

# Nachweis von Eigenblutdoping: Erfassung von Veränderungen im Gen-Expressionsmuster in Blutkonserven nach definierter Lagerung

(AZ 070301/13)

Anna Henke<sup>1</sup>, Michael W. Pfaffl<sup>1</sup> (Projektleiter), Reinhard Henschler<sup>2</sup>, Christian Wichmann<sup>2</sup> & Irmgard Riedmaier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Technische Universität München, Physiologie Weihenstephan, Freising

<sup>2</sup>Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie

## 1 Problem und Fragestellung

Die **World Anti Doping Agency (WADA)** veröffentlicht jedes Jahr eine aktuelle Liste mit verbotenen Substanzen, Substanzgruppen sowie Dopingmethoden (WADA, 2014). Zu den verbotenen Methoden zählen auch Bluttransfusionen jeglicher Art und Herkunft. Eine Transfusion kann einerseits mit „Eigenblut“ als autologe Transfusion (Eigenblutdoping) oder andererseits mit „Fremdblut“ als allogene Transfusion (Fremdblutdoping) durchgeführt werden. Beim Eigenblutdoping können sowohl Vollblut (VB) als auch Erythrozytenkonzentrate (EK) zum Einsatz kommen. Letzteres wird aber vermutlich häufiger im Wettkampfdoping verwendet, da im EK die Konzentration der wichtigen sauerstofftransportierenden Erythrozyten (Hämatokrit) bei ca. 60 % anstatt bei ca. 36 % im Vollblut liegt (Ullrich, Stolecki & Grünewald, 2005). Die Kapazität des Sauerstofftransports kann somit nach dem Blutdoping im Sportler signifikant erhöht und dessen Leistung, abhängig von dem erhöhten Hämatokrit, gesteigert werden. Dies kann auf legalem Wege nur durch anhaltendes Höherentraining erreicht werden.

Da beim Eigenblutdoping keine Fremdschubstanz zugeführt wird, sind direkte Nachweismethoden hier nicht zielführend. Einzig die Kontrolle des Hämatokritwertes kann bis dato die Anwendung autologer Bluttransfusionen aufdecken. Aber solange der Hämatokritwert unterhalb des für die Sportart vorgeschriebenen Grenzwerts liegt, bleibt Eigenblutdoping bisher unentdeckt. Vielversprechende neue Ansätze zum Nachweis von Eigenblutdoping bieten indirekte Nachweismethoden auf Ebene des Transkriptom. Dabei wird die Gesamtheit der RNAs in einer biologischen Probe zu einem bestimmten Zeitpunkt erfasst. Dies konnte bereits in verschiedenen Geweben gezeigt werden (Reiter, Lüderwald, Pfaffl & Meyer, 2008; Reiter, Pfaffl, Schonfelder & Meyer, 2008; Reiter, Tichopad, Riedmaier, Pfaffl & Meyer, 2010; Riedmaier, Tichopad, Reiter, Pfaffl & Meyer, 2009b). Vor allem bei Versuchen im Bereich der Anwendung illegaler Leistungsförderer im Humansport sowie in der Leistungsförderung lebensmittelliefernder Tiere, konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Veränderungen im Genexpressionsmuster in verschiedensten Organen (Blut, Leber und Reproduktionstrakt) reproduzierbar nachweisbar sind (Becker, Riedmaier, Reiter, Tichopad, Groot, et al., 2011; Becker, Riedmaier, Reiter, Tichopad, Pfaffl, et al., 2011; Becker, Riedmaier, et al., 2010; Reiter, Walf, Christians, Pfaffl & Meyer, 2007; Riedmaier, Reiter, Tichopad, Pfaffl & Meyer, 2011; Riedmaier, Tichopad, Reiter, Pfaffl & Meyer, 2009a). In Verbindung mit verschiedenen multifaktoriellen biostatistischen Methoden war es in diesen Tierversuchen möglich, behandelte (gedopte) von unbehandelten Tieren klar zu unterscheiden (Riedmaier et al., 2012). Diese Herangehensweise des indirekten Nachweises hat daher ein großes Potential, um in Zukunft die bestehenden analytischen Nachweismethoden zu ergänzen und einen Nachweis von Blutdoping zu etablieren.

