
Dopinganalytik – Möglichkeiten der Gen-Expressions- erfassung aus Haarfollikelzellen, Lymphozyten und Mundschleimhautepithel

Martin Schönfelder¹, Horst Michna [†]¹, Hande Hofmann¹, Heinrich H.D.
Meyer², Michael Pfaffl², Martina Reiter² & Katerina Nikolova Georgieva³

¹Technische Universität München, Lehrstuhl für Sport und Gesundheitsförderung,

² Technische Universität München, Institut für Physiologie

³Medical University of Plovdiv (Bulgaria), Department of Physiology

Problem

Mit dem fortschreitendem Wissensstand über die Dopingproblematik werden nicht nur die Verfahren der Dopinganalytik verbessert, sondern auch die Entwicklung neuer Doping-Methoden und ergogener Präparate schreitet parallel dazu voran. Aus diesem Grund liegt es nahe, als mögliche Ergänzung zu den bisherigen Analyseverfahren alternative Methoden zu etablieren, zu validieren und ihr Potential für die Praxis zu prüfen.

Die Analytik konzentriert sich bis zum heutigen Zeitpunkt entweder auf direkte Detektionsverfahren bestimmter Substanzen bzw. dessen Metaboliten mittels Massenspektrometrie (MS) oder auf indirekte Nachweismethoden, die sich auf die Auswirkungen einer Substitution stützen, z. B. die Hämatokrit-Bestimmung als mögliches Indiz eines Erythropoietin-Missbrauchs.

Betrachtet man den Missbrauch pharmakologisch wirksamer Substanzen aus biologischer Sichtweise, resultieren letztendlich die Doping-Effekte auch in einer Änderung von Gen-Expressionsmustern; d. h. die Substanzen greifen entweder direkt oder indirekt in die Regulation bestimmter Gene ein. Wie sich solche Änderungen auf der Expressionsebene widerspiegeln können, ist ansatzweise aus Untersuchungen aus den Bereichen der Haarforschung (Lachgar et al., 1999; Kim et al., 2003) und der Lebensmittel-produzierender Tiere (Hartel et al., 2003; Meyer, 2001) bekannt. Letztere Ergebnisse bieten eine Grundlage bei der Suche nach bestimmten Kandidatengenen im humanen System. Ein weiterer Punkt, der für wirkungsbezogene, molekularbiologische Analysen spricht, ist die Tatsache, dass biologische Systeme auf geringste Konzentrationen verschiedenster Substanzen reagieren können, die mittels der etablierten Analyseverfahren nur schwer oder gar nicht fassbar sind. Zudem bergen biologische Systeme die Möglichkeit, auch Auswirkungen unbekannter Substanzen anzuzeigen. Zum anderen können Wirkstoffe, wie Steroidhormone, Wachstumshormon und beta-Agonisten, nachhaltige Variationen in der Genexpression hervorrufen, welche noch über den Zeitraum der Nachweisbarkeit mittels MS hinaus reichen könnten.

Auf molekularbiologischer Ebene gibt es derzeit unterschiedliche Denkansätze die bestehenden Nachweisverfahren durch alternative Techniken zu unterstützen. Neben dem direkten Nachweis von verbotenen Substanzen bzw. deren Metaboliten

ist es ggf. möglich auch indirekt den Missbrauch anzuzeigen. Bei den möglichen Methoden sind zum einen der sog. „Rezeptor-basierte Screening Assay“ und „nachgelagerte“ Methoden wie die mRNA-Expressionsanalyse zu nennen.

Als Alternative kommen bei Erstgenanntem technikverwandte Methoden der sog. „Immunogramme“ wie RIA oder ELISA zum Einsatz. Diese Methoden beruhen nicht darauf mittels Antikörper spezifische Substanzen zu binden, sondern sie absorbieren diese auf natürliche Weise über den jeweiligen Rezeptor. Diese sog. „Rezeptogramme“ können auch unbekannte Substanzen mit gleicher Wirkungsweise bzw. Rezeptorbindungseigenschaft aufdecken (Scippo et al., 2004; Danyi et al., 2007). Als sog. Reporter können hier verschiedene Techniken eingesetzt werden: GC-MS, kolorimetrische Verfahren oder aber auch transgene Mikroorganismen oder Zelllinien, welche bspw. mit einem Luciferase- oder GFP-(green fluorescent protein)Gen ausgestattet sind.

