

Aus dem Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

Etablierung von Home-Made cDNA Microarrays und
Untersuchung der Genexpression nach Hochleistungssport

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Derek Anthony Gerald Zieker
aus
Johannesburg / Südafrika
2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. N. Blin

*Meiner Frau Judith,
meinen Eltern, Bernadette und Wolfgang
meinen Geschwistern, Gerald, Tanja, Giulliano und Jens*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

1 Einleitung	5
1.1 Stressantwort auf sportliche Belastung.....	5
1.2 Ausdauersport und Immunologie	6
1.2.1 Verschiebung der Zellpopulation	6
1.2.2 Cytokin-Antwort.....	7
1.3 Sport und oxidativer Stress.....	8
1.4 Microarray	11
1.4.1 Grundlagen der Microarray Technologie	11
1.4.2 Vor- und Nachteile der Microarray Technologie	13
1.4.3 Gen Expressions Profile – Genetischer Fingerabdruck.....	16
1.5 Ziele und Fragestellung dieser Arbeit	18
2 Material	19
2.1 Geräte und Chemikalien	19
3 Methoden.....	22
3.1 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays und Etablierung der Hybridisierung-Methode des cDNA Microarrays	22
3.1.1 Allgemeines zum cDNA Microarray.....	22
3.1.2 Theoretisches Hintergrundwissen zur Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays	23
3.1.2.1 Auswahl der Art der Produkte zum Auftragen auf den Slide.....	23
3.1.2.2 Auswahl der Slides	24
3.1.2.3 Auswahl des Spottingverfahrens	24
3.1.3 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays.....	25
3.1.3.1 Etablierung und Optimierung der PCR für 384-well Platten in 50µl Ansätzen	26
3.1.3.2 Entwerfen und Etablierung von Programmen für einen Pipettierroboter	28
3.1.3.3 Etablierung und Optimierung des Spottingpuffers.....	29
3.1.3.4 Entwerfen und Etablierung von Programmen für den Microarray-Spotter	30
3.2 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays zu Forschungszwecken .	31
3.2.1 Aufzucht der Bakterien.....	32
3.2.2 Amplifizierung der cDNA-Inserts	33
3.2.3 Spotten von PCR Produkten	34
3.3 Etablierung der Hybridisierung eines cDNA Microarrays	35
3.3.1 Isolierung und Vorbereitung der Nukleinsäuren	37
3.3.2 Sondenherstellung mithilfe der cDNA-Synthese	38
3.3.3 Prähybridisierung der Slides und Hybridisierung der Proben.....	40
3.3.4 Quantifizierungen – Überprüfungen – Sicherheiten.....	43
3.4 Vorversuche zur Etablierung eines cDNA Microarrays.....	45
3.4.1 Validierung des neuen cDNA Microarrays	47

3.5 Halbmarathon	48
3.5.1 Blutentnahme bei den Halbmarathon Läufern.....	48
3.5.2 Aufarbeitung der RNA, Amplifikation und Markierung der Proben	48
3.5.3 Hybridisierung der Proben.....	49
3.5.4 Scannen.....	50
3.5.5 Signal- und Bildextraktion.....	50
3.5.6 Normalisierung	50
3.5.7 Detektion differentiell expremierter Gene.....	52
3.5.8 Verfügbarkeit der Daten	52
3.5.9 Genetischer Expressions-Fingerabdruck	52
3.5.10 Quantitative Real Time PCR.....	53
4 Ergebnisse	55
4.1 Laufzeiten	55
4.2 Microarray-Ergebnisse	55
4.3 Real Time PCR-Ergebnisse	58
4.4 Genetischer Expressions-Fingerabdruck	61
5 Diskussion.....	65
5.1 Microarray Methodik.....	65
5.2 Veränderung der Genexpression in Zusammenhang mit Zellverschiebungen.....	66
5.3 Veränderung der Genexpression, die nicht im Zusammenhang mit offensichtlichen Zellverschiebungen stehen.....	68
5.3.1 Zelluläre Kommunikation	68
5.3.2 Signalübertragung und zelluläre Protektion	69
5.4 Genetischer Expressions-Fingerabdruck	72
5.5 Schlussfolgerung	74
Zusammenfassung	75
Protokolle	77
Liste der Gene auf dem Microarray	92
Literaturverzeichnis	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Chip Präparation.....	32
Abbildung 2: Qualitätskontrolle der PCR-Amplifikate vor dem Spotten	34
Abbildung 3: Darstellung eines hybridisierten Array nach dem Scannen	35
Abbildung 4: Ablauf der Probenvorbereitung.....	36
Abbildung 5: Darstellung des Hybridisierungsablaufs	41
Abbildung 6: Auswertung zweier Dye-Swap-Versuche mit unstimulierten und stimulierten Blutproben	47
Abbildung 7: Ausschnitt einer RNA-Qualitätsbestimmung mit dem Bioanalyzer von Agilent	49
Abbildung 8: Darstellung der Normalisationsprozedur	54
Abbildung 9: Box-plots der Real Time PCR Messungen	60
Abbildung 10: Genetischer Expressions-Fingerabdruck - Vergleich t1 vs. t0.....	63
Abbildung 11: Genetischer Expressions-Fingerabdruck - Vergleich t2 vs. t0.....	64

Verzeichnis der Abkürzungen

aadUTP	Amino-Allyl-dUTP
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
ID	Identifikation
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
vs	Versus (Gegenüberstellung)

1 Einleitung

1.1 Stressantwort auf sportliche Belastung

Sportliche Ausdauerbelastungen sind bezüglich ihrer Auswirkungen auf den menschlichen Körper schon oft untersucht und studiert worden. Dabei wird zwischen Veränderungen unmittelbar nach Belastung und mittel- bzw. langfristigen Veränderungen unterschieden.

Weiter ist natürlich auch die Art und Belastungsintensität eine kritische Größe. Entsprechend komplex sind mögliche Reaktionsformen des Körpers auf sportliche Belastung.

Hohe Trainings- und Wettkampfbelastungen führen zu wiederholten Stressantworten im Immunsystem des Sportlers. Die zentrale synoptische Aussage ist dabei, dass intensive Belastung zur Schwächung des Immunsystems führen kann, während regelmäßiges, moderates Ausdauertraining sich positiv auf das Immunsystem auswirkt (53). Sport führt zu einer koordinierten Antwort des Körpers mit Beteiligung nahezu aller Organsysteme (5). Oft werden, um eine gute Übersichtlichkeit zu gewähren, diese Organsysteme unabhängig voneinander betrachtet. Neben der Skelettmuskulatur und dem Halteapparat sind insbesondere Aspekte der Hämatologie, Respiration und Endokrinologie sowie der Immunologie in der Sportwissenschaft von besonderer Bedeutung.

Aufgrund guter systemischer Aussagemöglichkeiten und geringer Belastung der Sportler wird in sportmedizinischen Studien oft peripheres Blut als zu untersuchendes Gewebe herangezogen. Die hierbei beobachteten Veränderungen reflektieren zusätzlich zur Hämatologie auch metabolische Aspekte und Aspekte der Immunologie. Auch in der vorliegenden Arbeit wird das periphere Blut als probates, bestmögliches Fenster zur Beurteilung der systemischen Gesamtreaktion auf intensive Ausdauerbelastung angesehen.

1.2 Ausdauersport und Immunologie

1.2.1 Verschiebung der Zellpopulation

Bei sportlicher Belastung kann regelmäßig mit Belastungsbeginn eine Leukozytose festgestellt werden. Diese hängt von Ausmaß und Intensität der sportlichen Belastung ab. Körperliche Belastungen von weniger als 1,5 bis 2 Stunden führen zu einem biphasischen Anstieg der Leukozytenkonzentrationen. Es kommt zu einer sofortigen Leukozytose während der Belastung und zu einer verzögerten Leukozytose in der Nachbelastungsphase (24). Der sofortige schnelle Anstieg der Leukozyten ist bedingt durch hämodynamische Effekte, wie gesteigertes Herz-Zeitvolumen, und den Anstieg der Katecholamine. Die adrenalinvermittelte Stimulation der Beta-2-Adrenozeptoren hat eine Abnahme der Leukozytenadhäsion an den Endothelzellen zur Folge. Dies führt zu einem raschen Anstieg aller Leukozytensubpopulationen, die sich aus dem intravaskulären Kompartiment der nicht zirkulierenden und dem Endothel anhaftenden Zellen zusammensetzen. Zu diesem so genannten „marginalen Pool“ gehören u. a. die pulmonäre Strombahn, Milz-/Lebersinusoide und das Knochenmark (24; 68). Die hohe Blutkonzentration der Granulozyten erklärt ihre hohe Beteiligung am Leukozytenanstieg, an dem die Granulozyten ungefähr die Hälfte ausmachen. Bei steigender Belastungsintensität nimmt der Anteil der Granulozyten jedoch ab, da Granulozyten im Vergleich zu Monozyten und Lymphozyten eine geringere Katecholaminsensitivität aufweisen. Bei den Lymphozyten kann der größte relative Anstieg bei den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beobachtet werden, gefolgt von den zytotoxischen T-Zellen. Weniger stark ausgeprägt sind die Anstiege von T-Helfer und B-Lymphozyten (24). Unmittelbar nach Belastung kommt es aufgrund des reduzierten sympathischen Antriebs und des damit verbundenen Absinken der Katecholamine zu einem starken Abfall der Leukozytenkonzentration. Dies wird durch Abfall von Herzfrequenz und Blutdruck noch verstärkt. Ungefähr eine halbe Stunde nach Belastungsende haben Lymphozyten und Monozyten bereits wieder ihre Ausgangswerte erreicht, bzw. unterschritten. Dies betrifft vor allem die NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen (54). Durch vorübergehenden Abfall der B-Zellreihe (CD¹⁹⁺) kommt es zu einer verminderten Immunglobulinsynthese (77). Die verminderte Verfügbarkeit von IgA auf Schleimhäuten nach hoher sportlicher Belastung könnte

(Mit-)Verursacher für die erhöhte Inzidenz von Atemwegsinfekten und sonstigen Infektionen sein.

Zu der verzögerten Leukozytose kommt es bei Belastungen unterhalb von 1,5 bis 2 Stunden etwa eine Stunde nach Belastungsende. Sie erreicht ihr Maximum zwischen der zweiten und vierten Stunde nach Belastungsende und kann mehrere Stunden persistieren (24). In der Regel werden die Leukozytenkonzentrationen des Ausgangsniveaus nach 24 Stunden wieder erreicht. Die verzögerte Leukozytose wird fast ausschließlich verursacht durch einen Anstieg von neutrophilen Granulozyten. Dieser Anstieg ist bedingt durch den belastungsinduzierten Kortisolanstieg im Blut. Dieser führt mit einer Latenzzeit von einer bis zwei Stunden zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten, die aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden, bei gleichzeitiger Verringerung der Migration ins Gewebe.

Bei einer mehrstündigen Ausdauerbelastung überlagern sich die sofortige und verzögerte Leukozytose. Die Höhe der Leukozytenkonzentration ist hierbei abhängig von der Dauer der Belastung. Hauptverantwortlich für die Leukozytose, die nach extrem langer Ausdauerbelastung bei über 20.000 Leukozyten/ μ l Blut liegen kann, ist der Anstieg der neutrophilen Granulozyten, der mit dem Anstieg des Kortisolspiegels im Blut korreliert (68). Auch in diesem Fall sinken die Lymphozyten und NK-Zellen nach Belastungsende rasch auf das Ausgangsniveau zurück. Die Neutrophilenkonzentration bleibt über mehrere Stunden erhöht (24; 68). Innerhalb von 24 Stunden erreichen alle Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen wieder Normalwerte (68). Neben der Veränderung der Zellzusammensetzung gibt es ebenfalls Veränderungen auf immunologischer Ebene.

1.2.2 Cytokin-Antwort

Die Reaktion des Körpers auf eine erschöpfende Ausdauerbelastung wie z.B. ein Marathon- oder Halbmarathonlauf kommt der Akute-Phase-Reaktion nahe. Als Ursache hierfür werden zelluläre Schäden insbesondere an Muskelgewebe sowie oxidativer Stress und genuine sportassoziierte Cytokinausschüttung (Interleukin-6, IL-6) durch Muskel- oder Leberzellen, als Antwort auf den Bewegungsreiz oder zelluläre Schädigung diskutiert (4). Diese Reaktion geht in der Frühphase von einer lokalen oder

systemischen Entzündungsreaktion aus. Die dabei aktivierten Endothel- und Immunzellen treiben die lokale Entzündungsreaktion an und führen zu klassischen Entzündungszeichen, z.B. Rötung oder Ödembildung. Im weiteren Entzündungsverlauf werden durch Fibroblasten und Endothelzellen weitere immunkompetente Zellen angezogen. Diese schütten Cytokine aus. Wichtige Rollen spielen in diesem Zusammenhang Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF- α). Durch deren systemische Wirkung wird auch das Temperaturregulationszentrum im Hypothalamus angesprochen, was eine Fieberreaktion zur Folge hat. Die immunologische Reaktion auf erschöpfende Ausdauerbelastungen aber auch andere sportliche Belastungsarten wie z.B. exzentrische Belastung ist seit knapp 20 Jahren zunehmend in das Blickfeld der Forschung geraten. In der Zwischenzeit ist eine Vielzahl von Genen bekannt, die in diesem Zusammenhang reguliert werden. Es handelt sich hierbei neben Cytokinen, Katecholaminen, Kortison auch um Hitzeschockproteine (12; 20; 71).

Cytokine sind wichtige Modulatoren im Aktivierungsprozess immunkompetenter Zellen des Sportlers. Nach hoher und/oder langer sportlicher Belastung konnte eine Zunahme verschiedener Cytokine, wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 oder Interleukin-1-rezeptor-Antagonist (IL1-ra), im Plasma oder Urin von Leistungssportlern beobachtet werden, die am Folgetag wieder auf Normalniveau abgesunken war (30; 56; 58; 74; 79).

IL-6, das eine wichtige Aufgabe im Stoffwechsel belasteter Muskulatur einnimmt, wird in der Sportmedizin mittlerweile auch als Indikator für körperliche Belastung gewertet (58; 65; 73). Erhöhte Werte von Cortisol und Adrenalin werden teilweise für diese Veränderungen verantwortlich gemacht (31; 61). Andererseits wurde gezeigt, dass nach intensiver sportlicher Belastung die ex vivo Produktion von Cytokinen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes signifikant vermindert reguliert erscheint. Die Verminderung der Produktion von Cytokinen in mononukleären Zellen könnte Folge einer Gegenregulation sein (80).

1.3 Sport und oxidativer Stress

Der Körper produziert bereits unter physiologischen Bedingungen freie Radikale. Hierbei handelt es sich um hochreaktive Atome oder Moleküle, die in ihrer äußersten

Hülle mindestens ein ungepaartes Elektron aufweisen. Dieses ungepaarte Elektron ist verantwortlich für die hohe Reaktivität der Radikale. Sie oxidieren bioaktive Moleküle und können damit prinzipiell zur Schädigung von Proteinen, Lipiden, Zuckern, Nukleinsäuren und der Extrazellulärmatrix führen. Diese Schädigungen können, insbesondere bei unzureichender Balancierung durch antioxidative Regulationsmechanismen, fatale Konsequenzen haben. Freie Radikale sind an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie Herz-Kreislaufkrankungen, Tumorentstehung, Osteoporose und Diabetes beteiligt (22). Man unterscheidet reaktive Sauerstoffspezies (ROS), zu denen z.B. O_2^- zählt, und reaktive Stickstoffspezies (RNS), deren wichtigster Vertreter NO ist. ROS und RNS haben neben ihrer schädigenden Wirkung aber auch wichtige physiologische Funktionen. Zum einen dienen sie als körpereigener Schutz, indem sie Bakterien, virusinfizierte und anderweitig degenerierte Zellen oxidieren und damit vernichten. Sie sind somit eines der wichtigsten Waffensysteme der Immunabwehr. Zum anderen sind freie Radikale in Signalwege und Transkriptionsprozesse involviert, sowie in die Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration (17; 31). Bei körperlicher Belastung wird eine Steigerung der Produktion von freien Radikalen beobachtet (14). Wichtigster Entstehungsort freier Radikale ist das Mitochondrium. Vor allem über den Cytochromoxidase-Regulationsweg werden freie Radikale produziert. Weitere Entstehungsquellen sind das Xanthinoxidasesystem, die Regulationswege der NADPH-Oxidase, der Cyclooxygenase und der Stickstoffmonoxidsynthase (2; 22). Leukozyten sind eine bedeutende Quelle freier Radikale. Bei inflammatorischen Prozessen wandern sie in das entzündete Gewebe ein und produzieren dort im Rahmen ihrer Abwehrfunktion freie Radikale, was zu oxidativen Schäden führen kann (17). Zudem können Leukozyten indirekt die Radikalbildung verstärken, indem sie Cytokine freisetzen, die zu einer rezeptorvermittelten Stimulation von Enzymen führen können, die dann wiederum freie Radikale produzieren, z.B. die Lipooxygenase (23). Unter körperlicher Belastung führen aber noch weitere Mechanismen zu einer verstärkten Bildung von freien Radikalen. Hypoxie führt über eine Aktivierung der Xanthinoxidase und über die Autooxidation von Katecholaminen zur vermehrten Bildung freier Radikale (19; 27). Es ist wahrscheinlich, dass Sauerstoffradikale bei normaler und gesteigerter Sauerstoffaufnahme in einem definierten Verhältnis relativ zum zellulär

aufgenommenen Sauerstoff gebildet werden. Es wird angenommen, dass bis zu 5% des aufgenommenen Sauerstoffs von den Mitochondrien zu Superoxid umgewandelt wird (3; 9).

Der Körper passt sich bei chronischer körperlicher Belastung im Sinne eines Trainingseffekts an. Bei ausdauertrainierten Probanden wurden weniger freie Radikale nachgewiesen als bei untrainierten Vergleichspersonen bei gleicher Belastung (78). Der Körper schützt sich gegen freie Radikale durch mehrere Mechanismen. Zu den verschiedenen Komponenten der präventiven Abwehr zählen die Antioxidantien, antioxidative Enzyme und Radikal-bindende und Radikal-abfangende Proteine, die dabei selbst oxidiert werden. Das Thioredoxin- und Glutathionsystem stellen in einer aerob lebenden Zelle die zentralen antioxidativen Mechanismen dar. Wichtigstes Antioxidanz ist Glutathion (GSH). Es handelt sich hierbei um ein Tripeptid, das in der Zelle hergestellt wird und bei seiner Wechselwirkung mit freien Radikalen zu GSSG oxidiert wird. Weitere Antioxidantien stellen mit der Nahrung aufgenommene Substanzen dar, wie Vitamine A, C und E. Ein weiteres wichtiges Antioxidanz ist Thioredoxin. Thioredoxine sind wie alle Proteine mit einer Thiolgruppe (-SH) Enzyme mit intrinsischer antioxidativer Aktivität. Sie spielen auch bei der Regulation des Immunsystems eine bedeutende Rolle. Thioredoxin wird nach seiner Oxidation durch die Thioredoxinreduktase (TRxR), ein Enzym mit Selenocystein-Gruppe am aktiven Zentrum, reduziert. Die TRxR ist auch am Abbau von Lipidperoxiden oder von Wasserstoffperoxid sowie an der Rückumwandlung des Ascorbyl-Radikals in Ascorbinsäure beteiligt.

Bei den wichtigsten antioxidativ wirkenden Enzymen handelt es sich um Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT) und Glutathionperoxidase (GPX). Die Superoxiddismutase wandelt das Superoxid-Anion-Radikal in Wasserstoffperoxid um, das keine Radikaleigenschaften aufweist. Die Glutathionperoxidase ist zum einen für die Regeneration von Glutathion zuständig, zum anderen reduziert sie H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff. Letzteres leistet auch die eisen-abhängige Katalase. Wichtigster Vertreter der Metall-bindenden oder -oxidierenden Proteine ist Metallothionein, das auch auf Grund seiner zahlreichen SH-Gruppen antioxidative Eigenschaften aufweist. Diese Proteine binden oder oxidieren Eisen und Kupfer, die an der Entstehung von Radikalen aus H_2O_2 beteiligt sind. Es wurde gezeigt, dass es bei Ausdauertraining zu

einer Steigerung von Antioxidantien und antioxidativen Enzymen in Herz- und Skelettmuskulatur kommt (40; 63). Bezüglich peripherem Blut ist diese Situation bislang unklar.

1.4 Microarray

Das Gewebe der Wahl beim Menschen um Aussagen über systemische Stressparameter auf zellulärer und molekularer Eben zu treffen, ist das periphere Blut. Zur Genexpressionsanalyse hat sich die Microarray-Methode bewährt. In der vorliegenden Studie wurden Blutproben von Halbmarathonläufern mit cDNA Microarrays untersucht. Zur Untersuchung der Expressionsveränderung der Gene, wurde den Läufern vor, unmittelbar nach und 24 Stunden nach einem Halbmarathon Blut abgenommen. Das primäre Ziel der Studie war es, unbekannte Gene, die im Zusammenhang mit belastungsassoziierten Veränderungen im Immunsystem nach intensiver Ausdauerbelastung positiv oder negativ reguliert werden, mit Hilfe von cDNA Microarrays zu detektieren. Mit der Entdeckung neuer Kandidatengene, soll ein Beitrag geleistet werden zum besseren Verständnis von (patho-)physiologischen Zusammenhängen bestimmter Stoffwechselwege im Kontext der Entzündungsreaktion und Stress.

Die Gene, die auf dem verwendeten Microarray vertreten sind, wurden auf Grund ihrer bekannten oder angenommenen Funktion im Stress- und Entzündungsgeschehen ausgewählt. Diese Gene, stellen nach aktuellem Stand der Forschung wichtige Vertreter im Bereich der Entzündung, Apoptose, Stressantwort und deren zugehörigen Untergruppen dar.

1.4.1 Grundlagen der Microarray Technologie

Microarrays entstanden vor etwa 10 Jahren. Hybridisierungs- und anderweitige Interaktionsformate vom Großformat (z.B. Macroarrays auf Nylonmembranen) wurden zum Mikroformat miniaturisiert. Mikroformat bedeutet heute im Allgemeinen Adaption auf Glasträgerformate. Microarrays sind nicht auf die Form der Träger beschränkt, und

es werden sich in Zukunft weitere kleinerer Formate etablieren. Microarrays erfreuen sich eines stetigen Wachstums an Interesse. Sie stellen eines der wichtigsten experimentellen Gegenstücke zu den zahlreichen Genomprojekten dar. Anwendungsmöglichkeiten sind nahezu unbeschränkt und lassen Experimente auf unterschiedlichsten Ebenen zu. Die unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten von Experimenten reichen vom Drug-Target-Screening bis hin zur Transkriptions-Analyse. Derzeit kommen Microarrays in unterschiedlichen Forschungsbereichen zum Einsatz. Definiert durch das Design des Arrays und die Eigenschaft der zu untersuchenden Proben, können Fragestellungen aus verschiedenen Bereichen bearbeitet werden (49):

- Vergleich der Transkriptionsmuster unterschiedlicher Proben (Gewebe), wobei RNA als Informationsträger dient (Expressionschip)
- Abfragen der Unterschiede auf genomischer Ebene, wobei die genomische DNA als Informationsträger dient.

Die gebräuchlichste Form von Microarray-Experimenten ist die Analyse der differentiellen Genexpression. Die Feststellung relativer Signalstärken (z.B. ist Signal A 2,15-fach stärker als Signal B) stellt den großen Vorteil dieser Anwendung dar. Als immobilisiertes Target auf dem Microarray dient normalerweise DNA, die aus Genen des zu untersuchenden Organismus gewonnen bzw. amplifiziert wurde. Hybridisiert wird mit Proben, die den Informationsgehalt des zu untersuchenden Gewebe repräsentieren. Dabei kann es sich um cDNA handeln, aber auch um markierte RNA. Eine besondere Möglichkeit der Untersuchung ergibt sich, wenn mehr als zwei Parameter miteinander verglichen werden. Hierbei handelt es sich z.B. um Zeit- oder Konzentrationsabhängige Fragestellungen. Dadurch können Expressionsgruppen von Genen identifiziert werden, die ähnliche Expressionsverläufe aufweisen. Dieser Ansatz wird als Clustering bezeichnet (49).

Eine weitere Möglichkeit der Microarray-Anwendung bezieht sich nicht auf Expressionsunterschiede, sondern auf Variationen in der genomischen DNA. Variationen, die sich in z.B. in Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen äußern, lassen sich mithilfe von DNA-Microarrays untersuchen. Es hat sich gezeigt, dass das Auftreten bestimmter Erkrankungen mit dem Vorhandensein bestimmter Allele korreliert. Besonderes Interesse haben in diesem Zusammenhang die so genannten

Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs) erfahren. Um zu überprüfen, ob bestimmte SNPs in Populationen mehr oder weniger häufig vorkommen, können entsprechende Oligonukleotid-Microarrays verwendet werden (49).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der Einsatz von Microarrays mit dem Bestreben einhergeht, eine möglichst große Anzahl parallel-geschalteter Experimente innerhalb kürzester Zeit durchzuführen. Microarrays sind in diesem Zusammenhang eine sehr geeignete Methode, da sie extrem schnelle und umfassende Experimente ermöglichen (49).

Um spezielle Fragestellungen effizient bearbeiten zu können, haben sich home-made Microarrays mit ausgewählten Genen bewährt. Für die Untersuchungen steht dadurch ein fokussiertes und gut handhabbares diagnostisches Instrument zu Verfügung. Home-made Microarrays verringern zugleich die hohe Kostenintensivität im Vergleich zu kommerziell erworbenen Microarrays. Neben den hohen Kosten ist in der Tat ein weiterer Nachteil der Microarray Technologie paradoxer Weise die große Menge an generierten Daten. Teilweise kann sich die Auswertung und Bestätigung dieser Daten problematisch und kostenintensiv gestalten und erfordert zumeist die Hilfe eines qualifizierten Bioinformatikers (49). Vor- und Nachteile der Microarraytechnik sollen im folgenden Abschnitt dieser Einleitung weiter erläutert werden.

Die Herstellung und Etablierung eines Microarrays werden sehr detailliert im Methoden-Teil der Dissertation besprochen und werden in der Einleitung nicht gesondert beschrieben.

1.4.2 Vor- und Nachteile der Microarray Technologie

Im Vergleich zu herkömmlichen Methoden, z.B. konventionelle Mikrotiterplatten oder Immunoassays, hat die Microarray Technologie zahlreiche Vorteile. Diese erlauben eine positive Zukunftsaussicht für die Verwendung von Microarrays in Forschung und Diagnostik.

Fünf entscheidende Vorteile weisen DNA Microarrays auf (28; 44; 72).

Vorteile:

1. Große Anzahl der zu untersuchenden Gene

Ein Microarray bietet die Möglichkeit in einem einzigen Experiment simultan das Verhalten vieler Gene auf einmal zu untersuchen.

2. Schnelligkeit

Auf Grund der simultanen Untersuchung tausender von Genen in einem einzigen Experiment können innerhalb kürzester Zeit enorme Mengen an Zielgenen identifiziert werden.