Bei der Aufbereitung, Stabilisierung sowie der Lagerung des Vollblutes, bzw. der Erythrozytenkonzentrate, reagieren die „lebenden“ Blutzellen auf die veränderten Bedingungen und in direkter Folge ist mit physiologischen Reaktionen auf zelluläre Ebene zu rechnen. Mittels molekularbiologischer Methoden auf RNA Ebene können diese physiologischen Veränderungen erfasst, quantifiziert und ein Biomarkerset entwickelt werden. Um diese Hypothese zu stützen, wurde zunächst eine Pilotstudie durchgeführt, welche die Veränderungen im Genexpressionsmuster, im Speziellen von microRNAs (miRNA) in Blutbeutel nach definierter Lagerungszeit erfassen soll.

## 2 Methoden

### 2.1 Probanden

In die Studie wurden 20 gesunde männliche Probanden (Höchstalter 35 Jahre, gesund, sportlich) eingeschlossen, die durch Randomisierung in zwei gleich große Gruppen von je 10 Probanden aufgeteilt wurden. Von Gruppe 1 wurde das Blut der Vollblutspende (VBS) von 500 ml nach der Leukozytendepletion als VB bei  $4 \pm 2$  °C gelagert.

Die VBS von Gruppe 2 wurde nach der Leukozytendepletion in die Blutprodukte EK und Plasma aufgetrennt. Die EKs wurden ebenfalls bei  $4 \pm 2$  °C gelagert.

### 2.2 Studiendesign

Um die natürliche Variation (Basislinie) des Genexpressionsmusters der Probanden zu erfassen, wurden pro Proband drei Blutproben aus dem Arm (VB-Arm) im wöchentlichen Abstand vor der VBS entnommen. Eine Woche nach der 3. Blutprobe erfolgte die VBS. Sowohl das VB als auch das EK wurden für 10 Wochen bei  $4 \pm 2$  °C unter kontrollierten Bedingungen gelagert (siehe Abb. 1). Direkt nach der Leukozytendepletion (bei VB) und der Erythrozytenkonzentratherstellung wurden vom VB bzw. EK die ersten Proben mit dem PAXgene System (PAX) von PreAnalytiX (Hombrechtikon, Schweiz) als Triplikate gezogen. Nach 1, 2, 4, 6 und 10 Wochen Lagerung wurden ebenfalls Proben in Triplikaten genommen.

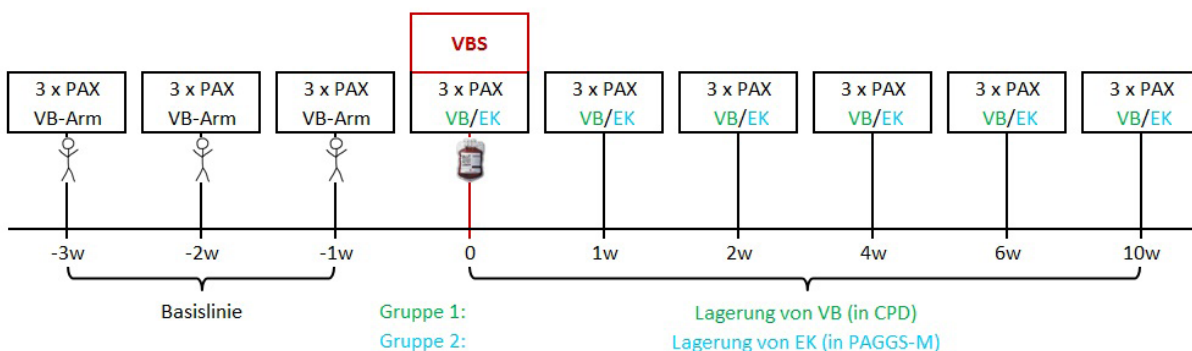


Abb. 1: **Studiendesign für die Pilotstudie:** Es wurden 20 Probanden durch Randomisierung in zwei gleich große Gruppen von je 10 Probanden aufgeteilt. Das Blut der Gruppe 1 und 2 wurden als VB in CPD Puffer bzw. EK in PAGGS-M Puffer gelagert. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten als Triplikate mit dem PAXgene System (PAX) entnommen.

