
Genexpression asthmarelevanter Gene während der Akute-Phase-Reaktion bei Leistungssportlern in Abhängigkeit von der Ausdauerleistungsfähigkeit

Thomas Hilberg¹ (Projektleiter), Antje Peuckert¹, Kathleen Menzel¹,
Karin Felsmann², Eva Möller², Peter Deigner², Andriy Ruryk²,
Stefan Russwurm² & Holger Gabriel¹

¹Friedrich-Schiller-Universität Jena, Lehrstuhl für Sportmedizin

²SIRS-Lab GmbH Jena

1 Problem

Das belastungsinduzierte Asthma ist weiterhin ein ungelöstes Problem vor allem im Hochleistungssport. Es konnte gezeigt werden, dass ca. 10-15 % der Olympiateilnehmer ein Exercise-induced-asthma (EIA) beklagen und das bis zu 50 % der Kaltwetter-Athleten respiratorische Symptome in Verbindung mit einer entsprechenden Reduktion des FEV₁ (Einsekundenkapazität) nach Belastung angeben, was definitionsgemäß einem EIA entspricht (Storms, 1999, 2003). Dabei haben diese Athleten nur teilweise eine asthmatische Vorgeschichte, ein guter Teil klagt dagegen ausschließlich über eine belastungsabhängige Problematik. Verschiedene Ursachen werden für das EIA verantwortlich gemacht, u. a. vaskuläre und osmotische Veränderungen, wie auch die Wiedererwärmung der Atemwege. Zunehmende Bedeutung wird aber auch inflammatorischen Transmittern zugeschrieben, dabei insbesondere den Leukotrienen und dem Histamin (Anderson & Kippelen, 2005). Dabei ist allerdings wenig über die belastungsinduzierte genregulatorische Ebene bei diesen Transmittern bekannt und inwieweit der individuelle ausdauer-spezifische Trainingszustand hierauf einen Einfluss nimmt.

Ziel dieser Studie war deshalb 1) die Untersuchung der akuten belastungsinduzierten Genregulation – dabei in diesem Studienteil fokussiert auf asthmarelevante Gene – und 2) die Überprüfung, ob diese Regulation abhängig ist von der Ausdauerleistungsfähigkeit.

2 Methode

In diese Studie wurden 17 gesunde untrainierte Probanden mit einer Sauerstoffaufnahme <50 ml/min/kg (im Mittel 46,3 ml/min/kg) und 20 gesunde trainierte Probanden mit einer Sauerstoffaufnahme von >65 ml/min/kg (im Mittel 68,3 ml/min/kg) eingeschlossen. Alle Probanden absolvierten eine Ausdauerbelastung mit 80 % der individuellen anaeroben

Schwelle über 90 min, hierbei die Gruppe „Trainiert“ im Mittel mit 222 Watt, die Gruppe „Untrainiert“ mit 135 Watt. Blutabnahmen zur Analyse der mRNA erfolgten vor und 45 min nach Belastung. Weitere Blutabnahmen direkt und zwei Stunden nach Belastung dienten der Bestimmung von Kontrollparametern. Mit Hilfe der Mikro-Array-Technik wurde die Genregulation von mehr als 5000 Genen bestimmt, dabei wurde ein Mitteldichte-Poly-nukleotid-Array eingesetzt, der durch den Kooperationspartner, die SIRS-Lab GmbH Jena, selbstständig entwickelt wurde. Die Zusammenstellung der Gene auf dem Chip erfolgte zielgerichtet auf inflammatorische und immunregulative Prozesse. In einem aufwändigen Verfahren wurde aus den Blutproben zunächst die mRNA isoliert und im Weiteren mit einer reversen Transkriptase in eine cDNA überführt. In weiteren Schritten erfolgten die Hydrolyse, Reinigung der cDNA und das Labeling mit fluoreszenzmarkierten Farbstoffen. Danach erfolgten die Reinigung der Proben, die Hybridisierung und am Ende das Scannen der Hybridisierungssignale. In die statistische Analyse gingen 5.386 Gene ein. Hierbei wurden Gene mit geringer Spot-Qualität/-Intensität oder Gene mit einer geringen Veränderung ausgeschlossen. Es konnten 786 Gene mit signifikanten Regulationsveränderungen im Zusammenhang mit akuter Belastung oder/und dem Trainingszustand detektiert werden. Beim Vergleich Prä-Post wurde die Schwelle für den p-Wert mit $p \leq 0,005$ und einer false discovery rate (FDR) von 2 % festgelegt, d. h. bei 500 Genen mit einem p-Wert von $p \leq 0,005$ sind ca. 10 falschpositive Gene zu erwarten. Beim Vergleich „Trainiert“ versus „Untrainiert“ wurde die Schwelle für den p-Wert auf $p \leq 0,005$ bei einer FDR von 5 % festgelegt. Im Anschluss an die univariate Analyse erfolgte eine multivariate Analyse der signifikanten Gene mittels hierarchischem Clustering.

3 Ergebnisse

Bei 552 Genen zeigten sich Veränderungen durch die akute körperliche Belastung, bei 234 Genen konnten trainingsinduzierte Veränderungen nachgewiesen werden. Lediglich 17 Gene zeigten eine Abhängigkeit sowohl vom Trainingszustand als auch von der akuten körperlichen Belastung.

