

Neuberger E, Simon P

Auf der Suche nach geeigneten Nachweismethoden für Doping – das Transkriptom

In Search of Efficient Detection Methods for Doping – Transcriptomic Research

Abteilung Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

ZUSAMMENFASSUNG

Um den Missbrauch leistungssteigernder Substanzen und Methoden einzuschränken und die Gesundheit von Sportlern zu schützen, bedarf es fortschrittlicher Nachweismethoden. In den letzten Jahren wurde vor allem die Entwicklung indirekter Nachweismethoden vorangetrieben. Bei der Betrachtung ausgewählter biologischer Marker, die in Relation zu einer Referenzpopulation analysiert werden, können Unregelmäßigkeiten festgestellt werden, die indirekt Hinweise auf die Verwendung verbotener Substanzen und Methoden geben. In dieser Übersichtsarbeit werden Transkriptom-spezifische Marker sowie deren Analysemethoden vorgestellt. In einer Reihe von Studien wurde der Einfluss von Doping auf das RNA Profil evaluiert und es konnten potenzielle Marker in Form von Boten RNA (mRNA) oder Mikro-RNA (miRNA) entdeckt werden. Um in weiteren Schritten zu prüfen, ob die Kandidaten als Biomarker in Betracht gezogen werden können, muss deren Qualifikation geprüft und in unterschiedlichen Kollektiven verifiziert werden. In diesem Zusammenhang müssen natürlich auftauchende Schwankungen der Biomarker, sowie mögliche Störeinflüsse berücksichtigt und unter standardisierten Bedingungen in großen Kollektiven getestet werden. Das Wissen um das Transkriptom, dessen Funktion und Regulation ist derzeit noch in einem frühen Stadium. Aufgrund der zügig voranschreitenden Forschung und der Verfügbarkeit verbesserter Messtechnologien ist es absehbar, dass weitere potentielle RNA Marker identifiziert werden. Nach einer arbeitsintensiveren Validierung könnten RNA Marker für sich, oder in Kombination mit anderen Biomarkern, die Sensitivität indirekter Dopingnachweise erhöhen.

Schlüsselwörter: indirekte Nachweise, RNA, verbotene Substanzen und Methoden, Doping im Sport

EINLEITUNG

Aus der Geschichte des Sports geht hervor, dass die Verwendung leistungssteigernder Substanzen enorme Vorteile für die Athleten bringen kann, die über Sieg oder Niederlage entscheiden (6). Um den Missbrauch leistungssteigernder Substanzen zu unterbinden, kontrolliert und harmonisiert die 1999 gegründete Welt Anti-Doping Agentur (WADA) den Kampf gegen Doping. Unter anderem erstellt und aktualisiert die WADA jährlich eine Verbotliste; sie erforscht, etabliert und verbessert Testsysteme und führt regelmäßige Dopingkontrollen durch. Trotz der Bemühungen hat sich der relative Anteil positiv getesteter Sportler von 1985 bis 2012 nicht erhöht und liegt weit unter der geschätzten Prävalenz (51). Diese lässt sich durch retrospektive Analysen von Proben (42), aufgrund positiver Befunde bei der Verwendung verbesserter Testsysteme (40) sowie durch indirekte Befragungen (8,44) schätzen. Die niedrige Erfolgsquote der Tests ergibt sich unter anderem durch die

SUMMARY

The development of sophisticated detection methods is prerequisite to prevent the abuse of performance enhancing substances and hence to protect the health of athletes, the development of sophisticated detection methods is a prerequisite. In recent years, the development of indirect detection methods has been of particular interest. By monitoring selected biological markers in athletes longitudinally, regarding population based thresholds, it is possible to indirectly detect differences which indicate potential substance abuse. This review describes transcriptomic biomarkers and corresponding analytical methods. The influence of doping on the RNA expression profile has been evaluated in a number of studies and potential messenger RNA (mRNA) and microRNA (miRNA) markers have been discovered. In order to determine whether the suggested RNAs can be considered as biomarkers, their qualification needs to be established and must be verified in larger and different populations. Therefore, naturally occurring variations of the biomarkers and confounding factors need to be considered and have to be tested under standardized conditions in different populations. Knowledge about the transcriptome, its regulation and function is in its early stages. However, with regard to the fast growing knowledge and the availability of improved detection technologies, novel potential RNA biomarkers will be identified. More labor-intensive validation is needed to check whether these biomarkers could increase the sensitivity of indirect detection approaches, either independently, or in combination with other biomarkers.

Key Words: indirect detection, RNA, prohibited substances and methods, doping in sports

Verwendung immer geschickterer Dopingprotokolle, die es ermöglichen, die jeweils aktuellen Testsysteme zu unterlaufen. Besonders schwierig ist der Nachweis von Substanzen, die ähnlich oder identisch zu körpereigenen Substanzen sind und eine kurze Halbwertszeit aufweisen. Dazu zählen pharmazeutisch produzierte, rekombinant hergestellte Erythropoietine (rEPOs), Wachstumshormone, wie Growth Hormone (GH), oder der Insulinähnliche Wachstumsfaktor 1 (rIGF1), oder endogene anabol-androgene Steroide. Weitere Herausforderungen stellen sich durch „Designersubstanzen“, die extra für Dopingzwecke entwickelt wurden und u.U. nicht ins Analysespektrum fallen (46).

accepted: July 2014

published online: October 2014

DOI: 10.5960/dzsm.2014.140

Neuberger E, Simon P: Auf der Suche nach geeigneten Nachweismethoden für Doping – das Transkriptom. Dtsch Z Sportmed. 2014; 65: 272-278.

Tabelle 1: Vor- und Nachteile direkter bzw. indirekter Nachweisverfahren.

