

Neue Nachweismethoden in der Dopinganalytik

Künstliche Sauerstofftherapeutika aus quervernetztem Rinderhämoglobin

Ein Beitrag von
Mario Thevis
Wilhelm Schänzer
Institut für
Biochemie

Die Suche nach künstlichen Sauerstoffträgern als Blutersatzstoffe für die Notfallmedizin ist seit langem ein aktuelles Forschungsgebiet, da Blutkonserven häufig nicht in ausreichenden Mengen vorliegen, deren Parameter bezüglich Blutgruppe, Rhesusfaktor und mögliche Krankheitserreger bestimmt werden müssen und Haltbarkeiten begrenzt sind. Neben Sauerstofftherapeutika auf der Basis von Perfluorkohlenwasserstoffe (PFC) sind im Besonderen Hämoglobinderivate intensiv untersucht worden.

Zellfreies Hämoglobin (Hb) dissoziiert in α, β -Dimere und verliert die Fähigkeit der reversiblen Sauerstoffbindung bedingt durch die Abwesenheit des polyanionischen Effektors 2,3-Diphosphoglycerat, das innerhalb von Erythrozyten dem Hb zur Verfügung steht. Durch intra- und intermolekulare Quervernetzung sind Hämoglobine verschiedener Spezies stabilisiert worden und das Rinderhämoglobin-Produkt Hemopure® der Firma Biopure wurde für den therapeutischen Einsatz im Humanbereich in Südafrika bereits zugelassen. Humanhämoglobinprodukte befinden sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt in Entwicklung bzw. in klinischen Testphasen und haben bislang keine medizinische Freigabe erhalten.

Neben therapeutischen Indikationen können künstliche Sauerstoffträger wie das Hemopure® auch zur Leistungssteigerung bei Athleten im Ausdauersportbereich verwendet werden. Daher sind solche Substanzen durch das IOC und die WADA (Welt-Antidoping Agentur) verboten und Nachweismethoden mittels verschiedener Techniken gefordert worden. Eine Möglichkeit ist die Auftren-

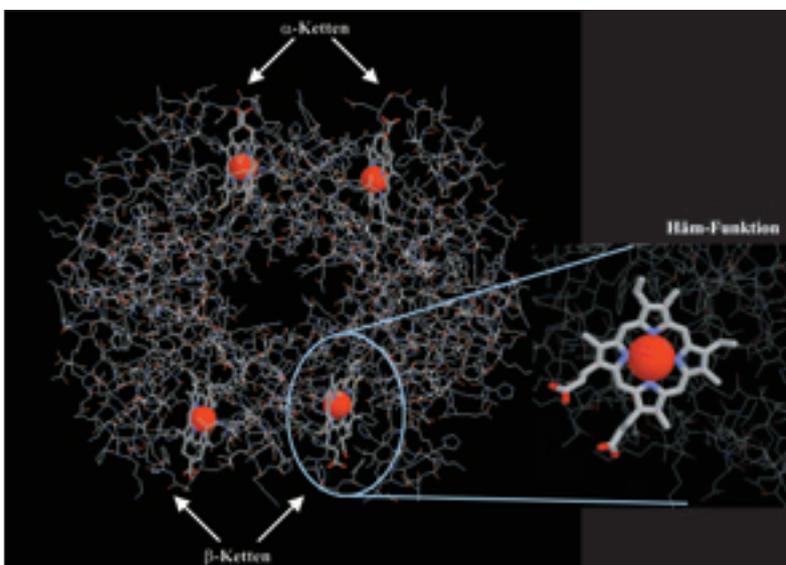
nung im Plasma befindlicher Proteine über Größenausschluss-Chromatographie (SEC, size-exclusion chromatography) und Detektion Häm-spezifischer UV-Banden. Ein wesentlich spezifischer Nachweis beruht auf der selektiven enzymatischen Degradierung des modifizierten Hämoglobins in Peptide, die daraufhin mittels Flüssigkeitschromatographie in Verbindung mit Massenspektrometrie bestimmt werden können, wie im Folgenden dargestellt wird.

