



Kandidaatintutkielma

Erytropoietiini ja sen käyttötarkoitukset

Elisa Myllymäki

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta
2018

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

I KIRJALLISUUSTUTKIELMA

Sisällysluettelo

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | Hormonit..... | 4 |
| 2 | Erytropoietiini..... | 4 |
| 2.1 | Erytropoietiinin rakenne..... | 5 |
| 2.2 | Erytropoietiinin synteesi..... | 7 |
| 2.3 | Erytropoietiinin hajotus..... | 10 |
| 3 | Erytropoietiinireseptori..... | 10 |
| 4 | Punasolujen tuotanto..... | 13 |
| 5 | Erytropoietiinin käyttö lääketieteessä..... | 15 |
| 6 | Rekombinanttierytropoietiini..... | 16 |
| 7 | Erytropoietiini urheilussa..... | 16 |
| 7.1 | Perusteet käytölle..... | 17 |
| 7.2 | Erytropoietiinin kaltaiset hormonit..... | 17 |
| 7.3 | Käytön havainnointi..... | 18 |

Lähteet

Käytetyt lyhenteet

| | |
|-----------|--|
| ActRII-Fc | aktiivireseptori II-Fc |
| BFU-E | burst-forming unit-erythroid |
| BHK | vauvahamsterien munuaisten solut |
| CBP | cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein |
| CERA | metoksipolyetyleeniglykoliepoietiini-beta |
| CFU-E | colony-forming unit-erythroid |
| CHO | kultahamsterien munasarjasolut |
| DPO | darbepoietiini alfa |
| EMP1 | erytropoietiinia matkiva peptidi 1 |
| EMP33 | erytropoietiinia matkiva peptidi 33 |
| EPO | erytropoietiini |
| EpoR | rekombinantti erytropoietiini |
| ESAs | erytropoieesin alullepanijat |
| fr | ferritiini |
| Hep3B | ihmisen hepatoomasolulinja 3B |
| HepG2 | ihmisen hepatoomasolulinja G2 |
| HIF-1 | hypoxia-inducible factor 1 |
| HIF-2 | hypoxia-inducible factor 2 |
| HNF-4 | hepatocyte nuclear factor 4 |
| HRE | hypoksian vasteosaset |
| IEF | isoelektrinen fokusointi |
| JAK-2 | Janus-perheeseen kuuluva proteiinityrosiinikinaasi 2 |
| LC-MS/MS | nestekromatografia-massaspektrometri -menetelmä |
| O-DDD | happiriippuvainen osa |
| PEG | polyetyleeniglykoli |
| PHD-1 | prolyyli-4-hydroksylaasi 1 |
| PHD-2 | prolyyli-4-hydroksylaasi 2 |
| PHD-3 | prolyyli-4-hydroksylaasi 3 |
| SFFV | friend spleen focus-forming virus |
| SHP1 | tyrosiinifosfataasi |
| STAT5 | signal transducer and signal activator of transcription 5 |

1 Hormonit

Soluissa on monenlaisia keinoja välittää viestejä ja säädellä elimistön toimintaa. Endokriininen säätely tapahtuu usein hormonien välityksellä. Hormonit erittyvät rauhasista ja ne voivat olla proteiineja, lyhyitä peptidejä, aminohappojohdannaisia tai kolesterolista syntetisoituneita steroideja. Kun hormonia tuottavat rauhasolut saavat viestin, että hormonia tarvitaan, erittyy sitä verisuonistoon, jota pitkin hormoni löytää kohdesolunsa. Niiden pinnalla on reseptoreita, jotka tunnistavat ja kiinnittävät hormonin. Näin viesti välittyy myös kohdesolun sisälle ja haluttu vaste aiheutuu. (Heino & Vuento 2015)

Hormonit voivat vaikuttaa myös paikallisesti, jolloin niitä kutsutaan kasvutekijöiksi. Ne voivat vaikuttaa välittömässä läheisyydessä oleviin soluihin ja tätä kutsutaan parakriiniseksi säätelyksi. Mikäli solu tuottaa hormoneja omaan käyttöönsä, on kyseessä autokriininen säätely. Tunnetaan kuitenkin myös kasvutekijöitä, joilla on endokriinisiä vaikutuksia. (Heino & Vuento 2015)

2 Erytropoietiini

Erytropoietiini (EPO) on elimistön tuottama glykoproteiini, joka säätelee punasolujen synteesiä. Sitä tuotetaan pääasiassa munuaisissa. Kun elimistön hapen konsentraatio laskee, tarvitaan lisää punasoluja, jotka kuljettavat happea ympäri elimistöä verisuonistoa pitkin. EPO:n vaikutus havaitaan luuytimessä, missä punasoluja tuotetaan multipotenteista kantasoluista. EPO kiinnittyy sille tarkoitettuihin reseptoreihin ja punasolujen määrä kasvaa 3-4 päivän sisällä EPO:n määrän lisääntymisestä. (Jelkmann & Metzen 1996)

Ensimmäisen havainnon punasolujen säätelyyn osallistuvasta humoraalisesta tekijästä teki Claude Bernard. Hän huomasi, että endokriiniset rauhaset osallistuvat säätelyyn ja yritti eristää hormonia, joka olisi päävastuussa. Hän myös huomasi, mitä seurauksia oli valtimoiden happipitoisuuden laskulla. Paul Bert ja Denis Jourdanet tutkivat korkeuden sekä paineen vaikutusta. He huomasivat, että vuoristotauti johtuu hypoksiasta. Bert ajatteli korkealla asuvien kohonneen happipitoisuuden olevan perinnöllistä, mutta Francois-Gilbert Viault huomasi Perun matkallaan 1980, että punasolujen määrä nousi hapen määrän ollessa pienempi. (Jelkmann 1992)

Paul Carnot ja Clotilde-Camille DeFlandre tekivät vuonna 1906 tutkimuksia jäniksillä, joissa he injektoivat jäniksille seerumia, jota oli eristetty anemiaa kärsiviltä eläimiltä. Kokeissa he havaitsivat punasolujen määrän nousun kahdessa päivässä. Näitä tutkimuksia yritettiin kuitenkin toistaa, mutta tuloksia ei pystytty todistamaan. Kyseiset tulokset saattoivat vääristyä hemoglobiinin konsentraatiosta. Näiden väärin tulosten jälkeen kesti kauan ennen kuin nimitys erytropoietiini edes esiteltiin. Tämä tapahtui vuonna 1948 suomalaisten Eva Bonsdorffin ja Eeva Jalaviston toimesta. (Jelkmann 1992)