Nachweismethode	Direkt Nachweis	Indirekter Nachweis (Grenzwert basiert)	Indirekter Nachweis (Biologischer Pass)
Vorteile	Nachweis verbotener Substanzen oder deren Stoffwechselprodukte lässt eindeutig auf Doping schließen (hohe Spezifität).	Gesetzte Obergrenzen schränken den Substanzmissbrauch ein.	Betrachtung der Marker im Längsschnitt (relativ zu populationsbasierten Grenzwerten); erhöht die Sensitivität und schränkt den Substanzmissbrauch ein.
Nachteile	<p>Testsystem muss für jede Substanz etabliert werden.</p> <p>Unbekannte „Designersubstanzen“ sind nicht nachweisbar.</p> <p>Halbwertszeit der Substanz oder der Metaboliten begrenzt die Nachweisbarkeit.</p>	<p>Obergrenzen können natürlicherweise überschritten werden.</p> <p>Sportler können an eine Obergrenze „herandopen“.</p> <p>Faktoren wie Alter, Geschlecht, genetischer Hintergrund müssten berücksichtigt werden.</p>	<p>Für jeden Marker müssen mögliche Störgrößen evaluiert werden.</p> <p>Sensitivität u.U. nicht ausreichend, um mikro-dosiertes Doping zu detektieren.</p>

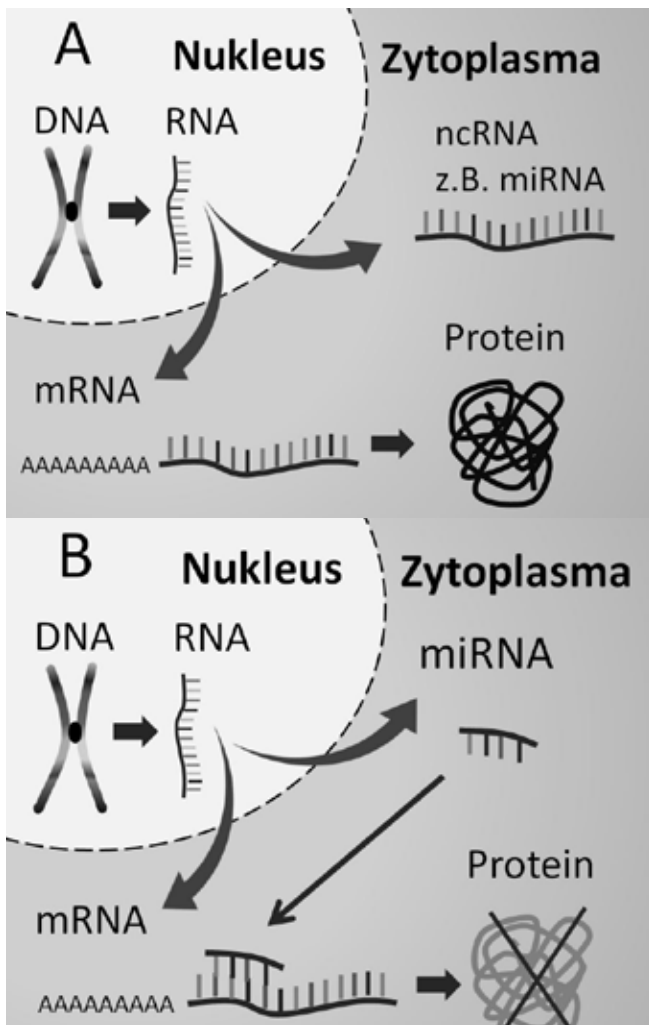


Abbildung 1: A. DNA wird in RNA transkribiert. Weniger als 2% der Transkripte sind proteinkodierende Boten RNA (mRNA). B. Etwa 90% der mRNA werden über die Bindung von Mikro-RNA (miRNA) feinreguliert. Bei exakter Übereinstimmung der Basenpaarung zwischen miRNA und mRNA wird die Ziel mRNA zerschnitten. Bei einer nicht perfekten Basenpaarung wird die Translation gehemmt.

von Obergrenzen hat jedoch Nachteile im Vergleich zu anderen Nachweisverfahren (siehe Tab. 1).

Deshalb wurde 2007 die Verwendung eines statistischen Verfahrens vorgeschlagen, das es ermöglicht, ausgewählte biologische Parameter eines Athleten im Längsschnitt zu betrachten und diese mit populationsbasierten Grenzwerten zu vergleichen. Dabei werden Faktoren wie Alter, Geschlecht und ethnische Zugehörigkeit in die Analyse mit einbezogen, wodurch sich die Sensitivität des indirekten Nachweisverfahrens erhöht (38). Dieses Modell legt die Grundlage für den von der WADA eingeführten Biologischen Pass, der derzeit verwendet wird um Blutdoping, anhand auffälliger hämatologischer Parameter, nachzuweisen (39).

Das adaptive Modell des Biologischen Passes kann um weitere Parameter bzw. Biomarker ergänzt werden, um die Sensitivität des Verfahrens zu erhöhen. Die Biomarkerforschung ist durch eine ständig wachsende Technik und Methodenvielfalt geprägt, die es ermöglicht, Biomarker aus den verschiedensten Bereichen zu analysieren. Dazu gehören das Genom, das Epigenom, das Transkriptom und das Proteom, aber auch denkbar viele weitere Bereiche, wie das Metabolom inklusive des Lipidoms. In einigen dieser Bereiche wurde bereits eine Reihe möglicher Marker vorgeschlagen (zusammengefasst in (33,34)).

In dieser Übersichtsarbeit werden explizit Transkriptom-spezifische Biomarker betrachtet und deren mögliche Anwendung in der Dopinganalytik diskutiert. Nach einer kurzen Einführung in das Transkriptom und in typische RNA Analysemethoden, wird der Stand der RNA Biomarkerforschung vorgestellt und es werden Möglichkeiten und Schwierigkeiten diskutiert, die im Prozess der Qualifikation, also der Eignung von RNA Molekülen als zuverlässige Doping-Biomarker, auftauchen.

DAS TRANSKRIPTOM UND RNA ANALYSEMETHODEN

Im Gegensatz zu der Gesamtheit der DNA (Genom) ist das Transkriptom, also die Gesamtheit der RNA Molekülen, sehr variabel und wird von einer Reihe äußerer und innerer Faktoren, wie etwa Krankheiten oder Medikamente beeinflusst. Aufgrund dieser Tat-

Tabelle 2: Vergleich typischerweise genutzter Methoden zur Bestimmung Transkriptom-spezifischer Biomarker.

	Micro-arrays	RNAseq	qRT-PCR	qRT-PCR Arrays
Bestimmung neuer RNA	Nein	Ja	Nein	Nein
Durchsatz	+++	+++	+	++
Sensitivität	+	++	+++	+++
Reliabilität	+	++	+++	+++
Dynamischer Messbereich	+	++	+++	+++
Bioinformatisches Wissen erforderlich	++	+++	+	+
Kosten	€	€€€	€€	€€

sache wurde vorgeschlagen Transkriptom-spezifische Biomarker zu bestimmen, die Hinweise auf Krankheiten sowie deren Verlauf liefern können (20).

