

Der direkte Nachweis von rekombinantem Erythropoietin (rEPO) in Urin

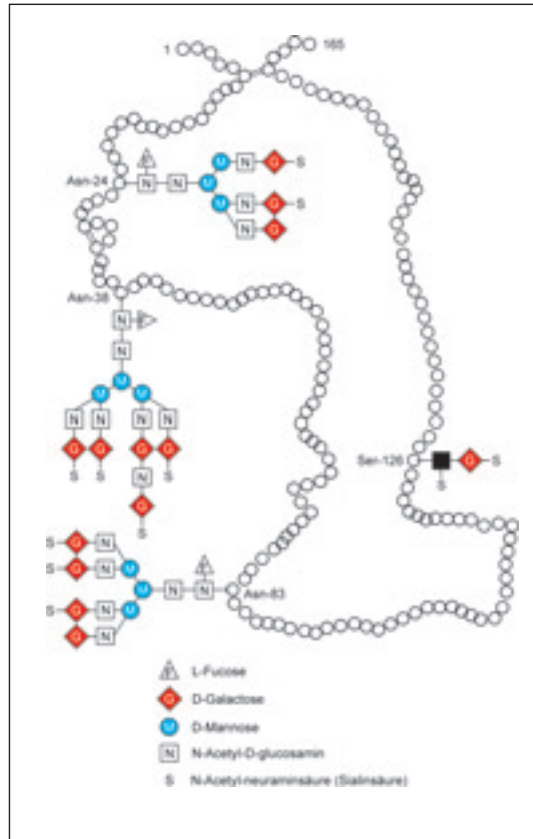
Erythropoietin (EPO) ist ein Peptidhormon, das die Produktion roter Blutkörperchen stimuliert (Erythropoese). Die erhöhte Anzahl im Organismus zirkulierender Erythrozyten hat eine Verbesserung der Sauerstoffaufnahmekapazität des Blutes und damit eine Steigerung der Ausdauerleistungsfähigkeit zur Folge. Das Internationale Olympische Komitee (IOC) verbietet seit ca. 12 Jahren den Gebrauch von EPO. Bis zum Jahr 2000 war der analytische Nachweis eines EPO-Missbrauchs mit der Schwierigkeit verbunden, dass das vom Organismus produzierte nicht vom synthetischen gentechnisch hergestellten EPO zu unterscheiden war, was zur Entwicklung indirekter Nachweismethoden geführt hat.

Bei indirekten Methoden zum Nachweis eines EPO-Missbrauchs werden ausgewählte Blutparameter (z.B. Hämatokrit, Hämoglobin, Retikulozyten) gemessen. Diese Blutparameter müssen folgende Eigenschaften erfüllen:

1. Zur Festlegung eines Normbereiches müssen sogenannte Referenzwerte der Parameter bekannt sein, die aus einer möglichst großen und repräsentativen Kontrollpopulation (Non user) erhoben und statistisch ausgewertet werden.
2. Eine EPO-Applikation muss signifikante Änderungen der ausgewählten Blutparameter hervorrufen, die quantitativ erfassbar sind. Das Verhalten dieser Blutparameter in Abhängigkeit von einer EPO-Applikation ist in pharmakokinetischen Studien zu untersuchen und zu charakterisieren (Parisotto et al. 2001).

Indirekte Methoden haben grundsätzlich den Nachteil, dass die applizierte Substanz nicht nachgewiesen wird. Die Quantifizierung indirekter Parameter und deren Vergleich mit den Referenzwerten einer Kontrollpopulation birgt immer das Risiko, dass einzelne von dieser Norm abweichende Werte physiologische Ursachen haben können und dennoch zu einem positiven Befund führen (falsch positiver Befund). Auch der umgekehrte Fall, in dem trotz EPO-Applikation die Blutparameter innerhalb des Normbereiches liegen, ist möglich, was zu falsch negativen Ergebnissen führt.

