
Entwicklung eines routinetauglichen Assays zur Bestimmung des UGT2B17 Phänotyps in Urinproben zur Beurteilung individueller Variationen von Testosteron/Epitestosteron (T/E)-Quotienten („Phänotyp T/E-Quotient“)

Patricia Anielski¹, Juliane Simmchen¹, Detlef Thieme¹, Lars Wassill²
& Dirk Ganghofner²

¹Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie Dresden (IDAS), Kreischa

²Amplex Diagnostics GmbH, Gars

Problem

Der Nachweis der verbotenen Aufnahme endogener Steroide in der Dopinganalytik erfolgt über die Quantifizierung des Testosterongehaltes (T) in der Urinprobe - relativ zu Epitestosteron (E), das als unwirksames Nebenprodukt der körpereigenen Steroidsynthese als Referenz fungiert. Entsprechend dem *World Anti-Doping Code* und der geltenden Verbotsliste (Prohibited List 2010) stellt ein Verhältnis von T zu E größer als 4 einen Dopingverstoß dar, wenn er nicht im Ergebnis weiterer Untersuchungen durch physiologische oder pathologische Faktoren erklärbar ist. Weiterführende Methoden zur Differenzierung des körpereigenem von exogen appliziertem T (bzw. entsprechender Vorläufersubstanzen) kommen somit nur im Ausnahmefall zur Anwendung, wobei v. a. der T/E-Quotient als Bewertungskriterium im Screening herangezogen wird. Zusätzliche Untersuchungen wären z. B. die Anwendung der Kohlenstoffisotopenverhältnis-Bestimmung (IRMS) oder die Begutachtung anderer endogener Steroide auf der Grundlage individueller Referenzwerte, die in Verlaufskontrollen ermittelt werden müssen (Sottas et al., 2008). Letztere erfordern jedoch eine ausreichende Zahl an Voruntersuchungen oder prospektive Zielkontrollen der einzelnen Athletin bzw. des einzelnen Athleten mit einem damit verbundenen erheblichen logistischen und organisatorischen Aufwand für die Steroidanalytik und die statistische Datenauswertung.

T und E werden überwiegend als Glucuronide im Urin ausgeschieden und zusammen mit dem unkonjugierten Anteil als so genannte ‚kombinierte Fraktion‘ analysiert. Neben Proteinbindung, der Absolutkonzentration im Blut und dem Phase-I-Metabolismus der Steroide kommt somit auch dem Ausmaß der Konjugation eine erhebliche Bedeutung zu (Phase II). T wird dabei hauptsächlich durch das Enzym UGT2B17 (UDP-Glucuronyl-transferase 2B17) glucuronidiert. Untersuchungen von Schulze et al. (2008) belegen die Abhängigkeit des T/E-Quotienten vom UGT2B17-Genotyp. Durch Mutation im betreffenden Gen (Wildtyp: ins/ins) kommt es zu einer heterozygoten (ins/del) oder homozygoten Deletion (del/del), was im Fall von del/del im Phänotyp durch ein vollständiges Fehlen des Enzyms UGT2B17 charakterisiert ist. Infolge dessen kommt es zu einer relativen Verringerung der Glucuronidierung von T, die zu signifikant erniedrigten T/E-Werten im Urin führt. Trotz exogener

T-Applikation liefert deshalb das Steroid-Screening im Urin häufig einen unauffälligen Befund mit einem T/E-Quotienten < 4 . Fallen keine sonstigen Abweichungen des Steroidprofils auf, würde die verbotene Anwendung somit nicht festgestellt, da zusätzlichen Untersuchungen wie z. B. eine IRMS-Analyse nicht veranlasst werden.

In diesem Projekt sollte geprüft werden, ob sich durch die Feststellung des UGT2B17-Phänotyps die Dopinganalytik hinsichtlich der T/E-Bestimmung effektiver oder effizienter gestalten lässt.

Methode

Zur Untersuchung des Enzym-Polymorphismus wurde ein Testkit zur Detektion des funktionellen UGT2B17-Gens durch die Fa. Amplex etabliert. Bei dem bekannten Polymorphismus handelt es sich um eine Deletion der Exons 1-6 in der Gensequenz für das Enzym UGT2B17. Die Auswahl der Primer für die PCR (Polymerase Chain Reaction) erfolgte im Bereich des Exons 6, weshalb mit dem etablierten Testkit das Vorhandensein des intakten Gens nachgewiesen wird. Dies erfolgt durch eine Farbreaktion – nachdem Zellen der Testperson aus dem Urin isoliert wurden, der betreffende Genabschnitt mittels PCR vervielfältigt wurde und dieser an einer spezifischen DNA-Sonde des Testkits gebunden hat.