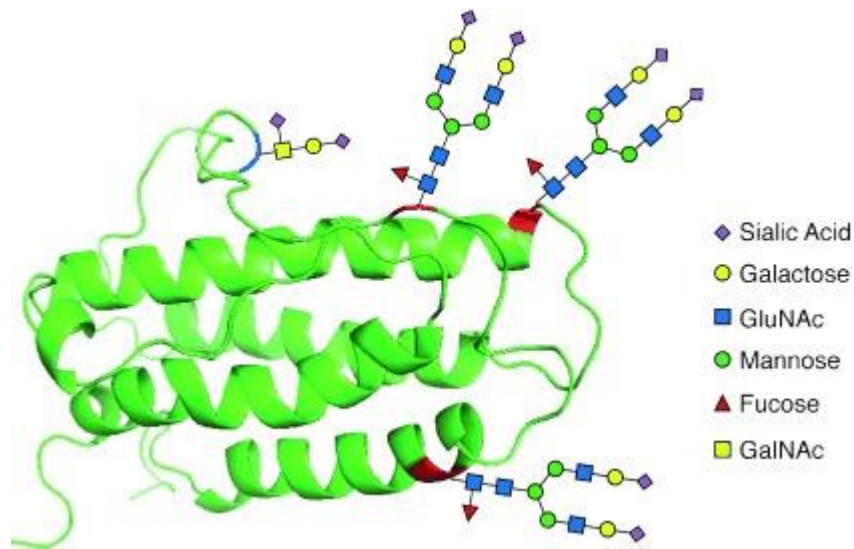
Kurt Reissmann ja Peter Ruhestroth-Bauer esittelivät tutkimuksiaan vuonna 1950, kun he olivat tehneet parabioosisia tutkimuksia. (Jelkmann 1992) Tällaisissa tutkimuksissa matkitaan tilannetta, joka esiintyy luonnostaan esimerkiksi siamilaisilla kaksosilla. Kaksi yksilöä yhdistetään tutkimustarkoituksessa ja niille muodostuu yhteinen verenkierto. (Eggel & Wyss-Coray 2014) Niissä kävi ilmi, että mikäli toiselle aiheutettiin hypoksia eli kudosten ympärille aiheutettiin laskenut happikonsentraatio, niin molemmilla yksilöillä punasolujen määrä silti nousi. EPO:n hoidolliset mahdollisuudet oivalsi Allan Erslev vuonna 1953, kunhan proteiini saataisiin vain eristettyä. (Jelkmann 1992) Tässä onnistui ensimmäisen kerran Tsunenori Miyake vuonna 1977, kun hän onnistui eristämään 10 mg puhdasta EPO:a 2550 litrasta aneemisten potilaiden virtsaa. Tämän jälkeen EPO:a ja sen ominaisuuksia pystyttiin tutkimaan paremmin ja tarkemmin. (Jelkmann & Metzen 1996)

2.1 Erytropoietiinin rakenne

Geeni, joka sisältää ihmisen EPO:n rakennusohjeet, sijaitsee kromosomissa seitsemän, tarkemmin sen pidemmän osan q11-q22 alueella. EPO sisältää viisi eksonia ja neljä intronia. (Jelkmann & Metzen 1996) EPO:n transkription ohella geenin NH₂-päästä pilkkoutuu 27 aminohapon kokoinen osa, jättäen jäljelle 166 aminohapon pituisen ketjun. Ihmisen virtsan EPO:sta sekä rEPO:sta ei kuitenkaan löydy 166. paikalla olevaa arginiinia, koska se poistetaan translaation jälkeisissä muokkauksissa. Valmis hormoni, joka pystyy kiertämään verenkierron mukana, koostuu siis 165 aminohaposta. Siinä on kaksi disulfidisiltaa, 7. ja 161. sekä 29. ja 33. kysteiniin välillä. (Jelkmann 1992) Ainakin toinen disulfidisilloista on tärkeä sekundaarirakenteen kannalta, sillä EPO:n biologinen aktiivisuus voidaan inaktivoida pelkistämällä tai kumoutumattomalla alkylaatiolla. (Koury & Bondurant 1992) EPO:n sekundäärirakenteesta (kuva 1) puolet

muodostuu α -kierteistä. Kaksi vastakkaissuuntaista paria α -helikaalisia kimppuja muodostaa pallomaisen rakenteen, joka näyttää GH kasvuhormonilta. (Jelkmann 1992)

EPO:n molekyyliässä kokonaisuudessaan on 30 kDa, josta 18 kDa kuuluu rakennetta koossa pitävälle peptidiketjulle. Hiilihydraatin määrä EPO:ssa on 40 %. Oligosakkarideista Ser-126 on O-sidoksellinen ja kolme asparagiinia paikoilla 24, 38 ja 83 ovat N-sidoksellisia. Nämä koostuvat fukoosista, mannoosista, N-asetyyli-glukosamiinista, galaktoosista sekä N-asetyylineuramiinista. N-linkittyneet muodostuvat pääasiassa neljän sokeriosan komplekseista ja O-linkittyneet ketjut omaavat vain yhteensä neljä sokeriosaa. (Jelkmann 1992)



Kuva 1 Erytropoietiinin sekundaärrakenne. Kuvassa näkyy α -kierteet sekä O- ja N-sidokselliset oligosakkaridit. Myös edellä mainittujen sokeriosat on eritelty. Kuva: (Wang et al. 2012)

Hiilihydraatin määrälle EPO:ssa on etsitty syitä ja onkin ehdotettu, että sen tehtävä on suojella EPO:n rakenteen glykolysaatiosta vastaavia osia niin ihmisillä kuin apinoilla ja hiirilläkin. Kohdennetussa mutageneesissä hiilihydraatti kiinnittyy paikkoihin 38, 83 ja 126 ja aiheuttaa EPO:n matalampaa eritystä. Tätä on tutkittu kultahamsterin munasarjasoluilla (CHO). Synteesin heikentyminen saattoi myös aiheutua aminohappojen korvautumisesta. Lämpö saattaa inaktivoida EPO:a, mutta mikäli EPO:on on liittyneenä oikeisiin kohtiin kiinnittyneitä hiilihydraatteja, pystytään lämmön vaikutuksia vastustamaan. Mikäli hiilihydraatit poistettaisiin EPO:sta, proteiini painuisi kasaan ja menettäisi muotonsa. Silti proteiini kykeni hemisynteesin stimulointiin, joten glykolysaatio ei ole välttämätön reseptoriin kiinnittymisen tai punasolujen kantamuodon aktivoinnin kannalta. Elävillä organismeilla tehdyillä tutkimuksilla on käynyt kuitenkin ilmi, että hiilihydraattiosa on tärkeä aineenvaihdunnan aikana. Mikäli EPO:sta puuttuu N-asetyylineuramiinihappo-osia,

poistetaan se verenkierrosta maksan galaktoosinsitoja- reseptoreilla. Koeputkessa tehdyissä tutkimuksissa edellinen tilanne tapahtuu nopeammin, sillä reseptorit tarraavat tällöin nopeammin EPO:on kuin elimistössä. (Jelkmann 1992)

Plasman EPO kestää lämmön ja pH:n muutoksia, sillä se esiintyy siellä vakaana happamana alfa₂-globuliinina. Miyake *et al.* 1977 puhdistama ihmisen virtsan EPO koostui kahdesta fraktiosta, alfasta ja beetasta. Niillä oli kuitenkin paljon samankaltaisuuksia: biologinen aktiivisuus, molekyylimassa ja aminohapposekvenssi. Niiden hiilihydraatit olivat kuitenkin erilaisia ja niiden osaset liikkuivat erilailla elektroforeesin aikana. (Jelkmann 1992)

Ihmisen virtsan EPO sekä DNA:sta tuotettu rekombinantti EPO (rEPO) ovat monella tapaa identtisiä. Niillä on samanlainen aminohapposekvenssi, sekundäärirakenne ja sekä disulfididisidosten että glykolysaatiokohtien paikat ovat samat. rEPO:ssa ei ole rakenteita, mitä ei ole ihmisen omassa EPO:ssa, mutta siltä puuttuu yksi sidos N-sidoksellisista oligosakkarideista galaktoosin ja N-asetyylineuramiinin väliltä. Eroja havaittiin myös sialyyliryhmän kiinnittämisessä, mutta ne voivat johtua myös siitä, että rEPO:a puhdistettaessa saadaan enemmän ainetta talteen. (Jelkmann 1992)