Der Denkansatz der vorliegenden Studie beruht darauf als „Reporter“ die Variation der natürlichen Genexpression heranzuziehen, denn die Bindung einer spezifischen Substanz an den korrespondierenden Rezeptor kann, wie z. B. im Falle der Steroidrezeptoren, direkt die Genexpression des Zielgewebes beeinflussen.

Das Problem, welches sich der skizzierten molekularbiologischen Analyse in den Weg stellt, liegt in den biologischen Ablaufprozessen begründet. Um auf der Ebene der Genexpression Auswirkungen der genannten Substanzen bestimmen zu können, muss das jeweilige biologische System auch ausreichend sensitiv auf diese Substanzen reagieren. Es ist nicht *per se* gegeben, dass die jeweiligen Rezeptoren der Substanzen oder deren Metabolite ubiquitär in allen Geweben exprimiert sind. Gleichwohl es einige Organe gibt, die äußerst sensitiv auf die bestimmten Wirkstoffe reagieren können, besteht eine weitere Hürde in der ethischen Vertretbarkeit einer Entnahme geeigneter Zellen oder Gewebe. Somit ist die Entnahme erforderlicher Mengen an geeigneter Zellen bzw. Geweben (bspw. der Muskulatur) nicht immer vertretbar bzw. auch für die Praxis in der Dopinganalytik nicht durchführbar.

Zusammenfassend stehen für den spezifischen Nachweis des Missbrauchs von Substanzen nur sehr wenige Zelltypen bzw. Gewebe zur Verfügung, die einerseits in ausreichender Menge aus dem Körper isolierbar sind und andererseits auch noch sensitiv auf die zu untersuchenden Substanzen reagieren. Letztlich kommen für derartige Untersuchungen an Athletinnen bzw. Athleten deshalb nur Blutproben, respektive die Untersuchung von Leukozyten/Lymphozyten, die Mundschleimhaut- und Haarfollikelzellen in Frage.

Die Gewinnung der Zellen ist im Fall der Haarfollikel u. U. schwierig, aber mit der Möglichkeit, auch aus sehr geringem Zellmaterial reproduzierbare Expressionsanalysen durchzuführen, liegt dies durchaus im Bereich des Möglichen (z. B. Ando et al., 1999).

Hauptziel dieser interdisziplinären und durch die Ethikkommission genehmigten Studie war es aus humanen Lymphozyten, Mundschleimhaut- und Haarfollikelzellen Genexpressionsmarker zu validieren, welche möglicherweise auf die Gabe von anabolen Substanzen (hier Testosteron und Clenbuterol) schließen lassen, um diese ergänzend mit einem geeigneten Tierversuch zu untermauern.

Das Projekt gliederte sich in die folgenden Fragestellungen:

- Etablierung einer adäquaten und hinreichenden Zellisolation und RNA-Extraktion für real-time qRT-PCR Analysen aus humanen Lymphozyten, Haarfollikelzellen und Mundschleimhautepithelzellen;
- Erstellung von Genexpressionsmustern in Haarfollikeln;
- Lymphozyten- und Mundschleimhautzellkultur zur Testung missbräuchlich verwendeter Substanzen (Testosteron, Clenbuterol) und anschließender Analyse von Genexpressionsmustern mit mindestens 20 Kandidatengenen in Abhängigkeit der Hormonbehandlung und körperlichen Aktivität;
- Tierexperimenteller Ansatz: kontrolliertes Ratten-Laufmodell mit subkutaner Applikation adäquater pharmakologischer Hormonmengen.

Methoden

Zellkultur

Alle Zellkulturen wurden gemäß den Herstellerangaben bzw. in Standardmedien kultiviert:

- Hair follicle dermal papillae cells (HFDPC): Cell Applications San Diego, USA;
- Mundschleimhautzellen BICR10 (ECACC): Salisbury, UK;
- Periphere Mononukleäre Blutzelle (PMBC): in MCDB 153 (Biochrom) plus 10 % FBS (Biochrom);
- Humane Mundschleimhautzellen: in MCDB 153.

Die Vitalität und die Proliferation der Zellkulturen wurden mittels WST1- (Fa. Roche) bzw. Kristallviolettassay überprüft. Die Zellgewinnung erfolgte bei den PMBC durch Dichtezentrifugation und bei den Mundschleimhautzellen durch Abschilferung mittels sterilen Zytobürsten.