3. Kostengünstig nach Anfangsinvestition bei Selbstherstellung von Microarrays

Nach anfänglichen Kosten von ca. 70.000.-€ für die komplette Ausstattung eines Microarray Labors kostet die Produktion von einem einzigen Chip weniger als 150.-€. Da sich die Microarray Technologie rasch zu einem gefragten Werkzeug entwickeln wird, ist sogar von einer Reduktion der momentanen Kosten auszugehen.

4. Benutzerfreundliche Technik

Ein großer Vorteil ist die Tatsache, dass die Microarray Technologie ohne toxisch oder radiologisch schädigende Substanzen auskommt. Zudem lässt sich der Glas-Objektträger als Basis der Technik einfach handhaben und ist bei der in Punkt 3 angesprochenen kostengünstigen Herstellung auch einfach zu ersetzen.

5. Anpassungsfähigkeit und Umfangsreichtum

Microarrays können ohne Probleme in vielen Bereichen der Medizin, in Forschung und Diagnostik eingesetzt werden. Eine Anpassung der Technologie an die jeweilige Fragestellung ist einfach zu vollziehen. Dabei werden umfangreiche Daten generiert.

Neben diesen Vorteilen birgt die Microarray Technologie aber auch Probleme, die hier ebenfalls dargestellt werden sollen (28; 44; 72).

Nachteile

1. mRNA Extraktion

Eine saubere Isolation von mRNA ist extrem wichtig für die Optimierung der Microarray Technologie. Dazu sollte die RNA möglichst in unbegrenzter Quantität vorliegen und aus einer homogenen Zellpopulation isoliert werden. Zelllinien aus Zellkulturen entsprechen diesen Kriterien am besten. Problematisch ist auch die Vergleichbarkeit der verschiedenen Möglichkeiten der RNA Isolation.

2. Array Herstellung

Die Handhabung der DNA bei der Herstellung von Microarrays stellt sich oft als kompliziert heraus. Vor allem das Konzentrieren von möglichst viel DNA auf einem möglichst kleinen Spot stellt eine große technische Herausforderung dar.

3. Ausstattungskosten

Die Ausstattung für ein Microarray-Labor kann mit einem relativ geringen Kostenaufwand getätigt werden. Kostenintensive Faktoren sind vor allem die Genklone, deren Aufarbeitung viel Zeit und Materialeinsatz beinhaltet. Wenn man bedenkt, dass nur ein kleiner Anteil an Genen wirkliche Zielgene darstellen, die wirklich relevant sind, stellt die Verwendung tausender von Genen eine enorme Verschwendung dar.

4. Begrenzte technische Möglichkeiten

Diese machen sich sowohl bei der Herstellung von Microarrays, z.B. minimaler Spotabstand, Pin-Größe als auch bei der Auswertung im Laser-Scanner bemerkbar. Eine ständige Verbesserung auf diesem Gebiet und damit die Optimierung der technischen Möglichkeiten ist zu erwarten.

5. Datenverarbeitung

Im Verlauf eines Microarray Experiments werden sehr viele Daten gewonnen, die ausgewertet und interpretiert werden müssen. Eine gute Software auf dem neusten Stand der Wissenschaft und Technik ist von Wichtigkeit um den Überblick zu behalten und die relevanten Daten einzugrenzen. Interessant und wichtig ist auch die

Entwicklung von Verknüpfungsstellen zwischen der reinen Auswertung und der Interpretation, z.B. in Form eines Pathwayfinders, der die gefundenen Gene zueinander und zu weiteren nicht signifikanten Genen in Relation setzt und damit neue Perspektiven der Interpretation schaffen könnte.

6. *Ethische Probleme*

Auch die DNA Microarray Technologie stellt die Wissenschaft vor ethische Probleme. Sie bietet die Möglichkeit für weitgefaste Gen Screenings und Diagnostik, was zum einen die Entwicklung neuer Medikamente und Behandlungsmethoden ermöglicht, auf der anderen Seite aber auch die Gelegenheit für genetische Diskriminierung erweitert. Vor allem auf dem Gebiet der Pränatal- und Präimplantationsdiagnostik bietet die Methode die Möglichkeit zur frühen Identifizierung von unerwünschten Eigenschaften oder Krankheiten in Ungeborenen. Die damit verbundenen Möglichkeiten und Gefahren werden kontrovers diskutiert.

1.4.3 Gen Expressions Profile – Genetischer Fingerabdruck

Ein großer Vorteil der Microarray Technologie ist, in einem einzigen Experiment eine enorme Menge von Genen zu untersuchen. Um neue Zielgene zu identifizieren erlaubt die cDNA Microarray Technologie des weiteren ein Clustering (Genmuster) der gefunden Gene. Dabei kann ein Muster angelegt werden, dass sich entweder auf ein ähnliches Expressionsverhalten und/oder auf eine ähnliche Funktion bezieht. Mit denen im Clustering gewonnenen Informationen ist es möglich eine Auswahl an Genen zu ermitteln mit welchen ein „genetischer Fingerabdruck“ erstellt werden kann. In diesem Zusammenhang bezieht sich der Begriff Fingerabdruck auf eine Gruppe von Genen, die ein gleichartiges Muster ihrer Expression aufweisen, welches wiederum mit einer spezifischen physiologischen Bedingung oder Genotyp verbunden ist. Der zentrale Baustein für dieses Muster ist die Expressionsveränderung einzelner Gene im Vergleich zu anderen Genen. Sogar in einem komplexen System mit vielen Störfaktoren und Veränderungen des Hintergrunds kann dieses spezielle Muster erkannt werden. Das bedeutet eine spezifische komplexe physiologische Antwort kann erkannt werden,

selbst wenn diese von anderen Prozessen überlagert wird. In diesem Zusammenhang kann dieses spezifische Genexpressionsmuster für die Diagnose von Krankheiten oder für die Identifizierung von veränderten physiologischen Zuständen genutzt werden.

Genetische Expressions-Fingerabdrücke sind zu einem wertvollen Instrument in der Forschung und Diagnostik geworden und finden vielfältige Anwendungen. Zum Beispiel kann diese Technik zur Klassifizierung verschiedener Tumortypen genutzt werden (13), zur Identifikation und Charakterisierung von Gliomen (66), zur Klassifizierung des Krankheitsstadiums bei malignem Pleuramesotheliom (48), zur molekularen Charakterisierung bei der Entwicklung, Diagnose und Behandlung von Brustkrebs (70), zur Bestimmung der molekularen Pathogenese der segmentalen Glomerulosklerose (69) und zum Auffinden einer möglichen Exposition mit toxischen Substanzen (43).

Der Autor der vorliegenden Arbeit geht davon aus, dass durch genetische Expressions-Fingerabdrücke Informationen generiert werden können, mit denen physiologische und metabolische Abläufe im Bereich des Ausdauersports klassifiziert und besser verstanden werden können. Der Vorteil dieser Methode ist die Sensitivität. Einige relevante Gene, die während einer Ausdauerbelastung nicht signifikant reguliert werden und deshalb in der Auswertung leicht übersehen würden, können mit Hilfe des Expressions-Fingerabdrucks erkannt und somit als Zielgene identifiziert werden.

Dadurch entstehen neue Perspektiven, die für die Interpretation der gewonnenen Daten im Gesamtzusammenhang relevant sein können.

Die Generierung eines solchen Fingerabdrucks für einen Halbmarathonlauf gehörte ebenfalls zu den Intentionen der Untersuchung. Ziel war es, ein bestimmtes Muster innerhalb der reguliert vorgefundenen Gene zu entdecken, das bei allen acht Halbmarathonläufern identisch vorlag. Hierzu wurden die Gene bezüglich ihrer physiologischen Funktion geordnet und in folgende Gruppen unterteilt: Signaltransduktion, Membranproteine, Zellinteraktionen, Apoptose, anti-/ oxidatives System, Immunsystem und anti-/ inflammatorisches System.

1.5 Ziele und Fragestellung dieser Arbeit

Wie weiter oben bereits angedeutet war das primäre Ziel dieser Dissertation die Konzeption, Herstellung und Validierung eines (kostengünstigen) home-made Genexpressionsmicroarrays mit ca. 300 Genen zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen im Bereich der Reaktion des Organismus auf Belastungs- und Entzündungsreize. Alle Arbeitsschritte und Ergebnisse, die sich auf die Konzeption, Herstellung und Validierung des Microarrays beziehen sind der besseren Übersicht wegen im Abschnitt Material und Methoden integriert dargestellt. Dabei sollten die nötigen Algorithmen zur Validierung, Ergebnisdarstellung und Auswertung in Zusammenarbeit mit dem Bioinformatischen Institut Tübingen erarbeitet werden. Bei gelungener Validierung sollte, wenn möglich, der Microarray zur Analyse der akuten Belastungsreaktion nach Halbmarathonlauf mit einer hinreichenden Anzahl an Probanden und Messzeitpunkten eingesetzt und ausgewertet werden. Dabei sollte erstens versucht werden neue, signifikant regulierte Kandidatengene zu finden, die die Belastungsreaktion charakterisieren und zweitens ein erster genetischer Expressions-Fingerabdruck dieser Reaktion erstellt werden. Signifikant regulierte Gene (nach vs. vor Belastung) sollten mittels Real Time PCR bestätigt werden. Dies sollte gleichzeitig dazu dienen, die prinzipielle Eignung des Microarrays für zukünftige Längs- und Querschnittsuntersuchungen bei verschiedenen sportmedizinischen Fragestellungen abzuschätzen und gegebenenfalls eine Weiterentwicklung anzustossen.

2 Material

2.1 Geräte und Chemikalien

Geräte

Agilent RNA Bioanalyzer	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Biorobotics Total Array System	Genomic Solution, Cambridgeshire, UK
Centrifuge 5403	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge GS-6R	Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA
COMFORT plus -20°C Kühlschrank	Siemens, München, Deutschland
EBA 12R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Fireboy eco Bunsenbrenner	INTEGRA Biosciences AG (IBS), Chur, Schweiz
Gelkammer Md 41-2325	Pequlab Biotechnoloy GmbH, Erlangen, Deutschland
Heizblock 1202	Pequlab Biotechnoloy GmbH, Erlangen, Deutschland
HF-4000 pH Meter pH 540 GLP	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Hybridisierungskammer	TeleChem International, Sunnyvale, USA
ImaGene 5	BioDiscovery, CA, USA
Inkubations-Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Kühlschrank +4°C	Kirsch, Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Kühlschrank -20°C	Siemens, München, Deutschland
Microarray Scanner	Genetix Limited, Hampshire, UK
MicroGrid I Spotter	BioRobotics, Cambridge, UK
Micro-spotting Pins	BioRobotics, Cambridge, UK
Milli-Q Water Purification System	Millipore, Billerica, USA
MultiPROBE II HT EX Pipettierroboter	PerkinElmer, Wellesley, USA
PCR-Gerät Primus 96 plus	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Pipetus akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

QMT Amino slides 75x25mm	Quantifoil, Jena , Deutschland
REAX Top Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Rotina 46R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Scotsman Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tuttnauer System 2540EL Autoklav	Tuttnauer Brinkmann, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Unimax 1010 Schüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vacuum-Konzentrator BA-VC 300H	Saur Laborgeräte, Reutlingen, Deutschland
Vip series – 86°C Kühlschränk	Sanyo, Concord, Ontario, Kanada
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wärmeschrank Heraeus Fb. Nr. 40121926	Kendro, Asheville, USA.

Chemikalien

20x SSC Puffer	Ambion, Austin, USA
5-(3-Aminoallyl)-2’Deoxyuridin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
5’-Triphosphat	
Ambion’s Hybridisierung Buffer #1	Ambion, Austin, USA
Beta-Actin	Stratagene, La Jolla, USA
Betaine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Cyanine-3 Ester	Amersham Biosciences, Amersham, UK
Cyanine-5 Ester	Amersham Biosciences, Amersham, UK
Dimethylsulfoxid wasserfrei 99,9%	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dithiothreitol (DTT) 0.1 M	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNA Polymerase Biotaq Red	Bioline, London, UK
dNTPs 100 mM	Promega, Mannheim, Deutschland
Ethanol absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0.5 M pH 8.0	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
First Strand Buffer 5x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Humane COT-1 DNA	Stratagene, La Jolla, USA
Kaliumdihydrogenphosphat 99%	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MgCl ₂ 50 mM	Qiagen, Hilden, Deutschland
Natiumcarbonat wasserfrei	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat 99 %	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PAXgene™ Blood RNA Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PAXgene™ Blood RNA Tubes	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR-Puffer 10x	Qiagen, Hilden, Deutschland
poly(dA) Oligonucleotide	Stratagene, La Jolla, USA
Random Primers 3µg/µl	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 %	Ambion, Austin, USA
Stratagene's SpotReport	Stratagene, La Jolla, USA
SuperScript II RNase H- RT 200u/µl	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Universal RNA	Stratagene, La Jolla, USA

3 Methoden

3.1 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays und Etablierung der Hybridisierung-Methode des cDNA Microarrays

3.1.1 Allgemeines zum cDNA Microarray

Die Microarray- Technologie lässt sich in zwei große Abschnitte unterteilen. Der erste Abschnitt beinhaltet die Herstellung eines Microarrays und der zweite die Bearbeitung der Proben, die auf den Microarray aufgebracht werden.

Zu Herstellung eines Microarrays werden oft rechtwinklige, oberflächenbehandelte, Glas-Objektträger eingesetzt. Auf diese „Slides“ können tausende von Genfragmenten aufgetragen werden. Das Auftragen dieser Fragmente auf einen Slide wird als Spotting bezeichnet. Die DNA-Abschnitte, die auf einen Slide gespottet werden, können unterschiedlicher Herkunft sein. Man kann einerseits aus Gewebe oder Zellreihen, welchen besonderes Interesse gilt, mRNA gewinnen und diese mittels reverser Transkriptase in cDNA umschreiben und auf den Slide spotten. Auf der anderen Seite, kann man Gene aus so genannten „Genexpressionsbibliotheken“ auf den Slide spotten. In einer Genexpressionsbibliothek sind cDNAs, welche aus RNAs ausgesuchter Gewebe gewonnen wurden, in bakterielle Plasmide eingebaut und können mittels vektorspezifischen Primern und der Polymerase- Kettenreaktion (PCR) in großen Mengen gewonnen werden. Diese PCR Produkte stehen dann zum Spotten der Slides zur Verfügung (49).

Das Versuchsmaterial wird aus Probandengewebe und entsprechenden Kontrollen gewonnen. Dieses Material, welches auf den gespotteten Microarray letztlich zur Hybridisierung aufgetragen wird, bedarf einer qualitativ hochwertigen und reproduzierbaren Aufarbeitung.

Die isolierte mRNA aus Probanden und Kontrollen wird in cDNA umgeschrieben und anschließend mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen behandelt. Dieser Vorgang nennt sich Markierung. Es werden meist gleichzeitig Proben von Kontrollpersonen und Probanden auf einen Slide aufgetragen. Diese fluoreszenzmarkierten cDNAs hybridisieren mit den gespotteten cDNAs, zu denen sie homolog sind, und lagern damit

die Fluoreszenzmarkierung an die nicht-fluoreszierende, gespottete cDNA an. Nach Ende der Hybridisierung wird der Slide gescannt. Beim Scannen werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch Laser angeregt. Die Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe werden gemessen. Bei einer Zweifachmarkierung (Kontrolle und Proband auf einem Slide) werden die Emissionen bei den zwei jeweils korrespondierenden Wellenlängen gemessen. Der Quotient dieser zwei Messwerte gibt an, ob beim Probanden oder bei der Kontrollperson mehr RNA eines bestimmten Gens vorhanden war, oder ob bei beiden Personen gleich viel RNA exprimiert wurde (49).

3.1.2 Theoretisches Hintergrundwissen zur Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays

Zur Herstellung eines Mikroarrays bedarf es im Vorfeld folgender Schritte und Überlegungen:

- Auswahl der Art der Produkte, die man auf den Slide auftragen möchte
- Auswahl der Slides (die Glasoberflächen können unterschiedliche „Beschichtungen“ aufweisen)
- Auswahl des Spottingverfahrens

3.1.2.1 Auswahl der Art der Produkte zum Auftragen auf den Slide

Als erstes wird entschieden welches Produkt auf den Slide gespottet werden soll. Es besteht die Möglichkeit Oligonucleotide oder DNA-Fragmente auf den Slide aufzutragen. Im Bereich der Microarraytechnologie unterscheidet man zwischen Oligonucleotidarrays (kurze Moleküle meist unter 100bp) und den DNA-Arrays (lange Moleküle zwischen 500-1500bp).

Für die Fragestellung dieser Studie haben wir uns für den Einsatz von DNA-Fragmenten entschieden.

3.1.2.2 Auswahl der Slides

Die Immobilisierung der gespotteten cDNAs erfolgt im Allgemeinen auf modifizierten Glasoberflächen. Für die Immobilisierung von größeren DNA-Fragmenten werden bevorzugt amino-modifizierte Glasoberflächen verwendet. Die amino-modifizierten Glasoberflächen interagieren durch elektrostatische Kräfte der positiv geladenen Amino-Gruppen mit den negativ geladenen Gruppen des DNA-Phosphatrückgrats der aufgespotteten cDNAs. Durch zusätzliche Bestrahlung der gespotteten Slides mit UV-Licht und Inkubation bei 80°C, wird die Bindungseffizienz der cDNA-Fragmente mit dem Slide verstärkt (49).

Bei der Herstellung unserer Microarrays kamen aufgrund der Verwendung von längeren DNA-Fragmenten, Slides mit amino-modifizierten Oberflächen zum Einsatz.

3.1.2.3 Auswahl des Spottingverfahrens

Ein Microarray-Spotter ist ein computer-gesteuerter Roboter. Er transferiert einige Nanoliter cDNA aus einer Microtiterplatte auf die Slide-Oberfläche. Dies geschieht mittels Spotting-Nadeln, die auch Pins genannt werden. Die Anzahl der Pins, mit denen ein Spotter bestückt ist, bestimmt, wie viele Proben gleichzeitig auf den Slide abgesetzt werden können.

Prinzipiell wird zwischen zwei mechanischen Spotting-Methoden unterschieden. Zum einen dem „Contact-Spotting“ und zum anderen dem „Non-Contact-Spotting“.

Das mechanische Contact-Spotting, bei dem der Pin den Slide berührt, ist das gebräuchlichste Verfahren.

Die Unterschiede der verschiedenen Pin-Modelle liegen in der Aufnahmeart der zu spottenden Lösungen. Man unterscheidet zwischen „Solid-Pins“, „Split-Pins“ und dem „Ring-and-Pin System“. Mit Solid-Pins kann immer nur ein Slide bei einem Transfer gespottet werden. Split-Pins, bei denen die Pins mit einem kapillarähnlichem Reservoir versehen sind, und Ring-and-Pin-Systeme, bei denen die zu spottende Lösung von einer Öse aufgenommen wird, bieten die Möglichkeit, Slides hintereinander zu spotten, ohne neue DNA aus der Vorratsplatte aufnehmen zu müssen. Diese Pins bieten einen

schnellen Durchsatz aber bergen die Gefahr ungleicher Volumina beim Spotten (49). Das Spotten mit „Solid-Pins“ ist zeitaufwendiger, und der Verbrauch an gespotteter cDNA ist größer durch vermehrte Evaporation.

Das Non-Contact-Spotting beruht auf dem Prinzip der Inkjet-Applikation. Die zu spottende Lösung wird durch Besprühen auf den Slide aufgebracht. Diese Methodik hat eine hohe Applikationsgeschwindigkeit und eine gute Spot-Morphologie, wird aber momentan noch von sehr wenigen Firmen angeboten.

Die verwendete Spotting-Methode unseres Projektes war das Contact-Spotting mit Solid-Pins.

3.1.3 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays

Um die Herstellung eines cDNA Microarrays durchzuführen war es wichtig, im Vorfeld einzelne Arbeitsschritte, die zur Herstellung notwendig sind, zu etablieren und zu optimieren. Dazu gehören:

- Etablierung und Optimierung der PCR für 384-well Platten mit 50µl PCR-Volumen
- Entwerfen und Etablierung von Programmen für einen Pipettierroboter zur Durchführung von folgenden Tätigkeiten: Pipettieren von PCR-Gemischen für
 - o Hochdurchsatz PCRs in 96- oder 384-well Platten
 - o Auftragen der PCR Produkte aus 96- oder 384-well Platten auf Agarose-Gele zur elektrophoretischen Analyse
 - o Aufreinigung von cDNAs aus 96- oder 384-well Platten über eine Vakuumstation
 - o Vorbereitung von 96- oder 384-well Platten zum Spotten
- Etablierung und Optimierung des Spottingpuffers
- Entwerfen und Etablierung von Programmen für den Microarray-Spotter

3.1.3.1 Etablierung und Optimierung der PCR für 384-well Platten in 50µl

Ansätzen

Zur Etablierung der PCR im 384-well Format wurden humane Klone aus einer Leukozyten-Expressions-Bibliothek verwendet. Da alle Leukozyten-cDNAs in das gleiche Plasmid inkloniert wurden, konnte für alle Klone ein und dasselbe Primerpaar zur PCR-Amplifikation der Inserts eingesetzt werden.

Die Reaktionszyklen bei der PCR setzen sich aus drei Schritten zusammen. Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die DNA durch Hitze in ihre Einzelstränge aufgespaltet. Anschließend wird die Temperatur so weit gesenkt, dass die spezifischen Primer an die komplementären Bereiche der cDNA binden können (Annealing) und die DNA-Polymerase an den Primer-DNA-Komplex binden kann. Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72° C erhöht. Dies ist die optimale Reaktionstemperatur der hitzestabilen Taq-Polymerase. Das Enzym synthetisiert den Komplementärstrang, der der ursprünglichen DNA exakt gleicht. Da die Komplementierung an beiden Strängen der cDNA gleichzeitig abläuft, hat man in einem Zyklus die Zahl der Moleküle verdoppelt.

Diese Reaktionsschritte werden in circa 30 – 40 Zyklen zur Vervielfältigung der cDNA wiederholt.

Die PCR ist im Institut für Transfusionsmedizin der Universität Tübingen eine bereits etablierte Methode für Einzelreaktionen bis 20µl. Für die Microarray-Herstellung war es notwendig die bereits bestehende Methode auf eine Hochdurchsatz- PCR von 384-Proben mit einem Reaktionsvolumen von 50µl abzuändern und neu zu etablieren.

Zusammensetzung einer 20µl PCR-Reaktion :

RNA / DNase freies Wasser	11.25 µl
10 x PCR-Reaktionspuffer	2.00 µl
dNTPs 10mM	2.00 µl
MgCl ₂ 25mM	3.00 µl
Hin-Primer	0.25 µl

Rück-Primer	0.25 µl
Taq-Polymerase	0.25 µl
Template / Probenmaterial 100ng/µl	1.00 µl

Zur Durchführung der 384-well PCR mit 50µl Reaktionsvolumen wurde die Zusammensetzung der 20µl PCR-Lösung auf 50µl hochgerechnet und optimiert.

Zusammensetzung einer 50µl PCR-Reaktion :

RNA / DNase freies Wasser	28.50 µl
10 x PCR-Reaktionspuffer	5.00 µl
dNTPs 10mM	5.00 µl
MgCl ₂ 25mM	7.50 µl
Hin-Primer	0.65 µl
Rück-Primer	0.65 µl
Taq-Polymerase	0.65 µl
Template / Probenmaterial 100ng/µl	2.00 µl

Vor der Durchführung im 384-well Format wurde die 50µl PCR-Reaktion im kleinen Maßstab optimiert und etabliert. Hierzu wurden einzelne PCRs mit bekannten positiv- und negativ Proben in 20- und 50µl PCR-Reaktionen durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet.

Temperatur-Zeit-Profil der 20µl PCR

1.	94.0°C	3 min	
2.	94.0°C	1 min	} 28 Zyklen
3.	59.5°C	1 min	
4.	72.0°C	1 min	
5.	72.0°C	10min	
6.	4.0°C	60min	

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 1,5 % Agarose-Gel aufgetragen. Die positiven Proben des 20µl Reaktionsansatz zeigten auf dem Gel und auch bei der Auswertung stärkere und bessere Ergebnisse im Vergleich zum 50µl Reaktionsansatz. Das schwach positive Ergebnis ist auf das Temperatur-Zeit-Profil zurückzuführen, da die Zeiten für das erhöhte Reaktionsvolumen unzureichend sind.

Daraufhin wurden verschiedene Zeiten für das Temperaturprofil verwendet, bis die Ergebnisse der 50µl PCR die der 20µl PCR entsprachen.

Optimiertes und etabliertes Temperatur-Zeit-Profil der 50µl PCR

1.	94.0°C	3 min	
2.	94.0°C	1:15 min	} 28 Zyklen
3.	59.5°C	1:30 min	
4.	72.0°C	1:30 min	
5.	72.0°C	10 min	
6.	4.0°C	60 min	

Das Einzel-PCR-Reaktionsvolumen wurde für 384 Reaktionen hochgerechnet. Das Ergebnis der 384-well Platten PCR, mit bekannten positiv- und negativ Proben, lieferte das äquivalent hochwertige Ergebnis wie bei einer Einzelreaktion.

3.1.3.2 Entwerfen und Etablierung von Programmen für einen Pipettierroboter

Der MultiProbe II ist ein Pipettierroboter mit acht einzeln ansteuerbaren Spitzen. Perkin Elmer garantiert Pipettier-Präzision bis zu 2 Mikrolitern. Man kann wahlweise mit waschbaren Stahlspitzen arbeiten, oder auch Einmalspitzen verwenden. Die große Auswahl von Zusatzkomponenten, wie Thermocycler, Plattenschüttler, Kühlblock und Vakuumkammern, machen den MultiProbe II zu einem sehr flexibel einsetzbaren Gerät für nahezu jede Pipettieraufgabe.

Folgende Programme wurden für den Pipettierroboter entworfen und etabliert und sind im Computerverzeichnis des Pipettierroboters im Zentralinstitut für Seelische Gesundheit/ Abteilung für Psychopharmakologie in Mannheim einzusehen (C:\Programme\Packard\Derek) :

- Hochdurchsatz PCRs mit 96- und 384-well Platten
- Auftragen von 96- und 384-well PCR-Platten-Produkte auf ein Agarose-Gel
- Aufreinigung von 96- und 384-well Platten über eine Vakuumstation
- Vorbereitung von 96- und 384-well Platten zum Spotten

3.1.3.3 Etablierung und Optimierung des Spottingpuffers

Da mit längeren cDNA- Fragmenten gearbeitet wurde, kamen für die Microarray-Herstellung amino-modifizierte Oberflächen zum Einsatz.

Der Microarray-Markt bietet für diese Art der Slideoberfläche eine Vielzahl von verschiedenen Pufferlösungen zum Spotten an. Vor den eigenen Versuchen wurde ein kommerziell erworbener Spottingpuffer mit einem selbst hergestellten Spottingpuffer verglichen.

