
Untersuchungen zur artifiziellen Demethylierung endogener Steroide

Detlef Thieme (Projektleiter), Claudia Rautenberg

Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie, Dresden

Problemstellung

Die Präsenz relevanter aktiver Mikroorganismen als Ursache der Demethylierung konnte im vorangegangenen Projekt ausgeschlossen werden (Thieme et al., 2006). Vielmehr schien die isolierte Anwesenheit von Proteinen mit entsprechender enzymatischer Aktivität für die stattfindende Demethylierung der endogenen Steroide verantwortlich zu sein. Um eine systematische Untersuchung des Phänomens durchführen zu können, wurden die vergleichsweise selten und unvorhergesehen auftretenden („aktiven“) Proben zunächst gesammelt. Insgesamt standen im Rahmen dieser Projektstudie 6 Urine mit Merkmalen der Demethylierung ($NA < NE$; $NE \geq 1 \text{ ng/ml}$; $NA/NE < A/E$) zur Verfügung, die aus Routine-Dopingkontrolle der Jahre 2006 bis 2008 selektiert wurden. Durch fraktionierte Zentrifugation aktiver Urine waren erste strukturelle Eingrenzungen hinsichtlich des Molekulargewichtes des vermuteten Enzyms vorhanden. Die erhaltenen Filtrate mit Peptidbestandteilen kleiner 10 kDa zeigten unverändertes Demethylierungsverhalten, was auf ein Molekulargewicht der aktiven Enzyme im Bereich zwischen 1 - 10 kDa schließen lässt.

Darauf aufbauend sollte eine weitere Charakterisierung des fraglichen Enzyms erfolgen. Zur Isolierung und Anreicherung des Proteins mit enzymatischer Aktivität sollte eine ionenchromatographische Methode entwickelt werden, unter der die Demethylierungsaktivität erhalten bleibt. Die mit Enzym angereicherte Fraktion sollte mit einer geeigneten Methode eingeeengt und anschließend das Molekulargewicht des Proteins bestimmt werden.

Um eine direkte Vergleichbarkeit zwischen der Demethylierung freier und konjugierter Steroide zu erhalten, sollte aktiver Urin einmal mit freien, glukuronidierten und sulfatierten Steroiden (Androsteron, Etiocholanolon) als Substrate umgesetzt werden.

Material und Methoden

Anreicherung aktiver Urinproben unter Erhalt ihrer metabolischen Aktivität

Durch Sterilfiltration und anschließende Ultrazentrifugation (Porenmembran cut off 10 kDa) der selektierten Urine wurden alle irrelevanten Proteine mit einem Molekulargewicht größer 10 kDa abgetrennt. Die so erhaltenen Filtrate wurden anschließend auf ihre metabolische Aktivität durch Zusatz der deuterierten Analoga von Androsteron bzw. Etiocholanolon und anschließender Inkubation von 20 Stunden bei 37° überprüft.

Zur Isolierung des Proteins mit enzymatischer Aktivität wurde zunächst eine Kationenaustausch-Chromatographie mit Stufengradient entwickelt und durchgeführt. Der pH-Arbeitsbereich war auf pH 5 - 6,5 determiniert, da vorbereitende Versuche einen Aktivitätsverlust bei Verschiebung in höhere pH-Bereiche gezeigt hatten.

Die Trennung von jeweils 0,5 ml des Filtrats erfolgte auf HiTrap SP Säulen (1 ml) unter Verwendung des folgenden Stufengradienten:

Puffer A: 50 mM NaAc, pH 6

Puffer B: 50 mM NaAc und 1M NaCl, pH6

Gradient: 100 % A (0 - 6 min), 90 % A (6 - 15 min), 60 % A (15 - 22 min) und 100 % (B 22 - 27 min)

Die einzelnen Fraktionen der verschiedenen Gradientenstufen wurden nach Einengung im Vakuum durch die in-situ Simulation der Demethylierung auf ihre metabolische Aktivität überprüft. Der erhaltene Rückstand wurde in Leerurin (Urin blank) aufgenommen und mit deuterierten Standards inkubiert.

SDS-Page aktiver Urinproben

Zur weiteren Charakterisierung der aktiven Urine wurde weiterhin versucht die im Filtrat (< 10 kDa) enthaltenen Proteine mittels SDS-Page aufzutrennen. Es wurde mit Tricine-SDS-Page basierend auf einem Tricine-Tris-Puffersystem gearbeitet (Schägger & Jagow, 1987; Schägger, 2006). Dies stellt eine Modifizierung zur bekannten Laemmli-SDS-Page dar und ist speziell für die Trennung von kleineren Proteinen im MW Bereich zwischen 1 - 30 kDa praktikabel.

