

Universitätsklinikum der Friedrich-Schiller Universität Jena  
Institut für Vaskuläre Medizin/  
Stiftungsprofessur für Molekulare Hämostaseologie

**Analyse der Veränderungen der Genexpression weißer Blutzellen des Menschen  
in Reaktion auf körperliche Belastung**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller- Universität Jena

von Diplom Biologin Petra Büttner

geboren am 28.08.1979 in Apolda

Jena 2007

Dissertation eingereicht am:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Mündliche Prüfung am:

Verteidigung am:

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	8
3. Material und Methoden	13
3.1. Probanden	13
3.2. Studien zur Etablierung von Methoden für die Identifikation von sportphysiologisch relevanten Genen in weißen Blutzellen	13
3.2.1. Generelle Übersicht über die Arbeitsschritte von der Blutentnahme bis zur Datenvalidierung	13
3.2.2. Studie 1 – Genexpressionsanalyse der Reaktion von WBZ auf erschöpfende und moderate physische Belastung	14
3.2.2.1. Experimenteller Aufbau	14
3.2.2.2. Blutbilder und Laktatbestimmung	15
3.2.2.3. Prozessierung der Proben	15
3.2.2.4. Präparation der Arrays	16
3.2.2.5. Analyse der Arrays	17
3.2.2.6. MIAME	17
3.2.2.7. Validierung der Daten mit Real-Time-PCR	17
3.2.3. Studie 2 - Genexpressionsanalyse der Reaktion von PBMC und T-Lymphozyten auf erschöpfende physische Belastung	19
3.2.3.1. Experimenteller Aufbau	19
3.2.3.2. Blutbilder und Laktatbestimmung	19
3.2.3.3. Prozessierung der Proben	20
3.2.3.4. Durchflusszytometrie	20
3.2.3.5. Präparation der Arrays	21
3.2.3.6. Analyse der Microarrays	22
3.2.3.7. MIAME	22
3.2.4. Studie 3 - Genexpressionsanalyse der Reaktion von Monozyten und T-Lymphozyten auf lang anhaltende intensive physische Belastung	22
3.2.4.1. Experimenteller Aufbau	22
3.2.4.2. Teilnehmer der Studie	22
3.2.4.3. Blutbilder	23
3.2.4.4. Prozessierung der Proben	23
3.2.4.5. Durchflusszytometrie	24
3.2.4.6. Präparation der Arrays	24
3.2.4.7. Analyse der Microarrays	24
3.2.4.8. MIAME	25
3.2.4.9. Validierung der Daten mit RT-PCR	25
3.3. Analyse der Microarrays	26
3.3.1. Qualitätskontrolle	26
3.3.2. Identifikation von Genen deren Expression signifikant durch den Stimulus Sport verändert wurde	29
3.3.3. Zuordnung verändert exprimierter Gene zu funktionellen Gruppen	31
3.3.3.1. Die GO (gene ontology)-Datenbank	31
3.3.3.2. Die KEGG-Datenbank	31
3.3.3.3. Weitere Informationsquellen zur Erstellung von Genlisten	32

## Inhaltsverzeichnis

3.3.4. Untersuchungen zur Ähnlichkeit von Proben, Vorhersagetests	32
3.3.4.1. Hauptkomponentenanalyse (HKA)	32
3.3.4.2. Hierarchisches Clustern	33
3.3.4.3. Vorhersagetests	33
3.3.5. Überlegungen zur Vorgehensweise in der Microarrayanalyse	33
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1. Nachweis des Einflusses physischer Belastung auf das Genexpressionsmuster in weißen Blutzellen	37
4.1.1. Differentialblutbilder	37
4.1.2. Moderate und erschöpfende Belastung verändert signifikant die Expression von Genen in weißen Blutzellen	37
4.1.3. Einordnung der Gene in einen physiologischen Kontext	38
4.1.4. Eignung der Gene zur Klassifizierung von Proben	39
4.1.5. Vergleich von bereits publizierten Genexpressionsmustern mit Daten, die im Rahmen der Studie 1 erhalten wurden.	41
4.1.6. Validierung der Ergebnisse mit RT PCR	43
4.2. Nachweis des Einflusses physischer Belastung auf die Genexpressionsmuster von PBMC und T-Lymphozyten – Studie 2	44
4.2.1. Differentialblutbilder	44
4.2.2. Erschöpfende Belastung verändert signifikant die Genexpression in PBMC und T-Lymphozyten	44
4.2.3. Einordnung der Gene in einem physiologischen Kontext	46
4.2.4. Klassifizierung der Belastungsintensität unter Einbezug der Proben aus Studie 1	46
4.3. Untersuchung der Effekte lang anhaltender intensiver physischer Belastung auf die Genexpression von T-Lymphozyten und Monozyten - Studie 3	47
4.3.1. Qualitätskontrolle	47
4.3.2. Identifikation von Genen, die durch lang anhaltende intensive Belastung verändert exprimiert wurden	47
4.3.3. Gruppierung der Athleten-Proben mit Hilfe von Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse basierend auf den finalen Genlisten	48
4.3.4. Einordnung der signifikant in den Blutzellen der Athleten veränderten Gene in einen physiologischen Kontext	50
4.3.4.1. Zuordnung der Gene zu GO-Klassen	50
4.3.4.2. Zuordnung der Gene zu KEGG-Stoffwechselwegen	52
4.3.4.3. Ähnlichkeiten im Regulationsmuster der Gene aus GO-Klassen und KEGG-Stoffwechselwegen	56
4.3.5. Validierung der Ergebnisse mit RT-PCR	59
4.3.6. Unterschiede in der Genexpression der Monozyten und T-Lymphozyten von Kontrollen und Athleten	60
4.4. Querschnittanalyse aller drei Studien	62
<b>5. Diskussion</b>	<b>66</b>
5.1. Genexpressionsänderungen in weißen Blutzellen als Reaktion auf moderate oder erschöpfende physische Belastung – Studie 1	66
5.1.1. Unterschiede in der Reaktion weißer Blutzellen auf moderates und erschöpfendes Training	66
5.1.2. Übereinstimmungen publizierter Ergebnisse mit Ergebnissen aus Studie 1	67
5.1.3. Genregulationen in weißen Blutzellen als Reaktion auf Sport	68
5.1.4. Eignung der gefundenen Genexpressionsmuster zur Klassifizierung von Proben	69
5.1.5. Zusammenfassung der Ergebnisse aus Studie 1 und daraus folgende Überlegungen für das Design von Studie 2	69
5.2. Genexpressionsanalysen in PBMC und T-Lymphozyten	70

## Inhaltsverzeichnis

5.2.1. Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Studie 2 und dem Vergleich von Studie 1 und 2	71
5.2.2. Die Leistungsfähigkeit des Separierungsprotokolles	72
5.3. Genexpressionsanalysen der Reaktion von T-Lymphozyten und Monozyten auf lang anhaltende intensive Belastung	74
5.3.1. Änderungen in den GEM von T-Lymphozyten während der Tour de France	75
5.3.2. Änderungen in der Genexpression von T-Lymphozyten im Vergleich von Ruhe und Wettkampf	77
5.3.3. Intensive lang anhaltende körperliche Belastung führt zu einer spezifischen Verschiebung verschiedener Stoffwechselgleichgewichte quieszenter T-Lymphozyten	82
5.3.4. Die Hierarchie der Nährstoffverteilung unter körperlicher Belastung und während einer Infektion	85
5.3.5. Änderungen in der Genexpression von Monozyten als Reaktion auf lang anhaltende intensive Belastung	86
5.3.6. Vergleich der Genexpression in den Kontrollen und den Athleten	87
5.4. Ähnlichkeiten in den Genexpressionsmustern aller drei Studien	88
6. Methodische Limitierungen, Hypothesen, neue Zielsetzungen und Ausblick	90
7. Referenzen	92
<b>II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>99</b>
<b>III. ANHANG</b>	<b>101</b>
a. Anthropometrische Daten und Blutbilder	101
b. Qualitätskriterien für RNA	105
c. Qualitätskriterien für Arrays	106
d. Dichte von Blutzellen	108
e. Darstellung von Datensätzen in einem Boxplot im Zuge der Qualitätssicherung	109
f. Darstellung von Datensätzen in einer Hauptkomponentenanalyse im Zuge der Qualitätssicherung	110
g. Genlisten zur Klassifizierung von Aktivierung, Zytokin-Expression und Quieszenz in T-Lymphozyten	111
<b>IV. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>114</b>
<b>V. DANKSAGUNG</b>	<b>115</b>
<b>VI. LEBENSLAUF</b>	<b>116</b>
<b>VII. PUBLIKATIONEN/ POSTER/ PREISE</b>	<b>118</b>

### 1. Zusammenfassung

Sportliche Aktivität ist mit zahlreichen physiologischen Veränderungen wie gesteigerten Stoffwechselumsätzen, verstärkter Blutzirkulation und erhöhter biomechanischer Beanspruchung des Körpers assoziiert. Viele Organe und Gewebe reagieren auf wiederholte physische Belastungen mit einer Adaptation des Stoffwechsels. Im Zuge einer Leistungsoptimierung kann Training für den Organismus negative Auswirkungen haben. Hochleistungsathleten können ein „Übertrainingssyndrom“ oder ein „Syndrom verringerter Leistungsfähigkeit“ entwickeln. Andererseits können mit moderatem Training positive Effekte auf zahlreiche Zivilisationskrankheiten wie beispielsweise arteriosklerotische Erkrankungen erzielt werden. Die physiologischen Prozesse die diesen Effekten zugrunde liegen sind teilweise unbekannt. Eine Vorhersage der Auswirkungen physischer Belastung ist mit derzeitigen Methoden nicht möglich.

Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung des Immunsystems an den positiven und negativen Effekten von Sport. Daher wurde in dieser Arbeit mittels Microarraytechnologie untersucht, ob in weißen Blutzellen als Reaktion auf physische Belastung spezielle Genexpressionsmuster (GEM) detektierbar sind. Um mögliche Erklärungen für die Effekte von Sport zu finden, wurden die GEM physiologisch interpretiert. Die notwendigen Untersuchungen wurden in drei aufeinander aufbauenden Studien realisiert. Zuerst wurde geprüft, ob durch Sport prinzipiell Veränderungen in den GEM weißer Blutzellen induziert werden und diese somit als Surrogatmarker für sportliche Belastung geeignet sind (Studie 1). Es wurde getestet, ob die beobachteten Musteränderungen die Art und Intensität physischer Belastungen widerspiegeln und geeignet sind, Proben entsprechend der Trainingseffizienz zu klassieren. In einer weiteren Studie wurde eine standardisierbare Zellseparations-Methodik etabliert (Studie 2). Die aus Studie 1 und 2 gewonnenen Ergebnisse wurden in einer dritten Studie eingesetzt, um physiologische Prozesse zu charakterisieren, die durch lang anhaltenden intensiven Sport reguliert werden.

In Studie 1 konnte gezeigt werden, dass akute physische Belastung sich auf die Genexpression weißer Blutzellen (WBZ) auswirkt. Weiße Blutzellen sind als Reporterzellen für den Stimulus „Sport“ geeignet. Als Antwort auf moderate und erschöpfende Belastung wurde eine deutliche Veränderung der Expression der selben Gene beobachtet. Die Richtung der Änderung war identisch, lediglich die Amplitude war verschieden. Der stärkere Reiz „erschöpfende Belastung“ führte zu einer stärkeren Expressionsänderung bei einer größeren Anzahl von Genen. Mit Hilfe der gefundenen GEM konnten die Proben entsprechend der Belastungsintensität klassiert werden.

Für die Studie 2 wurde die Reaktion auf den Reiz „erschöpfende Belastung“ in separierten PBMC (peripheral blood mononuclear cells) und T-Lymphozyten analysiert. Einige der in Studie 1 verändert reguliert gefundene Gene wurden erneut verändert exprimiert gefunden. In den separierten Zellen wurden jedoch auch andere, in den Gesamt-WBZ nicht detektierte, Genregulationen gefunden. Mit den Expressionsmustern der signifikant verändert regulierten Transkripte aus Studie 1 und 2 (WBZ und PBMC) war wechselseitig eine korrekte Klassierung der Proben

## Zusammenfassung

nach Ruhe und Belastung möglich. Das heißt, dass die durch erschöpfende Belastung induzierten GEM aus einer Probandengruppe in anderen Individuen wiedergefunden werden können. Die Genexpressionsmuster der T-Lymphozyten erlaubten eine richtige Klassierung der WBZ-Proben; die umgekehrte Zuordnung war nicht möglich. Die GEM separierter Subpopulationen weißer Blutzellen sind sensitiver als die aus Gesamt-WBZ.

In Studie 3 wurde die Genexpression separierter T-Lymphozyten und Monozyten von Hochleistungs-Radsportlern zu Beginn und Ende der Tour de France 2005 und in der wettkampffreien Zeit (Ruhe) bestimmt und die Daten verglichen. Als Bezugspunkt für die GEM der Athleten wurden auch Genexpressionsanalysen in den Blutzellen von Kontrollprobanden durchgeführt. Während des Wettkampfes wurden in beiden Zelltypen nur wenige Transkripte verändert exprimiert, wohingegen der Vergleich des Ruhezeitpunktes mit dem Wettkampf eine signifikante Veränderung von jeweils mehr als zweitausend Genen ergab. Unter Verwendung von Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse (HKA) war eine Trennung der „Ruhe“-Proben von den „Wettkampf“-Proben eindeutig möglich. Eine Unterscheidung der zu Start und Ende des Wettkampfes gemessenen GEM war mit diesen Methoden nicht möglich. Ein Vergleich der „Ruhe“- und der „Wettkampf“-Proben in den T-Lymphozyten ergab eine fast doppelt so hohe Anzahl an verändert regulierten Genen wie in den Monozyten. T-Lymphozyten reagieren sensitiver als Monozyten auf lang anhaltende intensive physische Belastung. Viele der in T-Lymphozyten verändert regulierten Gene konnten dem Kohlenhydrat-, dem Glutamin- und dem Arachidonsäurestoffwechsel, der Antigenprozessierung und –präsentation, der GO:6952: Abwehrreaktion und der GO:6955: Immunantwort zugeordnet werden. Die überwiegende Zahl der Gene dieser Klassen war während des Wettkampfes herab reguliert. Bestätigt wurde das auch mittels RT-PCR ausgewählter Gene. Eine Aktivierung der T-Lymphozyten, als Erklärung für eine Veränderung der Regulation energie- und immunrelevanter Prozesse konnte auf transkriptioneller Ebene zu keinem Zeitpunkt detektiert werden. Es wurden allerdings veränderte Regulationen von Genen der T-Zell-Quieszenz gefunden. TOB1, ein wichtiger Regulator und Erhalter der Lymphozyten-Quieszenz, war während des Wettkampfes höher als in Ruhe exprimiert.

Es ist anzunehmen, dass die beobachteten Herabregulationen in T-Lymphozyten während des Wettkampfes der Aufrechterhaltung der Energieversorgung, der direkt durch physische Belastung betroffenen Gewebe und Organe, wie Muskel, Herz und Leber dienen. Ein Sport-spezifisches Regulationssystem der Energieverteilung kann postuliert werden. TOB1 könnte in den T-Zellen eine zentrale Rolle spielen. Es erhält den energiesparenden Zustand der Lymphozyten-Quieszenz und erhöht die Schwelle der energieaufwändigen Aktivierung. Während der gesamten Tour de France war das GEM in Monozyten und T-Lymphozyten stabil. Diese Homöostase ist wahrscheinlich ein Effekt des Trainings. Das Erreichen der beobachteten speziellen GEM und deren Stabilität während einer Wettkampfphase könnten ein entscheidendes Kriterium für optimale Leistungsfähigkeit sein.

## 2. Einleitung

Zivilisationskrankheiten wie Arteriosklerose und viele damit assoziierte Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Adipositas, koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit, Insulinresistenz, endotheliale Dysfunktion oder Bluthochdruck können durch körperliche Aktivität in ihrer Entstehung verhindert oder positiv beeinflusst werden <sup>1, 2, 3</sup>. Dabei zeigen aktuelle Untersuchungen, dass bereits eine tägliche moderate Trainingseinheit von dreißig Minuten positive Auswirkungen auf das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse hat <sup>4</sup>.

Im Gegensatz dazu ist jedoch häufiges, lang anhaltendes und erschöpfendes Training bei Leistungssportlern mit dem Risiko verbunden, das so genannte „Übertrainingssyndrom“ zu entwickeln. Dies äußert sich durch eine generelle Erschöpfung der Betroffenen mit Schlafproblemen und/oder psychischer Niedergeschlagenheit. Die körperliche Leistungsfähigkeit nimmt ab, Erschöpfung tritt unter maximaler Belastung früher ein, die maximale Herzfrequenz nimmt ab und die anaerobe Schwelle sinkt <sup>5</sup>. Die anaerobe Schwelle entspricht der höchstmöglichen Belastungsintensität, die noch ohne zunehmende Übersäuerung aufrecht erhalten werden kann und bei der der Sauerstoffbedarf und die Sauerstoffaufnahme im Gleichgewicht sind. Erschöpfendes Training und einmalige, sehr intensive Belastungen, wie z.B. ein Marathonlauf sind mit einem erhöhten Risiko für Infektionen der oberen Atemwege verbunden <sup>6</sup>. Beide Beobachtungen wurden mit Veränderungen der Immunkompetenz der betroffenen Sportler, bzw. der Funktion der Immunzellen in Verbindung gebracht <sup>7</sup>.

Es stellt sich daher die Frage, worin die Unterschiede zwischen dem positiven, regelmäßigen moderaten Training und dem unter Umständen schädlichen exzessiven Training bestehen. Zahllose Parameter wurden in Korrelation zu den Effekten von Sport gesetzt. Sehr verbreitet sind die Erhebung von physiologischen Leistungsparametern wie beispielsweise der  $VO_{2max}$ , der aeroben/anaeroben Schwelle, der Herzfrequenz oder des Blutlaktat-Spiegels. Alle diese Parameter stehen miteinander in Verbindung und werden genutzt, um die individuelle, maximale Belastbarkeit, die Ausdauer und indirekt den Energieverbrauch eines Athleten zu ermitteln. Die  $VO_{2max}$  beschreibt den maximalen Sauerstoffverbrauch unter ansteigender Belastung. Während der zunehmenden Belastung deckt der Körper seinen Energiebedarf zunächst durch den aeroben Stoffwechsel. Bei etwa 75% der maximalen Herzfrequenz wird die aerobe Schwelle erreicht. Die benötigte Energie wird dann auch über den anaerob-laktaziden Stoffwechsel bereitgestellt.- Der Blutlaktat-Spiegel liegt dann etwa bei 2mmol/l. Nimmt die Belastung weiter zu, so steigt der Blutlaktat-Spiegel weiter. Bei einem Wert von circa 4mmol/l wird die anaerobe Schwelle erreicht. Der Sauerstoffbedarf und die Sauerstoffaufnahme befinden sich gerade noch im Gleichgewicht und die Übersäuerung des Körpers nimmt noch nicht zu. Wird die Belastungsintensität noch einmal gesteigert, wird mehr Laktat gebildet als abgebaut. Es kommt zu einer Übersäuerung des Körpers, was schließlich zu einem akuten Leistungsabfall führt. Die Bestimmung der genannten Werte gestattet eine gute Einschätzung des individuellen Trainingszustandes bzw. der Effizienz eines Trainings.

Diese Parameter lassen jedoch keine Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung des Immunsystems oder des endokrinen Systems an der Entstehung von unerwünschten



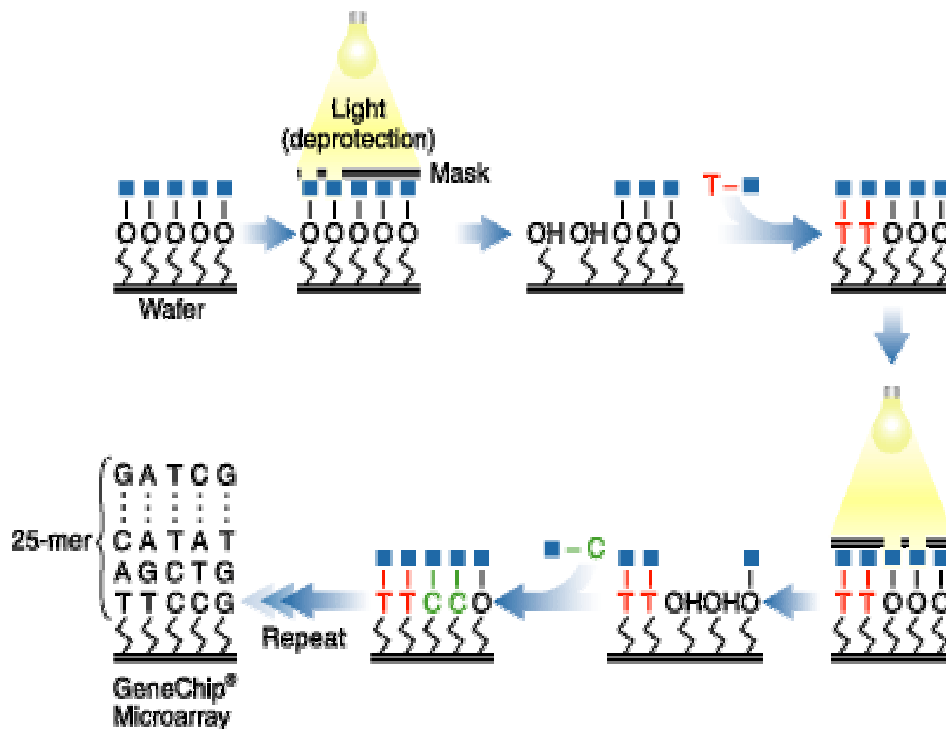
## Einleitung

oder positiven Nebenwirkungen bei körperlicher Belastung zu. Aus diesem Grunde wurde in zahlreichen Studien versucht die Funktion dieser Systeme zu charakterisieren. Es wurden die Hormonausschüttung<sup>8</sup>, die Interleukinproduktion<sup>9</sup>, die Rolle von Glutamin<sup>10, 11</sup> oder Kohlenhydraten<sup>12</sup> als Nährstoff-Supplementierung und die Verschiebungen der Blutzellspopulationen als Antwort auf Belastung<sup>13</sup> untersucht. Steinacker untersuchte die Regulation der Thyroidhormone als Antwort auf Training sowie deren Funktion in der metabolischen Kontrolle verschiedener Organsysteme. Er konnte zeigen, dass lang anhaltende Belastung zu einem Ungleichgewicht im Thyroidhormon-Haushalt führt und eine Ursache für Erschöpfung sein kann<sup>8</sup>. Petersen und Pedersen fanden, dass unter Belastung vermehrt Interleukin 6 ausgeschüttet wird, was zu einer Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine und einer Blockade der Produktion von TNF $\alpha$  führt. Die Autoren vermuten, dass TNF $\alpha$  eine Insulin-Resistenz begünstigen kann und dessen Blockade in Folge der IL6 Ausschüttung den protektiven Effekt von Sport erklärt<sup>9</sup>. Hiscock und Pedersen fassten in einem Übersichtsreferat verschiedene Studien zusammen, in denen untersucht wurde, ob eine Supplementierung von Glutamin, einer wichtigen Energiequelle von Immunzellen, eine positive Auswirkung auf die Immunfunktion hat. Trotz der zusätzlichen Glutaminaufnahme durch die Athleten, wurden in allen genannten Studien eine Abnahme der Blut-Glutamin-Konzentration und der Lymphozytenzahl als Folge der Belastung gefunden. Die Autoren schlossen daraus, dass Glutaminsupplementierung die auf Sport folgende Immunsuppression nicht verhindern kann. Anders verhält es sich mit der zusätzlichen Aufnahme von Glukose. Lancaster et al. fanden, dass die Aufnahme von mit Glukose angereicherten Getränken bei Radfahrern die Stresshormonantwort abschwächt<sup>12</sup>. Die genannten Studien hatten jeweils ein sehr spezifisches experimentelles Design um mit Sport assoziierte Effekte zu identifizieren, wodurch eine Verallgemeinerung der gefundenen Ergebnisse erschwert wird.

Anfang der 90er Jahre wurde die Microarraytechnologie entwickelt, mit deren Hilfe es möglich wurde, die Expression von tausenden Genen parallel und aus geringen Mengen Probenmaterial zu messen. Diese Methode erlaubt die Identifikation der transkriptionellen Regulation, die als Antwort auf einen physiologischen Reiz erfolgt. Aussagen über posttranskriptionelle Regulationen können nicht gemacht werden.

Ein Vorreiter dieser technischen Entwicklung war die 1993 gegründete Firma Affymetrix, die das in der Halbleiterfertigung geläufige Photolithografie-Verfahren zur Synthese von Oligonukleotidsonden auf speziell behandelten Oberflächen, so genannten Wafers, zur Marktreife brachte<sup>14</sup> (Abbildung 1).

## Einleitung



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Herstellung von Oligonukleotid-Sonden mit Hilfe der Photolithographie-Technologie durch Affymetrix.** Dargestellt sind: 1.) die Oberfläche, auf welche die Detektionssonden aufgebracht werden (wafer); 2.) die auf der Oberfläche gebundenen Aldehydgruppen, an welche die ersten Nucleotide gekoppelt werden (OH) und die Nucleotide selbst (T, A, G, C). Die blauen Würfel symbolisieren Schutzgruppen an den Nucleotiden, die eine Anbindung weiterer Nucleotide an die spezielle Sonde verhindern. Nachdem der Array mit einer speziellen lithografischen Maske (mask) überlagert ist, wird er Licht ausgesetzt (light deprotection), das die photosensitiven Schutzgruppen trifft, die unter den offenen Bereichen der Maske liegen. Wird der Array nun mit einem gewünschten Nucleotid geflutet, bindet dies nur an die schutzgruppenfreien Nucleotide. Durch eine Aneinanderreihung vieler Zyklen werden so 25-mer lange Oligonucleotide erstellt. Das Bild wurde von der Affymetrix Homepage übernommen (<http://www.affymetrix.com/technology/manufacturing/index.affx>).

Im Februar 2001 veröffentlichte das Human Genome Project (HGP)- Konsortium, eine erste Fassung der humanen Genomsequenz<sup>15, 16</sup>. Aus der „GenBank“ Datenbank, in der diese Sequenzen niedergelegt sind, wurden die Sequenzen für die Sonden der von uns verwendeten Affymetrix Arrays abgeleitet. Die Sequenzen der Sonden liegen jeweils im 3' Bereich der mRNA nahe dem Poly-Adenin-Ende. Dieser RNA-Bereich wurde gewählt, da er vor der Degradation durch RNAsen besser geschützt ist als der 5'-Bereich einer RNA. Jeweils elf verschiedene, sich teilweise überlappende Sonden detektieren ein Transkript eines Gens. Manche Gene werden durch bis zu sechs verschiedene Transkripte, darunter auch Splicevarianten, repräsentiert.

Die derzeit umfassendsten Arrays des Anbieters Affymetrix sind der HG U133 Plus 2.0 Array mit 47000 Transkripten die 39000 Gene repräsentieren sollen und der auf gut charakterisierte Gene begrenzte HG U133A 2.0 Array mit 18400 Transkripten/14500 Genen. Die große Zahl von Genen, deren Expression mit diesen Arrays semiquantifiziert werden kann, erlaubt es, völlig unvoreingenommen und somit nicht

## Einleitung

durch Hypothesen getrieben, die Effekte der experimentelle Kondition „Sport“ zu untersuchen.

Primär wird durch den Stimulus Sport der Stoffwechsel im Skelettmuskel, im Herz, in den Blutgefäßen und der Leber beeinflusst. Untersuchungen in Skelettmuskelzellen wurden bereits vereinzelt durchgeführt<sup>17</sup>, jedoch ist aus nahe liegenden Gründen eine Muskelbiopsie zur routinemäßigen Gewinnung von Probenmaterial nicht praktikabel. Die Analyse von Blutzellen ist hingegen komplikationslos und unter einfachen Bedingungen durchführbar. Durch die Analyse dieser Zellen kann Aufschluss über eine Beteiligung immunologischer Prozesse an sportlicher Aktivität gewonnen werden. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, dass die Blutzellen als Surrogatmarker für physiologische Prozesse in anderen Organen und Geweben dienen können und deren Reaktion auf physische Belastung widerspiegeln.

Blutzellen zirkulieren durch nahezu alle Gewebe, reagieren auf dort stattfindende physiologische Veränderungen und tragen ein Abbild dieser Reaktionen in die Peripherie des Körpers, wo sie entnommen werden können. Zusätzlich treten die Zellen in der Zirkulation mit dort befindlichen Substraten und bioaktiven Molekülen in Interaktion und sie reagieren auf verändertere Scherkräfte und Gaskomposition sowie Temperaturschwankungen. Durch diese Interaktionen wird die Genexpression beeinflusst. Beispielsweise schütten Skelettmuskelzellen unter Belastung große Mengen Interleukin-6 aus, wobei eine Erhöhung der Plasma-Konzentration von bis zum 100fachen gemessen wurde<sup>7</sup>. Interleukin 6 ist einer der effektivsten Mediatoren, die eine Immunantwort und damit Veränderungen in der Genexpression von weißen Blutzellen hervorrufen. Darüber hinaus haben Whitney et al. nachgewiesen, dass Genexpressionsprofile von weißen Blutzellen als Surrogatmarker für Stimuli geeignet sind, welche nicht primär auf Blutzellen wirkt. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpressionsprofile von PBMC (peripheral blood mononuclear cells) von Alter und Geschlecht von Probanden sowie circadianer Rhythmik beeinflusst werden<sup>18</sup>. Auch eine Unterscheidung von Kranken und Gesunden ist möglich. Blutzellen sind also auch als Reporter für nicht mit deren primären Aufgaben assoziierte Prozesse geeignet.

Ein sehr deutlicher, gut erforschter Effekt von Sport auf Immunzellen sind die Änderungen in der Zusammensetzung der weißen Blutzellen. Diese Änderungen werden als Subpopulationsverschiebungen bezeichnet. Abhängig von körperlicher Belastung finden sich erhebliche Unterschiede in der Poolgröße der Subpopulationen. Die Zahl der T- und B-Lymphozyten sowie der Natürlichen Killer Zellen (NK Zellen) steigt während der Belastung im Blut an und sinkt innerhalb einer Stunde nach dem Ende der Belastung bis unter das Ausgangsniveau ab. Das Ansteigen der Lymphozyten während des Sports wird durch deren Einwandern aus körpereigenen Pools, wie der Milz, den Lymphknoten und dem Gastrointestinaltrakt oder aus blutgefäßwandnahen Bereichen<sup>19</sup> begründet. Die Gründe für das schnelle Absinken der Zellzahlen nach dem Sport sind nicht endgültig geklärt. In T-Zellen wurde nach Sport eine erhöhte Apoptoserate gefunden<sup>20</sup>. Auch die Zahl der neutrophilen Granulozyten steigt während und sogar noch nach der Belastung an, um erst nach Stunden wieder auf das Ausgangsniveau zurückzukehren<sup>19, 21</sup>. Die Anzahl der im Blut zirkulierenden Monozyten weist geringere Veränderungen auf,

## Einleitung

steigt jedoch nach erschöpfendem Sport ebenfalls leicht an <sup>19</sup>. Diese Veränderungen der Zellzahlen in der Zirkulation, im besonderen das Absinken der Lymphozyten, werden als Ursache für die bereits erwähnten Infektionen der oberen Atemwege (URTI, upper respiratory tract infections) vermutet <sup>21</sup>.

Basierend auf den bestehenden Ergebnissen und den technologischen Möglichkeiten ergeben sich die Ziele und die Aufgabenstellung der Arbeit:

- Mit Hilfe der Microarraytechnologie soll geprüft werden, ob Genexpressionsmuster von Blutzellen eine Aussage über Intensität und Qualität des physiologischen Reizes „Sport“ zulassen.
- Die Genexpressionsmuster müssen es ermöglichen unbekannte Proben einer Belastungsintensität zuzuordnen.
- Falls es diese Genexpressionsmuster gibt, müssen sie auch in anderen Probanden wiederfindbar sein.
- Die Genexpressionsmuster sollen physiologisch interpretiert werden, um mögliche Erklärungen für die positiven und negativen Effekte von Sport zu finden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen die Grundlagen für ein auf Genexpressionsanalysen basiertes Diagnose-Werkzeug für Sport liefern. Mit dessen Hilfe können zukünftig Voraussagen zur Trainingseffizienz gemacht werden, die bestenfalls eine positive Beeinflussung des Trainings ermöglichen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Probanden

Für diese Arbeit wurden ausschließlich Männer als Probanden gewählt, um geschlechtsspezifische Unterschiede in der Genexpression als Störfaktor der Analysen auszuschließen. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Blutentnahmen gesund, standen während der Tests unter ärztlicher Aufsicht und hatten nach den Belastungstests jederzeit die Möglichkeit einen Arzt zu kontaktieren. Das experimentelle Design der Arbeit und der Aufklärungsbogen mit Übereinkunft für die Probanden wurden durch die Ethikkommission der Universität Jena genehmigt (Bearbeitungsnummer 1495-02/05). Jeder Teilnehmer wurde auf mögliche Risiken und die experimentelle Planung hingewiesen und unterzeichnete die vorgenannte Übereinkunft.

#### 3.2. Studien zur Etablierung von Methoden für die Identifikation von sportphysiologisch relevanten Genen in weißen Blutzellen

##### 3.2.1. Generelle Übersicht über die Arbeitsschritte von der Blutentnahme bis zur Datenvalidierung

Um den Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte zu verdeutlichen, wird nachfolgend eine Übersicht hierzu gegeben.



- Blutentnahme in spezielle Entnahmegefäße, Aufarbeitung der Zellen, abschließend Lyse in Trizol



- Isolation der RNA-haltigen, wässrigen Phase; anschließende Aufkonzentrierung und Aufreinigung der RNA mit RNeasy-Säulen



- Bestimmung von Konzentration und Qualität der RNA mit dem Nanodrop-Photometer und dem Agilent Bioanalyzer



- Prozessierung geeigneter RNA-Proben und Hybridisierung auf Affymetrix HG U133 A2.0 oder HG U133 Plus 2.0 Arrays
- Datenprozessierung; Qualitätskontrolle der Arrays
- Auswertung aller geeigneten Arrays mit speziellen Programmen
- Validierung der Expression ausgewählter Gene mittels Real-Time-PCR

### 3.2.2. Studie 1 – Genexpressionsanalyse der Reaktion von WBZ auf erschöpfende und moderate physische Belastung

Die Studie wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Sportmedizin der Universität Münster geplant und durchgeführt. Die ärztliche Betreuung, die Belastungstests, die Erstellung der Blutbilder und die Laktatmessungen sowie die Probenprozessierung bis zur Lyse der Zellen wurden im sportmedizinischen Institut Münster unter der Leitung von Prof. Dr. Mooren (jetzt Uni Gießen) durchgeführt.

#### 3.2.2.1. Experimenteller Aufbau

Fünf männliche Teilnehmer mit regelmäßigen Fußball- oder Lauftrainingseinheiten von 6 +/- 2,6h pro Woche wurden für den Test ausgewählt. Die Teilnehmer waren im Mittel 180 +/- 4,6cm groß; wogen 71,8 +/-4 kg und hatten ein durchschnittliches Alter von 25,4 +/- 3,5 Jahren (die ausführlichen anthropometrischen- und leistungsphysiologischen Daten sind in Anhang IIIa aufgeführt).

Nach einer medizinischen Grunduntersuchung wurden die Probanden einem Stufentest auf dem Laufband (Ergo XELG90 Spezial, Woodway, Weil am Rhein, Deutschland) unterzogen, um ihre maximale Sauerstoffaufnahme ( $VO_2max$ ) zu ermitteln. Die ermittelte individuelle  $VO_2max$  wurde als Grundlage für die Durchführung von erschöpfenden und moderaten Tests angewendet. Zwei Wochen nach dem Stufentest absolvierten die Probanden bei 80% ihrer  $VO_2max$  einen Laufbandtest bis zur Erschöpfung. Die durchschnittliche Laufzeit betrug 38,8 min. bei einer mittleren Laufgeschwindigkeit von 12,7 km/h. Ein bis zwei Wochen nach dem erschöpfenden Test wurde der moderate Test durchgeführt. Die

Laufgeschwindigkeit wurde so gewählt, dass die Probanden bei 60% ihrer  $VO_{2max}$  liefen (im Mittel 9,14 km/h). Die Laufdauer entsprach der individuellen Zeit, welche die Probanden bei 80%  $VO_{2max}$  bis zur Erschöpfung gelaufen waren.

Blutproben wurden jeweils vor dem Test, direkt nach dem Ende des Tests und eine Stunde nach dem Test entnommen und sofort prozessiert, wobei die direkt nach dem Testende entnommenen Proben nicht für Genexpressionsanalysen verwendet wurden.

### **3.2.2.2. Blutbilder und Laktatbestimmung**

Die Blutbilder wurden mit einem halb-automatischen Blutbild-Analysator (F-820, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) bestimmt. Die Laktatkonzentration des kapillaren Blutes wurde photometrisch mit einem kommerziellen Kit (EKF Diagnostic, Magdeburg, Deutschland) bestimmt.

### **3.2.2.3. Prozessierung der Proben**

Für die Durchführung von Genexpressionsanalysen wurden neun Milliliter Vollblut in Kalium-EDTA - Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) entnommen. Die weitere Prozessierung erfolgte mit gekühlten Puffern auf Eis. Die weißen Blutzellen wurden durch die Erythrozyten-Lyse Methode aus dem Vollblut gewonnen. Hierfür wurde der Erythrozyten-Lyse Puffer aus dem QiAmp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. 9 ml Blut wurden in 40 ml des vorgekühlten Erythrozytenlyse-Puffers gegeben. Nach mehrfachem Invertieren des Röhrchens wurde die Probe 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die weißen Blutzellen durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 400g und 4°C pelletiert, der Überstand wurde abgegossen und die Zellen wurden mit 1 ml Erythrozytenlyse-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml-Gefäß überführt. Nach erneuter fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde bei den genannten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand sorgfältig mit einer Pipette abgezogen. Das Pellet der weißen Blutzellen wurde in 10 µl PBS resuspendiert und dann in 900 µl Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) vollständig lysiert.

Die Proben wurden bei 4°C dunkel gelagert und innerhalb von zwei Tagen weiterverarbeitet. Hierfür wurden die Proben in 1,5 ml-PLG-Gefäße (Phase lock gel Heavy 1.5 ml; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Diese Gefäße enthalten ein spezielles Gel, das sich beim Zentrifugieren als Barriere zwischen die wässrige und organische Phase setzt. Die organische Phase und die Bestandteile der Interphase werden unter dem Gel eingeschlossen, so dass die Entnahme der wässrigen, RNA-haltigen Phase einfach zu bewerkstelligen ist. Die trizolierte Probe wurde mit 180 µl Chloroform durch exzessives einminütiges Schütteln vermischt. Das PLG Röhrchen wurde 15 min bei 12°C und 12000g bis zur vollständigen Phasentrennung zentrifugiert. Dann wurde der RNA-haltige, wässrige Überstand abgezogen, in ein 1,5 ml-Gefäß überführt und vorsichtig mit 280 µl Ethanol vermischt. Diese Lösung wurde auf RNeasy Mini Kit Säulen (Qiagen) aufgetragen und bei 7600g durch die Säule zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit je 350 µl RW1-Puffer gewaschen, und bei 7600g zentrifugiert wurde. Zwischen diesen beiden

Schritten wurde eine 20-minütige DNase-Behandlung durchgeführt um mögliche, die RNA kontaminierende DNA zu entfernen. Hierfür wurde das RNase Free DNase Set (Qiagen) nach Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Nach den Waschdurchgängen mit RW1-Puffer wurde das Abfallgefäß ersetzt und die Säule zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer bei 16000g gewaschen. Um alle Ethanolspuren von der Säule zu entfernen, wurde diese nach dem letzten Waschschrift nochmals 1 Minute bei 16000g zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt. Dann wurden in zwei aufeinander folgenden Schritten je 20 µl Aq. dest. auf die Säule pipettiert und diese bei 13500g zentrifugiert. Das Eluat (ca. 38 µl) wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Die RNA-Konzentrationen der Proben wurden mit dem Nanodrop-Photometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) bestimmt. Dieses Spektrometer wurde für alle RNA- und DNA-Bestimmungen in dieser Arbeit verwendet. Es bietet den großen Vorteil, dass nur sehr geringe Volumina der zu messenden Lösung benötigt werden, da die Messung ohne Küvetten direkt in einem Tropfen der Probe erfolgt. Für alle anfallenden Messungen genügen 0,5 – 1µl Probe.

Die Qualität der RNA wurde mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 System (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) bestimmt. Mit diesem auf einer miniaturisierten Elektrophorese beruhenden System kann mit ca. 100 ng der Probe die Qualität der RNA bestimmt und eine Degradation durch RNAsen ausgeschlossen werden. In Anhang IIIb sind RNAs in verschiedenen Degradationsstufen mit dem entsprechenden Elektropherogramm dargestellt. Für eine weitere Verwendung in Microarrayexperimenten musste jede Probe frei von Degradation sein.

### 3.2.2.4. Präparation der Arrays

Für diese Studie wurden 3 µg einer Mischung aus ribosomaler RNA (rRNA) und messenger RNA (mRNA) prozessiert. Kürzere RNA-Fragmente (<200 bp) wie 5,8s rRNA, 5s RNA (small ribosomal RNA) oder transfer RNA (tRNA) werden bereits während der Aufreinigung mit dem RNeasy Mini oder Micro Kit selektiv abgetrennt. Das Protokoll zur Microarrayprozessierung wurde in Anlehnung an das Affymetrix „GeneChip® Expression Analysis Manual“ Version 2003 erstellt. Die mRNA wurde zuerst mit Hilfe des SuperScript™ Double-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) in cDNA (copy bzw. complementary DNA) umgeschrieben. Um selektiv nur mRNA revers zu transkribieren, wurde ein T7-oligo-(dT) Primer (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) verwendet. In einer in-vitro Transkription wurde die cDNA mit Hilfe des ENZO Kit in biotinylierte cRNA (Enzo Life Sciences, Farmingdale, US) umgeschrieben. Die cRNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und anschließend fragmentiert. Eine erfolgreiche Fragmentierung wurde mit dem Agilent Bioanalyzer bestätigt. 8,125µg cRNA wurden bei 45°C und 60 Umdrehungen pro Minute für 16 Stunden auf den HG U133 A 2.0 Array hybridisiert. Nicht gebundene Fragmente und Reste des Hybridisierungsmixes wurden anschließend in der Fluidic Station nach dem Protokoll Midi\_Euk2 automatisiert vom Array heruntergewaschen. Die biotinylierten Nukleotide wurden mit Streptavidin-Phycoerythrin angefärbt. Die Arrays wurden mit dem GeneChip® Scanner 3000 gescannt. Die Daten wurden mit der „GCOS“ 1.1. (Affymetrix) aufgezeichnet. .