Mehrere mit Amino-Allyl-Gruppen modifizierte cDNA Proben wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cyanine-5) markiert. Diese cDNAs wurden anschließend mithilfe einer Evaporisationszentrifuge, einer so genannten Speed-Vac, konzentriert. Ein Teil der cDNAs wurde dann mit dem kommerziell erworbenen Spottingpuffer, der Firma TeleChem International, resuspendiert. Der andere Teil wurde mit einem selbst hergestellten Spottingpuffer resuspendiert (siehe nachfolgend die Zusammensetzung).

Die zu vergleichenden Proben wurden zu je 5µl, 10µl, 15µl, 20µl, 25 µl und 30µl mit dem entsprechenden Spottingpuffer resuspendiert. Nach dem Spotten wurden die Proben auf den Slides mit einem UV-Crosslinker und bei 80°C für zwei Stunden im Wärmeschrank weiter behandelt. Anschließend wurden die Slides gescannt und die Spotmorphologie beurteilt. Beurteilungskriterien waren die Form und die Größe der Spots. Bei einer Verdünnung mit 15µl selbst hergestellten Spottingpuffer, was einer

cDNA-Konzentration von circa 200 ng/µl entspricht, ergab sich die beste Spotmorphologie.

Selbst hergestellter Spottingpuffer:

Spottingpuffer	Vol (10ml)	Endkonzentration (1X)
20x SSC	1,5 ml	3x
600 mM NaP04	2, 5 ml	150 mM
5 M Betaine (monohydrat)	3,0 ml	1.5 M
RNAse/DNAse freies Wasser	3,0 ml	

3.1.3.4 Entwerfen und Etablierung von Programmen für den Microarray-Spotter

Der Microgrid II von Biorobotics ist ein Microarray-Spotter. Er ist mit 16 soliden Stahlpins ausgerüstet. Die verwendete Spotting-Methode ist das Contact-Spotting. Bei dieser Spotting-Methode ist es wichtig darauf zu achten, dass die Pins sowohl den optimalen Kontakt mit dem Spottingmedium als auch mit dem Slide haben. Die Pins sollten nur minimalen Kontakt mit dem Spottingmedium haben, um so Materialverluste des Spottingmediums und ungleiche Spottingmuster auf dem Slide zu verhindern. Ebenso sollte der Kontakt der Pins mit dem Slide nur minimal sein, um ein homogenes Spottingmuster zu erhalten und die Pins vor Deformationen zu schützen. Eine Deformierung der Pins würde Materialverluste des Spottingmediums und ungleiche Spottingmuster auf dem Slide zur Folge haben. Mithilfe der Software des Microarray-Spotter ist es möglich die optimale Höhe und Tiefe der Pin-Bewegungen für die jeweilig gewünschte Aktion zu justieren und optimieren. Der Microarray-Spotter verfügt über eine Kühlung und einen Luftbefeuchter im hinteren Bereich des Gerätes. Dadurch wird ein zu schnelles Austrocknen der Proben verhindert. Die Pins werden automatisch nach jedem Arbeitsschritt in RNAse/DNAse freiem Wasser und anschließend in 70% Ethanol gereinigt und getrocknet.

Die Programme die für den Microarray-Spotter entworfen und etabliert wurden, sind im Computerverzeichnis des Microarray-Spotters im Zentralinstitut für Seelische Gesundheit/ Abteilung für Psychopharmakologie in Mannheim einzusehen (C:\Programme\Derek).

3.2 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays zu Forschungszwecken

Die erfolgreichen Ergebnisse der Vorversuche bestätigten die Validität und Reproduzierbarkeit der selbst hergestellten cDNA Microarrays. Für die wissenschaftliche Fragestellung, die sich mit Vorgängen im Bereich des Entzündungsgeschehens und Immunologie befasst, wurden in diesem Zusammenhang bakterielle Klone die cDNA-Fragmente von 300 verschiedenen humanen Genen enthielten, vom Ressourcen Zentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) in Berlin, Deutschland ausgewählt und bestellt (siehe Anhang).

Die Tendenz bei der Produktion von Microarrays geht durch den enormen Aufwand und die riesige gewonnene Datenmenge immer mehr dazu über Arrays mit einer kleineren Anzahl von Genen herzustellen. Des weiteren erhöht die Anzahl der Gene auf dem Array auch die Kosten pro Array. Aus diesem Grund haben wir uns für 300 ausgewählte Gene für die Herstellung unseres Microarrays entschieden.

Chip Präparation

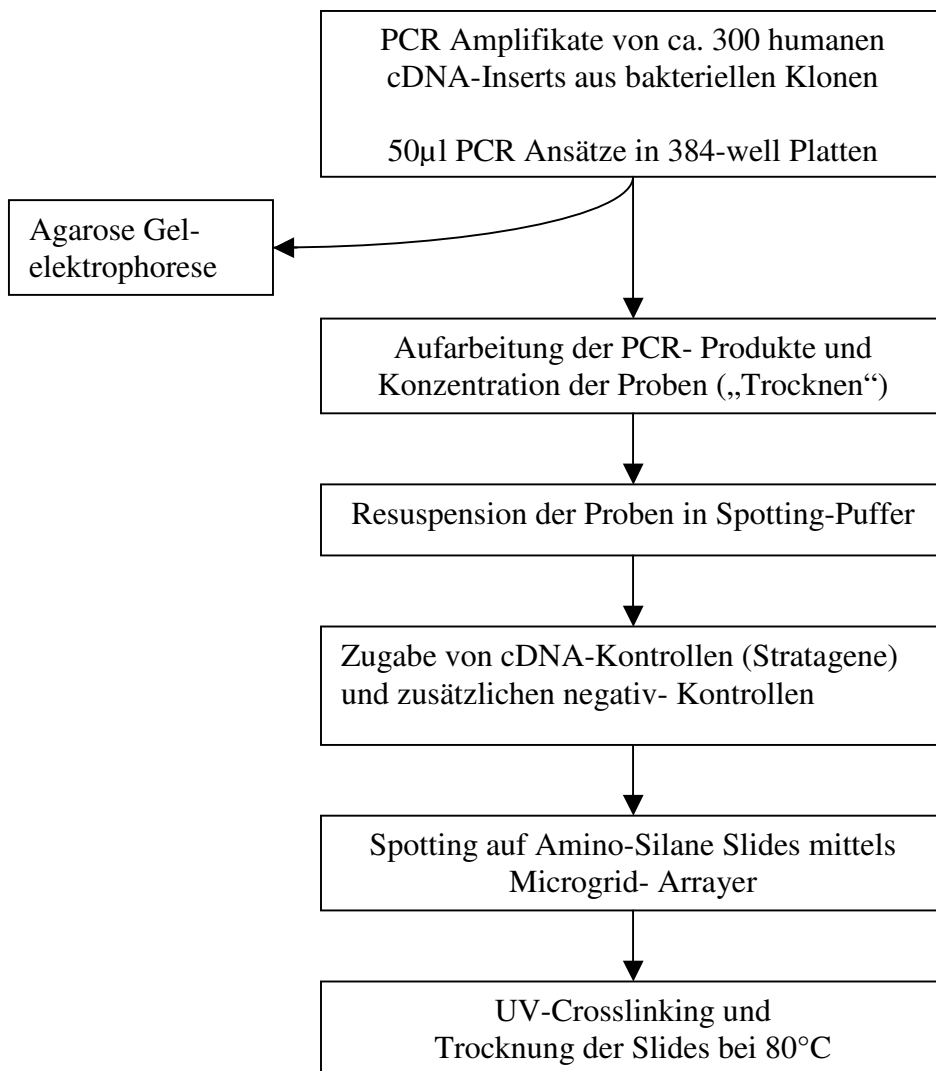


Abbildung 1: Darstellung der Chip Präparation

3.2.1 Aufzucht der Bakterien

Die 300 Klone des Ressourcen Zentrum für Genomforschung wurden in 96-well Platten in Agar geliefert.

Von jedem Well der gelieferten Platten wurde ein Aliquot entnommen und in eine neue 96- well Platte mit 200µl LB-Medium und Ampicillin (100µg/ml) überführt.

LB-Medium

Tryptone 9.6g

Yeast extrakt 19.2g

Glycerol 3.2ml

in 720 ml RNase/DNase freiem Wasser aufnehmen und autoklavieren.

KH₂PO₄ 1.85g

K₂HPO₄ 10.00g

in 80 ml RNase/DNase freiem Wasser aufnehmen und autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren wurden beide Flüssigkeiten miteinander vermischt und Ampicillin zugegeben.

Die 96-well Platten mit den in LB-Medium aufgenommenen bakteriellen Klonen wurden in einem Schüttler über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.2 Amplifizierung der cDNA-Inserts

Mithilfe des Pipettierroboters wurden je 48µl der PCR-Reaktionslösung (siehe oben) mit vectorspezifischen-Primern des Ressourcen Zentrum für Genomforschung in 300 Wells einer 384-well Platte vorgelegt. Anschließend wurden je 2µl der über Nacht in LB-Medium aufgezogenen bakteriellen Klone mit dem Pipettierroboter in die bereits vorgelegte PCR-Reaktionslösung überführt, gemischt und die humanen cDNA-Inserts amplifiziert. Die Amplifikate wurden qualitativ auf einem 1.5% Agarose-Gel geprüft.

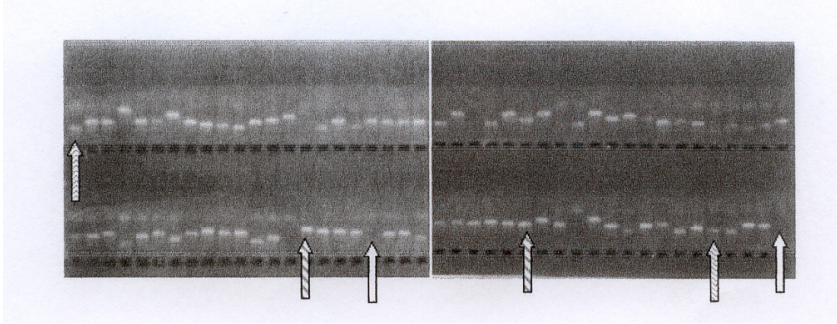


Abbildung 2: Qualitätskontrolle der PCR-Amplifikate vor dem Spotten

Qualitätskontrolle der PCR-Amplifikate vor dem Spotten auf einem 1.5% Agarose-Gel. Die gestreiften Pfeile zeigen auf PCR-Produkte, die ausreichend und gut amplifiziert wurden. Die gepunkteten Pfeile zeigen auf PCR-Produkte, die befriedigend amplifiziert wurden und die weißen Pfeile zeigen auf PCR-Produkte, die mangelhaft amplifiziert wurden.

3.2.3 Spotten von PCR Produkten

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte aufgereinigt, bei 37°C im Wärmeschrank konzentriert und anschließend in 15µl Spottingpuffer resuspendiert. 15µl der bereits erwähnten cDNA-Kontrollen von Stratagene mit zusätzlichen negativ-Kontrollen wie Leerprobe oder nur Spottingpuffer wurden an ausgewählten Stellen auf der Spottingplatte verteilt. Die Spottingplatte mit den Proben und Kontrollen wurde als Triplikate auf den Slide gespottet. Die Eckpunkte der Triplikate sind mit Universal-cDNA der Firma Stratagene markiert um jedes Triplikate später bei der Auswertung zu erkennen.

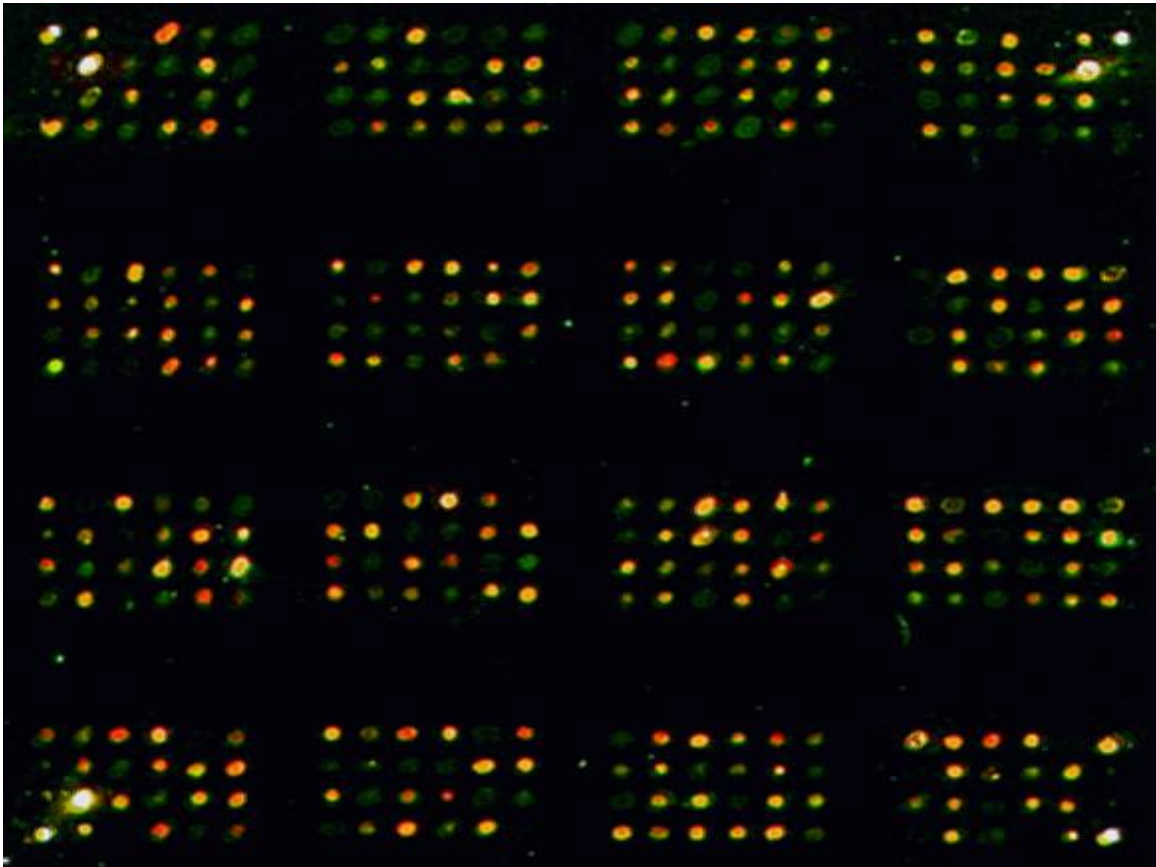


Abbildung 3: Darstellung eines hybridisierten Array nach dem Scannen

3.3 Etablierung der Hybridisierung eines cDNA Microarrays*

Wie bereits oben erwähnt, lässt sich die Microarray-Technologie in zwei große Abschnitte unterteilen. Der erste Abschnitt beinhaltet die Herstellung eines Microarrays und der zweite die Bearbeitung der Proben, die auf den Microarray aufgebracht werden.

Dieser zweite Abschnitt beinhaltet folgende Arbeitsschritte:

- Isolierung und Vorbereitung der Nukleinsäuren, die auf den Slide aufgetragen werden sollen
- Sondenherstellung mithilfe der cDNA-Synthese
- Prähybridisierung der Slides und Hybridisierung der Proben
- Quantifizierungen-Überprüfungen-Sicherheiten

* Kapitel geschrieben von Judith Zieker bis einschließlich Kapitel 3.3.4

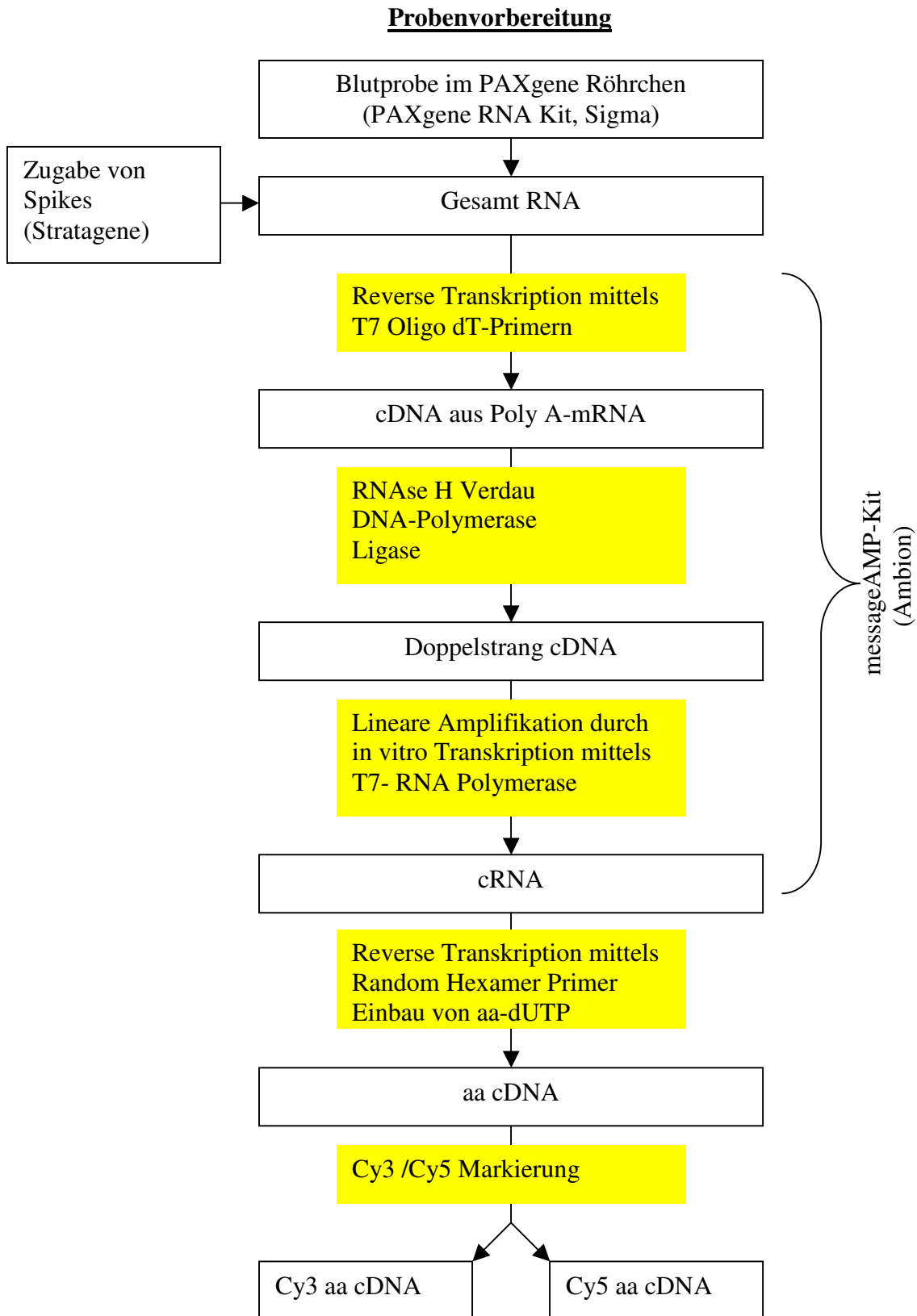


Abbildung 4: Ablauf der Probenvorbereitung

3.3.1 Isolierung und Vorbereitung der Nukleinsäuren

In den folgenden Kapiteln werden die verschiedenen Methoden zuerst im Allgemeinen erklärt. Anschliessend werden die in der Studie angewandten Methoden beschrieben.

RNA-Isolation (im Überblick)

Einer der entscheidenden Schritte bei nahezu allen Microarray-Experimenten ist die RNA-Isolierung. Bedauerlicherweise ist die RNA nicht annähernd so stabil wie die DNA. Die RNA und insbesondere die mRNA ist ausgesprochen vulnerabel und hat einen ubiquitär vorkommenden Feind: die RNase (49). Aus diesem Grund ist bei der RNA-Isolierung auf eine RNase-freie Umgebung zu achten. Mögliche Quellen für eine Kontamination können das zu isolierende Gewebe der Wahl selbst sein, die Umwelt, der Laborbereich sowie der Laborarbeiter. Um die Gefahrenquellen zu minimieren empfiehlt es sich, einige Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Absolute Sauberkeit und die Verwendung von Desinfektionsmitteln ist sehr nützlich. RNA-Isolierungen und das Arbeiten mit Bakterien sollten räumlich voneinander getrennt werden. Alle Materialien, mit denen die RNA in Verbindung kommt, müssen steril und vor allem RNase frei sein. Das Probenmaterial sollte schnell und frisch verarbeitet werden. Ebenso sollten entsprechende Prozeduren, die ein möglichst schnelles Inaktivieren der RNAsen gewährleisten, eingehalten werden. Des weiteren empfiehlt es sich RNA möglichst bei 4°C oder 65-70°C zu verarbeiten (49).

RNA kann mit einem RNA-Isolierung-Kit, oder mit der klassischen ‚Phenol-Methode‘ nach Chomczynski und Sacchi isoliert werden (10).

MessengerRNA (mRNA) ist nur zu einem kleinen Teil (1,0-5,0%) in der Gesamt-RNA-Population vertreten. Ausgehend von Gesamt-RNA kann gezielt mRNA in cDNA durch Verwendung von Oligo-dT Primern umgeschrieben werden.

RNA-Isolation (Anwendungsspezifisch)

Wie bereits erwähnt, kann die RNA mit einem RNA-Isolierung-Kit, oder mit der klassischen ‚Phenol-Methode‘ nach Chomczynski und Sacchi isoliert werden. Da zur Anfertigung dieser Arbeit Blut das Gewebe der Wahl ist, wurde im Selbstversuch Blut abgenommen, um die RNA-Isolation für die Microarray-Versuche zu etablieren.

RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi (siehe Protokoll 1)

RNA-Isolation mit PAXgene™ Blood RNA Kit (siehe Protokoll 2)

Die Qualität der RNA und die Reproduzierbarkeit der Qualität und Quantität der RNA, gemessen mit dem Bioanalyzer von Agilent, war bei fast allen Proben mit der RNA-Isolations-Methode mit PAXgene™ Blood RNA Kit (Qiagen) höher als die mit der RNA-Isolation-Methode nach Chomczynski und Sacchi. Da bei den Microarray-Versuchen ein Optimum an RNA-Qualität sehr wichtig ist, fiel die Entscheidung für den Einsatz der PAXgene Methodik.

3.3.2 Sondenherstellung mithilfe der cDNA-Synthese

In-vitro-Transkription und cDNA-Synthese (im Überblick)

Steht nicht ausreichend Probenmaterial für einen Microarray-Versuch zur Verfügung, muss eine lineare Amplifikation des Materials erfolgen. Eine der häufigsten Methoden ist die in-vitro-Transkription mithilfe der T7-RNA-Polymerase. Die aus dem Probenmaterial gewonnene RNA wird mit einem Oligo(dT)-Primer, der auch über eine T7-RNA-Polymerase Promotor-Sequenz verfügt, revers transkribiert. Nach der cDNA-Synthese, die unter Standardbedingungen erfolgt, wird eine konventionelle Zweitstrang-Synthese angehängt. Die doppelsträngige DNA wird mithilfe von PCR-Produkt-Reinigungssäulen aufgereinigt. Aus der cDNA wird nun mithilfe der T7-RNA-Polymerase komplementäre RNA (cRNA) synthetisiert. Nach erfolgter Synthese wird der Ansatz gereinigt. Die gereinigte cRNA kann nun wiederum für die cDNA-Synthese eingesetzt werden. Dazu wird die RNA bei 70°C denaturiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuheben. Anschließend wird die Probe auf Eis gestellt. Danach sollten alle anderen Ingredienzien in die Lösung gegeben werden (cDNA-Synthese-Puffer, Nukleotide, ergänzt durch aadUTP (Amino-Allyl-dUTP), RNase-Inhibitor und letztlich die Reverse-Transkriptase). Die cDNA-Synthese muss jetzt aber mit Random-Hexamer-Primern durchgeführt werden, da mit der cRNA nun der andere (falsche) Strang vorliegt und ein Oligo(dT)-Primer hier nicht binden könnte. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 42°C ist die Synthese beendet (49).

In-vitro-Transkription und cDNA-Synthese (Anwendungsspezifisch)

Die Sondenherstellung erfolgte weitgehend gemäß dem Protokoll von Jeremy Hasseman "Aminoallyl labeling of RNA for microarrays" (<http://pga.tigr.org/sop/M004.pdf>). Veränderungen und Optimierungen fanden im folgendem Bereich statt: die Inkubationszeiten wurden bei den Elutionsschritten während der Reinigung der Proben verlängert, mit dem Erfolg höherer cDNA-Ausbeute.

In-vitro-Transkription und reverse Transkription (siehe Protokoll 3)

Markierung (im Überblick und Anwendungsspezifisch)

Nach der cDNA-Synthese wird die noch vorhandene RNA durch einen alkalischen Verdau mit 1M NaOH und 0.5M EDTA pH 8.0 für 15 Min bei 65°C zerstört. Daran schließt sich eine Neutralisierung mit 1M HCL an. Die neutralisierte Probe sollte mithilfe kommerziell erworbener PCR-Produkt-Reinigungssäulen aufgereinigt werden. Die gereinigte cDNA wird in einer Speed-Vac konzentriert und in Natriumcarbonat resuspendiert. Die cDNA ist jetzt bereit zur Kopplung mit einem Farbstoff an den Amino-Allyl-Gruppen der Erststrang-cDNA. Dazu werden NHS-Ester der jeweiligen Farbstoffe, wie z.B. Cyanine-3 und Cyanine-5 (Cy3, Cy5, Amersham Biosciences) verwendet. Die Farbstoffe werden im Vorfeld in einem kleinen Volumen DMSO aufgenommen und dann mit der Probe vermischt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) und Dunkelheit gekoppelt. Da nicht alle Bindungsstellen abgesättigt werden können, gibt man nach der zweistündigen Inkubation Natriumacetat zu den Proben. Anschließend wird die nun markierte cDNA von allen anderen Reaktionspartnern mithilfe von PCR-Produkt Reinigungssäulen befreit. In diesem Zustand werden zu der cDNA Poly(dA), Yeast-Total-tRNA und humane Cot1-DNA hinzugegeben, die zur Vermeidung unspezifischer Bindungen dienen. Daraufhin wird die Probe wieder in der Speed-Vac konzentriert.

Markierung (siehe Protokoll 3)

3.3.3 Prähybridisierung der Slides und Hybridisierung der Proben

Prähybridisierung der Slides (im Überblick)

Die Spots auf den verwendeten Microarrays bestehen aus doppelsträngiger DNA. Vor dem Gebrauch der Microarrays müssen diese Doppelstrang-Verbindungen gelöst werden, da sonst keine Hybridisierung stattfindet. Zusätzlich muss der Microarray prähybridisiert werden, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Dazu wird der gespottete Slide in einer Lösung (10% SDS 5ml mit RNase/DNase freies Wasser 495ml vermischt) geschüttelt und anschließend mit RNase/DNase freiem Wasser gereinigt. In einem weiteren Schritt wird der Slide in RNase/DNase freiem Wasser bei 95°C geschüttelt und dann in einer Prähybridierungslösung (20x SSC 12.5ml, 10% SDS 0.5ml, BSA 500mg, RNase/DNase freies Wasser 37.0ml) bei 55°C 45 min lang inkubiert. Nach der Inkubation wird der Slide wieder in RNase/DNase freiem Wasser gereinigt und sofort mit Stickstoff trocken geblasen. Der Slide steht jetzt für die Hybridisierung bereit.