Lange Zeit wurde angenommen, dass RNA Transkripte hauptsächlich dazu dienen in Proteine umgeschrieben zu werden (siehe Abb. 1A). Dementsprechend hielt man in unserem Genom, im Wesentlichen die proteinkodierenden Bereiche für relevant und die restlichen Bereiche wurden als „Junk“ DNA abgetan. Die Erforschung des Transkriptoms während der letzten Dekade hat jedoch gezeigt, dass weniger als 2% des Transkriptoms aus kodierender mRNA (Boten RNA) besteht (5,27). Etwa 98% der RNA Moleküle sind sogenannte non-coding RNA (ncRNA), die weitläufig in kurze ncRNA (sncRNA) mit einer Länge von <200 Basenpaaren (bp) sowie lange ncRNA (lncRNA) >200 bp unterschieden werden. ncRNAs haben vielseitige und wichtige biologische Funktionen und ihre Verwendung als Biomarker wird intensiv untersucht (47). Die am besten erforschten ncRNA sind micro RNA (miRNA). Diese kurzen RNA Moleküle (~19-23 Nukleotide) können an mRNA binden und behindern dadurch den Umschrieb der mRNA zu Protein oder bedingen die Degradation der mRNA (siehe Abb. 1B). miRNA stellen somit einen wichtigen Baustein der post-transkriptionellen Genregulation dar und es wird geschätzt, dass etwa 90% der menschlichen Gene von miRNA feinreguliert werden (21). Die Zahl bekannter, reifer miRNA im Menschen hat sich in den letzten drei Jahren verdoppelt und beträgt mittlerweile 2555 (MirBase Release 20 (12)). Um die RNA Expression zu bestimmen, werden derzeit vorwiegend drei Methoden genutzt. Dazu zählen quantitative reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR), DNA Microarrays sowie die RNA Sequenzierung (RNAseq). Microarrays stellten die erste molekularbiologische Methode dar, um die Expression tausender Gene gleichzeitig relativ kostengünstig zu messen und werden bis heute intensiv im Bereich der Biomarker Forschung verwendet. In den letzten Jahren rückt vermehrt das RNAseq in den Vordergrund der Transkriptom-Analysen. Das RNAseq ist eine sich noch immer weiter entwickelnde Technologie (25). Sie besitzt jedoch einige Vorteile gegenüber anderen verwendeten Methoden (siehe Tab. 2).

Im Gegensatz zu den hybridisierungsbasierten Microarrays, wird die Menge der Moleküle direkt über Sequenzierung bestimmt. Dies hat den großen Vorteil, dass nicht nur bekannte, sondern potenziell auch neue Sequenzen detektiert werden können. Weiter weist das RNAseq einen erweiterten Messbereich auf und besitzt eine höhere Zuverlässigkeit bezüglich der Messergebnisse. Sinkende Kosten für das RNAseq erhöhen weiterhin dessen Attraktivität (30). Um die Ergebnisse von Microarray Studien zu validieren,

bleibt die qRT-PCR noch immer der Goldstandard. Die qRT-PCR ist eine sehr gut etablierte Methode und die Ergebnisse gelten als reliabel, insofern die geltenden Standards eingehalten werden (4). Ein Nachteil der qRT-PCR ist der geringe Durchsatz. In den letzten Jahren wurden von einigen Anbietern Produkte wie vorgefertigte qRT-PCR Arrays auf den Markt gebracht, mit denen in einem Versuch die Expression hunderter mRNA oder miRNA gemessen werden kann (30). Ungeachtet der Messtechnologie und der gewählten biologischen Probe aus der die RNA stammt, muss die Qualität des Probenmaterials untersucht werden und gegeben sein, da insbesondere der Zustand der RNA Integrität die Messergebnisse maßgeblich beeinflusst (2).

RNA BIOMARKER ZUR DOPINGDETEKTION

Nach dem gleichen Prinzip nach dem Transkriptom-spezifische Biomarker genutzt werden, um Hinweise auf Krankheiten sowie deren Verlauf zu finden, werden Transkriptom-spezifische Biomarker gesucht, um Indizien für den Missbrauch von Dopingsubstanzen zu erhalten (siehe Tab. 3). Um den Effekt von Dopingsubstanzen bei gesunden sportlichen Probanden zu testen, können aus ethischen Gründen keine Substanzen verwendet werden, deren Sicherheit nicht durch zuständige Behörden bestätigt wurde. Für nicht zugelassene Substanzen lässt sich somit kein dopingspezifisches RNA Profil im Menschen etablieren. Weiter müssen für die RNA Analyse biologische Probenmaterialien ausgewählt werden, die im Sinne von Dopinganalysen, minimalinvasiv gewonnen werden können.

MRNA ANALYSEN AUS VOLLBLUT UND BLUTBESTANDTEILEN

Peripheres Blut oder Zellbestandteile wie mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) sind eine zweckdienliche Quelle für genetisches Material. Es ist minimal invasiv in ausreichenden Mengen zu erhalten und enthält die RNA von etwa 80% aller proteinkodierender Gene und somit aller theoretisch im Körper anzureichender proteinkodierender mRNAs (16). Im Bereich der Dopingnachweise wurde das Blut-Transkriptom in einigen Human- und Tierstudien zum Nachweis von ESA Doping (1, 17, 48, 49), Blutdoping (29), Wachstumshormon Doping (22, 45) und Doping mit anabolen Substanzen (13, 37, 41) in Betracht gezogen.

Um einen Einblick über den Einfluss von rEPO auf das Bluttranskriptom gesunder Probanden zu erhalten, untersuchten

Tabelle 3: Humanstudien zur Bestimmung Transkriptom-spezifischer Biomarker zum Dopingnachweis.