### 3.2.2.5. Analyse der Arrays

Die CEL (cell intensity)-Dateien aller Arrays wurden zur Auswertung in die „GeneSpring“ Software importiert.

Die Daten wurden in vier Gruppen eingeteilt.

1. vor erschöpfender Belastung (veB)
2. vor moderater Belastung (vmB)
3. nach erschöpfender Belastung (eB)
4. nach moderater Belastung (mB)

Die weitere Vorgehensweise ist in 3.3. Microarrayanalyse ausführlich erläutert.

### 3.2.2.6. MIAME

MIAME steht für “Minimal Information to Annotate a Microarrayexperiment” und beschreibt eine Konvention, in welcher alle zur Interpretation von Microarrayexperimenten wichtigen Parameter zusammengefasst sind. Dazu zählen Informationen zu Spezies, Gewebetyp, experimentellem Stimulus, Aufarbeitungsmethode, Microarray-Plattform, Hybridisierungsmenge und Probenmarkierung. Die Informationen werden benötigt um Microarrayexperimente nachvollziehbar und somit auch vergleichbar zu machen <sup>22</sup>. Die MIAME-Anforderungen werden in der GEO-Datenbank (Gene Expression Omnibus) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) abgebildet, in der Datensätze mit den genannten Parametern hinterlegt werden können. Vor Veröffentlichung werden die Daten von Administratoren kontrolliert und unvollständige oder unschlüssige Datensätze abgelehnt.

Alle Proben aus Studie 1 wurden in der Serie GSE 3606 zusammengefasst und in der GEO-Datenbank hinterlegt.

### 3.2.2.7. Validierung der Daten mit Real-Time-PCR

In dieser Arbeit wurde für die quantitative Real-Time-PCR (RT-PCR) die SYBR Green Methode eingesetzt. SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA und emittiert nach Anregung Licht, welches detektiert und in eine Signalstärke umgerechnet wird. Das Signal wird mit der logarithmischen Vermehrung des Zieltranskriptes stärker, was eine Real-Time, also Echtzeitbeobachtung der Vervielfältigung ermöglicht. Während des routinemäßigen Schmelzens des Produktes am Ende jeder Messung wird das SYBR Green am speziellen Schmelzpunkt des Transkriptes freigesetzt, was zu einem schlagartigen Signalabfall führt. Unspezifische Nebenprodukte der Reaktion führen, abhängig von ihrer Sequenz und somit dem spezifischen Schmelzpunkt, zu einem weiteren Signalabfall und können so entdeckt werden, ohne dass die PCR-Ansätze mit Hilfe einer Gelelektrophorese überprüft werden müssen.

## Material und Methoden

Die RT-PCR Messungen wurden mit dem Rotorgene 2000 System (Corbett Research, Sydney, Australien) durchgeführt. Die Ursprungs-RNA jeder Probe wurde mit dem Omniscript RT Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 1,2 µg RNA und 82,5 pmol poly-dT(15) Primer (Roche, Mannheim, Deutschland) in 11,3 µL RNase freien Wasser gemischt (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und bei 72°C für 4 min denaturiert. Die Reaktion wurde bei Endkonzentrationen von 500 µmol/l dNTP (Qiagen), 3,3 µmol/l poly dT(15) Primer (Roche), 0,25 U/µl Omniscript Polymerase, 0,5 U/µl RNase Inhibitor (Roche), 0,01% (w/v) BSA (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in Polymerase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Die Reaktion wurde bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Je 2 µl cDNA wurden für jede RT-PCR eingesetzt.

Ausgehend von der Sequenz der Gene, für die eine Validierung durchgeführt werden sollte, wurde mit Hilfe des PRIMER3-Programms (<http://frodo.wi.mit.edu/>) ein entsprechendes Primerpaar bevorzugt im transkribierten 3'-Bereich gesucht. Diese wurden dann mit dem PUNS (Primer UniGene Selectivity)-Programm (<http://okeylabimac.med.utoronto.ca/cgi-bin/PUNS/>) auf Spezifität für ihr Zielgen getestet. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

„GenBank“ Name und Nummer	Primersequenzen	Annealingtemperatur
GAPD (NM_002046)	5'-tcggagtcaacggatttggtcgta-3'	66°C
	5'-atggactgtggtcatgagtccttc-3'	
MMP9 (NM_004994)	5'-aaagcctatttctgccaggac-3'	60°C
	5'-gtggggatttaccatggcact-3'	
S100P (NM_005980)	5'-taccaggcttctgcagagt-3'	60°C
	5'-ctccaggcatcatttgagt-3'	
HSPA1A (NM_005345)	5'-cgagaaggacgagtttgagc-3'	67°C
	5'-ggaaaggcccctaatctacc-3'	

Die genannten Primer wurden zur Etablierung von Standards für die Zieltranskripte MMP9, S100P oder HSPA1A benutzt. Es wurde jeweils eine PCR mit den entsprechenden Primern durchgeführt. Die Länge der Produkte dieser Reaktionen wurde in einem Gel überprüft. Anschließend wurde in einer Reamplifikation das Zieltranskript noch stärker angereichert und über Invisorb® Spin PCRRapid Kit Säulen (Invitrogen, Berlin, Deutschland) aufgereinigt. Die Konzentration der Transkripte wurde auf 10<sup>10</sup> Templatmoleküle/ µl eingestellt und in verschiedenen Verdünnungen zur Quantifizierung der Transkripte der zu testenden Proben verwendet.

Die RT-PCR wurde in einem 25µl Reaktionsansatz mit Endkonzentrationen von 0,5 µmol/l Primer, 200 µmol/l dNTPs, 1,8 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U Taq Polymerase

(Platinum Taq; Invitrogen), 0,01% (w/v) BSA; dem Polymerase-Reaktionspuffer und 0,16x der kommerziell erworbenen SYBR Green Lösung (Roche) durchgeführt. Nach einem Denaturierungsschritt bei 90°C wurden die Transkripte in 40 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung von 30 Sekunden bei 96°C, 30 Sekunden Annealing der Primer bei der entsprechenden Temperatur und 25 Sekunden Ausbau des Transkriptes durch die Polymerase bei deren Temperaturoptimum von 72°C, amplifiziert. Anschließend wurde über einen kontinuierlichen Temperaturanstieg von 75°C bis 99°C der Schmelzpunkt der Transkripte bestimmt. Eine spezifische Reaktion mit nur einem Produkt hat nur einen Schmelzpunkt. Beim Auftreten unspezifischer Produkte, wurde die Reaktion optimiert, bis keine Unspezifitäten mehr sichtbar waren.

### **3.2.3. Studie 2 - Genexpressionsanalyse der Reaktion von PBMC und T-Lymphozyten auf erschöpfende physische Belastung**

Diese Studie wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Sportmedizin der FSU Jena geplant und durchgeführt. Die ärztliche Betreuung, die Belastungstests und die Laktatmessungen wurden unter der Leitung von PD Dr. med. Dr. phil. Hilberg durchgeführt.

#### **3.2.3.1. Experimenteller Aufbau**

Diese Studie wurde ohne den moderaten Test mit drei Probanden analog zu Studie 1 durchgeführt. Die Männer waren gesund und trainierten regelmäßig (min. 6h/Woche). Über einen Stufentest wurde die individuelle  $VO_{2max}$  bestimmt. Diese wurde genutzt, um einen erschöpfenden Laufbandtest bei  $VO_{2max} = 80\%$  zu planen. Die Probanden hatten eine durchschnittliche Laufzeit von 38 +/- 13 min (die ausführlichen anthropometrischen- und leistungsphysiologischen Daten sind in Anhang IIIa aufgeführt). Eine Stunde vor dem Test und eine Stunde nach dem Test wurden jedem Probanden jeweils 24 ml Blut in BD Vacutainer CPT Gefäße entnommen. Diese Röhrchen enthalten ein thixotropisches Polyestergel, eine FICOLL™ HYPAQUE™ Lösung und 0.1 M Natriumcitrat als Antikoagulans. Das Polyester-Gel wird unter Einwirkung der Zentrifugalkraft durchlässig und bildet nach Beendigung der Zentrifugation eine undurchlässige Barriere zwischen den zu trennenden Zellpopulationen. Die Ficoll- Lösung besteht aus synthetischen Saccharosepolymeren und hat bei Raumtemperatur eine definierte Dichte von 1077 kg/m<sup>3</sup>. Entsprechend ihrer Dichte werden die PBMC, das sind die Monozyten, die Lymphozyten, die Thrombozyten und die basophilen Granulozyten von den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und den Erythrozyten getrennt (siehe auch Anhang IIIId).

#### **3.2.3.2. Blutbilder und Laktatbestimmung**

Die Blutbilder wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Jena mit einem XE 2100 Hematology Analyzer (Sysmex, Norderstedt, Deutschland) erstellt. Die

Laktatbestimmungen wurden mit dem EBIO Plus Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) im Institut für Sportmedizin durchgeführt.

### 3.2.3.3. Prozessierung der Proben

Aus jeweils 8 ml Vollblut wurden die T-Lymphozyten und PBMC isoliert. Für die T-Zell-Isolation wurden nach der Blutentnahme 400 µl „T Cell Enrichment Cocktail“ (StemCell Technologies, Grenoble, Frankreich) in das BD Vacutainer CPT gegeben und mit den Zellen durch mehrfaches Invertieren des Röhrchens vermischt. Der „T Cell Enrichment Cocktail“ besteht aus primären Antikörpern gegen Erythrozyten (Glykophorin A), B-Lymphozyten (CD19), NK-Zellen (CD56), Monozyten (CD16), Thrombozyten (CD36) und Granulozyten (CD 66b). Ein sekundärer Antikörper bindet schließlich an die primären Antikörper. Die entstehenden Tetramere komplexieren alle ungewünschten Zellen. Die Proben wurden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 min bei Raumtemperatur und ca. 1800g abzentrifugiert. Während dieses Schrittes wandern alle Zellen mit einer Dichte  $> 1077 \text{ kg/m}^3$  durch das Gel im BD Vacutainer CPT. Alle Zellen, die über die tetrameren Antikörper an Zellen mit einer Dichte  $> 1077 \text{ kg/m}^3$  gebunden sind, werden mit unter das Gel gezogen und so separiert. Anschließend wurden die Röhrchen acht- bis zehnmal invertiert, um die Zellen oberhalb der Gelbarriere (T-Lymphozyten) mit der dort befindlichen Flüssigkeit zu mischen. 200 µl der Zellsuspension wurden für durchflusszytometrische Analysen entnommen und in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Die übrigen T-Lymphozyten wurden in ein 50 ml Gefäß überführt, in das bereits 40 ml eiskaltes PBS mit 2 mM EDTA vorgelegt waren. Das Gefäß wurde auf 50 ml mit PBS/ 2 mM EDTA aufgefüllt, fünfmal invertiert und für 10 min bei 4°C und 500g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Zellpellet in 3 ml PBS/ 2 mM EDTA aufgenommen und in ein 5 ml-Gefäß überführt. Dieses wurde mit PBS/ 2 mM EDTA auf 5 ml aufgefüllt und erneut 10 min bei 4°C und 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Zellpellet in 1,5 ml Trizol lysiert. Die Proben wurden auf zwei 1,5 ml-PLG-Gefäße aufgeteilt. Die Aufarbeitung der RNA erfolgte analog zu Studie 1, jedoch wurde das RNeasy Micro Kit (Qiagen) verwendet, da dieses für geringere RNA Mengen optimiert ist. Die zunächst geteilten Proben wurden auf der Säule wieder vereinigt. Die Prozedur wurde entsprechend der Herstelleranweisung durchgeführt und beinhaltete einen DNase Schritt. Eluiert wurde in zwei Schritten mit je 10 µl Aq. dest. (Molekularbiologie geeignet). Vor der Elution wurde das Aq. dest 5 min auf der Säule inkubiert, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen. Das Eluat wies ein durchschnittliches Volumen von 18 µl auf.

### 3.2.3.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie-Analysen wurden mit einem FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt, das über einen Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488nm verfügt. Es wurden Antikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE),

Peridinin–Chlorophyll-Proteinkomplex (PerCP) oder Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5) eingesetzt.

**Tabelle 1: Antikörper die zur Detektion von Blutzellsubpopulationen benutzt wurden.**

Zelltyp	Antikörper gegen	Molekulare Basis des CD Markers
T-Lymphozyten	CD3	T-Zell Rezeptor
B-Lymphozyten	CD19	B-Zell-Korezeptor
Monozyten	CD14	Bindung von Lipopolysacchariden
Natürliche Killerzellen	CD56	Neurales Zell Adhäsions Molekül 1
Thrombozyten	CD41a	Integrin, alpha 2b
Erythrozyten	CD235a	Glykophorin A
Helfer T-Zellen	CD4	Rezeptor erkennt MHC-2
Zytotoxische T-Zellen	CD8	Rezeptor erkennt MHC-1
Granulozyten	CD66b	Immunglobulin CEACAM1

Die isolierte T-Lymphozytenpopulation wurde auf Verunreinigungen mit anderen Zellpopulationen überprüft. Dazu wurden je 50 µl der während der Aufarbeitung entnommenen Proben auf drei 1,5 ml-Gefäße aufgeteilt. In Röhrchen eins wurden jeweils 2 µl Antikörper gegen B-Lymphozyten, Monozyten und die Zielzellen; in Röhrchen zwei je 2 µl Antikörper gegen NK Zellen und Thrombozyten und in Röhrchen drei jeweils 2 µl Antikörper gegen bzw. Granulozyten pipettiert (Tabelle 1). Nach sehr kurzem vortexen, wurden die Zellen für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Gefäße mit 1 ml PBS/ 2 mM EDTA aufgefüllt und die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 500 g pelletiert. Die Zellen wurden in 200 µl PBS/ 2 mM EDTA aufgenommen und sofort analysiert. Bereits durch die Messung der Größe (FSC - forward scatter, Vorwärtsstreulicht) und Granularität (SSC - side scatter, Seitwärtsstreulicht) der Zellen konnte eine Aussage zur Reinheit der Proben getroffen werden. Da für die Qualitätskontrolle nur sehr wenig Material verfügbar war, wurde die Kompensation für die verwendeten Antikörper und die Subpopulationen der PBMC voreingestellt. Ein FSC-Threshold (Grenzwert) wurde so gesetzt, dass kleine Zelltrümmer von der Messung ausgeschlossen wurden. Es wurden 2000 bis 5000 Ereignisse gezählt. Proben deren Gesamtgehalt an CD19-, CD56-, CD14- oder CD66b- positiven Zellen größer als 5% war, wurden von der Microarrayanalyse ausgeschlossen.

### 3.2.3.5. Präparation der Arrays

Die Präparation wurde analog zu Studie 1 durchgeführt. Die „GCOS“ Version 1.2 wurde zur Steuerung der Fluidic Station und des Scanners verwendet.

### **3.2.3.6. Analyse der Microarrays**

Die CEL-Dateien wurden in „GeneSpring“ importiert und nach Zelltyp (PBMC oder T-Lymphozyten) und Zeitpunkt (vor und nach Belastung) geordnet. Für jede Gruppe gab es drei biologische Replikate.

### **3.2.3.7. MIAME**

Alle Datensätze wurden entsprechend den MIAME-Vorgaben in die NCBI Gene Expression Omnibus (GEO)-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) geladen. Die Proben der Studie 2 wurden unter der Seriennummer GSE 6053 gespeichert.

## **3.2.4. Studie 3 - Genexpressionsanalyse der Reaktion von Monozyten und T-Lymphozyten auf lang anhaltende intensive physische Belastung**

Die Studie wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Rehabilitative und Präventive Sportmedizin der Universität Freiburg geplant und durchgeführt. Die ärztliche Betreuung der Athleten und deren Aufklärung über Durchführung und Zielsetzung der Studie wurden von den dortigen Ärzten übernommen, die auch für die medizinische Betreuung der Athleten während der Tour de France verantwortlich waren. Die Studie wurde geblindet durchgeführt. Die Zuordnung der Proben zu Namen wurde von den Freiburger Ärzten verwaltet. Die Zuordnung der Proben zu einem Individuum war für unsere Arbeitsgruppe nicht möglich.

### **3.2.4.1. Experimenteller Aufbau**

Im Rahmen der Tour de France 2005 wurden Blutproben vor dem Start (Prolog), kurz vor Ende des Wettkampfes (St Etienne; vorletzte Etappe) sowie in der auf die Tour folgenden Ruhephase (Dezember 2005) entnommen. Die Blutentnahmen wurden jeweils zur gleichen Tageszeit und nicht nach akuter Belastung durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils vor Ort bis zur Lyse in Trizol aufgearbeitet und gekühlt nach Jena transportiert. Hier wurden die Proben prozessiert und auf HG U133 Plus 2.0 Arrays hybridisiert. Zusätzlich wurden die Genexpressionsmuster von neun Kontrollprobanden gemessen.

### **3.2.4.2. Teilnehmer der Studie**

Zwölf männliche Profisportler aus zwei deutschen Teams, die an der Tour de France 2005 teilnahmen, nahmen an dieser Studie teil. Die Athleten hatten einen Altersdurchschnitt von 30,4 +/- 3,5 Jahren, eine Körpergröße von 180,3 +/- 5,2 cm und ein Gewicht von 71,4 +/- 7,2 kg. Ihr Trainingspensum schloss insgesamt 30000 bis 35000 km pro Jahr mit Trainingszeiten von 30 bis 35 Stunden pro Woche ein. In den Tagen vor Beginn der Tour trainierten die Athleten 2 bis 3h täglich. Eine detaillierte Diskussion der Leistungsparameter während der Tour ist in der Arbeit von Vogt et al. <sup>23</sup> veröffentlicht. Die tägliche Kalorienaufnahme der Athleten betrug etwa 8500 kcal (persönliche Kommunikation mit S. Vogt, Universität Freiburg). In der

Ruhephase absolvierten die Fahrer vier Trainingseinheiten mit insgesamt 8 bis 10 Stunden pro Woche.

Zum Vergleich wurde ein Kontrollkollektiv zusammengestellt. Die teilnehmenden Männer waren gesund, Nichtraucher und nahmen keine Medikamente. Das Durchschnittsalter betrug 32,1 +/- 7,6 Jahre, das Gewicht 83,3 +/- 6,6kg bei einer Größe von 183,7 +/- 7cm. Die meisten der Kontrollprobanden absolvierten regelmäßige Trainingseinheiten von maximal 6 Stunden pro Woche. Ein Teilnehmer trainierte 8 bis 10 Stunden in vier Einheiten.

### **3.2.4.3. Blutbilder**

Die Differentialblutbilder wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Jena mit einem XE 2100 Hematology Analyzer (Sysmex, Norderstedt, Deutschland) angefertigt.

### **3.2.4.4. Prozessierung der Proben**

Die Teamärzte entnahmen jedem Athleten zu jedem der genannten Zeitpunkte 12 ml Blut aus der Armvene. Dazu wurden drei mal 4 ml BD Vacutainer CPT Röhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes USA) und das zugehörige Blutentnahmeset verwendet. Die Proben wurden sofort weiterverarbeitet. Aus einem der Röhrchen wurden 350 µl Vollblut entnommen, in ein separates Röhrchen überführt und für die Erstellung von Blutbildern aufbewahrt. In zwei Röhrchen wurden je 200 µl RosetteSep „Monocyte Enrichment Cocktail“ zugegeben. Im „Monocyte Enrichment Cocktail“ sind primäre Antikörpern gegen T-Lymphozyten (CD2, CD3, CD8), B-Lymphozyten (CD19), Natürliche Killerzellen (CD56), Granulozyten (CD66b) und Erythrozyten (Glykophorin A) enthalten um diese Zellen abzutrennen. Röhrchen drei wurden 200 µl RosetteSep „T cell Enrichment Cocktail“ gegeben. Die Prozessierung der Proben erfolgte analog zu Studie 2 (siehe Prozessierung der Proben 3.2.3.3.). Die Monozytenproben wurden dabei nach der ersten Zentrifugation in einem 50 ml-Gefäß vereint. Nach der Zentrifugation der BD Vacutainer CPT Tubes wurden jeweils 50 µl der Monozyten und der T-Zell Probe entnommen, in lichtgeschützte Amberggefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und zur späteren Durchführung durchflusszytometrischer Analysen bei 4°C gelagert. Die T-Zellen und Monozyten wurden in 1,5 ml Trizol lysiert und gekühlt nach Jena transportiert, wo sie innerhalb von zwei Tagen weiterverarbeitet wurden.

Zur Extraktion der RNA-haltigen Phase aus den in Trizol gelösten Proben wurden diese in 15 ml-PLG-Gefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. 500 µl Chloroform wurden hinzu pipettiert. Durch intensives Schütteln wurde eine gute Phasenmischung erzielt. Die PLG-Röhrchen wurden entsprechend den Herstelleranweisungen zur Phasentrennung zentrifugiert. Der RNA-haltige wässrige Überstand aus den PLG-Gefäßen (im Schnitt 900 µl) wurde in einem separaten Gefäß mit gleichem Volumen 70% Ethanol gemischt und dann über RNeasy Micro Säulen (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers aufgearbeitet. Eluiert wurde mit 2 mal 10 µl Aq. dest. (Molekularbiologie geeignet), die vor der Elution 5 min auf der Säule

inkubiert wurden. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt, mit Aq. dest. auf 125 ng/µl eingestellt und die Qualität der RNA mit dem Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) überprüft.

Die Blutproben von drei Kontrollprobanden wurden gleichzeitig mit denen der Athleten in Frankreich am ersten Abnahmetermin entnommen und bearbeitet. Die Proben der anderen Kontrollprobanden wurden in Jena entnommen und prozessiert.

### **3.2.4.5. Durchflusszytometrie**

Die Qualitätskontrolle mittels Durchflusszytometrie erfolgte direkt nach der Ankunft in Jena.

Alle Proben wurden auf Verunreinigungen mit unerwünschten Blutzellsubpopulationen getestet. Hierfür wurden die nach der Zentrifugation der CPT Gefäße entnommenen 50 µl - Aliquots der Proben verwendet. Sie wurden mit PBS/ 2 mM EDTA/ 2% BSA auf 100 µl aufgefüllt, auf zwei Gefäße a 50 µl aufgeteilt und mit jeweils 2 µl jeden Antikörpers inkubiert. In einem Ansatz wurde auf Verunreinigung mit B-Lymphozyten (CD19), Monozyten (CD14) und T-Zellen (CD3) und im zweiten Ansatz auf NK Zellen (CD56) getestet (alle Antikörper von Immunotools, Friesoythe, Deutschland). Die Messung erfolgte analog zu 3.2.3.4.. Eine Probe wurde aufgrund von Verunreinigungen von der Microarrayanalyse ausgeschlossen.

### **3.2.4.6. Präparation der Arrays**

Die Prozessierung der Arrays wurde ausgehend von 1 µg Total – RNA ansonsten analog zum Affymetrix „GeneChip Expression Analysis Technical Manual“ (November 2004) durchgeführt. Alle enzymatischen Schritte von der „first-strand“-Synthese über die in vitro Transkription bis zur Aufreinigung und Fragmentierung der RNA wurden mit dem GeneChip® One-Cycle cDNA Synthesis kit (Affymetrix, Santa Clara, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Abweichend wurde jedoch das Volumen des Hybridisierungsansatzes von 300 µl auf 220 µl verringert, so dass für eine Prozessierung 12 µg cRNA statt 15 µg ausreichend waren. Die HG U133 Plus 2.0 Arrays wurden der Herstellervorschrift gemäß mit 10 µg cRNA in 200 µl Hybridisierungsansatz befüllt.

### **3.2.4.7. Analyse der Microarrays**

Es wurden zwei verschiedene Analysen durchgeführt. Zuerst wurden nur die GEMs aus Monozyten und T-Zellen der Sportler zu den drei verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen. Die Datensätze wurden nach Zeitpunkten gruppiert. Gruppe eins umfasst alle Proben, die zu Beginn der Tour entnommen wurden. Diese wird im Folgenden als „Start“ (S) bezeichnet. In der zweiten Gruppe sind alle Proben enthalten, die einen Tag vor dem Ende der Tour entnommen wurden. Diese Gruppe wird als „Ende“ (E) bezeichnet. Die dritte Gruppe, benannt „Ruhe“ (R), beinhaltet die Proben aus der trainingsfreien Zeit.



In eine weitere Auswertung wurden auch die Kontrollprobanden (K) mit einbezogen. Die Anzahl der Replikate pro Gruppe ist aufgrund unterschiedlicher Probandenverfügbarkeit oder Probenausfälle unterschiedlich; sie ist in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Anzahl der Messungen pro experimenteller Gruppe in Studie 3**

	T-Lymphozyten	Monozyten
R	6	7
S	10	10
E	8	9
K	8	8

#### 3.2.4.8. MIAME

Alle Datensätze wurde in die GEO Datenbank geladen. Die Daten der Athleten sind als Serie GSE 1505, die Daten der Kontrollprobanden als GSE5237 hinterlegt.

#### 3.2.4.9. Validierung der Daten mit RT-PCR

Die Expression ausgewählter Gene wurde mit RT-PCR validiert. Die Messungen wurden mit dem Eppendorf Mastercycler EP Realplex Gradient S (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

1,5 µg Ursprungs-RNA pro 100 µl-Reaktion wurden mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerempfehlung revers transkribiert. Die Reaktionen wurden für die weiteren Verwendungen im Verhältnis 1:4 verdünnt. Pro Real-Time-PCR kamen 2 µl Probe zum Einsatz. Die PCR wurde mit dem RealMasterMix (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Dieses PCR Reagenz ist für den Mastercycler® EP Realplex optimiert und basiert auf der Eppendorf HotMaster® Taq DNA Polymerase, die keine Enzymaktivierungsphase benötigt und somit kurze PCR - Laufzeiten ermöglicht.

Die Gene wurden über bereits von Qiagen getestete und etablierte Primer quantifiziert. Die Primer wurden mit dem RealMasterMix entsprechend der Herstellervorgaben eingesetzt, um einen Standard für das Ziel-Gen zu erstellen. In diesem Prozess wurde auch die Annealing-Temperatur des Primers optimiert. Die Standards wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und auf eine Sollkonzentration von  $10^{10}$  einzelsträngigen Templatemolekülen/µl eingestellt. Alle verwendeten QuantiTect Primer und die entsprechenden Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Ein Primerpaar wurde von Jena Bioscience (Jena, Deutschland) bezogen. Die PKM2 (pyruvate kinase, muscle) wurde mit den beiden Primern 5'-AGGGTGACAGCTTCCTTCC-3' und 5'-GGCTTCAATGGAACAACAGC-3' bei einer Annealing-Temperatur von 60°C detektiert. Zur Quantifizierung der Anzahl von Transkripten in den einzelnen Proben wurden Eichgeraden mit den Standards erstellt. Die gemessenen Transkript-

Mengen aller zu bestimmenden Gene wurden für den Intergruppenvergleich auf das als invariabel exprimiert angenommene Gamma-Aktin normiert.

**Tabelle 3: Bestellnummern, Namen und Annealing-Temperaturen der für die Validierung der Array-Daten aus Studie drei verwendeten Qiagen Primer.** AT-Annealingtemperatur; BP-Länge des Zielfragmentes in Basenpaaren

Bestellnummer	Genname	Vollständiger Proteinname	AT in °C	BP
Hs_ACTG1_1_SG	ACTG1	Aktin Gamma 1	58	79
Hs_ALOX5_1_SG	ALOX5	Arachidonsäure 5 Lipoxygenase	54	132
Hs_ALOX5AP_1_SG	ALOX5A P	Arachidonsäure 5 Lipoxygenase-aktivierendes Protein	54	120
Hs_BCL2L1_SG_1	BCL2L1	BCL2-ähnliches Protein 1	58	79
Hs_CD69_1_SG	CD69	CD 69 antigen (T Zelle Aktivierungs Antigen)	52	90
Hs_G6PD_1_SG	G6PD	Glukose6-Phosphat-Dehydrogenase	58	91
Hs_GAPDH_SG_1	GAPD	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	55	90
HS_GLS_1_SG	GLS	Glutaminase	58	126
Hs_GLUD1_1_SG	GLUD1	Glutamat-Dehydrogenase 1	58	131
Hs_GSS_1_SG	GSS	Glutathion-Synthetase	60	75
Hs_HK3_1_SG	HK3	Hexokinase 3	52	129
Hs_PGK1_1_SG	PGK1	Phosphoglycerat-Kinase 1	60	149
Hs_PTGS1_1_SG	PTGS1	Prostaglandin-Endoperoxidsynthetase	50	91
Hs_TGFB_SG_1	TGFB1	Transformierender Wachstumsfaktor Beta 1	58	108
Hs_PKM2_1_SG	PKM2	Pyruvat-Kinase	60	133

### 3.3. Analyse der Microarrays

#### 3.3.1. Qualitätskontrolle

Im Anschluss an das Einscannen der Mikroarrays wurde zunächst eine mehrstufige Qualitätskontrolle durchgeführt, um fehlerhafte Arrays von der weiteren Auswertung auszuschließen. Erste Qualitätsparameter werden bereits in „GCOS“ errechnet und sind in einem Report für jeden Array einzeln abrufbar. Für die Parameter „noise“, „scaling factor“, „present call rate“ und „GAPD 3'/5' ratio“ wurden für jeden Zell- und Arraytyp Schwankungsbereiche festgelegt, die eine

Aussage über die Qualität des Arrays bzw. der Prozessierung zuließen (siehe Anhang IIIc).

Das Programm „GCOS“ führt für alle Arrays eine „background/ noise correction“ durch. „Noise“ beschreibt die Pixel-zu-Pixel-Variation zwischen den verschiedenen „probe cells“ (eine „Zelle“ auf dem Array auf die eine spezifische Sonde hybridisiert wurde, mit einer Seitenlänge von 11µm). Mit Hintergrund oder „background“ ist die Autofluoreszenz eines Arrays gemeint, die durch unspezifisch gebundene Zelltrümmer, Salze oder Streptavidin-Phycoerythrin-Reste verursacht wird. Das Minimum, das Maximum, der Durchschnitt und die Standardabweichung der Hintergrundintensität werden berechnet. Sehr hohe „noise“- und „background“-Werte können z.B. auf Probleme beim Waschprozess der Arrays deuten, haben meist einen negativen Einfluss auf die „present call rate“ und sind ein Ausschlusskriterium.

Generell wurde die mittlere Signalintensität aller Arrays auf einen Wert von 500 skaliert. Dies ist notwendig, da technisch bedingt, zwischen den Arrays unterschiedliche mittlere Signalintensitäten gemessen werden. Werden die Signalintensitäten nicht skaliert, sind technisch bedingte Intensitätsunterschiede nicht von echten Änderungen der Genexpression unterscheidbar. Der Multiplikations- bzw. Divisionsfaktor, mit dem die Signalintensitäten umgerechnet wurden, diente als Qualitätsmerkmal. Im Falle sehr hoher Signalintensitäten bzw. sehr niedriger Werte, z.B. als Folge mangelhafter Färbung mit Streptavidin-Phycoerythrinfarbstoff, wird der Skalierungsfaktor sehr groß. Davon betroffene Arrays wurden ausgeschlossen.

Für jedes einzelne Expressionssignal eines Transkriptes wurde ein p-Wert errechnet, der eine Aussage zur Zuverlässigkeit des entsprechenden Signals zulässt. Prinzipiell wird jedes Transkript durch elf „perfect match“-Sonden und elf „mismatch“-Sonden repräsentiert. Diese elf verschiedenen Sonden wurden in teilweise überlappender Anordnung nahe dem Poly-Adenin-Ende der mRNA gewählt. Im Falle eines „perfect match“ stimmen alle 25 Basen der Sonde mit der Sequenz des Zieltranskriptes überein. Die „mismatches“ entsprechen in ihrer Sequenz den „perfect match“-Sonden, tragen jedoch an Position 13 eine „falsche“ Base, die zu einer Fehlpaarung an das Zieltranskript führt. Das Verhältnis der Signalstärke an den „perfect matches“ zu der an den „mismatches“ wird zur Berechnung des p-Wertes verwendet. Eine genauere Beschreibung der Algorithmen ist im „GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals“ verfügbar ([https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data\\_analysis\\_fundamentals\\_manual.pdf](https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf)). Falls Transkripte unspezifisch an „perfect match“-Sonden binden, so binden sie auch in erhöhtem Maße an die „mismatch“-Sonden. Ist dies der Fall, kann die unspezifische Sonde detektiert und ausgeschlossen werden. Die Vorteile der „perfect match“-/„mismatch“-Strategie werden in einem technischen Report von Affymetrix ausführlicher erläutert ([http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/25mer\\_technote.pdf](http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/25mer_technote.pdf)). Ausgehend vom p-Wert werden „flags“ für jedes Transkript festgelegt, die eine Aussage darüber zulassen, ob ein Transkript „present“, d.h., deutlich detektierbar exprimiert oder „marginal“, also grenzwertig detektierbar oder „absent“, nicht detektierbar, ist. Die Festlegung der „flags“ erfolgt über so genannte

Alphas. Das sind durch den Benutzer frei wählbare p-Werte. Liegt Alpha 1 bei p-Wert = 0,04 und Alpha 2 bei p-Wert = 0,065, dann sind alle Transkripte mit p-Wert > 0,065 „absent“, >0,04 und <0,065 „marginal“, < 0,04 „present“. Diese Einstellungen wurden für alle Arrays verwendet. Sind die Einstellungen für die Alphas und somit „flags“ immer gleich, so kann man für einen Zell- und Arraytyp sehr zuverlässige Schwankungsbereiche für den prozentuellen Anteil von Transkripten mit einem „present call“ ermitteln und außerhalb dieser Bereiche liegende Arrays ausschließen.

Für einige Transkripte hat Affymetrix nicht nur Sonden in der 3' Region, sondern auch Sonden, die näher dem 5' Ende der mRNA liegen, gewählt. Aus dem Verhältnis der 3'- und 5'-Signale lassen sich Rückschlüsse auf mögliche Degradation dieser spezifischen RNA und damit indirekt auf alle RNAs der Probe ziehen. RNasen bauen RNA bevorzugt vom 5' Ende her ab. Somit ist das Signal der 5'-Sonde bei degradierten Proben schwächer, als das der 3'-Sonde. Unter anderem gibt es diese speziellen Sonden für die GAPD (Glyceraldehyd-3-Posphat Dehydrogenase). Das Verhältnis der GAPD-Sonden zueinander wurde als Qualitätsmerkmal genutzt.

Die von „GCOS“ erstellten Analysedateien wurden auch für eine Vorauswertung der Daten im Auswertungsprogramm „GeneSpring“ genutzt. Zusätzlich zu der Skalierung in „GCOS“ wurden die Datensätze normalisiert. Alle Messungen mit Werten kleiner 0,01 wurden auf 0,01 gesetzt. Anschließend wurde das Expressionssignal jedes einzelnen Gens auf einem Array durch den Median aller in dem Experiment erhobenen Messungen dieses Gens geteilt. Unter Anwendung von Clusteranalysen, Hauptkomponentenanalysen (siehe Kapitel 3.3.4.1 und 3.3.4.2.) und Boxplots wurden die Rohdaten verglichen und auf Verwandtschaft untersucht. Boxplots visualisieren die Verteilung der Gene über verschiedene Signalintensitäten. Es wird der Median der Signalintensität berechnet und ermittelt, über welchen Schwankungsbereich sich die Signalintensitäten von 25% aller Gene einer Probe erstrecken, deren Signalintensität sich unter- oder oberhalb des Median befindet. Dadurch werden 50% aller Gene in ein durch den Median getrenntes unteres und oberes Quartil eingeteilt. Je nach Streuung der Daten können die Quartile unterschiedlich groß sein. Der Abstand der äußeren Quartilgrenzen wird als Interquartil bezeichnet und sollte für alle Arrays eines Experimentes ähnlich sein. Die „whiskers“- Linien sind genau 1,5-mal so lang wie der Interquartilabstand. Alle Werte, die außerhalb der „whisker“ liegen, können als „Ausreißer“ betrachtet werden. In der Qualitätskontrolle wurden die Arrays als kritisch betrachtet, deren Daten eine starke Abweichung hinsichtlich Größe der Quartil-Fläche, Länge der „whisker“ und Anzahl der „Ausreißer“ im Vergleich zu allen anderen Arrays des Experimentes aufwiesen. Im Anhang IIIe sind die Boxplots aller Datensätze der T-Lymphozyten aus dem TdF-Kollektiv exemplarisch dargestellt. Ferner ist hier eine kritische Probe dargestellt. Die Probe mit der Nummer 572 wurde auch aufgrund eines von dem der übrigen Proben abweichenden Boxplots von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

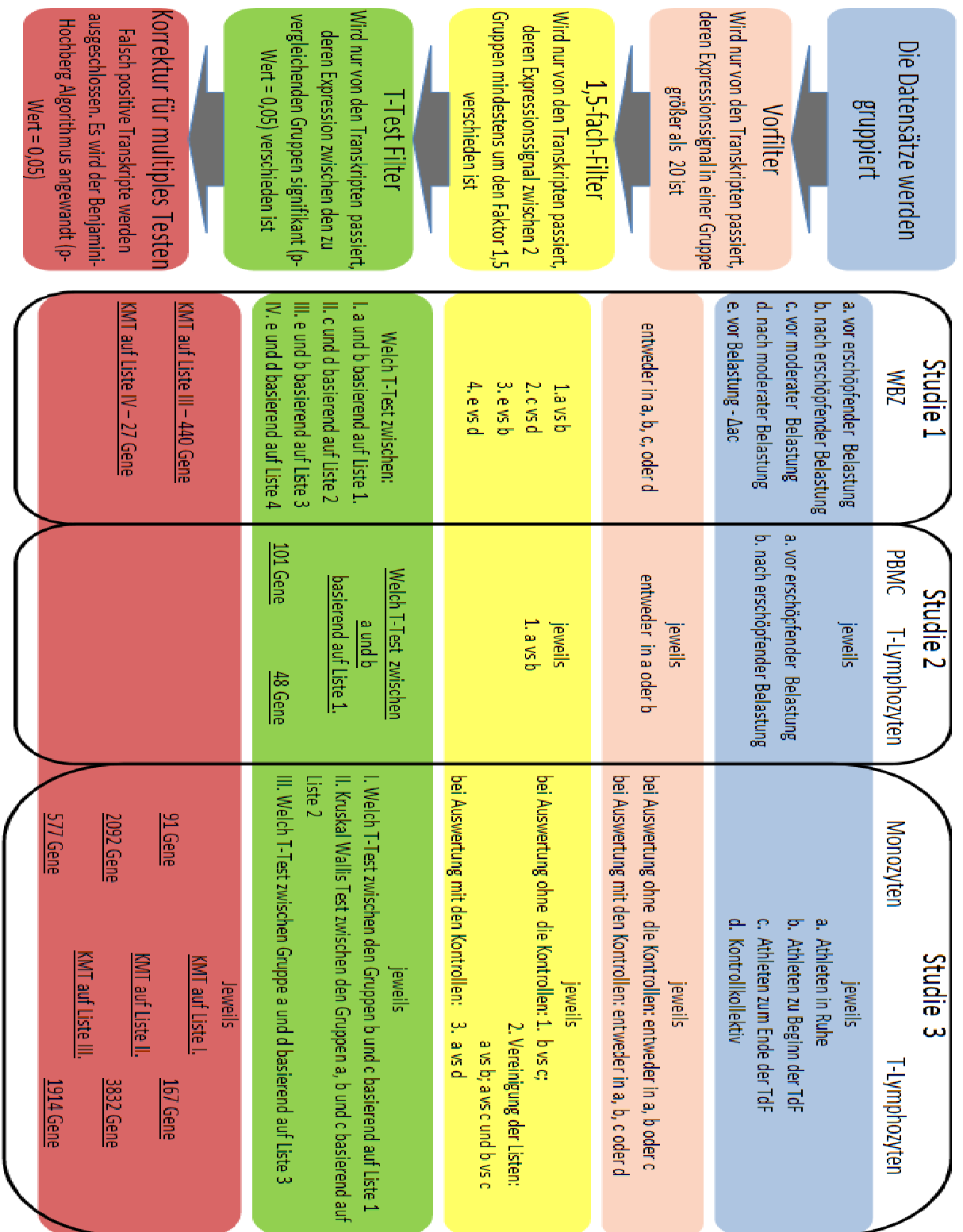
Fehlerhafte Arrays zeigen auch im hierarchischen Cluster größere Unterschiede, d.h. längere Wege oder größere Distanzen zu den anderen Datensätzen. Auch in der Hauptkomponentenanalyse werden fehlerhafte Datensätze anhand deutlich größerer Abstände zu den anderen Proben der gleichen experimentellen Gruppe identifiziert. Größere Abstände in Hauptkomponenten- und Clusteranalyse deuten auf

abweichende Genexpressionsmuster hin. Wenn diese Abweichungen nicht auf den Stimulus zurückgeführt werden können, muss die Probe ausgeschlossen werden.

### **3.3.2. Identifikation von Genen deren Expression signifikant durch den Stimulus Sport verändert wurde**

Für die weitere Analyse der Arrays wurden jeweils die CEL-Dateien aller Arrays eines Zelltyps in „GeneSpring GX 7.3“ (Agilent, Palo Alto, USA) geladen. CEL-Dateien beinhalten Informationen über die Signalintensität jeder einzelnen „probe cell“ des Arrays, die in einem dynamischen Bereich von 0 bis 65,000 aufgenommen und gemeinsam mit ihren X/Y Koordinaten gespeichert werden. Über diese Koordinaten der „probe cell“ kann die Zuordnung zum durch sie repräsentierten Transkript erfolgen. Als Importalgorithmus der CEL-Dateien in die „GeneSpring“ Software wurde der RMA (Robust Multiple-array Average)-Algorithmus gewählt<sup>24</sup>. Jedes mit dem RMA Algorithmus berechnete Genexpressionssignal wurde normiert, indem es durch den Median aller Messungen dieses Gens geteilt wurde. Die nach der Normierung erfolgende Logarithmierung „zwingt“ die Daten in eine Normalverteilung. Viele statistische Tests setzen eine Normalverteilung voraus.

