
Aspekte der Bekämpfung des Dopings unter Verwendung gentechnischer Erkenntnisse

Bernd Wolfarth

Technische Universität München
Abt. Präventive und Rehabilitative Sportmedizin

1 Problem

In zahlreichen epidemiologischen Studien und Zwillingsuntersuchungen konnte in der Vergangenheit der Nachweis erbracht werden, dass sowohl die körperliche Leistungsfähigkeit als auch das Ansprechen auf körperliches Training zu einem großen prozentualen Anteil durch das Erbgut weitergegeben werden. Mit Hilfe moderner molekulargenetischer Methoden ist es nun möglich, die Bedeutung einzelner Gene für diese Eigenschaften zu untersuchen. Dies eröffnet faszinierende Möglichkeiten, neues Wissen über grundsätzliche Regelmechanismen des menschlichen Körpers zu erhalten sowie zukünftig vielleicht auch Aussagen zur individuellen Ansprechbarkeit auf Training oder Therapien mit körperlicher Aktivität zu ermöglichen. Im Rahmen der Diskussion um die Manipulation des Erbguts stellt sich allerdings auch die Frage, ob dieses Wissen zukünftig dazu missbraucht werden kann, einzelne genetische Areale oder das gesamte Genom im Sinne einer unerlaubten Leistungssteigerung im Sport zu verändern. Um bereits jetzt die Grundlage für zukünftige Nachweismethoden zu entwickeln, müssen die Grundlagen, d. h. die natürlich vorhandenen Varianten im menschlichen Genom, welche einen Bezug zur körperlichen Leistungsfähigkeit haben, erforscht werden.

Als Basis für den wissenschaftlichen Bereich dieser Strategie war es das Ziel der in unserem Projekt durchgeführten Arbeiten, eine große Untersuchungskohorte aufzubauen, den Stand der Wissenschaft zu dokumentieren und an dem aufgebauten Kollektiv erste genetische Areale und einzelne Gene zu identifizieren, welche die Regulation der körperlichen Leistungsfähigkeit entscheidend beeinflussen können. Im experimentellen Teil sollten genetische Sequenzvariationen (Polymorphismen) in Kandidatengenen untersucht werden, deren biologische Endprodukte nach derzeitigem Wissensstand als leistungslimitierende Größen in Frage kommen. Diese Gene umfassen die Bereiche Sauerstofftransport, Substratoxidation, hormonelle Regulation, zelluläre Hyperplasie und Hypertrophie, Temperaturregulation und andere Gene, welche potentiell in die Regulation von Ausdauer-Phänotypen involviert sind.

Damit wird mit diesen Forschungsarbeiten die Definition der natürlich vorhandenen genetischen Varianten erarbeitet und die Grundlage für die weiteren Forschungsschritte bei der Detektion zukünftiger Manipulationsversuche in diesem Bereich gelegt.

2 Methode

Bis einschließlich Dezember 2006 wurden 356 männliche Ausdauerathleten (EEA=Elite Endurance Athletes) mit einer max. Sauerstoffaufnahme >75 ml/kg/min. rekrutiert. Die Athleten kommen aus Nordamerika (n=77), Deutschland (n=227) und Finnland (n=52). Als Kontrollgruppe dienen aktuell 344 untrainierte Kontrollpersonen (SC=Sedentary Controls) mit einer max. Sauerstoffaufnahme <50 ml/kg/min., welche nach Herkunftsland proportional der Athletengruppe rekrutiert wurden.

Von allen Probanden wurde DNA aus permanenten Zelllinien oder Vollblut gewonnen. Je nach ausgesuchtem Polymorphismus werden die entsprechenden Genabschnitte mittels PCR-Reaktion amplifiziert und auf Agarose-Gelen nach Enzymverdau oder auf Polyacrylamid-Gelen mit nachfolgender Laserdetektion (am Sequenzierautomaten) dargestellt.

