

**Andreas Breidbach**

# Nachweis von Erythropoietin-Missbrauch im Sport

Am Beispiel der Dopingkontrollen während der  
Olympischen Winterspiele Salt Lake City 2002

**Doktorarbeit / Dissertation**

## **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:**

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

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Copyright © 2004 Diplomica Verlag GmbH  
ISBN: 9783832440978

**Andreas Breidbach**

## **Nachweis von Erythropoietin-Missbrauch im Sport**

**Am Beispiel der Dopingkontrollen während der Olympischen Winterspiele  
Salt Lake City 2002**



---

Andreas Breidbach

# Nachweis von Erythropoietin-Missbrauch im Sport, am Beispiel der Doping- kontrollen während der Olympischen Winterspiele Salt Lake City 2002

Dissertation / Doktorarbeit  
Deutsche Sporthochschule Köln  
Fachbereich III  
Abgabe März 2004



Diplomica GmbH \_\_\_\_\_  
Hermannstal 119k \_\_\_\_\_  
22119 Hamburg \_\_\_\_\_

Fon: 040 / 655 99 20 \_\_\_\_\_  
Fax: 040 / 655 99 222 \_\_\_\_\_

agentur@diplom.de \_\_\_\_\_  
www.diplom.de \_\_\_\_\_

ID 4097

Breidbach, Andreas:

Nachweis von Erythropoietin-Missbrauch im Sport, am Beispiel der Dopingkontrollen während der Olympischen Winterspiele Salt Lake City 2002

Hamburg: Diplomica GmbH, 2005

Zugl.: Deutsche Sporthochschule Köln, Dissertation / Doktorarbeit, 2004

---

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden, und die Diplomarbeiten Agentur, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Diplomica GmbH

<http://www.diplom.de>, Hamburg 2005

Printed in Germany

## Lebenslauf

Name Andreas Breidbach  
geboren 23.05.1964 in Köln

### Schulbildung:

1970-1974 Grundschule Gr. Griechenmarkt, 50676 Köln  
1974-1980 Theodor-Heuss-Realschule, Euskirchener Str., 50935 Köln  
1980-1982 Gewerbliche Schule II, Perlengraben 101, 50676 Köln  
1982-1983 Fachoberschule für Ernährung und Hauswirtschaft Weinsbergstr, 50823 Köln

### Studium:

1984 Einsemestriges Studium (General Chemistry, General Physics, College Algebra, Butchery) am BHC College, Boston, MA, USA  
1986-1991 Studium der Lebensmittelchemie an der BUGH Wuppertal  
1995-2000 Promotionsvorbereitendes Studium DSHS Köln  
2002-2003 Promotionsvorbereitendes Studium DSHS Köln

### Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang:

1980-1982 Ausbildung zum Fleischergesellen: Metzgerei P. Becker, Jesuitengasse 117, 50737 Köln  
1983-1984 Grundwehrdienst  
1985 Beschäftigung als Meat-Cutter: Butcher Block, Boston, MA, USA  
1985-1986 Beschäftigung als Fleischergeselle: Metzgerei W. Breidbach, Blaubach 4, 50676 Köln  
1992 Wiss. Hilfskraft am Institut für Biochemie, DSHS Köln  
1992-2000 Wiss. Angestellter am Institut für Biochemie, DSHS Köln  
1995 Zweiwöchiger Aufenthalt in Harare/ Zimbabwe zur Inbetriebnahme eines temp. Dopingkontrolllabors und Ausbildung lokaler Wissenschaftler anlässlich der All African Games 1995  
2000 Dreiwöchige Mitarbeit im Australian Sport Drug Testing Laboratory, Sydney, anlässlich der Olymp. Sommerspiele 2000  
2001-2002 Staff Research Associate III: Paul Ziffren Olympic Analytical Laboratory, University of California, Los Angeles, CA, USA  
2002 Leitung des Arbeitsbereiches Erythropoietin im temp. Dopingkontrolllabor Salt Lake City anlässlich der Olymp. Winterspiele 2002  
Seit 2003 Staff Research Associate III-Supervisor: Paul Ziffren Olympic Analytical Laboratory, UC Los Angeles, CA, USA

## Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Methodik der Erythropoietin (EPO)-Dopingkontrollanalytik am Beispiel der Olympischen Winterspiele Salt Lake City 2002 (SLC2002) und wertet die dort gesammelten Daten aus. Es wurde bei einem Athleten und zwei Athletinnen ein Missbrauch von Darbepoetin alfa (Aranesp™) nachgewiesen, ein zu der Zeit erst seit kurzem erhältliches Nachfolgeprodukt von rekombinanten, humanem EPO (rhEPO).