Von den angewandten Färbetechniken erwies sich nur die Silberfärbung nach Blum als sensitiv genug (Candiano et al., 2004; Westermeier, 2006; Shevchenko, et al., 1996). Diese Färbetechnik ist kompatibel mit der im Anschluss an die Auftrennung geplanten massenspektrometrischen Bestimmung der erhaltenen Proteine. Essentiell für das Visualisieren aller im ausgewählten Molekulargewichtsbereich vorhandenen Proteine war eine vorherige Aufkonzentrierung der Urinfiltrate durch Lyophilisation. Zur weiteren Analyse wurden die im relevanten Molekulargewichtsbereich auftretenden Banden ausgeschnitten, entfärbt und als Auftragsanalytik vom Zentralinstitut für Proteinanalytik München analysiert. Alle Proteinbanden wurden dort mit LC-MS-MS untersucht. Anhand der erhaltenen Massenfragmente wurde abschließend mittels Datenbanksuche (Mascot) eine Sequenzierung ausgewählter Proteine durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Studien zur Anreicherung aktiver Urinproben unter Erhalt ihrer metabolischen Aktivität

Eine Demethylierungsaktivität konnte in allen ausgewählten Urinen nachgewiesen werden, wodurch ausreichend Material für nachfolgende Stabilitätstests verfügbar war. Der vorliegende Proteingehalte in den aktiven Proben wurde am Universitätsklinikum Dresden bestimmt. Die ermittelten Gesamtproteingehalte von zwei analysierten aktiven Urinen (jeweils Gesamturin als auch Filtrat) wiesen erwartungs-

gemäß keine Abweichungen von den Normwerten auf. Die Proteinausscheidung gesunder Personen liegt unterhalb von 150 mg/Tag (tägliche Urinabgabe 1 - 1,5 l). Die biologische, intra-individuelle Streuung der Ausscheidung von Proteinen liegt dabei in der Größenordnung von 20 - 30 %.

Ergänzend wurden Versuche zur Inkubation aktiver Urine unter Zugabe von Protease (Protease K) durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Aktivität nach Inkubation mit Protease K ungemindert bleibt. Es findet kein proteolytischer Abbau des entsprechenden Enzyms durch diese Protease statt. Ursächlich für diesen Umstand könnte die kleine Molekülgröße des vermuteten Proteins sein (< 10 kDA), so dass keine entsprechenden Schnittstellen für die Protease zur Verfügung stehen.

Als weitere Möglichkeit der Proteinanreicherung wurden die Filtrate einer Gefrier-trocknung unterzogen. Dabei sollte der Einfluss dieser Prozedur auf die Aktivität abgeschätzt werden. Diese Methode gilt als schonendes Verfahren zur Aufkonzentrierung von Proteinen, allerdings werden hier – anders als bei der Dialyse oder der Ultrafiltration – alle nichtflüchtigen Bestandteile der Protein-Lösung wie z. B. auch Salze angereichert.

Es wurden von zwei Proben je 1 ml aktives Filtrat 2 Stunden unter Vakuum eingengt. Der erhaltene Rückstand war viskos und wurde sofort in 1 ml Leerurin suspendiert. Anschließend wurde nach der bekannten Methode inkubiert. In beiden Urinen konnte nach der Inkubation NA-d4 und NE-d3 nachgewiesen werden. Der Grad der Bildung an demethylierten Steroiden in den aufkonzentrierten Proben wurde mit der in den verdünnten Ausgangsfiltraten verglichen. Dies wurde anhand der Intensitäten der entsprechenden massenspektrometrischen Signale abgeschätzt. Für beide Urine wurde eine verminderte Bildung an NA und NE ermittelt. Ursache der verminderten Aktivität können die sich erhöhende Salzkonzentration oder die Wasserentfernung selbst sein, welche sich destabilisierend oder denaturierend auf die Struktur der Proteine auswirkt (Verschiebung des Gleichgewichtes von nativem Protein zu denaturiertem Protein). Auf eine vorherige Dialyse zur Erniedrigung der Salzkonzentration wurde bewusst verzichtet, um damit zwangsläufig verbundene Verluste ggf. auch die des relevanten Proteins zu verhindern.