Bei einer homozygoten Deletion des UGT2B17-Gens liefert der Test ein negatives Ergebnis, d. h. Testpersonen mit einem vollständigen Fehlen des Enzyms können differenziert werden. Der Wildtyp (*ins/ins*) und der heterozygote Typ (*ins/del*) zeigen im Test ein positives Signal. Zur Überprüfung, ob Zellmaterial aus dem Urin extrahiert wurde, ist gleichzeitig eine interne Kontrolle integriert (β -Globulin).

Das Hyplex-Verfahren ist für die Analyse von Urinproben optimiert und besteht aus folgenden Teilschritten:

- Isolierung intakter Zellen aus Urin
- Lyse der Zellen
- DNA-Anreicherung
- PCR
- Hybridisierung der Amplifikate mit immobilisierter, markierter Sonde
- Detektion: ELISA-Prinzip (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
- Farbreaktion bei *ins/ins* oder *ins/del* = *pos*
- Keine Färbung bei *del/del* = *del*

Es resultieren die folgenden Ergebnis-Varianten des Testkits:

Phänotyp „**pos**“: UGT2B17 + / β -Globulin + → Genotyp *ins/ins* oder *ins/del*

Phänotyp „**del**“: UGT2B17 - / β -Globulin + → Genotyp *del/del*

Test „invalid“ (**n.v**): UGT2B17 - / β -Globulin - → nicht auswertbar

Das Hyplex-Testsystem wurde anschließend im IDAS an 674 Realproben durchgeführt. Um eine repräsentative Probenauswahl zu gewährleisten, wurden in einem Zeitraum von etwa 2 Monaten (Mitte Juni bis Mitte August 2009) alle eingehenden Dopingkontrollproben getestet, vorausgesetzt die Athletin bzw. der Athlet hatte einer

Verwendung zu Forschungszwecken zugestimmt. Es erfolgte eine Umcodierung der Urine.

Die Urine wurden zusätzlich im Steroid-Screening aufgearbeitet, um den T/E-Quotienten bezüglich des ermittelten UGT2B17-Phänotyps zu bewerten. Anhand der erhobenen Daten sollte beurteilt werden, ob das bisherige Verfahren zur Analyse körpereigener Steroide effektiver gestaltet werden kann. Zum Beispiel könnte das Risiko von falsch-negativen Befunden durch eine individuelle Anpassung des T/E-Quotienten je nach UGT2B17-Phänotyp verringert werden. Oder aber es könnte die Auswahl von Proben zur Durchführung zusätzlicher Analysen (IRMS) objektiviert werden, indem eine detailliertere Beurteilung der endogenen Steroide und des T/E-Quotienten erfolgt.

Ergebnisse

Folgende Häufigkeitsverteilungen und T/E-Mittelwerte wurden ermittelt (siehe Abb. 1):

- Untersuchte Proben: N = 674 (421 männliche, 253 weibliche Probanden).
- Phänotyp *del*: N = 154 (22,8 %); Mittelwert T/E 0,9.
- Phänotyp *pos*: N = 502 (74,5 %); Mittelwert T/E 1,7.
- Test "invalid" (n. v): N = 18 (2,7 %).