WADA Verbotklasse	Autoren, Jahr	Kollektiv	RNA-Typ, Probenmaterial	Methoden	Quelle
S1.1. Anabol androgene Substanzen	Schönfelder et al., 2011	Gesunde Probanden	mRNA, Vollblut	Microarray, qRT-PCR	(41)
	Pitsiladis et al., 2014	Gesunde Probanden	mRNA, Vollblut	Microarray	(28)
S2.1. Erythropoese stimulierende Substanzen	Leuenberger et al., 2011	Gesunde Probanden	miRNA, Plasma	Microarray, qRT-PCR	(14)
	Marie-Varlet et al., 2009	Gesunde Probanden	mRNA, Vollblut	SAGE, qRT-PCR	(48)
	Marie-Varlet et al., 2004	Gesunde Probanden	mRNA, Vollblut	qRT-PCR	(49)
	Magnani et al., 2001	Gesunde Probanden	mRNA, Vollblut	qRT-PCR	(17)
S2.4. Wachstums- hormon	Kelly et al., 2012	Gesunde Probanden, Akromegalie- und GH-Defizienz Patienten	miRNA, Plasma	Microarray, qRT-PCR	(11)
	Mitchell et al., 2009	Gesunde Probanden	mRNA, PBMCs	Microarray, qRT-PCR	(22)
M3. Autologes Blutdoping	Leuenberger et al., 2013	Gesunde Probanden	miRNA, Plasma	qRT-PCR Array, qRT-PCR	(15)
	Pottgiesser et al., 2009	Gesunde Probanden	mRNA, Lymphozyten	Microarray, qRT-PCR	(29)

Varlet-Marie et al. (2009) Genexpressionsunterschiede gepoolter Vollblutproben von 14 gesunden Probanden vor, während und nach vierwöchiger Gabe von rEPO mittels SAGE (48). 95 potenzielle Marker-Gene wurden bestimmt und mittels RT-qPCR in einem Folgeversuch mit 2 Probanden im Längsschnitt analysiert. Die Probanden erhielten über einen Zeitraum von 11 Tagen hohe Dosen rEPO (260 IU/kg) und anschließend für 22 Tage Mikrodosierungen rEPO. Die Analyse der Gene im Zeitverlauf ergab, dass die Expression von 33 Genen während der hohen rEPO Dosierung in beiden Probanden anstieg. 5 dieser Gene blieben auch während des Zeitraums der Mikrodosierungen erhöht und könnten als potenzielle Marker in Betracht gezogen werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Gene lediglich leichte Anstiege aufwiesen und während der Phase der Mikrodosierung unregelmäßig schwankten. Es müsste in größeren Probandenkollektiven geprüft werden, wie sich die intra-individuelle Schwankung der Genexpression der Marker verhält und ob die intra-individuelle Variation der Genexpression größer als der dopingbedingte Effekt ausfällt. In einer Studie von Mitchell et al. (2009) wurde diese Problematik aufgegriffen (22). Im Rahmen der Untersuchung erhielten 7 männliche und 13 weibliche Probanden täglich 2mg GH über einen Zeitraum von 8 Wochen. Mittels Agilent Microarrays wurde der Einfluss auf das PBMC Transkriptom untersucht. Es zeigte sich, dass der Effekt von GH zu geringfügigen Expressionsänderungen führte, die im Bereich der intra-individuellen Varianz lagen, wodurch sich keine aussagekräftigen Marker bestimmen ließen. 2011 untersuchten Schönfelder et al. die Vollblut mRNA Genexpression ausgewählter Gene von insgesamt 19 männlichen Probanden, von denen 8 Probanden 3 mal 1,5mg/kg Testosteron-Gel appliziert wurde (41). Ziel war es, neben der Bestimmung von Biomarkern, Kreuzeffekte von exogener Testosteron Applikation, Sport und zirkadianer Rhythmik zu bestimmen. Mittels RT-qPCR wurde die Expression 9 ausgewählter Referenzgene sowie 14 zuvor bestimmter Zielgene überprüft. Sowohl bei 8 von 9 Referenzgenen als auch 13 von 14 Zielgenen wurden die Expression durch den Einfluss von Sport und/oder durch die zirkadiane Rhythmik beeinflusst. Dadurch konnte der Effekt der Genexpression nicht eindeutig dem Doping zugeschrieben werden, weswegen die Einflussfaktoren gegeneinander abgegrenzt werden müssten.

Insbesondere die Analyse des Bluttranskriptoms wird durch eine Reihe von Störgrößen erschwert. Blut ist ein hoch komplexes Probenmaterial mit einer Vielzahl verschiedener Zellen, die sich sehr dynamisch verhalten und deren Transkriptom durch eine Reihe von Faktoren beeinflussbar ist. Neben dem genetischen Hintergrund, Geschlecht und Alter wird die Genexpression durch eine Vielzahl möglicher äußerer Einflüsse wie etwa zirkadiane Rhythmik, Sport, Ernährung, Krankheit, dem Menstruationszyklus und so weiter beeinflusst (zusammengefasst in (26)). Diese Einflüsse erschweren zum einen die Suche von Biomarkern, da der dopingbedingte Effekt durch die Blutzellzusammensetzung oder die Reaktion auf externe Einflüsse überdeckt sein könnte. Weiter könnten die Faktoren jeweils für sich oder in Summe auf die Genexpression der potenziellen Marker einwirken und somit eine eindeutige Zuordnung der Marker zum einem Dopingvergehen erschweren.

Jüngst wurde in einer Veröffentlichung auf vielversprechende Ergebnisse zur Bestimmung von mRNA Biomarkern für den Nachweis von rEPO Doping aus Vollblut hingewiesen (28). 39 Ausdauertrainierte gesunden Probanden erhielten für 4 Wochen Injektionen an rEPO. Die Studie war zwei geteilt wobei 19 Kaukasier unter Meereshöhe Bedingungen und 20 Kenianer unter moderaten Höhenbedingung (2100-2800 über Meereshöhe) behandelt wurden. In beiden Kollektiven zeigte sich, dass eine Vielzahl von Genen anstieg. Einige der Gene zeigten bereits Anstiege nach der ersten Injektion an rEPO, weitere blieben im Verlauf der 4 Wochen erhöht. Die präsentierten Ergebnisse der Studie geben den bis dato stärksten Hinweis darauf, dass mRNA Signaturen indirekt auf Doping bzw. rEPO Doping hindeuten können. In einer Folgestudie, im Rahmen derer rEPO mikrodosiert verwendet wird, soll sich zeigen inwieweit die Genexpressionsänderungen relativ zu Veränderungen der Retikulozyten im Blut stehen und ob bzw. welche Marker auf mikrodosiertes rEPO hindeuten könnten.

MIRNA ANALYSEN AUS PLASMA

In den letzten Jahren sind ncRNA in den Vordergrund der Biomarkerforschung gerückt, wobei zirkulierenden miRNAs aus Plasma

und Serum ein besonderes Forschungsinteresse galt. Dies liegt unter anderem daran, dass miRNA in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten wie Plasma, Serum, Urin oder Speichel vorhanden sind (7) und sich als sehr stabil gegenüber externen Einflüssen im Rahmen der Probenverarbeitung zeigten (23).