Für alle Experimente wurde zuerst ein Vorfilter erstellt. Dieser wurde so gewählt, dass jedes Gen in einer der experimentellen Gruppen im Mittel mindestens ein RMA-Rohsignal von 20 aufweisen musste. Die hieraus resultierende Genliste wird weiterhin als Vorfilter-Genliste bezeichnet. Dann wurden aus der Vorfilter-Genliste die Gene herausgefiltert, die zwischen den zu vergleichenden experimentellen Gruppen mindestens 1,5-fach verschieden waren (Kurzbezeichnung 1,5-fach-Genliste). Für die Studie 3 wurden die einzelnen 1,5-fach-Genlisten die aus den Vergleichen zwischen Ruhe, Start und Ende resultierten, zu Einer vereint. Basierend auf dieser Liste wurde mit einem Kruskal-Wallis Test bestimmt, welche Transkripte signifikant zwischen zwei der drei Gruppen verändert exprimiert waren. Die 1,5-fach-Genlisten aus den Studien 1 und 2 wurden mit einem parametrischen Welch T-Test auf Signifikanz getestet. Durch die zusätzliche Anwendung einer Korrektur für multiples Testen (Benjamini-Hochberg-Algorithmus mit einer false discovery rate (fdr) von 0,05) wurde die Anzahl der falsch positiven Transkripte in den resultierenden Listen gesenkt. Falsch positiv sind jene Gene, die zwar verändert exprimiert gefunden werden, deren Expression sich aber nicht zwischen den Gruppen unterscheidet. In Abbildung 2 ist dargestellt wie die finalen Genlisten in den drei Studien erstellt wurden.



**Abbildung 2: Vorgehensweise bei der Datenreduktion und der statischen Auswertung.** Die farbigen Blöcke stehen jeweils für bestimmte Datenreduktionswerkzeuge bzw. statistische Algorithmen. In drei Kästen sind die 3 Studien dieser Arbeit dargestellt. Dabei sind Block 2 und 3, analog zu Studie 2 und 3, auch noch in die untersuchten Zelltypen aufgeteilt. In der Arbeit wird das Kürzel „finale Genliste“ verwendet. In dieser Abbildung sind die finalen Genlisten unterstrichen. Zusätzlich wird die Anzahl der Transkripte in der finalen Genliste gezeigt.

### 3.3.3. Zuordnung verändert exprimierter Gene zu funktionellen Gruppen

Die finalen Genlisten wurden genutzt, um den Einfluss des Stimulus „Sport“ auf die Genexpression von WBZ, PBMC, T-Lymphozyten und Monozyten zu charakterisieren. Hierfür wurden Informationen aus verschiedenen Datenbanken verwendet, die nachstehend beschrieben werden. .

#### 3.3.3.1. Die GO (gene ontology)-Datenbank

Die GO-Datenbank gehört zu einem Projekt, in dem seit 1998 kontinuierlich Gene biologischen Prozessen, molekularen Funktionen oder zellulären Bestandteilen zugewiesen werden, wobei diese Zuordnungen ständig erweitert und aktualisiert werden. Das GO-Konsortium hat GO-Listen für mehrere Spezies erstellt. Ziel ist eine umfassende Zuordnung jedes einzelnen Gens in alle Prozesse, an denen sein Transkript oder Protein teilhat <sup>25</sup>. Dabei wird eine Einteilung in drei Ontologiegruppen vorgenommen, die Listen beinhalten, deren Mitglieder jeweils nach anderen Gesichtspunkten ausgewählt wurden. So wird zum Beispiel das Hitzeschockprotein HSPH1 in der Ontologie „GO:8150: Biologischer Prozess“ unter „Proteinfaltung“, in der Ontologie „GO:3674: Molekulare Funktion“ unter „Nukleotid Bindung“ und in der Ontologie „GO:5575: Zelluläre Komponente“ unter „Zytoplasma“ gelistet. Die verschiedenen so genannten GO-Terme werden hierarchisch miteinander verknüpft, so dass ausgehend von den drei genannten Oberbegriffen immer kleinere, speziellere Terme abgeleitet werden.

Die „GeneSpring“ Software enthält das Werkzeug „GO Browser“, welches direkten Zugriff auf die GO-Listen bietet. Die zu testenden Listen werden auf ihre Schnittmenge mit allen GO-Klassen geprüft. Sie erhalten je nach Übereinstimmung einen Überlappungs-Signifikanzwert (detailliert beschrieben im „GeneSpring GX Users“ guide s.258). Dabei wird auch der Umfang der zu testenden Liste berücksichtigt. Für unsere Auswertung wurden mit weniger als zehn Transkripten besetzte GO-Klassen nicht berücksichtigt. Die signifikant durch den Stimulus beeinflussten GO-Klassen wurden nach Signifikanzwert geordnet, um die Funktionen zu identifizieren, die am stärksten durch den Stimulus beeinflusst wurden.

#### 3.3.3.2. Die KEGG-Datenbank

Die KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)-Datenbank <sup>26, 27</sup> enthält Darstellungen von 307 Referenzstoffwechselwegen. Die KEGG-Übersichtstafeln sind ebenfalls in „GeneSpring“ enthalten und bieten die Möglichkeit, die Regulation der Mitglieder spezieller Stoffwechsel- und Signaltransduktionswege zu allen gemessenen Zeitpunkten zu visualisieren und so zu identifizieren, ob eine Regulation durch den Stimulus vorliegt. Pfade, die durch viele signifikant veränderte Gene auffällig waren, wurden generell hinsichtlich der Expression und Regulation aller zugehörigen Gene betrachtet. So ergab sich für viele Stoffwechselwege eine einheitliche Regulation, auch wenn nicht alle Gene signifikant verändert waren.

In GeneSpring ist der Algorithmus der hypergeometrischen Wahrscheinlichkeit enthalten. Er wird genutzt um die bereits erwähnte Überlappungs-Signifikanz

zwischen zwei Genlisten zu berechnen. Im „GO-Browser“ werden so die Überlappungs-Signifikanzen zwischen GO-Liste und zu testender Liste berechnet. Der Algorithmus wurde auch verwendet um für die Schnittmengen zwischen zu testender Liste und KEGG-Liste einen Signifikanzwert berechnen zu können. Dieser wurde im Folgenden verwendet um eine Rangfolge der am stärksten durch den Stimulus beeinflussten KEGG-Stoffwechselwege zu erstellen.

### 3.3.3.3. Weitere Informationsquellen zur Erstellung von Genlisten

Affymetrix bietet auf der Homepage die Nutzung des NETAFFX-Analyse Centers an (<https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>; Zugang nach kostenloser Registrierung). Hier ist es möglich Suchbegriffe einzugeben, zu denen dann eine Liste aller hiermit assoziierter Gene erstellt wird.

„GeneSpring“ bietet die Möglichkeit selbst Genlisten zu generieren. Dabei werden durch „GeneSpring“ automatisch zu jedem Gen alle auf dem jeweiligen Array repräsentierten Transkripte aufgelistet. Solche Transkriptlisten wurden für Gene erstellt, die eine enge thematische Beziehung zu Schwerpunkten dieser Arbeit aufwiesen. Basierend auf einer Studie von Connolly et al. <sup>28</sup> wurde eine Genliste erstellt die mit der finalen Genliste der Studie 1 verglichen wurde. Des weiteren wurden Genlisten zu Aktivierung von T-Lymphozyten <sup>29</sup>, Zytokin-Repertoire von Lymphozyten (<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/Tutorials/cytokines.html>) und Lymphozyten-Quieszenz <sup>30</sup> erstellt und deren Schnittmenge mit den finalen Genlisten der Studie 3 ermittelt.

### 3.3.4. Untersuchungen zur Ähnlichkeit von Proben, Vorhersagetests

Eine Ähnlichkeit der Proben wurde durch den Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Der Pearson-Korrelationskoeffizient ist ein Maß für den linearen Zusammenhang zweier Datensätze <sup>31</sup>. Ist der Koeffizient „0“ so besteht gar kein Zusammenhang. Ist er „1“ so sind die Datensätze identisch.

Die finalen Genlisten Listen wurden mit verschiedenen Techniken darauf getestet, ob diese sich auch zur Klassierung von Belastungsintensitäten in anderen Proben eignen. Im Folgenden werden drei hierfür geeignete Methoden erläutert.

#### 3.3.4.1. Hauptkomponentenanalyse (HKA)

Mit der Hauptkomponentenanalyse können aus den vielen Regulationsmustern eines Genexpressionsexperimentes die Expressionsmuster herausgesucht werden, die am stärksten zwischen den experimentellen Gruppen variieren <sup>32</sup>. Die ermittelten Gene mit den entsprechenden Regulationsmustern werden als Hauptkomponenten (HK) bezeichnet. Eine Kombination der HK mit den stärksten Varianzen kann genutzt werden, um die Proben einander zuzuordnen bzw. voneinander zu trennen, die ähnliche bzw. verschiedene Regulationsmuster aufweisen. In dieser Arbeit wurde die HKA für die Qualitätskontrolle der Datensätze eingesetzt. Als Beispiel ist im Anhang IIIf eine HKA, analog zu dem bereits erwähnten Boxplot, für alle T-



Lymphozytenproben der TdF gezeigt. Zudem wurden die ermittelten finalen Genlisten darauf getestet, ob mit der Genexpression der darin enthaltenen Gene, experimentelle Gruppen unterscheidbar sind.

### 3.3.4.2. Hierarchisches Clustern

Clusteranalysen wurden genutzt, um Ballungen von Variablen in einer Vielzahl von Datensätzen zu finden. Im Fall der Genexpressionsanalyse werden die Datensätze nach Ähnlichkeit der Signalintensitäten aller Gene einer analysierten Liste geordnet.

### 3.3.4.3. Vorhersagetests

Vorhersagetests wurden genutzt, um zu prüfen ob bestimmte Genexpressionsmuster aus der Analyse einer Studie in Proben anderer Probanden wiedergefunden werden können. Für Vorhersagetests definiert man ein Experiment als Trainingsset und gibt eine Liste von Genen vor, deren Genexpression zwischen den Parametern von Interesse, also hier der Zeit vor oder nach Belastung, verschieden ist. Dann wird ein Testset gewählt, d.h. ein anderes Experiment, für das nun der Parameter von Interesse anhand der Genexpression der gewählten Gene im Trainingsset vorhergesagt wird. Die Methode testet auch jedes einzelne Gen der Liste auf seine Fähigkeit, Parameter voneinander zu unterscheiden und ordnet sie entsprechend der Vorhersagekraft. So kann aus einer umfangreichen Liste das Subset von Genen extrahiert werden, das die beste Trennung erzeugt.

### 3.3.5. Überlegungen zur Vorgehensweise in der Microarrayanalyse

Vor jeder Auswertung eines Microarrayexperimentes steht die Umwandlung der technisch erhobenen Signalintensitäten der Transkripte in so genannte Rohdaten. Diese bestehen aus den Mittelwerten der mindestens 11 für jedes Transkript erhobenen Expressionssignale mit den zugehörigen Signifikanzwerten, welche eine Qualitätsbeurteilung der Signale ermöglicht. Allein für diese Berechnung existiert eine Vielzahl von Algorithmen. Affymetrix selbst bietet mit dem „GCOS“-Programm, das auch zum Steuern des Scanners und somit zur eigentlichen Datengenerierung eingesetzt wird, auch einen Algorithmus an. In der Vielzahl von Auswerteprogrammen anderer Anbieter gibt es weitere Algorithmen, die zur Berechnung der Rohdaten geeignet sind. Das in dieser Arbeit verwendete „GeneSpring“-Programm bietet die Möglichkeit, die Rohdaten mit dem „GCOS“-Algorithmus<sup>33</sup>, dem RMA- oder dem GCRMA-Algorithmus<sup>24</sup> zu berechnen.

Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden für diese Arbeit alle Rohdaten mit demselben Algorithmus berechnet. Gewählt wurde der RMA-Algorithmus. Der Grund für die Wahl dieses Algorithmus war eine Arbeit von Millenar et al.<sup>34</sup>, in der Vorzüge dieses Algorithmus gegenüber den beiden anderen hinsichtlich Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Vergleich zu RT-PCR gezeigt wurden.

Die durch „GCOS“ berechneten Rohsignale wurden jedoch weiterhin in der Qualitätskontrolle der Arrays eingesetzt, weil der RMA-Algorithmus alle Datensätze eines Experimentes in die Berechnung der Rohdaten eines Datensatzes einbezieht

wobei ein fehlerhafter Datensatz durch die Berechnung maskiert oder verfälscht werden kann. „GCOS“ hingegen berechnet die Rohsignale jedes Datensatzes einzeln. Die Details der Qualitätskontrolle wurden in „3.3.1. Qualitätskontrolle“ beschrieben.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem „GeneSpring“-Programm. Der erste Schritt der Auswertung war eine Datenreduktion. Zusätzlich zur Hintergrundsubtraktion, die bereits im RMA-Algorithmus enthalten ist, wurden solche Transkripte ausgeschlossen, die in einer experimentellen Gruppe ein Rohsignal von weniger als 20 aufwiesen. Der Vorfilter ließ jedoch zu, dass schwach bzw. nicht exprimierte Transkripte, die durch den jeweils untersuchten Stimulus über den Wert von 20 herauf bzw. von einem höheren Wert darunter reguliert wurden für die Auswertung erhalten blieben.

Transkripte, die in allen Gruppen unter diesem Wert lagen, wurden in dieser Arbeit als nicht exprimiert bzw. nicht detektiert betrachtet und in der Auswertung nicht beachtet. Die Gene, die auf dem Microarray geringe Expressionswerte haben, müssen nicht zwangsläufig auch in vivo niedrig exprimiert sein, da die speziellen Sonden zur Detektion wenig leistungsstark sein können. Daher ist es nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob Gene, die den Vorfilter nicht passierten, exprimiert wurden oder nicht.

In dieser Arbeit wurde ferner ein Filter verwendet, der nur Gene passieren ließ, die eine Expressionsänderung größer 1,5-fach aufwiesen. Für die Wahl dieser Grenze wurden verschiedene Überlegungen angestellt:

Die  $x$ -fach Grenze tiefer anzusetzen, führt dazu, dass mehr Gene den Filter passieren, deren mittlere Expressionsänderung in den experimentellen Gruppen nur dem Zufall geschuldet ist (falsch Positive).

Erstellt man unter Verwendung der Gene, die den oben genannten Vorfilter passieren eine Rangliste der am dichtesten besetzten GO-Klassen, so erhält man eine Übersicht über die momentan unabhängig von einem externen Stimulus ablaufenden physiologischen Prozesse in der Zelle. Ein Stimulus verschiebt die Rangordnung der GO-Klassen, wenn er Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Zellen hat. Liegt die  $x$ -fach Grenze sehr niedrig, z.B. bei 1,1-fach, so ändert sich diese Rangordnung kaum oder gar nicht. Erst ab höheren  $x$ -fach Grenzen ist eine Änderung erkennbar. Dies bedeutet, dass der Effekt des Stimulus deutlich aus zufälligen Varianzen der Genexpression isoliert wird.

Das Anheben der  $x$ -fach Grenze über 1,5-fach senkt die Zahl der falsch positiven Transkripte, generiert aber gleichzeitig falsch negative.

Jedoch ist zu bedenken, dass in Blutzellen gesunder Probanden Veränderungen der Genexpression von mehr als 2-fach erfahrungsgemäß selten sind. Es gibt nur vereinzelte Transkripte, deren Genregulation größer als 10-fach ist.

Legt man die  $x$ -fach Grenze zu hoch, passieren zu wenig Gene den Filter. Eine physiologische Auswertung z.B. über GO- oder KEGG-Zuordnungen wird damit stark eingeschränkt. Eine Auswertung der GE-Änderungen nach moderater Belastung (Studie 1) oder im Vergleich Start und Ende der Tour de France (Studie 3) wäre dann gar nicht möglich.

Der Expressionsfilter und die 1,5-fach Grenze stellen also einen Kompromiss dar, der vom speziellen Datensatz und der Zielsetzung des Experimentes abhängig gemacht werden muss. Dient das Microarrayexperiment z.B. der Suche nach diagnostischen Markergenen, die in der Folge funktionell charakterisiert werden sollen, müssen Expressionsfilter und die  $x$ -fach Grenze angepasst werden. Nur stark verändert regulierte Gene mit hohen Expressionswerten sind dann von Interesse.

Neben der Verwendung der zuvor beschriebenen Filter sind vor allem statistische Analysen geeignet, real veränderte Gene von falsch positiven Transkripten zu unterscheiden.

Für die Transkripte, die die zuvor genannten Filter passierten, wurde ein T-Test und eine Benjamini-Hochberg Korrektur für multiples Testen mit einer  $fdr$  (false discovery rate) von 0,05 angewendet<sup>35</sup>. Die KMT dient dazu, falsch positive Transkripte zu eliminieren. Dies ist besonders in den umfangreichen Microarraydaten notwendig. Bei steigender Anzahl von im T-Test zu überprüfenden Transkripten steigt proportional auch die Anzahl falsch Positiver. Für die Benjamini-Hochberg KMT werden die Transkripte zuerst nach T-Test-Signifikanzwert, beginnend mit dem höchsten Wert, in eine Rangfolge gebracht. Jeder Signifikanzwert wird dann mit der Gesamtzahl der Transkripte in der Liste multipliziert und dann durch die Rangzahl des Transkriptes geteilt. So ergibt sich ein neuer Signifikanzwert, der dann mit dem, durch den Benutzer festgelegten, Wert (hier  $fdr=0,05$ ) verglichen wird und zu Ausschluss oder Bestätigung des Transkriptes führt.

Liegt ein Transkript mit einem T-Test-Signifikanzwert von z.B. 0,004 auf Rang 80 in einer 400 Transkripte umfassenden Liste, so passiert es die KMT. Würde die Liste 4000 Mitglieder beinhalten, weil z.B. nicht vorgefiltert wurde, würde das Transkript ausgeschlossen. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Datenreduktion vor dem Einsatz von Korrekturen für multiples Testen.

Gerade bei Experimenten mit wenigen Replikaten, wie z.B. drei pro Gruppe in Studie 2, ist es schwierig, einen Mittelweg zwischen statistischer Zuverlässigkeit und biologischer Auswertbarkeit zu finden.

Wird ein Stimulus wie Sport in gesunden Probanden mit nur drei Replikaten untersucht, ist erfahrungsgemäß der Signifikanzwert verändert regulierter Gene gering. Daher werden die Gene meist durch KMT eliminiert. Dies ist darin begründet, dass in den Blutzellen des Menschen sehr große interindividuelle Schwankungen in der Genexpression auftreten.

Neben der Datenreduktion durch die Anwendung von Vor- und 1,5-fach-Filter führt auch die Einordnung der verändert exprimierten Gene in prädefinierte funktionelle Gruppen (z.B. GO-Klassen) zu einem Ausschluss von falsch Positiven. Diese finden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit gleichmäßig über alle funktionellen Gruppen verstreut. Gene die aufgrund eines physiologischen Stimulus ihre Expression verändert haben, weisen eine höhere Wahrscheinlichkeit dafür auf, in eine für den Stimulus spezifische funktionelle Klasse eingeordnet zu werden. Wird mit solchen Genen aus hoch signifikant veränderten GO-Klassen weitergearbeitet, kann davon ausgegangen, dass wenige falsch Positive darunter sind. Die eben beschriebene Vorgehensweise, interessante Microarraydaten über GO-Klassifizierung

anzureichern, wurde auch in einer Arbeit von Lewin and Grieve <sup>36</sup> sowie Büttner et al. <sup>37</sup> untersucht und als geeignet beurteilt.

GO-Klassen, die weniger als 10 Transkripte enthielten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Der Grund hierfür muss ausführlicher erläutert werden. Auf den Affymetrix-Arrays werden viele Gene, durch mehr als ein, teilweise durch bis zu sechs Transkripte repräsentiert. Die in „GeneSpring“ verwendeten GO-Listen enthalten alle Transkripte jedes Gens. So können beispielsweise in einer GO-Klasse mit einem Gesamtumfang von 22 Transkripten zwei Gene mit jeweils sechs Transkripten vertreten sein. Sind jeweils alle sechs Transkripte der mehrfach repräsentierten Gene signifikant verändert reguliert, so wird die Signifikanzberechnung des „GO-Browser“-Werkzeuges „getäuscht“. Die GO-Klasse würde in der Folge als hochsignifikant verändert erscheinen, obwohl real nur zwei von zwölf Genen anders reguliert waren. Alle GO-Klassen, die einen geringen Umfang hatten und trotzdem in dieser Arbeit genannt werden, wurden auf diese Möglichkeit hin überprüft, um falsche Schlüsse zu vermeiden und der eingangs genannten Bedingung gerecht zu werden.

Bei einer Zuordnung der Gene zu KEGG-Wegen stellt sich dieses Problem nicht, da hier die Gene unabhängig von der Anzahl ihrer Transkripte betrachtet wurden.

Eine Zuordnung der verändert regulierten Gene zu KEGG- UND GO-Klassen ermöglicht es, zu detektieren in welchen Stoffwechselwegen durch einen Stimulus Veränderungen induziert werden. Dabei ist aber zu beachten, dass im Rahmen der hier beschriebenen Studien nur transkriptionelle Regulationen detektiert werden können. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass wichtige Regulationsprinzipien in GO- und KEGG-Stoffwechselwegen sich ausschließlich auf Proteinebene abspielen, was mit der hier verwendeten Methodik nicht erfasst werden kann.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Nachweis des Einflusses physischer Belastung auf das Genexpressionsmuster in weißen Blutzellen

Um zu klären, ob Genexpressionsmuster in weißen Blutzellen (WBZ) Reaktionen auf den Stimulus „Sport“ wiedergeben, absolvierten fünf Probanden zwei unterschiedliche Belastungstests (moderat bei  $VO_2\max = 60\%$  und erschöpfend bei  $VO_2\max = 80\%$ ). Es wurde jeweils unmittelbar vor und eine Stunde nach der Belastung Blut entnommen und in den darin enthaltenen weißen Blutzellen wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt.

#### 4.1.1 Differentialblutbilder

Die Differentialblutbilder der Teilnehmer zeigten eine deutliche, für erschöpfende Belastung typische Subpopulationsverschiebung. Die Anzahl der Gesamt-Leukozyten, der Lymphozyten und der Hämoglobin-Wert waren nach dem Test signifikant erhöht (p-Wert < 0,05). Die Anzahl der Gesamt-Leukozyten und der Hämoglobin-Wert sanken eine Stunde nach dem Test wieder auf Ausgangslevel-Werte. Die Lymphozytenzahlen lagen signifikant (p-Wert < 0,05) um fast 30% unter dem Ausgangsniveau. Diese Ergebnisse wurden auch nach dem moderaten Test in einer schwächeren Form beobachtet.

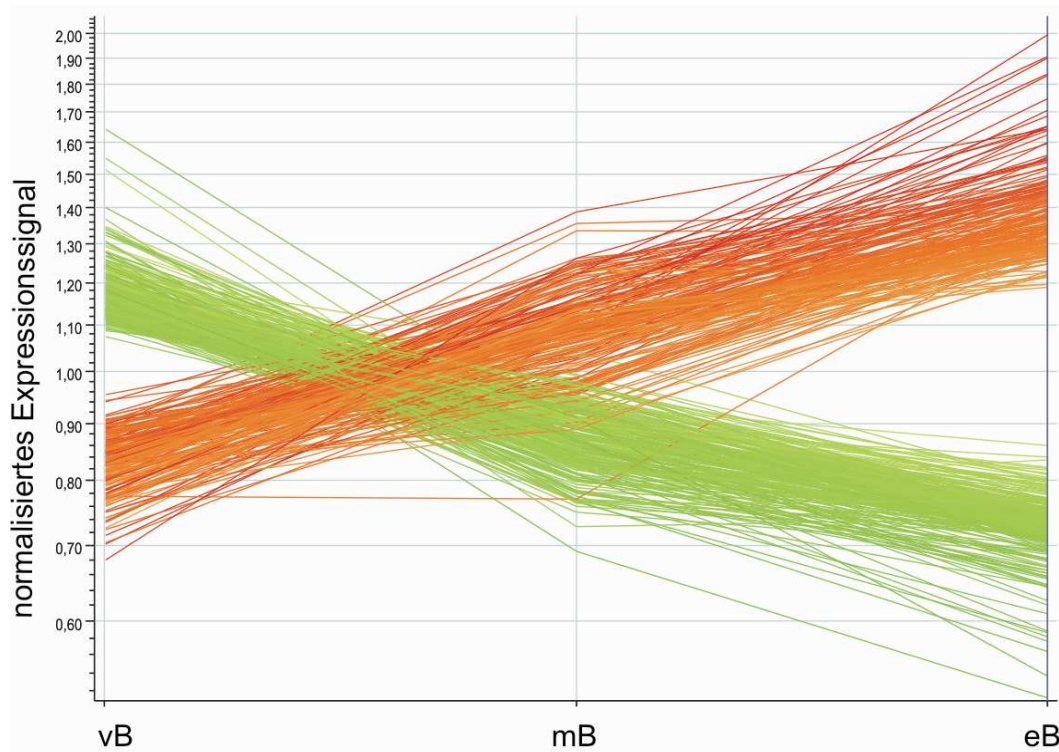
#### 4.1.2. Moderate und erschöpfende Belastung verändert signifikant die Expression von Genen in weißen Blutzellen

Für die Auswertung wurden alle Proben, die vor dem moderaten und dem erschöpfenden Belastungstests entnommen wurden, in der „vor Belastung“-Gruppe vereint. Aufgrund der großen Übereinstimmung zwischen den zwei Messwerten, die vor Belastung für jeden Probanden vorlagen (Pearson Korrelationskoeffizienten  $r=0,997; 0,998; 0,996; 0,997; 0,990$ ) wurden die zwei „vor Belastung“-Datensätze jedes Probanden gemittelt.

Den Vorfilter (siehe Abbildung 2) passierten in WBZ 16443 Transkripte. Unter Verwendung des 1,5-fach-Filters und eines T-Testes, kombiniert mit einer Korrektur für multiples Testen (Benjamini-Hochberg), wurden die Gene isoliert, die durch moderate oder erschöpfende Belastung verändert reguliert wurden. Im Vergleich von „vor Belastung“ und „nach erschöpfender Belastung“ waren 440 Transkripte signifikant verändert. Davon waren 195 Transkripte nach erschöpfender Belastung herauf und 245 Transkripte herab reguliert. Nach moderater Belastung waren unter Verwendung des gleichen Auswerteverfahrens nur 27 Transkripte signifikant verändert, wobei nach dem Belastungstest 11 herauf- und 16 herunter reguliert waren. Nur zwei dieser Transkripte waren nicht Teil der finalen Genliste für erschöpfende Belastung. Das waren die SQLE (Squalen Epoxidase) und BTEB1 (alias KLF9-Kruppel-like factor 9). Die beiden Transkripte zeigten jedoch nach erschöpfender Belastung die gleiche Richtung der Regulation wie nach moderater Belastung.

## Ergebnisse

Von den 440 nach erschöpfender Belastung verändert exprimierten Transkripten waren nach moderater Belastung bereits 435 tendenziell in die gleiche Richtung verändert. (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Quantitative Beziehung zwischen dem Ausmaß der Genexpressionsänderung und der Intensität physischer Belastung.** Gezeigt sind die normierten Expressionsniveaus der 440 Transkripte, die im Vergleich von „vor Belastung“ und „erschöpfende Belastung“ mehr als 1,5-fach signifikant verändert (T-Test mit Benjamini-Hochberg Korrektur für multiples Testen) gefunden wurden. 99% dieser Gene waren auch nach moderater Belastung in dieselbe Richtung verändert. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der Probennahme dargestellt. Von links nach rechts: vor Belastung; nach moderater Belastung; nach erschöpfender Belastung. Die y-Achse gibt das normalisierte Expressionssignal wieder.

### 4.1.3. Einordnung der Gene in einen physiologischen Kontext

Mit Hilfe des „GO Browser“ wurde eine Rangliste für die durch erschöpfende Belastung am stärksten besetzten funktionellen Klassen erstellt. Die am signifikantesten besetzten GO-Klassen waren in der Hierarchie unmittelbar benachbart. Dazu gehören „GO: 6950 Antwort auf Stress“; „GO:6955 Immunantwort“; „GO:43207 Antwort auf externe biotische Reize“; „GO:9607 Antwort auf biotische Reize“ und „GO:9613 Antwort auf Schädlinge, Pathogene und Parasiten“.

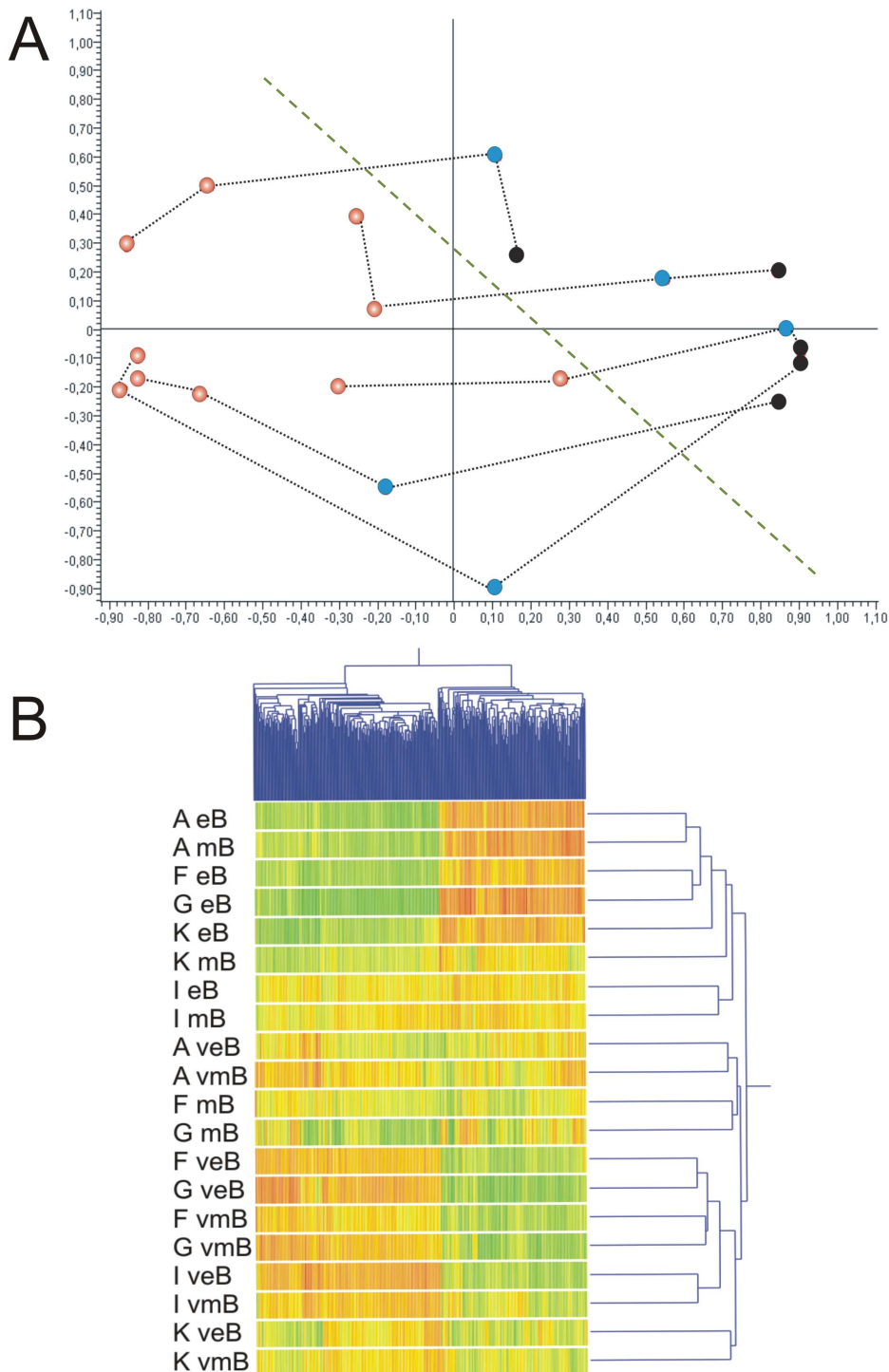
Eine Beteiligung weiterer physiologischer Prozesse konnte ebenfalls nachgewiesen werden. So wurden unter den herauf regulierten Genen die Matrixmetalloproteinase MMP9; die Hitzeschockproteine HSPA1A, HSPA1B, HSPH1 und HSPCA und das Leukozytenadhäsions-Gen Fukosyltransferase 7 (FUT7) gefunden. Auch zwei Gene

für Enzyme, die reaktive oxidative Spezies (ROS) neutralisieren, die Glutathion Peroxidase 3 (GPX3) und das Thioredoxin (TXN) wurden gefunden. Zu den herab regulierten Genen zählen der Prostaglandin D2 Rezeptor PTGDR, ein Transkriptionsfaktor der Hitzeschockproteine (HSF2) und ein Regulator der FAS – abhängigen Apoptose das Fas Apoptose inhibitorische Molekül 3 (FAIM3 alias TOSO).

#### **4.1.4. Eignung der Gene zur Klassifizierung von Proben**

Die 440 Gene der finalen Genliste für die erschöpfende Belastung wurden mit einer Hauptkomponentenanalyse (HKA) und hierarchischem Clustern darauf überprüft, ob sie die Proben nach Belastungsintensität gruppieren können (Abbildung 4)

## Ergebnisse



**Abbildung 4: Darstellung der Varianz zwischen den Proben der 5 Probanden vor Belastung und nach moderater und erschöpfender Belastung.** Bild A - Hauptkomponentenanalyse und Darstellung der Ähnlichkeit Bild B - Hierarchisches Cluster. HKA und Cluster basieren auf den 440 Transkripten der finalen Genliste für erschöpfende Belastung. Bild A: Rot – vor Belastung, blau – nach moderater Belastung, schwarz – nach erschöpfender Belastung. Die gepunkteten schwarzen Linien verbinden die Datenpunkte der einzelnen Probanden. Die gestrichelte grüne Linie zeigt die Trennung der „vor Belastung“-Proben von den „nach Belastung“-Proben. Die Komponente auf der x-Achse trägt mit 68,7% Varianz am stärksten zu Trennung der Proben bei. Die Komponente auf der y-Achse trägt mit 9,1% Varianz zur Trennung bei. Bild B: Die zwei Hauptgruppen des Clusters trennen die Proben „vor Belastung“ von denen nach erschöpfender Belastung. Die Zuordnung der Proben „nach moderater“ in eigene Gruppe erfolgte nicht.



In der hierarchischen Clusteranalyse und der HKA (Abbildung 4A) ließen sich die „erschöpfende Belastung“-Proben von den „vor Belastung“-Proben eindeutig trennen. Die „moderate Belastung“-Proben wurden nicht als eigenständige Gruppe erkannt, sondern wurden fallweise der einer oder anderen Gruppe zugeordnet. Zudem wiesen zwei „moderate Belastung“-Proben eine geringere Varianz zu den „erschöpfende Belastung“-Proben desselben Probanden auf als zu den „moderate Belastung“-Proben anderer Probanden.

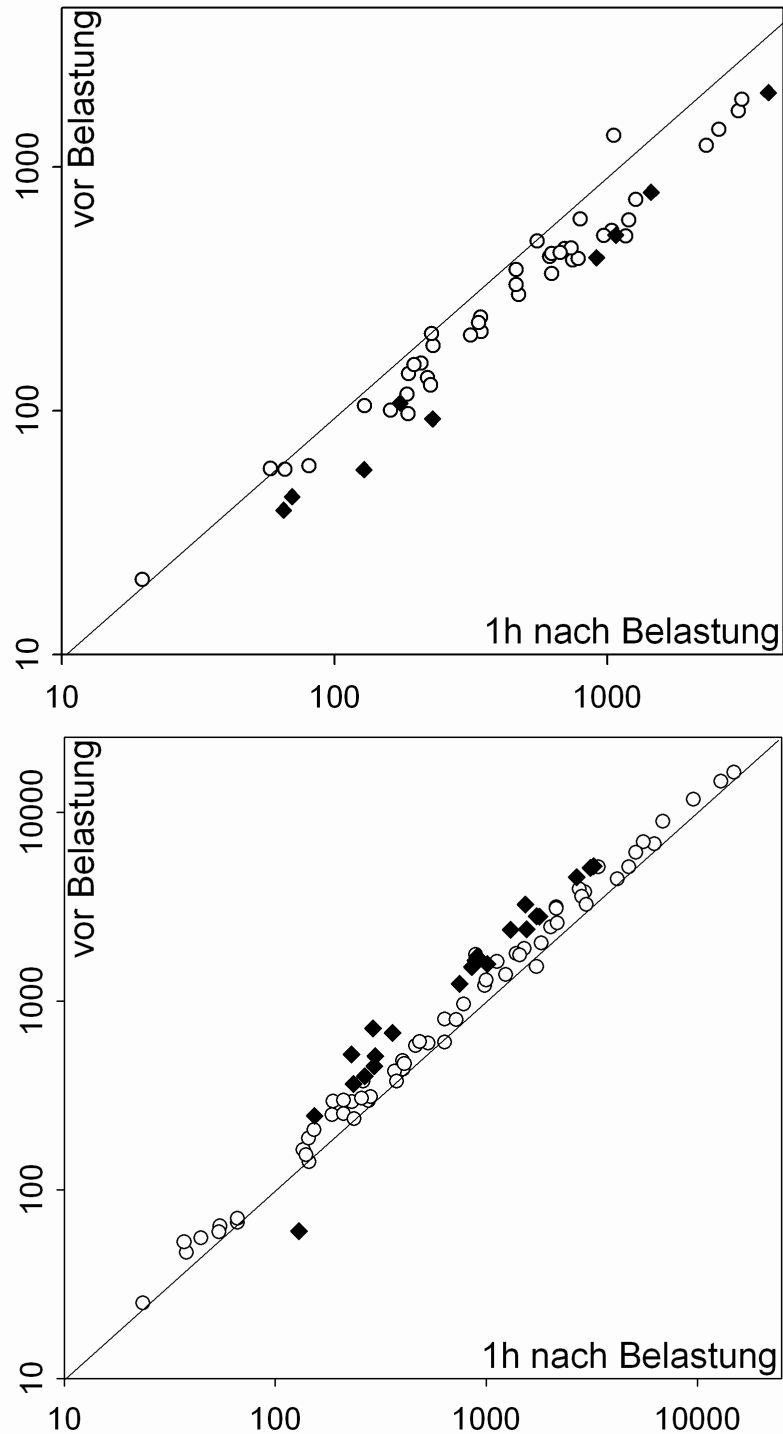
Die Darstellung der Probengruppierung in der HKA bot die Möglichkeit die Verteilung der individuell zusammengehörigen Proben zu betrachten. Wenn die x - Komponente als äquivalent der Belastungsintensität betrachtet wurde, so zeigte sich, dass die „moderate Belastung“-Proben bei jedem der Probanden zwischen den Proben der beiden Ruhezeitpunkte und der „erschöpfende Belastung“-Probe lagen.

Aufgrund der geringen Anzahl von Genen in der finalen Genliste für „moderate Belastung“ wurden keine HKA und keine Clusteranalyse durchgeführt. Zudem waren fast alle Gene dieser Liste Teil der finalen Genliste für „erschöpfende Belastung“.

#### **4.1.5. Vergleich von bereits publizierten Genexpressionsmustern mit Daten, die im Rahmen der Studie 1 erhalten wurden.**

In einer Arbeit von Connolly et al. wurde der Einfluss erschöpfender Belastung auf die Genexpression von PBMC getestet<sup>28</sup>. Es wurden Blutproben vor, direkt nach und eine Stunde nach erschöpfender Belastung entnommen. Die Genexpression der Proben wurde mit Affymetrix HG U133 A Arrays gemessen. Trotz einiger Unterschiede im experimentellen Design (PBMC statt WBZ, RNAlater statt Trizol, HG U 133 A statt HG U 133 A2.0) wurden die Ergebnisse aus Studie 1 mit den Ergebnissen die Connolly eine Stunde nach erschöpfender Belastung fand verglichen. 48 von 53 Genen, die Connolly nach Sport signifikant herab reguliert fand, waren in Studie 1 tendenziell ebenfalls herab reguliert. 73 von 78 Genen, die in der Connolly-Studie herauf reguliert waren, zeigten in der Studie 1 eine Regulation in dieselbe Richtung (Abbildung 5).