## 2.3 Blutspende und Blutkomponentenherstellung

Für die VBS von 500 ml wurde das Composelect® T3984-23 System (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Für Gruppe 1 wurde im ersten Beutel des Systems bereits enthaltenes 70 ml CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose) Puffer mit 500 ml frischem Vollblut des Probanden gemischt und anschließend die Leukozytendepletion über einen integrierten Filter durchgeführt. Dieser Beutel wurde dann als VB bei  $4 \pm 2$  °C gelagert. Für die Gruppe 2 wurde genauso verfahren, allerdings wurde das gefilterte VB für die weitere Blutkomponentenherstellung verwendet anstatt es direkt zu lagern. Für die Auftrennung in die Blutkomponenten Plasma und EK wurde das gefilterte VB bei 3998 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Plasma anschließend am Compomat G4 (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) in einen weiteren im System befindlichen Beutel abgetrennt. Das im Beutel verbliebene EK wurde für bessere Lagerungsbedingungen mit 110 ml PAGGS-M (Phosphate, Adenine, Glucose, Guanosine, Saline - Mannitol) Puffer gemischt und bei  $4 \pm 2$  °C für bis zu 10 Wochen kontrolliert gelagert. Der über die normale Lagerdauer hinausgehende Zeitpunkt (10w) ist vorgesehen, um die Sicherheit der Detektion von Lagerungsschäden und deren physiologischen Veränderungen zu erhöhen. Für den Versuch wurde das Votum der zuständigen Ethikkommission eingeholt.

## 2.4 RNA Extraktion und RNA Sequenzierung

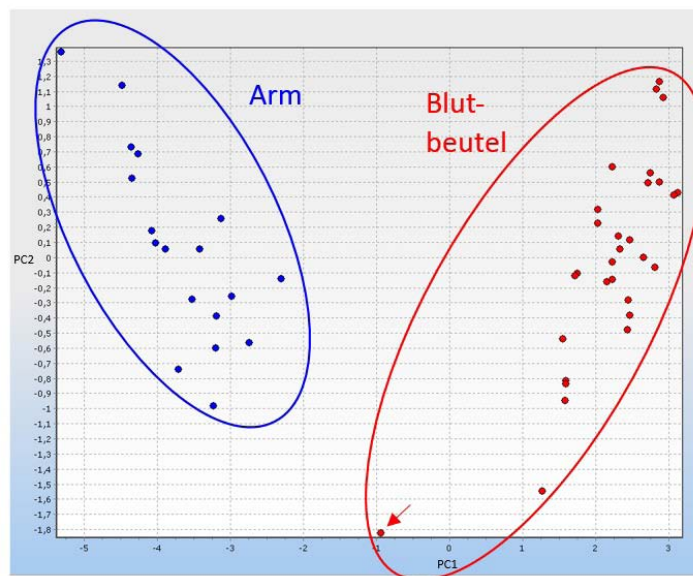
Die Blutproben wurden mit dem PAXgene Blood RNA Tube von PreAnalytiX (Hombrechtikon, Schweiz) entnommen, über Nacht inkubiert und bis zur Extraktion bei -20 °C gelagert. Die Röhrchen enthalten eine Stabilisierungslösung, welche die RNA vor Degradierung schützt und gleichzeitig das aktuelle RNA Profil fixiert, um eine weitere Induktion der Genexpression zu verhindern. Die totale RNA wurde mit dem PAXgene miRNA Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) extrahiert, photometrisch mit dem NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USW) quantifiziert und deren Qualität mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) gemessen (Becker, Hammerle-Fickinger, Riedmaier & Pfaffl, 2010; Fleige & Pfaffl, 2006). Für die erste Identifizierung von geeigneten Biomarkerkandidaten auf miRNA Ebene, wurde eine small RNA Sequenzierung (small RNA-Seq) auf einer Illumina HiSeq 2500 Plattform (Illumina, USA), wie bereits von Spornraft et. al beschrieben, durchgeführt (Spornraft et al., 2014). Für die Vorbereitung der Proben (Library Preparation) wurde das NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (New England BioLabs, Ipswich, USA) verwendet. Die EK Proben (-3w, -2w, -1w, 0w, 1w, 2w, 4w und 6w) von 6 Probanden wurden sequenziert und ausgewertet. Der Zeitpunkt 10w wurde von allen Probanden aus technischen Gründen ausgeschlossen. Da eine small RNA-Seq sehr kostspielig ist, erfolgt eine Validierung der small RNA-Seq Daten in allen verfügbaren Proben (10 Probanden EK, 10 Probanden VB) mittels RT-qPCR.