Die hier vorgestellte Methode zum direkten Nachweis von rEPO wurde von Francoise Lasne aus Frankreich entwickelt (LASNE/CEAURRIZ 2000; LASNE 2001). Der direkte Nachweis von rEPO basiert auf der isoelektrischen Fokussierung (IEF) von Urinkonzentraten. Grundlage des Tests ist die Unterscheidung von humanem EPO (hEPO), das der menschliche Organismus selber synthetisiert und deshalb auch als körpereigenes bzw. endoge-



Ein Beitrag von
Marc Machnik
Bettina Bialas
Wilhelm Schänzer
 Institut für
 Biochemie

Abb. 1:
 Schematische
 Darstellung von
 Erythropoietin.

nes EPO bezeichnet wird, und von rekombinantem EPO (rEPO), das gentechnisch hergestellt wird und als körperfremdes EPO zu betrachten ist. Seit November 2001 wird der Test offiziell von der Medical Commission des Internationalen Olympischen Komitees (Olympic Movement Anti-Doping Code) akzeptiert.

Strukturmerkmale von EPO

EPO ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 34-39 kDa. Es besteht aus insgesamt 165 Aminosäuren und 4 Zuckerseitenketten, die ungefähr 40% der Molekülmasse von EPO ausmachen. Von den Kohlenhydratseitenketten sind drei über die Aminosäure Asparagin N-glykosidisch und eine über die Aminosäure Serin O-glykosidisch mit dem Protein verbunden (Abb. 1). Die Varianz des Molekulargewichts von EPO kommt durch die Heterogenität der Zuckerketten zustande, die endständig mit Neuraminsäurederivaten (Abb. 2) verknüpft sind. Durch unterschiedliche Längen und Verzweigungen der Ketten lässt sich eine Vielzahl von "Zuckerzweigen" konstruieren, die die Ausprägung aller Isoformen eines EPO-Moleküls bewirken (Abb. 1). Eine Übersichtsarbeit über die Strukturen von Zuckerseitenketten in

EPO wurde von C.H. HOKKE (1995) veröffentlicht. Da die Glykosilierung von Proteinen speziesspezifisch erfolgt, unterscheidet sich das Glykosilierungsmuster in humanem EPO

vom rekombinanten EPO anderer Tierspezies, z.B. vom EPO des Hamsters.

CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) bilden zur Zeit die Hauptquelle für rekombinantes EPO. Beim rekombinanten EPO ist die Neuraminsäure zu etwa 95% am Stickstoff acetyliert (= Sialinsäure) und ca. 2% liegen als Glykolyacetyl-Derivat vor (Abb. 2).

Der Grad dieser unterschiedlichen Acetylierung und auch die An- und Abwesenheit sogenannter Repeats (immer wiederkehrende Zuckereinheiten) sind verantwortlich für unterschiedliche isoelektrische Punkte (pI) von humanem und rekombinanten EPO. Diese Eigenschaft wird analytisch bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) zum EPO-Nachweis ausgenutzt.

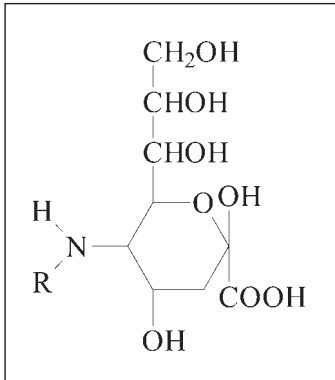


Abb. 2: Derivate der Neuraminsäure.
R=H=Neuraminsäure;
R=COCH₃=Sialinsäure;
R=COCH₂OH=N-Glycolyneuraminsäure.

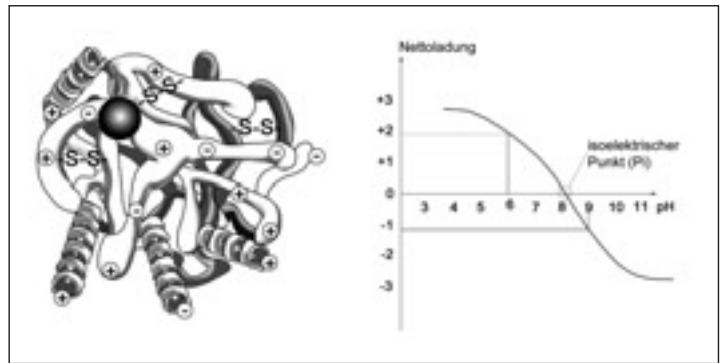


Abb. 4: Abhängigkeit der Nettoladung eines Proteins vom pH-Wert. Man beachte, dass Moleküle bei pH-Werten oberhalb ihres pI negativ und bei pH-Werten < pI positiv geladen sind.