Prähybridisierung der Slides (Anwendungsspezifisch)

10 sec	Rinsing Solution
	Bei Wechsel zu H ₂ O Slide-Halter wechseln
10 sec	H ₂ O (RT)
3 min	H ₂ O (95°C)
45 min	Prä-Hybd.-Lsg in Wasserbad (55°C)
10 sec	H ₂ O (RT)
	Sofort mit N ₂ trocknen

Bei diesen Vorgängen muss schnell gearbeitet werden um Temperaturschwankungen zu vermeiden und in den Lösungen sollten die Slides intensiv hin- und herbewegt werden. Die Prä-Hybridisierungs-Lösung muss schon vor Beginn der Prä-Hybridisierung im Wasserbad erwärmt werden.

Hybridisierung der Proben (im Überblick)

Chip Hybridisierung

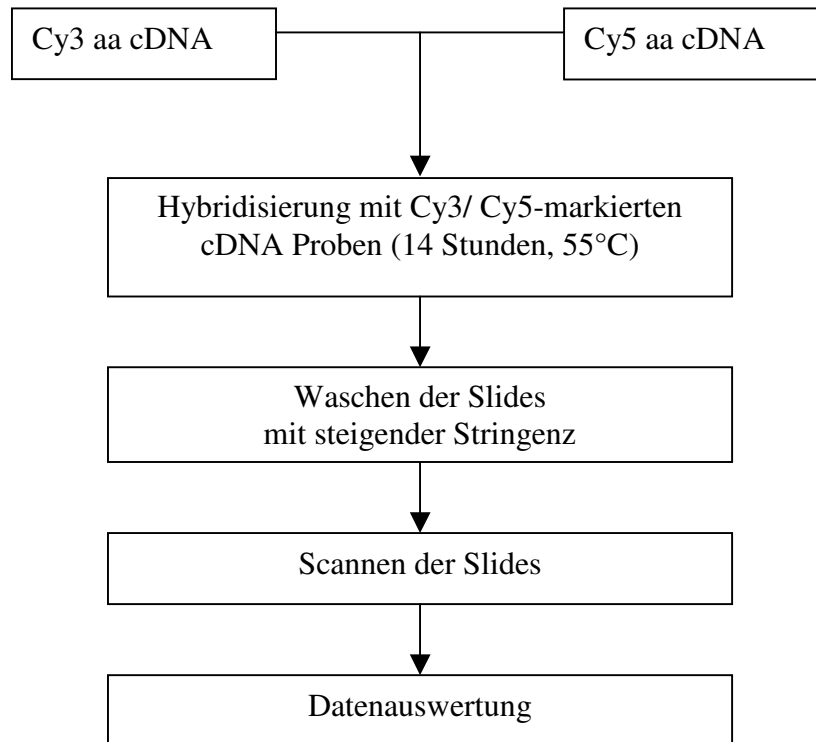


Abbildung 5: Darstellung des Hybridisierungsablaufs

Die farbstoffmarkierte cDNA-Probe wird nach dem Konzentrationsschritt in der Speed-Vac in 10mM EDTA aufgenommen und bei 95°C denaturiert, mit Hybridisierungspuffer verdünnt, auf den Slide aufgetragen und mit einem Deckgläschen bedeckt. Der Slide wird nun in eine Hybridisierungskammer (TeleChem) gelegt.

Die Hybridisierung wird bei 55°C über Nacht im Wasserbad durchgeführt. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Microarrays während der Hybridisierung nicht austrocknen. Dies würde mit einer Veränderung der Ionenkonzentration einhergehen, was wiederum zu verfälschten Hybridisierungsergebnissen führen würde. Um diese Gefahr weitgehend zu vermeiden, muss bei diesen Schritten schnell gearbeitet werden und vor der Hybridisierung Flüssigkeit (3xSSC) in dafür vorgesehenen Vertiefungen in der Hybridisierungskammer eingebracht werden.

Hybridisierung der Proben (Anwendungsspezifisch)

Vor Beginn der Hybridisierung ein Deckglas kurz in Wasser und Ethanol reinigen und mit N₂ sofort trocknen.

1. Die Proben aus der Speed-Vac holen. (*Die Ambion-Lsg bei 68°C für 15 min. inkubieren*)
2. Die erste Probe in 10 µl (10mM) EDTA aufnehmen und mischen bis die Farbe komplett aufgenommen ist. Dann dieses Gemisch auf die zweite Probe geben und diese ebenfalls darin aufnehmen und wie oben mischen.
3. Die Probe für 5 Min. bei 95°C in den Heizblock stellen.
4. Die Probe für 5 Min. bei RT stehen lassen. In dieser Zeit auf beiden Seiten der Kammer je 60 µl 3x SSC zugeben.
5. 35 µl Ambion Hybridisierungs-Lösung zugeben.
6. Das Gemisch für 10 sec. bei 68°C inkubieren.
7. Dann die Probe auf den Slide geben, die Hybridisationskammer schnell schließen und ins Wasserbad geben.
8. 14 Stunden bei 55°C im Wasserbad inkubieren.

Bei der Auswahl des Hybridisierungspuffers wurden mehrere Puffer untereinander verglichen.

Hybridisierungspuffer I: 50% Formamid, 6.0x SSC, 0.5% SDS, 5x Dehnhardt's-Lösung (50x Denhardt's-Lösung: 1.0% (w/v) Ficoll, 1.0% Polyvinylpyrrolidon, 1.0% BSA)

Hybridisierungspuffer II: Ambion's Hybridisierung Buffer #1 (Ambion)

Die Hybridisierungsergebnisse der beiden Hybridisierungspuffer zeigten annähernd qualitativ gleiche Ergebnisse. Die Lauffähigkeit auf dem Slide von Ambion's Hybridisierung Buffer #1, war aber deutlich höher als die des Hybridisierungspuffer I. Die höhere Lauffähigkeit des Puffers erlaubt auf Dauer ein schnelleres und zuverlässigeres Arbeiten bei der Hybridisierung des Slides.

Slidewäsche (im Überblick)

Nach der Hybridisierung werden die Slides in verschiedenen Waschlösungen gewaschen. Die Stringenzwaschungen sollten im Dunkeln erfolgen, um die Farbstoffe zu schonen. Die Stringenz der Waschlösungen hängt vom Salzgehalt, Detergenzien und von der Temperatur ab. Nach dem letzten Waschen wird der Slide sofort mit Stickstoff trockengeblasen sowie dunkel und trocken gelagert. Anschließend wird der Slide gescannt und ausgewertet.

Slidewäsche (Anwendungsspezifisch)

1. Waschpuffer A auf 30°C erwärmen.
2. Slide schnell aus der Hybridisierungs-Kammer holen und kurz in Waschpuffer A halten, um das Deckglas zu entfernen.

10 Min.	Wash A
10 Min.	Wash B
10 Min.	Wash C
	Sofort mit N ₂ trocknen

Bei dem Wechsel von Wash A zu Wash B sollte auch der Slideschüttler gewechselt werden (Reste von SDS können zur Verunreinigung des Hintergrunds führen).

Herstellung Wash A, B und C (siehe Protokoll 4)

3.3.4 Quantifizierungen – Überprüfungen – Sicherheiten

Da es sich bei den Microarray-Experimenten um komplexe, mehrstufige Experimente handelt, ist es sehr nützlich, wenn nach möglichst jedem Schritt nachgewiesen werden kann, ob qualitativ und quantitativ das erwartete Ergebnis erreicht wurde. Eine einfache Methode für entsprechende Überprüfungen ist die photometrische Messung. Hierbei ist jedoch eine Qualitätskontrolle nicht möglich. Die Qualität der RNA kann mithilfe des Agilent-Bioanalyzers (Agilent Technologies) überprüft werden. Die hierfür benötigte RNA-Menge liegt im Pikogramm-Bereich, im Gegensatz zur einer RNA-Gelelektrophorese, die eine Qualitätsaussage von RNA erst im Mikrogramm-Bereich

ermöglicht. Der Bioanalyser liefert hochwertige Aussagen über eine erfolgreiche RNA-Isolation bzw. den Grad der Degradation der RNA und gehört zum Goldstandard bei Microarray-Versuchen. Die Kontrolle am Photometer lässt Aussagen über die Mengen und auch die Reinheit (über den Koeffizienten der gemessenen Werte bei den Wellenlängen 260/280nm) der RNA-Preparation zu. Um Aussagen über die Mengenverhältnisse, die Hybridisierungsqualität und Spezifität der Probe zu erhalten, werden der Probe während der Aufarbeitung positiv- und negativ Kontrollen in einer definierten Mengenverdünnungsreihe zugegeben. Diese Kontrollen kann man kommerziell beziehen (Stratagene's SpotReport- 10 Array Validation System RNA spikes (Stratagene)). Sie ermöglichen Aussagen über die Effizienz der RNA-Isolation, der reversen Transkription und der Hybridisierung.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Kopplung des Farbstoffes an die cDNA. Um diesen Prozess quantitativ zu erfassen, wird ein Aliquot der fluoreszenz-markierten Proben photometrisch bei der Emissionswellenlänge des Farbstoffes gemessen.

$$\text{pmol Nucleotide} = \frac{\text{OD}_{260} * \text{Volumen } (\mu\text{l}) * 37 \text{ ng}/\mu\text{l} * 1000 \text{ pg}/\text{ng}}{324.5 \text{ pg}/\text{pmol}}$$

$$\text{pmol Cy3} = \frac{\text{OD}_{550} * \text{volume } (\mu\text{l})}{0.15}$$

$$\text{pmol Cy5} = \frac{\text{OD}_{650} * \text{volume } (\mu\text{l})}{0.25}$$

$$\text{Nukleotid /Farbstoff- Verhältnis} = \frac{\text{pmol cDNA}}{\text{pmol Cy Farbstoff}}$$

Anmerkung: 1 OD₂₆₀= 37 ng/μl für cDNA; 324.5 pg/pmol ist das durchschnittliche molekulare Gewicht von einem dNTP.

Optimale Voraussetzungen für die Hybridisierung ist eine Farbstoffinkorporation von >200 pmol einer Probe und ein Nukleotid /Farbstoff- Verhältnis von unter 50.

3.4 Vorversuche zur Etablierung eines cDNA Microarrays

Zur Überprüfung, ob die während der Untersuchung etablierten und optimierten Einzelschritte auch im Ganzen funktionieren, wurden 16 mal je 50μl von 20 unbekanntem PCR-Amplifikaten aus der Leukozyten-Bibliothek auf eine 384-well Platte verteilt. Diese Proben wurden bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet und in 15μl Spottingpuffer resuspendiert. Um Aussagen über die Hybridisierungsqualität treffen zu können, wurden zusätzlich positiv-und negativ Kontrollen zu der Probenplatte gegeben. Die von Stratagene kommerziell erworbenen Kontrollen bestehen aus 10 verschiedenen cDNAs, 3'-und 5' Beta-Actin, Poly(dA) und humane Cot1-DNA. Die 384-well Platte mit den in Spottingpuffer aufgenommenen Proben und Kontrollen wurde anschließend als Triplikat auf zwölf Slides gespottet.

In einem Selbstversuch in PAXgene™ Blood RNA Tubes abgenommenes Blut wurde nach Protokoll und mithilfe des entsprechenden Kits aufgearbeitet. Die isolierte RNA wurde dann quantitativ mit einem Photometer und qualitativ mit dem Bioanalyzer analysiert. Die getestete RNA wurde mit dem Message Amp Amplification Kit revers transkribiert und anschließend in-vitro-transkribiert. Die amplifizierte cRNA wird unter Einschluss von aadUTP in cDNA umgeschrieben und dann entsprechend dem Markierungs-Protokoll weiterbehandelt. Nach der Markierung wurde die Inkorporations-Effizienz nochmals am Photometer bei 260nm, für Cy3 bei 550nm und für Cy 5 bei 650nm, gemessen.

Zwei von den gespotteten Slides wurden nach dem Prähybridisierungsprotokoll für die Hybridisierung mit den Proben vorbereitet. Die markierten Proben wurden dann auf die Slides aufgetragen und über Nacht im Wasserbad bei 55°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Slides nach Protokoll gewaschen, mit Stickstoff getrocknet und anschließend gescannt und ausgewertet.

Die Qualität der bereits im Vorfeld etablierten und optimierten Schritte für die Herstellung und Hybridisierung eines Microarrays wurden von den Ergebnissen der hybridisierten Slides bestätigt. Die Slides zeigten eine homogene Spotmorphologie und einen geringen Farbhintergrund der Hybridisierung. Die Auswertung zeigte bei beiden Slides übereinstimmende Hybridisierungsergebnisse ohne Ausreißer was bei identischem Probematerial zu erwarten war und sich auch bestätigt hat.

Dieser Versuch wurde noch zwei weitere Male mit ähnlichen Resultaten durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit der selbst hergestellten Microarrays mit identischen Proben war gegeben. Zur Überprüfung des Microarrays mit zwei verschiedenen Proben wurde wieder im Selbstversuch Blut abgenommen. Ein Teil des Blutes wurde mit LPS für 2 Stunden stimuliert, der andere Teil des Blutes wurde unstimuliert belassen. Die RNA der Proben wurde nach dem entsprechenden Protokoll isoliert. Die isolierte RNA wurde dann quantitativ mit einem Photometer und qualitativ mit dem Bioanalyzer getestet und wie im oben beschriebenen Versuch weiterverarbeitet. Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ein unterschiedliches Inkorporationsverhalten aufzeigen und der Slide mit zwei unterschiedlichen Proben hybridisiert wurde, ist es sinnvoll bei diesem Versuch einen Dye-Swap (Farbwechsel) zu machen. Ein Dye-Swap bedeutet, dass jedes Probenmaterial ein Mal mit dem Farbstoff Cy3 und ein Mal mit dem Farbstoff Cy5 markiert und auf zwei Slides aufgetragen wird. Dies dient bei der Auswertung zur Korrektur des Inkorporationsunterschiedes der Fluoreszenzfarbstoffe. Für die vorliegende Untersuchung bedeutete dies, dass auf dem einen Slide die unstimulierte Probe mit Cy3 gefärbt und aufgetragen wurde und die stimulierte Probe mit Cy5 gefärbt und aufgetragen wurde. Auf dem zweiten Slide wurde die unstimulierte Probe nun mit Cy5 gefärbt und aufgetragen und die stimulierte Probe mit Cy3 gefärbt und aufgetragen. Die Ergebnisse beider Slides des Dye-Swaps wurden miteinander verglichen. Erst danach können Aussagen zu den verschiedenen Regulationen der Gene getroffen werden.

In dem Versuch ergaben sich nach dem Dye-Swap-Vergleich Unterschiede zwischen den unstimulierten- und stimulierten Proben. Dieses Ergebnis zeigt, dass der für die Untersuchung verwendete Microarray in der Lage ist, Unterschiede im Probematerial wiederzugeben.

Um auch hier die Reproduzierbarkeit des Microarrays zu zeigen wurde dieser Versuch noch zwei weitere Male mit übereinstimmenden Ergebnissen durchgeführt.

3.4.1 Validierung des neuen cDNA Microarrays

Auch bei dem in dieser Studie verwendeten Slide wurden zur Validierung und zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit des Microarrays mehrere Versuche nur mit unstimulierten Blut und Versuche mit unstimulierten und stimulierten Blut im Vergleich durchgeführt. Die Ergebnisse aller Versuche waren durchweg übereinstimmend und ohne Ausreißer, so dass die Validität und Reproduzierbarkeit des entwickelten Microarrays gegeben ist.

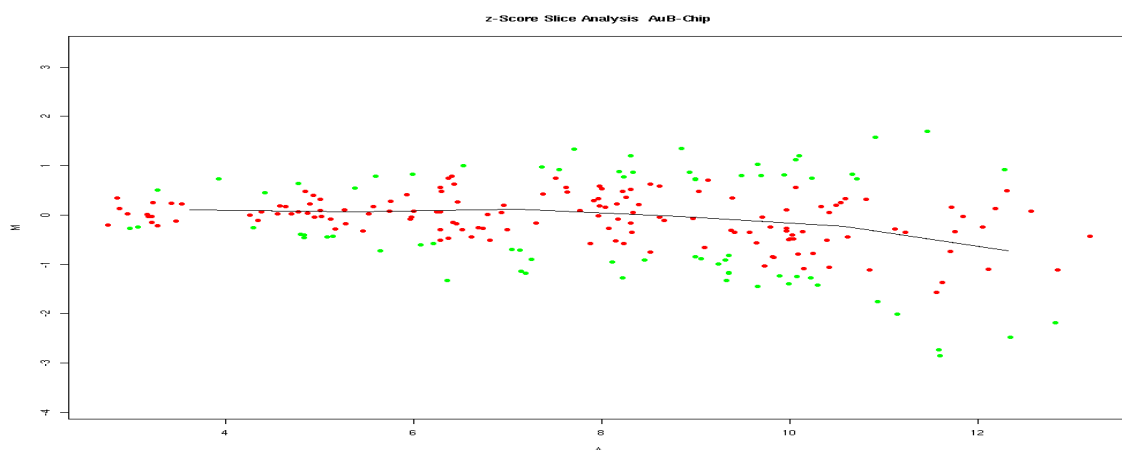


Abbildung 6: Auswertung zweier Dye-Swap-Versuche mit unstimulierten und stimulierten Blutproben

Das Ergebnis zeigt, dass alle Gene entweder 0.5x (rote Punkte) oder 1x (grüne Punkte) von der Regressionsgerade entfernt sind. Es sind keine Ausreißer ($>1x$) vorhanden.

3.5 Halbmarathon

3.5.1 Blutentnahme bei den Halbmarathon Läufern

Acht trainierte männliche Läufer (Durchschnittsalter 38.9 Jahre \pm 11.8 Jahre und einem durchschnittlichen BMI von 23.6 \pm 1.8), haben unter Wettkampfbedingungen einen öffentlichen Halbmarathon-Lauf (21.1 km) bestritten. Keiner der Läufer nahm Medikamente beinhaltend auch Antioxidantien und Nikotinabusus oder litt unter einer akuten oder chronischen Erkrankung. Der Halbmarathon begann um 10.00 Uhr an einem kühlen (1°C) Dezembertag. Die Laufstrecke war hügelig und anspruchsvoll.

Die Blutproben der Läufer (5x 2.5ml Vollblut) wurden in PAXgene™ Blood RNA Tubes in sitzender Position entnommen. Die Abnahmezeitpunkte der Proben waren festgelegt auf einen Tag vor dem Lauf (t0) in Ruhe, unmittelbar (bis zu 15 min) nach dem Lauf (t1) und 24 Stunden nach dem Lauf (t2). Die Läufer waren zu diesem Zeitpunkt für bereits mindestens zwei Jahre im Ausdauertraining, mit einer durchschnittlichen wöchentlichen Laufleistung von 52.2 km \pm 25.5 km (siehe Tabelle 1).

Wir haben das Genexpressionsmuster jedes Läufers, vor und nach dem Halbmarathon, analysiert. Jeder Teilnehmer dieser Studie wurde ausführlich über den Versuchsablauf aufgeklärt und hat schriftlich sein Einverständnis gegeben. Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt, entsprechend den Prinzipien des Helsinki Abkommens.

3.5.2 Aufarbeitung der RNA, Amplifikation und Markierung der Proben

Das in PAXgene™ Blood RNA Tubes abgenommene Blut wurde nach Protokoll und mit dem entsprechenden PAXgene™ Blood RNA Kit aufgearbeitet. Die isolierte RNA wurde dann quantitativ mit einem Photometer und qualitativ mit dem Bioanalyzer getestet. Die getestete RNA wurde mit dem Message Amp Amplification Kit revers transkribiert und anschliessend in-vitro-transkribiert. Die amplifizierte cRNA wurde unter Einschluss von aadUTP in cDNA umgeschrieben. Die synthetisierte cDNA wurde dann entsprechend dem Markierungs-Protokoll weiterbehandelt. Nach der Markierung wurde die Inkorporations-Effizienz nochmals am Photometer bei 260nm, für Cy3 bei 550nm und für Cy 5 bei 650nm, gemessen.

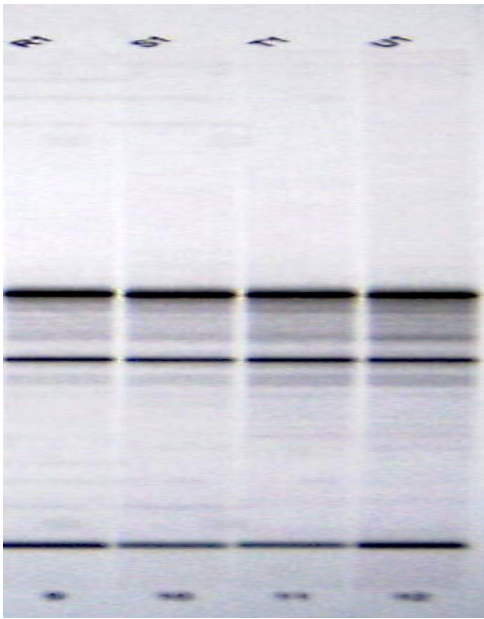


Abbildung 7: Ausschnitt einer RNA-Qualitätsbestimmung mit dem Bioanalyzer von Agilent

Die obere breite Bande ist die sogenannte 28 S-Bande und die im Vergleich dünnere Bande ist die 18 S-Bande. Die hier gemessene RNA zeigt die erwünschte hochwertige Qualität, die für Microarray-Versuche notwendig ist.

3.5.3 Hybridisierung der Proben

Die gespotteten Slides wurde nach dem Prähybridisierungsprotokoll für die Hybridisierung vorbereitet.

Wir haben uns entschieden den Zeitpunkt (t0) gegen den Zeitpunkt (t1), sowie den Zeitpunkt (t0) gegen den Zeitpunkt (t2), mit einem zusätzlichen Dye-Swap zu messen.

Versuchsdurchführung



3.5.4 Scannen

Die Slides wurden in einem Microarray Scanner (Genetix Limited) gescannt. Die Spannung der Photomultiplier-Röhre war sowohl für den roten als auch für den grünen Kanal immer auf 100% eingestellt. Die beiden resultierenden Ansichten (rot und grün) wurden mithilfe von ImaGene 5 (BioDiscovery) übereinander gelegt.

3.5.5 Signal- und Bildextraktion

Der erste Schritt der Bildextraktion umfasste den Ausschluss aller Spots, die von der ImaGene 5 software als „poor“ (schlecht beurteilbar aufgrund von Verunreinigungen des Signalvorder- oder Hintergrunds, Formunregelmäßigkeiten oder schlechter Spotqualität) markiert worden waren.

Der Modus der Pixelverarbeitung für den Signalvordergrund oder Hintergrund jedes einzelnen Spots wurde als Schätzfunktion beider Kanäle gewählt.

3.5.6 Normalisierung*

Die Auswertung und Normalisierung der Microarraydaten wurde in Zusammenarbeit mit der Fakultät für Informations- und Kognitionswissenschaften, Wilhelm-Schickard-Institut für Informatik an der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt. Die

* Kapitel geschrieben von Derek Zieker in Zusammenarbeit mit Janko Dietzsch (Institut für Bioinformatik, Eberhard Karls Universität Tübingen) bis einschließlich Kapitel 3.5.8

nachfolgende Erläuterung der Normalisierung und der Detektion differentiell exprimierter Gene lehnt sich an die vom Wilhelm-Schickard-Institut für Informatik bereitgestellte Beschreibung dieser Abläufe an. Das detaillierte Vorgehen wurde bereits von Zieker et al. veröffentlicht (84). Die Normalisierung wurde in drei Schritten durchgeführt (siehe Abbildung 8). Die drei einzelnen identischen Unterarrays wurden mit der Loess-Korrektur bearbeitet, um die vorhandenen lokalen Bias der Intensitätswerte zu verringern (7; 11). Diese Intensitätswerte des roten (Ch^{red}) und des grünen Kanals (Ch^{green}) wurden als Ausgangswerte verwendet, um den Log-Ratio M und das logarithmierte geometrische Mittel der Intensitäten A für alle Spots auf dem Array zu berechnen (7; 18):

$$M = \log_2 \left(\frac{Ch^{red}}{Ch^{green}} \right), A = \log_2 \sqrt{Ch^{red} \cdot Ch^{green}}$$

Um die Auswertung noch verlässlicher zu machen wurde ein Dye-Swap-Design durchgeführt. Es wurden zwei Microarrays hybridisiert. Dies bedeutet, dass auf dem einen Microarray die Probe im roten Kanal (s^{red}) und die Referenz im grünen Kanal (r^{green}) gemessen wurde. Die Hybridisierung wurde auf dem anderen Microarray genau andersherum durchgeführt, so dass die Referenz im roten (r^{red}) und die Probe im grünen Kanal (s^{green}) gemessen wurde. Daraus folgt für die Log-Ratios der Spots:

$$M' = \log_2 \left(\frac{s^{red}}{r^{green}} \right), M'' = \log_2 \left(\frac{r^{red}}{s^{green}} \right)$$

Die drei Replikate (Subarrays) einer Hybridisierung werden anschliessend arithmetisch gemittelt. Dadurch liegen für jedes Transkript jeweils zwei Schätzer vor. M^I , M^{II} und A^I , A^{II} . I und II kennzeichnen die beiden komplementären Dye-Konfigurationen. Am Ende der Normalisierung werden die Dye-Effekte mithilfe der beiden Schätzer M^I und M^{II} wie folgt eliminiert (67; 76; 82):

$$M = \log_2 \left(\frac{s}{r} \right) \cong \frac{1}{2} \cdot (M' - M'') = \frac{1}{2} \cdot \left(\log_2 \left(\frac{s^{red}}{r^{green}} \right) - \log_2 \left(\frac{r^{red}}{s^{green}} \right) \right) = \frac{1}{2} \cdot \left(\log_2 \left(\frac{s^{red}}{r^{red}} \right) + \log_2 \left(\frac{s^{green}}{r^{green}} \right) \right)$$

3.5.7 Detektion differentiell expremierter Gene

Bei einem direkten Designs der Hybridisierung von Kontrolle und Proband auf dem gleichen Microarray, kennzeichnen Log-Ratios M differentiell expremierte Gene, die statistisch signifikant von Null abweichen. Zur Kontrolle der Daten wurde der Einstichproben-t-Test mit der Annahme $\mu = 0$, durchgeführt. Die Problematik des multiplen Testens wurde durch die Verwendung verschiedener Methoden zur Kontrolle der Family-Wise Error Rate (FWER) und False Discovery Rate (FDR) gemacht (18; 25). Um eine hohe statistische Signifikanz für die Auswahl der differentiell expremierten Genen zu erreichen, wurde die Bonferroni-Korrektur (8) durchgeführt. Somit wurde ein Gen als differentiell expremiert bezeichnet, wenn sein Bonferroni-korrigierter p-Wert unter 5% (p-Wert < 0.05) lag.