## 2.5 Statistische Analyse

Die Vorgehensweise bei der Zuordnung (Mapping) der gelesenen Fragmente (Reads) einer small RNA-Seq zu bereits annotierten small RNAs wurde bereits beschrieben (Spornraft et al., 2014). Die ersten Analysen konzentrieren sich auf die Auswertung der am besten untersuchten small RNA Klasse, den microRNAs (miRNA). Die Daten wurden mit einem intern etablierten Protokoll auf R Basis ausgewertet und mit Hilfe der GenEx Software Pro (MultiD Analysis, Sweden) mit multivariaten Datenanalyse Techniken (z. B. PCA, HCA) visualisiert. Die Anzahl der Reads wurden mit Hilfe des DESeq Algorithmus normalisiert (Anders, 2011). Zur Reduzierung der falsch positiven Kandidaten wurde ein Cut-Off bei 50 Reads im Durchschnitt pro miRNA eingeführt.

### 3 Ergebnisse

Die Proben von 6 Probanden (Alter:  $27,8 \pm 3,4$  Jahre, Größe:  $181 \pm 2,7$  cm, Gewicht:  $80,5 \pm 4,5$  kg) aus Gruppe 2 (EK Lagerung) wurden mit der small RNA-Seq Technologie analysiert. Durch den definierten Cut-Off Wert von durchschnittlich 50 Reads pro miRNA, wurde die Anzahl der identifizierten miRNA von potentiellen 2578 auf 193 relevante miRNA reduziert. Diese 193 miRNAs wurden normalisiert, in die Software GenEx importiert und weiter analysiert. Diese Software bietet zusätzlich zur normalen Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) eine sog. dynamische PCA (dPCA) an. Mit Hilfe dieses Algorithmus können miRNAs mit steigendem P-Wert aus der Analyse ausgeschlossen werden, so dass am Ende ein Biomarker Muster entsteht, welches es erlaubt, zwischen den unterschiedlichen Behandlungen zu unterscheiden: Proben aus dem Arm (-3w – -1w) versus Proben aus dem Blutbeutel (0w – 6w) (siehe Abb. 2). Diese Clusterbildung basiert auf 10 höchst signifikant regulierte miRNA Biomarkern. Verglichen mit Zeitpunkt 0w hatte die Dauer der Lagerung keinen weiteren Einfluss. Die erste Hauptkomponente (PC1) beschreibt den größten Anteil der Varianz und zeigt eine eindeutige Trennung zwischen den frischen Proben aus dem Arm und den gelagerten Proben aus dem Blutbeutel.



**Abb. 2: dPCA von 6 Probanden:** Die Software GenEx wählte zwischen 193 relevanten miRNAs die geeignetsten 10 miRNAs aus, die den Unterschied zwischen Proben aus dem Arm (rote Punkte) und den Proben aus dem Blutbeutel (blaue Punkte) zeigen. Der Pfeil markiert einen Ausreißer.