Proteine, die aus Aminosäuren aufgebaut sind, verhalten sich ähnlich. Außer Säure- und Amino- gruppen beeinflussen auch anderer Strukturelemente den pI eines Moleküls, z.B. in EPO die Kohlenhydratseitenketten. Der pI ist somit ein charakteristisches Merkmal eines Proteins.

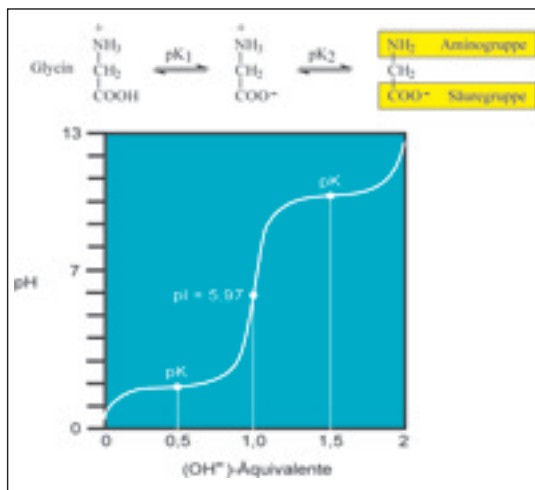
Eine Methode, um Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten zu trennen, ist die Elektrophorese (LASNE 2001), hier im speziellen die isoelektrische Fokussierung (IEF). Sie basiert auf der Eigenschaft geladener Proteine, in einem elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode zu wan-

Isoelektrischer Punkt (pI) und isoelektrische Fokussierung (IEF)

Isoelektrische Punkte treten bei Ampholyten auf, also bei Molekülen, die sowohl eine basische als auch eine saure Gruppierung enthalten. Einfaches Beispiel für Ampholyte sind Aminosäuren. Amino-

Abb. 3: Abhängigkeit der Netto- ladung einer Aminosäure (Glycin) vom pH- Wert.

Der pK₁-Wert entspricht dem pH-Wert, bei dem die obige Aminosäure zur Hälfte eine positive Ladung trägt (*NH₃-CH₂-COOH) und zur anderen Hälfte als neutrales Molekül mit einer positiven und einer negativen Ladung (*NH₃-CH₂-COO⁻) vorliegt. Bei pH = pK₂ bildet sich ein äquimolares Gleichgewicht (gleiche Anzahl von Molekülen) zwischen der Neutralform und der negativ geladenen Variante (NH₂-CH₂-COO⁻) aus.



säuren können sich aufgrund ihrer funktionellen Gruppen positiv, negativ oder neutral verhalten, abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums. Bei einem bestimmten pH-Wert liegt das Molekül voll ionisiert vor (Zwitterion), trägt aber in der Summe keine elektrische Ladung. Dieser pH wird als isoelektrischer Punkt bzw. pI bezeichnet (Abb. 3).

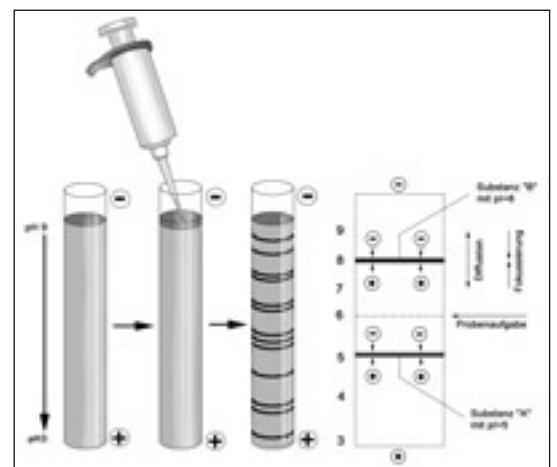


Abb. 5: Isoelektrische Fokussierung (IEF).