2.2 Erytropoietiinin synteesi

Sikiön EPO:n tuotannosta vastaa maksa, mutta syntymän jälkeen päävastuussa ovat munuaiset. EPO:n tuotanto maksassa jatkuu vähäisenä syntymänkin jälkeen ja sen lisäksi pienen osan EPO:n tuotannosta tekevät aivot sekä kivekset. Maksassa työn tekevät hepatosyytit eli maksasolut maksan keskisuonen ympärillä. Aivoissa EPO:n tuotannosta vastaavat astroosyytit. Kun aivot altistuvat hypoksisille olosuhteille, voidaan EPO:a tuottaa suoraan aivoissa, jolloin se luo suojaa neuroneille niiden tuhoutumista vastaan. (Lacombe & Mayeux 1998)

EPO:n tuotanto alkaa hapen määrän havainnoivan mekanismin säätelymään. Tätä on tutkittu ihmisen hepatoomasolulinjoilla, Hep3B ja HepG2. EPO:n tuotannossa on kuitenkin eroja munuaisten ja maksan välillä. Munuaisten solut reagoivat välittömästi täydellä teholla hypoksia olosuhteita vastaan, kun taas maksan solut reagoivat rauhallisemmin. Myös hypoksian vasteosaset (HRE) kontrolloivat EPO-geeniä eri kohdista munuaisissa ja maksassa. Molemmista kuitenkin EPO-promoottoria tukahduttaa GATA-2, jottei elimistön normaalissa happikonsentraatiossa alkaisi syntyä EPO:a ja sitä kautta lisää punasoluja, joka johtaisi liialliseen happikonsentraatioon. (Jelkmann 2011)

Solulinjat Hep3B ja HepG2 olivat ensimmäisiä, joilla EPO:n säätelyä hypoksian kautta tutkittiin. Nämä solut tuottavat EPO:a, mutta myöhemmin huomattiin, että vastaava tulos saataisiin myös monilla soluilla, jotka eivät tuota EPO:a. Monet geenit pystyvätkin sitomaan HIF-1:n (hypoxia-inducible factor 1). (Lacombe & Mayeux 1998) HIF-1:ä voidaan tuottaa monissa soluissa, joissa on olemassa vaste hypoksialle. Se myös kontrolloi geenejä, jotka koodaavat kehoa hypoksiaa vastaan suojaavia proteiineja, kuten verisuonten endoteelistä kasvutekijää ja joitain glykolyyttisiä entsyymejä. (Jelkmann & Metzen 1996) Solunsisäiset reaktiot hypoksiaan ovat tärkeitä fysiologisia prosesseja ja samanlaisia mekanismeja on myös hapen määrän havainnoinnille monissa kudoksissa ja soluilla. Tosin kaikkia hapen määrää aistivia mekanismeja ei vielä tunneta. Hep3B-solujen kanssa on huomattu, että yksi solutyyppeistä kykenee havaitsemaan hypoksisen tilan ja vastaamaan siihen nostamalla EPO-RNA-tasoa. (Lacombe & Mayeux 1998)

EPO kuuluu hematopoieettisiin kasvutekijöihin, mutta on niistä ainoa hypoksian säätelemä. EPO:a ei tuoteta solussa valmiiksi ja säilötä, vaan sen tuotanto aloitetaan olosuhteiden muuttuessa. Kun kehon hapensaanti vähenee, EPO-geenin transkription taso nousee. Geenin ekspressio sisältää myös vuorovaikutusta DNA:n ja tuman proteiinien välillä. (Lacombe & Mayeux 1998) EPO:n kudosspesifistä ekspressiota on selvitetty tekemällä kokeita transgeenisillä hiirillä. Hedelmöittyneisiin hiiren munasoluisiin mikroinjektioitiin joko neljä (tgEPO4) tai kymmenen (tgEPO10) kiloemäsparia (kb) kloonattua ihmisen EPO:a sisältävää DNA:ta. Geenistä oli mukana 0,7 kb 3'-pään sekvenssiä sekä joko 0,4 kb tai 6 kb 5'-pään sekvenssiä. Hiirien EPO:n tuotanto aloitettiin joko anemian tai koboltin avulla. tgEPO4 hiirillä ekspressio oli näkyvä maksassa, mutta ei munuaisissa tai muissa kudoksissa, jotka eivät normaalisti tuota EPO:a. tgEPO10:n kanssa EPO:a havaittiin ainoastaan maksassa. Kummissakin tapauksissa hiirillä havaittiin kasvanut punasolujen määrä. Näiden kokeiden avulla hän sai selville ne geenin kohdat, joita tarvitaan kudosspesifisyyteen sekä hypoksian käynnistämiseen. Geenin 5' päässä ovat EPO:n tuotannon käynnistämiseen munuaisissa vaadittava osa sekä negatiivisesta säätelystä vastaava osa. Hypoksiaa voimistava kohta on geenin 3' päässä. (Semenza *et al.* 1990)

3'-pään voimistajassa on kolme erilaista aluetta. Ensimmäinen sekvenssi sijaitsee tehostajan 5'-pään puolella ja se on sitoutumiskohta transkriptiotekijä HIF-1:lle. Keskimäinen alue käynnistää ihmisten ja rottaeläinten EPO-tehostajan toiminnan. Kolmas osa on vastuussa 3'-pään DNA sekvensseistä, jotka ovat sitoutumiskohtia HNF-4:lle (hepatocyte nuclear factor 4). Proteiinin C-terminaalinen pää on se pää, johon proteiinin rakentaminen translaatiossa lopetetaan eli siihen jää vapaa karboksyylihapporyhmä. EPO-geeniin kiinnittyvän HIF-1:n C-terminaalinen pää kiinnittyy p300:aan, jonka yli-ilmentyminen voimistaa hypoksian käynnistymistä. Voi myös

olla, että hypoksian aikana muodostuu iso proteiini-kompleksi, joka kiinnittyy suoraan tai epäsuoraan voimistajaan ja aiheuttaa EPO-geenin transkription. (Lacombe & Mayeux 1998)

HIF-1:ä voidaan tuottaa monissa soluissa, joissa on olemassa vaste hypoksialle. Se myös kontrolloi geenejä, jotka koodaavat kehoa hypoksiaa vastaan suojaavia proteiineja, kuten verisuonten endoteelistä kasvutekijää ja joitain glykolyttisiä entsyymejä. (Jelkmann & Metzen 1996) HIF-1 koostuu kahdesta alayksiköstä: happilabiilista eli helposti rakenteeltaan muuttuvasta α -yksiköstä sekä pienemmästä ja perustavasta β -yksiköstä. Tämä löydettiin EPO-tutkimusten yhteydessä, mutta myöhemmät tutkimukset ovat osoittaneet, että pääasiallisen EPO:n säätelyn hoitaa HIF-2. Sen α -muodon aktivoi stressiin reagoiva deasetylaasi Sirtuin 1. Maksan HIF-2 toimii pääsäätelijänä seerumin EPO:n määrässä. Se vastaa myös rautatasapainosta. (Jelkmann 2011)

HIF:t toimivat yhdessä HNF-4:n, transkriptionaalisen koaktivaattori p300:n sekä cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP) kanssa. Mikäli p300 käyttö soluissa estetään, romahtaa EPO:n tuotannon määrä. RNA-polymeraasi II ei kykene tällöin kiinnittymään geenin promoottoriin ja hypoksian stimuloiva asetylaatio ei kykene tapahtumaan. CBP:n poistaminen heikentää vain vähän hypoksian käynnistämää EPO-synteesiä. (Jelkmann 2011)