Die von GenEx erzeugte Heatmap (siehe Abb. 3) verdeutlicht mit grüner und roter Farbe ein niedriges bzw. hohes Expressionslevel der miRNA. Gleichzeitig sind an den Seiten der Heatmap auch zwei Dendrogramme eingezeichnet. Dendrogramme werden dazu genutzt, um Beziehungen zwischen Clustern darzustellen. Das Dendrogramm oben zeigt in Zusammenhang mit der Expression der miRNAs noch einmal die eindeutige Trennung von Arm- und Blutbeutelproben. Allerdings zeigte die Probe von Proband 10 zum Zeitpunkt 6w (P10 6w) ein etwas gegenläufiges Verhalten, das auch in der dPCA (Abb. 2) aufgefallen ist. Die Probe wurde dort mit einem Pfeil markiert. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um einen Ausreißer. Das zweite Dendrogramm auf der linken Seite fasst die miRNA zusammen, die ein ähnliches Verhalten aufweisen, so dass zuerst die 5 nach unten regulierten miRNAs dargestellt werden und danach die 5 nach oben regulierten miRNAs.

Die größte Veränderung wies miRNA Biomarker 9, mit einem fold change (fc) von 12,42 auf. Doch auch die kleinste Veränderung von Biomarker 7 (fc = 3,65) bedeutet eine höchst signifikante Erhöhung.

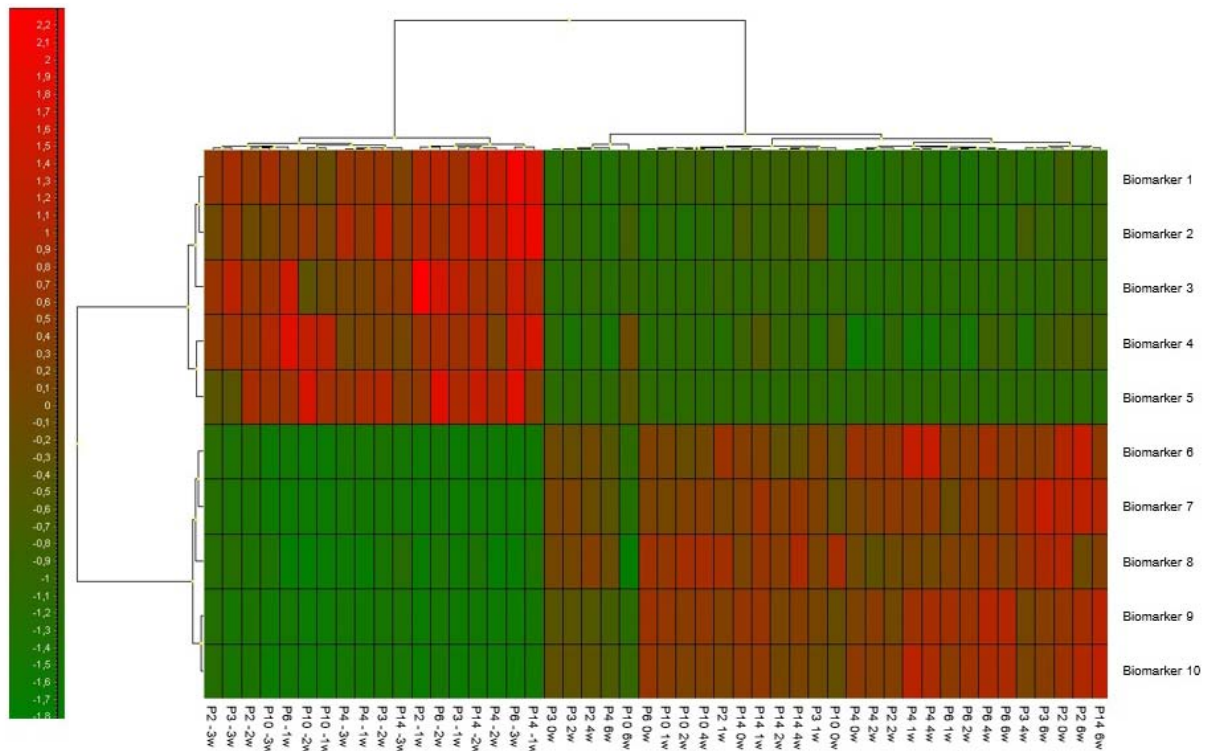


Abb. 3: Heatmap von 6 Probanden: Grüne und rote Farben repräsentieren eine niedrige bzw. hohe Expression der miRNA.

