
Entwicklung und Etablierung eines direkten Nachweisverfahrens für Gendoping unter besonderer Berücksichtigung erschöpfender Ausdauerbelastungen

Perikles Simon (Projektleiter), Thomas Beiter, Annunziata Fragasso, & Jens Hudemann

Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung Sportmedizin

Hintergrund

Zellfreie, im Plasma zirkulierende Nukleinsäuren wurden bereits vor 60 Jahren von Mandel und Métais erstmals beschrieben (Mandel & Métais 1948). Diese Entdeckung geriet allerdings weitgehend in Vergessenheit bis 19 Jahre später frei zirkulierende Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Serum von Patienten mit Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) untersucht wurde (Leon et al. 1977). Es zeigte sich, dass die Konzentration freier DNA im Blut von Tumorpatienten deutlich erhöht war und somit eine wichtige Indikatorrolle bei der Diagnostik und Früherkennung von Tumoren spielen könnte. Mittlerweile liegen zahlreiche Arbeiten vor, die eine Korrelation zwischen der Konzentration freier DNA und verschiedenen Tumorerkrankungen dokumentieren. Darüber hinaus ließen sich tumorspezifische genetische und epigenetische DNA Veränderungen (onkogene Mutationen, Heterozygotität, tumorspezifische Methylierungsmuster) auch innerhalb der frei im Blut zirkulierenden DNA (cirDNA) nachweisen (z. B. Mayall et al., 1998; Silva et al., 1999; Korshunova et al., 2008).

Zur Zeit liegt der Forschungsschwerpunkt zu cirDNA weitgehend auf dem Gebiet der Tumordiagnostik. Darüber hinaus konnte ein Anstieg von cirDNA jedoch auch in Zusammenhang mit anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel Trauma, Schlaganfall, Autoimmunerkrankungen und Diabetes, beobachtet werden (Butt & Swaminathan, 2008). Über die zellulären Ursprünge und die Vorgänge, die zu einer Freisetzung von DNA in die Blutbahn führen, wird momentan noch recht kontrovers diskutiert. Neben der vorherrschenden Meinung, cirDNA entstehe hauptsächlich als „Abfallprodukt“ nekrotischer oder apoptotischer Prozesse, wird auch eine aktive Freisetzung von DNA aus intakten Zellen diskutiert.

Aus sportmedizinischer Sicht ist natürlich von Interesse, ob auch ein Zusammenhang zwischen körperlicher Belastung und cirDNA besteht. Intensive körperliche Belastungen und Übertraining können neben einer mechanischen oder metabolischen Schädigung der Muskulatur auch zu einer systemischen leukozytären Entzündungsantwort führen (Kendall & Eston, 2002; Fehrenbach & Schneider, 2006). Diskutiert wird auch eine durch sog. oxidativen Stress hervorgerufene kurzfristige Schädigung der DNA (Niess et al., 1998). Es erscheint nahe liegend, dass sich diese Prozesse in einem Anstieg der cirDNA widerspiegeln könnten. Bislang liegen in den wissenschaftlichen Datenbanken allerdings nur drei Studien vor, die einen Einfluss körperlicher Belastung auf die Konzentration von cirDNA untersucht haben (Atamaniuk et al., 2004, 2008; Fatouros et al., 2006).

Der Fokus unserer Arbeitsgruppe liegt auf einem von der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA) geförderten Forschungsprojekt zur Etablierung eines auf der Detektion transgener DNA basierenden Bluttests zum Nachweis einer missbräulichen Verwendung gentherapeutischer Verfahren im Spitzensport (sog. Gendoping) (Beiter et al., 2008). Als Quelle transgener DNA im peripheren Blut nach somatischem Gentransfer kommen sowohl virale Vektoren im Plasma, als auch transduzierte Blutzellen in Frage. Primäres Zielorgan für den leistungssteigernden Einsatz eines somatischen Gentransfers ist die Skelettmuskulatur. Sollte nach körperlicher Belastung auch muskuläre DNA in Form von cirDNA ins Blut freigesetzt werden, wäre theoretisch ein Nachweis transgener DNA im Blut nicht nur in den ersten Wochen nach Gentransfer sondern über einen langen Zeitraum möglich.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss körperlicher Belastung auf die Konzentration cirDNA im Plasma von Hobbysportlern und Leistungssportlern untersucht. Zudem wurde über eine quantitative DNA-Methylierungsanalyse der Frage nach dem zellulären Ursprung dieser cirDNA nachgegangen.

Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

Als Ausgangsmaterial diente peripheres EDTA-Blut von Probanden vor und nach körperlicher Ausdauerbelastung. Nach Abtrennung der zellulären Bestandteile über zwei aufeinander folgende Zentrifugationsschritte (1600 g, 10 min, 4°C; 16000 g, 5 min, 4°C) wurde die cirDNA aus dem Plasma mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen, Hildesheim, Germany) aufgereinigt.

Die Quantifizierung erfolgte über eine quantitative Real-Time-PCR unter Verwendung des QuantiFast SYBR Green PCR Kits (Qiagen, Hildesheim, Germany) auf dem MyiQ Real-Time PCR Cyclus der Firma BioRad (München, Germany). Zur Amplifikation eines 88 bp genomischen Fragmentes wurden die Primer 5'-TTGGCTCAAACAACCTGAATCC-3' und 5'TCCTGGGAAGGTTACAGCAAG -3' verwendet. Der gemessenen CT(Cycle Threshold)-Werte wurden über eine Kalibrierungskurve ausgehend von einer Verdünnungsreihe eines genomischen Standards bekannter Konzentration in Konzentrationswerte (Kopien/Volumen) umgerechnet.

Um Rückschlüsse auf den zellulären Ursprung der cirDNA zu erhalten, benötigt man ein Unterscheidungsmerkmal, das es erlaubt, genomische DNA einem bestimmten Gewebe oder einer Zellpopulation zuzuordnen. Da die Basenabfolge der genomischen DNA in allen Geweben (bis auf wenige Ausnahmen) identisch ist, bedient man sich sog. epigentischer Modifikationen, die für die Steuerung gewebespezifischer Gene verantwortlich sind. Ein wichtiger epigentischer Prozess ist die biochemische Modifizierung regulatorischer DNA-Abschnitte durch Anhängen einer Methylgruppe an die DNA-Base Cytosin. Diese Methylcytosine lassen sich durch Behandlung der genomischen DNA mit Bisulfit nachweisen. Zur Unterscheidung muskulärer von nicht-muskulärer DNA verwendeten wir eine Methylierungsstelle in einer regulatorischen Region (Enhancer) des Gens, das für den muskelspezifischen Faktor MyoD kodiert. Da MyoD praktisch ausschließlich in der Muskulatur exprimiert wird, liegt diese Enhancer-Region nur im Muskelgewebe in unmethylierter Form vor. Nach Bisulfit-Konvertierung läßt sich so der muskuläre Anteil an der cirDNA über eine

quantitative DNA-Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung nachweisen. Diese Methode erlaubt eine quantitative Analyse von DNA-Methylierungsmustern sowie die präzise Quantifizierung des globalen Methylierungsgrades einer DNA-Probe. Die Pyrosequenzierungs-Analyse wurde von der Firma Varionostic GmbH in Ulm durchgeführt.

Ergebnisse

Ausdauerbelastung führt zu einem Anstieg der freien zirkulierenden DNA

Im Rahmen des alljährlichen Tübinger 100 km-Staffellauf wurden von insgesamt 104 Teilnehmern Blutproben vor und unmittelbar nach Beendigung des Staffellrennens abgenommen. Die Proben dienten gleichzeitig zur Evaluierung des WADA Gendoping-Nachweises (Falsch-Positiv-Ausschluss). Von 53 Probanden (34 Männer, 19 Frauen) wurde die Plasma-Konzentration an cirDNA ermittelt (Abb. 1).