dern. Bei der IEF wird in einem Trennmedium, was praktischerweise ein Gel ist, ein stabiler pH-Gradient erzeugt. Die Protein-Mischung wird auf das Gel pipettiert und nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine bis zu dem pH, der ihrem pI entspricht. Bei pH = pI gilt, dass die Nettoladung 0 ist und die Proteine zum Stillstand kommen. Diffundieren die Proteine aus der Zone ihres pI heraus, erhalten sie erneut eine Ladung und werden sozusagen zurückfokussiert (Abb. 5). Daher der Begriff isoelektrische Fokussierung.

Probenaufarbeitung und Analyse

Die Probenvorbereitung des Urins zur EPO-Bestimmung beinhaltet eine Mikrofiltration sowie

zwei Ultrazentrifugationsschritte und ist im Ergebnis lediglich eine Konzentrierung der im Urin enthaltenen Proteine. Nach der Urinkonzentrierung folgt die Trennung von humanem und rekombinanten EPO mittels IEF in einem Polyacrylamid-Gel mit geeignetem pH-Gradienten. Die EPO-Isoformen werden durch Anlegen eines elektrischen Feldes gemäß ihrer pI getrennt. Der Elektrophorese schließt sich ein sogenannter Immunoblot (Immuno-Abdruck) an, bei dem die urinären Proteine auf eine bestimmte Membran (z.B. aus Polyvinylidenfluorid, PVDF) überführt werden. Man erhält so ein Abbild der einzelnen EPO-Banden auf der Oberfläche der PVDF-Membran. Diese Membranen haben den Vorteil, dass sie Proteine (hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen) sehr stark fixieren und sich ansonsten chemisch neutral verhalten. Dadurch, dass sich die EPO-Moleküle an der Membranoberfläche befinden, sind sie leicht zugänglich für Antikörper, die dazu dienen, die EPO-Banden sichtbar zu machen.

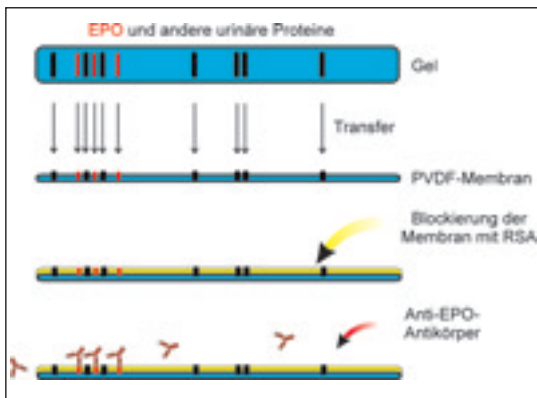


Abb. 6:
Prinzip eines Immuno-Blots.

Zunächst wird ein monoklonaler Anti-EPO-Antikörper (MAK) auf die PVDF-Membran verteilt, der spezifisch an alle vorhandenen EPO-Moleküle bindet, sowohl an rEPO wie hEPO. Andere urinäre Proteine reagieren nicht mit dem Antikörper. Nicht an EPO gebundene MAK können von der Membran gewaschen werden, weil die restliche PVDF-Oberfläche zuvor mit einem unspezifischen Protein (Rinderserumalbumin RSA, Milchpulverlösungen etc.) blockiert wurde (Abb. 6). Wichtig für den Immunoblot ist der Einsatz hochspezifischer MAK gegen EPO. Sobald Kreuzreaktionen zu anderen urinären Bestandteilen stattfinden, ist der Test nicht auswertbar.

