
Einfluss sportlicher Belastungen auf das Genexpressionsmuster in Leukozyten. Eine Pilotstudie¹

Frank C. Mooren

Universitätsklinikum Münster
Institut für Sportmedizin

1 Problem

Körperliches Training führt zu einer phänotypischen Anpassung nahezu aller Organe und Zellen des Körpers. Die Anpassungsreaktionen sind häufig spezifisch abhängig vom Typ und der Dauer der Belastung sowie von der betrachteten Zelle bzw. dem Organ. In den letzten 10 bis 15 Jahren wurde eine Fülle von Arbeiten herausgebracht, die die spezifische Adaption auf Protein und RNA-Ebene charakterisiert hat (Mooren & Völker, 2004). Sie sind phänotypischer Ausdruck, der durch sportliche Belastungen und körperliches Training verursachten veränderten Kontrolle bzw. Regulation der Transkription. Während die Untersuchung der Transkriptionsregulation bisher nur aufwendig Gen für Gen durchgeführt werden konnte, steht nach Einführung der Chiptechnologie eine Methode zur Verfügung, die in einer einzigen Untersuchung über 20.000 Gene kontrollieren kann. Dieser zunächst unsystematisch erscheinende Ansatz ermöglicht durch die Eingrenzung auf bestimmte Funktionsgruppen sowie insbesondere durch die Verwendung innovativer, bioinformatischer Analysemethoden die Aufklärung spezieller Genexpressionsmuster in Abhängigkeit von Einflussfaktoren, wie z. B. akuter und chronischer Belastung oder aber spezifischer Krankheiten.

Als Zielzellen für die geplanten Untersuchungen wären natürlich quergestreifte Muskelzellen besonders wünschenswert gewesen (Baar, 1999). Deren regelmäßige Gewinnung und Aufarbeitung ist für ein Routineverfahren jedoch nicht durchführbar. Wie die Vielzahl der sportimmunologischen Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt hat, spiegelt sich sportliche Aktivität jedoch sehr deutlich auch in der Veränderung von Zahl und Funktion peripherer Blutzellen wieder (Nieman, 1997). Als Zielzellen wurden daher Leukozyten verwendet und deren Funktion als Surrogatmarker geprüft. Daher war es das Ziel dieser Pilotstudie unter Verwendung moderner DNA-Chiptechnologie, den Einfluss körperlicher Aktivität auf das Genexpressionsmuster in Leukozyten zu untersuchen.

¹ VF 0407/01/76/2004

2 Methoden

Probandeneinschlusskriterien

In die Studie wurden nicht ausdauertrainierte männliche Probanden eingeschlossen, die folgende Einschlusskriterien erfüllten: Alter 18 bis 40 Jahre, BMI < 28, maximale Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) < 45 ml/min/kg KG. Als Ausschlusskriterien wurden festgelegt: Akute oder chronische Erkrankungen, Einnahme von Medikamenten, Einnahme von Antioxidantien, Nikotinabusus.

Untersuchungsablauf

In den Voruntersuchungen wurde nach Anamnese, körperlicher Untersuchung und Ruhe-EKG ein Mehrstufentest auf dem Laufband (1 % Steigung) mit Belastungs-EKG durchgeführt zur Bestimmung der Laufgeschwindigkeit und Herzfrequenz an der individuellen anaeroben Schwelle (IAS) sowie zur Ermittlung der VO_{2max} .

Im ersten Teil der Untersuchungen mussten die Probanden eine erschöpfende Belastung (ET) bei ca. 90 % der IAS (ca. 75-80 % der VO_{2max}) auf dem Laufband absolvieren. Abbildung 1 zeigt anhand eines Zeitstrahls den genauen Ablauf der Untersuchung. Blutentnahmen (BE) wurden vor sowie eine Stunde nach der Belastung durchgeführt.

Im zweiten Teil wurde ein Vergleich zwischen moderater und erschöpfender Belastung auf die Genexpression untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte bei einem Teil der Probanden ca. zwei Wochen nach erschöpfender Belastung eine zweite, moderate Laufbandbelastung (MT) bei ca. 65 % IAS (ca. 55-60 % der VO_{2max}) über den gleichen Zeitraum wie bei der erschöpfenden Belastung. Blutentnahmen wurden erneut vor sowie eine Stunde nach Belastung durchgeführt.