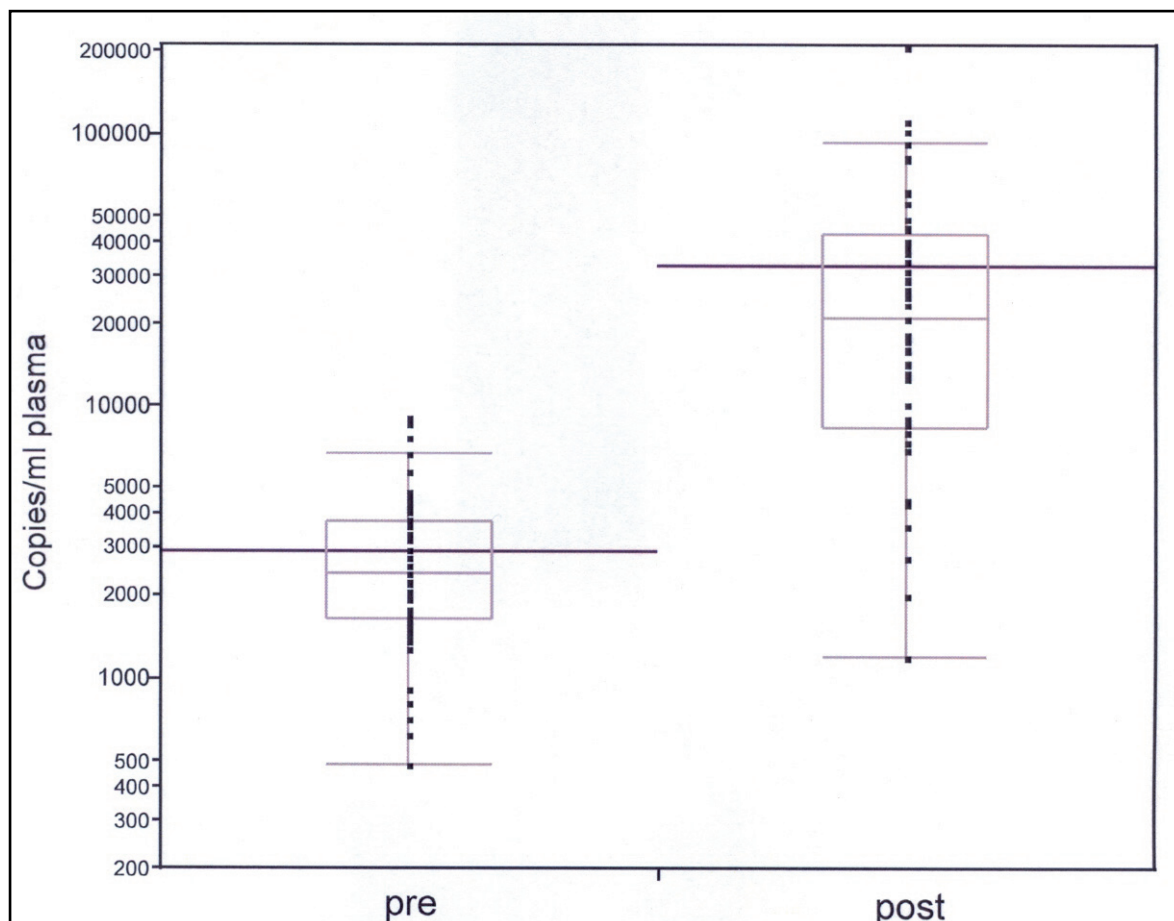


Abb. 1: cirDNA-Konzentration im Plasma von Freizeitläufern vor (pre) und nach (post) Ausdauerbelastung (N = 53, m = 34, w = 19; Alter: 17 - 60; BMI: 18,7 - 26,5)

Mit einer Ausnahme war bei allen Teilnehmer ein Anstieg der freien DNA im Plasma zu beobachten. Im Schnitt stieg die freie DNA um das 12,7-fache (0,9-fach bis 57-fach) an. Die cirDNA Konzentrationen lagen zwischen 483 und 9074 Kopien/

ml Plasma vor Belastung und zwischen 989 und 211500 Kopien/ml Plasma nach Belastung.