Die Bindung des Antikörpers an EPO ist reversibel, weil sie auf nicht kovalenten Wechselwirkungen beruht, und kann so z.B. durch pH-Veränderung rückgängig gemacht werden. Im sauren Milieu ändert der Antikörper die Konformation seiner Bindungsdomäne und beim Anlegen eines elektrischen Feldes dissoziiert der MAK vom EPO-Molekül ab in Richtung Kathode, wo er an eine zweite PVDF-Membrane gebunden wird

(Abb. 7). Die EPO-Moleküle sowie andere nicht spezifische urinäre Proteine verbleiben auf der 1. Membran, da die Bindung zu PVDF durch pH-Schwankungen nicht beeinflusst wird.

So erhält man ein erneutes Abbild der einzelnen EPO-Banden. Allerdings befinden sich auf der 2. Membran keine EPO-Moleküle, sondern die spezifischen monoklonalen Antikörper (MAK).

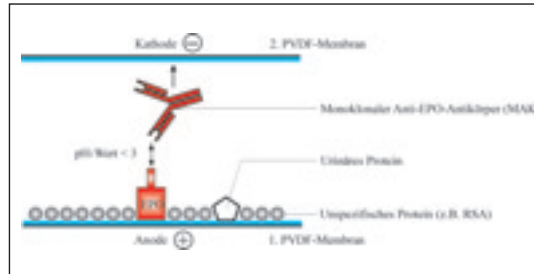


Abb. 7:
Prinzip des zweiten Blottings.

Die Sichtbarmachung der Antikörperbanden erfolgt durch einen zweiten Antikörper (Sekundärantikörper), der mit dem Anti-EPO-MAK reagiert. Dieser sekundäre Antikörper ist mit speziellen Enzymen gekoppelt (z.B. alkalische Phosphatase oder Peroxidase), die eine Substratumwandlung katalysieren, bei der Chemilumineszenz entsteht.

Der Vorteil des zweiten Blots ist die Reduktion des biologischen Untergrundes, da der enzymmarkierte Sekundärantikörper keine unspezifischen Reaktionen zu anderen Urinbestandteilen auf der 1. Membran eingehen kann. Außerdem ist eine Signalverstärkung und eine damit verbundene Erhöhung der Empfindlichkeit durch Mehrfachbindung der Antikörper-Enzym-Konjugate an den ersten Antikörper (MAK) denkbar.

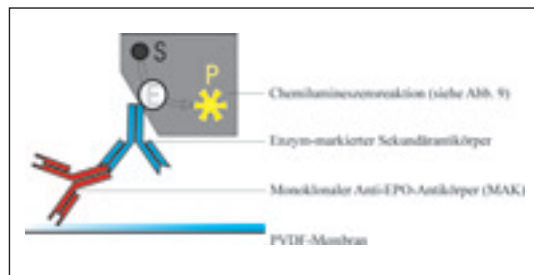


Abb. 8:
Visualisierung der MAK-Banden.
S = Substrat, E = Enzym,
P = Produkt.

Bei der Chemilumineszenzreaktion wird ein spezielles Substrat oxidiert und dadurch in einen energetisch angeregten Zustand versetzt. Der entstehende Acridiniumester geht unter Aussendung von Licht in einen stabileren Zustand über (Abb. 9). Das emittierte Licht wird mit einer Spezialkamera gemessen und computer-gestützt ausgewertet. Abb. 10 zeigt ein schematisches Bandenmuster einzelner EPO-Isoformen nach Entwicklung mittels einer CCD-Kamera (Charge Coupled Device). Rekombinantes EPO befindet sich in einem Bereich höherer pH-Werte, woraus folgt, dass es aus basischen Isoformen besteht (Spalte A). Spalte B enthält humanes EPO, welches niedrigere pH-Werte aufweist.

Zur Unterscheidung von rekombinantem und humanem EPO dient ein Wert, der saure von basischen Isoformen abgrenzt. Die Festlegung dieses Grenzwertes (Cut off) orientiert sich an der Bande des rekombinanten EPO mit dem niedrigsten pI (hier untere Bande der Spalte A).