3.5.8 Verfügbarkeit der Daten

Die generierten Daten dieser Studie sind über die Datenbank Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) des National Center for Biotechnology (NCBI) unter der GEO Series Accession Number GSE2532 für die Öffentlichkeit ersichtlich.

3.5.9 Genetischer Expressions-Fingerabdruck

Bei der Analyse der Daten war die identische Expression der Gene (t1 vs. t0 sowie t2 vs. t0), die auf dem Microarray vorhanden waren, das Ordnungskriterium zur Erstellung eines genetischen Expressions-Fingerabdrucks. Eine weitere Voraussetzung für die Erfassung eines Gens, war die gleichsinnige Regulation in allen acht Halbmarathonläufern.

3.5.10 Quantitative Real Time PCR

Gene von Interesse, die sich nach der Auswertung der Slides verändert haben, müssen mit einer zweiten unabhängigen Methode bestätigt werden. Die Methode der Wahl mit einer entsprechenden Sensitivität ist die Real Time PCR.

Einige ausgewählte cDNAs wurden mithilfe von Real Time PCR in einem LightCycler Instrument (Roche, Mannheim/ Germany) quantifiziert. Für diese PCR gestützte Vervielfältigung wurde das LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I-kit (Roche) entsprechend der Anleitung verwendet. Die finalen Konzentrationen von Primern und Magnesium wurden für jedes Primerpaar mit Vorversuchen optimiert.

Die Spezifität der PCR Bedingungen wurde gesichert durch Ermittlung der Schmelztemperaturen der betreffenden zu amplifizierenden cDNAs. Von diesen wurde zuvor in Agarose-Gel-Analysen gezeigt, dass sie mit der erwarteten Produktgröße korrelieren.

Eine relative Quantifizierung der Genexpressionslevel wurde mithilfe einer externen Standard-Kurve durchgeführt, die parallel zu den zu untersuchenden Proben mitlief. Diese Standard-Kurven wurden durch serielle Verdünnung einer bereits durch PCR amplifizierten Probe des betreffenden Amplifikats hergestellt.

Die lineare Anordnung wurde für jeden PCR Lauf festgelegt indem der CP-Wert (crossing point), der LightCycler Software, gegen den Verdünnungsfaktor dieser Standards berechnet wurde. Dieses Vorgehen erlaubt den quantitativen Vergleich der Proben. Für Proben innerhalb der linearen Verteilung der Standardkurven wurde der betreffende Wert über die Regressionsanalyse berechnet. Das Verhältnis der Werte spezifischer Proben zu β -Actin Werten erlaubt die relative Quantifizierung der Genexpression.

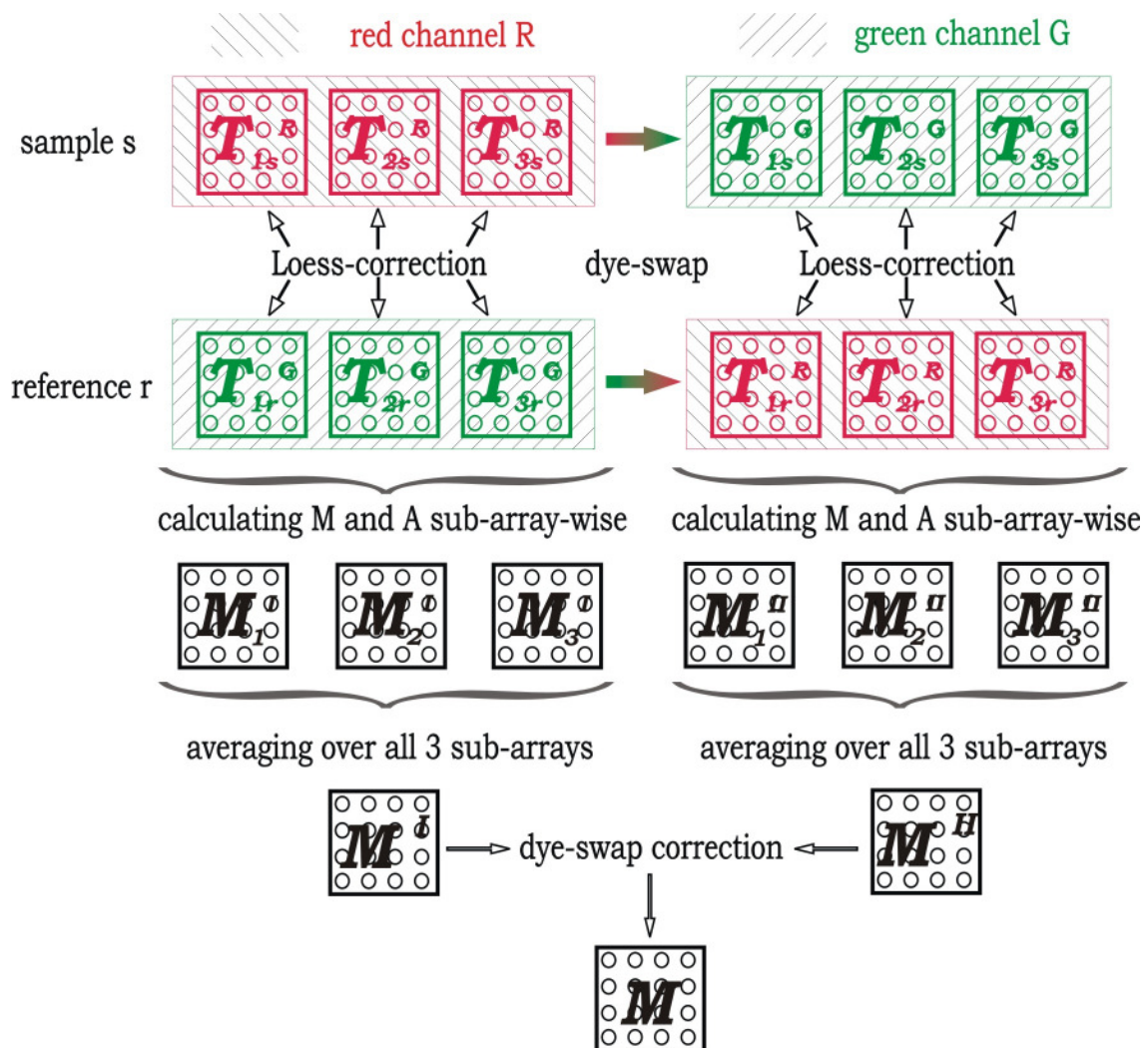


Abbildung 8: Darstellung der Normalisationsprozedur*

Die Vorgehensweise des Dye-swaps ist im oberen Teil der Darstellung zu sehen. Auf der linken Seite ist die Probe rot fluoreszierend und die Vergleichsprobe fluoresziert grün. Auf der rechten Seite sind die Fluoreszenzen vertauscht. Nachdem die drei einzelnen identischen Unterarrays mit der Loess-Korrektur bearbeitet wurden, wurden die log-Relationen M_x^I , M_x^{II} der einzelnen Spotintensitäten von Probe und Vergleichsprobe berechnet. M^I , M^{II} sowie A^I , A^{II} ergaben sich durch Bildung des Mittelwertes aller drei identisch gespotteten Unterarrays. Beide auf diesem Weg ermittelte Werte M^I und M^{II} wurden benutzt, um schließlich den über die Dye-Swap-Korrektur berechneten Wert M zu erhalten (siehe Methoden, Normalisation).

* Grafik erstellt von Janko Dietzsch (Institut für Bioinformatik, Eberhard Karls Universität Tübingen)

4 Ergebnisse

4.1 Laufzeiten

Die durchschnittliche Laufzeit der Halbmarathonläufer betrug 104.75 min, \pm 21.24 min. Die Laufzeiten der einzelnen Probanden ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Die Zellzahlverschiebung der Blutkörperchen vor dem Lauf (t0), kurz nach dem Lauf (t1) und 24 h nach dem Lauf (t2), sind in Tabelle 2 dargestellt. Sie entsprachen in der Größenordnung den Erwartungen bei einem Halbmarathon.

Tabelle 1: Anthropometrische Daten der Läufer

Läufer	Alter in Jahre	BMI	Laufzeit in min	Wöchentlich Laufleistung in km	Größe in cm	Gewicht in kg
1	58	26,3	129	25	177	82.5
2	50	25,6	139	35	182	85
3	28	24,1	105	50	169	69
4	25	22,3	82	60	164	60
5	44	23,4	95	50	178	74
6	44	20,8	77	110	170	60
7	30	23	103	45	191	84
8	32	23,1	108	45	192	85

Tabelle 2 : Zellzahlverschiebung der Blutkörperchen vor dem Lauf (t0), kurz nach dem Lauf (t1) und 24 h nach dem Lauf (t2)

Zeit punkt	Durchschnittliche Leukozytenanzahl per 1μl Blut	Durchschnittliche Granulozytenanzahl per 1μl Blut	Durchschnittliche Lymphozytenanzahl per 1μl Blut	Durchschnittliche Monozytenanzahl per 1μl Blut
T0	6237 \pm 1520	3498 \pm 939	2050 \pm 565	445 \pm 84
T1	16825 \pm 3930	14846 \pm 3780	1140 \pm 412	741 \pm 335
T2	6270 \pm 1205	3682 \pm 799	1865 \pm 493	517 \pm 134

4.2 Microarray-Ergebnisse

Es wurde eine Vielzahl von hoch- und runter- exprimierten Genen im Vergleich der Zeitpunkte vor dem Lauf (t0) mit nach dem Lauf (t1) gefunden.

Bei dem Vergleich der Zeitpunkte vor dem Lauf (t0) mit 24 Stunden nach dem Lauf (t2) wurde keine wesentliche Veränderung des Genexpressionsmusters gefunden. Die hoch- und runter- exprimierten Gene die nach dem Lauf (t1) gefunden wurden, zeigten 24 Stunden nach dem Lauf wieder normale Werte.

Die hoch- und runter- exprimierten Gene mit einem p-Wert ($p < 1$), die im Vergleich der Zeitpunkte vor dem Lauf (t0) mit nach dem Lauf (t1) gefunden wurden, sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Der Einstichproben-t-Test in Verbindung mit den regulierten p-Werten lieferte ein Ergebnis von sechs Genen. Diese sechs unterschiedlich exprimierten Gene, zeigten unter stringenter statistischer Auswertung einen p-Wert von ($p < 0.05$).

Diese Gene waren, Selectin L, das verstärkt exprimiert war, CD81, CD244, glutathione-S-transferase 3 (GSTM3), ICAM2 and integrin alpha x, die vermindert exprimiert waren.

Die sechs hochsignifikant exprimierten Gene ($p < 0.05$), und vier zusätzliche Gene, die von besonderem Interesse erschienen mit einem p-Wert von ($p < 1$), wurden mit einer zweiten unabhängigen Methode, der Real Time PCR, überprüft. Bei den vier zusätzlich ausgewählten Genen handelte es sich um Interleukin-1-recetor-antagonist (IL-1-ra), MAPKAP K2, Thioredoxin und CD1c. Sie waren deutlich reguliert, ohne jedoch unter der hier für die Auswertung angewandten, hochstringente Statistik, Signifikanz zu erreichen.

Tabelle 3: Vielfachen-Veränderungen- und p-Werte (nach Bonferroni) der unterschiedlich exprimierten Gene der Microarray-Analyse

Genprodukte	Log2 (FC)	Vielfachen- Veränderung (FC)	p-Werte (Bonferroni)
CD 81 (cd81)	-0,9	0,5	0,00
CD 244 (cd244)	-0,6	0,7	0,01
Integrin alpha x (itgax)	-0,2	0,9	0,02
Selectin L (sell)	1,7	3,2	0,04
Glutathione S-transferase M3 (gstm3)	-0,3	0,8	0,04
ICAM 2 (icam2)	-0,9	0,5	0,04
Chemokine receptor 1	-1,3	0,4	0,05
Sphingomyelin phosphodiesterase 2	-0,4	0,8	0,09
CD 1C (cd1c)	-0,3	0,8	0,10
Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	-0,3	0,8	0,15
MAPKAP K2 (mapkapK2)	0,5	1,4	0,15
CD 14	0,9	1,8	0,18
Thioredoxin (trx)	1,3	2,4	0,20
CD 19	-0,4	0,8	0,22
IL 2 receptor beta	-0,7	0,6	0,26
Chemokine ligand 4	-0,6	0,6	0,28
Thromboxane A synthase 1	0,9	1,8	0,30
CD 2	-1,2	0,4	0,33
IL 8 receptor alpha	1,0	2,0	0,35
Phospholipase C epsilon 1	-0,1	0,9	0,44
HSPB 1	0,8	1,8	0,47
CD 3E	-0,3	0,8	0,50
Protein C	-0,5	0,7	0,64
Thioredoxin 2	-0,3	0,8	0,69
Chemokine receptor 9	-0,7	0,6	0,88
CD 3E antigen	-0,5	0,7	0,91
IL 1 receptor antagonist (il-1ra)	0,7	1,7	0,93
Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	-0,2	0,8	0,95
Adrenergic beta 2 receptor surface	-0,2	0,8	0,99

4.3 Real Time PCR-Ergebnisse

Acht von den zehn überprüften Genen zeigten bei der Real Time PCR signifikante Ergebnisse ($p < 0.05$) und wurden in ihrer Expression auf dem Microarray bestätigt. Darunter waren auch die vier zusätzlich ausgewählten Gene. ICAM2 und CD244 zeigten in der Real Time PCR keine Signifikanz zeigten jedoch einen Trend in der erwarteten Richtung. Die Ergebnisse der Real Time PCR sind in Tabelle 4 und Abbildung 9 dargestellt. Die Primersequenzen der Gene sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Eine lineare Regressionsanalyse wurde durchgeführt um eine Korrelation der x-fachen Expressionsveränderung von zelltyp-spezifischen Oberflächlichenmolekülen, die bei Microarray-Analysen beobachtet wurden, herzustellen, in Verbindung mit der beobachteten individuellen x-fachen Verschiebung der peripheren Blutzellen. Wie in Tabelle 6 dargestellt, korreliert die unterschiedliche Expression aller relevanten spezifischen Zelloberflächenmarkern signifikant mit der respektiven x-fachen Veränderung der Zellzahlen.

Tabelle 4: Signifikant exprimierte Gene des Zeitpunktes (t0) im Vergleich zum Zeitpunkt (t1) durch die Real Time PCR bestätigt (2-Stichproben-t-Test)

Genprodukte	<i>p</i>-Werte
CD1c (cd1c)	0.03
CD244 (cd244)	0.27
CD81 (cd81)	0.02
Glutathione S-transferase M3 (gstm3)	0.02
ICAM2 (icam2)	0.57
IL 1 receptor antagonist (il-1ra)	0.0002
Integrin alpha x (itgax)	0.03
Selectin L (sell)	0.004
Mapkap K2 (mapkapK2)	0.02
Thioredoxin (trx)	0.03

Tabelle 5: Primer-Sequenzen

Genprodukte	Primersequenzen	Amplikatsgröße [bp]
cd1c	Ffwd 5'-TGAAGGCGTCACAGAACAG	199

	Bkwd 5'-CCAAACAGGCTTTGGGTAGA	
cd244	Ffwd 5'-GGTACAGAGGGAGCAAGCTG Bkwd 5'-CTCCTCCACACACAGAAGCA	253
cd81	Ffwd 5'-TCATCCTGTTTGCCTGTGAG Bkwd 5'-CCTCCTTGAAGAGGTTGCTG	270
gstm3	Ffwd 5'-CCTGGATGGGAAGAACAAGA Bkwd 5'-TTGTGTGCGGAAATCCATTA	142
icam2	Ffwd 5'-CAAACATCTCCCATGACACG Bkwd 5'-CTGCACTCAATGGTGAAGGA	163
il1- ra	Ffwd 5'- GGAATCCATGGAGGAAGAT Bkwd 5'- CCTTCGTCAGGCATATTGGT	245
itgax	Ffwd 5'-ATGCAATTGGGGTTGGATTA Bkwd 5'-CTCCAGACCAGGTGAAGCTC	282
sell	Ffwd 5'-AAACCCATGAACTGGCAAAG Bkwd 5'-CGCAGTCCTCCTTGTTCTTC	250
mapkapK2	Ffwd 5'- TCATGAAGAGCATCGGTGAG Bkwd 5'- TCAAAGAGTTGTGGCTGGTG	165
trx	Ffwd 5'-CTGCTTTTCAGGAAGCCTTG Bkwd 5'-TGTTGGCATGCATTTGACTT	203

Tabelle 6: Die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen der Genexpression und der Zellzahlverschiebung sind für jeden Marker und Zelltyp in dem oberen Teil der Tabelle wiedergegeben.

Die Genexpression (y) und die Zellverschiebung (x) für die acht unterschiedlichen Marker wurden einander angeglichen und zeigten eine hohe Korrelation (unterer Teil der Tabelle).

Marker	Zelltyp	fold-change cell count	fold-change expression
CD62L	Granulozyten	4.32375 ± 0.88021	3.40987263 ± 1.45615536
CD14	Monozyten	1.6975 ± 0.72005456	1.887124 ± 0.52366769
CD1c	Lymphozyten	0.55875 ± 0.14456215	0.81017089 ± 0.07123074
CD2	Lymphozyten	0.55875 ± 0.14456215	0.47236313 ± 0.18727041
CD3e	Lymphozyten	0.55875 ± 0.14456215	0.83402369 ± 0.08292171
CD19	Lymphozyten	0.55875 ± 0.14456215	0.78488713 ± 0.0926738
Markerveränderung der Genexpression (y) bezogen auf die Veränderung der Zellverschiebung (x)			
		R2	p-Wert
y = 0.37 + 0.72x		0.97	0.0003

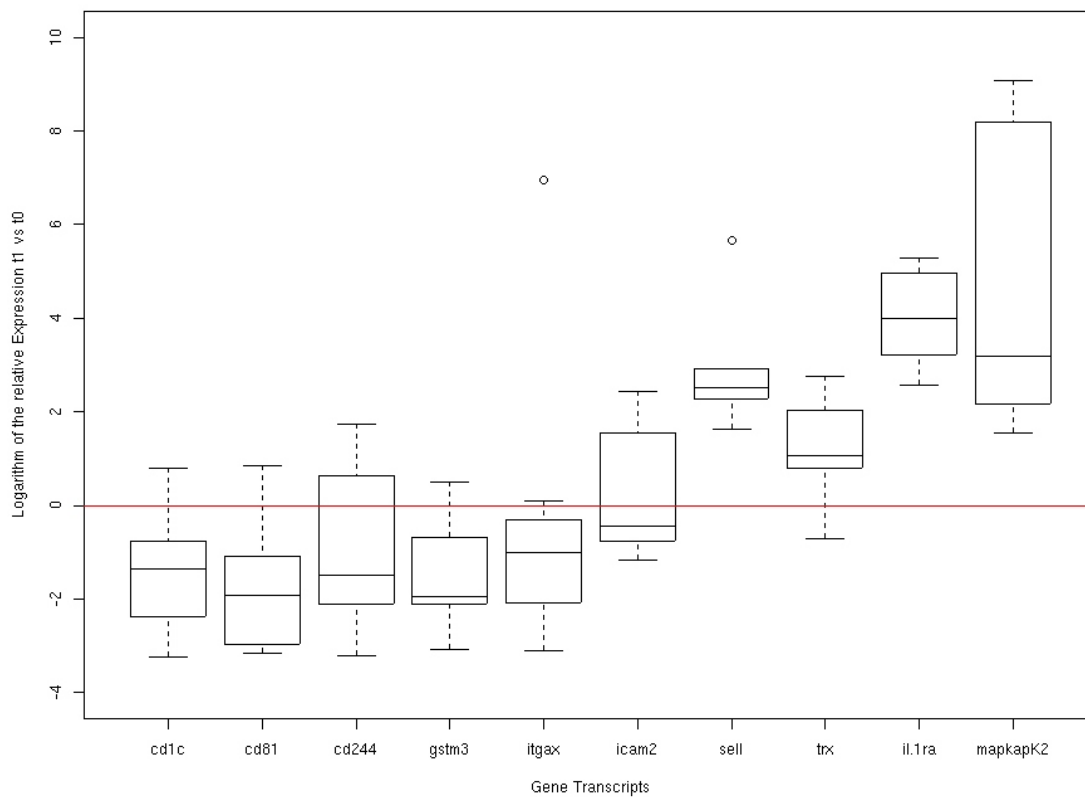


Abbildung 9: Box-plots der Real Time PCR Messungen*

Die Box-plots der Real Time PCR Messungen werden hier dargestellt als log₂-Werte der vielfachen Veränderungen zwischen Zeitpunkt t₁ und Zeitpunkt t₀. Die gezeigten box-whisker-plots visualisieren das Minimum (unterster Querstrich), den Median (Linie durch die Box) und das Maximum (oberer Querstrich) der Aufteilung der Ergebnisse. Die separat dazu eingezeichneten Punkte sind Ausreißer nach der Definition, die standardisierter Weise benutzt wird: Punkte wurden als Ausreißer betrachtet, wenn das Minimum der Entfernung zum ersten und dritten Viertel größer ist als das 1,5-fache des dazwischen liegenden Bereiches (IQR= drittes Viertel – zweites Viertel).

* Grafik erstellt von Janko Dietzsch (Institut für Bioinformatik, Eberhard Karls Universität Tübingen)

4.4 Genetischer Expressions-Fingerabdruck

Im Vergleich der Genexpression unmittelbar nach dem Lauf mit dem Ausgangsstatus vor dem Lauf wurden 36 Gene, welche bei allen acht Halbmarathonläufern identisch vorlagen, gefunden. (siehe Abbildung 10 und Tabelle 7). Diese Gene und ihre Zuordnung zu den assoziierten physiologischen Funktionen sind in Tabelle 7 dargestellt. Die vermehrte bzw. verminderte Expression der einzelnen gefundenen Gene wird in Abbildung 10 aufgezeigt.

21 Gene wurden beim Vergleich der Genexpression 24 Stunden nach dem Lauf mit dem Ausgangsstatus vor dem Lauf gefunden. Auch diese 21 Gene waren bei allen acht Läufern identisch exprimiert (siehe Abbildung 11 und Tabelle 7). Entsprechend werden diese Gene und ihre Zuordnung zu den assoziierten physiologischen Funktionen in Tabelle 7 dargestellt und die vermehrte bzw. verminderte Expression der einzelnen gefundenen Gene wird in Abbildung 11 aufgezeigt.

Tabelle 7: Gene und ihre Zuordnung zu den assoziierten physiologischen Funktionen

<i>Genprodukt-Clustering von t0 versus t1</i>		<i>Genprodukt-Clustering von t0 versus t2</i>	
<u>Signaltransduktion / Membranproteine / Zellinteraktion / Apoptose</u>		<u>Signaltransduktion / Membranproteine / Zellinteraktion / Apoptose</u>	
Genprodukt	Gene Session-ID	Genprodukt	Gene Session-ID
APP	AI827546	ADRB2	R08445
Beta 2 rec.	R08446	Caspase 2	AA481283
Caspase 5	W60703	Chemokine lig. 4 #	N57175
CD3E	H25061	Chemokine rec. 1	BC028078
CD3E antigen	H25061	Chemokine rec. 4	AA479357
CD81 * °	H30366	EDG1 #	W21494
Chemokine lig. 4 #	N57175	GRIA1	BF739768
EDG1 #	W21494	IGF2	H78540
ICAM2 *	R21644	Integrin beta 4	R48163
IL-18 R1	AA482489	SMPD1	H85744
Integrin alpha 4	BX091768		
Integrin alpha x *			
°	N64384		
MAPKAP K2 * °	R71819		
Phospholipase C	AA041245		
S12	H72224		
Selectin L * °	H00756		
<u>Anti-/ Oxidatives System</u>		<u>Anti-/ Oxidatives System</u>	

Gen-ID	Gene Session-ID	Gen-ID	Gene Session-ID
GSTM3 * °	R63065	GSS	R40853
GST pi	AA416781	SOD1	W25024
HSPB1	R33761	TRX R1	H15481
Peroxiredoxin 5	H20248		
Thioredoxin * °	R83156		
Thioredoxin 2	N32554		
<u>Immunsystem</u>		<u>Immunsystem</u>	
Gen-ID	Gene Session-ID	Gen-ID	Gene Session-ID
CD1C * °	BX116983	CD19 #	AI217645
CD8	W07753	IL-2 rec. beta #	R62939
CD14	R15360		
CD19 #	AI217645		
CD79B	R72128		
CD244 *	AI363168		
CSF 3 rec. (gran)	R31999		
IL-2 rec. beta #	R62939		
Integrin alpha M	AI307732		
<u>Anti-/ Inflammatorisch</u>		<u>Anti-/ Inflammatorisch</u>	
Gen-ID	Gene Session-ID	Gen-ID	Gene Session-ID
15-PGDH	AI832179	CD2	AI131504
IL-1 rec. antag. * °	AA497054	IFNGR1	H11838
IL-1 rec. type 2 #	H78484	IRAK1	R83860
Protein C #	BX107014	IL-1 rec. type 2 #	H78484
PTGS1	AA454668	MGST2	AA122237
		Protein C #	BX107014

* zeigt die Gene an, die signifikant bei der Microarrayanalyse im Vergleich t0 vs. t1 (p<0,05) verändert waren und mit der Real Time PCR bestätigt wurden (84).

° zeigt die Gene an, die bei der Real Time PCR ein p<0,05 hatten.

zeigt die Gene an, die im Vergleich t0 vs. t1 und t0 vs. t2 verändert vorlagen.