Bei den Staffellauf-Teilnehmern handelte es sich um eine sehr heterogene Population unterschiedlicher Alters- und Leistungsgruppen. Zudem konnte die Belastungsintensität der einzelnen Studienteilnehmer nicht eindeutig ermittelt werden. Um Aussagen über die cirDNA Konzentrationen unter standardisierten Belastungsbedingungen zu erhalten, wurde bei 12 Leistungssportlern eine Laufbandergometrie durchgeführt, die über 3-minütige Belastungsintervalle bis zur Ausbelastung des Sportlers verlief.

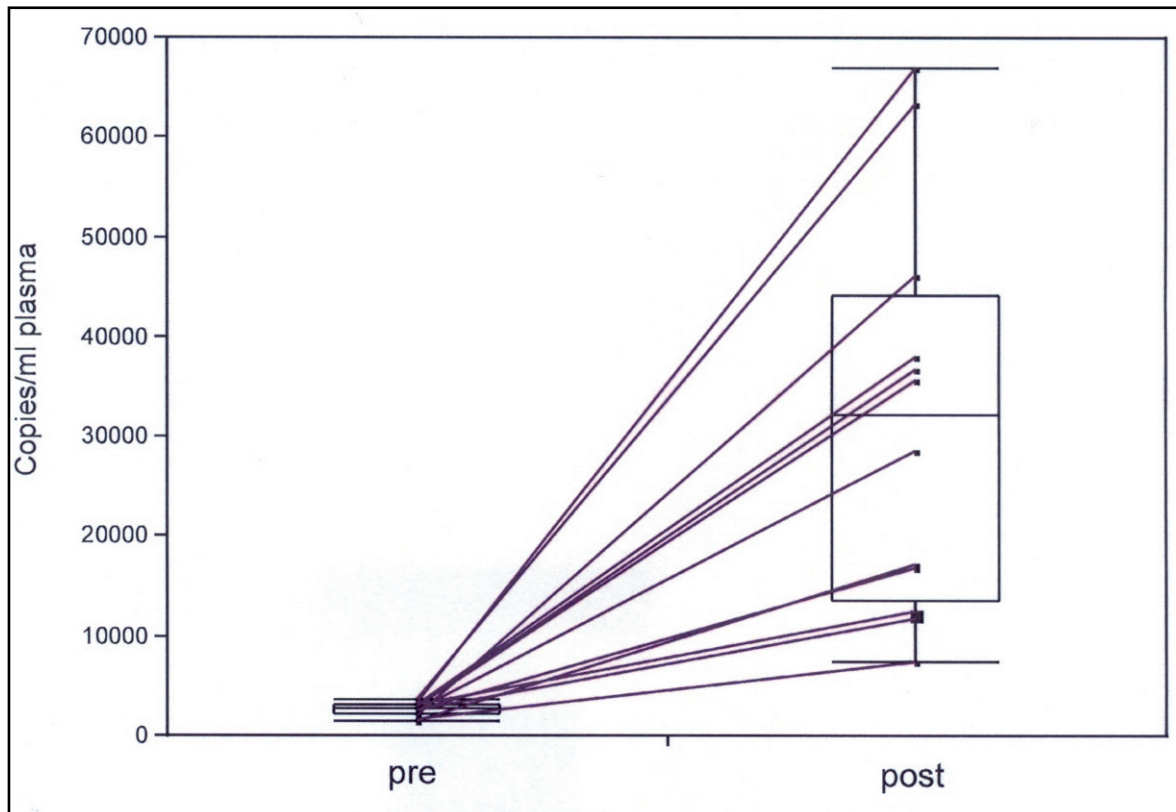


Abb. 2: cirDNA-Konzentration im Plasma von Leistungssportlern vor (pre) und unmittelbar nach (post) Ausdauerbelastung (N = 12)

Bei allen Sportlern war eine Erhöhung der Plasmakonzentration an cirDNA unmittelbar nach Belastung festzustellen (Abb. 2). Im Schnitt stieg die Konzentration an cirDNA um das 11,5-fache ($\pm 6,1$) an. Die Ausgangskonzentrationen lagen bei durchschnittlich 2712 (± 662) Kopien/ml Plasma und stiegen auf durchschnittlich 31862 (± 5728) Kopien/ml unmittelbar nach Belastung an.