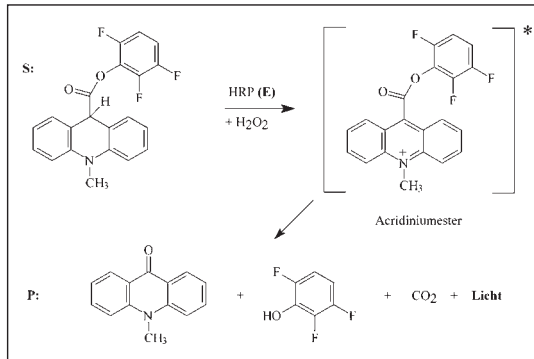


Abb. 9:
Prinzipielle Abläufe bei der Chemilumineszenz. S = Substrat, E = Enzym, P = Produkt, HRP = Horseradish peroxidase.

Zusammenfassung und Ausblick

Der direkte Nachweis von rekombinantem EPO basiert auf der isoelektrischen Fokussierung in einer Polyacrylamid-Gelmatrix mit pH-Gradient. Dabei werden humane und rekombinante EPO-Moleküle in einem elektrischen Feld voneinander getrennt. Fixierung sowie Visualisierung der einzelnen Epo-Banden erfolgen durch einen zweifachen Immunoblot, bei dem zuerst die EPO-Moleküle auf eine PVDF-Membran transferiert und durch spezifische Antikörper markiert werden.

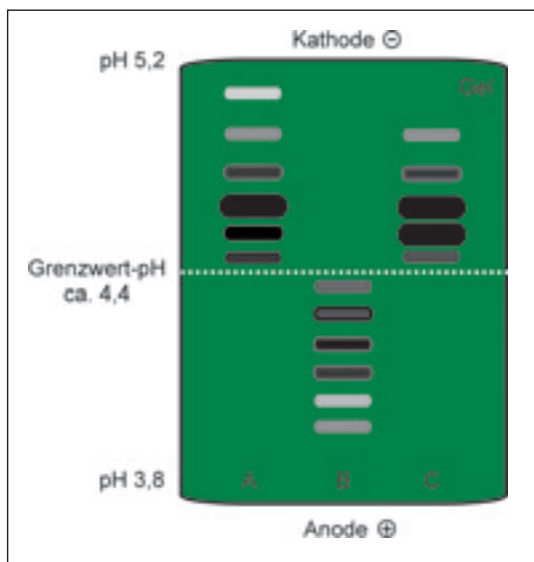


Abb. 10:
EPO-Banden nach IEF, Doppel-Blot und Chemilumineszenz-Visualisierung. A = rekombinantes EPO aus einem Standardpräparat; B = humanes EPO aus einer negativen Urinprobe; C = rekombinantes EPO aus einer positiven Urinprobe (vgl. LASNE et al. 2000).

Anschließend werden die spezifischen Antikörper auf einer zweiten PVDF-Membran abgebildet und mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Die mit einer Spezialkamera aufgenommenen Bandenmuster zeigen, dass humanes EPO niedrigere pI-Werte aufweist als rekombinantes, welches aus basischeren Isoformen besteht. Das hier vorgestellte Verfahren eignet sich auch zum Nachweis neuer EPO-Präparate wie Darbepoetin bzw. NESP (Novel Erythropoiesis Stimulating Protein, Handelsname in den USA: Aranesp), da

sich die pI-Werte von humanem EPO und NESP voneinander unterscheiden.

Grenzen der Methode sind in der aufwendigen und diffizilen Probenbehandlung zu sehen, die die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen beeinträchtigen kann. Aufgrund der sehr geringen Dosierung von EPO sind auch die zu erwartenden Urinkonzentrationen äußerst gering, weshalb bis dato andere theoretisch mögliche Nachweismethoden wie z.B. LC/MS-Verfahren (Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie) und elektrophoretische Verfahren mit MS-Kopplung aufgrund ihrer unzureichenden Empfindlichkeit nicht zum Einsatz gekommen sind. Ansatzpunkte für eine Verbesserung der Empfindlichkeit können spezifische Isolierungs- und Aufkonzentrierungsverfahren für EPO sein, wie z.B. die Immunoaffinitätschromatographie.

Literatur bei den Autoren.

Glossar

Ampholyt

Verbindung, die sowohl sauer als auch basisch reagieren kann.

Amphotere Verbindung

siehe Ampholyt.