Humanes EPO, ein Glykoprotein mit 165 Aminosäuren, einem Sauerstoff- und drei Stickstoff-gebundenen Kohlenhydratresten, ist ein Hormon, das die Bildung der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) im menschlichen Körper steuert. Sein Molekulargewicht beträgt ca. 30 kDa mit einem Kohlenhydratanteil von 30–40 %. Die Existenz dieses Hormons ist bereits 1906 postuliert worden. Seit 1948 wird es Erythropoietin genannt. 1957 wurde als Hauptbildungsort im erwachsenen Menschen die Niere ausgemacht. 1977 ist dann mit der Isolierung von wenigen Milligramm EPO aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie ein Meilenstein in der EPO-Forschung erreicht worden. Acht Jahre später, 1985, wurde das EPO-Gen erfolgreich kloniert.

Seit 1988 ist rhEPO für die Behandlung von Anämie als Folge von Nierenversagen erhältlich. Die Verfügbarkeit von rhEPO hat seitdem wesentlich zur Verbesserung der Lebensqualität von Menschen mit Nierenversagen beigetragen. Inzwischen wird rhEPO auch in vielen anderen Gebieten als Behandlungsmittel eingesetzt.

Auch im gesunden Menschen kann rhEPO die Anzahl der Erythrozyten erhöhen. Dies macht es zu einem potenten Dopingmittel, da die Ausdauerleistungsfähigkeit durch diese Erhöhung verbessert wird. Aus diesem Grund hat 1990 das Internationale Olympische Komitee rhEPO in die „Liste der verbotenen Substanzen“ aufgenommen. Aber bis zum Jahre 2000, als zwei unterschiedliche Nachweisverfahren veröffentlicht wurden, war ein Missbrauch von rhEPO nicht nachweisbar.

Das eine dieser zwei Verfahren beruhte auf den Veränderungen im roten Blutbild, die durch die Anwendung von rhEPO verursacht werden. Damit ist es ein indirektes Verfahren, da nur Wirkungen gemessen werden. Das andere Verfahren beruht auf dem Erkennen von rhEPO im Urin durch isoelektrische Fokussierung eines Urinkonzentrates mit nachfolgendem Immunoblotting, was ein direktes Verfahren darstellt und einem indirekten vorzuziehen ist. Beide Verfahren sind bei SLC2002 eingesetzt worden und werden hier beschrieben.

Es wird gezeigt, dass ein erster, schneller und einfacher Bluttest 133 verdächtige Proben identifizierte. 72 Blut- und Urinproben wurden daraufhin eingehender untersucht. Danach bestand nur noch bei 25 Blutproben ein Verdacht auf aktuellen Missbrauch, der aber durch den Urintest bei allen außer fünf Proben von drei Athleten/innen entkräftet wurde.

## Abstract

This work describes the methodology of the erythropoietin (EPO) doping control analyses at the Winter Olympics Salt Lake City 2002 (SLC2002) and evaluates the data obtained there. For three athletes a misuse of darbepoetin alfa (Aranesp™) was detected. At the time Aranesp™, which is an analog of recombinant human erythropoietin (rhEPO), had only been commercially available for a short period of time.

Human EPO, a glycoprotein of 165 amino acids, one oxygen- and two nitrogen-linked carbohydrate moieties, is a hormone, that regulates the production of red blood cells (erythrocytes) in the human body. Its molecular weight is ca. 30 kDa with a carbohydrate fraction of 30–40%. The existence of this hormone had been postulated as early as 1906 and it was named erythropoietin in 1948. In 1957 its main production site in the adult human was recognized as the kidney. A milestone in EPO research occurred 1977 with the isolation of a few milligrams of EPO from urine of patients with aplastic anemia. Eight years later, 1985, the EPO gene was successfully cloned.

Since 1988 rhEPO has been available for the treatment of anemia due to renal failure. The availability of rhEPO has improved the quality of life of patients with kidney failure significantly since then. Meanwhile rhEPO is being used as a treatment in many other areas.

Recombinant hEPO also increases the number of erythrocytes in healthy humans. This makes it a potent means of doping, since an increase in erythrocytes improves endurance performance. Because of this, the International Olympic Committee added rhEPO to its “list of prohibited substances” in 1990. However, misuse was not detectable until 2000 when two different detection methods were published.

One of the two methods is based on changes in red blood cell parameters caused by rhEPO administration. This makes it an indirect method, because secondary effects are measured. The other method is based on the recognition of rhEPO in urine by isoelectric focusing of urine concentrates followed by immuno blotting, which is a direct and more preferable method. Both methods were used during SLC2002 and are described herein.

It will be shown that an initial, quick, and simple blood test produced 133 suspicious samples. 72 blood and urine samples then underwent more sophisticated testing. Afterwards, 25 blood samples were still suspicious for current misuse, but the urine test was negative for all but five samples from three athletes.

## **Danksagungen**

Hiermit möchte ich Dr. Don H. Catlin und dem Paul Ziffren Olympic Analytical Laboratory der Universität von Kalifornien, Los Angeles, dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, während der Olympischen Winterspiele in Salt Lake City 2002 die EPO-Analytik zu leiten.