Tierversuch

Initial wurden 112 männliche Wistarratten (> 350 g) nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase in vier Gruppen aufgeteilt: sitzend+Testosteron, Bewegung+Testosteron, nur sitzend oder nur Bewegung. Alle Bewegungsgruppen erhielten ein Standardbewegungsprogramm von 2 Std. pro Tag. Die Applikation des Testosterons erfolgte subkutan (1.0 mg/kg BW). Jeweils in den Zeitabständen 0 h, 6 h und 24 h wurden je Gruppe acht Tiere mit CO₂ narkotisiert und mittels Dekapitation euthanisiert. Die PMBC wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen.

RNA-Gewinnung und RT-PCR

Die Gesamt-RNA-Isolation der Zell- und Gewebeproben erfolgte mittels Trifast (Fa. Peqlab). Die RNA wurde anschließend am Nanodrop (Fa. Peqlab) quantifiziert und auf Verunreinigungen überprüft. Die genspezifische Amplifizierung mittels realtime PCR wurde am RotorGene (Fa. Corbett) unter Verwendung des SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qPCR Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Pro Probe und Reaktionsansatz wurden 10 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

Gene Array

Um erste Kandidatengene für die PCR aufzuzeigen, welche möglicherweise durch Testosteron moduliert werden, kamen zwei Standard Gene Arrays mit unterschiedlichen Zielgenen zum Einsatz. (Inflammation und Breast Cancer DualChip Array, Fa. Eppendorf).

Ergebnisse

Um auf zellphysiologischer Ebene Veränderungen durch die Hormonapplikation nachzuweisen, wurden alle Zellkulturen auf Ihre Proliferationskapazität und mitochondriale Aktivität überprüft. Weder für die Mundschleimhaut-, die Haarfollikel- noch die Blutzellen ließen sich signifikante Änderungen, bezogen auf die Vitalität und die Proliferation, durch Testosteron oder Clenbuterol nachweisen.

Im Zuge der RNA-Isolation aus den nativen Mundschleimhautzellen deutete sich eine deutliche Verunreinigung durch bakterielle RNA an, die zum Ausschluss der Proben für die weiteren Untersuchungen führte. Ebenso eignete sich die native Haarfollikelkultur aufgrund der sehr geringen Zellausbeute nicht für die nachfolgenden Untersuchungen. Diese Umstände führten dazu, dass die nativen Zellkulturen aus der Mundschleimhaut (BICR10) und den Haarfollikeln (HFDPC) durch Permanentkulturen ersetzt wurden.

Ein Screeningverfahren mittels Gene Array in den BICR10 als auch PMBC Kulturen zeigte eine Vielzahl an potenziellen Genen auf, die möglicherweise durch Testosteron in ihrer Expressionshöhe moduliert wurden. Tab. 1 zeigt eine Zusammenstellung möglicher Kandidatengene aus den getesteten Zellkulturen.

Tab. 1. *Genexpressionsvergleich (in Vielfachen) zwischen Kontrolle und 6h Testosteron (0,1 μ M). Aufregulation = positive Werte, Abregulation = negative Werte.*

BICR10		PMBC	
Gene	Regulation	Gene	Regulation
BCL2	3,3754	IGFBP1	-186,0581
SERBP1	-2,0924	CAV1	-163,0767
VLDLR	4,5515	IGFBP3	-145,3588
SOX9	3,5449	CTGF	-102,5798
VWF	3,4535	S100A8	101,0569
KRT17	-2,1754	CD2	106,0412
KRT8	-1,3997	IL1B	159,9258
MMP11	3,3255	CCL7	212,9581
MMP2	-1,549	CCL8	645,0854
CAV1	-1,9389		
CD44	-1,5809		
PHYH	4,127		
VEGFa	3,2505		
FGF2	3,3088		
FGF8	3,8998		
TP53BP2	3,5152		
CTSB	-1,8561		
NME1/ NME2	-3,7089		
ODC1	-1,4476		
PCNA	-1,5813		
ST13	3,2178		
YBX1	-5,2225		
IL6	3,2859		

Die semiquantitative Verifizierung ausgewählter Kandidatengene erfolgte mittels realtime PCR und den entsprechenden genspezifischen Primern. Hierbei konnte für die Haarfollikelzellen gezeigt werden, dass Kandidatengene aus dem Bereich des Endokrins und der Wachstumsfaktoren unter einem signifikanten Einfluss der Testosteronbehandlung standen: positiv reguliert waren Androgen Rezeptor, FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) und FGF-7 (1 nM), eine negative Regulation zeigten

Growth Hormon Receptor und FGF-7(100 nM). Im Falle der Mundschleimhautzellen konnten mittels dreifaktorieller ANOVA ebenfalls signifikante Behandlungseffekte gezeigt werden. Die Effektgrößen waren hier vornehmlich die Hormone selbst und nicht so sehr deren Konzentrationen. Auch hier zeigte FGF-2 als auch CAV1 (Caveolin 1) einen signifikanten Gruppenunterschied zwischen der Clenbuterol- und der Testosteronbehandlung als auch zwischen der Clenbuterolbehandlung und den Kontrollproben. Auch das peroxisomale Protein PHYH, welches phytanoyl-CoA zu 2-hydroxyphytanoyl-CoA umwandelt, wies einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und der Testosteronbehandlung auf.