Die Bildung der entsprechenden 19-Norsteroiden wurde jeweils nur in der ersten Fraktion nachgewiesen. Fraktion 1 bedeutet, dass keine Bindung des Proteins an die Oberfläche des Säulenmaterials stattfand, sondern lediglich eine Art Filtration der Probe durch das Füllmaterial erfolgte. Der gewählte pH-Bereich weist demnach weniger als zwei Einheiten Differenz zum unbekanntem pI der gesuchten Verbindung auf, so dass das Protein keine entsprechend positive Ladung trägt. Eine Wiederholung des Versuches bei pH 5 unter ansonsten äquivalenten Bedingungen ergab das gleiche Resultat.

Die alternative Durchführung einer *Anionenaustausch-Chromatographie* erfordert das Arbeiten in höheren pH-Bereichen in dem nachweislich die Aktivität durch ggf. Denaturierung des Enzymes nicht mehr gegeben ist.

Es wurde weiterhin eine Reaktivierung der enzymatischen Aktivität durch Zusatz von enzymstabilisierend wirkendem Rinderserum Albumin (BSA) in Erwägung gezogen. Dazu wurde 1 ml aktiver Urin unter Zugabe von BSA mit Pufferlösung auf

pH 8 eingestellt und 1 Stunde bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde der Ansatz halbiert. Ein Teil wurde auf pH 6 zurückgepuffert, der andere bei pH 8 belassen. Abschließend wurden beide Aliquote mit deuterierten Standard inkubiert. Erwartungsgemäß konnten keinerlei Demethylierungsprodukte in der Probe mit pH 8 nachgewiesen werden. Auch der auf pH 6 zurückgepufferte Urin wies lediglich ~ 1/10 der Bildung an deuterierten 19-Norsteroiden im Vergleich zur Kontrollproben des aktiven Urins auf.

SDS-Page aktiver Urinproben

Urinäre Proteine mit einem relevanten Molekulargewicht im Bereich von 5 - 10 kDa wurden elektrophoretisch sowohl in aktiven als auch inaktiven Urinen aufgetrennt.

Die Visualisierung der aufgetrennten Banden erwies sich teilweise als schwierig, da durch die niedrige Proteinkonzentration eine verlängerte Einwirkzeit des Entwicklers notwendig war. Die Muster der auftretenden Proteinbanden sowohl in aktiven als auch inaktiven Urinen sind ähnlich (vgl. Abb.1).

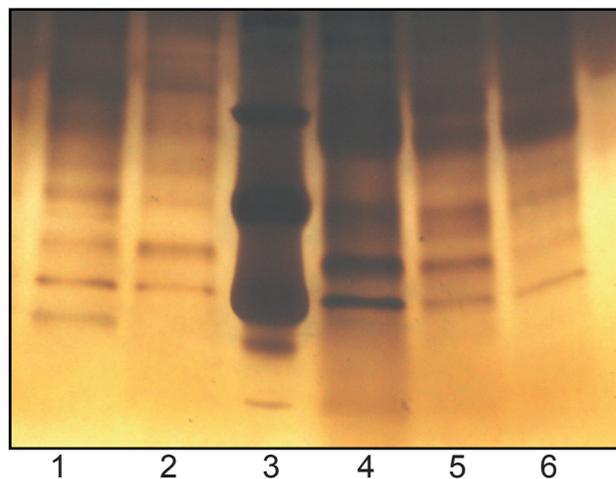


Abb. 1: SDS-Page-Gel von aktiven Urin (1,2) vs. inaktiven Urin (4,5,6); Ultra Low Range Molecular Weight Marker 1,06 – 26,6 kDa (3)

Als Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse mit Sequenzierung konnten sechs verschiedene Proteine identifiziert werden. Einige davon treten sowohl in aktiven als auch inaktiven Urinproben auf (vgl. Tab. 1). Der Nachweis von Psoriasin, Sarcosin und Cystatin ausschließlich in aktiven Urinen kann nicht zur Erklärung des Phänomens der Demethylierung herangezogen werden. Von den Enzymen, die nur im aktiven Urin gefunden wurden (Tab. 1) weist nur das Sarcosin, welches als Methylgruppenakzeptor im Cholin-Betain-Metabolismus involviert ist, auf einen möglicherweise erhöhten Methylgruppentransfer im Organismus dieser Probanden hin.