Meinen Mitarbeitern Inna Tregub, Henry Truong, Jeffrey Gorzek und Anni Ramseyer gehört Dank, weil ohne sie diese Daten nicht in dieser Form hätten gesammelt werden können.

Danken möchte ich auch dem Direktor der Medizinischen Kommission des IOC, Dr. Patrick Schamasch, und den internationalen Verbänden FIS, ISU, IBU, für die Erlaubnis, die in Salt Lake City gesammelten Daten für diese Arbeit verwenden zu dürfen.

Ralf Meutgens und meine Frau Sabine Nießen haben Dank verdient für ihre wertvollen Tipps beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wilhelm Schänzer, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit zu schreiben. Ohne seinen Ansporn und Unterstützung wäre diese Arbeit immer noch nicht geschrieben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Humanes Erythropoietin . . . . .	1
1.1.1	Geschichtlicher Überblick . . . . .	1
1.1.2	Molekularbiologie . . . . .	2
1.1.3	Leistungssteigernde Wirkung . . . . .	4
1.1.4	Nachweisbarkeit . . . . .	5
1.2	EPO-Tests bei Olympischen Spielen . . . . .	9
1.3	„Paul Ziffren Olympic Analytical Laboratory“ . . . . .	11
1.4	Ziel dieser Arbeit . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>13</b>
2.1	Direkter Nachweis . . . . .	13
2.1.1	Grundlagen . . . . .	13
2.1.2	Der uEPO-Test nach Lasne . . . . .	19
2.2	Indirekter Nachweis . . . . .	28
2.2.1	Grundlagen . . . . .	28
2.2.2	Der Bluttest nach Parisotto . . . . .	31
2.3	Der kombinierte Blut/ Urin-Test . . . . .	33
2.3.1	Grundlagen . . . . .	33
2.3.2	Durchführung des kombinierten Test während der Winterspiele . . . . .	35
2.4	Untersuchte Sportler . . . . .	36
2.5	Vergleichswerte . . . . .	36
2.6	„Zweite-Generation Bluttest“ . . . . .	37
2.7	Isoformenprofile . . . . .	38
2.8	Statistische Auswertung . . . . .	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Blut . . . . .	39
3.2	Urin . . . . .	50
3.2.1	Qualitätskontroll-Urinproben . . . . .	50

3.2.2	Athleten-Urinproben . . . . .	52
3.3	Kombinierter Test . . . . .	52
3.3.1	„Normale“ Profile . . . . .	52
3.3.2	„Unnormale“ Profile . . . . .	54
3.3.3	„Saure“ Profile . . . . .	54
3.3.4	„Keine“ Profile . . . . .	57
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
4.1	„Vor-Ort-Screening“ . . . . .	61
4.2	„ON model score“ . . . . .	63
4.3	Der Urintest . . . . .	67
4.4	Blut vor Urin: Sinn und Notwendigkeit . . . . .	69
4.4.1	„Zweite-Generation“-Bluttest . . . . .	72
4.4.2	Trainings- oder Wettkampfkontrollen . . . . .	73
4.5	Schlussfolgerungen . . . . .	75
	<b>Anhang A</b>	<b>77</b>
	<b>Glossar</b>	<b>109</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Aminosäuresequenz von hEPO . . . . .	2
1.2	Tertiär-Struktur von hEPO . . . . .	3
2.1	EPO-Isoformenmuster . . . . .	15
2.2	Densitogramm . . . . .	26
2.3	Laseroptik des ADVIA 120 . . . . .	29
	Histogramme: . . . . .	40
3.1	Hämatokritwerte . . . . .	40
3.2	Retikulozyten-Hämatokritwerte . . . . .	41
3.3	Prozent Makrozytenwerte . . . . .	42
3.4	Hämoglobinwerte . . . . .	43
3.5	Prozent Retikulozytenwerte . . . . .	44
3.6	sEPO-Konzentrationen . . . . .	45
3.7	sTfR-Konzentrationen . . . . .	46
3.8	„ON model scores“ . . . . .	47
3.9	„OFF model scores“ . . . . .	48
3.10	uEPO-Isoforme von Athleten . . . . .	50
3.11	Isoformenprofile der Qualitätskontroll-Urinproben . . . . .	51
3.12	Isoformenprofile der Athleten-Urinproben . . . . .	53

# Tabellenverzeichnis

3.1	Charakteristische Größen von allen Athleten . . . . .	49
3.2	Charakteristische Größen von den Athleten mit „normalen“ Profilen . . . . .	55
3.3	Median und alle Werte für die Athleten mit „unnormale“ Profilen . . . . .	56
3.4	Median und alle Werte für die Athleten mit „sauren“ Profilen . . . . .	58
3.5	Median und alle Werte für die Athleten ohne detektierbare Profile . . . . .	59