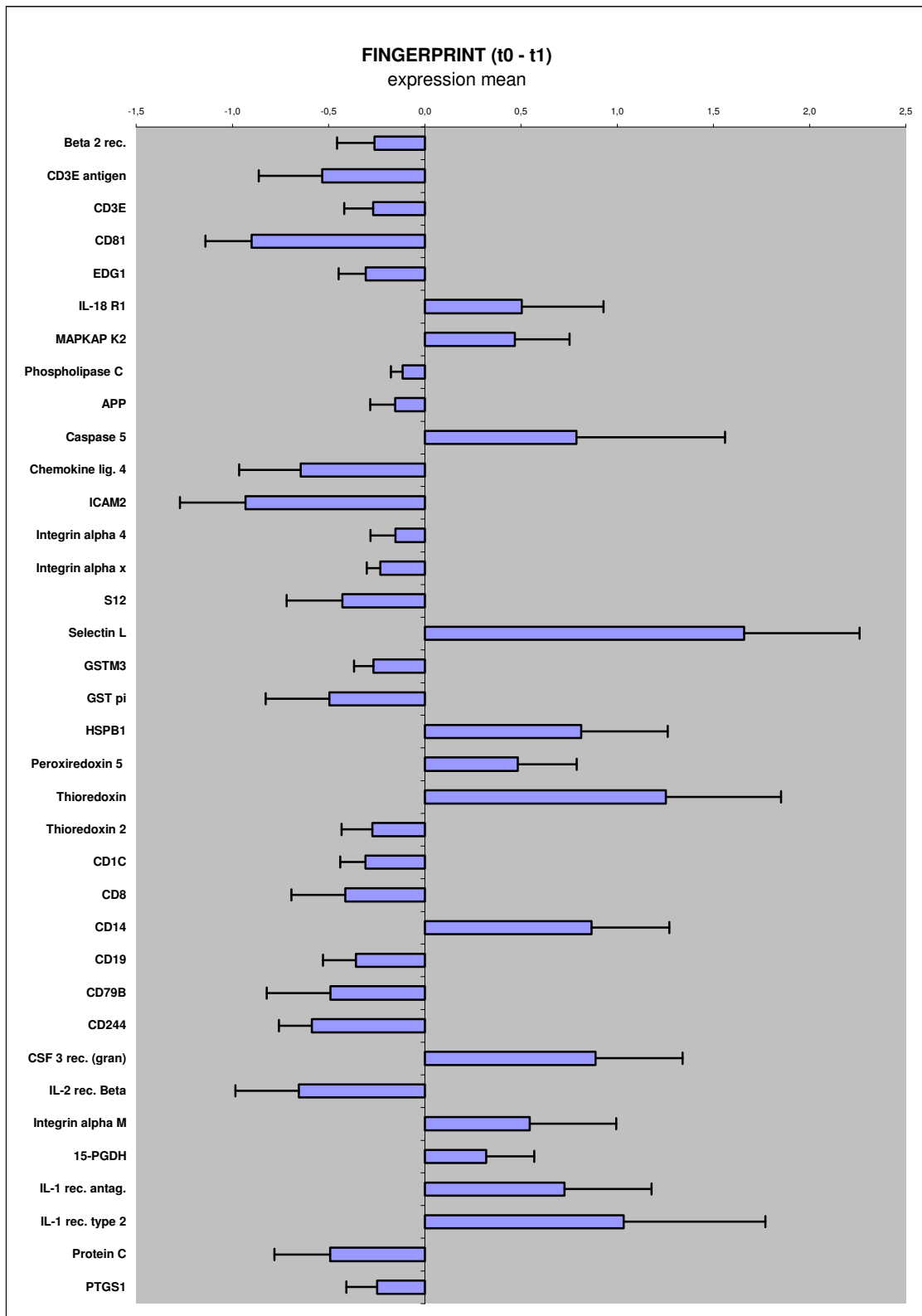


Abbildung 10: Genetischer Expressions-Fingerabdruck - Vergleich t1 vs. t0

Im Vergleich t1 mit t0 konnten 36 bei allen acht Läufern identisch exprimierte Gene gefunden werden.

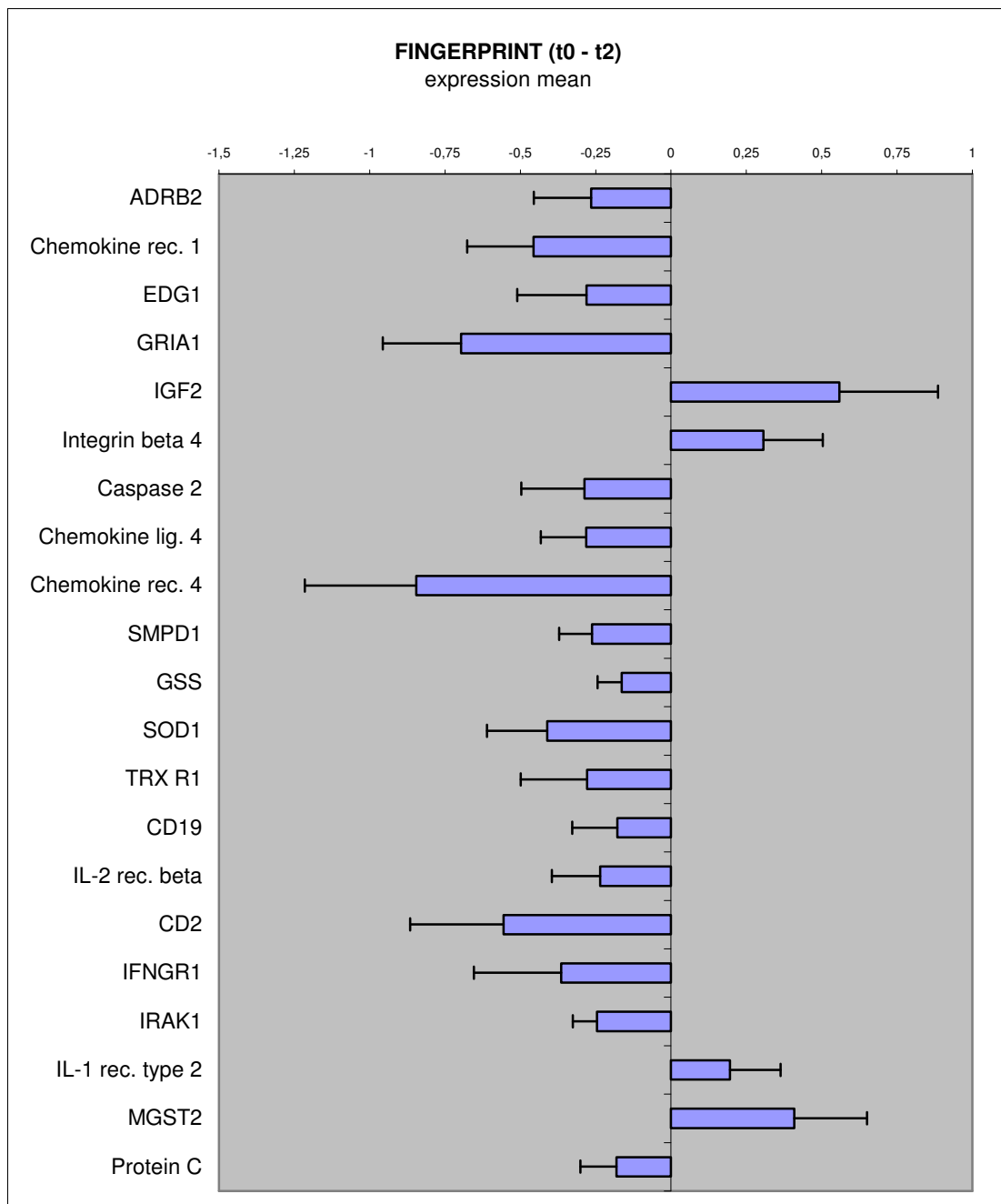


Abbildung 11: Genetischer Expressions-Fingerabdruck - Vergleich t2 vs. t0

Im Vergleich t2 mit t0 konnten 21 bei allen acht Läufern identisch exprimierte Gene gefunden werden.

5 Diskussion

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Vielzahl peripherer immunologischer Parameter, während und einige Stunden nach intensiver Ausdauerbelastung wie Marathon, Halbmarathon oder Triathlon signifikant verändert werden (51). Diese Veränderungen beinhalten die Induktion von Cytokinen und Hormonen, sowie die Induktion von Toleranz gegenüber bestimmter pathologischer Stimuli, Veränderungen in NK Zellen, in Adhäsionsmolekülen und in der Zellzahlpopulation.

Die beobachteten Veränderungen können der Energiebelieferung der beanspruchten Muskulatur dienen oder die beanspruchte Muskulatur vor überschießenden Entzündungsreaktionen schützen. Des Weiteren wird die Frage diskutiert, in wieweit diese Veränderungen auch im Zusammenhang mit der passageren Immunsuppression stehen, die bei Athleten nach intensiver Ausdauerbelastung beobachtet werden kann (80). Die meisten der beobachteten Veränderungen gehen innerhalb von 24 Stunden nach der intensiven Ausdauerbelastung auf Normalniveau zurück (51).

5.1 Microarray Methodik

Um neue Aspekte in dem Bereich der intensiven Ausdauerbelastung zu gewinnen, wurde ein cDNA Microarray mit Fokus auf Gene aus dem Stress- und Entzündungsgeschehen hergestellt, validiert und zur Analyse eines Halbmarathons erstmalig eingesetzt. Alle Schritte, die erforderlich waren, um einen für diese Studie einsetzbaren Microarray zu erstellen, zu prüfen und in ausreichender Menge verfügbar zu machen, sind im Abschnitt Material und Methoden ausführlich abgehandelt. Im weiteren Verlauf dieser Diskussion sollen diese Aspekte deshalb nicht mehr ausführlich besprochen werden, sondern die studienspezifischen Ergebnisse in den Vordergrund gestellt werden. Es soll hier deshalb nur kurz festgestellt werden, dass der Microarray die an ein solches komplexes Werkzeug zu stellenden Anforderungen in allen Belangen erfüllen konnte. Um dieses Ziel zu erreichen waren im Vorfeld zeitintensive und anspruchsvolle Vorversuche notwendig, die einen standardisierten und reproduzierbaren Ablauf aller Versuche gewährleisteten. Die Komplexität der Auswertung und die anschließende Bearbeitung der weitergehenden Fragestellung nach einem genetischen

Expressionsmuster wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Bioinformatik der Universität Tübingen hervorragend bewältigt.

Es war nicht Ziel der Studie alle bisher im Zusammenhang mit intensiver Ausdauerbelastung veränderten Gene zu bestätigen. Einige bekannte nachgewiesene Veränderungen wurden nicht in peripherem Blut sondern z.B. nur in Muskelgewebe nachgewiesen. Andere werden zwar im peripheren Blut erfasst, haben ihren Ursprung aber in anderen Geweben, so dass der Zeitpunkt der Blutabnahme entscheidend ist (z.B. IL-6 Anstieg im Plasma).

Die Mehrzahl der signifikant exprimierten Gene wurde mittels Real Time PCR in ihrer Regulation bestätigt. Die regulierten Gene und zusätzlich bestimmte Gene von Interesse, die auf dem Microarray einem Trend unterlagen und in der Real Time PCR signifikant waren, sollen im Folgenden detailliert in ihrem Zusammenhang mit intensiver Ausdauerbelastung diskutiert werden.

Die vorliegenden Daten machen deutlich, dass vermindert und vermehrt exprimierte Gentranskripte in peripheren Blutzellen unmittelbar nach einem Halbmarathonlauf zu finden sind, im Vergleich zum Status vor der sportlichen Leistung. Die meisten dieser signifikant veränderten mRNAs kodieren für Proteine, deren Regulation im Zusammenhang mit Sport bisher nicht bekannt war. Die Gen-Transkriptveränderungen passen jedoch ausgezeichnet in den Kontext zu physischem Stress. Es sind Gene, die mit oxidativem Stress und dem Schutz davor zu tun haben. Dazu zählen protektive Systeme (Thioredoxin (TXR), GSTM3, Inleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra)), zelluläre Kontakt-Mechanismen (CD81, Adhäsionsproteine), Signaltransduktion und zellulärer Schutz (mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 2 (MAPKAP-K2, TRX)). Auch Connolly et al. (12) konnten bereits unter der Verwendung von Affymetrix-Arrays Veränderungen in Mononukleären Zellen des peripheren Blutes zeigen, auf die in der weiteren Diskussion näher eingegangen wird.

5.2 Veränderung der Genexpression in Zusammenhang mit Zellverschiebungen

Eine sachgerechte Diskussion der Ergebnisse ist ohne die vorherige Einschätzung des Einflusses der zellulären Verschiebung im untersuchten Blut als Folge der Belastung nicht möglich. In diesem ersten Teil der Diskussion soll deshalb auf die

Genexpressionsveränderung, die im engen Zusammenhang mit der beobachteten Zellzahlverschiebung steht, eingegangen werden. Dies bezieht sich hauptsächlich auf Gene mit Zelloberflächenmarkern, die in den verschiedenen Zellpopulationen des peripheren Blutes unterschiedlich exprimiert sind.

In diesem Zusammenhang zeigten Gene wie L-Selectin, CD1c, CD2, CD3e, CD14 und CD19 eine entsprechende veränderte Regulation (siehe Tabelle 6).

L-selectin (CD62L) mRNA zeigte bei der Genexpressionsanalyse eine erhöhte Expression. Dieses Ergebnis stimmt mit den bisher veröffentlichten Daten der Literatur überein. Mit Hilfe der Flow-Zytometrie konnte eine signifikant erhöhte Expression von CD62L auf Granulozyten während der Rekonvaleszenzphase nach Sport nachgewiesen werden (39). Granulozyten zeigen eine sehr starke CD62L Expression. In vorliegender Studie war CD62L um den Faktor 3.4 erhöht reguliert, während der Anstieg der Granulozyten-Population den Faktor 4.3 betrug. CD1c, CD2, CD3e und CD19 sind Zellmarker für Lymphozyten. Die verminderte Expression dieser Gene, korreliert sehr eng mit der Abnahme der Lymphozyten-Population um 45%. Der Monozytenmarker CD14 zeigte im Gegensatz dazu eine erhöhte Regulation um 88% und reflektiert sehr schön die Zellzahlveränderung der Monozyten im peripheren Blut, die eine Zunahme um 69% nach dem Halbmarathon aufwies.

Die Expressionsveränderung von CD244, welches ein weiterer Oberflächenmarker ist, könnte ebenfalls den Zellzahlveränderungen zuzuordnen sein. CD244 ist der Rezeptor 2B4 der Natürlichen Killerzellen (NK), der als Co-Rezeptor auf humanen NK-Zellen, auf Makrophagen und auf Subpopulationen von CD8+ T-Zellen exprimiert ist (50). NK-Zellen des peripheren Blutes zeigen eine starke Zellzunahme direkt nach intensiver Ausdauerbelastung, können aber mit einer großen individuellen Breite schnell wieder auf ihr Ausgangsniveau zurückfallen (52). Weitere Untersuchungen sollten zeigen ob man die Veränderungen von CD244 in direkte Verbindung mit der Anzahl der NK-Zellen bringen kann.

Die Tatsache, dass eine hoch signifikante Korrelation zwischen der x-fachen Veränderung von Zelloberflächenmarkern mit der jeweiligen x-fachen Veränderung von Zellzahlen besteht (siehe Tabelle 6), unterstreicht die Richtigkeit der hier dargestellten Methode. Wie bei allen Microarray-Versuchen kann bei der verwendeten Methode nicht sicher zwischen stattgefundenen Expressionsveränderungen und Verzerrungen der

Genexpression aufgrund zellulärer Verschiebungen differenziert werden (siehe Tabelle 2 und Tabelle 6) (12; 71). Diese Problematik könnte ebenfalls von Bedeutung sein für Microarray Versuche mit soliden Geweben, z.B. beim oft dargestellten Vergleich zwischen tumorhaltigem und gutartigem Gewebe. Hier könnten Unterschiede im Vorhandensein von immunkompetenten Zellen zu einer schwerwiegenden Verzerrung von Expressionsanalysen führen.

5.3 Veränderung der Genexpression, die nicht im Zusammenhang mit offensichtlichen Zellverschiebungen stehen

5.3.1 Zelluläre Kommunikation

Integrin alpha x (CD11c) und CD81 mRNA zeigten sich in der vorliegenden Studie beide als signifikant vermindert exprimiert. Dies kann mit der beobachteten Zellverschiebung nicht zusammenhängen, da CD11c stark bis moderat in Monozyten, Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und Granulozyten exprimiert ist. In T- und B-Zellen ist fast keine Expression zu beobachten (35). CD81 wird exprimiert auf mehrkernigen Zellen (PNM), Monozyten und B- und T-Lymphozyten (75). Im Vollblut stellen die Lymphozyten einen kleinen Anteil an der Zellpopulation. Damit ist die stark verminderte Genexpression um 50% nicht auf die veränderte Anzahl der Lymphozyten zurückzuführen.

Regelmäßige moderate sportliche Betätigung führt zu einer verminderten Expression von Adhäsionsproteinen, besonders von beta-2-Integrinen (35). Es wird vermutet, dass die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen nach Sport die Adhäsion und Migration von Leukozyten in die Gefäßwände und das umgebende Gewebe negativ beeinflusst. Kurz nach sportlicher Betätigung könnte dies zu einer verminderten Immunresistenz gegen Infektionserreger führen. Nach dem vorliegenden aktuellen Wissensstand, wurde die verminderte Genexpression von CD81 im Zusammenhang mit Hochleistungssport bislang noch nicht gezeigt. Das Protein, das von diesem Gen kodiert wird, gehört zur Familie der transmembrane 4 super family (Tetraspanine), die an Signaltransduktionsmechanismen beteiligt sind. Zu diesen zählen die Regulation von Entwicklung, Aktivierung, Wachstum und Beweglichkeit von Zellen. Die Tetraspanine sind bekannte Komponenten von Exosomen. Bei der Reaktion und Adaptation des

Körpers auf starke sportliche Betätigung könnten CD81 Proteine eine wichtige Rolle spielen. Wie bereits erwähnt, könnte eine verminderte Interaktion im Zusammenhang mit Integrinen Teil einer Gegenregulation von unangemessenen proinflammatorischen Stimuli sein, die auf Grund akuten muskulären (zellulären) Stresses entstehen.

Integrine spielen des weiteren eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Integrine wirken vor allem in dem Bereich, in dem der Zellkontakt stattfindet. Diese Bindungsstelle wird auch als Immunologische Synapse (IS) bezeichnet (46). Die Präsenz von CD81 an der IS, kann eine essentielle Rolle bei der TH1/TH2 Polarisation spielen (15). Das vermindert regulierte CD81 Protein könnte somit teilweise mitverantwortlich für die abgeschwächte zellvermittelte Immunität und das Ungleichgewicht der TH1/TH2 Balance zugunsten TH2 nach Hochleistungssport sein. CD81 ist somit ein neues Kandidatengen, welches im Zusammenhang mit transienter Immunsuppression nach erschöpfender Ausdauerbelastung diskutiert werden muss. Dieser Zustand könnte die Anfälligkeit von Sportlern nach intensiver Ausdauerbelastung erklären. Die Veränderungen von CD81 mRNA und dessen zugehörigem kodiertem Protein in individuellen Leukozyten-Subpopulationen müssen jedoch in weiteren Studien bestätigt werden.

5.3.2 Signalübertragung und zelluläre Protektion

Im Gegensatz zu den Genen für zelluläre Kommunikation, können Gene für Signaltransduktion und zellulären Schutz nicht klar individuellen Subpopulationen innerhalb des peripheren Blutes zugeordnet werden. In der vorliegenden Studie hat sich die Menge der mRNA von MAPKAP-K2, TRX, GSTM3 und IL-1ra in Reaktion auf die Belastung verändert. Diese Veränderungen wurden mithilfe der Real Time PCR als signifikant exprimiert bestätigt.

Das Ergebnis, dass die Genexpression von MAPKAP-K2 in Sportlern nach intensiver Ausdauerbelastung signifikant vermehrt exprimiert ist, wurde bereits in Studien mit Muskelgewebe gezeigt (83).

MAPKAP-K2 ist ein nachgeschaltetes Substrat im Signalweg der MAPK-Familie. Das MAPKAP-K2 Protein phosphoryliert unter anderem das Hitzeschockprotein 27 (HSP27, HSPB1) (21; 62; 83). An der Synthese von Interleukin 6 (IL6) ist MAPKAP-

K2 ebenfalls beteiligt, indem es die IL6-mRNA stabilisiert (47). Das nach Belastung massiv ansteigende IL6 wird allerdings nach heutigem Wissensstand nicht in peripherem Blut produziert und die entsprechende RNA war auch in dieser Studie nicht signifikant reguliert. Der Bildungsort (vermutlich Muskel-, Lebergewebe, Endothel) ist bislang nicht sicher bekannt. Trotzdem besteht die Möglichkeit, falls die Induktion von MAPKAP-K2 auf andere Gewebe übertragbar ist, dass MAPKAP-K2 an der Bildung von IL6-mRNA beteiligt ist. Eine aktuelle Studie zeigte, dass es sich bei MAPKAP-K2 um ein „immediate early“ Gen handelt, das nach der Translation durch das mRNA stabilisierende Protein HuR reguliert wird. Dies könnte den frühen und isolierten Anstieg im peripheren Blut erklären, der in dieser Studie beobachtet wurde (42). Es ist bereits bekannt, dass iNOS, IL6 und HSP27 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nach intensiver Ausdauerbelastung vermehrt reguliert sind (20; 21; 57). Es ist die Aufgabe von weiteren Studien zu zeigen, welche Rolle die vermehrte Regulation von MAPKAP-K2 mRNA, die in dieser Studie beobachtet wurde, in Bezug auf die Regulation der oben genannten Gene und möglicher Weise auf weitere Substrate im Bereich von Ausdauerbelastung spielt. Interessanter Weise ist die hsp27 mRNA (HSPB1) in der vorliegenden Studie um das 1,8-fache erhöht und ist auf der Liste der regulierten Gene vermerkt (siehe Tabelle 3).

Es wurde in dieser Studie hier zum ersten Mal eine vermehrte Regulation von Thioredoxin mRNA gezeigt, was aber nicht gänzlich unerwartet ist. Das TRX Protein ist ein 12-kDA schweres redoxwirksames Enzym, dessen aktives Zentrum zwei Thiol- und zwei Sulfidgruppen enthält und das als Antwort auf oxidativen Stress von verschiedenen menschlichen Zelltypen freigesetzt wird, ausgenommen neutrophile Granulozyten (34; 37). TRX verfügt über eine Vielzahl von biologischen Funktionen, einschließlich der Modulation von Transkriptionsfaktoren (6; 32). Das redox-aktive TRX unterstützt den Organismus bei der Entfernung von freien Radikalen, verhindert die Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe und schützt die Zellen gegen TNF-induzierte Zytotoxizität (16; 33). Erhöhte TRX Werte wurden bereits bei Personen, die unter oxidativem Stress leiden, gemessen (38; 60). Gleichermaßen, stehen intensive Ausdauerleistungen in enger Assoziation mit einer oxidativen Belastung für den Organismus (1; 41; 55). Aus diesem Grund ist eine erhöhte Expression und die Präsenz von redox-aktiven Enzymen, wie TRX, entscheidend für die Aufrechterhaltung des

zellulären Gleichgewichtes. TRX dürfte somit einen wichtigen Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress in Zellen des peripheren Blutes nach intensiver Ausdauerbelastung darstellen. Es bleibt zu erwähnen, dass entstehende ROS neben ihrer schädigenden Wirkung auch Signalfunktionen im Organismus übernehmen können. Die vorhandene Menge an ROS ist in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung. Der Grenzbereich der positiven Effekte der ROS zu den schädigenden Effekte der ROS im Organismus ist sehr klein. Es wurde bereits in diesem Zusammenhang gezeigt, dass kleine Mengen an ROS, die noch positive Effekte auf den Organismus haben, vom TRX Schutzsystem geduldet werden (26).

Ein weiteres Gen im Zusammenhang mit oxidativem Stress ist GSTM3. In der vorliegenden Studie kann zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Genexpression von GSTM3 nach intensiver Ausdauerbelastung vermindert reguliert ist. Die Glutathion-Transferasen bilden eine Gruppe von verschiedenen Isoenzymen, die an der Entgiftung von endogenen und exogenen Stoffen im Organismus beteiligt sind. Des Weiteren sind die GSTs auch an der Inaktivierung einer Vielzahl von Karzinogenen beteiligt. In Studien, die sich mit der Genexpression von GSTs im Menschen beschäftigt haben, wurde ein Zusammenhang bei Polymorphismen der Glutathion-Transferasen und einer Erhöhung des Lungenkrebsrisikos gezeigt (64). Das Vorhandensein von GST mRNA im peripheren Blut konnte bisher nur bei Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie beobachtet werden, deren erhöhte Regulation mit einer günstigeren Prognose korreliert war (36). Die Aufgabe von GSTM3 im Zusammenhang mit Sport-Immunologie bleibt bisher ungeklärt und bildet einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Studien.

IL1-ra ist ein weiteres Gen, das man dem Bereich der zellulären Schutzfunktion zuordnen kann. Die Hauptaufgabe von IL1-ra ist die Regulierung und Kontrolle der durch Interleukin-1beta hervorgerufenen Effekte über eine kompetitive Hemmung am Rezeptor. Überwiegt Interleukin-1beta, so kommt es zu Entzündungsreaktionen und Gewebsschäden. Es ist bekannt, dass dieses Anti-Inflammatorische Cytokin nach intensiver Ausdauerbelastung im Serum erhöht reguliert ist (59; 65; 73). In der vorliegenden Studie konnte demonstriert werden, dass eine erhöhte Regulation von IL1-ra mRNA im peripheren Blut im Gegensatz zu IL6 zu beobachten ist. Eine erhöhte

Expression von IL1-ra in PBMC nach Ausdauerbelastung konnte bereits gezeigt werden (12).

Die erhöhte Regulation von IL1-ra könnte eine wichtige Funktion in dem Gleichgewicht zwischen Pro- und Anti-Inflammatorischen Cytokinen im Immunsystem haben.

5.4 Genetischer Expressions-Fingerabdruck

Nach der Auswertung von Microarraydaten, die eine Vielzahl von Genen umfasst, können Gruppen von identisch regulierten Genen gebildet werden. Die Gruppeneinteilung erfolgt nach physiologischen oder biologischen Eigenschaften aller identisch exprimierten Gene und deren Zusammenhang im physiologischen Geschehen (45). Die Verteilung der identisch regulierten Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt, bzw. körperlichen Zustand, ergibt ein für diesen Moment spezifisches Muster. Dieses für den bestimmten Zeitpunkt typische Muster wird als „genetischer Expressions-Fingerabdruck“ bezeichnet. Mithilfe dieses Fingerabdrucks können z.B. bestimmte Krankheiten klassifiziert werden. Wie bereits erwähnt nimmt die Diagnostik mit Hilfe genetischer Expressions-Fingerabdrücke ständig zu. Sie wird unter anderem zur Klassifizierung verschiedener Tumortypen genutzt (13), zur Identifikation und Charakterisierung von Gliomen (66), zur Klassifizierung des Krankheitsstadiums bei malignem Pleuramesotheliom (48), zur molekularen Charakterisierung bei der Entwicklung, Diagnose und Behandlung von Brustkrebs (70), zur Bestimmung der molekularen Pathogenese der segmentalen Glomerulosklerose (69) und zum Auffinden einer möglichen Exposition mit toxischen Substanzen (43).

Auch in dieser Studie sollte die Erstellung eines genetischen Expressions-Fingerabdrucks bei einem Halbmarathonlauf versucht werden. Bei der Analyse der Daten wurden alle auf dem Microarray vorhandenen Gene bei allen acht Läufern nach ihrer identischen Veränderung der Genexpression zwischen den einzelnen Entnahmezeitpunkten eingeteilt. Im Vergleich t1 mit t0 konnten 36 identisch exprimierte Gene gefunden werden. 21 Gene waren beim Vergleich zwischen t2 und t0 bei allen acht Läufern identisch exprimiert. Diese gefundenen Muster für die jeweiligen Entnahmezeitpunkte könnten einen für diesen Zeitpunkt typischen genetischen Expressions-Fingerabdruck bei Halbmarathon darstellen.