cirDNA und Laktat im Belastungsverlauf

Die cirDNA Kinetik wurde über einen Stufentest am Laufbandergometer durchgeführt. Ausgehend von einer aeroben Belastungsstufe wurde die Laufbandgeschwindigkeit in 3-minütigen Intervallen bis zur maximalen Ausbelastung des Probanden gesteigert. Nach jedem Belastungsintervall wurde die Konzentration an cirDNA im

Plasma sowie die Laktatkonzentration bestimmt. Während der anschließenden Erholungsphase wurden nach definierten Zeitintervallen (+ 5, + 10, + 15, + 20, + 30 Minuten) weitere Blutproben analysiert.

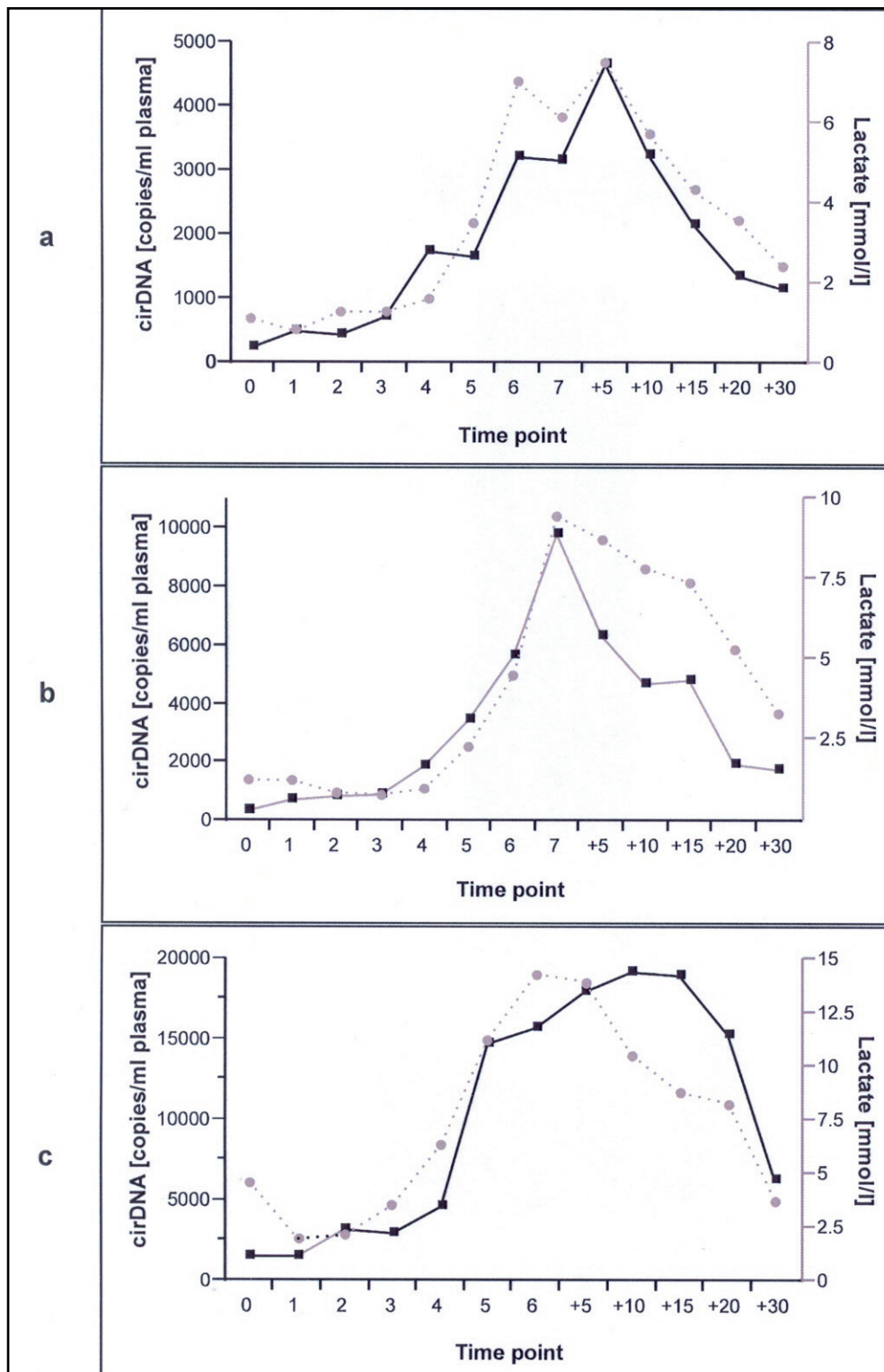


Abb. 3: circDNA (schwarz mit Quadraten) und Laktat (grau mit Punkten) Kinetik von 2 Freizeitläufern (a, b) und 1 untrainierten Person (c)