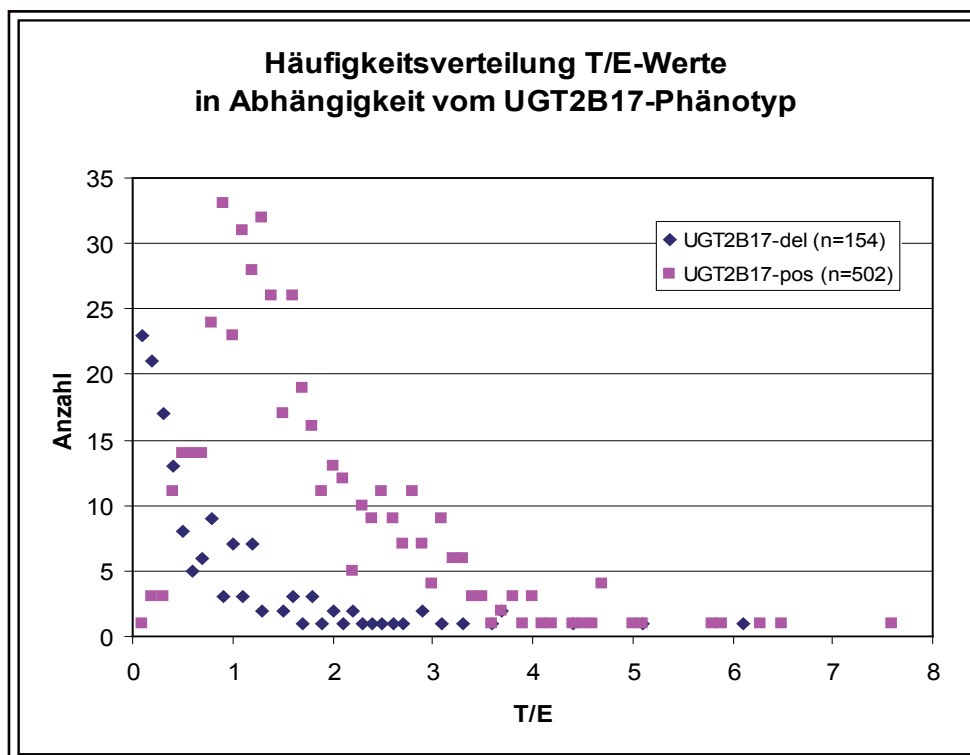


Abb. 1. T/E-Quotienten in Urinproben von Sportlerinnen und Sportlern mit Deletion (blau) bzw. mit intaktem UGT2B17-Gen (rot)

Die beiden Phänotypen unterscheiden sich hinsichtlich des T/E-Mittelwertes signifikant voneinander ($p = 0,000$, t-Test, Programm SPSS). Weitere Steroid-Werte aus dem Screening wurden nach Dichte-Korrektur in die statistische Auswertung einbezogen (Tab. 1). Signifikante Unterschiede zwischen den Phänotypen del und pos traten neben dem T/E-Quotienten bei der Testosteron-Konzentration sowie bei den Quotienten DHT/T und 5α -Diol/T auf. Die Überprüfung der Konzentrationen von E, DHT und 5α -Diol, sowie die Quotienten DHT/E und 5α -Diol/E zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Tab. 1. Steroidkonzentrationen (Dichte-korrigiert) in Abhängigkeit vom UGT2B17-Phänotyp; t-Test, SPSS
(T_E: T/E-Quotient; T: Testosteron; E: Epitestosteron; DHT_5A, DHT: 5α -Dihydro-T; ADIOL_5A, DIOL: 5α -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol; Q: Quotient)

Gruppenstatistiken					
				Standardab	Standardfehler
T_E	del	154	,895	1,031	8,304E-02
	pos	502	1,700	1,044	4,661E-02
T	del	154	19,150	24,554	1,979
	pos	502	30,073	28,565	1,275
E	del	154	24,337	25,048	2,018
	pos	502	20,474	20,382	,910
DHT_5A	del	153	3,516	4,963	,401
	pos	502	4,188	5,810	,259
ADIOL_5A	del	154	44,972	47,453	3,824
	pos	502	49,357	116,916	5,218
Q_DHT_T	del	153	,5736	1,7748	,1435
	pos	502	,2017	,2675	1,194E-02
Q_DIOL_T	del	154	6,9644	9,5233	,7674
	pos	502	2,4312	5,6039	,2501
Q_DHT_E	del	154	,4042	1,8386	,1482
	pos	500	,3072	,6629	2,965E-02
Q_DIOL_E	del	154	3,0745	5,9221	,4772
	pos	501	3,4472	9,6043	,4291

Diskussion

Im Rahmen dieses Projektes wurde ein spezieller PCR-Test (Hyplex, Fa. Amplex) zur Untersuchung auf Vorhandensein des Gens für die Glucuronyltransferase UGT2B17 in Urinproben entwickelt und auf Praxistauglichkeit untersucht. Das betreffende Enzym ist wesentlich an der Glucuronidierung von Testosteron beteiligt. Dessen Funktionalität steht deshalb in direktem Zusammenhang mit dem in der Dopinganalytik angewandten T/E-Quotienten.

Zur genetischen Untersuchung werden zunächst aus der Urinprobe Zellen der Testperson durch Zentrifugieren abgetrennt und anschließend die DNA isoliert. Mittels PCR wird ein ausgewählter Abschnitt des intakten UGT2B17-Gens amplifiziert, der

dann mit einem ELISA-Prinzip über eine Farbreaktion detektiert wird. Dadurch kann der UGT2B17-Phänotyp ermittelt werden, d. h. der Test erlaubt eine Unterscheidung zwischen homozygot deletierten (del/del) sowie homo- oder heterozygot positiven Individuen (ins/ins bzw. ins/del). Zusätzlich ist eine interne Kontrolle integriert, um die erfolgreiche Isolierung von Zellen aus dem Urin zu überprüfen.