Im Bereich der Dopinganalytik wurden vorrangig zirkulierende miRNAs aus dem Plasma in Augenschein genommen, um hierdurch eventuell Hinweise auf ESA Doping (14), autologes Blutdoping (15) oder Wachstumshormon-Doping zu erhalten (11). 2011 untersuchten Leunenberger et al. den Einfluss einer einmaligen Injektion von 200 µg MIRCERA® auf das miRNA Plasma-Profil gesunder Probanden. Bei MIRCERA (Markenname für „Continuous Erythropoietin Receptor Activator“, oder CERA) handelt es sich um ein ESA der dritten Generation, dessen Halbwertszeit im Körper über die Anheftung eines Pegylierungspolymers erhöht wird. Die Analyse der Proben zweier Probanden mittels Agilent Microarray zeigte die höchste Expressionsänderung für miR-144. Im anschließenden Versuch wurde mittels qRT-PCR die Expression von miR-144 in 18 gesunden Probanden im Zeitverlauf betrachtet. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Tag 8 - 27 nach einmaliger Injektion (relativ zu einer gewählten Referenz miRNA) (14). miR-144 ist zusammen mit miR-451 entscheidend am geregelten Entwicklungsprozess roter Blutzellen beteiligt (32). Eine erhöhte Expression der miRNA könnte indirekt auf eine erhöhte Erythropoese hindeuten. Diese erste Studie weist auf die Nutzbarkeit von Plasma miRNA Markern zur Detektion von ESA Doping hin. Es bleibt in weiteren Kollektiven und unter unterschiedlichen Bedingungen (wie bspw. Mikrodosierungen) zu prüfen, ob der Biomarker verifiziert werden kann und ob die Verwendung der jeweiligen Marker miRNA die Sensitivität des Biologischen Passes erhöht.

Die gleiche Arbeitsgruppe testete 2013 den Nutzen zirkulierender miRNA Biomarker zur Detektion von autologem Blutdoping. Zehn gesunden Probanden wurden ~500ml Vollblut entnommen, aufbereitet und nach 42 Tagen reinfundiert. Mittels Exiqon qRT-PCR Array wurde die miRNA Expression von 369 Kandidaten im Plasma gemessen und relativ zu einer gewählten miRNA sowie zu UniSp6 normalisiert. Drei miRNA wurden aufgrund der hohen Konzentration im Plasma, der hohen Expressionsänderungen und der statistischen Signifikanz ausgewählt und mittels qRT-PCR im Zeitverlauf gemessen. Die höchsten Anstiege zeigten sich am Tag 1 nach der Reinfusion. Die Kontrollgruppe (n=10) zeigte keine signifikanten Änderungen der gewählten miRNA. Mit Hilfe eines mathematischen Modells, welches die Expressionsänderung von miR-30b und Serum EPO Level berücksichtigt, konnten die Autoren Hinweise auf autologes Blutdoping bis Tag 3 nach der Reinfusion nachweisen. Die Autoren folgern aus ihren Ergebnissen, dass die Messung der miRNAs den Einfluss der Bluttransfusion auf die Physiologie der Lunge widerspiegeln könnte. Dieser Zusammenhang ergibt sich aus den Tatsachen, dass autologe Bluttransfusionen zu akuten Reaktionen in der Lunge führen können, dass im Plasma der Probanden der Anstieg eines lungenspezifischen Blutproteins nachgewiesen wurde und ein Großteil der in der Studie bestimmten miRNAs im hohem Maße im Lungengewebe exprimiert werden. In weiteren Versuchen bleibt der Einfluss möglicher Störgrößen wie Krankheit zu prüfen.

DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Bis dato wurden eine ganze Reihe Transkriptom-spezifischer Marker vorgeschlagen, die Hinweise auf Doping geben könnten. Um zu prüfen ob diese als geeignete und zuverlässige Biomarker in Betracht kommen, muss deren Qualifikation ermittelt werden (20). Unabhängig davon welcher RNA-Typ genutzt wird, muss ähnlich wie für das Blutpasssystem, die Schwankungsbreite der Marker im RNA-Profil ermittelt werden. Es bleibt zu testen, ob die Marker durch mögliche Einflussfaktoren wie Sport, Ernährung, Lebensstil, Krankheit oder denkbar viele weitere externe Faktoren beeinflussbar sind. Um die Marker weiter zu verifizieren, muss dies in verschiedenen Kollektiven untersucht werden, die sich in Ethnie, Geschlecht, Alter und gegebenenfalls in der Sportart unterscheiden. Da es sich bei Hochleistungssportlern um außergewöhnliche Individuen handelt deren Genotyp und folgend das Transkriptom außergewöhnliche Merkmale aufweisen kann, bedarf es Kontrollgruppen, die im Idealfall aus Elitesportlern bestehen. Je nach Sportart ergeben sich daraus die Schwierigkeiten den Referenzbereich mit ausreichend Kontrollprobanden abzustecken, wobei es sich um nicht-gedopte Probanden handeln muss, damit die natürliche Schwankungsbreite der Marker im Kollektiv abgebildet werden kann. Ein weiterer wichtiger Punkt ist es die Reliabilität der Messung zu gewährleisten, da die Messergebnisse von einer Reihe voranalytischer- und analytischer Einflussfaktoren beeinflusst werden können (19). In diesem Zusammenhang müssen die Probengewinnung, der Transport, die Probenverarbeitung und die Datenanalyse standardisiert werden. Es bleibt zu prüfen, ob und zu welchem Anteil die Faktoren Einfluss auf die Objektivität und Zuverlässigkeit der Daten, also auf die Expressionsänderungen, ausüben. In einem ersten Schritt kann dies in Anlehnung an die aktuellen Richtlinien der WADA zur Behandlung von Probenmaterial geschehen (50). Aus verschiedenen Gründen haben miRNA Analysen aus Plasma Vorteile gegenüber Vollblutanalysen. Dazu zählt, dass miRNA weniger anfällig für externe Einflüsse bei der Probengewinnung und sehr stabil während verschiedener Lagerungsbedingungen sind (10). Einige Störeinflüsse bleiben jedoch bestehen. Es hat sich unter anderem gezeigt, dass die Ergebnisse abhängig von der Anzahl und Verteilung der Blutzellen sind und die Hämolyse roter Blutzellen eine Störgröße darstellt, die ausgeschlossen werden muss (9,31). Es bleibt festzuhalten, dass das Wissen um das Transkriptom und seine biologische Funktion noch sehr begrenzt ist. Mit dem Aufkommen der RNAseq Technologie im Hochdurchsatz, ist das Interesse am Transkriptom und dessen Funktion weiter stark gewachsen (27) und es werden ständig neue Studien veröffentlicht, in denen verschiedene RNA, wie etwa lncRNA, als Biomarker in Betracht gezogen werden (47). Auch für die Dopinganalytik können diese, neben den bereits untersuchten RNAs, von Interesse sein. Mittels mathematischer Verfahren können die Ergebnisse verschiedener RNA Marker zusammengefasst werden wodurch sich eine eindeutigere Unterscheidung zwischen gedopt und ungedopt treffen lassen könnten (3,35,36).