HIF-1:n α -muodolla on kolme eri isomuotoa: 1α , 2α sekä 3α . Näiden C-terminaalinen pää koostuu happiriippuvaisesta osasta (O-DDD), jotka ovat prolyylihydroksyloituja hapen läsnäollessa. Tätä katalysoi rautaa sisältävät prolyyli-4-hydroksylaasit (PHD-1, -2 ja -3). Nämä siirtävät yhden happi atomin proliinille ja toisen 2-oksoglutaraatille, josta syntyy hiilidioksidia sekä sukkiinaattia. PHD-2:n ja PHD-3:n määrän noustessa pitkän hypoksisen jakson aikana, HIF- α :n määrä laskee. Tämä säätelyjärjestelmä selittää laskeneen EPO-tuotannon kroonisessa anemiassa sekä pitkän ajan vuoristossa vietetyn ajan aikana. PHD:t ovatkin alkuperäisiä happitasojen aistijoita EPO-tuotannossa. (Jelkmann 2011)

Hemiproteiinien uskotaan myös toimivan hapen aistimisessa. Tätä on tutkittu inhiboimalla hemisynteesiä 4,6-dioksoheptaanihapon avulla. HIF-1:n sitoutumista DNA:han voidaan inhiboida H_2O_2 :lla, joka hapettaa säätelyproteiinien sulfydryyliryhmät. Tyroidihormoni on yksi humoraalisista säätelijöistä, joka vahvistaa EPO-geenin ekspressiota. (Jelkmann & Metzen 1996) Mikäli HIF-1:n sitoutumiskohdan vieressä on DR2-DNA -jakso, se johtuu luultavasti kilpirauhasen vaikutuksista sekä retinoiinihaposta. Nämä vahvistavat EPO:n tuotantoa kudosspesifisesti, mutta happiriippuvaisella tavalla. Koboltti vahvistaa EPO:n tuotantoa syrjäyttämällä raudan HIF- 1α :n dioksygenaasista. Tällöin HIF stabiloituu ja aiheutuu samanlainen vaste kuin hypoksiasta. (Jelkmann 2011)

Soluilla on oltava tapoja aistia hapen määrää elimistössä, jotta ne voivat tuottaa vasteen, jota kautta EPO:n tuotanto voidaan aloittaa. Tällaisia keinoja ovat mm. hapen tilavuus veressä, valtimoiden happijännitys, hapen affiniteetti veressä, paikallisen verenkierron nopeus sekä solujen hapenkulutusnopeus. Keho ei kuitenkaan kykene havaitsemaan, onko kudosten happimäärä laskenut anemian vai korkeuden aiheuttaman hapen puutteen vuoksi. Varsinkin munuaisten aistima happimäärä on käytössä EPO:n säätelyssä. (Jelkmann & Metzen 1996)

2.3 Erytropoietiinin hajotus

EPO poistetaan verenkierrosta hitaasti, kuten muutkin glykoproteiinit. Se on myös pieni proteiini ja voi kulkeutua munuaisten kautta virtsaan, mutta rotilla tehdyillä tutkimuksilla vain 32 % tuotetusta EPO:sta poistettiin munuaisten kautta. (Jelkmann 1992)

Vain solut, joissa on erytropoietiini reseptori, voivat poistaa EPO:a elimistöstä. Kun EPO kiinnittyy reseptorin pinnalle ja siirtyy näin solun sisään, voivat lysosomit huolehtia poistosta. Voi myös olla, että solun ulkopuolella olevat proteaasit sekä entsyymit hajottavat EPO:a. (Gross & Lodish 2006)

EPO:a tuotetaan munuaisissa, mutta käytetään luuytimessä. Kun EPO siirtyy verisuonia pitkin kohde-elimeensä, on pidettävä huolta, etteivät maksan solut poista sitä elimistöstä ennen kuin sitä tarvitaan. Siaalihappo on tärkeä osa EPO:a, sillä se vaaditaan, jotta kohdesolut saavutetaan verenkierron mukana kuljettaessa. Maksan reseptorit tunnistavat EPO:n siaalihapon galaktoosin ja näin EPO ei poistu elimistöstä ennen kuin se on päässyt luuytimeen. (Choi *et al.* 1996)

3 Erytropoietinireseptori

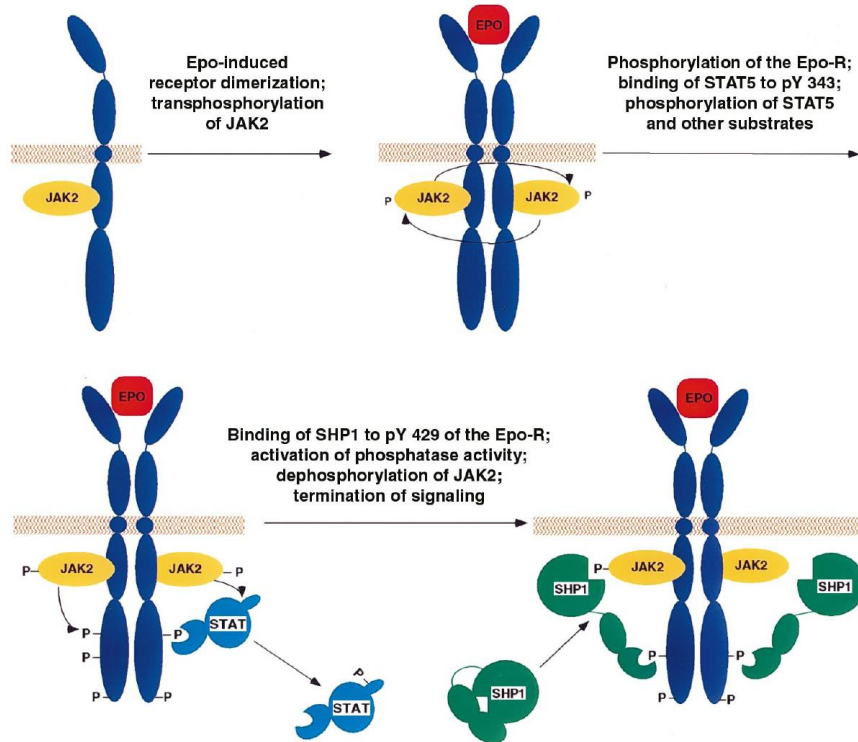
EPO kiinnittyy solukalvolla sille tarkoitettuun reseptoriin, EPO-reseptori (EpoR). Normaalisissa solussa ei ole paljon EPO-reseptoreita, vain noin tuhat per solu. EpoR:t luodaan punasolujen tuotantoon liittyvässä CFU-E-vaiheessa (colony-forming unit erythroid) ja reseptoreiden ekspressio vähenee punasolujen kehittyessä. Rottaeläinten erytroleukemiasoluista on pystytty kloonamaan EpoR-ketju. Se on 66 kDa:n kokoinen proteiini, johon EPO:n kiinnittyminen vaatii proteiinin liittymistä kahteen apumolekyylisiin, joista toinen on 85 kDa:n ja toinen 100 kDa:n kokoinen. (Lacombe & Mayeux 1998) Mikään muu reseptori ei voi korvata EpoR:ää, sillä homotsygooteilla

hiirillä tehdyissä tutkimuksissa on huomattu, että jos EPO:n tai EpoR:n geeni poistetaan hiirestä, kuolee sen alkio anemian seurauksena 12,5 päivän kohdalla. EPO-signaali onkin välttämätön, jotta punasolujen alkumuodot syntyvät ja että ne lähtevät kehittymään kypsiksi punasoluiksi. (Constantinescu *et al.* 1999)

EPO vaikuttaa kohdesoluissaan kiinnittymällä sille tarkoitettuihin reseptoreihin. EpoR kuuluu ryhmän yksi sytokiinireseptoriperheeseen. Tähän ryhmään kuuluvilla on yhteistä se, että niiden N-terminaalipäässä on solun ulkopuolella neljä kysteiiniryhmää ja Trp-Ser-X-Trp-Ser -aihe sijaitsee lähellä soluseinää. Reseptorin solunsisäisillä osilla ei ole katalyyttistä aktiivisuutta, joten solunsisäiset signaalimolekyylit pääsevät välittämään EPO:n vaikutuksia eteenpäin solussa, sen kiinnittyttyä reseptoriin. (Jelkmann & Metzen 1996)