Tab. 1: *Übersicht der identifizierten Proteine in Abhängigkeit von der Demethylierungsaktivität der untersuchten Urine*

Protein	Inaktiver Urine	Aktiver Urin
Ubiquitin	+	+
Keratin	+	+
Dermicidin	+	+
Cystatin-A	-	+
Psoriasisin	-	+
Sarcosin	-	+

Inkubationsstudie zum Umsatz von konjugierten Steroiden

Weiterführende Inkubationsstudien zur Demethylierung konjugierter Steroide wurden mit drei aktiven Urinen durchgeführt. Die Demethylierungsaktivität wurde mit Androsteronglukuronid, Androsteronsulfat, Etiocholanolonglukuronid und den dazugehörigen freien Verbindungen selbst untersucht. Zwischen den verschiedenen Konjugaten und dem freien Substrat wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Demethylierungsumsatzes beobachtet. Damit steht nicht nur freies Androsteron als Substrat für die Demethylierung zur Verfügung sondern auch entsprechende Konjugate, die in Urinproben erheblich höher konzentriert vorliegen. Die in der Dopinganalytik übliche Vorgehensweise der summarischen Quantifizierung von Glukuroniden und freien Steroiden erfasst demnach die Demethylierung von sowohl freien Steroiden als auch Glukurokonjugaten.

Erforderliche Modifikationen und offene Probleme

Die vergleichsweise geringe Aktivität, die bei der metabolischen Demethylierung endogener Steroide in Urinproben zu beobachten ist, lässt nur vergleichsweise geringe Enzymkonzentrationen erwarten. Daher setzt die Identifizierung von entsprechenden Proteinen eine effektive Anreicherung und Reinigung dieser Substanzen voraus. Die anfangs favorisierte Kationenaustauschchromatographie zeigte jedoch unter allen Bedingungen keine Retention auf den gewählten Säulen, alternative Bedingungen (Variation des pH-Wertes) führte zum irreversiblen Verlust der metabolischen Aktivität. Trotz der prinzipiellen Möglichkeit der Reaktivierung/ Renaturierung wurde der Versuch einer Anionenchromatographie auf Grund des nahezu 90%-igen Verlustes der Demethylierungsaktivität verworfen, so dass die erwünschte Anreicherung mittels Ionenchromatographie nicht realisierbar war. Da auch die anschließend erforderliche Silberfärbung mit zusätzlichen Sensitivitätsverlusten in der massenspektrometrischen Detektion verbunden ist, wurde die Prognose für eine erfolgreiche Identifikation ungünstig.

Alternative chromatographische Anreicherungen sind zwar verfügbar, der erforderliche Aufwand einer anschließender in-situ Aktivitätsdetektion erscheint jedoch für eine systematische Methodenentwicklung unakzeptabel hoch.

Zusammenfassung

Zur Anreicherung der Urinproben unter weitgehendem Erhalt der enzymatischen Aktivität war von den getesteten Verfahren die Methode der Aufkonzentrierung im Vakuum am besten geeignet. Ionenchromatographie als Methode zur Isolierung und Anreicherung der enzymatisch aktiven Proteine erwies als unbrauchbar, da für die Erhaltung der Demethylierungseigenschaften ein Arbeiten im bestimmten pH-Bereiches notwendig war, der jedoch keine Retention auf der verwendeten Säule erlaubte.

Die mittels SDS-Page aufgetrennten und anschließend massenspektrometrisch bestimmten Proteine scheinen nicht zwingend mit dem Phänomen der artifiziiellen Demethylierung assoziiert zu sein. Alternativ kommt auch die Anwesenheit von Co-Faktoren als Ursache individuell unterschiedlicher Aktivität in Betracht.

Die Ergebnisse der Untersuchungen im Rahmen des Projektes wurden zum Manfred Donike Workshop 2009 in Köln als Poster präsentiert („Structural investigation of candidate proteins in urine samples with demethylation activity“)

Literatur

- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Cantucci, L. et.al. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25 (9), 1327-1333.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, 1 (1), 16-22.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166 (2), 368-379.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*, 68, 850-858.
- Thieme, D., Ganghofner, D., Grosse, J., Rautenberg, C. & Wassil, L. (2006). *Untersuchungen von mikrobiologischen Einflüssen auf die Stabilität von Dopingkontrollproben*, Bisp-Jahrbuch Forschungsförderung 2005/2006, 43-46. Bundesinstitut für Sportwissenschaft, Bonn.
- Westermeier, R. (2006). Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue staining of polyacrylamide gels. *Proteomics*, 6 (Suppl. 2), 61-64.