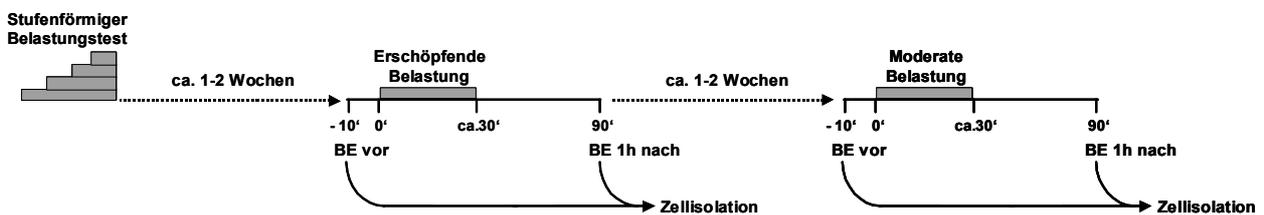


Abb. 1: schematische Darstellung des Untersuchungsablaufs.

Genexpressionsanalytik

Die Untersuchungen wurden mit dem GenChip® -System der Firma Affymetrix unter Verwendung des U133A-Chips durchgeführt. Mit diesem Chip können simultan die Kon-

zentrationen von etwa 22.000 Genen gemessen werden. Für die Durchführung der Hybridisation wurden 15 µg cRNA benötigt.

- *Zellisolation*

Die Leukozyten-Isolation aus Vollblut erfolgt durch hypotonen Schock vermittelte Lyse der Erythrozyten.

- *RNA-Reinigung um cDNA-Umschreibung*

Aus $1-5 \times 10^7$ Zellen wurde die gesamt-RNA durch Lyse der Zellen in einem BME-haltigen GITC-Puffer freigesetzt und anschließend in Gegenwart von Ethanol und/oder hoher Salzkonzentration an eine Silicamembran gebunden und danach eluiert. Hierfür wurde das RNeasy Midi-Kit der Firma Qiagen verwendet. Anschließend erfolgte die reverse Transkription mit dem SuperScript Choice System der Firma Gibco BRL unter Verwendung eines Poly-T-Primers, in den eine T7-Promotersequenz integriert ist. Die anschließende Reinigung der erhaltenen cDNA erfolgt mittels Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des PLG light-Systems der Firma Eppendorf. Die gereinigte cDNA wird anschließend unter Verwendung von biotinylierten Ribonucleotiden in cRNA umgeschrieben.

- *cDNA-Analyse*

Die biotinylierte und fragmentierte cRNA wurde über Nacht mit dem Genchip inkubiert. Dabei erfolgte eine Hybridisation der einzelnen cRNA-Moleküle an komplementäre Oligonukleotide auf dem Genchip. Nach anschließendem Waschen wurden Oligonukleotid-cRNA-Hybride in einem mehrstufigen Prozess mit Streptavidin-Phycoerythrin-Komplexen fluoreszierend markiert. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenzsignale, deren Höhe direkt proportional zur Menge der cRNA ist, mit der die Hybridisierung erfolgte. Die xy-Koordinaten der 22000 verschiedenen Gene, die auf dem Chip repräsentiert sind, sind bekannt. Dadurch kann eine Zuordnung der Intensitäten der gemessenen Fluoreszenzsignale zu den einzelnen Genen erfolgen.

- *Datenanalyse*

Die primäre Datenanalyse erfolgte mit der integrierten Software. Die Daten liegen dann in Form einer Tabelle vor, in der den einzelnen Genen die gemessenen Intensitäten der für sie spezifischen Fluoreszenzsignale zugeordnet sind. Die Qualitätskontrolle und die Grundauswertung erfolgten mit der Software Expressionist® (GeneData). Zusätzliche und weiterführende Analysen wurden mit den statistischen Funktionen des Programmpakets S-PLUS durchgeführt. Für Vergleiche von Fall- und Kontrollgruppen wurden multiple t-Teste und Wilcoxon-Rank-Sum Teste durchgeführt. Signifikante Gruppen wurden einer

Clusteranalyse unterzogen und es wurden weitere funktionelle, stoffwechselspezifische Kenngrößen ermittelt. Die mittels Clusteranalyse identifizierte Gengruppen wurden in nachfolgenden Experimenten auf ihre Potenz, gruppenspezifische Zuordnungen verlässlich vorzunehmen über ROC-Analysen weiter validiert.