Geeni, joka säätelee EpoR:ää, sijaitsee kromosomissa 19 ja koodaa rakenteen ydintä, joka koostuu 508 aminohaposta ja sen koko on 55 kDa. Solun ulkopuolella on 225 aminohapon kokoinen osa, johon ligandi voi kiinnittyä. Solukalvon läpäisevä osa koostuu 21 aminohaposta ja sisäpuolella signaalin kuljettamisesta vastaa 235 aminohapon ketju. Glykolysaation jälkeen koko reseptorin koko kasvaa 63-66 kDa:iin. Kiinnittyminen voi tapahtua myös suurempiin reseptoreihin. (Jelkmann & Metzen 1996)

EpoR aktivoituu dimerisaation vaikutuksesta (kuva 2). Tämä käynnistyy EPO:n läsnä ollessa, kuten myös Janus-perheeseen kuuluvan proteiiniytyrosiinikinaasin (JAK-2) fosforylaation käynnistyminen sekä aktivaatio. (Constantinescu *et al.* 1999) Tämä kiinnittyy solun sisäpuoleiseen osaan ja fosforyloituu, kun kaksi reseptoria yhdistyy dimerisaation vaikutuksesta. JAK2:n aktivoituminen käynnistää fosforyloitireaktioita ympärillään, jolloin itse reseptori sekä STAT5, joka kuuluu signaalintiperheeseen, fosforyloituvat. STAT5 siirretään tumaan ja tyrosiinifosfataasi (SHP1) pääsee defosforyloimaan JAK2:n, kiinnittymällä reseptorin C-terminaalipäähän. Tällöin EPO:n tuottama kasvusignaali pääsee kulkeutumaan eteenpäin. Tätä mekanismia kutsutaan JAK/STAT-signaalintiteiksi. (Jelkmann & Metzen 1996)



Kuva 2 Erytropoietiini reseptorin aktivoituminen. Kuvasta näkee, että reseptori on molemmin puolin solukalvoa ja JAK/STAT-signaalintie on vastuussa EPO:n viestin välittämisestä solun sisälle. Kuva: (Constantinescu et al. 1999)

EPO ei ole ainoa rakenne, joka voi sitoutua EpoR:ään. Erytropoietiinia matkiva peptidit EMP1 ja EMP33 kykenevät myös dimerisoimaan erytropoietiinin ligandin sitovan osan solun ulkopuolella (EPObp), mutta niiden muodostamat kompleksit eivät ole keskenään samanlaiset, eivätkä myöskään samanlaiset EPO:n aikaan saamaan muutoksen kanssa. EMP33 ei kykene aiheuttamaan signaalin aktivoitumista, sillä sen aikaan saama kulma reseptorin ulkoisten osien päiden välillä eroaa EPO:n aiheuttamasta kulmasta. EPO:n 120° kulma saa aikaan signaalin etenemisen, mutta EMP1:n 180° sekä EMP33:n 165° asteen kulmat eivät saa samaa vastetta aikaan. EMP1 on agonisti eli se kykenisi aktivoimaan reseptorin, mutta sen aiheuttama kulma on liian kaukana optimaalisesta. EMP33 taas on antagonisti eli se estää reseptorin toimimisen jo itsessään ja reseptorin aktiivisuus laskee nollaan. EMP:ien määrä elimistössä muutenkin nousee ja laskee huomattavan nopeasti, mikä ei anna solun sisäiselle koneistolle, joka huolehtii signaalin siirtämisestä, edes riittävästi aikaa reagoida ja aktivoitua. EPO taas tarjoaa pidennetyn ajan dimerisaatiolle, jolloin EpoR pystyy aktivoitumaan. (Ballinger & Wells 1998)

Friend spleen focus-forming virus (SFFV) on rottaeläimistä löydetty C-tyypin retrovirus. Sen vaipan glykoproteiini gp55 pystyy sitoutumaan EpoR:ään ja näin matkimaan EPO:n vaikutuksia. Viruksen aiheuttamat sairaudet johtuvatkin sen kyvystä sitoutua EPO:n reseptoriin ja

käynnistää punasolujen tuotanto. Virus saattaa aluksi infektoida punasolut ja sen jälkeen kyetä aloittamaan niiden massatuotannon erytropoieesiksi kautta. (Li *et al.* 1990)

EpoR saattaa aktivoitua myös mutaation vaikutuksesta. Ketjun 129:s aminohappo on arginiini, joka mutaation vaikutuksesta vaihtuu kysteiiniksi. Näin kahden EpoR-molekyylin välille syntyy disulfididisidos ja reseptori dimerisoituu. Kyseinen mutaatio voi myös johtaa syövän syntyyn. Myös täysin EPO:sta poikkeavat pienet synteettiset peptidit voivat aiheuttaa samanlaisen biologisen vasteen kuin EPO. (Lacombe & Mayeux 1998)

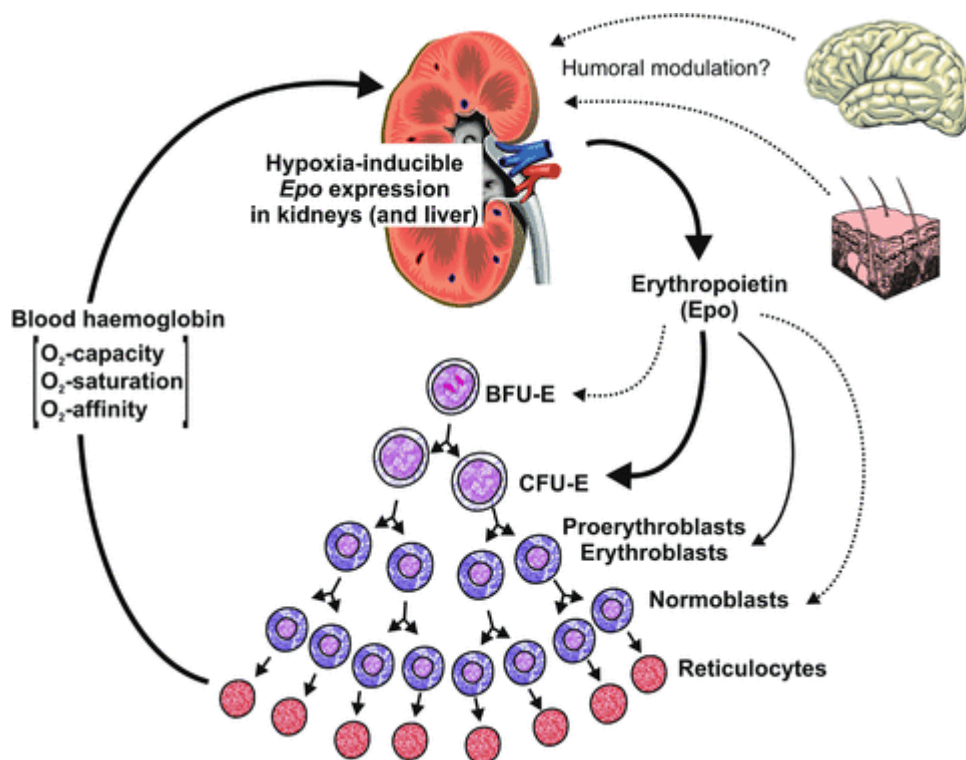
4 Punasolujen tuotanto

Punasolujen tuotantoa kutsutaan erytropoieesiksi. Se tarkoittaa tapahtumaa, jossa kypsiä punasoluja tuotetaan niiden esimuodoista. Tässä tapahtumassa on vahvasti EPO osallisena. Punasoluissa ei ole paljoa soluelimiä ja esimerkiksi tumaa sillä ei ole ollenkaan. Tämän takia se ei voi itse kasvaa ja jakautua aikuisessa nisäkkäässä. Erytropoieesi on tyypillinen negatiivisen palautejärjestelmän omaava systeemi, jossa EPO:n tuotanto nostaa punasolujen tuotantoa. EPO:a aletaan tuottamaan, kun kudosten happikonsentraatio laskee ja tuotanto lopetetaan tilanteen palaututtua normaaliksi. (Choi *et al.* 1996)