Die identisch exprimierte Gene waren den folgenden Gruppen bezüglich ihrer physiologischen Funktion zugeordnet: Signaltransduktion, Membranproteine, Zellinteraktionen, Apoptose, anti-/oxidatives System, Immunsystem und anti-/inflammatorisches System. Unter den gefundenen Genen waren nur wenige signifikant exprimiert. Die signifikant regulierten Gene wurden oben detailliert behandelt. Nur sehr wenige Autoren haben bereits über die Anwendung von Microarrays und Clustering im Bereich der Sportmedizin und -physiologie publiziert. Im Gegensatz zu der hier beschriebenen Studie, die mit Vollblut durchgeführt wurde, untersuchten Conolly et al. monoklonale Zellen des peripheren Blutes von 15 gesunden Probanden vor, 30 min nach und 60 min nach Belastung (12). Für ihre Studie benutzen sie Affymetrix Microarrays. Die regulierten Gene wurden in drei Hauptgruppen unterteilt, Stressantwort, Entzündungsgeschehen und Reparationsmechanismen. Einige Gene wurden sowohl in ihrer als auch in dieser Studie hier identisch reguliert gefunden. Diese Gene waren: CD14, Chemokine-ligand 4, Colony-stimulating factor 3 receptor (CSF3R), HSPB1, IL-1 receptor type 2, IL-1 receptor antagonist und IL-2 receptor beta. Eine weitere Studie von Sonna et al. beschreibt ebenfalls die Untersuchung von RNA monoklonaler Zellen des peripheren Blutes von vier männlichen Marinesoldaten mit Symptomen einer Hitzebelastung verglichen mit gesunden Marinesoldaten (71). Auch hier zeigte sich HSPB1 im Vergleich mit dieser Studie hier als identisch exprimiert. Hilberg et al. untersuchten Vollblut mit Oligonukleotid Microarrays von 6 gesunden Probanden jeweils 2 und 6 Stunden nach Sport (29). Wie in der hier beschriebenen Studie waren CSF3R und CD14 identisch reguliert. Wie die Aufzählung zeigt, wurden nur vereinzelte Gene in allen Studien als identisch reguliert gefunden. Mehrere Faktoren tragen zu den teilweise unterschiedlichen Ergebnissen der in allen Studien gefundenen Gene bei. Dazu gehören: Verwendung unterschiedlichen Ausgangsmaterials (Vollblut vs. mononukleare Zellen), Verwendung unterschiedlicher Microarrays (Affymetrix vs. home-made Microarrays) und den unterschiedlichen Belastungen der Probanden sowie den unterschiedlichen Zeitpunkten der Probeentnahmen. Mit den hier gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass physische Belastung assoziiert ist mit einem bestimmten Muster der Genexpression. Ebenso könnten solche Muster auch für andere physiologische Zustände generiert werden. Daraus könnten sich

Anwendungen im Bereich der Trainingsüberwachung, zur Vermeidung von Übertraining, des chronischen Ermüdungs-Syndroms (chronic fatigue syndrom) (81) und evtl. der Dopingkontrolle ergeben.

5.5 Schlussfolgerung

Mit Hilfe der cDNA Microarray Technologie, wurde die Genexpression von acht Halbmarathonläufern im peripheren Blut untersucht. Eine Vielzahl von Genen konnte nach intensiver Ausdauerbelastung bestimmt werden. Zurzeit kann zu diesen Genen keine Aussage über korrespondierende Regulationen auf Proteinebene getroffen werden. Einige Veränderungen mancher Gene können im Zusammenhang mit der Zellverschiebung der verschiedenen Zell-Populationen im Blut stehen. Es ist uns gelungen, drei Gene von besonderem Interesse zu finden, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit intensiver Ausdauerbelastung beschrieben wurden. Diese drei Gene sind CD81, TRX und GSTM3. Mit Hilfe der Real Time PCR konnten die gewonnenen Microarray Ergebnisse gut und reproduzierbar bestätigt werden.

Zudem gelang es, einen genetischen Expressions-Fingerabdruck bei Halbmarathon zu generieren. Die Ergebnisse könnten auch hierbei einen ersten Schritt darstellen, eine neue diagnostische Methode zu entwickeln. Der Expressions-Fingerabdruck könnte in Zukunft hilfreich zur Charakterisierung von Geweben und Krankheiten sein, könnte wichtige Hinweise liefern für therapeutische Ansätze sowie im Sport als diagnostisches Hilfsmittel zur Vermeidung von Übertraining eingesetzt werden.

Mit der Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Microarray Technologie eine geeignete Methode der Zukunft für den Einsatz im Bereich Sport darstellt.

Die Daten und Ergebnisse dieser Studie wurden im November 2005 in *Physiology Genomics*, (23(3):287-94) unter dem Titel "cDNA microarray analysis reveals novel candidate genes expressed in human peripheral blood following exhaustive exercise" (84) sowie im *Exercise Immunology Review* 2005 (11:86-96) unter dem Titel "CDNA-microarray analysis as a research tool for expression profiling in human peripheral blood following exercise" veröffentlicht (85).

Zusammenfassung

Stress kann in verschiedenen Varianten auftreten, und sich sehr unterschiedlich auf den Organismus auswirken. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde ein freiwillig auferlegter physischer Stress in Form von Hochleistungssport untersucht.

Bei hohen Trainings- oder Wettkampfbelastungen werden Stressantworten im Immunsystem des Sportlers mobilisiert, die dann sekundäre Auswirkungen auf somatische Parameter zeigen.

Diese Auswirkungen können zu Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung im peripheren Blut führen. Des Weiteren kann man eine Veränderung auf Genexpressionsebene beobachten.

Im Rahmen der Dissertationsarbeit wurden home-made cDNA Microarrays hergestellt und etabliert. Die Herstellung und Etablierung sind im Abschnitt Methode dieser Arbeit ausführlich beschrieben.

In dieser Studie wurde mit home-made cDNA Microarrays die Genexpression bei acht Halbmarathonläufern untersucht. Der eingesetzte cDNA Microarray enthielt ausgewählte Gene des Stress- und Entzündungsgeschehen. Das Besondere dieses Ansatzes ist, dass nicht nur ein einzelnes oder wenige Kandidatengene sondern eine größere Gruppe potentiell relevanter Gene auf mRNA- Ebene analysiert wurde.

Die Abnahmezeitpunkte der Blutproben der Läufer waren, vor (t_0), unmittelbar nach (t_1) und 24 Stunden nach (t_2) einem Halbmarathonlauf. Die hier gefundenen signifikant exprimierten Gene wurden mittels Real Time PCR bestätigt.

Lineare Regressions-Auswertungen zeigten, dass Microarray-Expressionsanalysen von zelltypischen Oberflächen-Molekülen die beobachtete Zellveränderung im peripheren Blut mit hoher Signifikanz widerspiegeln. In Übereinstimmung mit Ergebnissen vorheriger Studien konnte eine erhöhte Regulation von MAPKAP-K2, L-Selectin und IL1-ra nach Hochleistungssport nachgewiesen werden. Die Hauptergebnisse dieser Studie zeigen zum ersten Mal die verringerte Expression von CD81, die erhöhte Expression von Thioredoxin, welches wohlmöglich eine wichtige Rolle in der antioxidativen Abwehr spielt, und erstaunlicherweise die verminderte Expression des Antikarzinogenen-Gens GSTM3 im peripheren Blut.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war die Erstellung eines genetischen Expressions-Fingerabdrucks bei einem Halbmarathonlauf. Die Verteilung der identisch regulierten

Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt, bzw. körperlichen Zustand, ergibt ein für diesen Moment spezifisches Muster. Dieses für den bestimmten Zeitpunkt typische Muster wird als „genetischer Expressions-Fingerabdruck“ bezeichnet. Bei der Analyse der Daten wurden alle auf dem Microarray vorhandenen Gene bei allen acht Läufern nach ihrer identischen Veränderung der Genexpression zwischen den einzelnen Entnahmezeitpunkten eingeteilt. Im Vergleich t1 mit t0 konnten 36 identisch exprimierte Gene gefunden werden. 21 Gene waren beim Vergleich zwischen t2 und t0 bei allen acht Läufern identisch exprimiert. Diese gefundenen Muster für die jeweiligen Entnahmezeitpunkte könnten einen für diesen Zeitpunkt typischen genetischen Expressions-Fingerabdruck bei Halbmarathon darstellen. Die identisch regulierten Gene waren den folgenden Gruppen bezüglich ihrer physiologischen Funktion zugeordnet: Signaltransduktion, Membranproteine, Zellinteraktionen, Apoptose, anti-/ oxidatives System, Immunsystem und anti-/ inflammatorisches System.

Die Studie zeigt, dass Untersuchungen der Expressions-Fingerabdrücke und der Genexpression mit cDNA Microarrays eine verlässliche und präzise Methode ist, um die Liste der Kandidatengene, deren Regulation im Zusammenhang mit Hochleistungssport nachgewiesen werden kann, zu vervollständigen. Dies wird helfen, die Vorgänge bei Stress, Stressbewältigung, Adaption und Übertraining besser zu verstehen. Fernziel ist die Erstellung eines optimalen Werkzeuges für Trainingssteuerung und Stressdiagnostik im Allgemeinen.

Protokolle

Protokoll 1

RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi

1. 5 ml Vollblut in Zitratröhrchen abgenommen.
2. 5 ml Vollblut mit 45 ml Erythrozytenlysepuffer mischen.
 - Erythrozytenlysepuffer :
 - 8.29g Ammoniumchlorid
 - 1.00g Kaliumhydrogencarbonat
 - 0.0368g Komplexon III
 - auf 1000 ml mit RNAse/DNAse freiem Wasser auffüllen
 - steril filtrieren und anschließend autoklavieren
3. 15 min auf Eis inkubieren (ab und zu leicht durchschütteln).
4. 10 min bei 4°C und 160 x g zentrifugieren.
5. Überstand abgießen und Pellet mit 5 ml PBS waschen.
6. 10 min bei 4°C und 160 x g zentrifugieren.
7. Überstand abgießen.
8. Pellet mit 500µl PBS resuspendieren und in ein 2 ml Tube überführen.
9. Zu der Probe 990µl GTC-Puffer und 10 µl Mercaptoethanol geben.
 - GTC-Puffer :
 - 42.20g Guanidinoisothiocyanat (4M) - Endkonzentration
 - 0.50g Natrium-Lauroylsarcosin (0.5%) - Endkonzentration
 - 0.735g Natrium-Zitrat (0.25M) - Endkonzentration

- auf 100 ml mit RNase/DNase freiem Wasser auffüllen
 - mit HCL 5N oder NaOH 1M auf pH 7 einstellen
 - steril filtrieren und anschließend autoklavieren
10. 200µl Chloroform zur der Probe geben.
 11. Gründlich vortexen.
 12. 15 min bei 4°C und 17500 x g zentrifugieren.
 13. Überstand vorsichtig abgießen.
 14. 200µl Isopropanol zur Probe zugeben.
 15. Über Nacht bei -20°C die Probe präzipitieren.
 16. 40 min bei 4°C und 17500 x g zentrifugieren.
 17. Überstand vorsichtig abgießen.
 18. 200µl 70% Ethanol zugeben.
 19. 15 min bei 4°C und 17500 x g zentrifugieren.
 20. Überstand vorsichtig abgießen.
 21. Probe für 15 min in der Speed-Vac trocknen.
 22. Probe in 20µl RNase/DNase freiem Wasser aufnehmen.

Die Probe sofort auf Eis und Kontrolle der Qualität-und Quantität. Nach der Kontrolle die reverse Transkriptase Reaktion anschließen oder die RNA einfrieren bei -70°C mit Natriumacetat und Ethanol.

Protokoll 2

RNA-Isolation mit PAXgene™ Blood RNA Kit

1. Blutabnahme von 5 ml Vollblut in zwei PAXgene™ Blood RNA Tubes (Qiagen), gut mischen und Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur (RT).
2. 10 min. bei RT und 2800 x g zentrifugieren.
3. Abgießen des Überstands. Zugabe von 5 ml RNase/DNase freiem Wasser. Neuer Deckel.
4. Pellet durch Vortexen auflösen und erneut bei RT für 10 min. bei 2800 x g zentrifugieren. Anschließend den Überstand abgießen.
5. Jedes Pellet in 360 µl Buffer BR1 durch Vortexen lösen.
(Falls sich das Pellet nicht komplett auflöst, mit Pipettenspitze vorsichtig ablösen).
6. Zugabe von:

Buffer BR 2	300µl
Proteinase K	40µl

Vorher nicht mischen !

Vortexen.

Bei 55°C 10 min. inkubieren. Nach 5 min. Proben 1x vortexen.
7. 2x 3 min. bei maximaler Geschwindigkeit (17500 x g) und RT zentrifugieren. Überstand in neues Tube überführen.
8. Zugabe zum Überstand: 350 µl Ethanol (100%). Vortexen.

9. 700 µl der Probe werden auf das rosa PAXgene Säulchen (im processing tube) gegeben. Anschließend wird 1 min bei RT mit 9000 x g zentrifugiert. Filter-Säulchen wird auf neues processing tube gesteckt.
10. Die restliche Probe wird ebenfalls auf das Säulchen gegeben. Zentrifugieren 1 min. bei RT mit 9000 x g. Verwerfen des Eluats.

DNase Verdau

11. Zugabe von 350 µl Buffer BR3 auf das Säulchen. Zentrifugieren 1 min. bei RT mit 9000 x g. Verwerfen des Eluats.
12. Für jede Probe Herstellung folgendes Mixes

DNase I Solution	10µl
Buffer RDD	70µl

(Umgang mit der DNase: aufgetaute DNase nicht mehr einfrieren, sondern bei 4°C im Kühlschrank lagern. 6 Wochen haltbar.)

13. Den Mix direkt auf die Säulchen-Membran pipetieren und 15 min bei RT inkubieren.
14. Zugabe von 350 µl Buffer BR3 auf das Säulchen und 1 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren. Anschließend das Säulchen auf ein neues Processing tube setzen.

DNase Verdau beendet

15. Zugabe von 500 µl BR4 auf das Säulchen. 1 min zentrifugieren bei RT bei 9000 x g. Säulchen auf neues porcessing tube setzen.

16. Erneute Zugabe von 500 µl BR4 und zentrifugieren 3 min. bei RT mit 17500 x g. Verwerfen des Eluats und erneut zentrifugieren 1 min. bei RT mit 17500 x g, um die Membran zu trocknen.

17. Säulchen auf ein Elution tube setzen.

In zwei aufeinander folgenden Schritten je 40 µl Buffer BR5 direkt auf die Säulchen Membran pipettieren. Zentrifugieren 1 min bei RT bei 9000 x g.

18. Das Eluat 5 min bei 65°C inkubieren.

19. Die Probe sofort auf Eis und Kontrolle der Qualität-und Quantität. Nach der Kontrolle die reverse Transkriptase Reaktion anschließen oder die RNA einfrieren bei -70°C mit Natriumacetat und Ethanol.

Protokoll 3

Reverse Transkription mit in-vitro Transkription (Message Amp cRNA Amplification Kit (Ambion)), reverse Transkription und Markierung

Reverse Transkription mit in-vitro Transkription (Message Amp cRNA Amplification Kit (Ambion))

A. First Strand cDNA Synthese

Teil a)

1. Bis zu 5µg Gesamt RNA werden in ein RNase freies Tube gegeben.
2. Zugabe von 1µl T7 Oligo dT-Primer
3. Mit Nuklease freiem Wasser auf 12µl auffüllen
4. 10 min. bei 70°C im Thermocycler inkubieren.
Anschließend Probe auf Eis stellen.

Teil b)

Herstellung eines Reverse-Transkription-Mastermixes für alle Proben mit 5% Überschuss

für eine Probe:

10x First Strand Buffer	2µl
Ribonuklease Inhibitor	1µl
dNTP Mix	4µl
Reverse Transkriptase	1µl
Total	8µl

Gut mischen.

5 sec. zentrifugieren und die Probe auf Eis stellen.

Teil c)

1. Zu jeder Probe aus Schritt a) 4. werden 8µl Reverse-Transkriptions-Mastermix gegeben.

Gut mischen

2. 2 Stunden bei 42°C inkubieren

Anschließend auf Eis und sofort weiterverarbeiten.

B. Second Strand (Zweitstrang) cDNA Synthese

Teil a)

Herstellung eines Mastermixes für die Zweitstrang cDNA-Synthese für alle Proben mit 5% Überschuss

für eine Probe:

Nuklease freies Wasser	63µl
10x Second Strand Buffer	10µl
dNTP Mix	4µl
DNA Polymerase	2µl
RNase	1µl
Total	80µl

Gut mischen.

5 sec. Zentrifugieren.

Teil b)

1. Zugabe von 80µl Mastermix zu jeder Probe
2. 2 Stunden bei 16°C inkubieren
3. Proben können bei -20°C gelagert werden.

C. cDNA Aufreinigung

Teil a)

Erwärmen von 5ml nuklease-freiem Wasser auf 50°C für mindestens 10 min.

Teil b)

Vorbereiten der Filteraufsätze

1. Sichergehen, dass pro Probe ein Filter in einem 2ml Wash-Tube sitzt
2. 50µl cDNA Binding Buffer auf die Membran geben
3. Filter für 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren

Teil c)

Zu jeder cDNA-Probe von Schritt B.b) werden 250µl cDNA Binding Buffer pipettiert.
Gut mischen.

Teil d)

1. Probe-Gemisch auf die Filter-Membran geben
2. 1 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren
3. Durchlauf verwerfen

Filter auf neues Tube setzen.

Teil e)

Sicherstellen, dass vor Erstgebrauch Ethanol zum cDNA Wash-Buffer gegeben wurde.

1. 500µl cDNA Wash-Buffer auf jeden Filter geben

2. 1 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren
3. Eluat verwerfen
Erneut 1 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren
4. cDNA Filter in ein cDNA Elution Tube stellen

Teil f)

1. 10µl nuklease-freies Wasser (bereits mindestens 10 min. bei 50°C vorerwärmt) direkt auf die Filtermembran geben.
2. 2 min. bei Raumtemperatur inkubieren
Anschließend 1,5 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren
3. Schritt 1 + 2 wiederholen
Im Elutions Tube befindet sich die cDNA in ca. 16 µl nuklease-freiem Wasser
4. Filter verwerfen

Teil h)

Volumen jeder einzelnen Probe überprüfen

- Falls das Volumen 16 – 18µl beträgt: die Probe auf Eis stellen oder bei -20°C einfrieren
- Falls das Volumen unter 16µl beträgt: die Probe mit nuklease-freiem Wasser auf 16µl auffüllen, anschließend auf Eis stellen oder bei -20°C einfrieren

Die Proben können an dieser Stelle bei -20°C gelagert werden.

D. In vitro Transkription (cRNA Synthese)

Teil a)

Herstellung eines Transkriptions-Reaktions-Mixes für alle Proben mit 5% Überschuss

Für eine Probe:

ATP Soln 75mM	4µl
CTP Soln 75mM	4µl
GTP Soln 75mM	4µl
UTP Soln 75mM	4µl
10x Reaction Buffer	4µl

Enzyme Mix	4µl
Total	24µl

Pro Tube:

Reaktions-Mix	24µl
Probe aus Schritt E Teil h)	16µl
Total	40µl

Gut mischen.

5 sec. zentrifugieren.

Teil b)

Die Reaktion mindestens 6 Stunden höchstens 14 Stunden bei 37°C inkubieren.

Beachten: Im Luft-Inkubator arbeiten um Kondensation im Tube zu vermeiden.

Teil c)

1. 2µl Dnase I zu jeder Probe geben
Mindestens 5x mit Pipette mischen
2. 5 sec. zentrifugieren
3. 30 min. bei 37°C inkubieren
4. Proben können anschließend bei -20°C gelagert werden

E. cRNA-Aufreinigung

1. Zugabe von 60µl Elution Solution zu jeder Probe geben, um ein Endvolumen von 100µl zu erhalten
2. Gut mischen

Teil a)

Nuklease-freies Wasser mindestens 10 min auf 50°C vorheizen.

Teil b)

Zugabe von 350µl cRNA Binding Buffer zu jeder Probe.

Gut mischen.

Teil c)

Zugabe von 250µl 100% Ethanol zu jeder Probe.

Gut mischen.

Sofort mit dem nächsten Schritt fortfahren.

Teil d)

1. je 1 cRNA Filter auf 1 cRNA collection Tube setzen
Probe aus Schritt c) auf den Filter pipetieren
2. 1 min. bei 9000 x g zentrifugieren
3. Eluat verwerfen
4. Tube erneut 1 min. bei 9000 x g trocken zentrifugieren
5. Filter auf neues Collection Tube setzen

Teil e)

Sicherstellen, dass vor Gebrauch Ethanol zum cRNA Wash-Buffer zugegeben wurde.

1. Zugabe von 650 µl cRNA Wash-Buffer auf jeden cRNA Filter.
2. 1min. bei 9000 x g zentrifugieren
3. Eluat verwerfen
4. 1 min. bei 9000 x g bei RT trocken zentrifugieren
5. Filter in neues Tube setzen

Teil f)

1. 50µl nuklease-freies Wasser (mindestens 10 min. bei 50°C vorgewärmt) direkt auf die Filtermembran geben
2. Die Probe 2 min. bei Raumtemperatur inkubieren
1,5 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren
3. Schritt 1 + 2 wiederholen
Die cRNA befindet sich jetzt im Eluat in 100 µl nuklease-freiem Wasser.
4. Filter verwerfen.

Teil g)

cRNA Lagerung.

Bei -70°C lagern und häufiges Auftauen und Einfrieren vermeiden.

Reverse Transkription

1. 3 μg der in-vitro transkribierten cRNA in der Speed-Vac trocknen.
2. Pellet in 9,5 μl RNase/DNase freiem Wasser aufnehmen. Gut mischen.
3. 9 μl Random-Hexamer-Primer (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dazugeben und mischen.
4. 10 min bei 70°C inkubieren.
5. 2 min auf Eis.
6. Reaktionsansatz für 4 Proben:

5x First Strand buffer	25,0 μl
0, 1 M DTT	12,5 μl
50x aminoallyl-dNTP-Mix	2,5 μl
Super Script II	8,3 μl
<i>(kurz vorher erst dazu)</i>	

Aus dem Reaktionsansatz zu
jeder Probe aus 3. 11,6 μl

7. 2 Stunden bei 42°C inkubieren.
8. Entweder weiter im Protokoll oder bei -20°C lagern.

Aminoallyl dUTP 100mM

1mg aa-dUTP in 19,1 μl 0.1M KPO₄ lösen. Vortexen und bei -20°C lagern.

50x aminoallyl-dNTP-Mix

dATP (100mM)	5 μl
dCTP (100mM)	5 μl
dGTP (100mM)	5 μl

dTTP (100mM)		3µl
aa-dUTP (100mM)		2µl
	Total	20µl

Lagerung bei – 20°C

Markierung

9. Zu jeder der 30 µl Proben

NaOH	1M	10µl
EDTA	0,5M pH 8	10µl

Gut mischen.

10. 15 min. bei 65°C in den Heizblock.

11. Zu jeder Probe

HCl	1M	10µl
Buffer PB		300µl

Gut mischen.

12. Alles auf Reinigungs-Säulchen geben.

13. 1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.

Filtrat verwerfen.

14. 750 µl Phosphatwaschpuffer aufs Säulchen geben.

1 min. zentrifugieren bei RT mit 15000 x g.

Filtrat verwerfen.

15. Erneut 750 µl Phosphatwaschpuffer aufs Säulchen geben.

1 min. zentrifugieren bei RT mit 15000 x g.

Filtrat verwerfen.

16. Nochmals die Probe ohne Lösungen 1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.

17. Säulchen in ein neues Tube setzen.
18. Direkt auf die Säulchenmembran 30 µl Phosphat Elutionspuffer (4 mM KPO₄) geben.
19. Bei RT 5 min. inkubieren.
20. 1 min. zentrifugieren bei RT mit 15000 x g.
21. Die eluierten Proben in der Speed-Vac 30 min. trocknen lassen.

10 min. vor Speed-Vac-Ende die Farbstoffe Cy 3 und Cy 5 aus dem -80°C Kühlschrank holen und im Dunkeln 10 min. auftauen lassen.
22. Die Proben aus der Speed-Vac holen und in je 4,5 µl 100mM Na₂CO₃, pH 9 aufnehmen. Gut mischen.
23. Cy 3 und Cy 5 in je 4,5 µl (H₂O-freiem) DMSO aufnehmen und zur jeweiligen Probe geben. Gut mischen.
24. 2 Std. bei RT im Dunkeln inkubieren.
25. Zu jeder Probe zugeben:

NaAc	100mM	35µl
	pH 5,2	
buffer PB		250µl

Gut mischen
26. Auf Säulchen geben.
27. 1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.
Filtrat verwerfen.

28. 750 µl buffer PE aufs Säulchen geben.
1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.
Filtrat verwerfen.
29. 400 µl buffer PE aufs Säulchen geben.
1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.
Filtrat verwerfen.
30. Nochmals die Probe ohne Lösungen 1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.
31. Säulchen auf ein neues Tube setzen.
32. 30 µl buffer EB-Buffer aufs Säulchen geben.
5 Min. bei RT inkubieren.
1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.
33. 30 µl buffer EB aufs Säulchen geben.
5 Min. bei RT inkubieren.
1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.
34. Messen am Photometer bei 260, 550 und 650 nm.
35. Proben in Speed-Vac 2 – 3 Stunden trocknen.