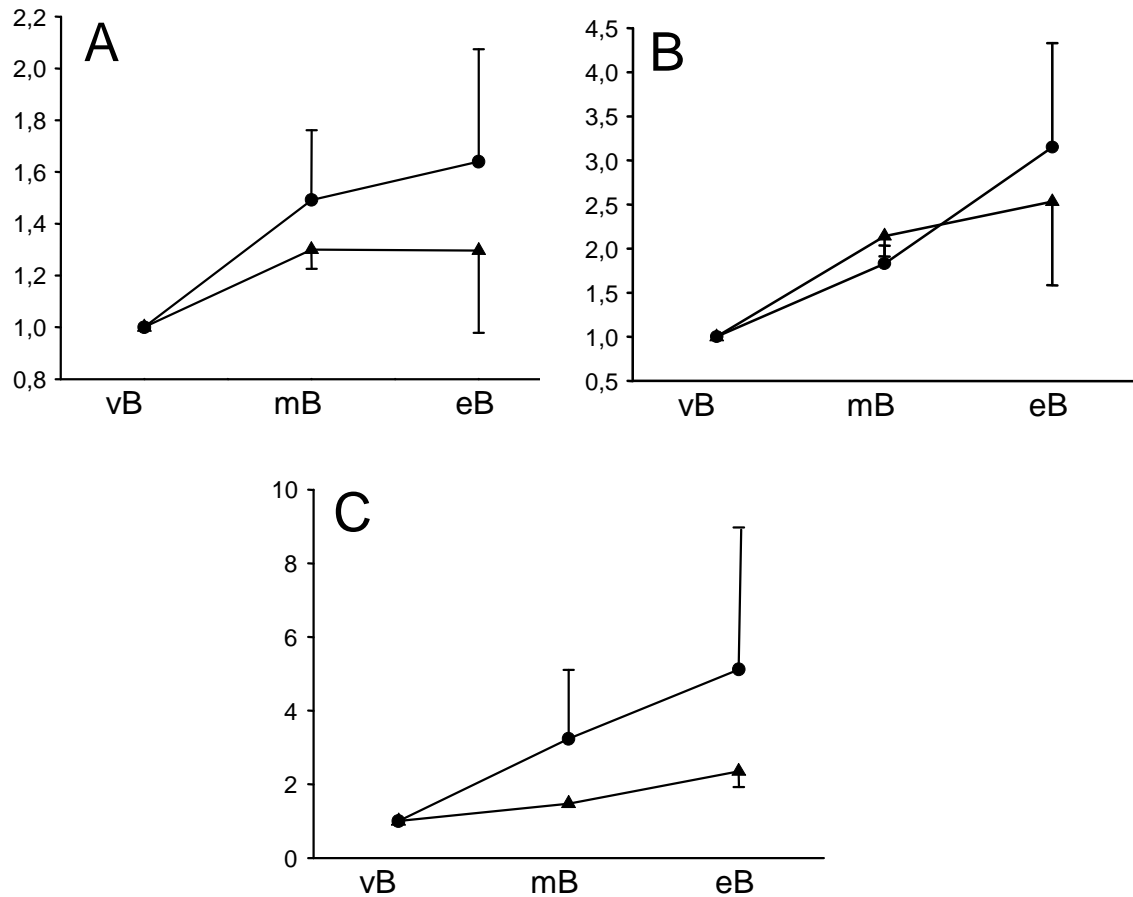
## Ergebnisse



**Abbildung 5: Übereinstimmung in der Genexpression in zwei voneinander unabhängigen Studien.** Es ist die Expression der Transkripte, welche von Connolly et al. 1h nach erschöpfender Belastung verändert reguliert gefunden wurden in den WBZ-Proben aus Studie 1 dargestellt. Auf der x-Achse ist das Expressionssignal 1h nach Belastung dargestellt, auf der y-Achse entsprechend die Expressionsstärke vor Belastung. Obere Abbildung: Transkripte, die nach der Studie von Connolly nach Sport herab reguliert wurden. Untere Abbildung: Transkripte, die in Connolly et al. <sup>28</sup> nach Sport herauf reguliert wurden. Die weißen Kreise symbolisieren Transkripte, die in Connollys Studie, jedoch nicht in Studie 1 signifikant verändert waren. Die schwarzen Rhomben symbolisieren Transkripte, die in beiden Studien signifikant verändert waren.

#### 4.1.6. Validierung der Ergebnisse mit RT PCR

Die Änderung der Expression von drei Genen der finalen Genliste für „erschöpfende Belastung“, S100P, MMP9 und HSPA1A, wurde mit Hilfe der RT-PCR bestätigt. (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Validierung von Expressionsänderungen mit Real-time-PCR.** A – S100P; B – MMP9; C – HSPA1A. Kreise symbolisieren die Arraydaten, Dreiecke die RT-PCR-Daten. Auf der x-Achse ist der Faktor aufgetragen, um den sich die Expression im Bezug auf „vor Belastung“ ändert. Alle Gene wurden nach Belastung stärker exprimiert. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte dargestellt: vor Belastung – vor Belastung; mB – nach moderater Belastung; eB – nach erschöpfender Belastung. An die einzelnen Messpunkte ist die Standardabweichung angetragen. Die Abbildung ist in dieser Form auch in der Veröffentlichung zu Studie 1 abgebildet <sup>38</sup>.

## **4.2. Nachweis des Einflusses physischer Belastung auf die Genexpressionsmuster von PBMC und T-Lymphozyten – Studie 2**

In dieser Studie wurde untersucht, welche Genexpressionsänderungen in Subpopulationen weißer Blutzellen als Reaktionen auf den Stimulus Sport stattfinden. Es wurde auch geprüft, ob die detektierten Genexpressionsänderungen mit denen aus Studie 1 identisch waren. Hierfür absolvierten drei Probanden einen erschöpfenden Belastungstest bei einer VO<sub>2</sub>max von 80%. Es wurde jeweils unmittelbar vor und eine Stunde nach der Belastung Blut entnommen und jeweils PBMC und T-Lymphozyten isoliert. Die Qualitätskontrolle mittels Durchflusszytometrie ergab, dass alle sechs T-Lymphozytenproben frei von anderen Zellpopulationen und somit geeignet für eine Genexpressionsanalyse waren.

### **4.2.1. Differentialblutbilder**

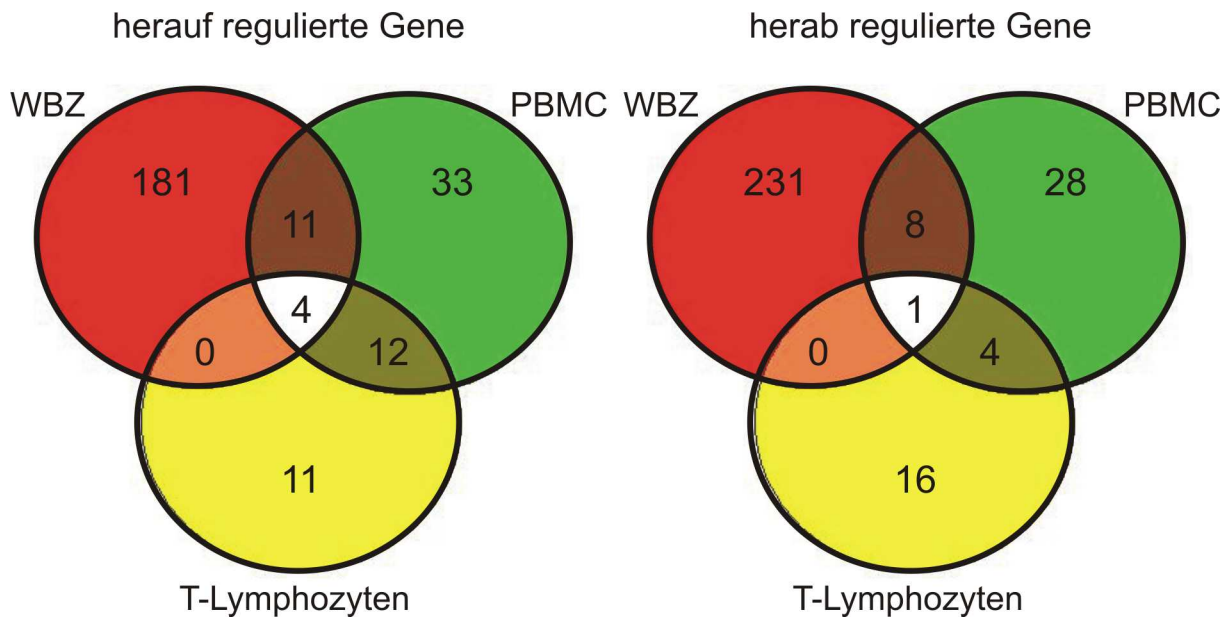
Die Differentialblutbilder der Teilnehmer zeigten eine deutliche, für den Zeitraum eine Stunde nach erschöpfender Belastung typische Subpopulations-Verschiebung<sup>13, 21</sup>. Die Anzahl der Granulozyten war nach dem Test erhöht, die der Lymphozyten vermindert. Unterschiede im Hämoglobingehalt des Blutes wurden nicht beobachtet. Da für einen Teilnehmer kein Blutbild nach dem Belastungstest vorlag, konnte keine Statistik angefertigt werden.

### **4.2.2. Erschöpfende Belastung verändert signifikant die Genexpression in PBMC und T-Lymphozyten**

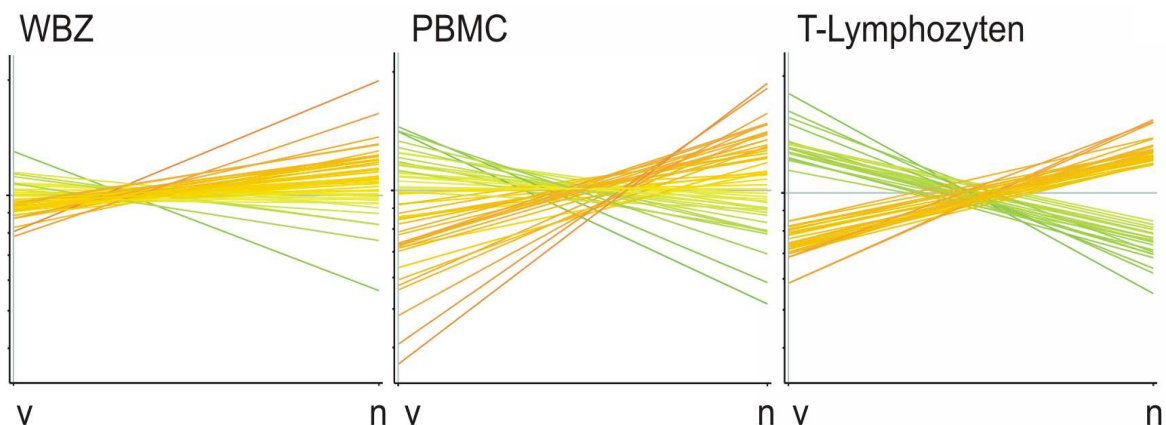
Den Vorfilter passierten in PBMC 17162, in T-Lymphozyten 16739 Transkripte. Nach dem Vorfilter wurde der 1,5-fach-Filter angewandt (siehe auch Abbildung 2). Anschließend wurde für die verbliebenen Transkripte ein T-Test ohne eine Korrektur für multiples Testen durchgeführt. In T-Lymphozyten waren 27 Transkripte signifikant herauf- und 21 herab reguliert, in PBMC entsprechend 60 und 41.

Viele der in T-Lymphozyten signifikant veränderten Transkripte waren auch in PBMC und den WBZ aus Studie 1 in derselben Richtung reguliert (siehe Abbildung 7 und 8). Dazu zählen die Gene der Hitzeschockproteine HSPA1A und HSPH1, welche in allen untersuchten Zellpopulationen signifikant herauf reguliert gefunden wurden. Das Gen des Prostaglandin D2 Rezeptors (PTGDS) war hingegen in allen drei Populationen signifikant herab reguliert.

## Ergebnisse



**Abbildung 7:** Das Schnittmengendiagramm zeigt die Überschneidungen der finalen Genlisten der drei untersuchten Zelltypen. Die finale Genliste für WBZ wurde in Studie 1 erstellt, die finalen Genlisten der PBMC und T-Lymphozyten in Studie 2.



**Abbildung 8:** Normierte Expression der Gene, die in T-Lymphozyten signifikant mehr als 1,5-fach durch erschöpfende Belastung verändert reguliert wurden. Links: die Expression dieser Gene in WBZ (Studie 1), Mitte: die Expression in PBMC (Studie 2), Rechts: die Expression in T-Lymphozyten (Studie 2). In jedem Einzeldiagramm ist der Zeitpunkt vor Belastung – v und der Zeitpunkt nach erschöpfender Belastung – n aufgetragen. Die Skalierung der y-Achse ist für alle drei Diagramme gleich gewählt.

Elf Transkripte wurden ausschließlich in T-Lymphozyten signifikant herauf reguliert gefunden (Abbildung 7). Diese Transkripte waren auch in den WBZ und den PBMC tendenziell herauf reguliert. Allerdings wurde diese Heraufregulation dort nicht als signifikant detektiert und die Expressionsänderung war kleiner als 1,5-fach. Eine analoge Beobachtung wurde für die ausschließlich in T-Lymphozyten herab regulierten Gene gemacht. Wie in Abbildung 8 deutlich wird, konnten in sortierten

Blutzellen verändert exprimierte Gene identifiziert werden, die in den komplexeren Zellgemischen durch andere Zellenpopulationen maskiert bzw. überlagert wurden

### **4.2.3. Einordnung der Gene in einem physiologischen Kontext**

Die in PBMC signifikant veränderten Gene konnten mittels „GO Browser“, den GO-Klassen „GO:6952:Abwehrreaktion“, „GO:6955:Immunantwort“, „GO:9607:Antwort auf biotische Reize“, „GO:50896: Antwort auf Reize“ und „GO:6950: Antwort auf Stress“ zugeordnet werden. In T-Lymphozyten war keine GO-Klasse mit mehr als zehn Transkripten signifikant ( $p$ -Wert  $<0,05$ ) besetzt.

### **4.2.4. Klassifizierung der Belastungsintensität unter Einbezug der Proben aus Studie 1**

Weil die in T-Lymphozyten signifikant verändert exprimierten Gene in WBZ (Studie 1) und PBMC eine tendenziell ähnliche Regulation zeigten, wurde untersucht, ob spezifische Genexpressionsmuster der WBZ, PBMC und T-Lymphozyten in den jeweils anderen Zellpopulationen wieder gefunden werden konnten. In diesem Kontext sollte auch geprüft werden, ob sich die Ergebnisse eines Probandenkollektivs auf ein anderes übertragen lassen. Hierfür wurde basierend auf den Expressionsmustern der Gene der finalen Genlisten aus WBZ, PBMC und T-Lymphozyten in den jeweils anderen Zellpopulationen klassifiziert, ob eine Probe in Ruhe oder nach erschöpfender Belastung entnommen wurde. Für den Vergleich wurden die „moderate Belastung“ nicht berücksichtigt, da es zu dieser Belastungsintensität in PBMC und T-Lymphozyten keine Entsprechung gab.

Anhand der Muster der Gene aus der finalen Genliste aus WBZ wurden alle PBMC-Proben der Gruppe „vor-“ bzw. „nach Belastung“ richtig zugeordnet. Für T-Lymphozyten versagte die Gruppen-Vorhersage basierend auf der finalen Genliste aus WBZ. Keine Probe wurde zugeordnet.

Mit den Expressionsmustern der Transkripte der finalen Genliste aus PBMC konnten 14 von 15 WBZ-Proben richtig in die Gruppe „vor-“ bzw. „nach erschöpfender Belastung“ eingeordnet werden.

Basierend auf der finalen Genliste aus T-Lymphozyten wurden 9 von 15 WBZ-Proben richtig vorhergesagt.

Mit den finalen Genlisten aus PBMC und T-Lymphozyten ließ sich die Gruppenzugehörigkeit der PBMC- und T-Zell-Proben wechselseitig klassieren.

### **4.3. Untersuchung der Effekte lang anhaltender intensiver physischer Belastung auf die Genexpression von T-Lymphozyten und Monozyten - Studie 3**

In Studie 1 und 2 wurde der Einfluss akuter, erschöpfender Belastung untersucht. In Studie 3 sollte geprüft werden, wie sich lang anhaltende intensive Belastung auf die Genexpression auswirkt. Dazu wurde in Monozyten und T-Lymphozyten Genexpressionsanalysen durchgeführt. Die Entnahme der Blutproben erfolgte im Rahmen der Tour de France 2005 in Zeiten höchster Belastung, direkt am Start und kurz vor Ende des Wettkampfes sowie in der auf die Tour folgenden Ruhephase mit geringer körperlicher Belastung. Zum Vergleich wurden auch Genexpressionsanalysen in Monozyten und T-Zellen von Kontrollprobanden durchgeführt.

#### **4.3.1. Qualitätskontrolle**

Von allen sortierten Proben musste eine T-Zell-Probe ausgeschlossen werden, da sie mit mehr als 5% Monozyten verunreinigt war. Sieben Proben hatten eine RNA-Konzentration, die für eine Microarrayanalyse nicht ausreichend war. Fünf Proben zeigten Zeichen von Degradation und waren daher nicht verwendbar. Somit wurden 71 von 84 Proben prozessiert und auf Arrays hybridisiert. Drei Hybridisierungen mussten wiederholt werden, da auf den betroffenen Arrays ein extrem hohes Hintergrundsignal (background/ noise) gemessen wurde. Dadurch lagen „call rate“ und Skalierungsfaktor außerhalb des akzeptablen Schwankungsbereiches. Drei Athleten-Datensätze mussten von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden, da zwei Arrays für die Parameter „call rate“ und „noise“ außerhalb des normalen Schwankungsbereiches und einer trotz ansonsten normaler Qualitätsmerkmale außerhalb der festgelegten Grenzwerte für „call rate“ lagen. Von den 18 Datensätzen der Kontrollprobanden mussten zwei ausgeschlossen werden, da sowohl „noise“ als auch „call rate“ außerhalb der Norm lagen.

Somit wurden abschließend 66 Datensätze ausgewertet. Die Anzahl der analysierten Proben pro Gruppe ist in Tabelle 2 aufgelistet (Material und Methoden 3.2.4.7).

#### **4.3.2. Identifikation von Genen, die durch lang anhaltende intensive Belastung verändert exprimiert wurden**

In einem ersten Schritt wurden nur die Proben der Athleten untereinander ohne einen Vergleich mit den Kontrollen analysiert.

Den Vorfilter passierten in T-Lymphozyten 37262 und in Monozyten 38099 Transkripte. Basierend auf den Vorfilterlisten wurden nun 1,5-fach-Filter Listen erstellt. Mit einem Kruskal-Wallis Test in Kombination mit Benjamini-Hochberg KMT (fdr=0,05) wurde dann nach signifikant verändert exprimierten Genen gesucht (siehe auch Abbildung 2). In den T-Lymphozyten waren 3832 Transkripte, in den Monozyten 2092 Transkripte signifikant verändert. Von den letztgenannten waren 73% auch Teil der finalen T-Lymphozyten-Genliste. In beiden Zelltypen waren die

## Ergebnisse

stärksten Änderungen in der Genexpression zwischen den Wettkampfzeitpunkten und dem Ruhepunkt zu beobachten.

Deutlich weniger Gene zeigten einen signifikanten Unterschied wenn Start und Ende des Wettkampfes verglichen wurden. Dies galt für beide Zelltypen. In T-Lymphozyten waren 167- in Monozyten 91 Transkripte signifikant verändert exprimiert.

In einer weiteren Auswertung wurden die Kontrollen mit in die Betrachtung einbezogen. In Tabelle 4 ist die Anzahl der Gene aufgelistet, die bei einer Veränderung von 1,5-fach zwischen zwei der vier experimentellen Gruppen verschieden waren.

**Tabelle 4: Anzahl der Gene, die im Vergleich von zwei der vier experimentellen Gruppen in Studie 3 mehr als 1,5-fach verschieden exprimiert waren.** Der Vergleich basiert auf einer Vorfilter Liste, die alle Transkripte einschließt, die in einer der vier Gruppen ein Expressionssignal >20 hatten.

Vergleich	Monozyten 1,5-fach Verändert	T-Lymphozyten 1,5-fach verändert
Ruhe – Kontrollen	942	2385
Ruhe – Start	1881	3271
Ruhe – Ende	1633	3447
Start – Ende	128	281
Kontrollen – Start	471	297
Kontrollen – Ende	281	429

Bei dem Vergleich der Genexpressionsmuster der Kontrollgruppe mit den Athleten fiel auf, dass zwischen den Kontrollen und der „Start“ bzw. „Ende“-Gruppe weniger Gene verändert reguliert waren als im Vergleich der Kontrollen mit der „Ruhe“-Gruppe. Auch bei der Auswertung aller vier experimentellen Gruppen zeigte sich, dass in T-Lymphozyten mehr Gene durch den Stimulus verändert reguliert wurden.

### **4.3.3. Gruppierung der Athleten-Proben mit Hilfe von Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse basierend auf den finalen Genlisten**

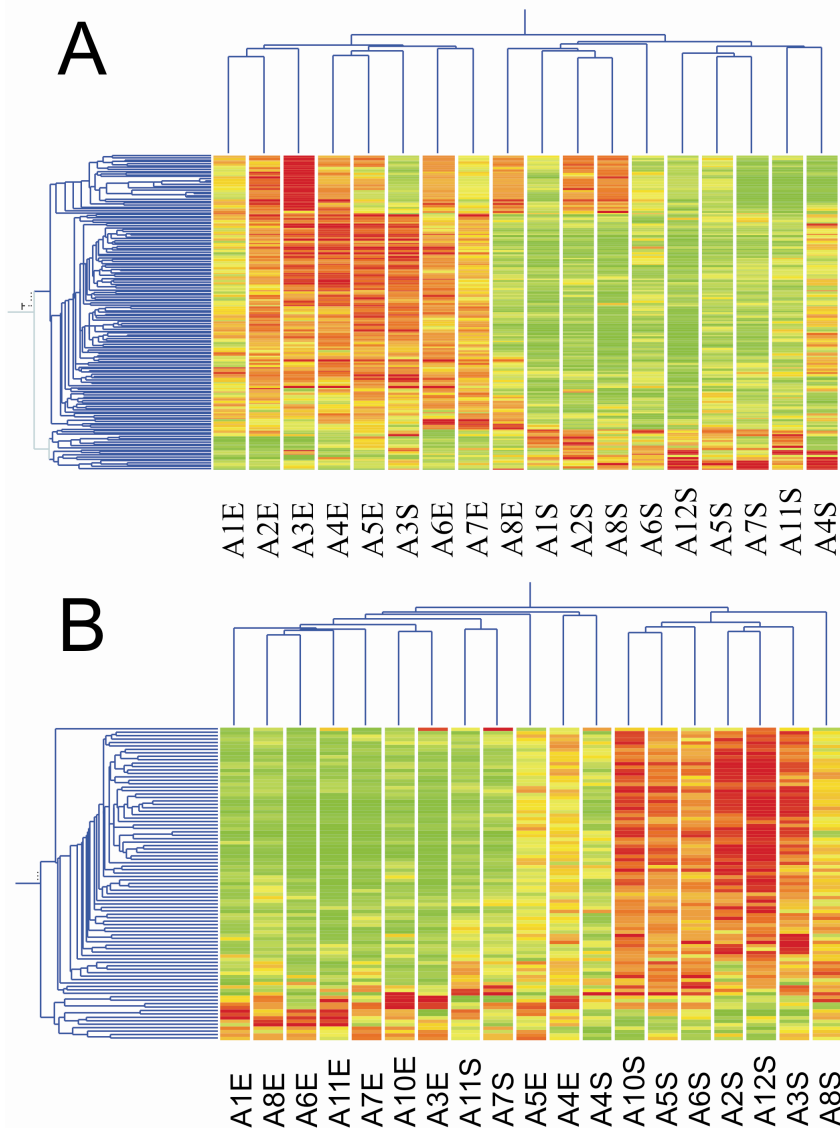
Wie bereits in Tabelle 4 ersichtlich, waren zwischen dem Ruhezeitpunkt und den einzelnen Wettkampfzeitpunkten wesentlich größere Unterschiede feststellbar als zwischen den beiden Wettkampfzeitpunkten. Entsprechend konnten durch Clusteranalysen, basierend auf den finalen Genlisten, in beiden Zelltypen die „Ruhe“- Proben deutlich von den Wettkampfproben getrennt werden. Eine



## Ergebnisse

Trennung der „Start“- und „Ende“-Proben basierend auf Clusteranalysen der Genexpression war jedoch nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

Um dennoch eine Trennung der Wettkampf-Proben zu ermöglichen, wurde auf die Listen zurückgegriffen, die nur jene Gene beinhalteten, die zwischen „Start“ und „Ende“ verschieden exprimiert waren (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Clusteranalyse zur Verdeutlichung des Effektes der Tour de France.** Prüfung der Eignung der signifikant (T-Test mit Benjamini-Hochberg KMT) mehr als 1,5-fach zwischen Start und Ende der TdF veränderten Gene, für eine Zuordnung der Einzelproben zur richtigen experimentellen Gruppe mit Hilfe einer Clusteranalyse. Im Bild A wurden die 18 T-Lymphozyten-Proben entsprechend der Expression von 167 Transkripten geclustert. Im Bild B wurden die 20 Monozyten-Proben entsprechend der Expression von 91 Transkripten geclustert.

Auch auf der Basis dieser Listen konnten die Proben nicht korrekt in ihre entsprechende Gruppe eingeordnet werden. Zwei T-Zell-Proben und drei

## Ergebnisse

Monozyten-Proben wurden falsch zugeordnet. Die Genlisten waren nicht geeignet, Individuen eindeutig einer experimentellen Gruppe zuzuordnen zu können.

Analoge Ergebnisse fanden sich auch bei Anwendung einer Hauptkomponentenanalyse (Daten nicht gezeigt).

### 4.3.4. Einordnung der signifikant in den Blutzellen der Athleten veränderten Gene in einen physiologischen Kontext

#### 4.3.4.1. Zuordnung der Gene zu GO-Klassen

Basierend auf den finalen Genlisten aus der Auswertung aller Athleten-Datensätze, wurde bestimmt, in welchen GO-Klassen eine veränderte Regulation durch den Stimulus „lang anhaltende Belastung“ beobachtet werden konnte (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Dargestellt ist die Anzahl der Transkripte die zur Schnittmenge der genannten GO-Klasse mit den finalen Genlisten aus Monozyten und T-Lymphozyten gehören, und wie viele dieser Transkripte zu den Zeitpunkten des Wettkampfes höher oder niedriger exprimiert waren als zu dem Ruhezeitpunkt. Nur die fünf am signifikantesten beeinflussten GO-Klassen pro GO-Ontologie sind aufgeführt. G steht für die Anzahl der Transkripte in der Schnittmenge der finalen Genliste mit der GO-Klasse. ↑/↓ steht für die Anzahl der Transkripte deren Expressionslevel in der Wettkampfphase höher/niedriger als in der Ruhephase ist. Die Überschneidungs-Signifikanz zwischen finaler Genliste und GO-Klasse ist: \* ≤ 0,05, \*\* ≤ e<sup>-5</sup>, \*\*\* ≤ e<sup>-10</sup>, \*\*\*\* ≤ e<sup>-20</sup>.

GO – Klasse	Monozyten			T-Lymphozyten		
	G	↓	↑	G	↓	↑
„GO:8150: Biologischer Prozess“						
„GO:6952: Abwehrreaktion“	103***	88	15	209***	177	32
„GO:6955: Immunantwort“	84**	69	15	206***	178	28
„GO:6968: zelluläre Abwehrreaktion“	-	-	-	40***	34	6
„GO:7165: Signaltransduktion“	272**	184	88	-	-	-
„GO:7242: intrazelluläre Signal Kaskaden“	126**	82	44	-	-	-
„GO:9607: Reaktion auf biotische Reize“	106***	91	15	209***	177	32
„GO:43207: Reaktion auf äußere biotische Reize“	-	-	-	107***	95	12
„GO:3674: Molekulare Funktion“						
„GO:30695: GTPase Regulator Aktivität“	57	42	15	82**	64	18
„GO:5083: kleine GTPasen Regulator Aktivität“	41	30	11	52**	41	11
„GO:5096: GTPase Aktivator Aktivität“	33**	26	7	48**	38	10
„GO:30234: Enzym Regulator Aktivität“	83**	55	28	134**	99	35
„GO:16773: Phosphotransferase Aktivität“	93**	51	42	-	-	-
„GO:3678: DNA Helikase Aktivität“	-	-	-	19**	8	11
„GO:5575: Zelluläre Komponente“						
„GO:5623: Zelle“	791**	430	361	1459**	873	586

## Ergebnisse

„GO:5681: Spliceosomen Komplex“	12	4	8	-	-	-
„GO:5622: Intrazellulär“	570	290	280	1071**	579	492
„GO:43226: Organelle“	483**	242	241	-	-	-
„GO:43227: Membran-gebundene Organelle“	424	216	208	801**	419	382
„GO:5634: Nukleus“	-	-	-	593**	286	307
„GO:5773: Vakuole“	-	-	-	31	31	0

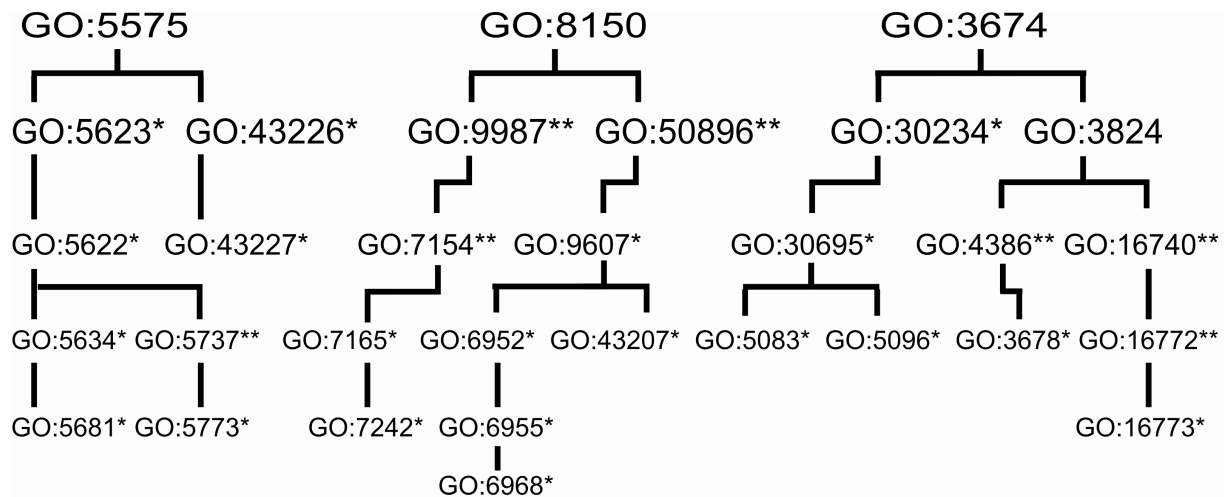
In den T-Lymphozyten wurde die höchste Übereinstimmung zwischen der finalen Genliste und GO-Klassen in der Ontologie „GO:8150: Biologischer Prozess“ für die Klassen „GO:9607: Reaktion auf biotische Reize“, „GO:6952: Abwehrreaktion“ und „GO:6955: Immunantwort“ mit Signifikanzen von  $\sim 3e-21$  bis  $\sim 4e-19$  gefunden. Für die GO-Klassen der Ontologien „GO:8150: Biologischer Prozess“ und „GO:3674: Molekulare Funktion“ wurde beobachtet, dass die ihnen zugeordneten Transkripte aus den finalen Genlisten zum größten Teil in der Ruhephase höher exprimiert waren als während des Wettkampfes. So waren in den oben genannten GO-Klassen der Ontologie „GO:8150: Biologischer Prozess“ jeweils mehr als 85% der Transkripte in der Wettkampfphase herab reguliert

In den Monozyten waren zum Teil dieselben GO-Klassen wie in den T-Lymphozyten unter den Top Fünf der am stärksten verändert regulierten GO-Klassen. Der in den T-Lymphozyten beobachtete Trend einer vorwiegenden Herabregulation während des Wettkampfes war in den Monozyten wesentlich schwächer ausgeprägt.

GO-Klassen, die in Tabelle 5 in der zelltypspezifischen Rangliste der fünf am stärksten besetzten GO-Klassen nur für einen Zelltyp gezeigt wurden, waren auch im jeweils anderen Zelltyp signifikant verändert reguliert, standen aber an einem niedrigeren Platz in der Rangfolge.

Die fünf am stärksten verändert regulierten GO-Klassen jeder Ontologie waren in der Regel direkt miteinander verwandt, d.h. sie beschreiben ähnliche Prozesse und beinhalten zum Teil dieselben Gene (Abbildung 10). Die übergeordneten Begriffe waren zum größten Teil ebenfalls signifikant durch den Stimulus verändert reguliert.

## Ergebnisse



**Abbildung 10: Hierarchische Beziehungen zwischen den GO-Klassen, deren Mitglieder durch lang anhaltende intensive physische Belastung am stärksten verändert reguliert wurden.** Hier sind die fünf signifikantesten GO-Klassen beider Zelltypen gemeinsam in einem Diagramm dargestellt. \* Steht für den höchsten Signifikanzwert einer GO-Klasse in der jeweiligen Ontologie, d.h. Signifikanzwerte von 0,008 bis  $\sim 3e-21$ ; \*\* zeigt, dass die jeweilige Klasse in mindestens einem Zelltyp signifikant verändert reguliert gefunden wurde, d.h. Signifikanzwerte  $< 0,05$ . Nachfolgend die vollen Namen der gezeigten GO-Klassen, geordnet nach Zahlenwert: „GO:3674: Molekulare Funktion“, „GO:3678: DNA Helikase Aktivität“, „GO:3824: Katalytische Aktivität“, „GO:4386: Helikase Aktivität“, „GO:5083: kleine GTPasen Regulator Aktivität“, „GO:5096: GTPase Aktivator Aktivität“, „GO:5575: Zelluläre Komponente“, „GO:5622: Abwehrreaktion“, „GO:5623: Zelle“, „GO:5634: Nukleus“, „GO:5681: Spliceosomen Komplex“, „GO:5737: Zytoplasma“, „GO:5773: Vakuole“, „GO:6952: Abwehrreaktion“, „GO:6955: Immunantwort“, „GO:6968: zelluläre Abwehrreaktion“, „GO:7154: Zellkommunikation“, „GO:7165: Signaltransduktion“, „GO:7242: intrazelluläre Signal Kaskaden“, „GO:8150: Biologischer Prozess“, „GO:9607: Reaktion auf äußere Reize“, „GO:9987: Zellulärer Prozess“, „GO:16740: Transferase Aktivität“, „GO:16772: Transferase Aktivität“, „GO:16773: Phosphotransferase Aktivität“, „GO:30234: Enzym Regulator Funktion“, „GO:30695: GTPase Regulator Aktivität“, „GO:43207: Reaktion auf äußere biotische Reize“, „GO:43226: Organelle“, „GO:43227: Membran-gebundene Organelle“, „GO:50896: Antwort auf Reize“

### 4.3.4.2. Zuordnung der Gene zu KEGG-Stoffwechselwegen

Für die Übereinstimmung zwischen finaler Genliste und jeweiligem KEGG-Stoffwechselweg wurde ein p-Wert berechnet, nach dem eine Rangfolge der am stärksten veränderten Wege erstellt werden konnte (Tabelle 6).

**Tabelle 6: KEGG–Stoffwechselwege deren Mitglieder in Folge lang anhaltender intensiver Belastung in T-Lymphozyten signifikant verändert reguliert waren.** Die zu den jeweiligen Stoffwechselwegen bzw. physiologischen Prozessen gehörenden, hier gezeigten Gene waren in den finalen Genlisten enthalten. ↓ Das Gen ist während des Wettkampfes im Vergleich zur Ruhephase herab reguliert. ↑ Das Gen ist während des Wettkampfes im Vergleich zur Ruhephase herauf reguliert.

Bezeichnung des KEGG Stoffwechselweges	p-Wert	signifikant veränderte Mitglieder
„durch Natürliche Killerzellen vermittelte Zytotoxizität“	8,80E-08	FCERG1↓, ITGAL↓, ITGB1↓, GZMB↓, SYK↓
„Antigen Prozessierung und Präsentation“	1,50E-07	HLA-DRA↓, HLA-DRB3↓, HLA-F↓, IFI30↓
„Insulin Signal Weg“	5,50E-06	FLOT2↓, CRK↓, RAPGEF1↓, RAPGEF6↓
„Apoptose“	1,70E-04	IRAK1↓, BCL1L2↓, CASP8↓, NFKB2↓
„Zell Zyklus“	1,30E-03	CCND2↑, CDK6↑, CDKN1C↓, YWHAZ↑

In den Monozyten waren die drei am signifikantesten besetzten KEGG-Stoffwechselwege (Tabelle 6) die gleichen wie in den T-Lymphozyten. In beiden Zelltypen waren die verändert regulierten Gene, die den genannten KEGG-Stoffwechselwegen zugeordnet wurden weitgehend die Selben.

Neben der beschriebenen Detektion von verändert regulierten KEGG-Stoffwechselwegen über die Bestimmung eines Überlappungs-Signifikanzwertes, wurden auch solche Stoffwechselwege näher untersucht, die eng mit der immunzellenspezifischen Physiologie verknüpft sind oder im Mittelpunkt von sportmedizinischen Publikationen standen. Glukose ist eine der wichtigsten Energiequellen für Immunzellen <sup>39, 40</sup>, daher wurden sowohl die Regulation der Glykolyse als auch des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels betrachtet. Erschöpfender Ausdauersport ist oft mit einer durch Sport induzierten Bronchokonstriktion assoziiert. Als Ursache hierfür werden unter anderem Leukotriene gesehen <sup>41</sup>. Diese werden hauptsächlich von polymorphonukleären Zellen und Makrophagen produziert <sup>42</sup>. Es wurde jedoch auch mehrfach gezeigt, dass Lymphozyten spezifisch auf Leukotriene reagieren <sup>43,44, 45</sup> und auch selbst Leukotriene produzieren <sup>46</sup>. Daher wurde auch der KEGG-Stoffwechselweg „Arachidonsäuremetabolismus“ eingehender untersucht.

Auf diesem Weg wurde deutlich, dass auch die Gene wichtiger Schlüsselenzyme der Glykolyse, des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels und des Arachidonsäurestoffwechsels durch lang anhaltende Belastung verändert reguliert wurden (Tabelle 7). Dabei waren die meisten Gene während des Wettkampfes herab reguliert.

## Ergebnisse

**Tabelle 7: Stoffwechselwege, aus denen nur wenige zugehörige Gene Mitglied der finalen Genlisten waren, wobei diese Gene aber für Schlüsselenzyme bzw. Schrittmacherenzyme codieren.** Es werden alle Mitglieder des gezeigten KEGG-Weges aufgezählt, die Teil der finalen Genliste aus Monozyten und T-Lymphozyten waren. Die mit einem \* gekennzeichneten Gene waren in beiden Zelltypen Teil der finalen Genliste.

„Pentose Phosphat Stoffwechsel“	Transketolase, Transaldolase 1, Fruktose-1,6-Bisphosphatase, 1, 6-Phosphoglukonolaktone, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase*, Phosphorybosyl Pyrophosphat Synthetase 2*
„Glykolyse und Glukogenese“	Phosphoglycerat Kinase 1*, Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase, Aldehyd Dehydrogenase 3, Enolase 1, Fruktose-1,6-bisphosphatase 1, Hexokinase 3*, Pyruvat Kinase*
„Arachidonsäurestoffwechsel“	Prostaglandin D2 Synthase*, Aldo-keto Reduktase Typ 3*, Arachidonate 5-Lipoxygenase, Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 1, Thromboxan A Synthase 1

Diese Stoffwechselwege wurden einer eingehenderen Analyse unterzogen. Alle Gene die den Vorfilter passiert hatten und den Stoffwechselwegen zugeordnet werden konnten, wurden hinsichtlich ihrer Regulation betrachtet. Es zeigte sich, dass in den KEGG-Stoffwechselwegen „Pentose-Phosphat-Stoffwechsel“, „Glykolyse und Glukogenese“ und „Arachidonsäurestoffwechsel“ auch die nicht signifikant veränderten Gene, die gleiche Richtung der Expressionsänderung wie die signifikant veränderten Gene aufwiesen. Diese Beobachtung wurde in beiden Zelltypen gemacht. Als Beispiel für die Beobachtung ist die Regulation der Gene der Enzyme der Glykolyse in Abbildung 11 dargestellt.

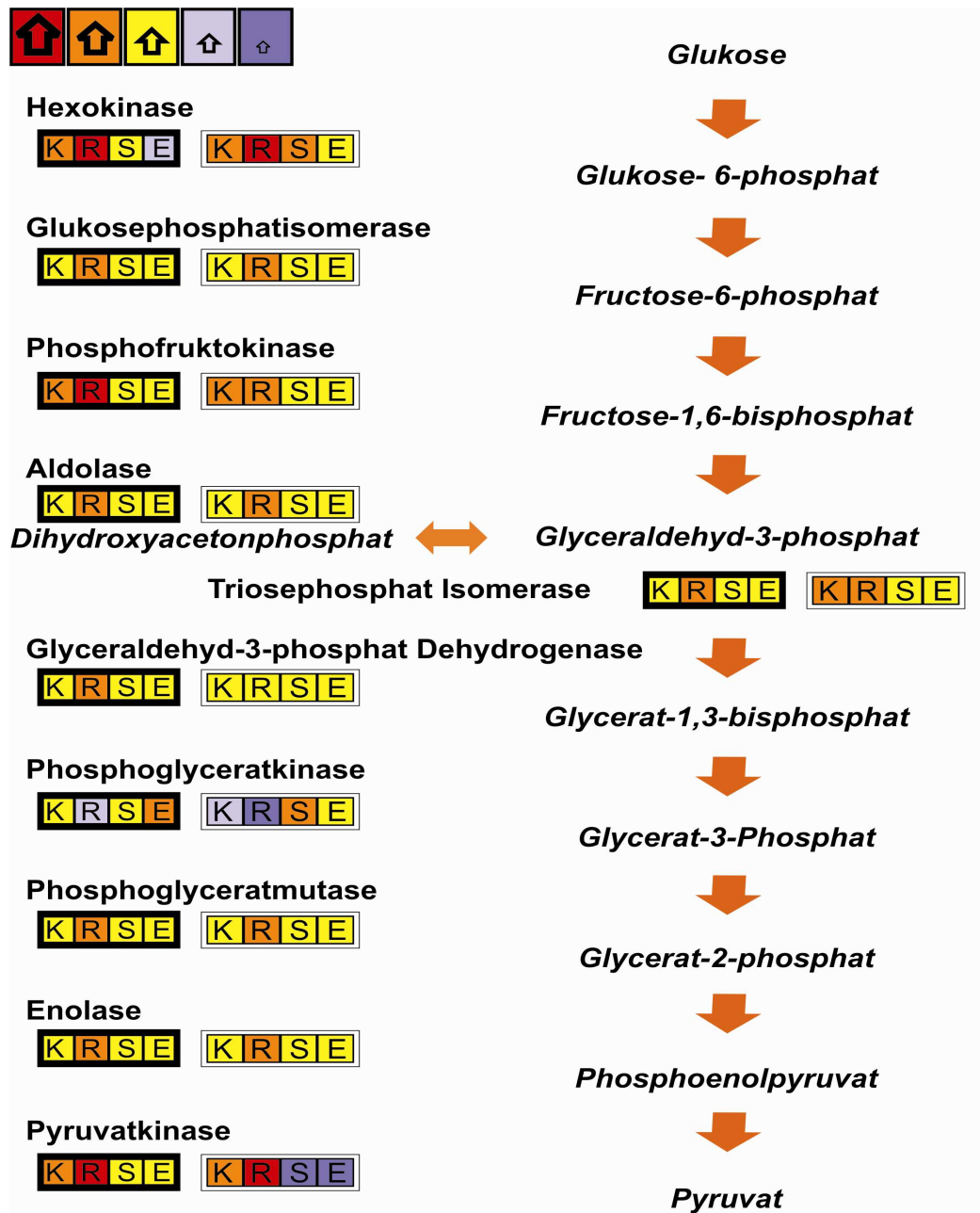


Abbildung 11: Vereinfachte Darstellung des enzymatischen Glukoseabbaus zur Verdeutlichung der Herabregulation der zugehörigen Gene während der Tour de France im Vergleich zur Ruhe. Unter jedem Enzym ist die normierte Signalstärke in jeder der vier experimentellen Gruppen dargestellt. Der linke Block zeigt jeweils die Expression in den T-Lymphozyten, der rechte Block analog die der Monozyten. K – Kontrollen, R – Athleten in der Ruhephase, S – Athleten zum Start der TdF, E – Athleten zum Ende der TdF. Die Kolorierung der einzelnen Boxen symbolisiert die Signalstärke, wobei, wie ganz oben links dargestellt, rot für das höchste und stahlblau für das niedrigste Signal steht. Jedes Gen mit Ausnahme der Phosphoglyceratkinase war in beiden Zelltypen während des Wettkampfes herab reguliert. Phosphoglyceratkinase 1, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Aldehyd-Dehydrogenase 3, Enolase 1, Fruktose-1,6-bisphosphatase 1, Hexokinase 3 und Pyruvatkinase waren in T-Lymphozyten signifikant verändert reguliert. In Monozyten waren Phosphoglyceratkinase 1, Hexokinase 3 und Pyruvatkinase signifikant verändert.