Die Einführung indirekter Marker und letztlich des Biologischen Passes mit dem hämatologischen Modul hat dazu geführt, dass sich die Anzahl atypischer Blutprofile bei Elite Sportlern verringert hat (24,52). Somit verringert sich der Handlungsspielraum in dem unbemerkt manipuliert werden kann. Ein weiterer Vorteil des Biologischen Passes ist, dass verdächtige Sportler ermittelt werden können. Anschließend können diese Sportler dann

zielgerichtet beobachtet und mit weiteren Verfahren getestet werden (39).

Trotz dieser Vorteile bleibt festzuhalten, dass sich der Biologische Pass noch immer in der Anfangsphase befindet und dessen Reliabilität durch weitere Etablierung sowie durch die Einführung weiterer Parameter bspw. aus dem Bereich des Transkriptoms oder Metaboloms verbessert werden kann (39). Es wird derzeit noch diskutiert, ob Athleten ausschließlich auf Grundlage des Biologischen Passes verurteilt werden sollten (18). Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass indirekte Verfahren ein Doping-Delikt nicht direkt beweisen, sondern lediglich mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit darauf hindeuten, dass die Profile auf unnatürliche Weise zustande kamen. Die Forschung um das Transkriptom ist derzeit noch nicht weit genug um vorherzusagen, ob robuste Marker bzw. Profile bestimmt werden können, die einen Hinweis auf Doping liefern und die Reliabilität und Sensitivität des biologischen Passes erhöhen.

Angaben zu finanziellen Interessen und Beziehungen, wie Patente, Honorare oder Unterstützung durch Firmen: keine.