Strukturen verschiedener Hämoglobine

Die primäre Aufgabe des Hämoglobins in Erythrozyten ist die Versorgung der Mitochondrien mit Sauerstoff und die Entsorgung entstehenden Kohlendioxids. Dazu wird Sauerstoff reversibel an Häm-Einheiten gebunden und über den Blutkreislauf in Zielgewebe transportiert, wo daraufhin Kohlendioxid aufgenommen und nach Beförderung in die Lunge über Alveolen abgegeben wird. Hämoglobine bestehen prinzipiell aus α - und β -Ketten, zwei Untereinheiten, von denen jeweils zwei für die Bildung des Hämoglobinmoleküls notwendig sind (Abb. 1). Aufgrund nicht-kovalenter Wechselwirkungen sind Hämoglobine innerhalb roter Blutkörperchen stabil und fungieren als Transportmedium für Sauerstoff.

Trotz identischer Aufgaben der Hämoglobine verschiedener Spezies unterscheiden sich deren Primärstrukturen, d.h. deren Aminosäuresequenzen. In Abbildung 2 sind die Aminosäuresequenzen der α - und β -Ketten des humanen sowie des bovinen Hämoglobins als konventionelle Ein-Buchstaben-Abkürzung dargestellt. Es liegt eine Sequenzhomologie von ca. 85 Prozent vor, d.h. etwa jede 8. der insgesamt 287 Aminosäuren des humanen Hämoglobins ist im bovinen Pendant substituiert. Zudem ist die β -Kette des Rinderhämoglobins um eine Aminosäure verkürzt. Diese signifikanten Unterschiede werden zum spezifischen Nachweis rinderhämoglobin-basierender Sauerstofftherapeu-

Abb. 1:
Struktur des humanen Hämoglobins: je zwei Untereinheiten des Hämoglobins, d.h. α - und β -Ketten, lagern sich nicht-kovalent zu einem Tetramer zusammen. Jede monomere Einheit trägt eine Häm-Funktion mit einem komplexierten Eisen(II)-Ion (rot).
[Quelle: Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb> Eintrag 1A3N].



tika in der Dopinganalytik genutzt, da Medikamente wie z.B. Hemopure aus diesen von humanem Hb abweichenden Strukturen hergestellt werden.

Aufbau des Hemopure

Das Produkt Hemopure wird durch inter- und intramolekulare Vernetzung der Untereinheiten bovines Hämoglobins hergestellt. Dazu werden Verknüpfungen sowohl zwischen Lysin-99-Einheiten der α -Ketten (intramolekular) als auch unspezifisch zwischen Lysinen verschiedener Hämoglobinmoleküle (intermolekular) eingefügt, welche dem resultierenden Makromolekül mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 250.000 u seine Stabilität im Blutkreislauf verleihen. Eine solche chemische Vernetzung ist schematisch in Abb. 3 dargestellt.

Nachweis quervernetzten Rinderhämoglobins in der Dopinganalytik

Die signifikanten Unterschiede der Hämoglobine von Mensch und Rind werden für den Nachweis dieser dopingrelevanten Verbindung genutzt. Aufgrund der Tatsache, dass die Primärstrukturen, d.h. die Aminosäuresequenzen der Hämoglobine bekannt sind und Proteine mit Hilfe spezifischer Enzyme C-terminal an Lysinen und Argininen in Peptide gespalten werden können, erlauben moderne Datenbanken (z.B. SwissProt: <http://www.expasy.org/sprot/>) eine theoretische Kalkulation entstehender Peptide. In Tabelle 1 ist eine Auswahl solcher Peptide von humanem und bovinem Hämoglobin gelistet. Hier wurden aus α - und β -Ketten Bruchstücke generiert, deren genaue Massen, entsprechende Positionen und Aminosäuresequenzen berechnet wurden. Zudem wurden korrespondierende Masse/Ladung-Verhältnisse kalkuliert (m/z), da Peptide unter Elektrospray-Ionisations-Bedingungen (ESI, dem folgenden praktischen Messverfahren) durch Anlagerung von zwei oder mehr Protonen verschiedene Ladungszustände annehmen.