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse der multivariaten Datenanalyse zeigen, dass die Blutlagerung einen bedeutenden Effekt auf das miRNA Profil im Blut hat. Es konnten eindeutig zwei verschiedene Cluster identifiziert werden, die einmal durch die Proben aus dem Arm (-3w - 1w) und einmal durch die Proben aus dem Blutbeutel (0w - 6w) repräsentiert werden. Dies könnte möglicherweise durch die Stabilisatorlösung, das Additiv bei EK Lagerung, die mechanische Bearbeitung oder sonstige noch unbekannte Einflüsse ausgelöst werden. Dies unterstützt die Hypothese, dass sich der „Puffer- und Lagereffekt“ auf die miRNA auch nach Transfusion von gelagerten EKs wiederfinden lässt. Womöglich verstärkt der Puffer im EK, der mit transfundiert wird, sogar die Wirkung im Körper. Des Weiteren wird eine Reaktion des Körpers auf die plötzlich erhöhte Erythrozytenanzahl im Blut erwartet, die Auswirkungen auf das miRNA Profil hat.

Allerdings sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei den Proben aus dem Arm um Vollblut mit allen Bestandteilen (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Plasma) handelt und bei den Proben aus dem Blutbeutel um konzentrierte Erythrozyten, aus denen die meisten Leukozyten und Thrombozyten herausgefiltert wurden und das Plasma abzentrifugiert wurde. Doch Chen et al. zeigten bereits 2008, dass der Hauptanteil der im Vollblut enthaltenen miRNA aus den Erythrozyten stammt und nicht aus den Leukozyten (Chen, Wang, Telen & Chi, 2008). Ähnliches wurde auch von Kirschner et al. für die miR-16 und miR-451 veröffentlicht (Kirschner et al., 2011). Von den miRNAs

miR-486-5p, miR-451, miR-92a und miR-16, ist ebenfalls bekannt, dass sie ihren Ursprung in den Erythrozyten haben und sich die miRNA Expressionswerte aus den Blutzellen in den Expressionswerten des Plasmas widerspiegeln (Pritchard et al., 2012).

Durch eine kurze Berechnung des maximal möglichen Anstieges der Erythrozytenzahl (57,9 %), bedingt durch die Herstellung des EKs aus der 500 ml Vollblutspende, verglichen mit dem gemessenen Anstieg der Reads (265 %) mit dem kleinsten fold change ( $fs = 3,65$ ) konnte bestätigt werden, dass die erhöhte Erythrozytenzahl im EK nicht allein für die große Änderung der Biomarkerkandidaten verantwortlich sein kann. Die Daten aus dem small RNA-Seq sollen im Anschluss noch mittels RT-pPCR in allen verfügbaren Proben validiert werden. Des Weiteren wäre es interessant zu untersuchen, welche mRNA von den regulierten ausgewählten miRNA reguliert werden, um herauszufinden, welche Signalwege betroffen sind. Die gewonnenen Daten sollen als Grundlage für eine neue Studie dienen, in welcher die resultierende Biomarkersignatur in gesunden männlichen Probanden nach Transfusion von autologem Blut validiert werden sollen. Aufgrund der hohen Regulation der miRNAs in dieser Studie, wird erwartet, dass die ausgewählten miRNAs trotz der, durch die Transfusion verursachten, starken Verdünnung im Probanden (ca. 1:30), als Gruppe oder „Biomarker Signatur“ wiedergefunden werden können. Diese neue Biomarkersignatur könnte dann als Nachweis für Eigenblutdoping fungieren und den ABP (Athlete Biological Passport) ergänzen.