3 Ergebnisse

Im ersten Teil wurden insgesamt zehn Sportler eingeschlossen. Durch bio-informatische Analyse zeigte sich, dass von den mehr als 20000 untersuchten Genen nur die Expression eines relevanten Pools von ca. 300 Genen durch eine akute erschöpfende Belastung bei 80 % der individuellen anaeroben Schwelle (VIAS) verändert wurde. Die nachfolgend dargestellte Clusteranalyse belegt (Abb. 2), dass die unbelasteten Proben (pre) eindeutig von den belasteten Proben unterschieden werden können, d.h. das eindeutig ein Effekt sportlicher Aktivität auf die Genexpression nachzuweisen ist.

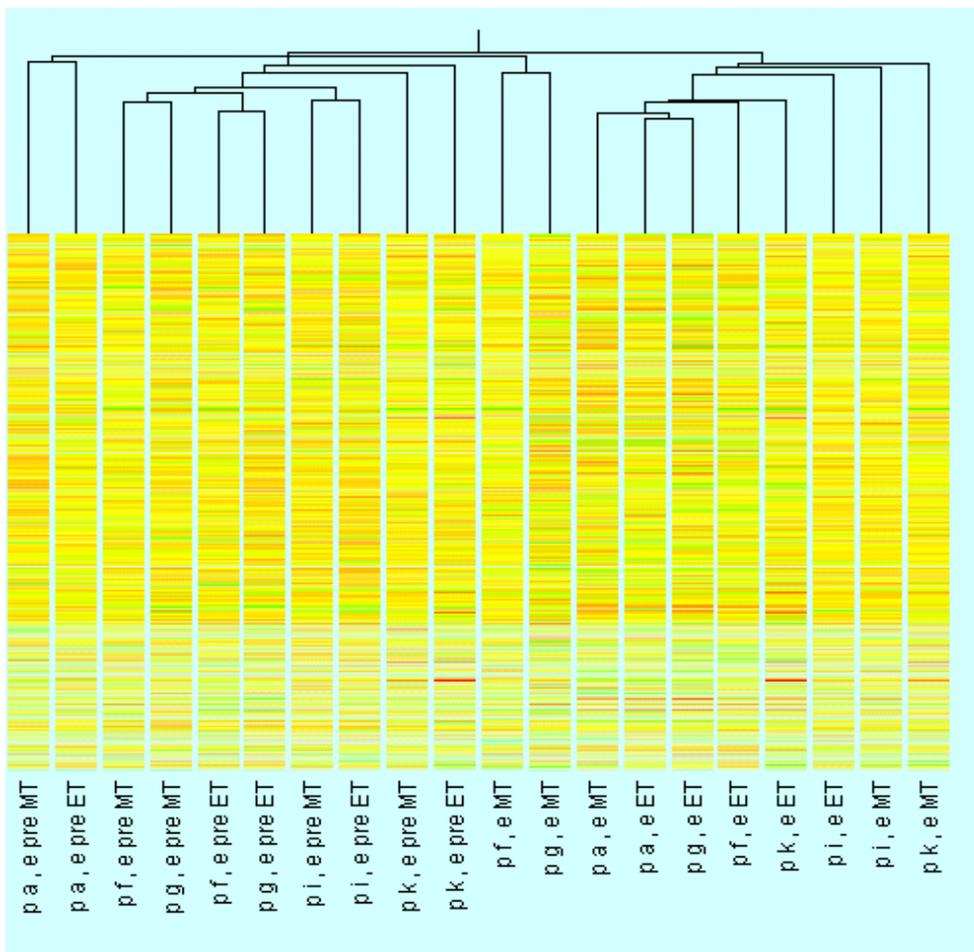


Abb. 2: Clusteranalyse der Genexpressionsmuster vor (pre) und nach (e) akuter Belastung.