Peptide, die ausschließlich aus Rinderhämoglobin stammen (in Tabelle 1 mit b gekennzeichnet), eignen sich zum praktischen Nachweis dieses Proteins in humanem Blut. Dazu wird ein Aliquot humanen Plasmas (etwa 50 μ l) mit Trypsin bei 37° C inkubiert, um Proteine spezifisch an Lysin- und Arginin-Molekülen zu spalten. Das resultierende Gemisch mit einer Vielzahl an Peptiden aus vielen verschiedenen Plasmaproteinen wird mit Hilfe von Flüssigkeitschromatographie (LC, liquid chromatography) über Elektrospray-Ionisation (ESI) in ein Massenspektrometer (MS) befördert, welches zum einen die Bestimmung der genauen Masse der Peptide erlaubt und zum anderen Informationen über die Aminosäuresequenz der Peptide bereitstellt. Dazu werden Peptide, welche aufgrund der ESI zwei oder mehr Ladungen tragen, mit Stickstoffmolekülen kollidiert, wodurch das Peptid zerbricht und sogenannte Produkt-Ionen generiert.

α -Kette human (141 Aminosäuren, mittleres Molekulargewicht = 15126 u)
VLS ^P ADKTNV KAAMGKVS ^C AGEYGAEEALE RMFLSFPTTK TYFFHFDLSH GSAQVKGHGK KVADALTNV A ^S DDMPNAL SALS ^D DLMAHK LRVDPVNFKL LSHCLLVTLA AHLPAEFTPA VHASL ^D DKFLA ^S VSTVLTLSKY R
α -Kette bovin (141 Aminosäuren, mittleres Molekulargewicht = 15053 u)
VLS ^P ADKGNV KAAMGKVS ^C AAEYGAEEALE RMFLSFPTTK TYFFHFDLSH GSAQVKGHGA KVAALTKAV E ^F DDLPAL SELS ^D DLMAHK LRVDPVNFKL LSHSLLVTLA SHLPSDFTPA VHASL ^D DKFLA ^S VSTVLTLSKY R
β -Kette human (146 Aminosäuren, mittleres Molekulargewicht = 15867 u)
VHLTPEEK ^G V ^T ALNGKVN ^V DEVGGEALGR LLVYYPWTQR FFESFGDLST PDAV ^M NPVKV KAHGKVLGA FSDGI ^S ELDN LKGT ^F FATLSE LHCDKLHVDP ENFRLLGNVL VCVLASHFGK EPTPPQAA ^Y QKVAVGANA LA ^R YH
β -Kette bovin (145 Aminosäuren, mittleres Molekulargewicht = 15954 u)
MLTAEK ^G AV TAFWGVKVD EVGGEALGRL LVVYYPWTQR FESFGDLSTA DAV ^M NPVKV AHGKVLDSF SNG ^S ELDDL KOTFAALSEL HCDKLHVDPE NFKLLGNVL VVLARNFGKE FTFVLOADPQ KVVAVANAL A ^R YH

Abb. 2: Aminosäuresequenzen der α - und β -Ketten von humanem und bovinem Hämoglobin. A Alanin, C Cystein, D Asparaginsäure, E Glutaminsäure, F Phenylalanin, G Glycin, H Histidin, I Iso-leucin, K Lysin, L Leucin, M Methionin, N Asparagin, P Prolin, Q Glutamin, R Arginin, S Serin, T Threonin, V Valin, W Tryptophan, Y Tyrosin. Beispiele substituierter Aminosäuren der verschiedenen Spezies sind blau bzw. grün markiert.

Diese Bruchstücke beschreiben teilweise oder ganz die Komposition des Peptids und ermöglichen somit dessen Identifizierung. In Abbildung 4 ist ein sogenanntes Produkt-Ionen-Spektrum eines Pep-