#### **4.3.4.3. Ähnlichkeiten im Regulationsmuster der Gene aus GO-Klassen und KEGG-Stoffwechselwegen**

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, ist für die hochsignifikant besetzten GO-Klassen in der Ontologie „GO:8150:Biologischer Prozess“ eine überwiegende Herabregulation von Genen durch die intensive, lang anhaltende Belastung ersichtlich. Dieses Phänomen wurde auch in den genannten KEGG-Stoffwechselwegen beobachtet. Daher wurden ausgewählte GO-Klassen und KEGG-Stoffwechselwege hinsichtlich der Regulation ihrer Gene gemeinsam betrachtet, um mögliche Gemeinsamkeiten im Regulationsmuster aufzudecken.

In die Betrachtung wurden die hoch signifikant verändert regulierten GO-Klassen, die in der GO-Hierarchie auf der vierten Ebene liegen, einbezogen (Abbildung 10). Auf dieser Ebene sind die Genlisten nicht so umfangreich wie es z.B. auf Ebene 1 in der Ontologie „GO:8150:Biologischer Prozess“ der Fall ist. Vielmehr sind die GO-Klassen dieser Ebene speziell auf einen Stimulus ausgerichtet. Für die T-Lymphozyten wurden die GO-Klassen „GO:43207: Reaktion auf äußere biotische Reize“ und „GO:6952: Abwehrreaktion“ und für die Monozyten die GO-Klassen „GO:7165: Signaltransduktion“ und „GO:6952: Abwehrreaktion“ in den Vergleich einbezogen. Von den verändert regulierten KEGG-Stoffwechselwegen wurden jene zwei gewählt, die die höchste Signifikanz der Übereinstimmung mit den finalen Genlisten zeigten. Zusätzlich wurden die Glykolyse, der Pentose-Phosphat-Stoffwechsel und der Arachidonsäurestoffwechsel einbezogen.

Die normierte Expression aller Gene der ausgewählten GO-Klassen und KEGG-Stoffwechselwege wurde zu jedem Zeitpunkt gemittelt und graphisch aufgetragen (Abbildung 12). In die Grafik wurden die Mittelwerte des Kontrollkollektivs ebenfalls eingetragen, um einen Anhaltspunkt für die durchschnittliche Expression der Gene in Nicht-Hochleistungssportlern deutlich zu machen.



## Ergebnisse

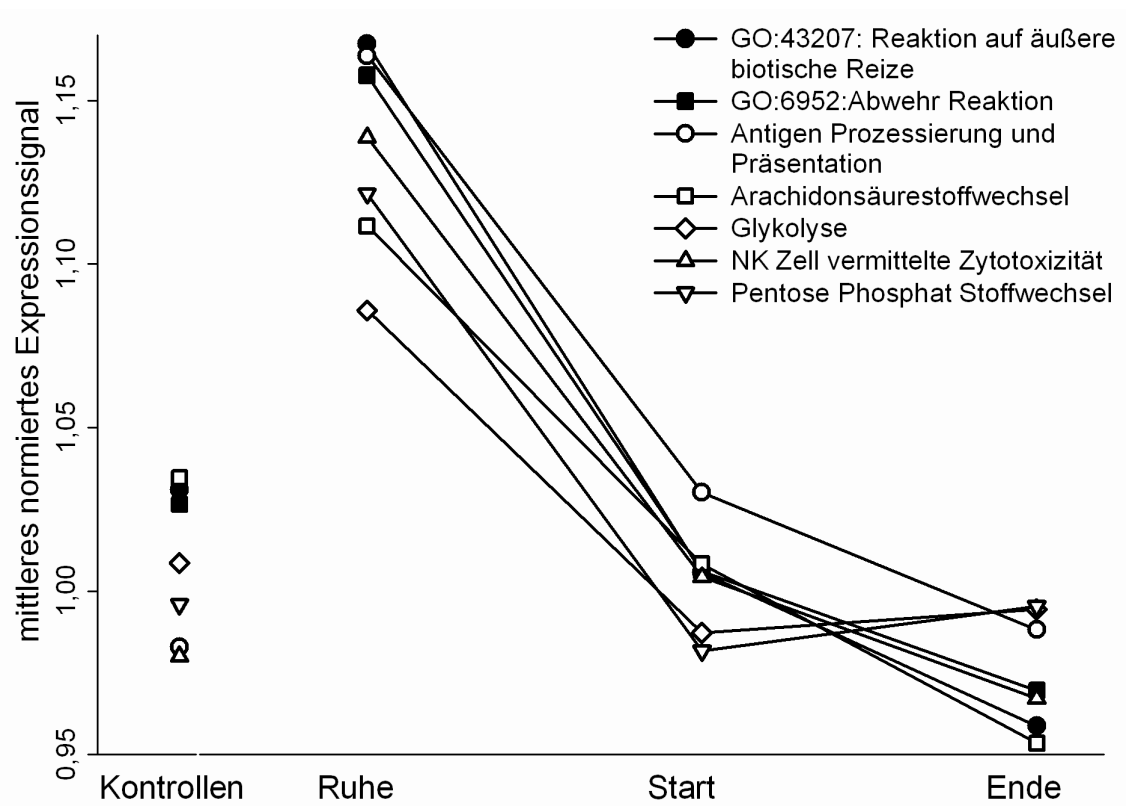
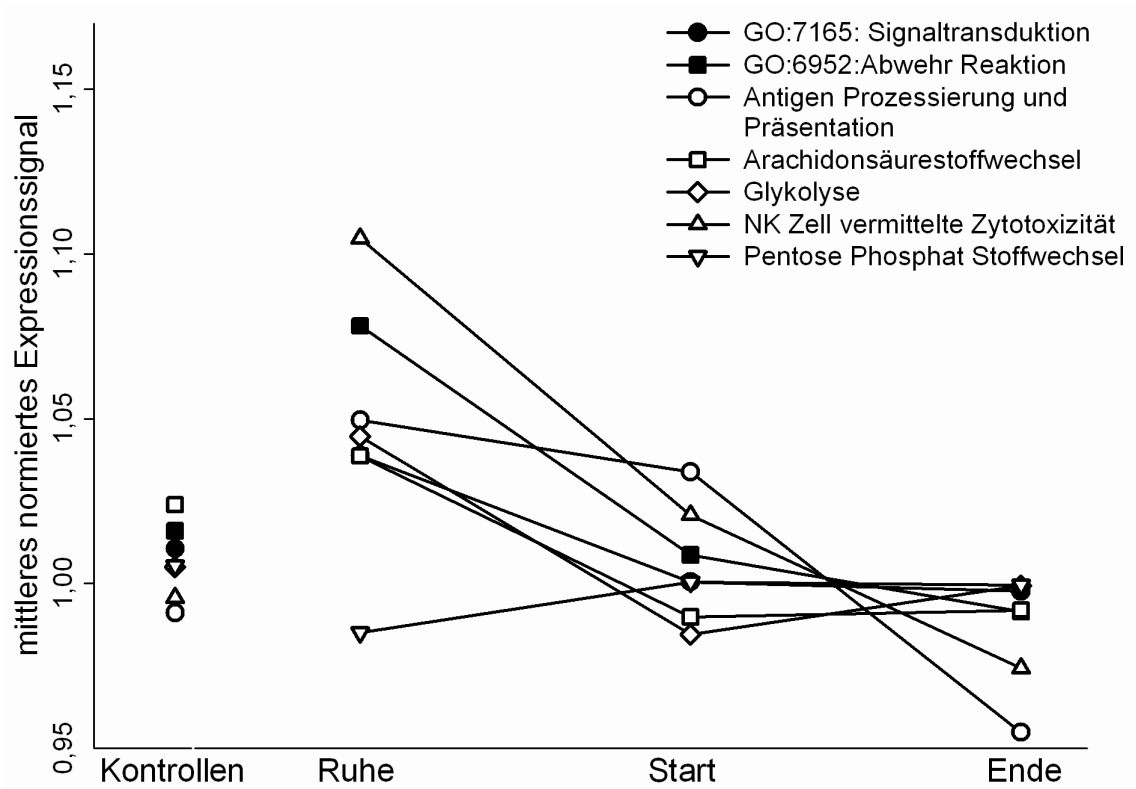


Abbildung 12: Darstellung des durchschnittlichen, normierten Expressionssignale aller Gene der dargestellten GO-Klassen bzw. KEGG-Stoffwechselwege. Monozyten (oben) und T-Lymphozyten (unten).

## Ergebnisse

Bei der Betrachtung der gemittelten Expression der in Abbildung 12 gezeigten GO-Klassen bzw. KEGG-Stoffwechselwege zeigte sich, dass in beiden Zelltypen das gemittelte Expressionsniveau in der Ruhephase der Sportler am höchsten war. Eine Ausnahme war die Expression der Gene des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels in den Monozyten. Hier war die mittlere Expression der Gene in der Ruhephase der Athleten niedriger als in den Kontrollen. In den Monozyten waren die Veränderung der gemittelten Genexpression bezogen auf den Unterschied zwischen „Ruhe“ und „Start“ in jedem gezeigten Stoffwechselweg geringer als in den T-Lymphozyten.

Für jeden möglichen Vergleich der vier experimentellen Gruppen wurden Signifikanzwerte per T-Test ermittelt (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Signifikanzwerte (T-Test) zu den Vergleichen der Expression aller Gene der genannten GO bzw. KEGG Gruppen in Abbildung 12.** Verglichen wurden die Werte in folgenden Gruppen: K – Kontrollen, R – Athleten in Ruhe, S – Start des Wettkampfes, E – Ende des Wettkampfes.

	K zu R	K zu S	K zu E	R zu S	R zu E	S zu E
<b>Monozyten</b>						
„GO:7165:Signaltransduktion“	8,9E-26	1,3E-11	3,6E-19	3,2E-46	7,6E-54	0,0397
„GO:6952:Abwehrreaktion“	2,5E-18	0,0889	4,3E-09	1,3E-22	1,8E-34	2,5E-05
„Antigen Prozessierung und Präsentation“	0,0113	7,3E-03	5,9E-03	0,5222	4,6E-05	8,5E-07
„Arachidonsäure Metabolismus“	0,2793	6,4E-04	2,8E-03	3,6E-04	1,0E-03	8,4E-01
„Glykolyse und Glukogenese“	1,9E-03	2,9E-03	0,3977	2,3E-06	2,8E-04	0,0137
„NK Zell vermittelte Zytotoxizität“	2,4E-09	3,0E-03	8,4E-04	1,1E-05	3,4E-12	3,6E-07
„Pentose Phosphat Stoffwechsel“	0,4001	0,7419	0,6635	0,5214	0,5314	0,9434
<b>T-Lymphozyten</b>						
„GO:43207:Reaktion auf äußere biotische Reize“	1,1E-20	3,6E-03	3,1E-15	9,3E-35	2,0E-52	4,7E-16
„GO:6952:Abwehrreaktion“	5,1E-34	9,4E-04	6,7E-18	1,1E-52	1,7E-74	1,0E-14
„Antigen Prozessierung und Präsentation“	2,9E-07	0,014	0,806	1,1E-04	1,3E-06	0,049
„Arachidonsäurestoffwechsel“	1,8E-03	4,6E-03	2,5E-16	3,5E-05	1,4E-09	1,0E-09
„Glykolyse und Glukogenese“	1,8E-04	6,9E-03	0,093	1,6E-06	9,3E-06	0,319
„NK Zell vermittelte Zytotoxizität“	2,8E-16	1,2E-03	0,133	6,5E-13	1,8E-18	1,0E-06
„Pentose Phosphat Stoffwechsel“	1,1E-03	0,321	0,972	2,3E-04	8,9E-04	0,279

Die Signifikanzwerte bestätigten, dass die Unterschiede zwischen allen experimentellen Gruppen in den T-Lymphozyten meist größer als in den Monozyten waren. Des Weiteren hatte die Genexpression der Kontrollen in beiden Zelltypen in der Regel eine größere Ähnlichkeit zu den GEM der Wettkampfzeitpunkte als zur Genexpression in der Ruhephase der Athleten.

### 4.3.5. Validierung der Ergebnisse mit RT-PCR

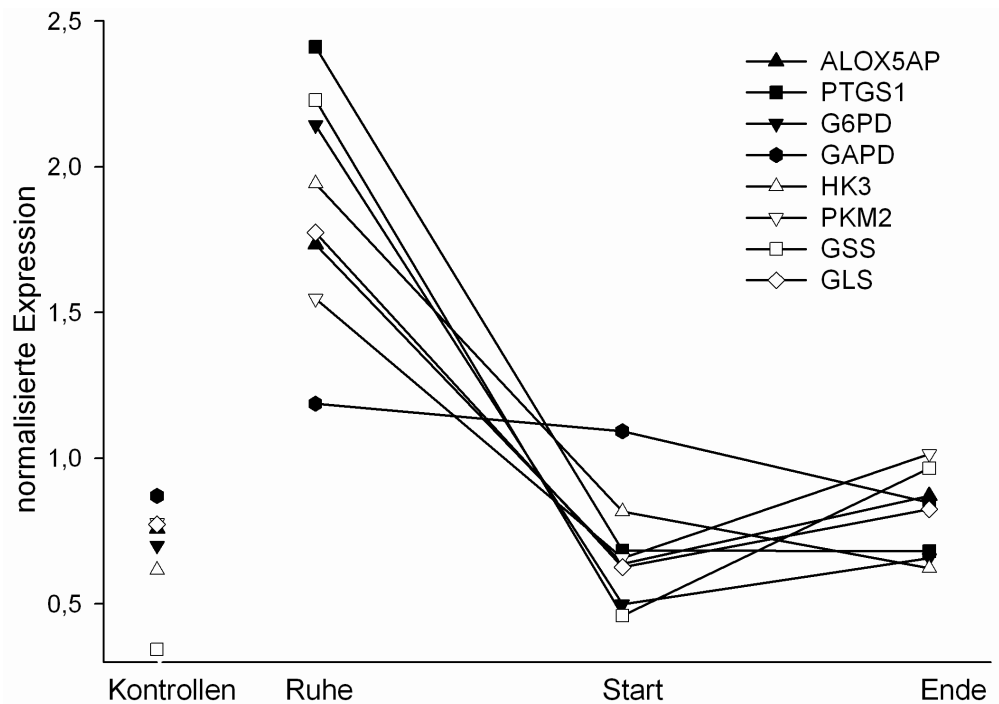
Ausgewählte Gene die in Studie 3 während der TdF herab reguliert waren, wurden unter Zuhilfenahme von RT-PCR validiert (Abbildung 13). Es wurden hauptsächlich Gene aus dem Kohlenhydrat-, dem Glutamin- und dem Arachidonsäurestoffwechsel ausgewählt, um die Expressionsunterschiede in diesen Stoffwechselwege genauer zu untersuchen.

In T-Lymphozyten waren die Gene ALOX5, BCL2L1, CD69, GLUD1, LEPR, PGK1 und TGFB1 in den Wettkampfproben niedriger als in der Ruhe exprimiert. Jedoch waren diese Resultate nicht signifikant (T-Test p-Wert >0,05). Die Gene ALOX5AP, GLS, G6PD, GAPD, GSS, HK3, PTGS1 und PKM2 waren signifikant (T-Test p-Wert < 0.05) in den Wettkampfproben im Vergleich zur Ruhe herab reguliert. Ergänzend wurde die Expression der Gene ALOX5AP, GAPD und GSS mittels RT-PCR validiert, obwohl sie auf den Arrays nicht signifikant verändert waren.

Die vorgenannten Gene wurden mittels RT-PCR sowohl in T-Lymphozyten als auch Monozyten gemessen. Dabei zeigte sich, dass Gene die in der Microarrayanalyse in den Monozyten keine signifikante Veränderung aufwiesen bei Untersuchung mittels RT-PCR als während des Wettkampfes signifikant herauf reguliert gefunden wurden. Das betraf die ALOX5, BCL2L1, G6PD, GLUD1, PTGS1 und GSS. Die Expression der anderen Gene war unverändert. CD69 wurde in Monozyten nicht bestimmt.

Die PGK1 wurde in der Genexpressionsanalyse in beiden Zelltypen während der TdF signifikant herauf reguliert gefunden. Dieses Ergebnis wurde mit RT-PCR nicht bestätigt, hier war das Gen in den Proben der Athleten unverändert exprimiert.

## Ergebnisse



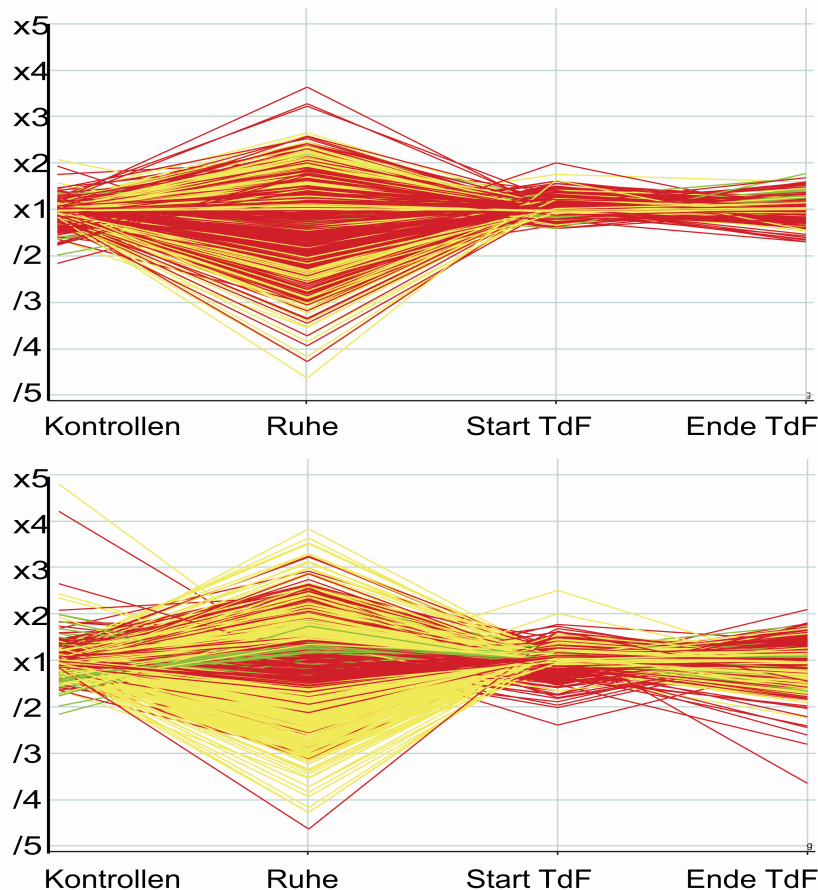
**Abbildung 13: Validierung der Arraydaten aus T-Lymphozyten mit RT-PCR.** Darstellung der gemittelten Genexpression in der Kontrollgruppe und in den Athleten zu den drei Entnahmezeitpunkten. Dargestellt sind nur die Gene, deren Expression in der RT-PCR signifikant zwischen den drei Athleten-Gruppen verschieden waren. Auf der y-Achse ist die normierte Expression dargestellt. Jedes einzelne Gen wurde auf die Expression von Gamma Aktin normalisiert und durch den Mittelwert geteilt, der sich aus den Messungen in den vier Gruppen ergibt.

### 4.3.6. Unterschiede in der Genexpression der Monozyten und T-Lymphozyten von Kontrollen und Athleten

Die Genexpression in den Proben der Kontrollen wurde eingehender mit den Proben der Athleten in Ruhe verglichen, um herauszufinden wie sich lang anhaltende Belastung auf die „Ruhe-Expressionsmuster“ eines Menschen auswirkt.

## Ergebnisse

Für diesen Vergleich wurde bestimmt, welche Gene eine signifikante Änderung (T-Test mit Benjamini-Hochberg KMT) der Expression von mehr als 1,5-fach zwischen den Kontrollen und den Athleten in Ruhe zeigten. In Monozyten waren das 577, in T-Lymphozyten 1914 Transkripte. Rund 82% der Transkripte in T-Lymphozyten und rund 79% der Transkripte in Monozyten waren auch Teil der finalen Genliste aus der Auswertung der Athleten-Datensätze (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Darstellung der Expression der Gene der finalen Genlisten aus der Auswertung der Athleten-Datensätze sowie der Gene, die im Vergleich der Athleten in Ruhe mit den Kontrollen verändert waren. Auf der y-Achse ist der Faktor aufgetragen, um den sich die Expression zwischen den jeweiligen Zeitpunkten ändert. Transkripte in rot sind Teil der finalen Genlisten aus der Auswertung der Genexpressionsmuster der Athleten. Transkripte in grün gehören zur finalen Genliste aus dem Vergleich Kontrollen und Athleten in Ruhe. Transkripte in gelb repräsentieren die Schnittmenge beider zuvor genannten Listen. Oben ist die Expression in den Monozyten, unten in den T-Lymphozyten dargestellt.

Die differentiell exprimierten Gene konnten den GO-Klassen „GO:6952: Abwehrreaktion“; „GO:9607: Reaktion auf biotische Reize“ und „GO:5096: GTPase Aktivator Aktivität“ zugeordnet werden. Diese GO-Klassen waren auch mit den Transkripten der finalen Genliste aus der Einzelauswertung der Athleten-Datensätze hochsignifikant besetzt.

#### 4.4. Querschnittanalyse aller drei Studien

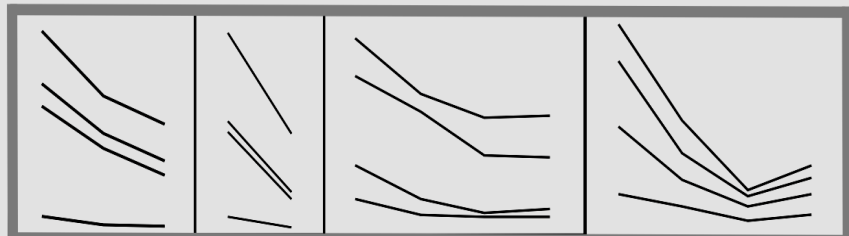
Um alle Datensätze miteinander vergleichen zu können, wurde nur mit Transkripten gearbeitet, die auf dem HG U133 A 2.0 Array repräsentiert sind.

Es wurden jeweils die finalen Genlisten verwendet (siehe auch Abbildung 2). In diesem Vergleich wurde aus Studie 3 die Genliste, die sich aus dem Vergleich der Athleten untereinander ergab, verwendet.

Vier Gene waren in jeder der analysierten Zellpopulationen in Folge körperlicher Belastung signifikant verändert exprimiert. In jeder Studie wurden sie in Folge von Sport herab reguliert gefunden (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9: Signifikant veränderte Gene aus der Querschnittanalyse.** Vier Gene wurden in allen drei Studien unter dem Einfluss von Sport signifikant verändert exprimiert gefunden. Dargestellt sind die Affymetrix Annotationsnummer, der Genbank-Name, der vollständige Name und die jeweilige Expressionshöhe (RMA Rohsignal) in den experimentellen Gruppen der verschiedenen Studien. Unterhalb der Tabelle ist zusätzlich die Tendenz der Genregulation analog zu den Expressionssignalen in den Zeilen darüber dargestellt. WBZ-weiße Blutzellen, PBMC-peripheral blood mononuclear cells, vB - vor Belastung, mB - moderate Belastung, eB-erschöpfende Belastung, R – Ruhe, S – Start der TdF, E – Ende der TdF, K - Kontrollen

			akute intensive Belastung						lang anhaltende intensive Belastung							
			WBZ			PBMZ			T-Lymphozyten				Monozyten			
Annotation	GenBank	Name	vB	mB	eB	vB	eB	R	S	E	K	R	S	E	K	
205291_at	IL2RB	interleukin 2 receptor, beta	1.447	986,4	786,2	3.138	1.580	1.591	1.140	940	958	562,1	308,7	126,7	188	
209160_at	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3	129,8	71,03	60,6	284,6	96,5	276,9	153,1	127,5	123	115,4	82,9	41,71	58,2	
212070_at	GPR56	G protein-coupled receptor 56	913,5	614,7	424,1	1.598	539,6	1.279	988,3	627,6	622	291,7	149,9	82,47	114	
218638_s_at	SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	1.074	719,8	525,1	1.769	656,9	549	277,9	160,5	197	466,1	220	109,4	155	



Die Reaktion von WBZ, PBMC, T-Zellen und Monozyten auf den Stimulus „Sport“ wurde beurteilt, indem die am stärksten verändert exprimierten GO-Klassen aufgelistet und verglichen wurden (Tabelle 10). Verwendet wurden die eingangs genannten Genlisten.

## Ergebnisse

**Tabelle 10: Signifikant veränderte GO-Klassen - Querschnittanalyse.** Dargestellt sind die zehn GO-Klassen, deren Mitglieder am stärksten durch „Sport“ verändert reguliert waren. Sie werden für jede untersuchte Zellpopulation gezeigt. Fett gedruckte Klassen wurden in jeder Zellpopulation unter den „Top Zehn“ gefunden. Die WBZ-Daten für diesen Vergleich wurden aus Studie 1, die PBMC-Daten aus Studie 2, die Monozyten- und T-Lymphozytendaten aus Studie 3 entnommen.

GO – Klasse	Schnittmenge der finalen Genliste mit dieser GO-Klasse	% Gene der finalen Genliste in dieser GO-Klasse	p-Wert
<b>WBZ</b>			
„GO:6950: Reaktion auf Stress“	48	16	8,93E-06
<b>„GO:9607: Reaktion auf biotische Reize“</b>	<b>45</b>	<b>15</b>	<b>2,12E-05</b>
„GO:43207: Reaktion auf äußere biotische Reize“	30	10	1,81E-05
„GO:9613: Reaktion auf Schädlinge, Pathogene oder Parasiten“	29	10	3,09E-05
„GO:6954: Entzündungsreaktion“	14	5	0,000449
<b>„GO:6952: Abwehrreaktion“</b>	<b>43</b>	<b>14</b>	<b>4,91E-05</b>
„GO:7582: Physiologischer Prozess“	275	92	0,000216
<b>„GO:6955: Immunantwort“</b>	<b>42</b>	<b>14</b>	<b>1,44E-05</b>
„GO:9605: Reaktion auf äußere Reize“	35	12	7,54E-05
„GO:42330: Taxis“	10	3	0,00109
<b>PBMC</b>			
<b>„GO:6952: Abwehrreaktion“</b>	<b>20</b>	<b>29</b>	<b>1,86E-07</b>
<b>„GO:6955: Immunantwort“</b>	<b>19</b>	<b>27</b>	<b>2,43E-07</b>
<b>„GO:9607: Reaktion auf biotische Reize“</b>	<b>20</b>	<b>29</b>	<b>2,96E-07</b>
„GO:50896: Reaktion auf Reize“	28	40	6,04E-07
„GO:6950: Reaktion auf Stress“	17	24	5,12E-05
„GO:9613: Reaktion auf Schädlinge, Pathogene oder Parasiten“	11	16	0,000171
„GO:43207: Reaktion auf äußere	11	16	0,000208

## Ergebnisse

biotische Reize“

„GO:50874: Physiologischer Prozess im Organismus“	22	31	0,000755
---	----	----	----------

„GO:9605: Reaktion auf äußere Reize“	11	16	0,00248
--------------------------------------	----	----	---------

### T Zellen

<b>„GO:9607: Reaktion auf biotische Reize“</b>	<b>221</b>	<b>12</b>	<b>2,97E-21</b>
--	------------	-----------	-----------------

„GO:6952: Abwehrreaktion“	215	12	9,06E-21
---------------------------	-----	----	----------

„GO:6955: Immunantwort“	197	11	4,12E-19
-------------------------	-----	----	----------

„GO:6968: zelluläre Abwehrreaktion“	41	2	1,01E-11
-------------------------------------	----	---	----------

„GO:43207: Reaktion auf äußere biotische Reize“	118	7	8,66E-11
---	-----	---	----------

„GO:9613: Reaktion auf Schädlinge, Pathogene oder Parasiten“	114	6	2,47E-10
--	-----	---	----------

„GO:7165: Signaltransduktion“	497	28	7,32E-09
-------------------------------	-----	----	----------

„GO:50896: Reaktion auf Reize“	312	17	3,12E-07
--------------------------------	-----	----	----------

„GO:9611: Reaktion auf Verwundungen“	84	5	9,69E-07
--------------------------------------	----	---	----------

„GO:7242: intrazelluläre Signal Kaskaden“	224	12	1,76E-06
---	-----	----	----------

### Monozyten

<b>„GO:9607: Reaktion auf biotische Reize“</b>	<b>112</b>	<b>12</b>	<b>2,38E-10</b>
--	------------	-----------	-----------------

„GO:6952: Abwehrreaktion“	109	12	3,79E-10
---------------------------	-----	----	----------

„GO:7165: Signaltransduktion“	278	30	3,06E-08
-------------------------------	-----	----	----------

„GO:6955: Immunantwort“	90	10	1,42E-06
-------------------------	----	----	----------

„GO:7242: intrazelluläre Signal Kaskaden“	129	14	2,99E-06
---	-----	----	----------

„GO:7179: Signalweg des Rezeptors für den transformierenden Wachstumsfaktors Beta“	11	1	7,71E-06
--	----	---	----------

„GO:6968: zelluläre Abwehrreaktion“	20	2	1,03E-05
-------------------------------------	----	---	----------



## Ergebnisse

„GO:7178:Transmembranales Rezeptor Protein Serin/ Threonin Signalweg“	12	1	6,27E-05
„GO:50896:Reaktion auf Reize“	163	17	0,000208
„GO:7243: Proteinkinase Kaskade“	33	4	0,00039

Die blutzellspezifische Reaktion auf Sport erfolgte immer über die veränderte Regulation von Genen deren Proteine die an Immunprozessen beteiligt sind. In jeder Zellpopulation wurden die Mitglieder der GO-Klassen „GO:6952:Abwehrreaktion“, „GO:6955:Immunantwort“ und „GO:9607:Reaktion auf biotische Reize“ hochsignifikant durch den Stimulus beeinflusst.

In allen Zellpopulationen wurde ermittelt, welche Gengruppen prinzipiell exprimiert wurden. Dazu wurden die Gene aus den jeweiligen Vorfilter-Genlisten der verschiedenen Zellpopulationen einer GO-Klassifikation unterzogen und nach Signifikanz geordnet. So ließ sich ermitteln, welche Prozesse in Blutzellen regulär und unabhängig von externen Stimuli ablaufen. Beim Vergleich der so entstandenen GO-Klassenranglisten ergab sich, dass die Top 99 GO-Klassen, in allen vier untersuchten Zellpopulationen bzw. Zellgemischen die gleichen waren. Zudem war keine der speziell durch Sport veränderten GO-Klassen darunter.

## 5. Diskussion

Diese Arbeit fasst die Ergebnisse aus drei aufeinander aufbauenden Studien zusammen. In der ersten Studie wurde die Möglichkeit untersucht, ob und in welcher Form eine Reaktion auf Sport verschiedenerer Belastungsintensitäten in Genexpressionsmustern weißer Blutzellen (WBZ) detektierbar ist. Die prinzipielle Tauglichkeit von Blutzellen als Reporterzellen für veränderte StoffwechsellLeistungen sollte damit überprüft werden.

Die zweite Studie hatte eher technischen Charakter und untersuchte, inwieweit durch Sport induzierte Genexpressionsmuster (GEM)-Veränderungen verschiedener Blutzell-Subpopulationen sich überlagern. Hierzu wurden die Veränderungen in gemischten Zellpopulationen mit denen in separierten Subpopulationen verglichen. In Vorhersagetests wurde geprüft, ob die Muster aus den WBZ eine Klassifizierung der sortierten Zell-Proben nach Belastungsintensität ermöglichen und umgekehrt. Gleichzeitig wurde untersucht, ob durch Sport induzierte GEM trotz individueller Schwankungen in einem anderen Probandenkollektiv wieder auffindbar sind.

Die Technik der Zellseparierung wurde schließlich in der dritten Studie angewandt, um zu prüfen, welche Genexpressionsmuster durch lang anhaltenden intensiven Sport in Monozyten und T-Lymphozyten induziert werden. Die erhaltenen Muster wurden in einen sportphysiologischen Zusammenhang gesetzt und ihre Eignung als diagnostisches Werkzeug eingeschätzt.

### 5.1. Genexpressionsänderungen in weißen Blutzellen als Reaktion auf moderate oder erschöpfende physische Belastung – Studie 1

Zu Beginn der experimentellen Planung dieser Arbeit waren keine Daten verfügbar, die sich mit Genexpressionsanalysen in weißen Blutzellen und deren Reaktion auf Sport befassten. Studie 1 war daher als Machbarkeitsstudie ausgelegt. Die Suche nach durch Sport verändert regulierten physiologischen Prozessen stand noch nicht im Mittelpunkt. Prinzipiellere Fragen sollten geklärt werden: Sind WBZ geeignete Reporterzellen für den Stimulus Sport? Sind sie sensitiv für unterschiedliche Reizstärken?

Anders als in der publizierten Version von Studie 1 <sup>38</sup> wurden die Daten für diese Arbeit nicht mit dem „GCOS“-Algorithmus ausgewertet. Statt dessen wurde der zum Zeitpunkt der Publikation noch nicht verfügbare RMA-Algorithmus verwendet, um eine Vergleichbarkeit mit den anderen Studien zu ermöglichen.

#### 5.1.1. Unterschiede in der Reaktion weißer Blutzellen auf moderates und erschöpfendes Training

Die Genexpressionsstudie in weißen Blutzellen zeigte, dass moderates und erschöpfendes Training einen deutlich messbaren Einfluss auf die Regulation der Genexpression der WBZ haben. Nach erschöpfendem Training waren wesentlich mehr Gene signifikant verändert, als nach dem moderatem Training. Davon waren 99% bereits nach moderatem Training entsprechend herauf- oder herab reguliert Wie

aus Abbildung 3 ersichtlich ist, scheint die Reizstärke mit der Anzahl der Veränderungen und deren Amplitude zu korrelieren.

Ob eine Schwelle existiert, an der die Änderung abrupt verstärkt wird oder ob die Veränderung in der Genexpression kontinuierlich mit der Reiz- bzw. Belastungsintensität zunimmt, muss in weiteren umfangreichen Experimenten geklärt werden.

### 5.1.2. Übereinstimmungen publizierter Ergebnisse mit Ergebnissen aus Studie 1

Unter den verändert exprimiert gefundenen Genen waren auch bereits gut charakterisierte Markergene für physische Belastung. Ein prominentes Beispiel sind die Hitzeschockproteine HSPH1 (105kD), HSPA1A und HSPA1B (70kDa) und HSPCA (90kDa). Diese wurden in Leukozyten und im Skelettmuskel sowohl auf transkriptioneller, als auch Proteinebene schon mehrfach als reguliert beschrieben<sup>47-49</sup>. Zu den biologischen Funktionen von Hitzeschockproteinen zählen die Verhinderung von Proteinaggregation und die Unterstützung der Proteinfaltung<sup>50,51</sup>.

Durch körperliche Belastung werden sowohl im Muskel, als auch in Neutrophilen vermehrt ROS (reaktive oxidative Spezies) gebildet<sup>52, 53</sup>. Die in WBZ gefundene Heraufregulation der Glutathion-Peroxidase 3 (GPX3) und des Thioredoxin (TXN) nach Belastung könnten zu deren Neutralisation beitragen und damit eine wichtige Schutzfunktion übernehmen<sup>54,55</sup>.

Während Studie 1 durchgeführt wurde, erschien eine Publikation, über den Einfluss des Stimulus Sport auf die Genexpression in PBMC<sup>28</sup>. Die Gemeinsamkeiten dieser Studie mit Studie 1 lagen in der Wahl der Zeitpunkte der Blutentnahme und in der Verwendung der Affymetrix-Technologie zur Detektion der Genexpressionsunterschiede. Es gab allerdings mehrere Unterschiede im experimentellen Aufbau der „Connolly-Studie“ im Vergleich mit Studie 1. In Studie 1 wurden WBZ durch Erythrozytenlyse isoliert und die WBZ sofort weiter verarbeitet. Die Gruppe um Connolly isolierte PBMC mit einer Dichtegradientenzentrifugation. Die PBMC-RNA wurden vor der finalen Aufarbeitung in RNAlater (Ambion, Austin, USA) gelagert. Trotz der experimentellen Unterschiede waren die Befunde beider Studien weitgehend identisch. Gene die in Studie 1 im Gegensatz zur „Connolly-Studie“ nicht als signifikant verändert exprimiert gefunden wurden, zeigten tendenziell die von Connolly beschriebene Regulationsrichtung.

Die weitestgehende Übereinstimmung von Studie 1 mit der „Connolly-Studie“ zeigt, dass bei gleicher experimenteller Vorgehensweise und bei Verwendung ähnlicher Technologien der Einfluss erschöpfender Belastung auf die Genexpression von Blutzellen sehr gut reproduziert werden kann. Dabei ist es erstaunlich, dass die Ergebnisse sich so sehr gleichen, da in Studie 1 auch die Genexpression in Granulozyten mitbestimmt wurde, welche bei erschöpfendem Sport großen Subpopulationsverschiebungen unterliegen. Diese Zellpopulation war in den Proben der Connolly-Studie nicht enthalten. Dass beide Studien trotzdem zu ähnlichen Ergebnissen führten, kann nur so erklärt werden, dass die Genregulation in Granulozyten weitestgehend der in anderen Subpopulationen entspricht. Ebenso ist

denkbar, dass in Granulozyten nur wenige Gene durch den Stimulus verändert exprimiert wurden.

Die Identifikation von verändert exprimierten Genen in WBZ, die bereits in anderen Studien ebenso verändert reguliert beschrieben wurden<sup>28, 47, 48, 54, 55</sup>, bestätigt einerseits die Ergebnisse vorhergegangener Studien. Es wird aber auch die Übertragbarkeit von Befunden zwischen Studien mit unterschiedlichsten experimentellen Aufbau und Methoden gezeigt.

### 5.1.3. Genregulationen in weißen Blutzellen als Reaktion auf Sport

Neben der Wiederfindung bereits bekannter Ergebnisse, wurden auch zahlreiche bisher nicht beschriebene Regulationen von Genen in weißen Blutzellen aufgedeckt. Im Rahmen dieser Arbeit können diese Ergebnisse nicht systematisch interpretiert werden, da die beobachtete Expression keinem Zelltyp zugeordnet werden kann. Weil durch erschöpfende physische Belastung massive Verschiebungen der Blutzell-Subpopulationen auftreten, kann jede beobachtete Veränderung sowohl auf echter Expressionsregulation, als auch auf den Zellpopulationsverschiebungen beruhen. Es gibt keine Möglichkeit endgültig zu klären welche Ursache die beobachtete Regulation hat.

Trotzdem sollen einige Transkripte der finalen Genliste diskutiert werden, da sie Erklärungsansätze für die durch Sport induzierten Verschiebungen in den Subpopulationen liefern können.

Die MMP9 (Matrixmetalloproteinase 9), auch bekannt als Gelatinase B, ist ein Kollagen-4-degradierendes Enzym und war in WBZ nach Belastung herauf reguliert. Das Enzym wird im Zusammenhang mit Sport sonst eher unter dem Aspekt seiner wichtigen Funktionen in der Homöostase der Sehne und des Muskels betrachtet. Dort hat es Anteil an der Anpassung des Muskels bzw. der Sehne an neue Anforderungen und am Wiederaufbau von durch Sport verursachten Verletzungen. So wurde die erhöhte Expression und Translation des Gens bzw. Proteins im Muskel bzw. der Sehne in Folge physischer Belastung bereits gezeigt<sup>56, 57</sup>. In Leukozyten ist die Rolle der MMP9 aber wahrscheinlich eine andere. Einerseits wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass durch die Ausschüttung von MMPs ins Plasma periphere Blutstammzellen und Progenitorzellen mobilisiert werden<sup>58, 59</sup>. Andererseits wurde auch beschrieben, dass Matrixmetalloproteinasen mit der Rekrutierung von Leukozyten aus der Blutbahn in Organe und Gewebe, wie z.B. dem Gehirn, in Verbindung stehen<sup>60, 61</sup>. In beiden Fällen kann die Wirkung der veränderten MMP9 Expression also zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Blutzell-Subpopulationen führen.

Interessanterweise wurde die MMP9 sowie zwei weitere in WBZ signifikant verändert gefundene Gene, HSP27 und YES1, auch im Kontext erhöhter in-vitro und in-vivo Invasivität von Brustkrebs, beschrieben. In dieser Studie von Hansen et al.<sup>62</sup> wurden alle drei Gene ebenso reguliert gefunden wie nach erschöpfender Belastung. Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression des von uns als herauf reguliert gefundenen HSP27 (auch HSPB1) mit der Heraufregulation von MMP9 und der Herabregulation von YES1, dem viralen Homolog des Yamagushi Sarkoms 1,

gekoppelt ist <sup>62</sup>. Die Autoren vermuteten, dass YES1 möglicherweise die Expression von MMP9 unterdrückt, und daher durch HSP27 gehemmt wird, um die Expression von MMP9 zu fördern. Im Modell Brustkrebs ist die beschriebene Regulation mit einem Ansteigen der in-vivo Invasivität der Krebszellen assoziiert. Im Kontext der zuvor genannten Interpretation der Regulation der MMP9 im Zusammenhang mit Sport könnte sie in Leukozyten deren Ein- oder Auswandern aus dem Blutkreislauf ermöglichen.