Punasoluja tuotetaan sikiövaiheessa maksassa ja syntymän jälkeen luuytimessä. Verisolut muodostuvat pluripotenteista kantasoluista ja punasolujen syntyminen vaatii muutaman kantamuodon ennen kypsän solun syntymistä. Aikaisin muoto on BFU-E-solut (burst-forming unit-erythroid), jotka erikoistuvat nopeasti jakautuviksi CFU-E-soluksi. Nämä jakautuvat kolmesta viiteen kertaan 2-3 päivän aikana, jolloin ne erikoistuvat ja solun koko muun muassa pienenee. (Hattangadi *et al.* 2011)

Punasolun elinikä on yleensä noin 120 päivää. (Hattangadi *et al.* 2011) Niiden määrän kasvu EPO:n määrän lisääntyttyä kestää noin 3-4 päivää. Vielä kypsyttömät punasolut ovat jälkeläisiä multipotenteille kantasoluille, jotka kykenevät uusiutumaan ylläpitääkseen verisolujen kantamuotojen saatavuuden. Se, mikä verisolu kantasolusta syntyy, on sattumanvaraista, mutta siihen vaikuttavia tekijöitä ovat monet kasvutekijät ja sytokiinit. Punasolun kantamuodolla on olemassa tuma, mutta se työntyy ennen kypsymistä solusta ulos. Siitä jää kuitenkin RNA-jäämiä punasoluun, millä on voitu todistaa kantamuodon omaavan tuman. (Jelkmann & Metzen 1996)

EPO-reseptoreita on eniten CFU-E-solujen pinnalla, joihin EPO:lla onkin suurin vaikutus luuytimessä. Tämä tarkoittaa, että EPO ei osallistu aivan alkuvaiheessa punasolujen tuotantoon. Suurin osa BFU-E- ja CFU-E -soluista kohtaa solukuoleman elimistön normaalissa happikonsentraatiossa, mutta kun EPO:n määrä kasvaa, kasvavat myös kyseisten solujen määrät ja punasoluja päästään tuottamaan (kuva 3). EPO:n tärkein tehtävä erythropoieesin aikana onkin toimia kasvutekijänä luuytimessä ja estää kantamuotojen apoptoosia. Kuten aikaisemminkin on jo todettu, EPO:n määrään ei vaikuta punasolujen määrä, vaan hapen saatavuus. Fysiologiset olosuhteet eivät siis vaikuta sen tuotantoon. (Lombardero *et al.* 2011)



Kuva 3 Erythropoieesin säätelymekanismi. Mikäli happea ei ole saatavilla tarpeeksi, alkaa EPO:n tuotanto munuaisissa. EPO:n vaikutus kohdistuu eniten CFU-E-soluihin. Kun punasolujen määrä nousee, nousee myös happikonsentraatio, joten elimistön tila palautuu normaaliksi ja EPO:a ei enää tarvita. Myös esimerkiksi aivot osallistuvat EPO:n tuotantoon. Kuva: (Jelkmann 2011)

CFU-E-solujen ensimmäinen jakaantuminen on vahvasti EPO:sta riippuvainen, kun taas myöhemmin EPO:a ei niinkään tarvita. Tämä johtuu myös siitä, että EpoR:ien määrä vähenee huomattavasti, mitä pidemmälle solu jakautuu ja erikoistuu. Soluväliaineessa oleva fibronectiini on toinen erythropoieesin tärkeä säätelijä EPO:n ohella, mutta ne eivät säätelä samoja kohtia, vaan niiden säätely ajoittuu eri kohtiin erilaistumista. Ensimmäisen päivän aikana CFU-E-solut jakautuvat kahdesti, mikä vaatii EPO:n läsnäoloa. Toisen päivän aikana tapahtuu kahdesta kolmeen

nopeaa jakautumista, joista viimeiset eivät enää vaadi EPO:n läsnäoloa, mutta vaativat kiinnittymisen fibronektiiniin. (Hattangadi *et al.* 2011)

Mikäli EPO:n kiinnittymisestä sen reseptoriin kehittyvän solun pinnalla aiheutuva vaste eliminoidaan solun sisällä, tulee solu käymään läpi solukuoleman. EPO:n kiinnittyminen aktivoi solun sisäisiä signaaleita, kuten signal transducer and signal activator of transcription 5 (Stat5), phosphoinositide-3 kinase/Akt ja Shc/Ras/mitogen-activated kinase (MAPK). Apoptoosiin riittää, että toinen kahdesta ensimmäisestä aiheutetusta viestistä ei välity. (Hattangadi *et al.* 2011)

Ennen valmiin punasolun kypsymistä, CFU-E muuttuu vielä monella tavalla. Kehittymisen aikana voidaan havaita proerytroblastit sekä normoblastit. Ensimmäisessä on kasvavat globiinin mRNA:n tasot ja jälkimmäisessä voidaan havaita jo paljon hemoglobiinia. Tästä kehittyä lopulta retikulosyytti, joka on vielä kypsymätön punasolun muoto. Proerytroblastista retikulosyytiksi vaaditaan vähintään neljä päivää ja 4-5 jakautumista. Hemoglobiini tiivistyy erilaistumisen aikana ja tuma tulee lopulta näkyviin. (Jelkmann & Metzen 1996)

5 Erytropoietinin käyttö lääketieteessä

Kun EPO:n ominaisuuksia tutkittiin ja ne saatiin selville, ennustettiin samalla, että jonain päivänä EPO:n avulla voitaisiin varmasti hoitaa anemiapotilaita. Tämä on nykyään mahdollista ja rEPO:a käytetäänkin munuaisten vajaatoimintaan liittyvän kroonisen anemian hoitoon. rEPO palauttaa punasolujen suhteellisen osuuden veren tilavuudesta sekä poistaa potilaan verensiirto tarpeen. rEPOhoito parantaa potilaiden hyvinvointia ja kun potilaille ei tarvitse suorittaa verensiirtoja, niin säästytään hylkimisreaktioilta, virusinfektioilta sekä raudan liikakuormitukselta. (Jelkmann 1992)

EPO:lla on tehty kliinisiä tutkimuksia aivohalvausten hoitamisessa ja sen vaikutuksia on todistettu magneettikuvauksen avulla. Aivohalvauksen jälkeen ensimmäiset kolme päivää potilaille annettiin suonensisäisesti EPO:a ja sen määrä aivojen alueella kasvoi huomattavasti verrattuna hoitamattomiin potilaisiin. (Noguchi *et al.* 2007)