LITERATUR

- BAILLY-CHOURIBERRY L, NOGUIER F, MANCHON L, PIQUEMAL D, GARCIA P, POPOT MA, BONNAIRE Y. Blood cells RNA biomarkers as a first long-term detection strategy for EPO abuse in horseracing. *Drug Test Anal.* 2010;2:339-345 Medline. doi:10.1002/dta.146
- BECKER C, HAMMERLE-FICKINGER A, RIEDMAIER I, PFAFFL MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods.* 2010;50:237-243 Medline. doi:10.1016/j.jymeth.2010.01.010
- BECKER C, RIEDMAIER I, REITER M, TICHOPAD A, PFAFFL MW, MEYER HH. Changes in the miRNA profile under the influence of anabolic steroids in bovine liver. *Analyst (Lond).* 2011;136:1204-1209. doi:10.1039/c0an00703j
- BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY GL, VANDESOMPELE J, WITTEWER CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55:611-622 Medline. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- CARNINCI P, KASUKAWA T, KATAYAMA S, GOUGH J, FRITH MC, MAEDA N, OYAMA R, RAVASI T, LENHARD B, WELLS C, KODZIUS R, SHIMOKAWA K, BAJIC VB, BRENNER SE, BATALOV S, FORREST AR, ZAVOLAN M, DAVIS MJ, WILMING LG, AIDINIS V, ALLEN JE, AMBESI-IMPIOMBATO A, APWEILER R, ATURALIYA RN, BAILEY TL, BANSAL M, BAXTER L, BEISEL KW, BERSANO T, BONO H, CHALK AM, CHIU KP, CHOUDHARY V, CHRISTOFFELS A, CLUTTERBUCK DR, CROWE ML, DALA E, DALRYMPLE BP, DE BONO B, DELLA GATTA G, DI BERNARDO D, DOWN T, ENGSTROM P, FAGIOLINI M, FAULKNER G, FLETCHER CF, FUKUSHIMA T, FURUNO M, FUTAKI S, GARIBOLDI M, GEORGH-HEMMING P, GINGERAS TR, GOJOBORI T, GREEN RE, GUSTINCICH S, HARBERS M, HAYASHI Y, HENSCH TK, HIROKAWA N, HILL D, HUMINIECKI L, IACONO M, IKEO K, IWAMA A, ISHIKAWA T, JAKT M, KANAPIN A, KATOH M, KAWASAWA Y, KELSO J, KITAMURA H, KITANO H, KOLLIAS G, KRISHNAN SP, KRUGER A, KUMMERFELD SK, KUROCHKIN IV, LAREAU LF, LAZAREVIC D, LIPOVICH L, LIU J, LIUNI S, MCWILLIAM S, MADAN BABU M, MADERA M, MARCHIONNI L, MATSUDA H, MATSUZAWA S, MIKI H, MIGNONE F, MIYAKE S, MORRIS K, MOTTAGUI-TABAR S, MULDER N, NAKANO N, NAKAUCHI H, NG P, NILSSON R, NISHIGUCHI S, NISHIKAWA S, NORI F, OHARA O, OKAZAKI Y, ORLANDO V, PANG KC, PAVAN WJ, PAVESI G, PESOLE G, PETROVSKY N, PIAZZA S, REED J, REID JF, RING BZ, RINGWALD M, ROST B, RUAN Y, SALZBERG SL, SANDELIN A, SCHNEIDER C, SCHONBACH C, SEKIGUCHI K, SEMPLE CA, SENO S, SESSA L, SHENG Y, SHIBATA Y, SHIMADA H, SHIMADA K, SILVA D, SINCLAIR B, SPERLING S, STUPKA E, SUGIURA K, SULTANA R, TAKENAKA Y, TAKI K, TAMMOJA K, TAN SL, TANG S, TAYLOR MS, TEGNER J, TEICHMANN SA, UEDA HR, VAN NIMWEGEN E, VERARDO R, WEI CL, YAGI K, YAMANISHI H, ZABAROVSKY E, ZHU S, ZIMMER A, HIDE W, BULT C, GRIMMOND SM, TEASDALE RD, LIU ET, BRUSIC V, QUACKENBUSH J, WAHLESTEDT C, MATTICK JS, HUME DA, KAI C, SASAKI D, TOMARU Y, FUKUDA S, KANAMORI-KATAYAMA M, SUZUKI M, AOKI J, ARAKAWA T, IIDA J, IMAMURA K, ITOH M, KATO T, KAWAJI H, KAWAGASHIRA N, KAWASHIMA T, KOJIMA M, KONDO S, KONNO H, NAKANO K, NINOMIYA N, NISHIO T, OKADA M, PLESSY C, SHIBATA K, SHIRAKI T, SUZUKI S, TAGAMI M, WAKI K, WATAHAKI A, OKAMURA-OHO Y, SUZUKI H, KAWAI J, HAYASHIZAKI Y. The transcripti- onal landscape of the mammalian genome. *Science.* 2005;309:1559-1563 Medline. doi:10.1126/science.1112014
- COOPER C. Drug cheating at the Olympics: who, what, and why? *Lancet.* 2012;380:21-22 Medline. doi:10.1016/S0140-6736(12)61114-3
- CORTEZ MA, BUESO-RAMOS C, FERDIN J, LOPEZ-BERESTEIN G, SOOD AK, CALIN GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8:467-477 Medline. doi:10.1038/nrclinonc.2011.76
- DIETZ P, ULRICH R, DALAKER R, STRIEGEL H, FRANKE AG, LIEB K, SIMON P. Associations between Physical and Cognitive Doping - A Cross-Sectional Study in 2.997 Triathletes. *PLoS ONE.* 2013;8:e78702 Medline. doi:10.1371/journal.pone.0078702
- DUTTAGUPTA R, JIANG R, GOLLUB J, GETTS RC, JONES KW. Impact of Cellular miRNAs on Circulating miRNA Biomarker Signatures. *PLoS ONE.* 2011;6:e20769 Medline. doi:10.1371/journal.pone.0020769
- GRASEDIECK S, SCHOLER N, BOMMER M, NIESS JH, TUMANI H, ROUHI A, BLOEHDORN J, LIEBISCH P, MERTENS D, DOHNER H, BUSKE C, LANGER C, KUCHENBAUER F. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia.* 2012;26:2414-2416 Medline. doi:10.1038/leu.2012.106
- KELLY BN, HAVERSTICK DM, LEE JK, THORNER MO, VANCE ML, XIN W, BRUNS DE. Circulating microRNA as a biomarker of human growth hormone administration to patients. *Drug Test Anal.* 2013.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D68-D73 Medline. doi:10.1093/nar/gkt1181
- LABRIE F, LUU-THE V, MARTEL C, CHERNOMORETZ A, CALVO E, MORRISSETTE J, LABRIE C. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an anabolic steroid like dihydrotestosterone (DHT), the most potent natural androgen, and tetrahydrogestrinone (THG). *J Steroid Biochem.* 2006;100:52-58. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.03.006
- LEUENBERGER N, JAN N, PRADERVAND S, ROBINSON N, SAUGY M. Circulating microRNAs as long-term biomarkers for the detection of erythropoiesis-stimulating agent abuse. *Drug Test Anal.* 2011;3:771-776 Medline. doi:10.1002/dta.370
- LEUENBERGER N, SCHUMACHER YO, PRADERVAND S, SANDER T, SAUGY M, POTTGIESSER T. Circulating microRNAs as biomarkers for detection of autologous blood transfusion. *PLoS ONE.* 2013;8:e66309 Medline. doi:10.1371/journal.pone.0066309
- LIEW CC, MA J, TANG HC, ZHENG R, DEMPSEY AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med.* 2006;147:126-132 Medline. doi:10.1016/j.lab.2005.10.005
- MAGNANI M, CORSI D, BIANCHI M, PAIARDINI M, GALLUZZI L, GARGIULO E, PARISI A, PIGOZZI F. Identification of blood erythroid markers useful in revealing erythropoietin abuse in athletes. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27:559-571 Medline. doi:10.1006/bcmd.2001.0419
- McArdle D. CAS 2009/A/1912-1913 Pechstein vs International Skating Union. In: Anderson J (Hrsg): *Leading Cases in Sports Law.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 2013, 209-225.
- McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimnich A. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem.* 2011;57:833-840 Medline. doi:10.1373/clinchem.2010.157198
- MENDRICK DL. Transcriptional profiling to identify biomarkers of disease and drug response. *Pharmacogenomics.* 2011;12:235-249 Medline. doi:10.2217/pgs.10.184
- MIRANDA KC, HUYNH T, TAY Y, ANG YS, TAM WL, THOMSON AM, LIM B, RIGOUTSOS I. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell.* 2006;126:1203-1217 Medline. doi:10.1016/j.cell.2006.07.031
- MITCHELL CJ, NELSON AE, COWLEY MJ, KAPLAN W, STONE G, SUTTON SK, LAU A, LEE CMY, HO KKY. Detection of Growth Hormone Doping