An diesem Prozess könnte auch die herauf reguliert gefundene Fukosyltransferase 7 (FUT7) teilhaben. Das Protein ist an der Biosynthese des sialyl-Lewis x Epitopes beteiligt, welche wiederum essentiell für den Kontakt des Leukozyten mit endothelzellständigen E- und P-Selektinen ist. Durch die Leukozytenadhäsion wird ein Prozess eingeleitet, in dessen Folge die Leukozyten die Gefäße verlassen um beispielsweise in entzündliches Gewebe einzuwandern<sup>63</sup>.

### **5.1.4. Eignung der der gefundenen Genexpressionsmuster zur Klassifizierung von Proben**

Die als verändert reguliert identifizierten Gene (finale Genliste) wurden genutzt, um mit Hilfe ihrer Expressionsmuster eine Zuordnung der Proben zu ihrer experimentellen Gruppe durchzuführen. Dazu wurden ein hierarchisches Cluster und eine Hauptkomponentenanalyse (HKA) der Proben erstellt. Hier wurden die „vor Belastung“-Proben deutlich von den „erschöpfende Belastung“-Proben getrennt. Die „moderate Belastung“-Proben wurden nicht in eine eigene Gruppe separiert. Betrachtete man für jedes Individuum einzeln die Verteilung der Proben in der HKA, so ergibt sich ein anderes Bild (Abbildung 4): wenn man die x-Achse als analog der Belastungsintensität betrachtet, so liegt die „moderate Belastung“-Probe immer zwischen den beiden „vor Belastung“-Proben und der „erschöpfende Belastung“-Probe des jeweiligen Probanden. Die Zuordnung ist also individuen-spezifisch doch möglich. Die individuelle Genexpression wird immer in vergleichbarer Weise aus der Homöostase ausgelenkt. Allerdings wird auch deutlich, dass der Einfluss individueller Genexpression einen sehr starken Einfluss auf die Klassifizierungsqualität von Markergen-Expressionsmustern hat.

Will man basierend auf Genexpressionsmustern eine individuelle Probe klassieren, so sollten auch andere Proben des gleichen Probanden, von denen man die entsprechende Belastungsintensität kennt, mit in die Betrachtung einbezogen werden. Dies verbessert die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Klassifizierung.

### **5.1.5. Zusammenfassung der Ergebnisse aus Studie 1 und daraus folgende Überlegungen für das Design von Studie 2**

Durch die Studie in WBZ wurde die prinzipielle Eignung von weißen Blutzellen als Reporterzellen für den Einfluss physischer Belastung auf den Körper bestätigt. Die Zellen reagieren sehr sensitiv auf die Reizstärke des Stimulus.

Nach erschöpfendem Training wurden wesentlich mehr Gene verändert exprimiert als nach moderater Belastung. Jedoch waren nach beiden Belastungsintensitäten

dieselben Gene verändert reguliert, wobei die Amplitude der Regulationsänderung nach erschöpfender Belastung größer war.

Weiterhin konnte die Studie 1 zeigen, dass die gemessenen GEM unter bestimmten Voraussetzungen geeignet sind, die Belastungsintensität zu klassifizieren.

Obwohl in Studie 1 interessante neue Ergebnisse gefunden werden konnten, bleibt das Problem bestehen, dass die Zellsubpopulationen der WBZ natürlichen Schwankungen unterworfen sind, wenn der Mensch physischer Belastung ausgesetzt ist. So ist es schwer, die echte Regulation eines Gens von einer scheinbaren zu unterscheiden, die durch Ab- bzw. Zunahme des exprimierenden Zelltyps bedingt ist. Es ist aber z.B. auch möglich, dass ein Gen in einer WBZ-Subpopulation herauf in einer anderen aber herab reguliert wird und in der Summe gar keine veränderte Regulation detektiert wird. Ebenso kann ein nicht reguliertes Gen in einer durch Sport kaum beeinflussten Population fälschlich reguliert erscheinen. Der Grund hierfür ist, dass der Anteil dieses Transkriptes in der final hybridisierten Gesamtprobe abhängig vom Anteil aller anderen RNA ist. Deren Konzentration kann aber aufgrund starken Absinkens oder Ansteigens der exprimierenden Populationen schwanken.

Es besteht keine Möglichkeit, die Subpopulationsverschiebungen aus den Daten „heraus zu rechnen“. Es kann nur grob abgeschätzt werden, ob eine x-fache Veränderung in der Genexpression realistisch ist, wenn sie größer als die x-fache Zellzahl-Änderung der exprimierenden Population ist.

Um Genexpressionsmessungen für sportdiagnostische Anwendungen nutzbar zu machen, ist es aus den genannten Gründen unumgänglich, sie unabhängig von in-vivo Subpopulationsverschiebungen zu machen. Letztendlich bleibt nur die Möglichkeit die Zellpopulationen getrennt voneinander zu untersuchen, d.h. sie zu separieren.

### **5.2. Genexpressionsanalysen in PBMC und T-Lymphozyten**

Die zweite Studie sollte die Vorteile separierter Zellen gegenüber der Verwendung von Gesamt-WBZ testen und die Reproduzierbarkeit der Methode untersuchen. Zudem sollte getestet werden, ob T-Lymphozyten sich als Reporterzellen für den Stimulus „körperliche Belastung“ eignen. T-Lymphozyten wurden getestet, weil Sport Einfluss auf diese Zellen nimmt. Beispiele hierfür sind die mehrfach erwähnten Subpopulationsverschiebungen und die FAS-Apoptose in Lymphozyten <sup>20 21</sup>.

Zusätzlich wurden auch Messungen in PBMC durchgeführt. Diese wurden durch eine Dichtezentrifugation separiert und umfassen in dem hier benutzten Separierungssystem Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten und basophile Granulozyten.

Der Versuchsaufbau der Studie 2 wurde analog zu Studie 1 gestaltet, da getestet werden sollte, ob GEM der T-Lymphozytenpopulation in den WBZ verdeckt waren. Außerdem sollte getestet werden ob die in Studie 1 erhaltenen GEM in einer neuen Probandengruppe reproduziert werden konnten.

### 5.2.1. Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Studie 2 und dem Vergleich von Studie 1 und 2

Ein erstes interessantes Ergebnis war, dass in T-Lymphozyten nur unwesentlich weniger (2,5%) Gene als in PBMC exprimiert wurden. Dabei waren die Gene die den Vorfilter in beiden Zelltypen passierten zu über 94% identisch. Dieses Ergebnis war überraschend, da durch die Separation die Vielfältigkeit an Zelltypen mit verschiedensten physiologischen Aufgaben und daran gekoppelt umfangreicheren Transkriptom stark eingeschränkt wurde. Daraus kann man schlussfolgern, dass sehr viele Gene in allen Blutzellen exprimiert werden, auch wenn deren Produkte hier nicht ursächlich wirken. So sind z.B. alle vier auf dem HG U133 Plus 2.0 repräsentierten Transkripte des typischen Monozytenantigens CD14 auch in T-Lymphozyten exprimiert. Die Rohsignale erreichen dabei in den T-Zellen fast Dreiviertel der Intensität, die für diese Transkripte in Monozyten gemessen wurde. Die Messwerte schwanken dabei weniger als 10% zwischen den Probanden. Dies verdeutlicht, dass nicht etwa in einigen Proben eine Verunreinigung mit Monozyten vorliegt, sondern im Gegenteil echte Expression des Gens.

In Studie 2 wurden nur drei Replikate pro experimenteller Gruppe gemessen. Das ist für Microarraymessungen in humanen Blutzellen zur Untersuchung von Sport eine zu kleine Ausgangsbasis. In der Folge war keines der Gene signifikant im T-Test kombiniert mit der Korrektur für multiples Testen. Die Daten sind daher nicht geeignet, um Markergene für akute Belastung in T-Lymphozyten oder PBMC zu identifizieren. Wie in 3.3.5. diskutiert wurde, kann man über eine Zuordnung von Genen zu GO-Klassen die Gene aus einer Liste filtern, die physiologisch miteinander verknüpft sind. Falsch positive Gene werden keiner GO-Klasse zugeordnet und können so aus einer Auswertung ausgeschlossen werden. Gene die einer GO-Klasse zugeordnet werden, sind also mit hoher Wahrscheinlichkeit richtig positiv und ermöglichen somit trotzdem eine Aussage zu der physiologischen Reaktion der Zellen auf den Stimulus.

Die in PBMC und T-Zellen gefundenen verändert regulierten Gene wurden mit denen aus WBZ verglichen um Ähnlichkeiten in den Regulationsmustern aufzudecken.

Von den 440 in WBZ signifikant verändert reguliert gefundenen Transkripten waren 380 in T-Lymphozyten exprimiert. Die Expression mehrerer Gene wie HSPA1A und PTGDS wurde erneut signifikant herauf bzw. herab reguliert gefunden. Dies zeigt einerseits, dass die in Studie 1 gefundenen Markergene für akute Belastung auf andere Individuen übertragbar sind und andererseits werden dadurch die Befunde validiert. Da in WBZ bei physischer Belastung immer Subpopulationsverschiebungen auftreten, war es nicht möglich, endgültig festzustellen, ob die verändert reguliert gefundenen Gene auf echte Regulation oder veränderte Anzahl der exprimierenden Zellen zurückzuführen waren. Die Gene, die in den separierten T-Lymphozyten wiedergefunden wurden, beruhen hingegen auf realer Regulation da umfangreiche Verschiebungen der T-Lymphozyten-Subpopulationen nicht bekannt sind. Somit ist eine wichtige Voraussetzung auf dem Weg zur Entwicklung eines diagnostischen Werkzeuges erfüllt.

Die durch Sport induzierten GEM aller untersuchten drei Zelltypen wurden genutzt, um in den jeweils anderen Zelltypen vorherzusagen, ob eine Probe vor oder nach Belastung entnommen wurde.

Da PBMC und WBZ weitestgehend dieselben Zelltypen einschließen, ist es nicht erstaunlich, dass sich deren GEM soweit ähnelten, dass eine wechselseitige Vorhersage möglich war. Dieser Befund macht deutlich, dass das komplexe Expressionsmuster einer Probandengruppe in einer anderen wieder gefunden werden können.

Das Gen-Expressions-Muster der WBZ war in den T-Lymphozyten nicht aufzufinden. So konnte mit dem WBZ-Muster auch keine T-Zellprobe richtig zugeordnet werden. Dieses Resultat reflektiert die Überdeckung T-Lymphozyten-spezifischer Genregulation im Gemisch der WBZ.

Umgekehrt war mit dem Muster der Gene der T-Lymphozytenliste für 9 aus 15 WBZ-Proben eine richtige Vorhersage möglich. Das deutet darauf hin, dass die GEM der T-Lymphozyten spezifischer als die der WBZ sind. Auch diese Vermutung beruht aus der Annahme, dass in separierten T-Lymphozyten ausschließlich echte Regulation beobachtet wird, wohingegen in WBZ echte Regulation von durch Subpopulationsverschiebungen bedingten Expressionsunterschieden überdeckt ist.

Unter Betrachtung der Ergebnisse aus Studie 2 sind separierte Zellen besser als Zellgemische geeignet um Sport-spezifische Regulationsmuster zu charakterisieren.

### **5.2.2. Die Leistungsfähigkeit des Separierungsprotokolles**

Im Vorfeld der Studie 2 wurden umfangreiche Arbeiten zur Erstellung eines geeigneten Protokolls zur Zellseparierung geleistet. Das Ziel der Isolation war die Aufreinigung qualitativ hochwertiger RNA aus einer Zielpopulation, die in der Summe weniger als 5% andere Zellen enthalten sollte. Da Blutzellen schnell auf die Entnahme aus dem Blutkreislauf reagieren, wenn sich z.B. die Temperatur und die Scherkräfte ändern, musste die Zeit bis zur Lyse so kurz wie möglich sein. Das endgültige Protokoll stellt einen Kompromiss zwischen der Dauer der Aufarbeitung, der Schonung der Zellen und der Reinheit der Population dar. Innerhalb von etwa 80 Minuten ist die Isolation von T-Lymphozyten bzw. Monozyten aus 4 bzw. 8 ml Vollblut mit abschließender Lyse der Zelle durchführbar. Die Zellen werden „untouched“ isoliert, das heißt, sie werden nicht mit Antikörpern direkt aus der Probe isoliert. Das Ankoppeln eines Antikörpers an den Rezeptor der Zelle kann zur Aktivierung führen, welche unabsehbare Genexpressionsänderungen nach sich ziehen könnte. Statt dessen wurden mithilfe der so genannten „Depletions“-Strategie alle unerwünschten Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert und aus dem Vollblut entfernt. Wenn möglich wurden die Zellen mit 4°C-kalten Puffern behandelt und bei 4°C zentrifugiert. So werden enzymatische Vorgänge wie Transkription oder RNA-Abbau auf ein Minimum reduziert und das in-vivo-GEM „eingefroren“. Aus technischen Gründen mußten aber verschiedene Arbeitsschritte bei Raumtemperatur erfolgen, so das die Zellen für circa 45 min nicht gekühlt wurden. In dieser Zeit treten unabsehbare und nicht beeinflussbare Veränderungen im Genexpressionsmuster auf. Es besteht keine Möglichkeit dies bei Verwendung der eingesetzten Methodik zu umgehen. Da es nicht möglich ist, das in vivo GEM der Zellen direkter zu bestimmen, kann auch nicht ermittelt werden, welche Prozesse



durch den Einfluss der höheren Temperatur betroffen sind. Da alle Proben immer nach dem gleichen Protokoll behandelt wurden und somit theoretisch immer die selbe Expressionsantwort auf die Aufarbeitung zeigten, ist ausgeschlossen, dass die Analyse der Antwort der Zellen auf den Stimulus Sport verfälscht wurde. Es ist aber denkbar, dass mit dieser Methode verändert regulierte Transkripte die intrazellulär einem schnellen Abbau unterliegen nicht detektierbar sind.

Die am Ende der Zellseparation stehende Lyse mit Trizol stoppt augenblicklich alle intrazellulären enzymatischen Prozesse und somit auch die RNA-Neubildung bzw. den RNA-Abbau. An diesem Punkt wird das GEM sozusagen eingefroren. Nachfolgende Prozesse sind nicht zeitkritisch. Es muss natürlich darauf geachtet werden, dass die Proben nicht mit RNAsen verunreinigt werden. Die Lyse der aufgereinigten, sortierten Zellen stellt den ersten Punkt in der Gesamtprozessierung der Proben von der Blutentnahme bis zum Microarray dar, an dem eine Lagerung der Proben und ein Transport möglich sind. Insbesondere für diese Arbeit war dies wichtig, da für Studie 3 die Proben vor Ort (den Wettkampf-Standorten) entnommen werden mussten, jedoch erst im Labor in Jena aufgearbeitet werden konnten.

Durch das Pipettieren während der Isolation, wurden die Zellen Scherkräften ausgesetzt, die eine teilweise Zerstörung der Zellen bewirkten. In der Durchflusszytometrie war dies deutlich sichtbar. Die Zelltrümmer konnten nicht angefärbt und ihre Größe und Granularität nicht den Zellsubpopulationen zugeordnet werden. In den Zelltrümmern waren keine nachweisbaren Mengen RNA enthalten. Das wurde gezeigt, indem die Zielzellen positiv selektioniert wurden, wodurch nur die Zelltrümmer in der Probe zurückblieben. Aus diesen wurde dann analog zu den sortierten Zellen eine RNA-Isolation vorgenommen.

In Vorversuchen wurden die sortierten Zellen mit FACS auf die Anwesenheit von T-Lymphozyten (CD3), B-Lymphozyten (CD19), Monozyten (CD14), NK-Zellen (CD56), Thrombozyten (CD41a), Erythrozyten (CD235a) und Leukozyten (CD66b) überprüft. Es zeigte sich, dass Granulozyten nie, Erythrozyten dagegen immer eine Verunreinigung der Probe darstellen. Die Ficoll-Methode bedingt, dass Erythrozyten 14.3 +/- 9.4% der Zellzahl der finalen Probe ausmachen, da sie nicht vollständig abgetrennt werden können<sup>64</sup>. Die Verunreinigung hatte immer einen ähnlichen Umfang. Erythrozyten bzw. die Retikulozyten enthalten jedoch nur geringe Mengen RNA, die vor allem für die typischen Erythrozyten Proteine wie z.B. die Hämoglobine codiert. Als Weiterentwicklung der Methode könnte im Protokoll eine Lyse der verbleibenden Erythrozyten/ Retikulozyten mit 5 ml des für Studie 1 verwendeten Erythrozytenlyse-Puffers erfolgen. So könnte z.B. der zweite Waschschriff mit PBS durch diesen Erythrozytenlyse-Puffer ersetzt werden. Jedoch muss genau geprüft werden, inwieweit die Erythrozytenlyse Auswirkungen auf die zu isolierenden Zellen Auswirkungen hat.

Auch Thrombozyten-Verunreinigungen wurden in den Monozyten-Proben beobachtet. Die T-Lymphozyten-Separationen waren frei von Thrombozyten. An die Oberfläche der Monozyten banden sich, vermutlich in Folge einer Thrombozyten-Aktivierung durch Ficoll, immer Thrombozyten. Freie Thrombozyten waren in den Monozyten-Proben nicht detektierbar. Da die Bindung der Thrombozyten an die Monozyten sehr effizient war, konnte durch die Verwendung von mehreren Waschschriffen keine Verbesserung erzielt werden. Die Thrombozyten wurden mit

den Monozyten weiterbearbeitet. Thrombozyten enthalten geringe Mengen von spezifischer Megakaryozyten-Rest-RNA. In den Microarrayprozess wurden 1000 ng RNA eingesetzt. Nach einer Studie von Rox <sup>65</sup> können aus  $2.7 \times 10^{11}$  Thrombozyten ungefähr 22,5 µg total RNA isoliert werden. In den für die Monozytenisolation verwendeten 8ml Vollblut befinden sich im Schnitt  $1,6 \times 10^9$  Thrombozyten, was also einer RNA-Menge von 130 ng entspricht. Der größte Teil der Thrombozyten (>90%) wurde jedoch durch die Waschprozesse entfernt. Nur direkt an die Monozyten gebundene Thrombozyten wurden zusammen mit diesen aufgearbeitet.

Da die Anteile von Erythrozyten und Thrombozyten in den Proben immer ähnlich waren, kann davon ausgegangen werden, dass die abschließende Datenanalyse nicht beeinflusst wurde.

Für die Analyse bedenkliche Verunreinigungen in den sortierten T-Lymphozytenproben waren zumeist auf Monozyten und in den sortierten Monozyten entsprechend auf T-Lymphozyten zurückzuführen. In der Folge wurden die sortierten Zellen generell auf die Anwesenheit von Monozyten, NK-Zellen, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten überprüft.

Im Großteil der sortierten Proben waren gar keine Verunreinigungen mit diesen Zellen detektierbar.

### **5.3. Genexpressionsanalysen der Reaktion von T-Lymphozyten und Monozyten auf lang anhaltende intensive Belastung**

Nachdem die Separation von T-Lymphozyten reproduzierbar etabliert und die Sensitivität dieses Zelltyps für den Stimulus „physische Belastung“ gezeigt wurde, konnte die Methodik in einem größeren Projekt eingesetzt werden.

Naive T-Lymphozyten sind im Vergleich zu anderen Blutzellen „langlebig“ und haben eine Lebenserwartung von mindestens hundert Tagen im Blut, wenn sie nicht aktiviert werden <sup>66, 67</sup>. Sie sind also der untersuchten Belastung permanent ausgesetzt und sollten daher unter dem Stimulus „lang anhaltender intensiver Sport“ eine spezifische Homöostase einstellen. T-Lymphozyten stehen stellvertretend für die spezifische Immunabwehr des Körpers und können eine Aktivierung der Abwehr anzeigen.

Zusätzlich wurden auch Monozyten hinsichtlich ihrer Reaktion auf den Stimulus „Sport“ untersucht. Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten repräsentieren sie die unspezifische Immunabwehr. Ihre Aufenthaltszeit im Blut ist mit nur wenigen Tagen deutlich kürzer als die der T-Zellen <sup>68, 69</sup>. Ein Teil der Monozyten wandert aus der Zirkulation in das umliegende Gewebe aus, differenziert zu Makrophagen und übernimmt dann verschiedene Aufgaben, wie z.B. die Phagozytose von apoptotischen Partikeln/Zellen oder von ins Gewebe eingedrungenen Krankheitserregern. Andere Monozyten werden in der Milz aus der Zirkulation entfernt. Falls der Stimulus „Sport“ Einfluss auf diesen Zelltyp hat, dann erfolgt dies entweder in einer kurzfristigen Antwort auf das spezielle Umfeld in der Zirkulation oder bereits durch eine Prägung während der Reifung.

Der Mensch ist ein ungeeigneter Modellorganismus. Die Lebensbedingungen, wie z.B. die Ernährung oder der circadiane Rhythmus können individuell sehr

verschieden sein und können nur schwerlich beeinflusst werden. Im Besonderen gilt dies, wenn ein Experiment Hochleistungssportler einschließt und über einen längeren Zeitraum läuft.

Um den Stimulus „lang anhaltende physische Belastung“ in einem möglichst einheitlichen experimentellen Umfeld messen zu können, wurden daher für die Studie 3 Zeiträume gewählt, in denen Athleten ähnliche Trainingszustände, ähnliche Tagesrhythmen und ähnliche Kalorienaufnahmen hatten. Dafür bot sich ein Wettkampf wie die Tour de France an. Sie gilt als härtestes Radrennen der Welt und stellt daher höchste Anforderungen an die Teilnehmer, die ihrerseits zu den leistungsfähigsten Ausdauersportlern überhaupt zählen.

Schon bei der ersten Sichtung der Daten fiel auf, dass die größten Unterschiede in der Genexpression zwischen dem Ruhezeitpunkt und den Wettkampfzeitpunkten gemessen wurden.

Um sicherzustellen, dass dieses Ergebnis reale Genexpressionsänderungen widerspiegelt und nicht auf technische Unzulänglichkeiten zurückzuführen ist, wurden die Datensätze der Studie 3 zusätzlich zu den im Kapitel Material und Methoden (Abschnitt 3.3.1.) genannten Methoden einer besonders rigiden Qualitätskontrolle unterworfen. Für alle Arrays wurde bestimmt, wie viele Transkripte ein Expressionssignal von größer Tausend aufweisen. Dies sind in der Regel nach RMA weniger als 3% aller Transkripte. Für den Fall, dass technische Probleme die Ursache der starken Unterschiede gewesen wären, hätte dies auch in der Zahl der höher exprimierten Gene sichtbar werden müssen. In allen Proben war jedoch die Anzahl dieser Gene ähnlich (1400 +/- 50 ohne signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen).

Zusätzlich wurden die Qualitätskontrolle und die statistische Auswertung durch einen Kooperationspartner bei der Genedata AG (Basel, Schweiz) nachvollzogen. Mit dem umfangreichen „Genedata Expressionist Refiner Pro 3.0.15“-Programm wurden von „GCOS“ unabhängige Qualitätsparameter erstellt, die alle Datensätze, basierend auf den CEL-Dateien, auf ihre Tauglichkeit hin prüften. Als Qualitätsbewertung wurden „Bad“, „Medium“ und „Good“ vergeben. Drei Arrays wurden mit „Bad“ beurteilt, wobei genau jene betroffen waren, die auch in der Qualitätsüberprüfung basierend auf „GCOS“ ausgeschlossen worden waren. Zwei Arrays erhielten ein „Medium“ als Bewertung, wurden jedoch in beiden Analysen verwendet. Die statistische Auswertung wurde mit dem „Genedata Expressionist® Pro 3.0“-Programm durchgeführt.

Die Übereinstimmung in der Anzahl der Transkripte, die in beiden Auswertungen nach Kruskal-Wallis Test signifikant veränderten waren, betrug 98.8% in den T-Zellen und 99.4% in den Monozyten. Auch die Einordnung der Transkripte in funktionelle GO-Klassen wurde geprüft. Jeweils acht der zehn am signifikantesten veränderten GO-Klassen waren in beiden Auswertungen dieselben.

In der Gesamtschau aller Qualitätskontroll-Parameter kann es als gesichert gelten, dass die beobachtete Regulation real ist und nicht auf technischen Problemen basiert.

### 5.3.1. Änderungen in den GEM von T-Lymphozyten während der Tour de France

Die GEM in den Proben des „Start“- und „Ende“-Zeitpunktes waren sehr ähnlich.

Wie in Abschnitt 4.1.2. beschrieben, wurden in Studie 1 die individuellen Proben vor Belastung vereinigt, da sie große Ähnlichkeit zeigten. Die Pearson-Korrelationskoeffizienten für die „vor Belastung“-Proben der fünf Probanden waren  $\geq 0,99$ . Dieser Wert ist ein Index dafür, dass die zwei Messungen der GEM der Ruhephase eines Individuums im Abstand mehrerer Tage sehr ähnlich sind. Betrachtet man im Vergleich die Pearson-Korrelationskoeffizienten der TdF-Athleten (Tabelle 11), so wird deutlich, dass die Korrelation zwischen dem „Start“- und „Ende“-Zeitpunkt fast ebenso hoch war.

**Tabelle 11: Pearson-Korrelationskoeffizienten für den Vergleich der Genexpression in zusammengehörigen Datensätzen.** Verwendet wurde die Datensätze von vier Athleten, für die zu jedem Zeitpunkt eine Messung vorlag. Die GEM zu den beiden Wettkampfzeitpunkten haben bei jedem Athleten die größte Ähnlichkeit, d.h. den besten Korrelationskoeffizienten.

	A1	A2	A3	A4
Ruhe vs. Start TdF	0,978	0,989	0,981	0,965
Ruhe vs. Ende TdF	0,959	0,987	0,977	0,973
Start vs. Ende TdF	0,988	0,994	0,992	0,996

In der statistischen Auswertung des Vergleichs der Wettkampfzeitpunkte wurden entsprechend wenige signifikant verändert exprimierte Transkripte gefunden. 167 Transkripte waren signifikant mehr als 1,5-fach verschieden exprimiert. Die Gene zu diesen Transkripten sind zu fast 50% nicht funktionell annotiert und zudem noch unspezifisch über die GO- und KEGG-Klassen verstreut, so dass nicht identifizierbar ist, welchen physiologischen Sinn eine gemeinsame Regulation haben könnte. Die beim Vergleich der Wettkampfzeitpunkte am signifikantesten besetzten GO-Klassen waren „GO:9607:Reaktion auf biotische Reize“ und „GO:6952:Abwehrreaktion“, mit jeweils neun Transkripten. Nach Anwendung der in Abschnitt 3.3.5 erläuterten Qualitätskriterien wurden die GO-Klassen nicht weiter ausgewertet.

Die Expressionsmuster dieser Gene waren nicht geeignet, in der Hauptkomponentenanalyse bzw. Clusteranalyse eine Trennung der individuellen Proben nach dem Entnahmezeitpunkt während des Wettkampfes zu erzielen.

Diese Ergebnisse wurden im Vorfeld der Studie nicht erwartet. Man ging davon aus, dass die enorme physische und psychische Belastung während des Wettkampfes einen starken Einfluss auf die GEM haben würde.

Die Gründe für die geringen Unterschiede können verschieden sein:

Betrachtet man das physisch geleistete Tagespensum, dem sich die Sportler im Zeitraum um die Etappen in Fromentine (S) und St. Etienne aussetzten (E), so zeigt sich, dass die Belastung im Mittel aller Sportler zu beiden Zeiten ähnlich ist.

Man könnte zudem vermuten, dass die Ähnlichkeit in der Genexpression antrainiert ist. So könnte das der Tour vorhergehende vorbereitende Training die GEM noch vor Beginn des Wettkampfes eingestellt haben. Wie beobachtet, bleiben diese dann auch weitestgehend während des Wettkampfes erhalten.

Letztlich absolvierten alle Teilnehmer gesund und ohne Übertrainingssymptome den Wettkampf. Gesundheitliche Probleme wie eine Infektion hätten einen messbaren Einfluss auf die GEM gehabt und die Veränderungen in der Genexpression des jeweiligen Probanden wären wesentlich größer gewesen <sup>18</sup>.

Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass GEM während eines Wettkampfes relativ stabil bleiben. Möglicherweise stellt sich unter maximalem Training eine sehr spezielle Homöostase in den T-Lymphozyten ein. Die Ergebnisse waren überraschend, ermöglichen aber einen den Ansatz, dass entstehende Probleme in der Leistungsfähigkeit eines Athleten in einem Abweichen der GEM sichtbar sein könnten.

### **5.3.2. Änderungen in der Genexpression von T-Lymphozyten im Vergleich von Ruhe und Wettkampf**

3832 Transkripte waren durch lang anhaltende, intensive körperliche Belastung verändert exprimiert. Als Bezugszeitpunkt wurde „Ruhe“ betrachtet. Die zu diesem Zeitpunkt gemessene Genexpression kann als „steady state“ im Trainingsjahr betrachtet werden. Zwar ist ein Hochleistungssportler die meiste Zeit des Jahres der lang anhaltenden intensiven Belastung ausgesetzt, jedoch stellt sich die Genexpression bei Ausbleiben des Stimulus auf das Niveau der „Ruhe“ ein. Herauf regulierte Gene bezeichnen also solche, die während des Wettkampfes ein höheres Expressionsniveau als während der „Ruhe“ aufweisen., herab reguliert beschreibt den umgekehrten Sachverhalt.

Da nicht alle Gene diskutiert werden können, wurde zuerst eine Selektion von Genen aus dem Datenpool vorgenommen. Dabei wurden die Gene ausgewählt, die physiologisch miteinander verknüpft sind. Das macht die Interpretation der Daten einfacher. Auch wurde so die Wahrscheinlichkeit gemindert, dass die sich anschließende Analyse auf falsch positiven Befunden beruhte.

Die Verwendung der GO- und KEGG-Listen bot eine gute Möglichkeit diese Selektion durchzuführen.

Die Auswertung der Expression in den KEGG-Listen zeigte z.B. große Veränderungen im „Arachidonsäurestoffwechsel“. Hier waren die Gene mehrerer nacheinander geschalteter Enzyme herab reguliert. Das Schrittmacherezym der Prostaglandinsynthese, die PTGS1, produziert Prostaglandin H2. Dieses wird wiederum durch die PTGDS in Prostaglandin D2 umgewandelt. PGD2 dient der AKR1C3 als Substrat für PGF2alpha. Alle drei Gene waren in T-Lymphozyten signifikant während der TdF herab reguliert.

Nach Funk <sup>42</sup> werden die genannten Prostaglandine je nach Produktionsgewebe mit einer Kontraktion der glatten Muskulatur, Chemotaxis und allergischem Asthma in Zusammenhang gebracht. Zumeist stehen Makrophagen, Endothelzellen und Mastzellen im Mittelpunkt des Interesses, wenn die Produktion und die Wirkung der Prostaglandine untersucht werden <sup>15</sup>. PGD2-Produktion wurde aber auch schon direkt in T-Lymphozyten nachgewiesen <sup>70</sup>.

Die zum Arachidonsäurestoffwechsel gehörende 5-Lipoxygenase (ALOX5), das 5-Lipoxygenase aktivierende Protein (ALOX5AP) und die Prostaglandin

Endoperoxidase Synthase 1 (PTGS1) sowie zusätzlich der transformierende Wachstums Faktor Beta 1 (TGFB1) wurden auch per Real-Time-PCR validiert. Für alle Gene wurde eine niedrigere Expression während der Wettkampfphase bestätigt, jedoch wiesen nur die Gene ALOX5AP und PTGS1 Signifikanz auf (T-Test p-Wert <0,05).

Eine große Anzahl von Genen aus GO-Listen die immunologische Prozesse beschreiben wurde in T-Lymphozyten verändert exprimiert gefunden. Interessanterweise war der größte Teil dieser Gene während des Wettkampfes im Vergleich zur Ruhe herab reguliert.

So waren z.B. in der „GO:6952: Abwehrreaktion“ nur 32 Gene während des Wettkampfes im Vergleich zur Ruhe herauf reguliert, obwohl 209 Gene insgesamt signifikant verändert gefunden wurden. In dieser GO-Klasse sind sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Gene enthalten. Daher ist es bemerkenswert, dass diese Gene weitgehend herab reguliert sind. Beispielhaft hierfür ist die gemeinsame signifikante Herabregulation von Interleukin 15 (IL15), dem CX3 Chemokin Rezeptor 1 (CX3CR1), den Signalgebern und Transkriptions-Aktivatoren 3 und 6 (STAT3 und 6), den nukleären Faktoren aktivierter T-Lymphozyten (NFAT), dem Tumor-Nekrose Faktor Alpha (TNF $\alpha$ ) und BCL2L1 (siehe auch Abbildung 15). Nachfolgend sind einige in der Literatur beschriebene Interaktionen der genannten Gene gezeigt, die deutlich machen, dass deren gemeinsame Herabregulation ungewöhnlich ist.

Interleukin 15 gilt als wichtiger Regulator der T-Zell- und NK-Zell-Aktivierung und -Proliferation. Es ist entscheidend für das Überleben dieser Zellen. Die Aufrechterhaltung eines homöostatischen T-Lymphozytenpools erfolgt zum Teil über einen autokrinen Regelkreis mit Interleukin 15 Produktion in den T-Lymphozyten <sup>71</sup>.

Sechler et al. <sup>72</sup> konnten zeigen, dass Interleukin 15 die mRNA- und die Proteinmenge an CX3CR1 signifikant verringert. Das Besondere an CX3CR1 ist, dass dieser Rezeptor parallel auf Endothelzellen auch als Adhäsionsmolekül für Leukozyten fungiert <sup>73</sup>.

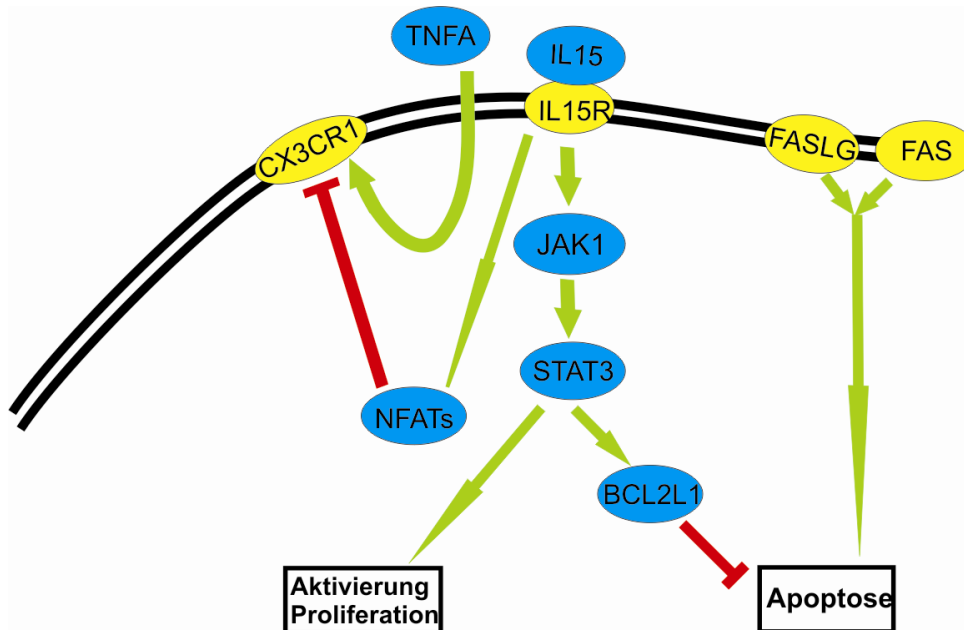
Die Wirkung von Interleukin 15 wird über den Interleukin 15 Rezeptor auf die Transkriptionsfaktoren (NFAT) übertragen, die ihrerseits wiederum direkt auf den Promotor von CX3CR1 einwirken und zu einer Herabregulation des Rezeptors führen <sup>74</sup>.

Hingegen wurde für TNF $\alpha$  beschrieben, dass dieses Chemokin eine Heraufregulation des CX3C Rezeptors <sup>75</sup> bewirkt.

Außerdem wurde gezeigt, dass IL15 die durch FAS (der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 6) und den FAS Liganden eingeleitete Apoptose verhindert. Das Interleukin induziert über den Janus Kinase 1 (JAK1) und STAT3 Signalweg die Heraufregulation des B-Zell Lymphom 2 ähnlichen Proteins 1 (BCL2L1), welches ein antiapoptotisches Protein darstellt <sup>76</sup>.

Zwischen den genannten Proteinen lassen sich noch wesentlich mehr Interaktionen beschreiben, doch bereits an diesen wenigen Beispielen wird deutlich, dass die gleichzeitige Herabregulation aller genannten Gene zur selben Zeit wahrscheinlich

nicht durch Prozesse wie Zell-Aktivierung oder Apoptose geleitet wird, da sonst eine gegenläufige Regulation von Antagonisten zu erwarten wäre.



**Abbildung 15:** Darstellung ausgewählter Interaktionen von Proteinen, deren Gene nach lang anhaltender Belastung signifikant mehr als 1,5-fach herab reguliert waren. Eine Ausnahme stellen FAS und JAK1 dar. FAS war in allen Gruppen auf dem gleichen niedrigen Niveau exprimiert und ist hier nur der Vollständigkeit halber dargestellt. JAK1 war nach lang anhaltender Belastung signifikant herauf reguliert. Gelbe Ellipsen symbolisieren membranständige Proteine, blaue Ellipsen andere Proteine. Grüne Pfeile stehen für Aktivierung bzw. Heraufregulation, rote T-Linien für Inaktivierung, Blockade oder Herabregulation. Obwohl die Proteine gegenläufigen Prozessen angehören, sind ihre Gene signifikant herab reguliert.

Zusätzlich zur Regulation der signifikant veränderten Gene wurde auch die Regulation der nicht signifikant veränderten Mitglieder „GO:6952: Abwehrreaktion“, betrachtet. Fast alle Gene dieser GO sind tendenziell herab reguliert

Die Beobachtung einer tendenziellen Herabregulation betraf in T-Lymphozyten alle hochsignifikant veränderten GO-Klassen der Ontologie „GO:8150: Biologischer Prozess“.

Die erste Ursache, die man bei veränderter Regulation von immunrelevanten Genen ins Auge fasst, ist die Aktivierung der T-Lymphozyten. In dem hier vorliegenden Fall lag die Vermutung nahe, dass in den Proben der Ruhephase der Anteil von aktivierten T-Lymphozyten höher war. Basierend auf den Arbeiten von Sancho et al., Yusuf et al.<sup>29, 30</sup> und einer Internet Datenbank (<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/Tutorials/cytokines.html>) wurden Genlisten erstellt. Mit deren Hilfe konnten das Zytokin-Repertoire, der Aktivierungszustand und die Quieszenz von T-Lymphozyten beurteilt werden. Die Genlisten mit ausführlicheren Informationen zu den Genen, deren Expressionsstärke und einer Quantifizierung der Expressionshöhe in den einzelnen Gruppen finden sich in Anhang IIIg.

Der wohl wichtigste Marker der T-Lymphozyten-Aktivierung ist das CD69 Molekül. Die mRNA des CD69 Antigens steigt nach der Aktivierung eines T-Lymphozyten stark an. Das Protein wird als früher Marker der T-Zell- Aktivierung angesehen <sup>77</sup>. Daher wurde die in der Mikroarrayanalyse unverändert gefundene Expression dieses Gens mittels RT-PCR validiert. Analog zu der Arraydatenauswertung wurden keine signifikanten Unterschiede in der CD69-Expression in den experimentellen Gruppen gefunden. Auch zahlreiche andere Gene, deren Expression typischerweise durch Aktivierung verändert wird (Anhang IIIg), zeigten in allen Gruppen auf den Arrays ähnliche Messwerte. Ausnahmen sind das bereits erwähnte IL15, der Chemokin Ligand 3 (CCL3), die Phosphoinositid-3-Kinase Beta (PIK3CB) und TNF $\alpha$ . Sie wurden zwar signifikant verändert exprimiert gefunden, jedoch haben alle Proteine dieser Gene multifunktionelle Eigenschaften, so dass deren Regulation nicht als Hinweis für veränderte Aktivierungszustände der Lymphozyten gewertet werden kann.

Ähnlich verhielt es sich mit den Expressionswerten der Zytokine. Der Großteil der relevanten T-Lymphozyten-Interleukine war nur sehr niedrig exprimiert und zeigte keine Veränderungen zwischen den experimentellen Gruppen. Eine Ausnahme stellte der transformierende Wachstumsfaktor Beta 1 dar, der im Wettkampf signifikant herab reguliert gefunden wurde, der jedoch auch zur Gruppe der multifunktionellen Proteine gehört.

Im Gegensatz zum Vorgenannten fanden sich für Gene die an der Lymphozyten-Quieszenz beteiligt sind signifikante und funktionell sinnvolle Veränderungen.

Quieszenz beschreibt einen Ruhezustand der Lymphozyten, der durch spezielle Regulationsmechanismen eingeleitet und beendet wird. In Quieszenz befindliche Zellen sind durch eine geringe Größe, eine niedrige Stoffwechselrate und das Ausbleiben spontaner Proliferation gekennzeichnet <sup>78</sup>

In den vergangenen Jahren stieg das Interesse an der Regulation der Lymphozyten-Quieszenz, da diese als ein mögliches Ziel für eine therapeutische Intervention bei Autoimmunkrankheiten angesehen wird <sup>79</sup>. Jedoch sind die der Quieszenz zugrunde liegenden Regulationsprozesse bzw. die Faktoren, die diesen Zustand einleiten oder beenden, nur teilweise aufgeklärt. Die Regulation Quieszenz-bezogener Gene durch lang anhaltendes intensives Training könnte daher ein neuer interessanter Aspekt für die Forschung auf diesem Gebiet sein. Einige für die Quieszenz relevante Gene und deren Regulation während lang anhaltenden intensiven Trainings sollen daher eingehender diskutiert werden.

KLF4, der Krüppel ähnliche Faktor 4, und FOXO1, der Forkhead Box“ Transkriptionsfaktor 1, waren in der Ruhepause signifikant höher exprimiert als während des Wettkampfes. Jedoch war von drei Transkripten für FOXO1 nur eines signifikant verändert. TOB1 der Signalgeber für ERBB2 (v-erb-b2 erythroblastische Leukämie, virales Onkogen Homolog 2) war während des Wettkampfes herauf reguliert.