Als erste Kandidatengene für die aerobe Leistungsfähigkeit wurden und werden folgende Gene untersucht: Tumor-Necrosis-Faktor alpha (TNF α), Heat-Shock-Protein 70 (HSPA1), Erythropoietin (EPO), Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R), Hypoxia-inducible-factor 1 alpha (HIF1A), Lipoprotein-Lipase (LPL), LDL-Rezeptor (LDLR), Carnitine-Palmitoyltransferase II (CPTII), Alpha-2-Adrenerger Rezeptor, Beta-2-Adrenerger Rezeptor, Beta-2-Adrenerger Rezeptor, mitochondriale DNA-Polymorphismen (mtDNA), muskuläre Kreatin-Kinase (CKMM), Angiotensin-Konvertierungs-Enzym (ACE) und endotheliale Nitro-Oxid-Synthetase (NOS3). Möglichst informative Polymorphismen werden in den jeweiligen Genen ausgewählt. Zur Auswertung wird zum einen mittels Chi-Square-Testung die Verteilung dieser Merkmale zwischen Untersuchungs- und Kontrollgruppe überprüft, zum anderen werden Assoziationsstudien innerhalb der Gruppen in Bezug auf bestimmte Phänotypen (z. B. maximale Sauerstoffaufnahme, linksventrikuläre Masse) durchgeführt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit SAS und SPSS Software.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden im Verlauf des Projektes bisher über 30 Polymorphismen in mehr als 20 Kandidatengenomen der körperlichen Leistungsfähigkeit untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen am Genathlete-Kollektiv wurden zum größten Teil als vorläufige Ergebnisse an kleineren Teilkollektiven veröffentlicht. Nach dem Ausbau des Kollektivs auf

über 600 Probanden wurden zuletzt für zwei Polymorphismen aus unterschiedlichen Funktionsbereichen signifikante Ergebnisse gefunden, die aktuell entsprechend veröffentlicht werden. Diese Ergebnisse werden exemplarisch kurz zusammengefasst und im Folgenden präsentiert:

In der ersten Arbeit wurde die Bedeutung mehrerer genetischer Variationen im Gen, welches den Beta2-Adrenergen Rezeptor (ADRB2) verschlüsselt, untersucht. Für zwei der drei untersuchten Polymorphismen fand sich kein Zusammenhang zwischen der Allelverteilung und der körperlichen Leistungsfähigkeit. Für den sog. Arg16Gly Polymorphismus zeigte sich allerdings ein interessantes Ergebnis. Bezüglich der Allel- und Genotypenverteilung fanden sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Herkunftsorten bzw. innerhalb der Athletengruppe für unterschiedliche Sportarten. In der vergleichenden Analyse zwischen den beiden Gruppen (EEA vs. SC) zeigte sich allerdings eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Genotypen ($p=0.030$). In einer weiter differenzierten Analyse zeigte sich die Häufung des Glycin Allels in der Kontrollgruppe mit hochsignifikantem Ergebnis ($p < 0.01$). Zusammenfassend fand sich erstmals ein Hinweis, dass eine Variante im Gen für den Beta2-Adrenergen Rezeptor eine Bedeutung für die Ausprägung der Ausdauerleistungsfähigkeit haben könnte (Wolfarth, 2007a).

Tab. 1: Deskriptive Daten des Untersuchungskollektivs

	Anzahl	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	VO _{2max} (ml kg ⁻¹ min ⁻¹)
EEA	356	21,5±5,4	178,7±6,1	69,2±7,1	79,0±3,4
SC	344	28,8±12,0	178,0±7,3	75,4±9,4	40,2±7,0
EEA=Athletengruppe (Elite Endurance Athletes), SC=Kontrollgruppe (Sedentary Controls), Mittelwerte±Standardabweichung					

Im Gen für die endotheliale Nitrooxidsynthetase (NOS3) wurden ebenfalls drei Polymorphismen untersucht. Alle Polymorphismen befanden sich für die Athleten und die Kontrollgruppe im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für eine 27bp-Wiederholung sowie den Glu298Asp Polymorphismus konnten keine Unterschiede bezüglich der Allel- oder Genotypenverteilung zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. Bei der Untersuchung des Mikrosatelliten fand sich ebenfalls kein Unterschied in der Gesamtverteilung der Allele zwischen den beiden Kohorten. Bei der differenzierten Analyse der einzelnen Allele fand sich allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen Trägern und Nicht-Trägern eines spezifischen, 164 bp großen Fragments, wobei dieses deutlich häufiger bei den Athleten gefunden wurde ($p=0.007$) (Wolfarth, 2007b).