6 Rekombinanttierytropoietiini

Rekombinantti ihmisen erytropoietiini (rHuEPO tai rEPO) on ollut kaupallisesti saatavilla vuodesta 1988. Kyseistä lääkeainetta EPO:a on onnistuttu tuottamaan yhdistelmä-DNA -tekniikalla. Pätkä geenin cDNA:ta siirretään joko CHO- tai vauvahamstereiden munuaisten (BHK) solulinjaan. Näin pystytään tuottamaan rEPO:a markkinoille suurissa määrin. Esimerkiksi litrasta ihmisen EPO:n cDNA:lle ehdollistettua viljelyainetta, jossa on CHO-soluja, saadaan normaalisti eristettyä 30-80 mg rHuEPO:a. (Choi *et al.* 1996)

rEPO on peptidiketjultaan identtinen ihmisen normaalin EPO:n kanssa, mutta eroja löytyy hiilihydraatti osista, jotka ovat heretogeneettisiä. Tästä erosta huolimatta rEPO:lla on myös pystytty hoitamaan anemia potilaita. On kuitenkin tärkeää, että rEPO ja EPO voidaan erottaa toisistaan analyttisillä bioteknologian menetelmillä, jotta rEPO:a väärinkäyttävät urheilijat saadaan kiinni. (Choi *et al.* 1996)

Jotta rEPO:n rakenne on voitu selvittää, on ensin ollut saatava selville EPO:n täydellinen rakenne, jotta saadaan vertailukohde. Proteiinit on eristettävä ja puhdistettava, jotta ehjää ja puhdasta rakennetta voidaan tutkia muun muassa nestekromatografialla, kapillaari elektroforeesilla, massaspektrometrillä sekä ydinmagneettisella resonanssi ilmiöllä. Molekyylimassa voidaan määrittää natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE) sekä Western blot -menetelmällä. Seuraavaksi proteiinista eritellään glykopeptidit, jotka glykolysoidaan uudelleen, jotta saadaan tietää proteiinin sisältämät peptidit ja olikosakkaridit. Peptidien avulla voidaan päätellä aminohappojärjestys proteiinissa ja hiilihydraatit saadaan selville analysoimalla jäljelle jääneet olikosakkaridit. Kun kaikki tämä selville saatu informaatio proteiinista yhdistetään, saadaan proteiinin molekylaarinen malli pääteltyä. (Choi *et al.* 1996)

Kun SDS-PAGE:a käytetään EPO:n proteiinien erotteluun, saadaan selville EPO:n ja rEPO:n molekyylimassat. Ihmisen virtsasta eristetyn proteiinin geelillä kulkema matka osoittaa kooksi 34-38,5 kDa, kun taas rHuEPO:lla saadaan kooksi 32-38 kDa. (Choi *et al.* 1996)

7 Erytropoietiini urheilussa

EPO luetaan urheilupiireissä dopingaineeksi ja sen käyttö onkin kielletty jo vuonna 1987. Tuolloin tutkimusmenetelmät eivät olleet vielä kovin kehittyneitä ja edelleenkin, vaaditaan tieteeltä kehittymistä, jotta väärinkäyttö saataisiin kytkettyä kokonaan pois urheilusta. Dopingin käytön

kontrollointi on ollut käytössä urheilussa jo yli 50 vuotta. Nykyisillä aineilla pelkät virtsanäytteet eivät enää riitä, vaan rinnalle on otettu verinäytteet tarkempia tutkimuksia varten. (Choi *et al.* 1996)

Veridoping oli ensimmäisiä EPO:n käytön muotoja. EPO:a käytettiin anemian hoidossa ja sen tiedettiin nostavan punasolujen tuotanto, joten urheilijalta otettiin verta talteen ja myöhemmin se laitettiin urheilijalle itselleen takaisin ja näin saatiin kohonnut punasolukonsentraatio aikaiseksi. EPO:n valvoton käyttö on aiheuttanut myös kuolemia. (Macauley 1996)

7.1 Perusteet käytölle

EPO:n väärinkäyttö perustuu sen aiheuttamaan vasteeseen soluissa tuottaa lisää punasoluja. Kun punasolujen määrä nousee, kasvaa myös elimistön hapen kuljetuskapasiteetti sekä hemoglobiinin määrä. Varsinkin aerobista suorituskykyä vaativissa lajeissa EPO:n käyttö on hyödyllistä suorituksen kannalta. Kun elimistössä on enemmän happea kuljettavia molekyylejä, kykenee lihakset työskentelemään kauemmin ja paremmin. (Choi *et al.* 1996) Urheilijat käyttävät myös korkean paikan leirejä harjoittelussaan, jotta EPO:n määrä nousisi luonnostaan elimistössä. (Macauley 1996)

7.2 Erythropoietiinin kaltaiset hormonit

Ensimmäinen EPO:n kaltainen hormoni oli jo edellä mainittu rEPO. Toisen polven EPO:n kaltaista hormonia, darbepoietiini alfaa (DPO), on ollut saatavilla vuosituhannen alusta saakka. Siinä on kaksi ylimääräistä N-linkittyntä hiilihydraattiketjua, jotka takaavat hormonille paremman metabolisen vakauden solussa. Uusin hormoni tähän perheeseen on kolmannen polven metoksipolyetyleeniglykoliepoietiini-beta eli CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator). Tähän rakenteeseen on lisätty iso polymeeriketju. Sen puoliintumisaika on huomattavasti pidempi verrattuna rEPO:oon tai darbepoietiiniin. (Macdougall 2005)

EPO:n ja sen kaltaisten hormonien väärinkäyttöä on havaittu myös hevosurheilussa. Hevosten plasmasta on kyetty tunnistamaan kaikki kolme eri hormonia erittäin tarkalla nestekromatografia-massaspektrometri -menetelmällä (LC-MS/MS). Tämän tutkimuksen menetelmä perustuu tryptiinipeptidiin (T_8), joka esiintyy kaikissa kolmessa: rEPO:ssa, DPO:ssa

sekä CERA:ssa. Hormonit saatiin eristettyä polyetyleeniglykoli (PEG) 6000:lla käsitellystä plasmasta anti-rEPO vasta-aineiden avulla. Hormonit digestoitiin trypsiinillä ja analysoitiin LC-MS/MS:llä. Hormonien havainnointiin vaadittiin seuraavat määrät: 0,3 mg/ml CERA, 0,1 ng/ml rEPO ja 0,05 ng/ml DPO. Niiden tunnistamiseen toisistaan vaadittiin hieman isompi saanto: 0,5 ng/ml CERa, 0,2 ng/ml rEPO ja 0,1 ng/ml DPO. Tällä menetelmällä voidaan siis havaita kilpahevosten EPO:n käyttö dopingina. (Guan *et al.* 2010)

7.3 Käytön havainnointi

EPO:a on luonnollisesti erittäin vähän elimistössä. Se vaikeuttaa sinänsä rEPO:n käytön tunnistamista, sillä urheilijoilta otetut näytteet sisältävät tällöin aina EPO:a. On kuitenkin kyettävä tunnistamaan onko kyseessä elimistön ulkopuolinen EPO vai ihmisen on luonnollinen hormoni. Jotta tähän on päästy, on ensin ollut selvitettävä molempien molekyylien ominaisuuksia ja eroja mahdollisimman tarkkaan. (Choi *et al.* 1996)

EpoR toimii elimistössä, kuten ihmisen oma EPO eli se nostaa punasolutuotantoa muutaman päivän päästä synteesistä tai rekombinantin tapauksessa muutaman päivän päästä käytöstä. EpoR:n määrä elimistössä kuitenkin puoliintuu 4-12 tunnin päästä käytöstä, joten se ei ole enää verenkierrossa, kun sen seuraukset näkyvät. Tämä on myös vaikeuttanut väärinkäytön havainnointia. (Magnani *et al.* 1999)