## 5 Literatur

- Anders, S. (2011). Analysing RNA-Seq data with the “DESeq” package. 1-22.
- Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I. & Pfaffl, M.W. (2010). mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50 (4), 237-243.
- Becker, C., Riedmaier, I., Reiter, M., Tichopad, A., Groot, M.J., Stolker, A.A., et al. (2011). Influence of anabolic combinations of an androgen plus an estrogen on biochemical pathways in bovine uterine endometrium and ovary. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 125 (3-5), 192-201.
- Becker, C., Riedmaier, I., Reiter, M., Tichopad, A., Pfaffl, M.W. & Meyer, H.H. (2011). Changes in the miRNA profile under the influence of anabolic steroids in bovine liver. *Analyst*, 136 (6), 1204-1209.
- Becker, C., Riedmaier, I., Reiter, M., Tichopad, A., Pfaffl, M.W. & Meyer, H.H.D. (2010). Effect of trenbolone acetate plus estradiol on transcriptional regulation of metabolism pathways in bovine liver. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 2 (2), 257-265.
- Chen, S.Y., Wang, Y., Telen, M.J. & Chi, J.T. (2008). The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One*, 3 (6), e2360.
- Fleige, S. & Pfaffl, M.W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine*, 27 (2-3), 126-139.

- Kirschner, M.B., Kao, S.C., Edelman, J.J., Armstrong, N.J., Vallely, M.P., van Zandwijk, N., et al. (2011). Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One*, 6 (9), e24145.
- Pritchard, C.C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J.D., Dougherty, K.J., Miyaji, M.M., et al. (2012). Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer prevention research (Phila)*, 5 (3), 492-497.
- Reiter, M., Lüderwald, M., Pfaffl, M.W. & Meyer, H.H.D. (2008). First steps towards a new screening method for anabolic androgenic agents in human hair follicle. *The doping journal*, 5 (3).
- Reiter, M., Pfaffl, M.W., Schonfelder, M. & Meyer, H.H. (2008). Gene expression in hair follicle dermal papilla cells after treatment with stanozolol. *Biomark insights*, 4, 1-8.
- Reiter, M., Tichopad, A., Riedmaier, I., Pfaffl, M.W. & Meyer, H.H.D. (2010). Monitoring gene expression in muscle tissue of macaca fascicularis under the influence of testosterone and SARM. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 1 (2), 73-79.
- Reiter, M., Walf, V.M., Christians, A., Pfaffl, M.W. & Meyer, H.H. (2007). Modification of mRNA expression after treatment with anabolic agents and the usefulness for gene expression-biomarkers. *Analytica chimica acta*, 586 (1-2), 73-81.
- Riedmaier, I., Benes, V., Blake, J., Bretschneider, N., Zinser, C., Becker, C., et al. (2012). RNA-sequencing as useful screening tool in the combat against the misuse of anabolic agents. *Analytical chemistry*, 84 (15), 6863-6868.
- Riedmaier, I., Reiter, M., Tichopad, A., Pfaffl, M.W. & Meyer, H.H. (2011). The potential of bovine vaginal smear for biomarker development to trace the misuse of anabolic agents. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 119 (2), 86-94.
- Riedmaier, I., Tichopad, A., Reiter, M., Pfaffl, M.W. & Meyer, H.H. (2009a). Identification of potential gene expression biomarkers for the surveillance of anabolic agents in bovine blood cells. *Analytica chimica acta*, 638 (1), 106-113.
- Riedmaier, I., Tichopad, A., Reiter, M., Pfaffl, M.W. & Meyer, H.H. (2009b). Influence of testosterone and a novel SARM on gene expression in whole blood of Macaca fascicularis. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 114 (3-5), 167-173.
- Spornraft, M., Kirchner, B., Haase, B., Benes, V., Pfaffl, M.W. & Riedmaier, I. (2014). Optimization of Extraction of Circulating RNAs from Plasma - Enabling Small RNA Sequencing. *PLoS One*, 9 (9), e107259.
- Ullrich, L., Stolecki, D. & Grünewald, M. (2005). *THIEMEs Intensivpflege und Anästhesie*. Stuttgart: Thieme.
- WADA. (2014). *The World Anti-Doping Code*. The 2015 prohibited list. International standard. In T.W.A.-D. Agency (Hrsg.) (S. 10).