4 Diskussion

Betrachtet man die Bedeutung einer ausreichenden statistischen Voraussetzung bezüglich der Größe des Probandenkollektivs für die Zuverlässigkeit von Aussagen bezüglich einer Genotypen-Phänotypen-Interaktion, so muss man auch die Ergebnisse aus unserer eigenen Studie an den z. T. noch kleinen Teilkollektiven vorsichtig interpretieren. Bei der zwischenzeitlich erreichten Studiengröße mit über 600 Probanden ist dieses Problem für die meisten zu untersuchenden Polymorphismen mit günstiger Allel- und Genotypenverteilung sicherlich besser zu lösen und man kann in Zukunft Ergebnisse aus dieser Studie mit größerer Sicherheit als Hinweis auf eine tatsächliche Bedeutung einer genetischen Variante für die Ausprägung der Bezugsgröße der maximalen Sauerstoffaufnahme werten. Zur Einschätzung dieser Ergebnisse sollte man allerdings auch bedenken, dass in den vergangenen zehn Jahren in vielen Teilbereichen der Medizin, z. T. mit erheblichem finanziellem Aufwand, die Durchführung genetischer Studien betrieben wurde. Insbesondere im Bereich der multifaktoriell bedingten „Volkskrankheiten“ wie Adipositas, Arterielle Hypertonie, Typ-II-Diabetes oder Arteriosklerose ist nach anfänglicher Euphorie durch viele positive Assoziationsergebnisse aus kleinen Studienkohorten eine gewisse Ernüchterung eingetreten. Die meisten frühen Befunde wurden zwischenzeitlich in großen Populationsstudien oder Meta-Analysen revidiert oder relativiert. Klassisches Beispiel hierfür ist der Deletions-/Insertions-Polymorphismus im ACE-Gen, der mit zahlreichen kardiovaskulären Krankheitsbildern assoziiert schien und dessen Bedeutung zwischenzeitlich sehr zurückhaltend interpretiert wird, da in keiner großen Studie mit Probandenzahlen >500 Personen die initialen Ergebnisse bestätigt werden konnten. Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurde dieser Polymorphismus ebenfalls untersucht und es zeigte sich kein Zusammenhang zur Ausdauerleistungsfähigkeit (Wolfarth, 2003).

Tab. 2: *Herkunft der Probanden nach Region*

	Anzahl	America	Deutschland	Finnland
EEA	356	77 (21,6%)	227 (63,8%)	52 (14,4%)
SC	344	94 (27,3%)	201 (58,4%)	49 (14,3%)
EEA=Athletengruppe (Elite Endurance Athletes), SC=Kontrollgruppe (Sedentary Controls), Anzahl der Probanden und prozentualer Anteil an der Subgruppe in Klammern				

Welche Konsequenzen müssen nun aus diesen Erfahrungen gezogen werden? Sicherlich ist in diesem Forschungsbereich die Auswahl der zur Untersuchung anstehenden Kollektive von entscheidender Bedeutung. Neben stringenten Ein- und Ausschlusskriterien und der unbedingten Voraussetzung einer ausreichenden Fallzahl muss insbesondere bei Fall-/

Vergleichsstudien auch der Auswahl der Kontrollgruppe besondere Beachtung geschenkt werden. Hier muss gefordert werden, dass Kontrollkollektive nach den gleichen strengen Kriterien ausgewählt und untersucht werden wie die Fallgruppen. In der Vergangenheit wurden hier häufig unreflektiert Kontrollgruppen nur aufgrund der lokalen Verfügbarkeit eingesetzt, ohne eine ausreichende Beschreibung bezüglich Herkunft oder phänotypischen Merkmalen zu geben. Diese Grundsätze sind für das durch uns aufgebaute Studienkollektiv erfüllt.