- by Gene Expression Profiling of Peripheral Blood. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:4703-4709 Medline. doi:10.1210/jc.2009-1038
23. MITCHELL PS, PARKIN RK, KROH EM, FRITZ BR, WYMAN SK, POGOSOVA-AGADJANYAN EL, PETERSON A, NOTEBOOM J, O'BRIANT KC, ALLEN A, LIN DW, URBAN N, DRESCHER CW, KNUDSEN BS, STIREWALT DL, GENTLEMAN R, VESSELLA RL, NELSON PS, MARTIN DB, TEWARI M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:10513-10518 Medline. doi:10.1073/pnas.0804549105
 24. MORKEBERG J, SALTIN B, BELHAGE B, DAMSGAARD R. Blood profiles in elite cross-country skiers: a 6-year follow-up. *Scand J Med Sci Sports.* 2009;19:198-205 Medline. doi:10.1111/j.1600-0838.2008.00770.x
 25. NEKRUTENKO A, TAYLOR J. Next-generation sequencing data interpretation: enhancing reproducibility and accessibility. *Nat Rev Genet.* 2012;13:667-672 Medline. doi:10.1038/nrg3305
 26. NEUBERGER EW, MOSER DA, SIMON P. Principle considerations for the use of transcriptomics in doping research. *Drug Test Anal.* 2011;3:668-675 Medline. doi:10.1002/dta.331
 27. PERTEA M. The Human Transcriptome: An Unfinished Story. *Genes (Basel).* 2012;3:344-360 Medline. doi:10.3390/genes3030344
 28. PITSILADIS YP, DURUSSEL J, RABIN O. An integrative 'omics' solution to the detection of recombinant human erythropoietin and blood doping. *Br J Sports Med.* 2014;48:856-861 Medline. doi:10.1136/bjsports-2014-093529
 29. POTTGIESSER T, SCHUMACHER YO, FUNKE H, RENNERT K, BAUMSTARK MW, NEUNUEBEL K, MOSIG S. Gene expression in the detection of autologous blood transfusion in sports - a pilot study. *Vox Sang.* 2009;96:333-336 Medline. doi:10.1111/j.1423-0410.2009.01169.x
 30. PRITCHARD CC, CHENG HH, TEWARI M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012;13:358-369 Medline. doi:10.1038/nrg3198
 31. PRITCHARD CC, KROH E, WOOD B, ARROYO JD, DOUGHERTY KJ, MIYAJI MM, TAIT JF, TEWARI M. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;3:492-497.
 32. RASMUSSEN KD, SIMMINI S, ABREU-GOODGER C, BARTONICEK N, DI GIACOMO M, BILBAO-CORTES D, HOROS R, VON LINDERN M, ENRIGHT AJ, O'CARROLL D. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J Exp Med.* 2010;207:1351-1358 Medline. doi:10.1084/jem.20100458
 33. REICHEL C. OMICS-strategies and methods in the fight against doping. *Forensic Sci Int.* 2011;213:20-34 Medline. doi:10.1016/j.forsciint.2011.07.031
 34. RIEDMAIER I, BECKER C, PFAFFL MW, MEYER HH. The use of omic technologies for biomarker development to trace functions of anabolic agents. *J Chromatogr A.* 2009;1216:8192-8199 Medline. doi:10.1016/j.chroma.2009.01.094
 35. RIEDMAIER I, BENES V, BLAKE J, BRETSCHNEIDER N, ZINSER C, BECKER C, MEYER HH, PFAFFL MW. RNA-sequencing as useful screening tool in the combat against the misuse of anabolic agents. *Anal Chem.* 2012;84:6863-6868 Medline. doi:10.1021/ac301433d
 36. RIEDMAIER I, PFAFFL MW. Transcriptional biomarkers--high throughput screening, quantitative verification, and bioinformatical validation methods. *Methods.* 2013;59:3-9 Medline. doi:10.1016/j.ymeth.2012.08.012
 37. RIEDMAIER I, TICHOPAD A, REITER M, PFAFFL MW, MEYER HHD. Identification of potential gene expression biomarkers for the surveillance of anabolic agents in bovine blood cells. *Anal Chim Acta.* 2009;638:106-113 Medline. doi:10.1016/j.aca.2009.02.014
 38. ROBINSON N, SOTTAS PE, MANGIN P, SAUGY M. Bayesian detection of abnormal hematological values to introduce a no-start rule for heterogeneous populations of athletes. *Haematologica.* 2007;92:1143-1144 Medline. doi:10.3324/haematol.11182
 39. SAUGY M, LUNDBY C, ROBINSON N. Monitoring of biological markers indicative of doping: the athlete biological passport. *Br J Sports Med.* 2014;48:827-832 Medline. doi:10.1136/bjsports-2014-093512
 40. SCHANZER W, GUDDAT S, THOMAS A, OPFERMANN G, GEYER H, THEVIS M. Expanding analytical possibilities concerning the detection of stanozolol misuse by means of high resolution/high accuracy mass spectrometric detection of stanozolol glucuronides in human sports drug. *Drug Test Anal.* 2013;11-12:810-818. doi:10.1002/dta.1516
 41. SCHONFELDER M, HOFMANN H, ANIELSKI P, THIEME D, OBERHOFFER R, MICHNA H. Gene expression profiling in human whole blood samples after controlled testosterone application and exercise. *Drug Test Anal.* 2011;3:652-660 Medline. doi:10.1002/dta.360
 42. SOTTAS PE, ROBINSON N, FISCHETTO G, DOLLE G, ALONSO JM, SAUGY M. Prevalence of blood doping in samples collected from elite track and field athletes. *Clin Chem.* 2011;57:762-769 Medline. doi:10.1373/clinchem.2010.156067
 43. SOTTAS PE, ROBINSON N, RABIN O, SAUGY M. The athlete biological passport. *Clin Chem.* 2011;57:969-976 Medline. doi:10.1373/clinchem.2011.162271
 44. STRIEGEL H, ULRICH R, SIMON P. Randomized response estimates for doping and illicit drug use in elite athletes. *Drug Alcohol Depend.* 2010;106:230-232 Medline. doi:10.1016/j.drugalcdep.2009.07.026
 45. THAKKAR H, BUTT AN, POWRIE J, HOLT R, SWAMINATHAN R. Circulating nucleic acids in the assessment of endogenous growth hormone production. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1137:58-65 Medline. doi:10.1196/annals.1448.003
 46. THEVIS M. Mass Spectrometry in Sports Drug Testing Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays. Hoboken, New Jersey: Wiley; 2010.
 47. VAN ROOSBROECK K, POLLET J, CALIN GA. miRNAs and long noncoding RNAs as biomarkers in human diseases. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013;13:183-204 Medline. doi:10.1586/erm.12.134
 48. VARLET-MARIE E, AUDRAN M, ASHENDEN M, SICART MT, PIQUEMAL D. Modification of gene expression: Help to detect doping with erythropoiesis-stimulating agents. *Am J Hematol.* 2009;84:755-759 Medline. doi:10.1002/ajh.21525
 49. VARLET-MARIE E, AUDRAN M, LEJEUNE M, BONAFUOX B, SICART MT, MARTI J, PIQUEMAL D, COMMES T. Analysis of human reticulocyte genes reveals altered erythropoiesis: potential use to detect recombinant human erythropoietin doping. *Haematologica.* 2004;89:991-997 Medline.
 50. WADA. Guidelines for blood sample collection. (2011). <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/guidelines-blood-sample-collection#.VClIGYQuVm5>. Accessed August 29, 2014.
 51. WADA WORKING GROUP REPORT TO WADA EXECUTIVE COMMITTEE ON LACK OF EFFECTIVENESS OF TESTING PROGRAMS. (2012). <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/lack-of-effectiveness-of-testing-programs#.VClklQQuVm6>. Accessed August 29, 2014.
 52. ZORZOLI M, ROSSI F. Implementation of the biological passport: the experience of the International Cycling Union. *Drug Test Anal.* 2010;2:542-547 Medline. doi:10.1002/dta.173

Korrespondenzadresse:**Prof. Dr. Dr. Perikles Simon****Johannes Gutenberg-Universität Mainz****Abteilung Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation****Albert-Schweitzer Str. 22****55128 Mainz****E-Mail: simonpe@uni-mainz.de**