Die weitere Untersuchung, welche Gene von der Belastung betroffen sind, ergab folgende Funktionsgruppen:

- eine „Up“-Regulation von
 - Apoptose assoziierten Genen
 - Membranpotential-assoziierten Genen
 - Kinase-Phosphatase-assoziierten Genen
 - cAMP-Signalweg assoziierten Genen
 - Hypoxie-assoziierten Genen
- eine „Down“-Regulation von
 - T-Zellrezeptordomän-assoziierten Genen
 - Adhäsionsrezeptoren
 - Tyrosin-Phosphatase-assoziierten Genen

Die relativen Veränderungen der Expression der einzelnen Gene bewegten sich hierbei um den Faktor 1,3-2,1. Dies ist deutlich geringer als bei in-vitro Experimenten mit Zellkulturen. Hierbei müssen jedoch zwei Fakten beachtet werden. Zunächst handelt es sich um individuelle Untersuchungen verschiedener Probanden. Die Expressionslevel dürften daher per se deutlich abweichen von homogenen Zellkulturbedingungen. Zweitens ist der gesetzte Belastungsreiz sicherlich deutlich schwächer zu bewerten als eine pharmakologische Stimulation in einer Zellsuspension. In den aktuellen Untersuchungen war sehr positiv zu bewerten, dass teilweise recht niedrige Irrtumswahrscheinlichkeiten auftraten, die eine hohe Sensitivität des Verfahrens dokumentieren.

Fünf der oben genannten Probanden absolvierten noch einen zweiten Lauf auf dem Laufband bei moderater Geschwindigkeit entsprechend 60 % der maximalen Sauerstoffaufnahme. Dieser Lauf wurde über den gleichen Zeitraum durchgeführt wie der erste Lauf. Es zeigte sich, dass die Genexpression offenbar durch die Belastungsintensität titriert werden kann. Während die Ausgangsniveaus vor beiden Belastungen relativ vergleichbar waren (ersten beiden Säulengruppen links), kam es zu einer stufenförmigen Veränderung der Genexpression über die moderate Belastung (MT) hin zur erschöpfenden Belastung (ET)(Abbildung 3). Im Gegensatz zu den intensiven Belastungen zeigten moderate Belastungen eine niedrigere Expressionsveränderung und auch eine genspezifische Expressionsveränderung. Einzelne Gene wurden auch nach moderater Belastung weiter vermehrt bzw. vermindert exprimiert (cAMP-abhängige Proteinkinase), andere dagegen zeigten eine relative Veränderung des Expressionslevels gegenüber der intensiven Belastung (T-Zell-Locusgene), wiederum andere Gene zeigten keine Veränderung des Expressionslevels mehr (FADD-like Apoptoseregulator). Wichtig war jedoch die Erkenntnis, dass die bei der moderaten Belastung veränderten Gene allesamt auch bei der

intensiven Belastung verändert exprimiert waren. Dies legt den Schluss nahe, dass die Untersuchung der Genexpression nach einer maximalen Ausdauerbelastung den belastungsrelevanten Genpool gut charakterisieren sollte.