Im Fall der nativen humanen PMBC konnte neben Hormon- und Zeiteffekten ein zusätzlicher Einfluss des Blutabnahmezeitpunktes im zeitlichen Verhältnis zu einer standardisierten Belastung für die Gentranskripte von CCL7 und CD2 gezeigt werden (Tab. 2)

Tab. 2. *Genregulation in kultivierten peripheren mononuklearen Blutzellen in Abhängigkeit prae / post Belastung, Kulturdauer und Hormonbehandlung.*

GeneID	Abnahme prae vs post Belastung	Kulturdauer 0 h vs. 6 h 0 h vs. 24 h	Behandlung Clenbuterol, Testosteron und Kontrolle
CAV1	-	-	-
CCL7	p = 0,011	6h vs. 24h: p < 0,001 0h vs. 24h: p < 0,001	
CCL8	-	-	-
IL 1b	-	6h vs. 24h: p < 0,001 0h vs. 24h: p < 0,001	-
CD2	p = 0,04	-	-
MDH1	-	-	-
S100A8	-	-	Nur Post Belastung Clen vs. Kontr.: p = 0,002 Clen vs. Testo.: p = 0,01

Im abschließenden Tierversuch konnte gezeigt werden, dass binnen 6 Stunden nach der Testosteron-Applikation eine signifikante Reduktion der Androgenrezeptor-Expression in den PMBCs erfolgte. Diese Reduktion des Androgenrezeptors war primär unabhängig von der chronischen Belastung, d. h. sowohl sitzende als trainierende Ratten zeigten diese Genexpressionsmodulation.

Diskussion und Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass unter Berücksichtigung der Zellsolation und körperlicher Belastung das Genexpressionsscreening eine potenzielle Methode zur Stütze klassischer Analyseverfahren in der Dopinganalytik darstellen könnte.

Sowohl in der Mundschleimhaut als auch in peripheren Blutzellen lassen sich potenzielle Kandidatengene zeigen, welche auch schon von anderen Autoren als hormonsensitiv beschrieben wurden (Whitaker et al., 1997; Nehse & Tunn, 1994; Ojanotko-Harri, 1992). In Hinblick auf eine praktische Anwendung als Screeningmethode in der Dopinganalytik sind die Mundschleimhautzellen aufgrund der Gefahr einer Verunreinigung durch bakterielle RNA wohl eher ungeeignet.

Die differenzierte Geneexpression in Abhängigkeit des applizierten Hormons (Testosteron bzw. Clenbuterol) zeigt an, dass hier mit Kreuzeffekten zu rechnen, was mit einem androgenabhängiger Immunresponse zu vergleichen ist (Bebo et al., 1999). Weiterhin darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Ergebnisse der Blutzellkulturen mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Belastungseinfluss vermuten lassen, gleichwohl die PMBC mehrere Stunden nach der Belastung ex vivo kultiviert wurden.

Diese Vermutung eines potenziellen Belastungseinflusses wird durch die in vivo Studien bekräftigt, denn der initiale Abfall der Androgenrezeptor-Expression kehrt sich zunächst in der Gruppe der aktiven Ratten um. Diese mögliche Belastungsabhängigkeit wurde unter anderem auch von Kawai et al. (2007) und Radom-Aizik et al. (2009) gezeigt. Darüber hinaus wurde der Androgen Rezeptor in den Blutzellen der Ratte durch die Testosterongabe reprimiert, was auch durch andere Autoren sowohl im Humansystem als auch bei der Maus gezeigt werden konnte (vgl. Sader et al., 2005, „...in Maus und Mensch...“, Roberts et al., 2009, „...in jungen und älteren Männern...“).

Aufgrund der komplexen zellulären Zusammenhänge zwischen körperlichen Belastungen und einer Hormongabe sind auf jeden Fall weitere standardisierte Untersuchungen erforderlich. Darüber hinaus müssen auch mögliche epigenetische Einflussfaktoren, wie bspw. DNA-Methylierung, mit in die Diskussion einbezogen werden.