Protokoll 4

Herstellung Wash A, B und C

Wash A

20x SSC	50ml
10% SDS	10ml
H ₂ O	440ml
Total	500ml

Wash B

20x SSC	50ml
H ₂ O	450ml
Total	500ml

Wash C

20x SSC	5ml
H ₂ O	495ml
Total	500ml

Liste der Gene auf dem Microarray

Gen-ID	Genprodukte
AI625116	3-Phosphoglycerate dehydrogenase
H18371	4-aminobutyrate aminotransferase
R02455	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A
R08445	Adrenergic beta 2 receptor surface
H15250	adrenergic beta recetor kinase 2
AI827546	Amyloid beta precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)
BX099240	Annexin A3
AA401645	Arachidonate 5-lipoxygenase
R08446	Beta 2 receptor
R37590	Calmodulin dependend protein kinase 2 alpha
AI890021	Calnexin
BX101374	CAMK2G
N42544	Caspase 8
H00587	Casein kinase1, gamma 3
T95149	Caspase 1
T96912	Caspase 10
AA481283	Caspase 2
AA001875	Caspase 3
T47302	Caspase 4
W60703	Caspase 5
W45688	Caspase 6
N45588	Caspase 7
T97630	Caspase 9
T76941	Cationic amino acid transporter Y+system member 11
R15360	CD 14
W01042	CD 163
H60010	CD 164
AI217645	CD 19
AI581337	CD 1A
BX094495	CD 1B
BX116983	CD 1C
AI131504	CD 2
AI363168	CD 244
AI309276	CD 33
BX115969	CD 36
H25061	CD 3E
T90300	CD 3G
AI125073	CD 3Z
AI493245	CD 44
BX089501	CD 58
T82464	CD 59
BX107300	CD 68

BX106067	CD 69
T70375	CD 74
R72128	CD 79B
W07753	CD 8
AA983817	CD 80
H30366	CD 81
AA443748	CD 83
H48796	CD 84
R27966	CDP-diaglycerol synthase 1
AA126322	Chemokine ligand 10
W17274	Chemokine ligand 21
W79160	Chemokine ligand 3
N57175	Chemokine ligand 4
BC028078	Chemokine receptor 1
AA479357	Chemokine receptor 4
AI417775	Chemokine receptor 5
AI808029	Chemokine receptor 6
BX110824	Chemokine receptor 9
R17689	Choline kinase
H65052	Coagulation factor II (thrombin)
AA995402	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
H04648	Colony stimulating factor 2 receptor, beta, low affinity (granulocyte-macrophage)
R02281	Colony stimulation factor 1 (macrophage)
R31999	Colony stimulation factor 3 receptor (granulocyte)
R28219	CPD-diaglycerol synthase 1
BX108502	Creatine kinase mitochondrial 1
AF119711	Cystinyl leukotriene receptor 1
AI791352	D-amino-acid oxidase
AI792161	D-aspartate oxidase
AA026189	Diaglycerol kinase alpha
BX102108	DNA cytosine-5-methyltransferase 1
W60555	Endothelial differentiation G-protein-receptor 4
AA147537	Endothelial differentiation lysophosphatidic acid G-protein coupled receptor 2
W21494	Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1
BX119598	Endothelial differentiation, G-protein-coupled receptor 6
R07399	Endothelin 1
AI140863	Endothelin 2
R55533	Endothelin 3
BX109539	Endothelin receptor type A
H28710	Endothelin receptor type B
AI620493	Erythropoietin
AI912442	Erythropoietin receptor
R14669	Fibroblast growth factor 1

R70281	Fibroblast growth factor 2
H53584	FK506 binding protein 5
N48860	GABRA2
BI824607	Glial high affinity glutamate transporter member 2
R35481	Glial high affinity glutamate transporter member 3
H75385	Glutamat receptor 4
AI939470	Glutamat receptor ionotropic AMPA2
R32945	Glutamat receptor ionotropic kainate 1
R44770	Glutamat receptor metabotropic 2
AA583221	Glutamat receptor metabotropic 4
BX100407	Glutamat receptor metabotropic 7
H23378	Glutamate receptor ionotropic AMPA 1
AI 219670	Glutamate receptor ionotropic delta 2
H15472	glutamate receptor ionotropic kainate 2
BI544689	Glutamate receptor ionotropic kainate 3
R60315	Glutamate receptor ionotropic, kainate 5
BX109400	Glutamate receptor, ionotrophic, AMPA3
H92366	Glutathion peroxidase 3
H44827	Glutathion peroxidase 4
R40853	Glutathion synthetase
N58247	Glutathione peroxidase 1
R63065	Glutathione S-transferase M3
AA416781	Glutathione S-transferase pi
R00993	Glycin-N-acyltransferase
T87010	G-protein coupled receptor 65
AI587350	G-Protein coupled receptor CKR-L2
AA579697	Granulocyte colony stimulation factor
AA456241	Heme oxygenase 1
H23171	High affinity aspartate/ glutamate transporter, member 6
H11697	HLA-B
H80088	HLA-DRA
AA629034	HSPA8
R33648	HSPB 1
N51133	HSPD1
AI832179	Hydroxyprostaglandine dehydrogenase 15
H12569	Hypothetical protein MGC16121
N92072	ICAM 1
R21644	ICAM 2
BX104157	ICAM 3
R87840	ICAM 5
AI769523	IFN gamma
R34333	IFN gamma receptor 1
H70425	IFNAR1
H11838	IFNGR1
H78484	IL 1 R2
W03241	IL 1 receptor 1

AA497054	IL 1 receptor antagonist
R83860	IL 1 receptor associated kinase 1
H53227	IL 10 rezeptor
W47426	IL 11
BX100275	IL 12 RB2
BC029121	IL 12 receptor beta1
AI208823	IL 13
R52796	IL 13 receptor alpha 2
BX116580	IL 15
H57532	IL 16
BX093651	IL 18 (interferon gamma inducing factor)
AA482489	Il 18 R1
AA922389	IL 1A
W47225	IL 1B
R62939	IL 2 receptor beta
AI807898	IL 21 rezeptor
BC009681	IL 24
BX112502	IL 3 receptor alpha
BX099369	IL 4 receptor
AI381503	IL 5 receptor alpha
W31016	IL 6
AA411559	IL 6 receptor
AI278395	IL 6 signal transducer
BF001579	IL 8 receptor alpha
H78484	IL1 receptor type 2
BX102575	INF gamma
BX089562	Inositol hexa phosphate kinase 3
AI273559	Insulin-like growth factor 1
H79027	Insulin-like growth factor 2
AA461266	Integrin alpha 10
H16112	Integrin alpha 11
BX118387	Integrin alpha 2
AI610203	Integrin alpha 3
BX091768	Integrin alpha 4
R06523	Integrin alpha 5
H16046	Integrin alpha 6
N50605	Integrin alpha 7
AI092330	Integrin alpha 9
R05815	Integrin alpha E
AA925878	Integrin alpha L
Ai307732	Integrin alpha M
N64384	Integrin alpha x
AI825940	Integrin beta 1
W68403	Integrin beta 2
R48163	Integrin beta 4
H74205	Integrin beta 5

BX114422	Integrin beta 7
AA569711	Integrin beta 8
BX100858	jun B proto-oncogene
H42105	Leptin
W06971	Leptin receptor
R50018	Leukemia inhibitory factor
R38159	Leukemia inhibitory factor receptor
R15731	Lipopolysaccharide binding protein
W74395	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member1)
AI537595	Lymphotoxin beta
BX089209	Macrophage scavenger receptor 1
BX114709	MAP2K4
R40676	MAP3K5
AI689229	MAPK10
W76332	MAPK14
BX116807	MAPK8
R71819	MAPKAP K2
AA122237	Microsomal glutathion S transferase 2
AI277275	Microsomal glutathione S-transferase 3
W02452	MKK3
R40514	Nerve growth factor receptor
AA450336	Neurexin 3
AA423955	Neuropeptide Y-receptor Y1
BX113942	Neurotransmitter transporter dopamine member 3
W90214	Neutral amino acid transporter member 5
BX115063	NOS 1
AI493548	NOS 2A
H15032	NOS 3
AA701502	PDGFA
R40559	PDGFB
H79419	PDGFRA
R45650	PDGFRB
W17301	Peroxiredoxin 4 (ap)
H20248	Peroxiredoxin 5
BX118512	Peroxisome proliferative activated receptor alpha
BX111682	Phosphate cytidylyltransferase, choline, beta isoform
AA424760	Phosphoglycerate kinase 1
W03943	Phospholipase A2, group XIIB
BX103148	Phospholipase C delta 1
AA041245	Phospholipase C epsilon 1
BX105088	Phospholipase C gamma 2
AA424760	Phosphoglycerate kinase 1
AI024617	Platelet derived growth factor 10
R22459	Platelet/endothelia cell adhesion molecule (CD 31)
BX115959	prokineticin 2
BX102242	Prostaglandin E receptor 2

BX109537	Prostaglandin I2 synthase
AA454668	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1
AI123006	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
AA461272	Protein arginine N-methyltransferase 7
BX107014	Protein C
H79363	Protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha isoform
T87071	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B--, alpha
R39428	Protein tyrosine phosphatase receptor type G
R33323	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21
AI610837	Protooncogen protein
T39278	PTAFR
AA831306	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1
AA404273	Retinoic acid receptor alpha
H72224	S 12
H39991	Selectin E
H00756	Selectin L
T70809	Selectin P
BX118929	Sex determining region Y - box 2
BX106428	Sialyltransferase 8D
T95741	Signal transducer and activator of transcription 6, IL 4 ind.
H85744	Sphingomyelin phosphodiesterase 1
W32352	Sphingomyelin phosphodiesterase 2
BX092054	Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2
H19077	Sphingosine kinase 2
R45235	Stromal cell derived factor 20
AA426577	Stromal cell derived factor receptor 1
W25024	Superoxide dismutase 1
BX098594	Superoxide dismutase 3
AI924869	Syntaxin 4A
H19474	Synuclein beta
BX118929	SYR (sex-determining regionY) - box 2
H73417	T-Cell activation protein phosphatase 2C
R83156	Thioredoxin
N32554	Thioredoxin 2
BX101312	Thioredoxin interacting protein
H15481	Thioredoxin reductase 1
R45108	Thioredoxin reductase 2
BX112338	Thrombomodulin
AA479058	Thrombopoietin
R76436	Thromboxane A synthase 1
R82831	Thromboxane A2 receptor
BX118951	TNF alpha
AI492518	TPTE
H20229	Transforming growth factor alpha
R36466	Transforming growth factor beta 1
W44691	Vascular endothelial growth factor

BX092558
R79352

Vasoactive intestinal peptide
Zink transporter

Literaturverzeichnis

1. **Alessio HM.** Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25: 218-224, 1993.
2. **Andrew PJ and Mayer B.** Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 521-531, 1999.
3. **Askew EW.** Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology* 180: 107-119, 2002.
4. **Berg A, Northoff H and Keul J.** [Immunology and sports]. *Internist (Berl)* 33: 169-178, 1992.
5. **Bernstein D.** Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. *Physiol Genomics* 13: 217-226, 2003.
6. **Bjornstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B and Holmgren A.** The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 269: 29382-29384, 1994.
7. **Bolstadt B.M., R.A.Irizzary, M.Åstrand and T.P.Speed.** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19: 185-193, 2003.
8. **Bonferroni C.E.** Teoria statistica delle classi e calcolo della probabilita. *Pubblicazioni del Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze* 8: 3-62, 1936.
9. **Chance B, Sies H and Boveris A.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605, 1979.
10. **Chomczynski P and Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
11. **Cleveland W.S.** Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *Journal of the American Statistical Association* 74: 829-839, 1979.

12. **Connolly PH, Caiozzo VJ, Zaldivar F, Nemet D, Larson J, Hung SP, Heck JD, Hatfield GW and Cooper DM.** Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* 97: 1461-1469, 2004.
13. **Covell DG, Wallqvist A, Rabow AA and Thanki N.** Molecular classification of cancer: unsupervised self-organizing map analysis of gene expression microarray data. *Mol Cancer Ther* 2: 317-332, 2003.
14. **Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA and Packer L.** Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1198-1205, 1982.
15. **Deng J, Dekruyff RH, Freeman GJ, Umetsu DT and Levy S.** Critical role of CD81 in cognate T-B cell interactions leading to Th2 responses. *Int Immunol* 14: 513-523, 2002.
16. **Djavaheri-Mergny M, Javelaud D, Wietzerbin J and Besancon F.** NF-kappaB activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNFalpha-treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Lett* 578: 111-115, 2004.
17. **Droge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002.
18. **Dudoit S., Y.H.Yang, M.J.Callow and T.P.Speed.** Statistical methods for identifying genes with differential expression in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* 12: 111-139, 2002.
19. **Evans P and Halliwell B.** Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 85 Suppl 2:S67-74.: S67-S74, 2001.
20. **Fehrenbach E and Niess AM.** Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exerc Immunol Rev* 5:57-77.: 57-77, 1999.
21. **Fehrenbach E, Niess AM, Schlotz E, Passek F, Dickhuth HH and Northoff H.** Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. *J Appl Physiol* 89: 704-710, 2000.
22. **Fehrenbach E and Northoff H.** Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev* 7:66-89.: 66-89, 2001.

23. **Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG and Packer L.** Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* 22: 1115-1126, 1997.
24. **Gabriel H and Kindermann W.** The acute immune response to exercise: what does it mean? *Int J Sports Med* 18 Suppl 1:S28-45.: S28-S45, 1997.
25. **Ge Y., S.Dudoit and T.P.Speed.** Resampling-based Multiple Testing for Microarray Data Analysis. *Sociedad Española de Estadística e Investigación Operativa Test* 12 No.1: 1-77, 2003.
26. **Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM and Dimmeler S.** Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett* 19;577: 427-433, 2004.
27. **Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjodin B and Richter EA.** Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *J Physiol* 498: 239-248, 1997.
28. **Henn W.** Genetic screening with the DNA chip: a new Pandora's box? *J Med Ethics* 25: 200-203, 1999.
29. **Hilberg T, Deigner HP, Moller E, Claus RA, Ruryk A, Glaser D, Landre J, Brunkhorst FM, Reinhart K, Gabriel HH and Russwurm S.** Transcription in response to physical stress--clues to the molecular mechanisms of exercise-induced asthma. *FASEB J* 19: 1492-1494, 2005.
30. **Hoffman-Goetz L and Pedersen BK.** Exercise and the immune system: a model of the stress response? *Immunol Today* 15: 382-387, 1994.
31. **Hoffman-Goetz L and Quadrilatero J.** Treadmill exercise in mice increases intestinal lymphocyte loss via apoptosis. *Acta Physiol Scand* 179: 289-297, 2003.
32. **Holmgren A and Bjornstedt M.** Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252:199-208.: 199-208, 1995.
33. **Hoshino T, Nakamura H, Okamoto M, Kato S, Araya S, Nomiya K, Oizumi K, Young HA, Aizawa H and Yodoi J.** Redox-active protein thioredoxin prevents proinflammatory cytokine- or bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1075-1083, 2003.

34. **Jikimoto T, Nishikubo Y, Koshiha M, Kanagawa S, Morinobu S, Morinobu A, Saura R, Mizuno K, Kondo S, Toyokuni S, Nakamura H, Yodoi J and Kumagai S.** Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Immunol* 38: 765-772, 2002.
35. **Jordan J, Beneke R, Hutler M, Veith A, Haller H and Luft FC.** Moderate exercise leads to decreased expression of beta1 and beta2 integrins on leucocytes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 76: 192-194, 1997.
36. **Kearns PR, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Pieters R, Veerman A and Hall AG.** Mu class glutathione S-transferase mRNA isoform expression in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 120: 80-88, 2003.
37. **Kinnula VL, Soini Y, Kvist-Makela K, Savolainen ER and Koistinen P.** Antioxidant defense mechanisms in human neutrophils. *Antioxid Redox Signal* 4: 27-34, 2002.
38. **Kumagai S, Jikimoto T and Saegusa J.** [Pathological roles of oxidative stress in autoimmune diseases]. *Rinsho Byori* 51: 126-132, 2003.
39. **Kurokawa Y, Shinkai S, Torii J, Hino S and Shek PN.** Exercise-induced changes in the expression of surface adhesion molecules on circulating granulocytes and lymphocytes subpopulations. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 71: 245-252, 1995.
40. **Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R and Ji LL.** Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol* 267: R439-R445, 1994.
41. **Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, Brooks GA and Ames BN.** Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 89: 21-28, 2000.
42. **Lopez dS, I, Zhan M, Lal A, Yang X and Gorospe M.** Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2987-2992, 2004.
43. **Marchant GE.** Toxicogenomics and toxic torts. *Trends Biotechnol* 20: 329-332, 2002.

44. **Marshall A and Hodgson J.** DNA chips: an array of possibilities. *Nat Biotechnol* 16: 27-31, 1998.
45. **Michaels GS, Carr DB, Askenazi M, Fuhrman S, Wen X and Somogyi R.** Cluster analysis and data visualization of large-scale gene expression data. *Pac Symp Biocomput* :42-53.: 42-53, 1998.
46. **Mittelbrunn M, Yanez-Mo M, Sancho D, Ursa A and Sanchez-Madrid F.** Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J Immunol* 169: 6691-6695, 2002.
47. **Miyazawa K, Mori A, Miyata H, Akahane M, Ajisawa Y and Okudaira H.** Regulation of interleukin-1beta-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273: 24832-24838, 1998.
48. **Mohr S, Keith G, Galateau-Salle F, Icard P and Rihn BH.** Cell protection, resistance and invasiveness of two malignant mesotheliomas as assessed by 10K-microarray. *Biochim Biophys Acta* %20;1688: 43-60, 2004.
49. **Müller HJ and Röder T.** *Der Experimentator. Microarrays.* Spektrum Akademischer Verlag, 2004.
50. **Nakajima H and Colonna M.** 2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum Immunol* 61: 39-43, 2000.
51. **Nieman DC, Berk LS, Simpson-Westerberg M, Arabatzis K, Youngberg S, Tan SA, Lee JW and Eby WC.** Effects of long-endurance running on immune system parameters and lymphocyte function in experienced marathoners. *Int J Sports Med* 10: 317-323, 1989.
52. **Nieman DC, Miller AR, Henson DA, Warren BJ, Gusewitch G, Johnson RL, Davis JM, Butterworth DE and Nehlsen-Cannarella SL.** Effects of high- vs moderate-intensity exercise on natural killer cell activity. *Med Sci Sports Exerc* 25: 1126-1134, 1993.
53. **Nieman DC and Nehlsen-Cannarella SL.** The immune response to exercise. *Semin Hematol* 31: 166-179, 1994.

54. **Nieman DC and Pedersen BK.** Exercise and immune function. Recent developments. *Sports Med* 27: 73-80, 1999.
55. **Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H and Fehrenbach E.** Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. *Exerc Immunol Rev* 5:22-56.: 22-56, 1999.
56. **Niess AM, Passek F, Lorenz I, Schneider EM, Dickhuth HH, Northoff H and Fehrenbach E.** Expression of the antioxidant stress protein heme oxygenase-1 (HO-1) in human leukocytes. *Free Radic Biol Med* 26: 184-192, 1999.
57. **Niess AM, Sommer M, Schlotz E, Northoff H, Dickhuth HH and Fehrenbach E.** Expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human leukocytes: responses to running exercise. *Med Sci Sports Exerc* 32: 1220-1225, 2000.
58. **Northoff H, Weinstock C and Berg A.** The cytokine response to strenuous exercise. *Int J Sports Med* 15 Suppl 3:S167-71.: S167-S171, 1994.
59. **Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P and Pedersen BK.** Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 515: 287-291, 1999.
60. **Park YS, Fujiwara N, Koh YH, Miyamoto Y, Suzuki K, Honke K and Taniguchi N.** Induction of thioredoxin reductase gene expression by peroxynitrite in human umbilical vein endothelial cells. *Biol Chem* 383: 683-691, 2002.
61. **Pedersen BK and Hoffman-Goetz L.** Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 80: 1055-1081, 2000.
62. **Polanowska-Grabowska R and Gear AR.** Heat-shock proteins and platelet function. *Platelets* 11: 6-22, 2000.
63. **Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Lieu FK, Ji LL and Herb RA.** Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol* 265: H2094-H2098, 1993.

64. **Reszka E and Wasowicz W.** Significance of genetic polymorphisms in glutathione S-transferase multigene family and lung cancer risk. *Int J Occup Med Environ Health* 14: 99-113, 2001.
65. **Ronsen O, Lea T, Bahr R and Pedersen BK.** Enhanced plasma IL-6 and IL-1ra responses to repeated vs. single bouts of prolonged cycling in elite athletes. *J Appl Physiol* 92: 2547-2553, 2002.
66. **Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, Helin HJ, Helen PT, Schraml P, Kallioniemi OP and Kononen J.** Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res* 60: 6617-6622, 2000.
67. **Sanchez-Cabo F., A.Prokesch, G.G.Thallinger, R.Pieler, Z.Trajanoskie, P.D.Butcher, J.Hinds, L.E.A.Holmes, S.G.Campbell, M.P.Ashe, S.Hubbard, K.-H.Cho and O.Wolkenhauer.** Assessing the efficiency of dye-swap normalization to remove systematic bias from two-color microarray data. *Applied Bioinformatics* 2004.
68. **Scharhag J, Meyer T, Gabriel HH, Auracher M and Kindermann W.** Mobilization and oxidative burst of neutrophils are influenced by carbohydrate supplementation during prolonged cycling in humans. *Eur J Appl Physiol* 87: 584-587, 2002.
69. **Schwab K, Witte DP, Aronow BJ, Devarajan P, Potter SS and Patterson LT.** Microarray analysis of focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Nephrol* 24: 438-447, 2004.
70. **Seth A, Kitching R, Landberg G, Xu J, Zubovits J and Burger AM.** Gene expression profiling of ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors. *Anticancer Res* 23: 2043-2051, 2003.
71. **Sonna LA, Wenger CB, Flinn S, Sheldon HK, Sawka MN and Lilly CM.** Exertional heat injury and gene expression changes: a DNA microarray analysis study. *J Appl Physiol* 96: 1943-1953, 2004.
72. **Southern E, Mir K and Shchepinov M.** Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet* 21: 5-9, 1999.
73. **Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K and Pedersen BK.** IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E433-E437, 2003.

74. **Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K and Sugawara K.** Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc Immunol Rev* 8:6-48.: 6-48, 2002.
75. **Tohami T, Drucker L, Radnay J, Shapira H and Lishner M.** Expression of tetraspanins in peripheral blood leukocytes: a comparison between normal and infectious conditions. *Tissue Antigens* 64: 235-242, 2004.
76. **Tseng G., M.Oh, L.Rohlin, J.Liao and W.Wong.** Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assesment of gene effects. *Nucleic Acids Research* 29(12): 2549-2557, 2001.
77. **Tvede N, Heilmann C, Halkjaer-Kristensen J and Pedersen BK.** Mechanisms of B-lymphocyte suppression induced by acute physical exercise. *J Clin Lab Immunol* 30: 169-173, 1989.
78. **Venditti P, Masullo P and Di MS.** Effect of training on H(2)O(2) release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 372: 315-320, 1999.
79. **Vikingsson A, Pederson K and Muller D.** Enumeration of IFN-gamma producing lymphocytes by flow cytometry and correlation with quantitative measurement of IFN-gamma. *J Immunol Methods* 173: 219-228, 1994.
80. **Weinstock C, Konig D, Harnischmacher R, Keul J, Berg A and Northoff H.** Effect of exhaustive exercise stress on the cytokine response. *Med Sci Sports Exerc* 29: 345-354, 1997.
81. **Whistler T, Jones JF, Unger ER and Vernon SD.** Exercise responsive genes measured in peripheral blood of women with chronic fatigue syndrome and matched control subjects. *BMC Physiol* 5: 5, 2005.
82. **Yang Y.H, S.Dudoit, P.Luu and T.P.Speed.** Normalization for cDNA microarray data. *Microarrays: Optical Technologies and Informatics* 4266: 2001.
83. **Yu M, Blomstrand E, Chibalin AV, Krook A and Zierath JR.** Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. *J Physiol* 536: 273-282, 2001.

84. **Zieker D, Fehrenbach E, Dietzsch J, Fliegner J, Weidmann M, Nieselt K, Gebicke-Haerter P, Spanagel R, Simon P, Niess AM and Northoff H.** cDNA-microarray analysis reveals novel candidate genes expressed in human peripheral blood following exhaustive exercise. *Physiol Genomics* 17; 23(3): 287-94, 2005.

85. **Zieker D, Zieker J, Dietzsch J, Burnet M, Northoff H and Fehrenbach E.** CDNA-microarray analysis as a research tool for expression profiling in human peripheral blood following exercise. *Exerc Immunol Rev* 11: 86-96, 2005.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Northoff, dem Ärztlichen Direktor der Abteilung für Transfusionsmedizin, möchte ich größten Dank aussprechen für die Vergabe des Themas dieser Dissertation und die Bereitstellung aller zur Durchführung des Projektes erforderlichen Ressourcen. Ich möchte mich auch weiter für die in mich investierte Zeit, Vertrauen und Hilfestellungen durch Diskussionen und Ratschläge sehr bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. A. M. Nieß, dem Ärztlichen Direktor der Abteilung für Sportmedizin, für die Vermittlung von umfangreichen Wissen im Bereich Sportmedizin.

Herrn Prof. Dr. P. Gebicke, für seine vielfältigen Ratschläge und Hilfestellungen, die Einführung in den Bereich Microarraytechnologie, der Bereitstellung von Laborräumlichkeiten und verwendeter Geräte/Materialien seiner Abteilung und vor allem für das Erlernen des wissenschaftlichen Arbeitens.

Herrn Prof. Dr. Spanagel, für seine Investition und Hilfe die zur Durchführung dieses Projektes beigetragen hat.

Frau Dr. E. Fehrenbach für ihre jederzeit bereitgestellte Unterstützung und Hilfestellung, für viele Ratschläge, Diskussionen und der erfolgreichen Zusammenarbeit.

Frau Dr. K. Struwe und J. Dietzsch der Abteilung Bioinformatik, für ihre Unterstützung und Durchführung der Auswertung der Microarraydaten. Dank ihrer Unterstützung, Hilfe und Einsatz konnten die experimentell gewonnenen Daten in einen biologischen Zusammenhang gebracht werden.

Frau J. Zieker für die intensive und erfolgreiche Zusammenarbeit und Hilfe zur Etablierung der cDNA Microarrays.

Mein weiterer Dank gilt den Probanden der Studie und allen, die mir ihre Unterstützung zum Erlernen labortechnischer Fertigkeiten haben zukommen lassen.

Lebenslauf

Derek Anthony Gerald ZIEKER

- Persönliche Angaben
- Geburtsdatum: 11. 11. 1974
 - Geburtsort: Johannesburg/ Südafrika
- Promotion
- Etablierung von home-made cDNA Microarrays und Untersuchung der Genexpression nach Hochleistungssport
- Studium
- Studium der Humanmedizin. Beginn im SS 1999 an der Eberhard Karls Universität Tübingen
- Physikum (März 2001, Tübingen)
 - Von September 2001 bis September 2002 zwei Forschungssemester in Mannheim
 - 1. Staatsexamen (März 2003, Tübingen)
 - 2. Staatsexamen (März 2005, Tübingen)
 - Von April 2005 bis September 2006 ein Forschungssemester in Tübingen
 - 3. Staatsexamen (07. November 2006, Friedrichshafen)
- Schulabschluss
- Abitur (Juni 1994, Johannes-Kepler-Gymnasium Reutlingen)
- Weitere Ausbildungen
- Wehrdienst (Juli 1994 – Juni 1995)
 - Ausbildung zum Koch im Brenner's Park-Hotel Baden-Baden (Februar 1996 – Juli 1998)
- Publikationen
(bis Dezember 2006)
- Zieker J*, **Zieker D***, Jatzko A*, Dietzsch J, Nieselt K, Schmitt A, Bertsch T, Fassbender K, Spanagel R, Northoff H, Gebicke-Haerter PJ. Differential gene expression in peripheral blood of patients suffering from Posttraumatic Stress Disorder. *Mol Psychiatry*. 2006; Article in press.
 - **Zieker D***, Fehrenbach E*, Dietzsch J*, Fliegner J, Weidmann M, Nieselt K, Gebicke-Haerter P, Spanagel R, Simon P, Niess AM, Northoff H. cDNA-microarray analysis reveals novel candidate genes expressed in human peripheral blood following exhaustive exercise. *Physiol Genomics*. 2005;17;23(3):287-94.
 - **Zieker D***, Zieker J*, Dietzsch J, Burnet M, Northoff H, Fehrenbach E. cDNA-microarray analysis as a research tool for expression profiling in human peripheral blood

following exercise.

Exerc Immunol Rev. 2005;11:86-96.

- Fehrenbach E, **Zieker D**, Niess AM, Moeller E, Russwurm S, Northoff H.
Microarray technology the future analyses tool in exercise physiology?
Exerc Immunol Rev. 2003;9:58-69.

*equally contributing first authors