Damit steht mit diesem Kollektiv eine robuste Basis für die Untersuchung der genetischen Grundlage der Ausdauerleistungsfähigkeit zur Verfügung. Die Zusammenstellung der weltweit publizierten Ergebnisse genetischer Studien in Zusammenhang mit der körperlichen Leistungsfähigkeit wurde ebenfalls im Rahmen dieses Projektes durchgeführt. Die Veröffentlichung erfolgte jeweils gemeinsam mit einem internationalen Autorengremium und wird jährlich in „*Medicine and Science in Sports and Exercise*“ publiziert (Wolfarth, 2005; Rankinen, 2006). Über diese Publikation ist eine regelmäßige Aktualisierung gewährleistet, welche dem interessierten Leser einen raschen Überblick über neue Befunde aus dem Bereich der Genetik der körperlichen Leistungsfähigkeit bietet.

In Bezug auf mögliche Gendopingmethoden hat sich in den letzten Jahren – im Vergleich zur Entwicklung der konventionellen Dopingsubstanzen und -methoden – eher wenig getan. Obwohl schon 2001 in der Presse spekuliert wurde, dass bei den Olympischen Spielen 2002 die ersten genmanipulierten Athleten an den Start gehen, ist bis heute kein konkreter Fall von Gendoping bekannt. Die potentiell interessanten Bereiche Sauerstofftransport und Muskelwachstum bieten kaum neue Erkenntnisse bezüglich klinisch anwendbarer Genterapien. Die zugehörigen Ergebnisse aus Tierversuchen zeigen weitgehend einen Stand, welcher vor ca. zehn Jahren schon vorhanden war.

Betrachtet man sich die Geschichte der Leistungsmanipulation im Sport, wird es aber ohne Zweifel Athleten geben, die ungeachtet der immensen medizinischen Risiken diese Methoden anwenden werden, sobald sie in der Praxis zur Verfügung stehen. Einen genauen Zeitpunkt für die Einführung der Genterapie in die klinische Praxis zu benennen, ist derzeit nicht möglich. Es ist allerdings davon auszugehen, dass zumindest für ausgesuchte Krankheitsbilder entsprechende Therapien innerhalb der nächsten Dekade etabliert werden. Keimbahnmanipulationen sind auf Grund der langen Generationszeiten beim Menschen als eher unwahrscheinlich anzusehen, zumal in diesem Bereich der dopinganalytische Nachweis einfach durchzuführen wäre und es keiner Neuentwicklungen bedürfte. Hierzu genügen die vorhandenen Methoden der forensischen Medizin (genetic fingerprinting).

5 Schlussfolgerung

Genetische Marker direkt zu untersuchen, ist ein neuer Ansatz zur Erforschung der genetischen Basis der körperlichen Aktivität und Leistungsfähigkeit. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Einsatzbereiche dieser Ergebnisse in der Praxis. Neben der Möglichkeit, die Leistungsfähigkeit im Bereich des Ausdauersports genetisch zu charakterisieren, eröffnen sich evtl. auch Perspektiven im Bereich der präventiven und rehabilitativen Trainingstherapie, bessere und effizientere Therapieplanungen durchzuführen und evtl. frühzeitige Aussagen zur Indikation und Effektivität entsprechender Programme zu machen. Des Weiteren wird es möglich sein, mit Hilfe molekularbiologischer Techniken neue Therapieformen zu etablieren, welche bisher nicht dagewesene Behandlungsmöglichkeiten für eine große Anzahl schwerer Krankheiten in unterschiedlichen Teilgebieten der Medizin bieten. Als Folge dieser Entwicklung lässt sich aber auch ein zukünftiger Missbrauch dieser Techniken im Sinne einer Manipulation genetischen Materials zur unerlaubten Leistungs-optimierung im Bereich des Sports nicht ausschließen. Diese Aussicht sollte allerdings nicht dazu führen, entsprechende Forschung zu unterbinden oder einzuschränken, da früher oder später diese Erkenntnisse auch in anderen Teilbereichen der Medizinforschung erarbeitet und dann auf den Sport übertragen werden könnten. Vielmehr muss aktiv, offen und ethisch verantwortlich an diesen Themenkomplex herangetreten werden, denn nur mit exzellentem Fachwissen und transparentem Erkenntnisstand ist einem möglichen Missbrauch sinnvoll vorzubeugen.