Der Hyplex-Kit wurde im IDAS an 674 Dopingkontrollen unter Realbedingungen durchgeführt und die Ergebnisse in Zusammenhang mit den Steroidkonzentrationen ausgewertet. Von den untersuchten Proben lieferten 656 ein verwertbares Ergebnis, d. h. nur bei 2,7 % versagte das Verfahren zur Isolierung von Zellmaterial. Folgende Häufigkeitsverteilung der UGT2B17-Deletion wurde festgestellt: 22,8 % Phänotyp UGT2B17-del; 74,5 % Phänotyp UGT2B17-pos. Die ermittelte Verteilung entspricht ungefähr einem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (theoretische Häufigkeit UGT2B17-del: 25 %). Da nichts über die ethnische Herkunft der Testpersonen bekannt ist, ist jedoch kein direkter Vergleich der Häufigkeiten mit den Literaturwerten möglich (Schulze et al., 2008; Wilson et al., 2004), die zudem an kleineren Populationen ermittelt wurden.

Die Gruppen UGT2B17-pos und -del unterscheiden sich signifikant in den Mittelwerten für die Quotienten T/E (del: 0,9; pos: 1,7), 5 α -Diol/T (del: 7,0; pos: 2,4) und DHT/T (del: 0,6; pos: 0,2). Damit stehen durch die Bestimmung des UGT2B17-Phänotyps ergänzende Informationen für die Steroidanalytik zur Verfügung.

Bei einer großen Anzahl (89 der 674) Proben wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt, um die Funktionalität des Testkits zu überprüfen. Zur Diskussion standen insbesondere Abweichungen der Steroidkonzentrationen (z. B. T/E) im Vergleich zu den Literaturdaten für die unterschiedlichen UGT2B17-Phänotypen. Bei 9 Urinproben traten Besonderheiten auf, die nicht abschließend geklärt werden konnten. Diese Proben wiesen im Testkit sowie in der Bestätigungsmethode (PCR mit Gelelektrophorese, Wilson et al., 2004) einen del-Phänotyp auf, unterschieden sich jedoch hinsichtlich des T/E-Wertes und weiterer Steroidparameter nicht von der UGT2B17-pos Gruppe. Eine exogene Zufuhr von Testosteron-Präparaten wurde mittels IRMS-Analyse ausgeschlossen. In diesen Fällen bleibt zu prüfen, ob die Ursache im Hyplex-Detektionsverfahren liegt, oder ob neben den bekannten noch zusätzliche genetische Modifikationen oder individuelle Besonderheiten eine Rolle spielen. Hierzu müssten weitere genetische Analysen durchgeführt werden.

Als kritisch für die Anwendung des Testverfahrens ist zudem das Risiko einer Kontamination mit Fremdzellen sowohl während der Probenahme der Dopingkontrolle als auch während der Aufarbeitung in einem nicht für die PCR-Analytik spezialisierten Labor zu beurteilen, da jeweils keine sterilen Bedingungen gegeben sind.

Abschließend ist festzuhalten, dass mit dem Testkit zusätzliche Informationen zum Phase-II-Metabolismus der Steroide erhalten werden können. Ein kompletter Ersatz der IRMS-Analytik oder die individuelle Anpassung des T/E-Wertes entsprechend dem UGT2B17-Phänotyp ist nach aktueller Datenlage jedoch nicht möglich. Somit bleibt zu prüfen, ob die Bewertung von zusätzlichen Steroidparametern zur effizienteren Detektion der missbräuchlichen Anwendung von Testosteron-Präparaten im Urin genutzt werden kann.

Literatur

- Schulze, J.J., Lundmark, J., Garle, M., Skilving, I., Ekström, L. & Rane, A. (2008). Doping test results dependent on genotype of uridine diphospho-glucuronosyl transferase 2B17, the major enzyme for testosterone glucuronidation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93 (7), 2500-2506.
- Schulze, J.J., Lorentzon, M., Ohlsson, C., Lundmark, J., Roh, H.K., Rane, A. & Ekstrom, L. (2008). Genetic aspects of epitestosterone formation and androgen disposition: influence of polymorphisms in CYP17 and UGT2B enzymes. *Pharmacogenetics and genomics*, 18, 477-485.
- Sottas, P.E., Saudan, C., Schweizer, C., Baume, N., Mangin, P. & Saugy, M. (2008). From population- to subject-based limits of T/E ratio to detect testosterone abuse in elite sports. *Forensic science international*, 174 (2-3), 166-172.
- Wilson, W. 3rd, Pardo-Manuel de Villena, F., Lyn-Cook, B.D., Chatterjee, P.K., Bell, T.A., Detwiler, D.A., Gilmore, R.C., Valladeras, I.C., Wright, C.C., Threadgill, D.W. & Grant, D.J. (2004). Characterization of a common deletion polymorphism of the UGT2B17 gene linked to UGT2B15. *Genomics*, 84 (4), 707-714.