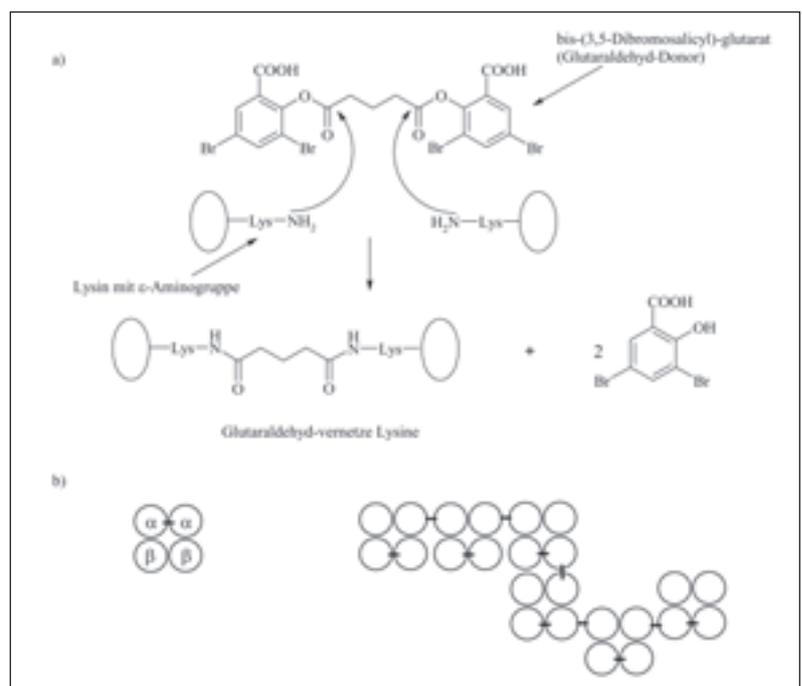
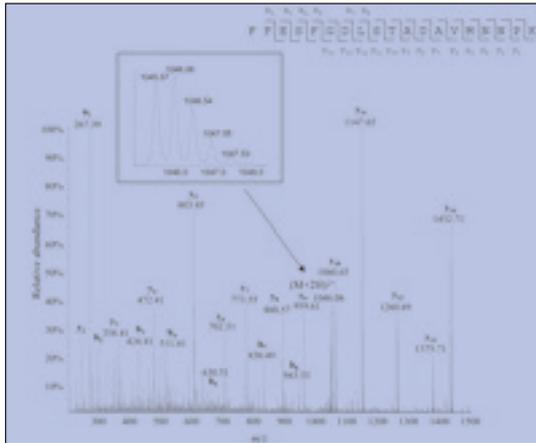


Abb. 3: a) Quervernetzung von Lysinen mit Glutaraldehyd; b) stabilisiertes Hämoglobin-Monomer (links, ca. 64.000 Da) und Polymer (rechts, mittleres Molekulargewicht ca. 250.000 Da).

Abb. 4: ESI-Produkt-Ionen-Spektrum des Peptids der Masse 2089.95 Da (m/z 1045.98) nach Elektrospray-Ionisation und Kollision mit Stickstoffmolekülen (sog. kollisions-induzierte Dissoziation). Der vergrößerte Ausschnitt zeigt das zweifach geladene Molekül-Ion, während die Fragmente mit den Bezeichnungen b_n und y_m die jeweiligen Abschnitte der Aminosäuresequenz des Peptids (oben rechts) repräsentieren.



	Masse (Da)	Peptide nach ESI (m/z)		Position	Aminosäuresequenz	Herkunft
		$M+2H^{2+}$	$M+3H^{3+}$			
α-Ketten						
	2986,49	1493,24	999,83	52-90	VADALTNAAVAVDDMPNALSALSDLAHK	b
	2989,81	1495,80	999,87	100-127	ILSHSLVTLASHLPDITP AVHASLDK	b
	2987,81	1494,81	999,20	100-127	ILSHCLVTLAAHLPAETTP AVHASLDK	b
	2387,19	1194,60	799,06	89-90	AVEHLDOIPLGALSLSLDAHK	b
	1833,89	917,95	612,30	41-56	TYPPFDLSHGSADVK	b + b
	1529,73	765,87	510,91	17-31	NGAHAGEYGAELER	b + b
	1279,73	640,86	427,58	128-139	FLANVSTVLTSK	b
	1252,71	627,36	418,57	128-139	FLASVSTVLTSK	b
	1071,55	536,78	358,18	32-40	MILSPITTK	b + b
β-Ketten						
	2089,95	1045,98	697,85	40-58	FFESFGDLSLTAQAVMGNPK	b
	2058,95	1030,47	687,32	41-58	FFESFGDLSLTPDVMGNPK	b
	1718,97	860,99	574,32	105-120	ILGNVLCVLAHFGK	b
	1689,89	835,95	557,83	87-87	VLGAFSDGLAHLDMK	b
	1422,73	712,36	475,24	120-131	EFTPLDADFQK	b
	1421,87	711,84	474,89	83-95	GTFTLSELHCKK	b
	1391,66	696,83	464,89	82-94	GTFAALSELHCKK	b
	1378,70	690,35	460,57	121-132	EFTPPVDAAYDK	b
	1314,66	658,33	439,22	18-30	VWDEIVGGEALGR	b
	1274,73	638,36	425,91	31-40	ILVVYPWTOR	b + b
	1265,83	633,92	422,94	104-115	ILGNLVVVVLAR	b
	1177,68	589,84	393,56	132-143	VVAGVANALAHK	b
	1149,67	575,84	384,22	133-144	VVAGVANALAHK	b
	1126,56	564,28	376,52	96-104	LHYDPENIR	b
	1101,55	551,78	368,18	19-29	VDEIVGGEALGR	b
	1098,56	550,28	367,19	95-103	LHYDPENFK	b
	1097,53	549,76	366,84	86-75	VLDSPNGMK	b