Belastungsstufen (je 3 Minuten): 1 bis 6/7; Erholungsphase : + 5 bis + 30 Minuten. Die cirDNA Kinetik wurde an drei Probanden (2 männliche Freizeitläufer (Abb. 3a, b) und 1 weibliche untrainierte Person (Abb. 3c) durchgeführt. Bei allen Probanden korrelierte der Anstieg der Laktatkurve mit dem Anstieg der cirDNA.

Anteil muskulärer DNA im cirDNA Pool

Die quantitative Methylierungsanalyse der MyoD Enhancer Region ergab für das Referenz-Cytosin einen Methylierungsgrad von 23 % im Skelettmuskel (Abb. 4a). Im Vergleich dazu zeigen Blutzellen eine fast vollständige Methylierung (91 %) an der entsprechenden Basenposition (Abb. 4b).

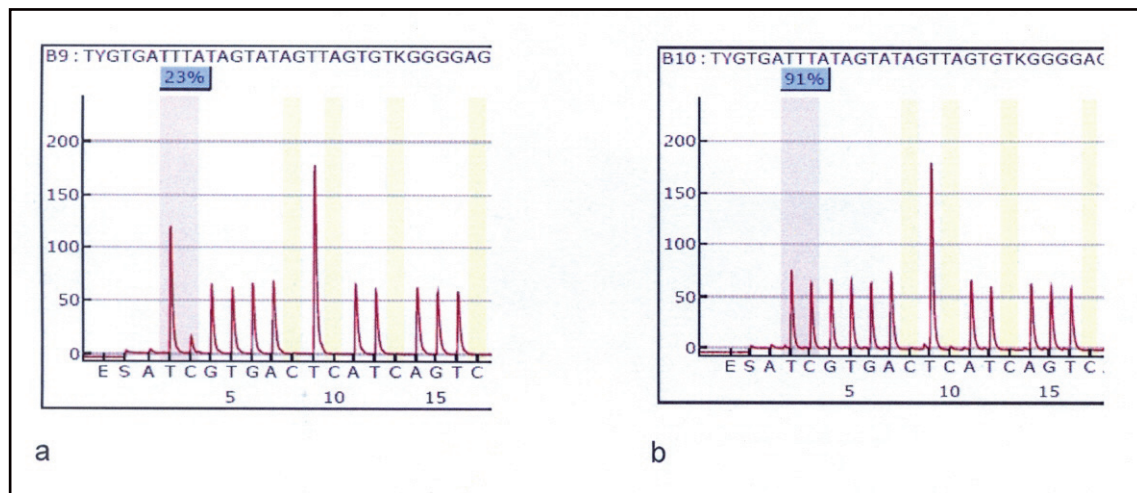


Abb. 4: Quantifizierung des Methylierungsgrades des Referenz-Cytosins im MyoD Enhancer-Bereich mittels Pyrosequenzierung nach Bisulfit-Behandlung. Als Ausgangsmaterial wurde genomische DNA aus dem Muskel (a) und aus peripheren Leukozyten (b) verwendet.

