionskrankheiten in Deutschland" (DRUCK-Studie)." p.1- 188, *Berlin*.
- Roberts, C.T., Lasky, S.R., Lowe, W.L., JR, Seaman, W.T., LeRoith, D. (1987) "Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acids: differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues." *Molecular Endocrinology* 1:243–248.
- Ron, D., Powers, A.C., Pandian, M.R., Godine, J.E., Axelrod, L. (1989) "Increased insulin-like growth factor II production and consequent suppression of growth hormone secretion: a dual mechanism for tumor-induced hypoglycemia." *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 68:701–706.
- Rotwein, P., Burgess, S.K., Milbrandt, J.D., Krause, J.E. (1988) "Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 85:265–269.
- Saka, V.R., Hall, K., Holtz, H.V., Humbel, R., Sjören, B., Wetterberg, L. (1982) "Evidence for the presence of specific receptors for insulin-like growth factors 1 (IGF-1) and 2 (IGF-2) and insulin throughout the adult human brain." *Neuroscience Letters* 34:39–44.
- Salmon, W.D., Daughaday, W.H. (1957) "A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro." *The Journal Of Laboratory And Clinical Medicine* 49:825–836.
- Sayer, R.A., Lancaster, J.M., Pittman, J., Gray, J., Whitaker, R., Marks, J.R., Berchuck, A. (2005) "High insulin-like growth factor-2 (IGF-2) gene expression is an independent predictor of poor survival for patients with advanced stage serous epithelial ovarian cancer." *Gynecologic Oncology* 96:355–361.
- Schanzer, W., Thevis, M. (2007) "Doping im Sport." *Medizinische Klinik* 102:631–646.

- Schatz, H., Stracke, H., Zapf, J. (1983) "Diagnostik bei Akromegalie. Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor als Aktivitätsparameter." *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 108:1391–1395.
- Schneider, A., Hommel, G., Blettner, M. (2010) "Linear regression analysis." *Deutsches Ärzteblatt International* 107:776–782.
- Schneider, R.J., Grandke, J. (2012) "Temperatureinfluss auf Immunoassays." *Nachrichten Aus Der Chemie*:1112–1113.
- Schulz, C., Oster, H., Lehnert, H. (2015) "Einführung in die Prinzipien der Endokrinologie." p.36-45; Lehnert, H., Anlauf, M., Rationelle Diagnostik und Therapie in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel. *Thieme, Stuttgart*.
- Schütt, B.S., Weber, K., Elmlinger, M.W., Ranke, M.B. (2003) "Measuring IGF-I, IGFBP-2 and IGFBP-3 from dried blood spots on filter paper is not only practical but also reliable." *Growth Hormone and IGF Research* 13:75–80.
- Seeber, C.T., Walgenbach, S., Dienes, H.P., Junginger, T. (1998) "Ungewöhnliche Häufung von partiell endokrin aktiven Tumoren." *Der Chirurg* 69:477–480.
- Shlosberg, A., Rumbelha, W.K., Lublin, A., Kannan, K. (2011) "A database of avian blood spot examinations for exposure of wild birds to environmental toxicants: the DABSE biomonitoring project." *Journal Of Environmental Monitoring* 13:1547–1558.
- Sitar, T., Popowicz, G.M., Siwanowicz, I., Huber, R., Holak, T.A. (2006) "Structural basis for the inhibition of insulin-like growth factors by insulin-like growth factor-binding proteins." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 103:13028–13033.
- Siwanowicz, I., Popowicz, G.M., Wisniewska, M., Huber, R., Kuenkele, K.P., Lang, K., Engh, R.A., Holak, T.A. (2005) "Structural basis for the regulation of insulin-like growth factors (IGFs) by IGF binding proteins (IGFBPs)."
- Strauss, A. (2008) "Cordozentese." p.325-328; *Ultraschallpraxis: Geburtshilfe und Gynäkologie. Springer, Berlin, Heidelberg*.
- Sussenbach, J.S., Steenbergh, P.H., Holthuizen, P. (1992) "Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes." *Growth Regulation* 2:1–9.
- Tally, M., Li, C.H., Hall, K. (1987) "IGF-2 stimulated growth mediated by the somatomedin type 2 receptor." *Biochemical and biophysical research communications* 148:811–816.
- Teale, J.D., Marks, V. (1990) "Inappropriately elevated plasma insulin-like growth factor II in relation to suppressed insulin-like growth factor I in the diagnosis of non-islet cell tumour hypoglycaemia." *Clinical Endocrinology* 33:87–98.
- Teale, J.D., Marks, V. (1998) "Glucocorticoid therapy suppresses abnormal secretion of big IGF-II by non-islet cell tumours inducing hypoglycaemia (NICTH)." *Clinical Endocrinology* 49:491–498.