Mit dem Aufbau des vorliegenden Studienkollektivs über die letzten Jahre, im Rahmen des BISp-Projektes, wurde ein weltweit einmaliges Werkzeug geschaffen, um die Bedeutung einzelner genetischer Marker für die Ausdauerleistungsfähigkeit zu untersuchen. Hierdurch besteht die Möglichkeit in Bezug auf potentielle Gendopingvergehen, zum einen die natürlich vorhandenen genetischen Variationen in einem Kollektiv hochleistungsfähiger Ausdauerathleten zu charakterisieren. Zum anderen kann bei Spekulationen um mögliche Manipulationen eine Bedeutungsevaluation einzelner Gene oder Genvarianten zumindest für den Bereich Ausdauerleistungsfähigkeit durchgeführt werden.

Ein Teilbereich, der zukünftig an Bedeutung gewinnen könnte, wird allerdings schon jetzt durch das vorliegende Projekt mit angerissen. Da auf Grund der Weiterentwicklung von z. T. nicht nachweisbaren Dopingsubstanzen die indirekten Methoden zunehmend an Bedeutung gewinnen werden, kann über Kollektive wie das hier vorgestellte zukünftig eine genetische Veranlagung zu einer außergewöhnlichen physiologischen Wertekonstellation dokumentiert werden. Dies würde den Umgang mit diesen Methoden und insbesondere die Evaluation eventueller Ausnahmegenehmigungen optimieren. Als aktuell brennendes Thema in diesem Bereich wäre der Aufbau eines solchen Kollektivs mit entspre-

chenden hämatologischen Parametern als Bezugsphänotyp zu sehen. Hier ist im Rahmen der aktuellen Grenzwertdiskussion zur Vermeidung bzw. zum Nachweis von Blutdoping und verwandten Methoden (EPO, EPO-Aktivatoren etc.) Handlungsbedarf zur Charakterisierung der genetischen Voraussetzungen zu sehen.

6 Literatur

- Rankinen, T., Bray, M. S., Hagberg, J. M., Perusse, L., Roth, S. M., Wolfarth, B., & Bouchard, C. (2006). The Human Gene Map for Performance and Health-Related Fitness Phenotypes: The 2005 Update. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 38, 1863-1888.
- Wolfarth, B., Rankinen, T., Mühlbauer, S., Ducke, M., Rauramaa, R., Boulay, M. R., Pérusse, L. & Bouchard, C. (2007a). Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism and Elite Endurance Athlete Status: The Genathlete Study. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* (in press).
- Wolfarth, B., Rankinen, T., Mühlbauer, S., Scherr, J., Boulay, M. R., Pérusse, L., Rauramaa, R. & Bouchard, C. (2007b). Association between a β 2-Adrenergic-Receptor Polymorphism and Elite Endurance Performance. *Metabolism* (in press).
- Wolfarth, B., Bray, M. S., Hagberg, J. M., Perusse, L., Rauramaa, R., Rivera, M. A., Roth, S. M., Rankinen, T., & Bouchard, C. (2005). The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2004 update. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 37, 881-903.
- Wolfarth, B., Mühlbauer, S., Boulay, M., Perusse, L., Rankinen, T., Rauramaa, R., & Bouchard, C. (2003). Renin-Angiotensin-System (RAS) Polymorphismen bei hochtrainierten Ausdauerathleten. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 54, 60.