Ein quantitativer Vergleich des Methylierungsgrades des MyoD Enhancer Bereichs im cirDNA Pool vor und nach körperlicher Belastung lässt Rückschlüsse auf den zellulären Ursprung der bei Belastung freigesetzten cirDNA zu. Eine Freisetzung aus der Muskulatur infolge von mechanischen oder metabolischen Schädigungen müsste sich in einer Verringerung des Methylierungsgrades widerspiegeln. Eine endgültige Evaluierung der Ergebnisse steht noch aus. Die vorläufigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Muskulatur vermutlich in einer Größenordnung von 10 % am Anstieg der cirDNA nach Ausdauerbelastung beteiligt ist.

Ausblick

Unsere bisherigen Ergebnisse verdeutlichen, dass quantitative und qualitative Analysen der cirDNA eine wichtige Rolle in der molekularen Leistungsdiagnostik spielen könnten. Wichtig in diesem Zusammenhang ist vor allem die Klärung folgender Fragen:

- Lassen Unterschiede im Anstieg der cirDNA bei Belastung Rückschlüsse auf das Leistungspotential des Athleten zu?
- Lässt sich ein kausaler Zusammenhang zwischen Laktatkurve und cirDNA Konzentration herstellen?
- Welche biochemischen und zellulären Prozesse sind für den Anstieg der cirDNA bei Belastung verantwortlich?

Literatur

- Atamaniuk, J., Stuhlmeier, K.M., Vidotto, C., Tschan, H., Dossenbach-Glaninger, A. & Mueller, M.M. (2008). Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *European journal of applied physiology*, 104 (4), 711-717.
- Atamaniuk, J., Vidotto, C., Tschan, H., Bachl, N., Stuhlmeier, K.M. & Müller, M.M. (2004). Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clinical chemistry*, 50 (9), 1668-1670.
- Beiter, T., Zimmermann, M., Fragasso, A., Armeanu, S., Lauer, U.M., Bitzer, M., Su, H., Young, W.L., Niess, A.M. & Simon, P. (2008). Establishing a novel single-copy primer-internal intron-spanning PCR (spiPCR) procedure for the direct detection of gene doping. *Exercise immunology review*, 14, 73-85.
- Butt, A.N. & Swaminathan, R. (2008). Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137, 236-242.
- Fatouros, I.G., Destouni, A., Margonis, K., Jamurtas, A.Z., Vrettou, C., Kouretas, D., Mastorakos, G., Mitrakou, A., Taxildaris, K., Kanavakis, E. & Papassotiropoulos, I. (2006). Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clinical chemistry*, 52 (9), 1820-1824.
- Fehrenbach, E. & Schneider, M.E. (2006). Trauma-induced systemic inflammatory response versus exercise-induced immunomodulatory effects. *Sports medicine*, 36 (5), 373-384.
- Kendall, B. & Eston, R. (2002). Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen. *Sports medicine*, 32 (2), 103-123.
- Korshunova, Y., Maloney, R.K., Lakey, N., Citek, R.W., Bacher, B., Budiman, A., Ordway, J.M., McCombie, W.R., Leon, J., Jeddelloh, J.A. & McPherson, J.D. (2008). Massively parallel Bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA. *Genome research*, 18 (1), 19-29.
- Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M. & Yaros, M.J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*, 37, 646-650.
- Mandel, P. & Métais, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin l'Homme. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 241-243.
- Mayall, F., Jacobson, G., Wilkins, R. & Chang, B. (1998). Mutations of p53 gene can be detected in the plasma of patients with large bowel carcinoma. *Journal of clinical pathology*, 51 (8), 611-613.
- Niess, A.M., Baumann, M., Roecker, K., Horstmann, T., Mayer, F. & Dickhuth, H.H. (1998). Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. *Journal of sports medicine and physical fitness*, 38 (2), 111-115.
- Silva, J.M., Dominguez, G., Villanueva, M.J., Gonzalez, R., Garcia, J.M., Corbacho, C., Provencio, M., España, P. & Bonilla, F. (1999). Aberrant DNA methylation of the p16INK4a gene in plasma DNA of breast cancer patients. *British journal of cancer*, 80 (8), 1262-1264.