- Therrell, B.L., Hannon, W.H., Pass, K.A., Lorey, F., Brokopp, C., Eckman, J., Glass, M., Heidenreich, R., Kinney, S., Kling, S., Landenburger, G., Meaney, F.J., McCabe, E.R.B., Panny, S., Schwartz, M., Shapira, E. (1996) "Guidelines for the retention, storage, and use of residual dried blood spot samples after newborn screening analysis; Statement of the council of regional networks for genetic services." *Biochemical And Molecular Medicine* 57:116–124.
- Trojan, L., Bode, C., Weiss, C., Mayer, D., Grobholz, R., Alken, P., Michel, M.S. (2006) "IGF-II serum levels increase discrimination between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer and improve the predictive value of PSA in clinical staging." *European Urology* 49:286-92.
- Wang, K.C.W., Zhang, L., McMillen, I.C., Botting, K.J., Duffield, J.A., Zhang, S., Suter, C.M., Brooks, D.A., Morrison, J.L. (2011) "Fetal growth restriction and the programming of heart growth and cardiac insulin-like growth factor 2 expression in the lamb." *The Journal Of Physiology* 589:4709–4722.
- Weimann, E., Kiess, W. (1990) "Grundlagen und klinische Bedeutung der Insulin-like Growth Factors/Somatomedine." *Klinische Wochenschrift* 68:985–1002.
- Werder, K.v. (2005) "Funktionsstörungen des Hypothalamus-Hypophysen-Systems." p.69-195; *Klinische Neuroendokrinologie. Springer, Berlin.*
- Wheatcroft, S.B., Kearney, M.T. (2009) "IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: implications for metabolic homeostasis." *Trends In Endocrinology And Metabolism* 20:153–162.
- Wilson, E.M., Hsieh, M.M., Rotwein, P. (2003) "Autocrine growth factor signaling by insulin-like growth factor-II mediates MyoD-stimulated myocyte maturation." *The Journal Of Biological Chemistry* 278:41109–41113.
- Xu, Q., Yan, B., Li, S., Duan, C. (2004) "Fibronectin binds insulin-like growth factor-binding protein 5 and abolishes its ligand-dependent action on cell migration." *The Journal Of Biological Chemistry* 279:4269–4277.
- Yu, H., Mistry, J., Nicar, M.J., Khosravi, M.J., Diamandis, A., van Doorn, J., Juul, A. (1999) "Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation." *Journal Of Clinical Laboratory Analysis* 13:166–172.
- Zabransky, S. (2012) "Proceedingband 2012 zur Geschichte des Neugeborenencreening auf metabole und endokrine Störungen in Deutschland." *Medizinischer Verlag Zabransky, Homburg.*
- Zabransky, S., Nennstiel-Ratzel, U., Liebl, B. (2001) "Präanalytik und Tracking." p. 65-84; Zabransky, S., "Screening auf angeborene endokrine und metabole Störungen." *Springer Vienna, Vienna.*
- Zapf, J., Froesch, E.R. (1986) "Akromegalie und insulinähnliche Wachstumsfaktoren." *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 116:71-77.
- Zapf, J., Futo, E., Peter, M., Froesch, E.R. (1992) "Can "big" insulin-like growth factor II in serum of tumor patients account for the development of extrapancreatic tumor hypoglycemia?" *The Journal Of Clinical Investigation* 90:2574–2584.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde in der Firma Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH unter der Betreuung von Herrn Dr. M. Langkamp angefertigt. Der Versuchsaufbau und -ablauf wurde in Zusammenarbeit von Herrn Dr. Langkamp und mir konzipiert.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau N. Wachendorfer von mir eigenständig durchgeführt und ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch meinen Betreuer, Herrn Dr. Langkamp, durch mich.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Entwicklung und Validierung einer innovativen Methode zur Bestimmung des Insulin-ähnlichen-Wachstumsfaktors II aus Trockenblutproben“ selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen, als die aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet und wörtliche Zitate sowie sinngemäße Wiedergaben als solche kenntlich gemacht.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation keinem Dritten zur Überprüfung vorgelegt oder mich an einer anderen Universität zum Promotionsverfahren angemeldet habe.

Ort, Datum

Unterschrift

8 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Karin Klingel sowie Herrn Prof. Dr. Bertram Flehmig für die Überlassung des Themas, ebenso wie für die sehr gute und stets zeitnahe Betreuung. Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Angelika Haage für ihren unermüdlichen Einsatz und für die Möglichkeit, bei der Firma Mediagnost zu promovieren. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen – das werde ich nie vergessen.

Weiterhin möchte ich dem gesamten Team der Firma Mediagnost in Reutlingen meinen Dank aussprechen. Ich habe mich vom ersten Tag an sehr wohl gefühlt und eine angenehme und freundschaftliche Atmosphäre genießen dürfen. An dieser Stelle sei mein Betreuer, Herr Dr. Langkamp genannt. Mit seinem großen Wissensfundus und seiner wissenschaftlichen Erfahrung hat er mir hilfreiche Denkanstöße vermittelt. Ebenso ein ganz herzliches Dankeschön an Frau Nadine Wachendorfer. Ihre perfekte Einarbeitung in die technischen Methoden haben mir den Laboralltag sehr erleichtert.

Auch möchte ich Herrn Diplom-Mathematiker Thomas Giese herzlich für seine geduldigen Erläuterungen in Bezug auf meine statistischen Fragen danken.

Abschließend möchte ich meiner Familie von ganzem Herzen danken. Hier seien meine Brüder, die mich immer wieder aufs Neue motiviert, beraten und bestärkt haben, genannt. Insbesondere danke ich Dir, lieber Matze, für Deine tolle Unterstützung. Außerdem gilt ein großes Dankeschön meinem Freund Paul. Du hast mich des Öfteren aufgebaut und für mich schwierige Situationen in Ruhe und mit Zuversicht gelöst. Vielen Dank für Deine unendliche Geduld!

Der größte Dank gilt meinen Eltern und Großeltern. Ihr habt auf meinem bisherigen Lebensweg immer und ausnahmslos hinter mir gestanden und mich in allen meinen Vorhaben bestärkt. Eure Liebe, Unterstützung und Euer Vertrauen haben mich stets angetrieben. In unendlicher Dankbarkeit widme ich Euch meine Dissertation.