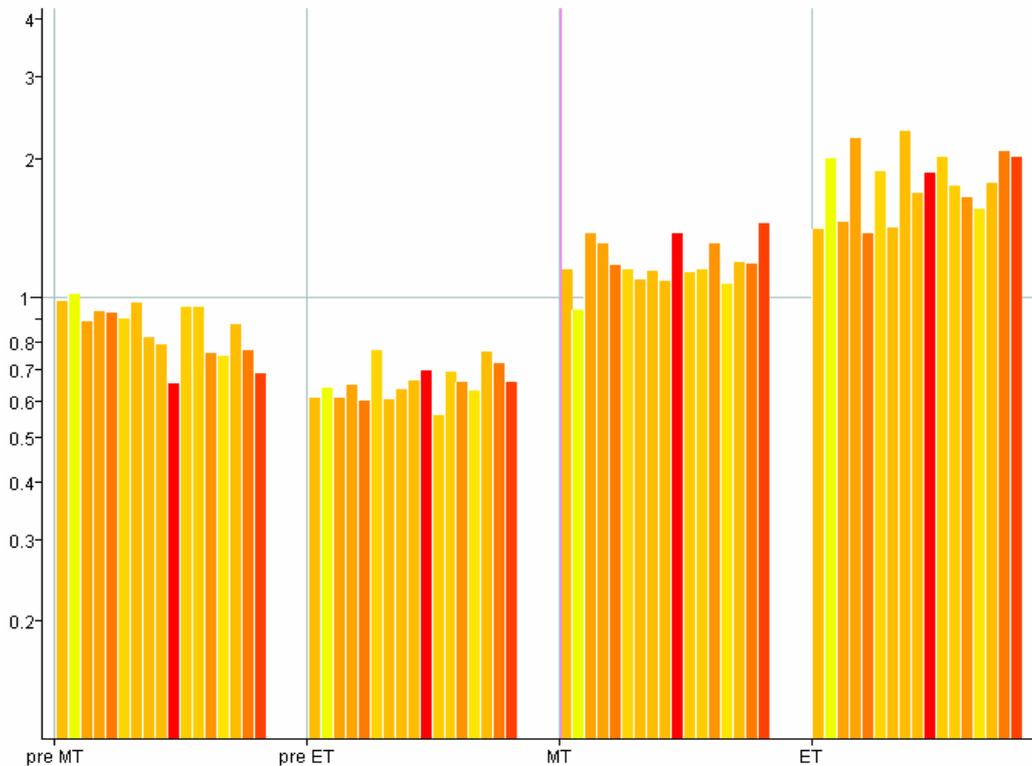


Abb. 3: *Quantitative Veränderung der belastungsinduzierten Genexpression nach moderater (MT) und erschöpfender (ET) Belastung gegenüber den Ausgangswerten (pre).*

Eine Untersuchung des Einflusses des Trainingszustandes erbrachte an den bisher vorliegenden Daten keine eindeutigen Ergebnisse.

4 Diskussion

Es konnten bislang neue Erkenntnisse über die differenzierte Regulation einzelner Gene in Abhängigkeit der Belastungsintensität gewonnen werden. Hierbei wurden bisherige Kenntnisse bestätigt, wie z.B. die Veränderungen von Hitzeschockproteinen, und völlig neue Daten gewonnen, wie z.B. die Regulation bestimmter Apoptose-assoziiierter Gene.

Die vorliegenden Ergebnisse haben aber auch Schwachstellen aufgezeigt, die sich vornehmlich auf methodische Fragen beziehen. So erscheint es zukünftig unbedingt sinnvoll, die Chip-Untersuchungen in den Leukozytensubpopulationen durchzuführen. Durch die Belastung kommt es zu einer Verschiebung derselben, die auch belastungsinduzierte Genexpressionsmuster überdecken kann. Eine Fortsetzung der Untersuchungen zur belas-

tungsinduzierten Genexpression erscheint unbedingt angeraten, um differenzierte Aussagen über Trainingsverläufe bzw. Maximalbelastungen zu machen. Die vorliegende Studie hatte als Pilotstudie den Zweck, die Machbarkeit und Umsetzbarkeit zu prüfen. Dies wird durch die gesammelten Daten eindeutig belegt. Es konnte demonstriert werden, dass periphere Blutzellen sehr wohl als Surrogatmarker verwendet werden können, da sich in ihnen die stattgefundenene, sportliche Belastung widerspiegelt.

Kenntnisse über das belastungsinduzierte Genexpressionsmuster werden sehr wahrscheinlich in Zukunft helfen können, Belastungs- und Regenerationsphasen in der Trainingssteuerung zu optimieren. Darüber hinaus deutet sich aber auch ein großes Potential dieser Methodik in der Dopinganalytik an.

5 Literatur

- Baar, K., Blough, E., Dineen, B. & Esser, K. (1999). Transcriptional regulation in response to exercise. *Exerc Sport Sci Rev*, 27, 333-379.
- Mooren, F.C. & Völker, K. (2004): *Molecular and cellular exercise physiology*. Champaign (Il.): Human Kinetics.
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Sampson, C. S., Herring, J. L., Suttles, J., Conley, M., Stone, M. H., Butterworth, D. E. & Davis, J. M. (1995). The Acute Immune Response to Exhaustive Resistance Exercise. *J Sports Med*, 16, 322-328.