Ensimmäisiä tutkimusmenetelmiä EPO:n väärinkäytön havainnoinnille oli Gareau *et al.* 1996 kehittämä menetelmä, jossa käytettiin liukoisen transferriinireseptorin (sTfr) konsentraation ja seerumin ferritiinin (fr) konsentraation välistä suhdelukua. sTfr ilmaisee erytroidiaktiivisuutta ja fr mittaa paljonko rautaa kehossa on säilöttynä. Tutkimus toteutettiin kolmelle ryhmälle, joista kahdessa ensimmäisessä ryhmässä oli viisi miesurheilijaa ja viimeisessä ryhmässä oli kahdeksan miesurheilijaa. Ryhmät A ja B saivat joka toinen päivä pistoksen kymmenen päivän ajan eli yhteensä viisi pistosta. Ryhmä C sai yhteensä kaksitoista pistosta eli heidän koettaan jatkettiin 28 päivää. Ryhmän C annos oli myös selkeästi pienempi, sillä he saivat 30 U/kg, kun toiset ryhmät saivat 200 U/kg. Ryhmät B ja C saivat lisäksi rautaa, foolihappoa sekä vitamiini B₁₂:sta. (Magnani *et al.* 1999) EPO määriä käsitellään usein joko kansainvälisellä yksiköllä IU (Jelkmann 1992) tai kansainvälisellä entsyymiaktiivisuusyksiköllä U. (Magnani *et al.* 1999)

Tulokset osoittivat, että ryhmällä A suhdeluku poikkesi merkittävästi ennen hoitoa otetusta arvosta päivästä kaksi aina kokeiden loppuun asti eli päivään 31. Ryhmällä B arvot poikkesivat päivinä 4-24 ja ryhmällä C vain päivinä 18-24. Tästä voitiin päätellä, että toistuvasti korkeina annoksina käytettynä ilman rautalisää, EpoR:n käyttö voidaan havainnoida. Pienempinä annoksina tai raudan kanssa käytettynä ei voida todistaa, että urheilija on varmasti käyttänyt EpoR:ää. (Magnani *et al.* 1999)

EPO-analyytit tehdään nykyään antidopinglaboratorioissa elektroforeesitekniikoita hyödyntäen ja Maailman Antidopingtoimiston laatimien tarkkojen ohjeiden mukaan. Havainnointimenetelmät ovat kehittyneet koko ajan ja nykyään jokaisesta virtsa- ja verinäytteestä on tehtävä immunopuhdistus, jotta käytöstä voidaan varmistua. Paljon dopinglaboratorioissa käytetty menetelmä on ELISA-petrimaljoilla suoritettava metodi, jossa käytetään virtsanäytettä. Se on halpa, helppo sekä luotettava menetelmä ja on ainoa menetelmä, jossa virtsasta voidaan puhdistaa EPO:a. Siinä käytetään myös yhden blottauksen SAR-PAGE analyysitekniikkaa. (Desharnais *et al.* 2017)

Verinäytetutkimuksista ei ole saatu yhtä halpoja kuin virtsanäytetutkimuksista, vaikka niiden ottamisen määrä on noussut huomasti viime vuosina. Verinäytteisiin olisi myös syytä panostaa, sillä ne ovat luotettavampia kuin virtsasta tehdyt tutkimukset. (Desharnais *et al.* 2017)

Isoelektrinen fokuointi (IEF) on tekniikka, jolla molekyylit voidaan erottaa toisistaan niiden isoelektristen pisteiden välisten erojen avulla. (Righetti 1983) Se oli ensimmäinen metodi, jolla ihmisen oma ja rekombinantti EPO voitiin erottaa toisistaan. Se on edelleen käytössä erythropoiesia alullepanijoiden (ESAs) tutkimisessa, mutta kaikkia EPO:n muotoja sillä ei voida havaita. Menetelmää on paranneltu, kun havaittiin, että ESAs:n kanssa käytössä oli toinen kielletty aine: aktiivireseptori II-Fc fuusioproteiini (ActRII-Fc). Näiden proteiinien immunopuhdistus yhdistettiin yhteen menettelytapaan, johon yhdistettiin IEF. Näin tuttua proteiinien erittelytapaa voidaan jatkaa dopingtutkimuksessa, vaikka uusia ESA-muotoja ilmenisi. (Martin *et al.* 2018)

Lähteet

- Eggel, A & Wyss-Coray, T. (2014) Parabiosis for the Study of Age-Related Chronic Disease. *Swiss medical weekly*
- Ballinger MD & Wells JA (1998). Will any dimer do? *Nature structural biology* 5(11): 938-940.
- Choi D, Kim M & Park J (1996). Erythropoietin: Physico- and biochemical analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 687(1): 189-199.
- Constantinescu SN, Ghaffari S & Lodish HF (1999). The erythropoietin receptor: Structure, activation and intracellular signal transduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 10(1): 18-23.
- Desharnais P, Naud J- & Ayotte C (2017). Immunomagnetic beads-based isolation of erythropoietins from urine and blood for sports anti-doping control. *Drug Testing and Analysis* 9(11-12): 1744-1752.
- Gross AW & Lodish HF (2006). Cellular Trafficking and Degradation of Erythropoietin and Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (NESP). *Journal of Biological Chemistry* 281(4): 2024-2032.
- Guan F, Uboh CE, Soma LR, Maylin G, Jiang Z & Chen J (2010). Confirmatory analysis of continuous erythropoietin receptor activator and erythropoietin analogues in equine plasma by LC-MS for doping control. *Analytical Chemistry* 82(21): 9074-9081.
- Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J & Lodish HF (2011). From stem cell to red cell: Regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood* 118(24): 6258-6268.
- Heino & Vuento (2015). *Biokemian ja solubiologian perusteet*. WSOY
- Jelkmann W (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of physiology* 589(Pt 6): 1251-1258.
- Jelkmann W (1992). Erythropoietin: Structure, control of production, and function. *Physiological Reviews* 72(2): 449-489.
- Jelkmann W & Metzner E (1996). Erythropoietin in the control of red cell production. *Annals of Anatomy* 178(5): 391-403.
- Koury MJ & Bondurant MC (1992). The molecular mechanism of erythropoietin action. *European Journal of Biochemistry* 210(3): 649-663.
- Lacombe C & Mayeux P (1998). Biology of erythropoietin. *Haematologica* 83(8): 724-732.
- Li J-, D'Andrea AD, Lodish HF & Baltimore D (1990). Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. *Nature* 343(6260): 762-764.

- Lombardero M, Kovacs K & Scheithauer BW (2011). Erythropoietin: A hormone with multiple functions. *Pathobiology* 78(1): 41-56.
- Macauley D (1996). Fortnightly Review: Drugs in sport. *British Medical Journal* 313(7051): 211-215.
- Macdougall IC (2005). CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator): a new erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. *Current hematology reports*. 4(6): 436-440.
- Magnani M, Corsi D, Bianchi M, Paiardini M, Galluzzi L, Parisi A ym. (1999). Monitoring erythropoietin abuse in athletes [7]. *British journal of haematology* 106(1): 260-261.
- Martin L, Audran M & Marchand A (2018). Combined immuno-purification and detection of recombinant erythropoietins and activin receptor type II-Fc fusion proteins by isoelectric focusing for application in doping control. *Drug Testing and Analysis*. (painossa)
- Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R & Jia Y (2007). Role of erythropoietin in the brain. *Critical reviews in oncology/hematology* 64(2): 159-171.
- Righetti PG (1983). *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier Biomedical Press, .
- Semenza GL, Dureza RC, Traystman MD, Gearhart JD & Antonarakis SE (1990). Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements. *Molecular and cellular biology* 10(3): 930-938.
- Wang P, Dong S, Brailsford JA, Iyer K, Townsend SD, Zhang Q ym. (2012). At last: erythropoietin as a single glycoform. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 51(46): 11576-11584.