Tab. 1: Theoretisch bestimmte Massen von Peptiden aus humanem und bovinem Hämoglobin nach enzymatischer Behandlung mit Trypsin. Hier sind nur Peptide mit einer Masse > 1000 Da aufgelistet.

tids aus Rinderhämoglobin abgebildet. Die Anwesenheit eines oder mehrerer Peptide des Rinderhämoglobins in humanem Plasma bedeutet einen Dopingverstoß gegen die Regularien der Welt-Antidoping Agentur (WADA).

Eine vom Hersteller Biopure empfohlene intravenöse Dosis Hemopure besteht aus 30-45 g quervernetzten Rinderhämoglobins. Bei einem angenommenen Blutvolumen von ca. 6 Litern kann demnach eine Konzentration von mindestens 5 mg Hemopure pro Milliliter Blut erwartet werden, und die Halbwertszeit dieses Therapeutikums wurde mit ca. 20 Stunden bestimmt. Das beschriebene Verfahren zur Bestimmung Rinderhämoglobin-spezifischer Peptide erlaubt die Detektion von etwa 0.25 mg Hemopure je Milliliter Blut und kann somit auch über mehrere Tage nach Applikation des Medikaments dessen Anwesenheit bestätigen.

Literatur bei den Autoren.



Dr. Mario THEVIS, geb. 1973, studierte Sport und Chemie (Lehramt Sek. II) an der DSHS Köln und der RWTH Aachen. 2001 promovierte er am Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln mit dem Thema „Synthese und

Charakterisierung von Glucuronidkonjugaten anabol androgener Steroide und deren Metaboliten“. Als Postdoctoral fellow an der University of California Los Angeles, Department of Chemistry and Biochemistry (2002), beschäftigte er sich vor allem mit den Themen Protein-Derivatisierung, Massenspektrometrische Analytik von intakten Proteinen mittels QqTOF, Ion Trap und FT-MS Analysatoren. Seit 2003 ist er Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie mit den Arbeitsschwerpunkten LC-MS/MS Analytik und Fragmentierungsaufklärung von Beta-Blockern, Diuretika, Corticosteroiden sowie dopingrelevanter Peptidhormone.

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



Prof. Dr. Wilhelm SCHÄNZER, geb. 1951, Sportstudium an der Deutschen Sporthochschule Köln, Chemiestudium (Lehramt an Gymnasien) an der Universität zu Köln, promovierte von 1980 bis 1984 an der DSHS bei Professor Manfred Donike. Nach seiner Habilitation im Fach Biochemie an der DSHS Köln (1995) ist er seit 1997 Leiter des Instituts für Biochemie, das im Rahmen der Dopingkontrollen im Sport vom IOC für die Dopinganalytik akkreditiert ist. Einer seiner Forschungsschwerpunkte ist seit 1986 „Metabolismus und Nachweis von synthetischen anabolen Steroiden (Anabolika)“.

E-Mail: schaenzer@biochem.dshs-koeln.de; **Internet:** www.dopinginfo.de