Der Transkriptionsfaktor FOXO1 nimmt Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus, der Stress-Resistenz und des Energie-Metabolismus <sup>80</sup>. FOXO1 wurde in einer Studie auch als apoptoserelevant beschrieben <sup>81</sup>. Ein „Silencing“ des Transkriptionsfaktors verminderte die durch TNF, TNFR1 (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1), NFKB



(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1), FADD (FAS assoziiertes Protein) und die Kaspasen 3 und 8 vermittelte Apoptose in Fibroblasten um 76%<sup>81</sup>. Interessanterweise waren während des Wettkampfes alle genannten Gene mit Ausnahme von FADD gemeinsam mit FOXO1 herab reguliert. Diese Herabregulation in T-Lymphozyten kann als Hinweis auf einen Schutzmechanismus vor Apoptose interpretiert werden.

KLF4 ist ein Transkript des Krüppel Faktors, dessen Expression normalerweise auf den Darm beschränkt ist. Ein zweiter Vertreter dieser Familie, KLF2, wird laut Suzuki et al. vermehrt in der Lunge und in Lymphozyten exprimiert und ist der am besten untersuchten Krüppel Faktor<sup>82</sup>. Dieses Protein ist ein essentieller Regulator von Quieszenz, Überleben, Migration und Emigration der T-Zellen<sup>83</sup>. Das Expressionsniveau von KLF2 ist in den T-Zell-Proben zu allen Zeitpunkten unverändert hoch. Zu KLF4 liegen im Gegensatz zu KLF2 wesentlich weniger Daten vor. Möglicherweise hat es für die T-Zell Homöostase eine ähnliche Bedeutung wie KLF4, da gezeigt werden konnte, dass es die Kontrollpunkte des Zellzyklus beeinflussen kann<sup>84</sup>.

Das interessanteste mit der Lymphozyten-Quieszenz assoziierte und verändert reguliert gefundene Gen ist TOB1. Dieses Gen ist im Wettkampf signifikant höher als in der Ruhephase exprimiert. Tzachanis et al.<sup>85</sup>, sowie Hua und Thompson<sup>78</sup>, beschrieben das Protein dieses Gens als wichtigsten, aktiven Erhalter der Quieszenz in peripheren T-Lymphozyten. TOB1 hat die Fähigkeit die Transkription von „Aktivierungs-Zytokinen“ wie z.B. Interleukin 2 und 4, Interferon-Gamma, Zyklin A und E sowie die Zellproliferation zu inhibieren<sup>78</sup>. Zusätzlich wird sogar die Schwelle der Aktivierbarkeit des T-Lymphozyten durch dieses Protein angehoben<sup>85</sup>. Während der Lymphozyten-Aktivierung z.B. durch Interleukin 2 oder eine Kostimulation des T-Zell Rezeptors mit CD28 ist eine Herabregulation von TOB1 zwingend erforderlich, um die Quieszenz zu beenden<sup>78,85</sup>.

Über die Regulation von TOB1 und KLF2 werden die T-Zellen während des Wettkampfes also in Quieszenz gehalten. Auch in der Ruhephase ist TOB1 exprimiert, jedoch signifikant niedriger als während des Wettkampfes.

Zusammenfassend kann also für die T-Zellen geschlussfolgert werden, dass sie zu allen Zeitpunkten quieszent und nicht aktiviert waren. Die beobachteten umfangreichen Herabregulationen inflammatorischer Prozesse während des Wettkampfes können nicht dadurch erklärt werden, dass diese Prozesse zum Zeitpunkt „Ruhe“ in Folge einer Aktivierung herauf reguliert waren.

Um eine Erklärung für diese Beobachtungen zu finden, wurden die in „GeneSpring“ enthaltenen KEGG-Stoffwechselwege auf Auffälligkeiten hin überprüft. Während des Wettkampfes wurden starke Veränderungen in der Regulation energiegewinnender Stoffwechselwege gefunden. Besonders viele Enzyme der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels waren signifikant herab reguliert. Gleiches galt auch für Schlüsselenzyme des Glutaminstoffwechsels.

Als Vertreter der Kohlenhydrate umsetzenden Stoffwechselwege wurden die Hexokinase 3 (HK3), die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), die Phosphoglycerat Kinase 1 (PGK1), die Pyruvat Kinase, Muskel 2 (PKM2) und die Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase auch per Real-Time PCR validiert. Für den

Glutamin-abhängigen Stoffwechsel wurden die Glutamat Dehydrogenase (GLUD1), die Glutaminase (GLS) und die Glutathion Synthetase (GSS) validiert. Die Expression dieser Gene wurde während des Wettkampfes verglichen zur Ruhe herab reguliert gefunden, wobei bis auf die PGK1 und GLUD1 alle Gene signifikant verändert waren.

Neben den energierelevanten Stoffwechselwegen wurden auch andere signifikant verändert regulierte KEGG-Stoffwechselwege gefunden (siehe 4.3.4.2.) wie „NK Zell vermittelte Zytotoxizität“ und „Arachidonsäurestoffwechsel“. Diese haben inhaltliche Bezüge zu den zuvor beschriebenen immunrelevanten GO-Klassen.

Diese beiden KEGG-Stoffwechselwege wurden gemeinsam mit dem „Pentose-Phosphat-Stoffwechsel“, der „Glykolyse und Glukogenese“ und den GO-Klassen „GO:43207:Reaktion auf äußere biotische Reize“ und „GO:6952:Abwehrreaktion“ auf Ähnlichkeiten im Regulationsmuster untersucht (4.3.4.3). Wie in Abbildung 12 deutlich wird, sind in T-Lymphozyten alle genannten Prozesse in ähnlichem Maße von der Ruhe zum Wettkampf herab reguliert. Es kann also eine Kopplung der immun- und energierelevanten Stoffwechselwege angenommen werden.

Die Herabregulation in den immunrelevanten Wegen setzte sich allerdings auch während des Wettkampfes fort, während die Expression der Kohlenhydrat-abbauenden Stoffwechselwege zum Start des Wettkampfes, den niedrigsten Punkt erreicht hatte. Dies wurde auch in der RT-PCR bestätigt.

### **5.3.3. Intensive lang anhaltende körperliche Belastung führt zu einer spezifischen Verschiebung verschiedener Stoffwechselgleichgewichte quieszenter T-Lymphozyten**

In die bisherige Auswertung wurden nur die Stoffwechselwege einbezogen, deren Regulation durch den Stimulus lang anhaltende Belastung hoch signifikant verändert wurde. Dabei waren die für die Untersuchung verwendeten finalen Genlisten nicht danach gefiltert, ob die Gene im Wettkampf herauf- oder herab reguliert waren. Durch den Stimulus waren im Vergleich der Ruhe mit den Wettkampfzeitpunkten etwa genauso viele Transkripte signifikant herauf- wie herab reguliert. Trotzdem war die Anzahl der herab regulierten Transkripte in den hochsignifikant veränderten physiologischen Prozessen sehr groß. Das heißt, dass die herauf regulierten Transkripte über viele verschiedene Prozesse verteilt waren, während eine Herabregulation nur ganz spezielle Prozesse und hier sehr viele Gene betraf.

Dass die in 4.3.4.3 genannten GO- und KEGG-Prozesse gemeinsam einer Herabregulation unterliegen, ist kein Zufall. Es gibt mehrere Querverbindungen zwischen den Prozessen, von denen exemplarisch nachfolgend einige genannt werden.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels wie Prostaglandin E1 und Leukotrien D4 die Differenzierung von Immunzellen fördern und an entscheidenden Punkten der adaptiven Immunantwort agieren<sup>86, 87</sup>. So wird z.B. auch die inflammatorische

Antwort von T-Lymphozyten, die an asthmatischen Prozessen beteiligt sind, durch Cystenyl-Leukotriene gesteuert <sup>43</sup>.

Die Glykolyse und der Pentose-Phosphat-Stoffwechsel sind über mehrere gemeinsame Metabolite wie z.B. Glukose-6-Phosphat oder Fruktose-6-Phosphat miteinander verbunden.

Die Verfügbarkeit von Glukose hat einen direkten Einfluss auf die Produktion von Zytokinen <sup>88</sup>. Wird Ausdauersportlern Glukose zugeführt, fällt die proinflammatorische Antwort auf die Belastung schwächer aus.

Ein letztes Beispiel ist das Ergebnis einer in vitro Bindungsstudie, in der eine direkte Interaktion zwischen der Prostaglandin D Synthase mit der Hexokinase 3 gezeigt <sup>89</sup> wurde.

In quieszenten Zellen ist der Sinn dieser Kopplung von immun- und energierelevanten Prozessen nicht sofort offensichtlich. Betrachtet man sie unter dem Aspekt einer T-Lymphozyten-Aktivierung, wird die Bedeutung klar. Werden T-Lymphozyten aktiviert, reagiert ihr Energiestoffwechsel innerhalb von Sekunden und der Sauerstoffverbrauch der Zellen steigt um bis zu 53%. Allein die verstärkte Proteinsynthese, beispielsweise die Antigen-Produktion, verbraucht dreimal mehr Sauerstoff <sup>90</sup> als die basale Proteinsynthese. Alle durch die Aktivierung startenden Prozesse wie Zytokinese, Migration, Antikörper-Prozessierung und Präsentation und die Zellkommunikation der T-Lymphozyten sind sehr energieaufwändig <sup>91</sup>. Die Aktivierung der immunrelevanten bzw. energiegewinnenden Prozesse wird dabei über den T-Zell Rezeptor initiiert. Eines der Schlüsselproteine der Aktivierung ist die non-Rezeptor Tyrosin Kinase ZAP70, welche verschiedenste Signaltransduktionswege aktiviert. Am Ende dieser Signalübertragung stehen unter anderem die schon erwähnten nukleären Faktoren der T-Zell Aktivierung (NFAT). Über diese wird dann die Expression von Zytokinen gestartet. ZAP70 und die NFAT waren signifikant während des Wettkampfes herab reguliert.

Im Zusammenhang mit der Energiestoffwechsel-Regulation soll an dieser Stelle auf eine Gruppe von Proteinen hingewiesen werden, deren Gene nicht ausschließlich der Herabregulation unterliegen. Die Aktivierung der energiegewinnenden Prozesse ist stark von Kalziumsignalen abhängig. Aufgrund der beobachteten Regulationen im Energiestoffwechsel wurde auch die Regulation kalziumabhängiger Prozesse betrachtet. Tatsächlich waren viele Gene, die für kalziumbindende Proteine kodieren, signifikant verändert. So waren z.B. Calmodulin 1 und die Kalzium/ Calmodulin abhängige Kinase 2 Delta während des Wettkampfes herauf reguliert. Calmodulin 2 und 3 sowie das Calreticulin Binde Protein 1 waren hingegen herab reguliert. Eine generelle Herabregulation wie sie z.B. für die Gene des Arachidonsäurestoffwechsels beobachtet wurde, ist für kalziumassoziierte Gene nicht zu erwarten. Kalzium ist obligatorisch für die ionische Integrität der Zelle. Ein Verlust der ionischen Integrität entsteht durch "Ionenlecks" in den Membranen, wodurch intra- bzw. extrazelluläre Ionen ihr thermodynamisches Gleichgewicht einstellen. Dies führt zum Tod der Zelle <sup>92</sup>. Nach Buttgeriet et al. <sup>93</sup> zählt die ionische Integrität der Zelle zu den Prozessen, die selbst unter schwierigen Bedingungen wie Nährstoffverknappung am längsten aufrechterhalten werden. Ähnlich wie die ionische Integrität einer Zelle aufrechterhalten wird, muss auch ein Minimum an energieliefernden Prozessen in

der Zelle ablaufen. Das erklärt vielleicht die Beobachtung, dass die Expression von Genen der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels zu Beginn des Wettkampfes ein Minimum erreichte, wohingegen die immunrelevanten Gene während des Wettkampfes noch weiter herab reguliert wurden.

Bisher wurde die Kopplung von Energie- und Immun-Prozessen unter dem Aspekt einer Aktivierung und daraus folgend einer Heraufregulation diskutiert. Die gefundenen Daten zeigen aber eine Herabregulation dieser Prozesse während des Wettkampfes. Daraus ergibt sich die Frage ob eine mangelnde Versorgung der Zellen mit Nährstoffen die Ursache für diese Beobachtung ist.

Die bedeutendsten Energiequellen für T-Lymphozyten sind Glukose und Glutamin<sup>39, 79, 94</sup>. Diese Nährstoffe werden über das Blut im Körper verteilt was bedeutet, dass T-Lymphozyten permanent Zugang zu ihnen haben sollten.

Die Glutaminase (GLS), wurde signifikant herab reguliert gefunden was auch per RT-PCR bestätigt wurde. Ohne dieses Enzym können Monozyten und T-Lymphozyten, Glutamin nicht als respiratorischen Energieträger nutzen<sup>10</sup>. Neben einer verringerten Verfügbarkeit von Glutamin als Energiequelle ergeben sich aus einer geringeren Glutaminaufnahme weitere Konsequenzen für den Zellmetabolismus. Glutamin ist ein Stickstoff-Lieferant für den Purin- und Pyrimidin-Metabolismus<sup>95</sup>. Die Nukleotid-Biosynthese war auch durch die signifikante Herabregulation der Pyruvat Kinase, der Cytidin Deaminase und der Cytidin 5-Prime Triphosphat Synthetase beeinflusst. Des Weiteren ist Glutamin ein Vorläufer für das für zelluläre Redoxgleichgewichte wichtige Glutathion. Die Glutathion Synthetase war ebenfalls signifikant auf den Arrays und in RT-PCR herab reguliert. Das könnte bedeuten, dass der Schutz der T-Zellen vor oxidativem Stress und freien Radikalen vermindert war. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Glutamin als Nährstoff und immunrelevanten Prozessen. Die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Rezeptoren wie Interleukin 2, dem Interleukin 2 Rezeptor, Interferon Gamma oder dem Tumor Nekrose Faktor alpha ist in reifen Thymozyten direkt von der Verfügbarkeit von Glutamin abhängig<sup>96</sup>.

Neben Glutamin ist Glukose die entscheidende Energiequelle. Die gleichzeitige Verfügbarkeit von Glukose und Glutamin erhöht die Verstoffwechslungsrate beider Substrate<sup>97</sup>. Da T-Lymphozyten kaum interne Glykogen Speicher besitzen, sind sie im hohen Maße auf externe Glukosezufuhr angewiesen<sup>40</sup>. Die Hexokinase 3 ist das erste Enzym in der Glukose konvertierenden Glykolyse. Sie wurde sowohl in der Microarrayanalyse als auch der RT-PCR während des Wettkampfes im Vergleich zur Ruhe signifikant herab reguliert gefunden. Erst nach der Phosphorylierung durch die HK3 ist die Glukose für die Zelle als Energiequelle verfügbar. Ohne den irreversiblen Schritt der Phosphorylierung kann sie leicht wieder aus der Zelle ausgeschleust werden<sup>98</sup>. Zudem ist die Phosphorylierung notwendig um die Glukose für den Abbau zu aktivieren. Neben der Hexokinase 3 sind noch mehrere Mitglieder des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels bzw. der Glykolyse herab reguliert.

Da bekannt ist, dass die Hexokinase 3, die Phosphofruktokinase und die Pyruvat Kinase direkt transkriptionell reguliert<sup>99, 100</sup> werden, sind Rückschlüsse auf die Menge der Enzyme in den T-Lymphozyten möglich. Die Schlussfolgerung ist, dass

die Zellen sich zwar in einem nährstoffreichen Umfeld, dem Blut, befinden, die Nährstoffe aber nicht zur eigenen Energiegewinnung verwenden.

Möglicherweise unterliegen die T-Lymphozyten einem Prozess der Energieeinsparung, welcher induziert wird, um den durch die intensive Belastung erhöhten Energiebedarf in anderen Organen/ Geweben wie Muskel, Herz und Leber auszugleichen.

### **5.3.4. Die Hierarchie der Nährstoffverteilung unter körperlicher Belastung und während einer Infektion**

Die Nährstoffverteilung auf verschiedene Organe und Gewebe des Körpers ist strikt reguliert. Während lang anhaltender körperlicher Belastung wird in der Leber, den Nieren, dem Darm und den Immunzellen Glutamin verbraucht <sup>96</sup>. Zwar wird im Skelettmuskel Glutamin produziert, aber der Verbrauch unter Belastung übertrifft die Produktion sehr schnell, so dass ein Mangel entsteht. Auch der Verbrauch von Glukose durch die Skelettmuskeln erschöpft schnell die körpereigenen Vorräte. Hinsichtlich einer Glukoseversorgung hat in der Hierarchie das Gehirn höchste Priorität <sup>101, 102</sup>. So konnte gezeigt werden, dass im Falle einer Verknappung von Glukose, zum Schutz des Energiebedarfs des Gehirns, im Muskel eine vorübergehende Hemmung von Glykogenolyse und Glukoseimport induziert wird <sup>8</sup>. Auch Herz, Lunge, Leber und natürlich die Skelettmuskeln weisen unter lang anhaltender intensiver Belastung einen erhöhten Energiebedarf auf. Die meisten Organe sind in der Lage unter moderater Belastung auch Fett als Energiequelle zu nutzen <sup>3</sup>. Unter intensiver, erschöpfender Belastung wird aber vermehrt auf Substrate wie Kohlenhydrate oder Glutamin zurückgegriffen <sup>3</sup>.

Die Immunzellen sind also einem „Wettbewerb um Nährstoffe“ ausgesetzt. Da sie für die Reaktion des Körpers auf den Stimulus nicht primär notwendig sind, scheint eine Herabregulation des Energieverbrauchs, wie in Studie 3 beobachtet, im Sinne von Energieeinsparungen sinnvoll. Es wurde bereits diskutiert, dass die energierelevanten Prozesse wohl nicht noch weiter herab reguliert werden können als es während der TdF beobachtet wurde, wenn die Energieversorgung der Zelle nicht zusammenbrechen soll. Die Immunprozesse wurden weiter herab reguliert, da sie für das Überleben der Zelle nicht primär notwendig sind.

In diesem Zusammenhang ist es auch interessant, die Folgen einer T-Zell-Aktivierung auf den Energiehaushalt des Athleten zu diskutieren. Wird das Immunsystem aktiviert, erfährt die Leistungsfähigkeit des Athleten, eine deutliche Beeinflussung. Das Abnehmen der Leistungsfähigkeit basiert hauptsächlich auf dem Energieverlust der durch die energieaufwändige Aktivierung induziert wird <sup>93, 94, 103, 104</sup>. Spurlock <sup>105</sup> befasste sich in einem Übersichtsartikel mit der Energieumverteilung während einer Immunantwort. Er beschrieb verschiedene Regulationsmechanismen, die zu einer Umkehr der Energieversorgungs-Hierarchie führen. Die Immunzellen nehmen durch spezifische Interaktionen Einfluss auf den Metabolismus anderer Gewebe und Organe, um den eigenen, durch die Immunantwort gesteigerten, Energiebedarf zu decken. Die Interaktion wird vor allem durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren gesteuert. So wird z.B. durch den Tumor Nekrose Faktor oder Interleukin 1 im Skelettmuskel, Herz und Leber die Glukoseaufnahme gehemmt <sup>103</sup>.

Auch im Zusammenhang mit dem „Übertrainings-“, bzw. dem „verringerte Leistungsfähigkeits-Syndrom“ wurden Hinweise auf eine ursächliche Beteiligung des Immunsystems gefunden. Smith<sup>103</sup> fasste verschiedene Symptome die im Zusammenhang mit Übertraining bzw. verringerter Leistungsfähigkeit stehen, nach der Häufigkeit ihrer Nennung zusammen. Er berichtete, dass oft eine Depletion von Mineralstoffen, eine gesenkte Muskel-Glykogen-Konzentration, grippeähnliche Symptome, schlechtere Heilung kleiner Verletzungen und Anschwellen der Lymphknoten oder Infektionen beobachtet wurden.

Möglicherweise trainiert der Sportler die Unterdrückung des Immunsystems um einen Energieverlust „vorzubeugen“. Die gefundene Heraufregulation von TOB1 unterstützt diese Hypothese. Die Zellen werden einerseits in energetisch sparsamer Quieszenz gehalten und gleichzeitig erhöht sich die Schwelle der Aktivierbarkeit<sup>78, 85</sup>. Zusätzlich wird eine Aktivierung auch dadurch erschwert, dass Gene von für den Prozess substantiellen Proteinen wie ZAP70 und NFATs herab reguliert werden. Somit wird die Gefahr verringert, dass durch eine Aktivierung des Immunsystems ein Energieleck entsteht.

### **5.3.5. Änderungen in der Genexpression von Monozyten als Reaktion auf lang anhaltende intensive Belastung**

Die Auswertung der Genexpressionsmuster in Monozyten zeigte, dass die Reaktion auf den Stimulus „lang anhaltende intensive Belastung“ viel weniger Gene (~50%) in ihrer Regulation beeinflusste als in T-Lymphozyten. Von den verändert regulierten Transkripten gehören fast drei Viertel auch zur finalen T-Lymphozyten Genliste. Dies wird auch darin wieder gespiegelt, dass dieselben GO- und KEGG-Listen wie in T-Zellen hochsignifikant besetzt waren. Der Einfluss des Stimulus auf diese Prozesse war allerdings weniger stark ausgeprägt als in den T-Zellen (siehe auch Abbildung 12). Die Richtung der Regulation der Kohlenhydrat verstoffwechselnden bzw. immunrelevanten Prozesse in den Monozyten entsprach der in den T-Lymphozyten. Die meisten Gene waren während des Wettkampfes niedriger exprimiert als in der Ruhephase.

In der RT-PCR wurde eine signifikante Heraufregulation von ALOX5, BCL2L1, G6PD, GLUD1, PTGS1 und GSS während des Wettkampfes gefunden. GLUD1, die Glutamat Dehydrogenase ist das Enzym, welches nach der Glutaminase an der Verstoffwechslung von Glutamin beteiligt ist. Es war in Monozyten auch schon in der Arraymessung signifikant herauf reguliert.

Die Schlüsse, die hinsichtlich der Glutaminversorgung der T-Lymphozyten gezogen wurden, treffen somit für Monozyten nicht zu.

Auch die mit RT-PCR gefundene Heraufregulation der G6PD deutet darauf hin, dass die Energieversorgung der Monozyten anders an die Gegebenheiten angepasst ist als die der T-Lymphozyten.

Eine Ursache für die beobachteten Unterschiede zwischen den Zelltypen ist im experimentellen Aufbau der Studie, präziser den Zeitpunkten der Blutentnahmen in Verbindung mit der Verweildauer der betrachteten Zelltypen in der Blutzirkulation begründet. Zwischen den Blutentnahmen des Wettkampfes lagen ca. drei Wochen.

Die Proben des Ruhezeitpunktes wurden erst vier Monate später abgenommen. Diese Zeitpunkte waren nur so wählbar, da sie dem Jahrestrainingsplan der Athleten angepasst waren. Nicht aktivierte Monozyten und T-Lymphozyten haben sehr unterschiedliche Aufenthaltszeiten in der Zirkulation. Monozyten bleiben nur wenige Tage im Blutstrom <sup>68, 69</sup>. Hingegen wird die Aufenthaltszeit für naive T-Lymphozyten auf ein bis zwei Jahre geschätzt <sup>66, 67</sup>. Das bedeutet, dass T-Lymphozyten dem lang anhaltenden Stimulus permanent ausgesetzt sind und ihre Lebensbedingungen unter dem Stimulus sich kaum ändern. Monozyten hingegen werden nach wenigen Tagen entweder in der Milz ausgesondert oder wandern aus der Blutbahn aus und differenzieren zu Makrophagen. In der Blutzirkulation sind die Zellen aktiv mit der Erkennung körperfremder Partikel oder entzündlicher Signale, die zu einem Auswandern aus der Zirkulation führen, beschäftigt. Monozyten haben daher einen anderen Energiebedarf als quieszente T-Lymphozyten, so dass es nicht erstaunlich ist, dass die Regulation der energetisch bedeutsamen Stoffwechselwege anders gefunden wurde.

Eine Zielstellung dieser Arbeit war die Identifikation einer Zellart, die gut geeignet ist, um den Einfluss des Stimulus „lang anhaltende intensive Belastung“ sensitiv wiederzugeben. Im Vergleich von Monozyten und T-Lymphozyten ist letzterer Zelltyp eindeutig vorzuziehen.

### 5.3.6. Vergleich der Genexpression in den Kontrollen und den Athleten

Ein sehr auffälliges Ergebnis dieser Arbeit war, dass das Niveau der Genexpression in energieliefernden bzw. immunrelevanten Prozessen in den Blutzellen der Kontrollprobanden sehr stark dem in den Athleten während des Wettkampfes ähnelte. Auch lagen die genannten Prozesse in der Ruhephase weit über dem Niveau in den Kontrollen.

Die Gene, die zwischen der Ruhephase der Athleten und den Kontrollen verändert reguliert wurden, waren größtenteils dieselben wie aus dem Vergleich Wettkampf und Ruhephase. Daher fallen sie auch in dieselben GO- und KEGG-Klassen. Erwartungsgemäß würde man die Genexpression in den Kontrollen wohl eher der Genexpression der Athleten in Ruhe als der während des Wettkampfes gleichsetzen. Wie in Abschnitt 4.3.4.3 gezeigt wurde, besteht aber für die energieliefernden und immunrelevanten Prozesse in Blutzellen eine direkte Kopplung. Der Energieumsatz der Sportler und der Kontrollen liefert möglicherweise die Erklärung für diese Beobachtung.

Hochleistungssportler haben einen stark erhöhten Energieumsatz und dies auch in der jährlichen trainingsfreien Zeit. Leider sind keine Angaben dazu verfügbar, in welchem Ausmaß der Kalorienbedarf in der wettkampffreien Zeit sinkt. Dieser stellt sich jedoch nicht auf das Niveau normaler Männer ein, da die Athleten anteilig mehr Muskelmasse haben. Muskeln verbrauchen auch unbelastet mehr Energie als beispielsweise Fettgewebe <sup>106</sup>. Während des Wettkampfes verbrennen die Athleten bis zu 8500 kcal pro Tag (persönliche Kommunikation S. Vogt, Präventive und Rehabilitative Sportmedizin, Universität Freiburg). Die Mitglieder des Kontrollkollektivs hatten einen geschätzten Umsatz von 3000kcal pro Tag.

Die Auswirkungen der verschiedenen Ernährungsweisen und Energieumsätze haben neben dem Training einen nicht ermittelbaren Einfluss auf die Genexpression der Blutzellen.

Für diese Studie wird die Genexpression in den Kontrollen daher nur als Orientierung genutzt. Durch den Vergleich der Kontrollen mit den Athleten ist es z.B. möglich Aussagen darüber zu treffen, ob eine veränderte Regulation relevant ist oder nicht. Betrachtet man die Unterschiede in der Expression der stark verändert regulierten physiologischen Prozesse, so wird erst im Vergleich mit den Kontrollen deutlich, wie umfangreich die Änderungen waren.

### 5.4. Ähnlichkeiten in den Genexpressionsmustern aller drei Studien

Für diese Arbeit wurden Microarrayexperimente unter verschiedenen Gesichtspunkten durchgeführt. Alle Experimente zielen aber im Grunde auf die Beschreibung der Reaktionen weißer Blutzellen auf den Reiz „Sport“ ab. So war es von Interesse nach Genen zu suchen, die prinzipiell verändert reguliert werden, wenn ein Mensch sich physisch belastet.

Generell wurden nach lang anhaltendem intensivem Training andere Gene verändert reguliert als in der Akutreaktion. Dies spiegelt sich in der geringen Schnittmenge der finalen Listen aus allen drei Studien wieder. Natürlich haben Zellgemisch und Individualität der Sportler bzw. der Trainingszustand ebenfalls einen großen, nicht differenzierbaren Einfluss.

Trotzdem bleibt als Fazit die Erkenntnis, dass Blutzellen und hierbei besonders die T-Lymphozyten sehr sensitiv verschiedene Belastungen des Körpers wiedergeben. Auch die Individualität des jeweiligen Sportlers erzeugt ein deutliches Muster. Das unterstreicht die Sensitivität der Methodik.

Interessanterweise wurden in allen untersuchten Blutzellen durch die körperliche Belastung immer die immunrelevanten Prozesse „GO:9607: Reaktion auf biotische Reize“, „GO:6952: Abwehrreaktion“ und „GO:6955: Immunantwort“ angesprochen. Diese drei GO-Klassen waren in keinem Zelltyp unter den 99 GO-Klassen, in denen unabhängig von einem externen Stimulus die meisten Mitglieder exprimiert waren. Der Vergleich der drei Genexpressions-Studien zeigt, dass die Auswirkungen des Stimulus zumindest teilweise unabhängig von Zelltyp, Trainingsstatus oder Art der Belastung immer die gleichen Prozesse betreffen. Die Gene für den Interleukin 2 Rezeptors Beta (IL2RB), Spondin 2 (SPON2), den G-Protein gekoppelten Rezeptor 56 (GPR56) und die Aldo-Keto Reduktase, Familie 1, Mitglied C3 (AKR1C3) waren in allen Studien durch Sport signifikant herab reguliert. Das Gen IL2RB codiert für eine Untereinheit des Interleukin 2 Rezeptors und ist an der Vermittlung der Immunantwort beteiligt. Spondin 2 erfüllt Aufgaben in der Leukozyten-Rekrutierung aus dem Blut, der Erkennung von Mikroben und ist essentiell im Aufbau einer stabilen Verbindung zwischen T-Lymphozyten und dendritischen Zellen<sup>107</sup>. AKR1C3 und PTGDS stammen beide aus dem Arachidonsäurestoffwechsel. Hier sind sie an der Produktion von Prostaglandin D2 beteiligt. Prostaglandin D2 wurde unter anderem im Zusammenhang mit T-Lymphozyten Chemotaxis beschrieben<sup>42</sup>



## Diskussion

Es ist durchaus denkbar, dass noch mehr solcher „universell durch Sport regulierbaren Gene“ existieren. Für diese Gene ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sie auch in einem anderen Sportmodell wieder gefunden werden können.

## 6. Methodische Limitierungen, Hypothesen, neue Zielsetzungen und Ausblick

Microarrays sind für die Generierung von genomweiten Expressionsdaten die leistungsfähigste Technologie. Berechtigterweise wird oft argumentiert, dass eine physiologische Relevanz der Ergebnisse allein mit Messungen des Transkriptom nicht beweisbar ist. Um zu zeigen, dass eine Veränderung in der Genexpression auch Auswirkungen auf das zugehörige Protein hat, müsste jede einzelne gefundene Änderung der Expression auf Proteinebene bestätigt werden. Anschließend müsste jedes Protein in umfassenden Experimenten auf tatsächliche Funktionalität getestet werden. Allein in T-Lymphozyten wurden 3832 Transkripte durch den Stimulus „lang anhaltende intensive Belastung“ signifikant verändert reguliert gefunden. Alle Befunde auf Proteinebene zu überprüfen, ist mit den derzeit verfügbaren Technologien nicht zu leisten. Auch bleibt zu bedenken, dass für Microarrayexperimente sehr geringe Probenmengen ausreichen. Dies kommt der Anforderung entgegen, dass einem Hochleistungssportler nur geringe Volumina Blut entnommen werden können. Etwa fünf Millionen naive T-Lymphozyten sind aus ca. 4 ml Vollblut isolierbar. Deren RNA reicht aus, um einen transkriptionellen Scan des gesamten Genoms durchzuführen. Da naive T-Zellen aber nur geringste Mengen Protein beinhalten, wäre mit der genannten Zellzahl nur ein reproduzierbarer semi-quantitativer Western Blot denkbar (persönliche Kommunikation mit C. Fritsch, DKFZ Heidelberg). So steht eine Messung auf Proteinebene tausenden Messungen auf transkriptioneller Ebene gegenüber.

Jedoch besteht das Interesse, das dieser Arbeit zugrunde liegt, auch nicht in der endgültigen Klärung grundlegender physiologischer Prozesse. Es geht vielmehr darum, ob mit Messungen der Genexpression Proben hinsichtlich von Leistungsparametern klassifizierbar sind. Für den Hochleistungssport ist das gewünschte Ziel die Entwicklung eines diagnostischen Werkzeuges auf der Basis der Transkriptomik. Diese soll zukünftig Ansatzmöglichkeiten zur Verbesserungen des Trainingszustandes aufzeigen oder die Detektion von Übertraining ermöglichen, bevor dieses sich physiologisch manifestiert.

Die Hoffnung, dass Übertraining anhand von GEM vorhersagbar wird, ist nicht unbegründet: Veränderungen im Immunsystem waren schon oft als Ursache für das Übertrainingssyndrom im Gespräch<sup>5</sup>. Es existieren z.B. mehrere Studien, die sich mit der Hypothese der „Zytokin-Krankheit“ befassen<sup>7,103</sup>. Diese beruht auf der Tatsache, dass der Muskel unter Belastung große Mengen Interleukin 6 ausschüttet. Dieses führt zu Aktivierung von Immunzellen und dadurch wie diskutiert zu einem Abfallen der Leistungsfähigkeit. In einer Arbeit von Gabriel et al.<sup>108</sup> wurden daher in übertrainierten Athleten per FACS die Immun-Phänotypen von T-Lymphozyten bestimmt, um herauszufinden, ob eine Immunaktivierung die Ursache für Übertraining war. Der Schluss der aus den Ergebnissen der Arbeit von Gabriel gezogen wurde, war, dass eine Aktivierung der Zellen des Immunsystems nur einen minimalen Anteil an Übertraining hat.

Keiner der Athleten, die an der Studie 3 teilnahmen, litt an einem Übertrainings-Syndrom oder verringerter Leistungsfähigkeit und es konnte auch keine Immunzellaktivierung beobachtet werden. Trotzdem kann aus den Ergebnissen

dieser Studie eine neue Hypothese für eine Ursache des Übertrainings abgeleitet werden. Wie bereits erwähnt, zeigen Studien zum Thema Übertraining, dass das Syndrom oft mit verändertem Glutamin- bzw. Kohlenhydrat/Glykogen-Metabolismus einhergeht <sup>103</sup>. Zu beiden Zeitpunkten des Wettkampfes waren ebendiese Prozesse in den T-Lymphozyten der Athleten im Vergleich zur Ruhe herab reguliert. Die Genexpression war zu den beiden Wettkampf Zeitpunkten sehr ähnlich.

Das Muster, das in T-Lymphozyten gemessen wird, ist durch die äußeren Umstände, wie z.B. die Nährstoffversorgung bestimmt und steht in einem Gleichgewicht mit Prozessen, die in anderen Geweben stattfinden. Ändert sich durch einen nicht bekannten Auslöser die vermutlich antrainierte Homöostase in den T-Lymphozyten, so sind Auswirkungen auf die Homöostase des ganzen Körpers zu erwarten.

Es ist also ein Model denkbar, in dem eine Aktivierung der Zellen gar nicht notwendig ist um ein „Energieleck“ zu erzeugen. Während des Wettkampfes könnte allein das Ansteigen der Genexpression immunrelevanter und dadurch energierelevanter Stoffwechselwege auf das Niveau der Ruhewerte ausreichen, damit das Energiegleichgewicht gestört wird. Folgen für den Athleten, wie verringerte Leistungsfähigkeit wären denkbar.

All dies ist natürlich zu diesem Zeitpunkt hochspekulativ. Man müsste die Genexpressionsmuster eines übertrainierten Athleten bestimmen, um ganz gezielt Veränderungen in immun- oder energierelevanten Prozessen zu messen. Dazu läuft basierend auf Methodik und Ergebnissen dieser Studie bereits eine Folgestudie, in deren Rahmen diese Hypothese geprüft werden kann.

Die rapide Weiterentwicklung der Microarraytechnologie und der zunehmende Wettbewerb zwischen den Anbietern eröffnet die Aussicht, dass ein Array schon bald für unter 100 Euro gemessen werden kann. Durch die gleichzeitige Weiterentwicklung der Probenprozessierung ist es außerdem denkbar, dass mit der gesamten RNA von T-Lymphozyten aus nur einem Milliliter Blut ausreichend Material für eine Arraymessung verfügbar wird. Ein auf Genexpression basierender Standardtest rückt in greifbare Nähe.

## 7. Referenzen

1. Tully MA, Cupples ME, Chan WS, McGlade K, Young IS. Brisk walking, fitness, and cardiovascular risk: a randomized controlled trial in primary care. *Prev Med.* Aug 2005;41(2):622-628.
2. Barengo NC, Hu G, Lakka TA, Pekkarinen H, Nissinen A, Tuomilehto J. Low physical activity as a predictor for total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men and women in Finland. *Eur Heart J.* Dec 2004;25(24):2204-2211.
3. Hansen K, Shriver T, Schoeller D. The effects of exercise on the storage and oxidation of dietary fat. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 2005;35(5):363-373.
4. Bassuk SS, Manson JE. Physical activity and the prevention of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* Jul 2003;5(4):299-307.
5. Urhausen A, Kindermann W. Diagnosis of overtraining: what tools do we have? *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 2002;32(2):95-102.
6. Lakier Smith L. Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 2003;33(5):347-364.
7. Robson P. Elucidating the unexplained underperformance syndrome in endurance athletes : the interleukin-6 hypothesis. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 2003;33(10):771-781.
8. Steinacker JM, Brkic M, Simsch C, Nething K, Kresz A, Prokopchuk O, Liu Y. Thyroid hormones, cytokines, physical training and metabolic control. *Horm Metab Res.* Sep 2005;37(9):538-544.
9. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* Apr 2005;98(4):1154-1162.
10. Oehler R, Roth E. Regulative capacity of glutamine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* May 2003;6(3):277-282.
11. Hiscock N, Pedersen BK. Exercise-induced immunodepression- plasma glutamine is not the link. *J Appl Physiol.* Sep 2002;93(3):813-822.
12. Lancaster GI, Khan Q, Drysdale PT, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MT, Gleeson M. Effect of prolonged exercise and carbohydrate ingestion on type 1 and type 2 T lymphocyte distribution and intracellular cytokine production in humans. *J Appl Physiol.* Feb 2005;98(2):565-571.
13. Mooren FC, Lechtermann A, Volker K. Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. *Med Sci Sports Exerc.* Sep 2004;36(9):1476-1483.
14. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 24 1994;91(11):5022-5026.
15. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* Oct 21 2004;431(7011):931-945.
16. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER,

- Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korfi I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. Feb 15 2001;409(6822):860-921.
17. Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *Faseb J*. Sep 2005;19(11):1498-1500.
  18. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, Brown PO. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 18 2003;100(4):1896-1901.
  19. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*. Jul 2000;80(3):1055-1081.
  20. Mooren FC, Bloming D, Lechtermann A, Lerch MM, Volker K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol*. Jul 2002;93(1):147-153.
  21. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med*. Aug 2000;34(4):246-251.
  22. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*. Dec 2001;29(4):365-371.
  23. Vogt S, Heinrich L, Schumacher YO, Blum A, Roecker K, Dickhuth HH, Schmid A. Power output during stage racing in professional road cycling. *Med Sci Sports Exerc*. Jan 2006;38(1):147-151.
  24. Wu Z, Irizarry R, Gentleman R, Martinez M, Spencer F. A Model based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *JASA*. 2003

## Referenzen

25. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* May 2000;25(1):25-29.
26. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* Jan 1 2000;28(1):27-30.
27. Kanehisa M. The KEGG database. *Novartis Found Symp.* 2002;247:91-101; discussion 101-103, 119-128, 244-152.
28. Connolly PH, Caiozzo VJ, Zaldivar F, Nemet D, Larson J, Hung SP, Heck JD, Hatfield GW, Cooper DM. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Appl Physiol.* Oct 2004;97(4):1461-1469.
29. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* Mar 2005;26(3):136-140.
30. Yusuf I, Fruman DA. Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends Immunol.* Jul 2003;24(7):380-386.
31. Mansson R, Tsapogas P, Akerlund M, Lagergren A, Gisler R, Sigvardsson M. Pearson correlation analysis of microarray data allows for the identification of genetic targets for early B-cell factor. *J Biol Chem.* Apr 23 2004;279(17):17905-17913.
32. Raychaudhuri S, Stuart JM, Altman RB. Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series. *Pac Symp Biocomput.* 2000:455-466.
33. Affymetrix I. *GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals*. Santa Clara: Affymetrix, Inc.; 2002.
34. Millenaar FF, Okyere J, May ST, van Zanten M, Voeselek LA, Peeters AJ. How to decide? Different methods of calculating gene expression from short oligonucleotide array data will give different results. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:137.
35. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society.* 1995;57:289-300.
36. Lewin A, Grieve IC. Grouping Gene Ontology terms to improve the assessment of gene set enrichment in microarray data. *BMC Bioinformatics.* 3 October 2006 2006;7:426:1-16.
37. Buttner P, Mosig S, Funke H. Gene expression profiles of T lymphocytes are sensitive to the influence of heavy smoking: a pilot study. *Immunogenetics.* Dec 6 2006.
38. Buettner P, Mosig S, Lechtermann A, Funke H, Mooren FC. Exercise affects the gene expression profiles of human white blood cells. *J Appl Physiol.* Sep 21 2006.
39. Field CJ. Use of T cell function to determine the effect of physiologically active food components. *Am J Clin Nutr.* Jun 2000;71(6 Suppl):1720S-1725S; discussion 1726S-1727S.
40. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, Elstrom RL, June CH, Thompson CB. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity.* Jun 2002;16(6):769-777.
41. Parsons JP, Mastrorade JG. Exercise-induced bronchoconstriction in athletes. *Chest.* Dec 2005;128(6):3966-3974.
42. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* Nov 30 2001;294(5548):1871-1875.
43. Kim DC, Hsu FI, Barrett NA, Friend DS, Grenningloh R, Ho IC, Al-Garawi A, Lora JM, Lam BK, Austen KF, Kanaoka Y. Cysteinyl leukotrienes regulate Th2 cell-dependent pulmonary inflammation. *J Immunol.* Apr 1 2006;176(7):4440-4448.