Antigen

Substanz, die von einem Organismus als fremd erkannt wird und dadurch eine spezifische Immunantwort (Bildung von Antikörpern) auslöst.

Antikörper

Klasse von Proteinen, die als Antwort des Immunsystems nach Kontakt des Organismus mit einem Antigen (Fremderreger) gebildet werden und mit dem entsprechenden Antigen spezifisch reagieren.

Blot

Verfahren, elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine bestimmte Membran zu transferieren und zu immobilisieren.

CHO

Abkürzung für Chinese Hamster Ovary, Quelle für eine in der Gentechnologie vielfach genutzte Zelllinie, die aus dem Ovar einer chinesischen Hamsterart stammt.

Erythropoiese

Bildung und Reifung von Erythrozyten, Regulierung durch EPO.

Glykoprotein

Protein mit einem kovalent gebundenen Kohlenhydratanteil.

Glykosilierung

Knüpfung einer glykosidischen Bindung (z.B. an Proteine), siehe auch N-/ O-glykosidische Bindung.

hEPO

humanes, körpereigenes Erythropoietin

HRP

Abkürzung für Horseradish Peroxidase. Enzym, das Oxidationsreaktionen katalysiert.

Isoelektrische Fokussierung

Verfahren zur Trennung von geladenen Makromolekülen in einem elektrischen Feld mit pH-Gradienten.

Isoelektrischer Punkt

Bezeichnung für denjenigen pH-Wert einer Lösung eines Ampholyten, bei dem seine Nettoladung gleich null ist. Am isoelektrischen Punkt besteht keine Wanderung im elektrischen Feld.

Isoformen von EPO

EPO-Moleküle, die sich nur innerhalb der Zuckerseitenketten unterscheiden.

MAK

Abkürzung für monoklonaler Antikörper.

Monoklonaler Antikörper

von einem einzigen Zellklon ausgehende homogene und monospezifische Antikörperpopulation.

Neuraminsäure

Polyhydroxyaminoketosäure, Bestandteil von Glykoproteinen, trägt zur negativen Ladung der Proteine bei.

N-glykosidische Bindung

Bindungsart, bei der die Hydroxylgruppe eines Saccharids mit dem Stickstoffatom eines Reaktionspartners (z.B. Protein) unter Wasserabspaltung reagiert.

O-glykosidische Bindung

Bindungsart, bei der die Hydroxylgruppe eines Saccharids mit dem Sauerstoffatom eines Reaktionspartners (z.B. Protein) unter Wasserabspaltung reagiert.

pKA

negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten einer Säure.



Dr. Marc Machnik, geb. 1968 in Grevenbroich, studierte Chemieingenieurwesen mit Fachrichtung Biotechnologie an der FH Aachen. Im Februar 2000 promovierte er an der Deutschen Sporthochschule Köln in den Fächern Biochemie und Trainings- und Bewegungslehre. Seit März 2000 ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie.

E-Mail: m.machnik@biochem.dshs-koeln.de

pH

pondus hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration.

Repeats

wiederkehrende Zuckereinheiten.

rEPO

rekombinantes, körperfremdes Erythropoietin

Zwitterion

Zustand einer amphoteren Verbindung, bei dem die Dissoziation der basischen und sauren Gruppe gleich stark und damit die Summe der Ladungen gleich null ist.

Freiheit die anzieht!

SOMMER 2002

GONSO Sportmoden GmbH & Co. KG
Ebenhardtstraße 24
D-72461 Albstadt
Telefon 07432 . 209-0
Telefax 07432 . 209-88
Internet www.gonso.de
eMail info@gonso.de

Sie finden uns im autorisierten Fachhandel.

4 gute Gründe für Sympatex® HIGH2OUT

- 120 % mehr Atmungsaktivität als herkömmliche Sympatex Lamine
- saugt flüssigen Schweiß in das Jackenfutter auf, verteilt ihn und läßt ihn durch die Membran verdunsten
- unterstützt die natürliche Temperaturregelung des Körpers
- unterstützt die natürliche Temperaturregelung des Körpers