Literatur

- Ando, Y., Yamaguchi, Y., Hamada, K., Yoshikawa, K., & Itami, S. (1999). Expression of mRNA for androgen receptor, 5alpha-reductase and 17b-hydroxysteroid dehydrogenase in human dermal papilla cells. *The British journal of dermatology*, 141 (5), 840-845.
- Bebo, B.F. Jr, Schuster, J.C., Vandenbark, A.A. & Offner, H. (1999) Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. *Journal of immunology*, 162 (1), 35-40.
- Danyi, S., Degand, G., Duez, C., Granier, B., Maghuin-Rogister, G. & Scippo, M.L. (2007). Solubilisation and binding characteristics of a recombinant beta2-adrenergic receptor expressed in the membrane of Escherichia coli for the multianalyte detection of beta-agonists and antagonists residues in food-producing animals. *Analytica chimica acta*, 589 (2), 159-65.
- Hartel, A., Didier, A., Pfaffl, M.W. & Meyer, H.H.D. (2003). Characterisation of gene expression patterns in 22RV1 cells for determination of environmental androgenic/antiandrogenic compounds. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 84 (2-3), 231-238.
- Kawai, T., Morita, K., Masuda, K., Nishida, K., Sekiyama, A., Teshima-Kondo, S., Nakaya, Y., Ohta, M., Saito, T. & Rokutan, K. (2007). Physical exercise-associated gene expression signatures in peripheral blood. *Clinical journal of sport medicine*, 17 (5), 375-383.
- Kim, C.D., Lee, M.H. & Roh, S.S. (2003). Identification of androgen-regulated genes in SV40-transformed human hair dermal papilla cells. *Journal of dermatological science*, 32 (2), 143-149.
- Lachgar, S., Charveron, M., Sarraute, J., Mourard, M., Gall, Y. & Bonafe, J.L. (1999). In vitro main pathways of steroid action in cultured hair follicle cells: vascular approach. *The journal of investigative dermatology. Symposium Proceedings*, 4 (3), 290-295.
- Meyer, H.H.D. (2001). Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. *APMIS*, 109, 1-8.
- Nehse, G. & Tunn, S. (1994). Androgen and progesterone receptors in oral carcinoma. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery*, 22 (2), 114-119.
- Ojanotko-Harri, A., Forssell, H., Laine, M., Hurttia, H., Bläuer, M. & Tuohimaa, P. (1992). Immunohistochemical detection of androgen receptors in human oral mucosa. *Arch Oral Biol*, 37 (6), 511-514.
- Radom-Aizik, S., Zaldivar, F. Jr, Leu, S.Y. & Cooper, D.M. (2009). A brief bout of exercise alters gene expression and distinct gene pathways in peripheral blood mononuclear cells of early- and late-pubertal females. *Journal of applied physiology*, 107 (1), 168-175.
- Roberts, M.D., Dalbo, V.J., Hassell, S.E. & Kerksick, C.M. (2009). The expression of androgen-regulated genes before and after a resistance exercise bout in younger and older men. *Journal of strength and conditioning research*, 23 (4), 1060-1067.

- Sader, M.A., McGrath, K.C., Hill, M.D., Bradstock, K.F., Jimenez, M., Handelsman, D.J., Celermajer, D.S. & Death, A.K. (2005). Androgen receptor gene expression in leucocytes is hormonally regulated: implications for gender differences in disease pathogenesis. *Clinical endocrinology*, 62 (1), 56-63.
- Scippo, M.L., Argiris, C., Van De Weerd, C., Muller, M., Willemsen, P., Martial, J. & Maghuin-Rogister, G. (2004). Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378 (3), 664-669.
- Whitaker, S.B., Vigneswaran, N. & Singh, B.B. (1997). Androgen receptor status of the oral sebaceous glands. *The American Journal of dermatopathology*, 19 (4), 415-418.

Eigene Publikationen im Rahmen des Projekts

- Reiter, M., Pfaffl, M.W., Schönfelder, M. & Meyer, H.H. (2008). Gene expression in hair follicle dermal papilla cells after treatment with stanozolol. *Biomarker insights*, 4, 1-8.
- Schönfelder, M., Reiter, M., Pfaffl, M., Meyer, H.H.D., Kwiatkowska, D., Müller, R.K. & Oberhoffer, R. (2009). Genexpressionsscreening als unterstützende Methode in der klassischen Doping-Analytik. 41. Deutscher Sportärztekongress der DGSP am 24.-26 September 2009 in Ulm. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 60 (7-8), 196.