## Referenzen

44. Gelfand EW, Dakhama A. CD8+ T lymphocytes and leukotriene B4: novel interactions in the persistence and progression of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* Mar 2006;117(3):577-582.
45. Luster AD, Tager AM. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. *Nat Rev Immunol.* Sep 2004;4(9):711-724.
46. Jakobsson PJ, Steinhilber D, Odlander B, Radmark O, Claesson HE, Samuelsson B. On the expression and regulation of 5-lipoxygenase in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 15 1992;89(8):3521-3525.
47. Fehrenbach E, Niess AM, Schlotz E, Passek F, Dickhuth HH, Northoff H. Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. *J Appl Physiol.* Aug 2000;89(2):704-710.
48. Febbraio MA, Koukoulas I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J Appl Physiol.* Sep 2000;89(3):1055-1060.
49. Lancaster GI, Moller K, Nielsen B, Secher NH, Febbraio MA, Nybo L. Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. *Cell Stress Chaperones.* Autumn 2004;9(3):276-280.
50. Fehrenbach E, Niess AM. Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exerc Immunol Rev.* 1999;5:57-77.
51. Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:349-384.
52. Peake J, Suzuki K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. *Exerc Immunol Rev.* 2004;10:129-141.
53. Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E. Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. *Exerc Immunol Rev.* 1999;5:22-56.
54. Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal.* Jun 2002;4(3):405-414.
55. Laval J. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol Biol (Paris).* Jan 1996;44(1):14-24.
56. Koskinen SO, Heinemeier KM, Olesen JL, Langberg H, Kjaer M. Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. *J Appl Physiol.* Mar 2004;96(3):861-864.
57. Carmeli E, Moas M, Lennon S, Powers SK. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp Physiol.* Jul 2005;90(4):613-619.
58. Pelus LM, Bian H, King AG, Fukuda S. Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4. *Blood.* Jan 1 2004;103(1):110-119.
59. Velders GA, Fibbe WE. Involvement of proteases in cytokine-induced hematopoietic stem cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci.* Jun 2005;1044:60-69.
60. Sellebjerg F, Sorensen TL. Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system. *Brain Res Bull.* Aug 15 2003;61(3):347-355.
61. Jones RL, Hannan NJ, Kaitu'u TJ, Zhang J, Salamonsen LA. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab.* Dec 2004;89(12):6155-6167.
62. Hansen RK, Parra I, Hilsenbeck SG, Himmelstein B, Fuqua SA. Hsp27-induced MMP-9 expression is influenced by the Src tyrosine protein kinase yes. *Biochem Biophys Res Commun.* Mar 23 2001;282(1):186-193.

## Referenzen

63. Bengtson P, Lundblad A, Larson G, Pahlsson P. Polymorphonuclear leukocytes from individuals carrying the G329A mutation in the alpha 1,3-fucosyltransferase VII gene (FUT7) roll on E- and P-selectins. *J Immunol.* Oct 1 2002;169(7):3940-3946.
64. Becton Dickinson Company g. *BD Vacutainer™ CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Citrate*  
*For the Separation of Mononuclear Cells from Whole Blood.* Vol 2003: Becton, Dickinson and Company; 2003.
65. Rox JM, Bugert P, Muller J, Schorr A, Hanfland P, Madlener K, Kluter H, Potzsch B. Gene expression analysis in platelets from a single donor: evaluation of a PCR-based amplification technique. *Clin Chem.* Dec 2004;50(12):2271-2278.
66. Macallan DC, Wallace D, Zhang Y, De Lara C, Worth AT, Ghattas H, Griffin GE, Beverley PC, Tough DF. Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. *J Exp Med.* Jul 19 2004;200(2):255-260.
67. Neese RA, Misell LM, Turner S, Chu A, Kim J, Cesar D, Hoh R, Antelo F, Strawford A, McCune JM, Christiansen M, Hellerstein MK. Measurement in vivo of proliferation rates of slow turnover cells by 2H2O labeling of the deoxyribose moiety of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 26 2002;99(24):15345-15350.
68. Leder LD. The origin of blood monocytes and macrophages. A review. *Blut.* Nov 1967;16(2):86-98.
69. van Furth R, Diesselhoff-Den Dulk MM. The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. *J Exp Med.* Oct 1 1970;132(4):813-828.
70. Feldon SE, O'Loughlin C W, Ray DM, Landskroner-Eiger S, Seweryniak KE, Phipps RP. Activated human T lymphocytes express cyclooxygenase-2 and produce proadipogenic prostaglandins that drive human orbital fibroblast differentiation to adipocytes. *Am J Pathol.* Oct 2006;169(4):1183-1193.
71. Miranda-Carus ME, Benito-Miguel M, Llamas MA, Balsa A, Martin-Mola E. Human T cells constitutively express IL-15 that promotes ex vivo T cell homeostatic proliferation through autocrine/juxtacrine loops. *J Immunol.* Sep 15 2005;175(6):3656-3662.
72. Sechler JM, Barlic J, Grivel JC, Murphy PM. IL-15 alters expression and function of the chemokine receptor CX3CR1 in human NK cells. *Cell Immunol.* Aug 2004;230(2):99-108.
73. Barlic J, Sechler JM, Murphy PM. IL-15 and IL-2 oppositely regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1. *Blood.* Nov 15 2003;102(10):3494-3503.
74. Barlic J, McDermott DH, Merrell MN, Gonzales J, Via LE, Murphy PM. Interleukin (IL)-15 and IL-2 reciprocally regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1 through selective NFAT1- and NFAT2-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* Nov 19 2004;279(47):48520-48534.
75. Croitoru-Lamoury J, Guillemin GJ, Boussin FD, Mognetti B, Gigout LI, Cheret A, Vaslin B, Le Grand R, Brew BJ, Dormont D. Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: evidence for a central role of TNF alpha and IFN gamma in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia.* Mar 2003;41(4):354-370.
76. Demirci G, Li XC. IL-2 and IL-15 exhibit opposing effects on Fas mediated apoptosis. *Cell Mol Immunol.* Apr 2004;1(2):123-128.
77. Cambiaggi C, Scupoli MT, Cestari T, Gerosa F, Carra G, Tridente G, Accolla RS. Constitutive expression of CD69 in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12. *Immunogenetics.* 1992;36(2):117-120.
78. Hua X, Thompson CB. Quiescent T cells: actively maintaining inactivity. *Nat Immunol.* Dec 2001;2(12):1097-1098.
79. Frauwirth KA, Thompson CB. Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol.* Apr 15 2004;172(8):4661-4665.



## Referenzen

80. Dong XY, Chen C, Sun X, Guo P, Vessella RL, Wang RX, Chung LW, Zhou W, Dong JT. FOXO1A is a candidate for the 13q14 tumor suppressor gene inhibiting androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Res.* Jul 15 2006;66(14):6998-7006.
81. Alikhani M, Alikhani Z, Graves DT. FOXO1 functions as a master switch that regulates gene expression necessary for tumor necrosis factor-induced fibroblast apoptosis. *J Biol Chem.* Apr 1 2005;280(13):12096-12102.
82. Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R. Vascular implications of the Kruppel-like family of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jun 2005;25(6):1135-1141.
83. Carlson CM, Endrizzi BT, Wu J, Ding X, Weinreich MA, Walsh ER, Wani MA, Lingrel JB, Hogquist KA, Jameson SC. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature.* Jul 20 2006;442(7100):299-302.
84. Yoon HS, Yang VW. Requirement of Kruppel-like factor 4 in preventing entry into mitosis following DNA damage. *J Biol Chem.* Feb 6 2004;279(6):5035-5041.
85. Tzachanis D, Freeman GJ, Hirano N, van Puijenbroek AA, Delfs MW, Berezovskaya A, Nadler LM, Boussiotis VA. Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. *Nat Immunol.* Dec 2001;2(12):1174-1182.
86. Spanbroek R, Hildner M, Steinhilber D, Fusenig N, Yoneda K, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+) hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. *Blood.* Dec 1 2000;96(12):3857-3865.
87. Rudolph IL, Kelley DS, Klasing KC, Erickson KL. Regulation of cellular differentiation and apoptosis by fatty acids and their metabolites. *Nutr Res.* Jan-Feb 2001;21(1-2):381-393.
88. Nieman DC, Pedersen BK. Exercise and immune function. Recent developments. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* Feb 1999;27(2):73-80.
89. Sui D, Wilson JE. Interaction of insulin-like growth factor binding protein-4, Miz-1, leptin, lipocalin-type prostaglandin D synthase, and granulin precursor with the N-terminal half of type III hexokinase. *Arch Biochem Biophys.* Oct 15 2000;382(2):262-274.
90. Schmid D, Burmester GR, Tripmacher R, Kuhnke A, Buttgerit F. Bioenergetics of human peripheral blood mononuclear cell metabolism in quiescent, activated, and glucocorticoid-treated states. *Biosci Rep.* Aug 2000;20(4):289-302.
91. Krauss S, Brand MD, Buttgerit F. Signaling takes a breath--new quantitative perspectives on bioenergetics and signal transduction. *Immunity.* Oct 2001;15(4):497-502.
92. Boutilier RG. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *The Journal of experimental biology.* Sep 2001;204(Pt 18):3171-3181.
93. Buttgerit F, Burmester GR, Brand MD. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol Today.* Apr 2000;21(4):192-199.
94. Walsh NP, Blannin AK, Robson PJ, Gleeson M. Glutamine, exercise and immune function. Links and possible mechanisms. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* Sep 1998;26(3):177-191.
95. Castell L, Vance C, Abbott R, Marquez J, Eggleton P. Granule localization of glutaminase in human neutrophils and the consequence of glutamine utilization for neutrophil activity. *J Biol Chem.* Apr 2 2004;279(14):13305-13310.
96. Calder PC, Yaqoob P. Glutamine and the immune system. *Amino Acids.* 1999;17(3):227-241.
97. Ardawi MS. Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes. *Metabolism.* Jan 1988;37(1):99-103.

## Referenzen

98. Jacobs SR, Rathmell JC. Lymphocyte selection by starvation: glucose metabolism and cell death. *Trends Immunol.* Jan 2006;27(1):4-7.
99. Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 5 1994;91(14):6496-6500.
100. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* May 2004;5(5):343-354.
101. Fehm HL, Kern W, Peters A. The selfish brain: competition for energy resources. *Prog Brain Res.* 2006;153:129-140.
102. Peters A, Schweiger U, Pellerin L, Hubold C, Oltmanns KM, Conrad M, Schultes B, Born J, Fehm HL. The selfish brain: competition for energy resources. *Neurosci Biobehav Rev.* Apr 2004;28(2):143-180.
103. Smith LL. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med Sci Sports Exerc.* Feb 2000;32(2):317-331.
104. Field CJ, Johnson I, Pratt VC. Glutamine and arginine: immunonutrients for improved health. *Med Sci Sports Exerc.* Jul 2000;32(7 Suppl):S377-388.
105. Spurlock ME. Regulation of metabolism and growth during immune challenge: an overview of cytokine function. *J Anim Sci.* Jul 1997;75(7):1773-1783.
106. Speakman JR, Selman C. Physical activity and resting metabolic rate. *Proc Nutr Soc.* Aug 2003;62(3):621-634.
107. Li H, Oliver T, Jia W, He YW. Efficient dendritic cell priming of T lymphocytes depends on the extracellular matrix protein mindin. *Embo J.* Sep 6 2006;25(17):4097-4107.
108. Gabriel HH, Urhausen A, Valet G, Heidelberg U, Kindermann W. Overtraining and immune system: a prospective longitudinal study in endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc.* Jul 1998;30(7):1151-1157.

## II. Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adenin
<b>bp</b>	„basepairs“, Anzahl der Basen
<b>BSA</b>	bovines Serum-Albumin
<b>C</b>	Cytosin
<b>CD</b>	cluster of differentiation
<b>CEL</b>	Cell Intensities
<b>CPT</b>	„cell preparation tube“, spezielles Röhrchen zur Zellisolation
<b>cDNA</b>	copy DNA oder complementary DNA, kopierte DNA oder komplementäre DNA
<b>cRNA</b>	copy RNA oder complementary RNA, kopierte RNA oder komplementäre RNA
<b>eB</b>	erschöpfende Belastung
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>FACS</b>	Fluorescence activated cell sorting; Fluoreszenz aktivierte Zell-Sortierung
<b>FSC</b>	“forward scatter“, Vorwärtsstreulicht
<b>fdr</b>	“false discovery rate“, die Irrtumswahrscheinlichkeit
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat
<b>„GCOS“</b>	GeneChip operating software
<b>GCRMA</b>	GC Robust Multi-array Average
<b>GEO</b>	“gene expression omnibus“, Datenbank für Microarray-Datensätze mit MIAME Kriterien
<b>GEM</b>	Genexpressionsmuster
<b>GO</b>	gene ontology
<b>G</b>	Guanin
<b>HG</b>	“human genome“
<b>HGP</b>	“Human Genome Project“
<b>HKA</b>	Hauptkomponentenanalyse
<b>HK</b>	Hauptkomponente
<b>KEGG</b>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<b>mRNA</b>	„messenger RNA“, Boten RNA
<b>mB</b>	moderate Belastung

## Abkürzungen

<b>MIAME</b>	“ Minimal Information to Annotate a Microarrayexperiment”, Konvention zur Festlegung unerlässlicher Informationen um Microarrayexperimente nachvollziehbar zu machen
<b>KMT</b>	Korrektur für multiples Testen
<b>NK Zelle</b>	Natürliche Killer Zelle
<b>PBMC</b>	peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
<b>PE</b>	Phycoerithrin
<b>PeCy5</b>	Phycoerythrin-Cy5
<b>PerCP</b>	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
<b>PLG</b>	phase lock gel, Spezialgel zur Phasentrennung
<b>RMA</b>	Robust Multi-array Average
<b>RT-PCR</b>	Real-time-PCR
<b>T</b>	Thymin
<b>SSC</b>	“side scatter”, Seitwärtsstreulicht
<b>TdF</b>	Tour de France
<b>U</b>	Uracil
<b>vB</b>	vor Belastung
<b>veB</b>	vor erschöpfender Belastung
<b>vmB</b>	vor moderater Belastung
<b>VO<sub>2</sub>max</b>	maximale Sauerstoffaufnahme
<b>WBZ</b>	weiße Blutzellen
<b>ZT</b>	Zelltyp

III.Anhang

a. Anthropometrische Daten und Blutbilder

Studie 1: Genexpressionsanalysen in weißen Blutzellen

Abbildung 1: Anthropometrische Daten der teilnehmenden Probanden

Pr ob an d	Geburt sjahr	Alter	Gew icht in kg	Groe sse in cm	max.V O <sub>2</sub> /Kg/ ml/mi n/Kg)	Geschwindi gkeit bei LAC 2,5mmol in km/h	Laufd auer in min	Test 80% VO <sub>2</sub> max		Test 60% VO <sub>2</sub> max			
								km/ h	Lacta t vor	Lacta t nach	km/ h	Lacta t vor	Lacta t nach
I	1979	25	71	172	52,96	8,85	31	10	1,37	3,4	7,2	1,16	1,18
F	1979	25	74	184	63,88	14,45	32	14,9	1,06	4,51	9,5	1,2	0,88
G	1982	22	65	179	62,1	8,37	65	11,5	0,81	2,51	8,5	1,43	1,22
A	1972	32	72	181	67,76	13,88	37	13,5	1,1	2,71	10,5	1,11	1
K	1981	23	77	185	56,53	12,4	29	13,5	1,07	3,84	10	1,25	1,89

## Anhang

Abbildung 2: Blutbilder der teilnehmenden Probanden in Studie 1

Erschöpfender Test bei 80% VO<sub>2</sub>max

		WBC x10E3/ul	HGB g/dl	Lymph %	Mo+Gr %	Lymph absolut	Gr+Mo absolut
K	vor Test	7,3	14,0	20,5	79,5	1,5	5,8
	nach Test	10,0	14,6	30,0	70,0	3,0	7,0
	1h nach Test	7,4	13,8	-	-		
A	vor Test	3,8	16,7	42,1	57,9	1,6	2,2
	nach Test	5,7	16,9	54,3	45,7	3,1	2,6
	1h nach Test	4,0	16,4	32,5	67,5	1,3	2,7
G	vor Test	5,4	15,2	53,7	46,3	2,9	2,5
	nach Test	9,5	16,0	58,9	41,1	5,6	3,9
	1h nach Test	8,5	14,8	17,6	82,4	1,5	7,0
F	vor Test	4,7	13,4	40,4	59,6	1,9	2,8
	nach Test	6,7	13,7	55,2	44,8	3,7	3,0
	1h nach Test	5,4	13,1	-	-		
I	vor Test	6,6	14,2	54,5	45,5	3,6	3,0
	nach Test	7,5	14,3	50,6	49,4	3,8	3,7
	1h nach Test	5,5	13,9	34,5	65,5	1,9	3,6

Moderater Test bei 60% VO<sub>2</sub>max

		WBC x10E3/ul	HGB g/dl	Lymph %	Mo+Gr %	Lymph absolut	Gr+Mo absolut
K	vor Test	5,5	15	21,8	78,2	1,199	4,301
	nach Test	5,6	15,7	-	-		
	1h nach Test	4,7	14,5	-	-		
A	vor Test	4	16,2	47,5	52,5	1,9	2,1
	nach Test	4,3	16,4	44,1	55,9	1,8963	2,4037
	1h nach Test	3,8	15,9	39,4	60,6	1,4972	2,3028
G	vor Test	5,3	15,2	54,7	45,3	2,8991	2,4009
	nach Test	4,8	15,8	41,6	58,4	1,9968	2,8032
	1h nach Test	5,1	15,1	35,2	64,8	1,7952	3,3048

## Anhang

F	vor Test	4,7	13,4	46,8	53,2	2,1996	2,5004
	nach Test	5	13,6	38	62	1,9	3,1
	1h nach Test	4,7	13,6	34	66	1,598	3,102
I	vor Test	6	14,5	43,3	56,7	2,598	3,402
	nach Test	7,2	14,9	38,8	61,2	2,7936	4,4064
	1h nach Test	5,9	14,2	25,4	74,6	1,4986	4,4014

## Studie 2 Genexpressionsanalysen in PBMC und T-Lymphozyten

Abbildung 3: Anthropometrische Daten der teilnehmenden Probanden

Proband	Geb. Datum	Größe (cm)	Gewicht (kg)	IAS (km/h)	VO <sub>2</sub>		V <sub>max</sub> (km/h)	V <sub>80%</sub>	Laufzeit (min)	vor Test		nach Test	
					max (ml/min)								
KR	1976	185	78	11,5	4291	16	12,8	25	1,31	5,58			
VS	1972	167	67	14,2	5300	20	15	50	1,45	3,51			
DW	1978	186	77	14,7	5412	18	14,1	40	1,1	2,63			
<b>Herzfrequenz während des Belastungstests</b>													
	prä Test	10'	15'	20'	25'	30'	35'	40'	45'	50'	5' post Test		
KR	62	155	172	175	177						104		
VS	65	150	170	170	171	172	174	177	177	177	111		
DW	105	150	172	177	183	187	192	193			138		



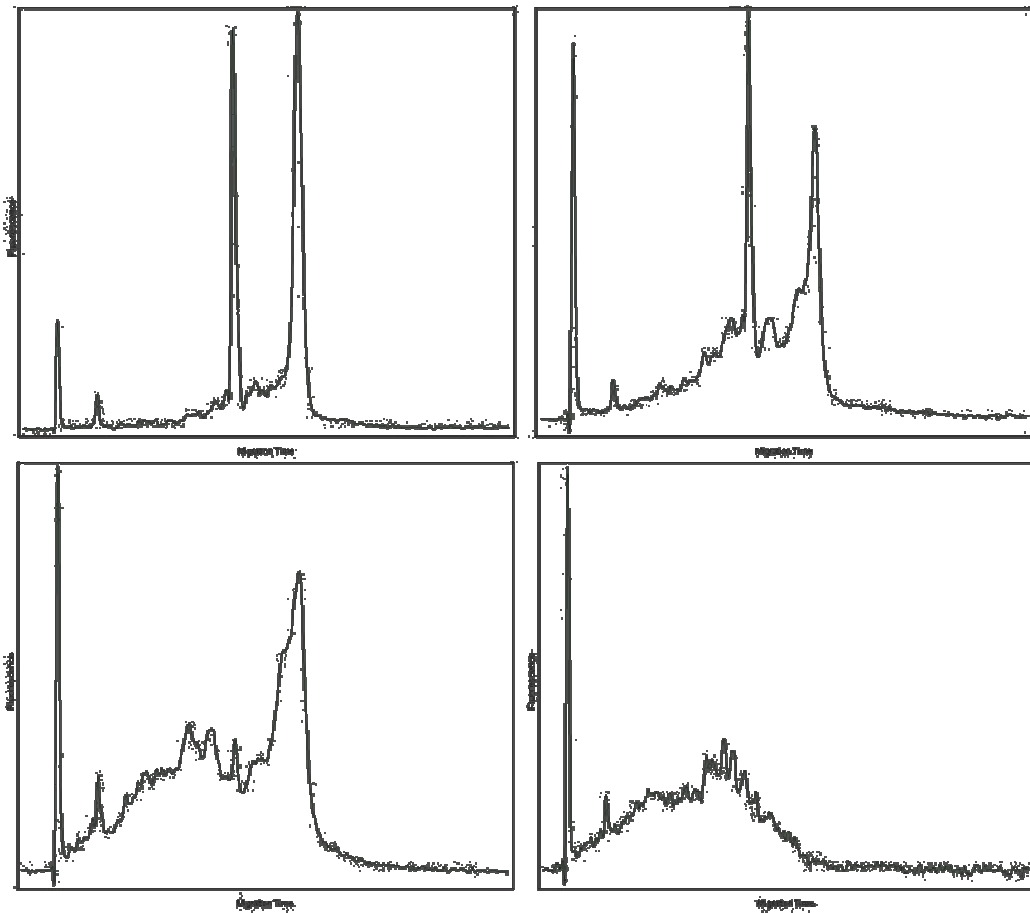
**b. Qualitätskriterien für RNA**

Abbildung 4: Elektropherogramme verschiedener RNA Proben. Aufgetragen ist die Fluoreszenz (y-Achse) gegen die Migrationszeit (x-Achse). Die beiden Scheitelpunkte die nach der Hälfte der Zeit erscheinen repräsentieren die 18s bzw. 28s ribosomale RNA. Die Fläche unter den Scheitelpunkten sollte idealerweise im Verhältnis 18s:28s ist 1:2 stehen. Oben links: gute RNA Qualität, oben rechts: RNA ist teilweise degradiert und nur noch sehr beschränkt verwendbar; unten links: RNA ist sehr stark degradiert und nicht mehr verwendbar; unten rechts: RNA ist vollständig degradiert, keine Scheitelpunkte sind mehr erkennbar.

### c. Qualitätskriterien für Arrays

Tabelle 1: Um Qualitätskriterien für Arrays festzulegen, müssen der Arraytyp, das Aufarbeitungsprotokoll und der Zelltyp berücksichtigt werden. Generelle Schwankungsbereiche werden zwar von Affymetrix vorgegeben, sind aber für spezielle Projekte zu weit gefasst. In dieser Tabelle sind Richtwerte für rawQ (noise) und „present call“ Rate in % auf HG U 133Plus 2.0 Arrays in Monozyten und T-Lymphozyten zusammengefasst, wobei nur die Arrays in die Berechnung aufgenommen wurden, die auch in der Auswertung aufgenommen wurden. Die Richtwerte wurden unter anderem als Qualitätskriterium herangezogen.

#### Monozyten

interne Probennummer	raw Q (noise)	present call Rate in %
212	1,42	43,9
219	1,53	43,4
309	1,42	43,4
317	1,44	44,6
325	1,38	45
327	1,36	41,4
329	1,25	41,2
331	1,28	42,6
333	1,27	43,9
335	1,39	43,7
337	2,18	39
339	1,32	44,9
341	1,31	43,9
344	1,36	45,5
346	1,22	44,4
347	1,32	44,4
349	1,41	43,9
351	1,34	43,7
361	1,25	46,1
365	1,41	43,3
367	1,65	46,9
369	1,33	45,3
371	1,38	44,2

#### T-Lymphozyten

interne Probennummer	raw Q (noise)	present call Rate in %
211	1,43	46,0
300	1,38	44,9
316	1,78	42,1
320	1,54	45,4
326	1,29	46,2
328	1,3	44,8
330	1,26	43,0
332	1,34	45,7
334	2,17	40,5
336	1,22	43,8
338	1,29	46,4
340	1,39	43,4
342	1,35	44,2
343	1,31	43,8
345	1,67	41,6
348	1,27	46,1
350	2,08	39,5
360	1,25	46,7
366	1,31	45,9
368	1,56	46,4
370	1,29	47,5
372	1,24	46,3
374	1,3	48,0

## Anhang

373	1,55	43,8	376	1,54	48,0
375	1,35	45,6	378	1,91	45,9
377	1,51	46,4	390	2,2	42,3
379	1,54	45,1	568	1,44	42,7
381	2,33	41,4	569	1,8	44,1
562	1,55	43,9	570	1,46	44,7
563	2,07	40,2	572	2,65	37,0
565	1,81	45,9	573	1,33	44,5
566	1,75	41,2	585	1,31	43,3
567	1,45	44,4			
586	1,52	42,5			
590	1,6	44,1			
<b>Mittelwert</b>	<b>1,49</b>	<b>43,8</b>		<b>1,52</b>	<b>44,4</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,26</b>	<b>1,8</b>		<b>0,35</b>	<b>2,5</b>
<b>Maximum</b>	<b>1,22</b>	<b>46,9</b>		<b>1,22</b>	<b>48,0</b>
<b>Minimum</b>	<b>2,33</b>	<b>39,0</b>		<b>2,65</b>	<b>37,0</b>

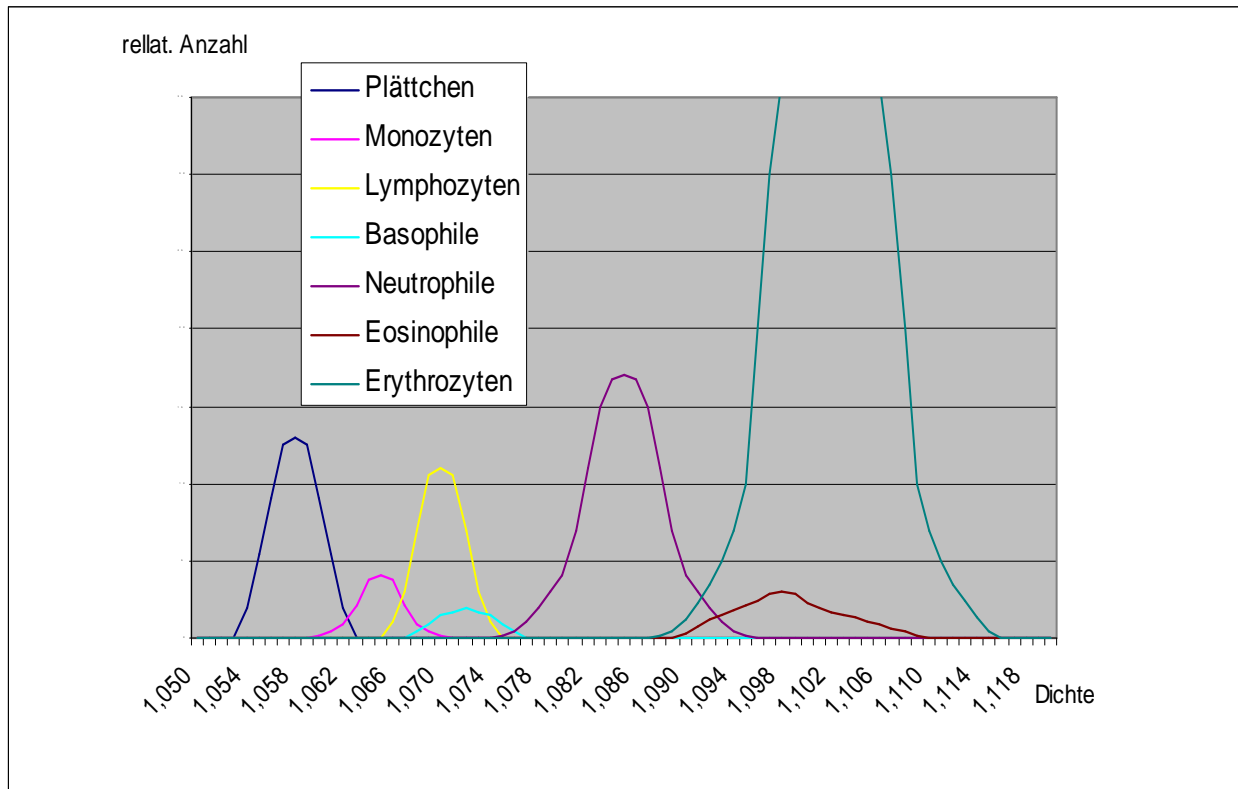
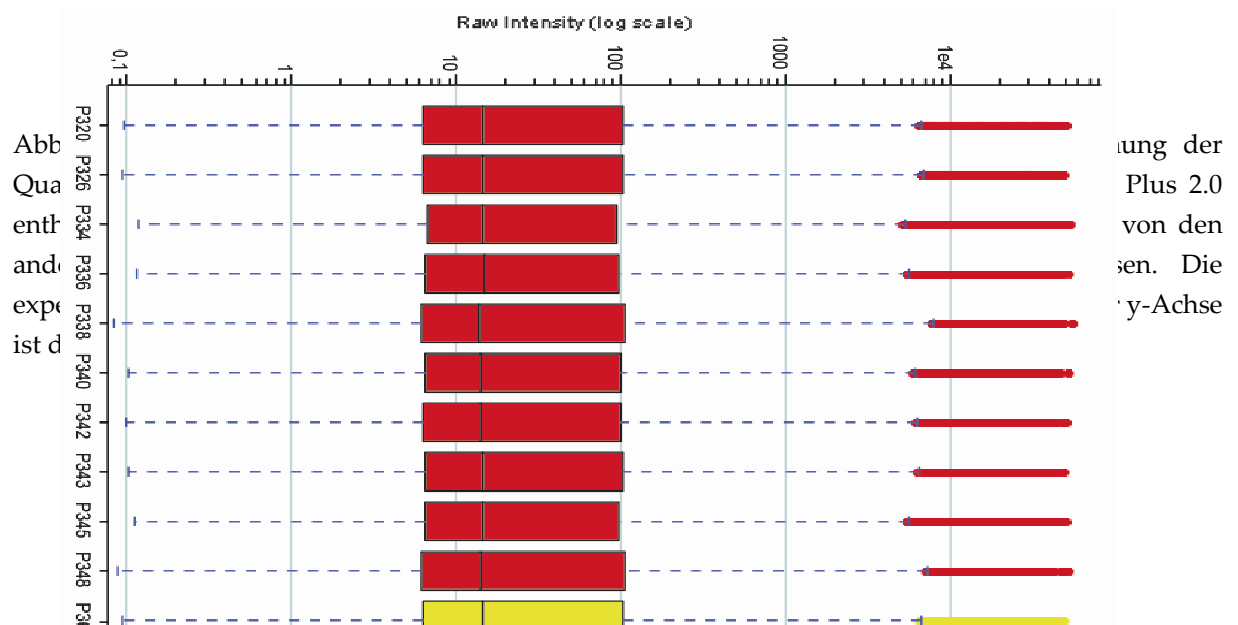
**d. Dichte von Blutzellen**

Abbildung 4: Darstellung der Dichte menschlicher Blutzellen. Thrombozyten haben die geringste, Erythrozyten die höchste Dichte. Gemäß ihrer Dichte, können Blutzellen über Dichtegradienten oder Dichtekissen aufgetrennt werden.

e. Darstellung von Datensätzen in einem Boxplot im Zuge der Qualitätssicherung



f. Darstellung von Datensätzen in einer Hauptkomponentenanalyse im Zuge der Qualitätssicherung

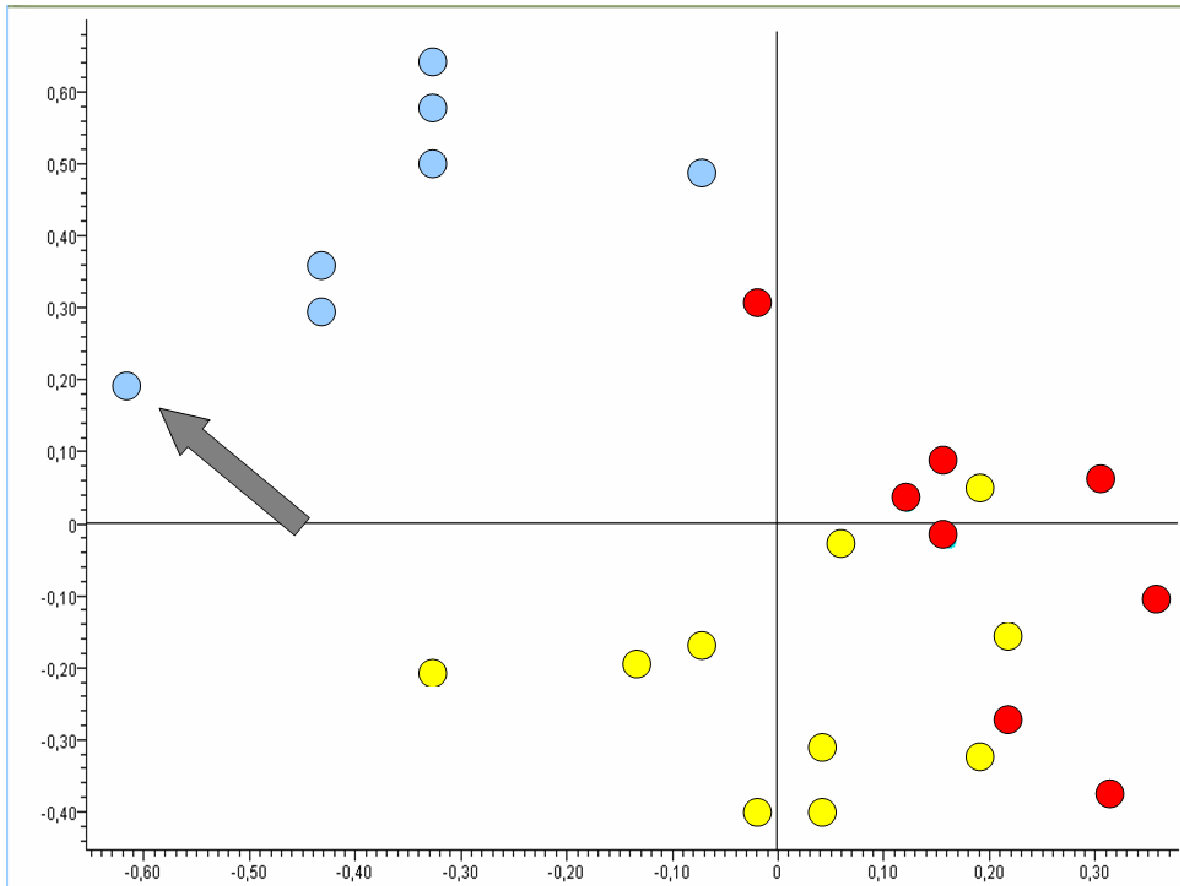


Abbildung 6: Hauptkomponentenanalyse basierend auf der Genexpression aller auf dem HG U133 Plus 2.0 Array repräsentierten Gene für alle T-Lymphozyten Proben der Studie 3. Der Datensatz mit der Nummer 572 (gekennzeichnet durch den grauen Pfeil) weicht auch in der HKA deutlich von den anderen Datensätzen ab. Die experimentellen Gruppen sind rot – Start, gelb – Ende und blau – Ruhe gekennzeichnet.

**g. Genlisten zur Klassifizierung von Aktivierung, Zytokin-Expression und Quieszenz in T-Lymphozyten**

Tabelle 3: Die folgenden Listen wurden aus verschiedenen Quellen zusammengestellt um zu klären, ob die T-Lymphozyten in den Athleten während eines Zeitpunktes aktiviert waren. Dabei werden für jedes in der Literatur genannte Gen alle auf dem HG U133 Plus 2.0 repräsentierten Transkripte gezeigt. Die erste Spalte beinhaltet den Gen Namen nach GenBank; die zweite Spalte den vollen Gennamen nach GenBank; die dritte Spalte die Affymetrix Annotation des entsprechenden Transkriptes; die vierte Spalte Information über die Regulation des Transkriptes in den 4 experimentellen Gruppen (Kontrollen, Ruhe, Start, Ende) und die fünfte Spalte die Signal Expression Level. Dabei ist nicht exprimiert < 10, > 10 niedrig < 100, > 100 mittel < 1000, > 1000 hoch. „Athleten“ wird als zusammenfassende Bezeichnung für die drei Zeitpunkte Ruhe, Start und Ende verwendet; fettgedruckt – Transkript ist signifikant mehr als 1.5-fach (finale Liste) verändert.

## Zytokine die in T-Lymphozyten exprimiert werden

TGFB1	transforming growth factor, beta 1	203084_at	keine Veränderungen	Niedrig
<b>TGFB1</b>	<b>transforming growth factor, beta 1</b>	<b>203085_s_at</b>	<b>Herauf reguliert in Ruhe</b>	<b>Mittel</b>
CCL4	chemokine ligand 4	204103_at	herauf reguliert in Ruhe	Mittel
IL6	interleukin 6	205207_at	keine Veränderungen	Niedrig
IL7	interleukin 7	206693_at	keine Veränderungen	Niedrig
IL11	interleukin 11	206924_at	keine Veränderungen	Niedrig
IL11	interleukin 11	206926_s_at	keine Veränderungen	Niedrig
LTA	lymphotoxin alpha	206975_at	herauf reguliert in Ruhe	Niedrig
IL12A	interleukin 12A	207160_at	keine Veränderungen	Niedrig
IL10	interleukin 10	207433_at	keine Veränderungen	nicht exprimiert
IL4	interleukin 4	207538_at	keine Veränderungen	Niedrig
IL4	interleukin 4	207539_s_at	keine Veränderungen	Niedrig
IL13	interleukin 13	207844_at	keine Veränderungen	Niedrig
IL2	interleukin 2	207849_at	keine Veränderungen	nicht exprimiert
IL12B	interleukin 12B	207901_at	keine Veränderungen	nicht exprimiert
IL2	interleukin 2	207906_at	keine Veränderungen	Niedrig



## Anhang

#### **IV. Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre,

... dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

... dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität Jena bekannt ist.

... dass ich weder die vorliegende Doktorarbeit noch Teile dieser für eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Jena, den 6. Januar 2007

Petra Büttner

## Danksagung

### V. Danksagung

Der größte Dank gebührt meinen Eltern. Sie haben mir die Ausbildung ermöglicht, die ich mir gewünscht habe.

Bärbel und Björn helfen mir immer den notwendigen Ausgleich zu meiner Arbeit zu finden. Das ist unersetzlich.

Harald Funke hat mir ermöglicht eigene Ideen zu entwickeln und selbständig zu entscheiden, welche Projekte ich verfolgen möchte. Er hat mir oft aufgezeigt, wo Verbesserungen oder andere Denkansätze nötig waren. Ich habe viel gelernt.

Meine Kollegen Barbara, Ina, Knut, Kerstin und Sandy haben mich fachlich und menschlich bereichert.

Die Mitglieder des Institutes für Vaskuläre Medizin sind immer hilfsbereit auf mich zugegangen. Vielen Dank! .

Alle anderen hilfsbereiten und auskunftsfreudigen Kooperationspartner und Sachbearbeiter der Uni Jena zu nennen, würde zu weit führen. Sie alle haben einen Anteil am Gelingen meiner Arbeit. Daher ein generelles Dankeschön!

Abschließend möchte ich den Gutachtern danken, die sich die Zeit genommen haben, sich mit dieser Arbeit auseinander zu setzen.

## Lebenslauf

### VI. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Geburtstag /-ort: 28.08.1979 in Apolda

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

#### Schulbildung:

1986-1991 Werner - Seelenbinder Schule Apolda

1991-1998 Gymnasium Bergschule Apolda

Abitur: 7. Juli.1998 mit der Gesamtnote 1,5

#### Studium:

1998-2003 Friedrich – Schiller Universität Jena

Studium Diplom Biologie

Diplom: 10. Oktober 2003 mit der Gesamtnote 1,7

Spezialisierung: Hauptfach Mikrobiologie  
Nebenfächer Biochemie, Phytopathologie

Thema der Diplomarbeit. Siderophore des Pathogens der Sojabohne *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 1a/96 und seiner bakteriellen Antagonisten *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 und *Pantoea agglomerans* 48b/90

#### Promotion:

seit dem 17. November 2003 im Institut für Vaskuläre Medizin Friedrich-Schiller Universität Jena/ AG Molekulare Hämostaseologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Harald Funke

## Lebenslauf

Thema: Analyse der Veränderungen der Genexpression weißer Blutzellen des Menschen in Reaktion auf körperliche Belastung

## VII. Publikationen/ Poster/ Preise

Buettner, P., Mosig, S., Lechtermann, A., Funke, H., Mooren, F. C. Exercise affects the gene expression profiles of human white blood cells. *Journal of Applied Physiology*. Sep 2006

Buettner, P., Mosig, S., Funke, H. Gene expression profiles of T-lymphocytes are sensitive to the influence of heavy smoking. A pilot study. *Immunogenetics*. online publiziert am 6.12.06, "in press"

Mosig, S., Büttner, P., Gläser, D., Hilberg T., Mooren, FC., Funke, H. Gene expression profiles in white blood cells: Improved lower limit of assay sensitivity in isolated T-cells, *in preparation*

Mosig S., Rennert K., Büttner P., Soufi M., Krause S., Kzhyshkowska J., Goerdts S., Heller R., Schaefer J., Funke H. Imprints of atherosclerosis are present in circulating monocytes of patients with Familial Hypercholesterolemia, *in preparation*

Büttner P., Vogt S., Heinrich, L., Schmid, A., Schumacher, YO, Dickhuth, HH., Baumstark, MW., Brandenburg, A., Jakob, E., Mosig, S., Funke, H., Expressing the Tour de France , *in preparation*

### Posterpräsentationen

"Effects of physical training are reflected in gene expression profiles in white blood cells" Buettner, P., Mosig, S., Lechtermann, A., Funke, H., Mooren, F. C.; 1. Deutscher Atheroskleroskongress 2004, Leipzig

"Effects of physical training are reflected in gene expression profiles in white blood cells" Buettner, P., Mosig, S., Lechtermann, A., Funke, H., Mooren, F. C; Swiss Med Lab 2004, Luzern \*

\* 6. Oktober 2004; 3. Platz – "Poster of the day award" während des "International Swiss MedLab and 8th Alps Adria congress 2004" in Luzern; Postertitel „ Effects of physical training are reflected in gene expression profiles in white blood cells“