Aufgrund ausführlicher Datenbankrecherchen konnten 18 regulierte asthmarelevante Gene detektiert werden. Diese sind mit Ihren Veränderungen in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Darstellung der Ratio (dimensionslos) der Gene zur Kontrollzelllinie;
 UG = untrainierte Gruppe, TG = trainierte Gruppe jeweils vor bzw. nach
 Belastung, * = vor versus nach (beide Gruppen), # = UG versus TG jeweils
 $p \leq 0,005$, MW \pm Stabw.

	UG vor	UG nach	TG vor	TG nach
ALOX5	0,92 \pm 0,52	1,36 \pm 0,53 *	0,96 \pm 0,31	1,11 \pm 0,31 *
ALOX5AP	0,29 \pm 0,35	0,99 \pm 0,47 *	0,21 \pm 0,24	0,85 \pm 0,36 *
GM-CSF	-0,09 \pm 0,25	0,06 \pm 0,20 *	-0,04 \pm 0,17	0,14 \pm 0,24 *
HRH1	-0,56 \pm 0,19	-0,53 \pm 0,13	-0,73 \pm 0,22 #	-0,63 \pm 0,22 #
IL10RA	0,39 \pm 0,18	0,16 \pm 0,22 *	0,28 \pm 0,18	0,20 \pm 0,23 *
IL13RA1	0,90 \pm 0,32	0,70 \pm 0,30 *	0,88 \pm 0,28	0,55 \pm 0,59 *
IL1R1	-0,20 \pm 0,17	0,00 \pm 0,21 *	-0,18 \pm 0,18	-0,01 \pm 0,21 *
IL1R2	2,03 \pm 0,55	2,33 \pm 0,76 *	2,23 \pm 0,51	2,69 \pm 0,53 *
IL2RA	0,24 \pm 0,32	0,12 \pm 0,26 *	0,36 \pm 0,29	0,06 \pm 0,30 *
IL2RG	1,12 \pm 0,19	0,91 \pm 0,27 *	0,99 \pm 0,19	0,80 \pm 0,35 *
IL8	-1,96 \pm 0,26	-1,55 \pm 0,57 *	-2,16 \pm 0,34	-1,76 \pm 0,40 *
LTB4R	0,24 \pm 0,36	0,25 \pm 0,42	0,41 \pm 0,25	0,38 \pm 0,20
MAPK14	-0,51 \pm 0,20	-0,13 \pm 0,35 *	-0,57 \pm 0,23	-0,31 \pm 0,35
PTGS1	0,01 \pm 0,21	-0,13 \pm 0,24 *	-0,20 \pm 0,26 #	-0,49 \pm 0,28* #
PTGS2	0,84 \pm 0,37	1,06 \pm 0,32 *	0,86 \pm 0,23	1,19 \pm 0,33 *
RANTES	0,73 \pm 0,40	0,00 \pm 0,41 *	0,64 \pm 0,33	-0,09 \pm 0,52 *
TBXAS1	0,88 \pm 0,32	0,76 \pm 0,27 *	0,98 \pm 0,28	0,74 \pm 0,33 *
TNF	-0,26 \pm 0,21	-0,15 \pm 0,29 *	-0,37 \pm 0,23	-0,22 \pm 0,21 *

Abkürzungen (Gen – Produkt): ALOX5 – Arachidonsäure Lipooxygenase 5;
 ALOX5AP- Arachidonsäure Lipooxygenase 5 aktivierendes Protein (FLAP);
 LTB4R – Leukotrien B4 Rezeptor; TNF – Tumor Nekrose Faktor;
 GM-CSF – Granulozyten- Monozyten koloniestimulierender Faktor;
 PTGS1 & 2 – Prostaglandin-endoperoxid Synthasen 1 & 2;
 TBXAS1 – Thromboxan A Synthase 1; MAPK14 – mitogen activated protein kinase 14;
 HRH1 – Histamin Rezeptor H1; IL8 – Interleukin 8; IL1R1 – Interleukin 1 Rezeptor 1;
 IL1R2 – Interleukin 1 Rezeptor 2; IL2RA – Interleukin 2 Rezeptor alpha;
 IL2RG – Interleukin 2 Rezeptor gamma; IL10RA – Interleukin 10 Rezeptor alpha;
 IL13RA – Interleukin 13 Rezeptor alpha

Dabei sind die Veränderungen im mRNA-Muster bei der ALOX5, ALOX5AP und MAPK14 (p38MAPK) nach akuter Belastung hervorzuheben, weil diese Gene eine beson-

dere Bedeutung im Leukotrienstoffwechsel besitzen. Darüber hinaus war die PTGS1 in der trainierten Gruppe vermindert, was möglicherweise über eine Reduktion der Prostaglandin-E₂-Konzentration zu einer Verminderung bronchodilatatorischer Effekte führt und damit indirekt die Bronchokonstriktion verstärkt. Die Belastung führte zusätzlich in beiden Gruppen zu einer Reduktion der PTGS1.

In Abbildung 1 werden die Veränderungen der Leukotrienregulation nach akuter körperlicher Belastung schematisch zusammengefasst.

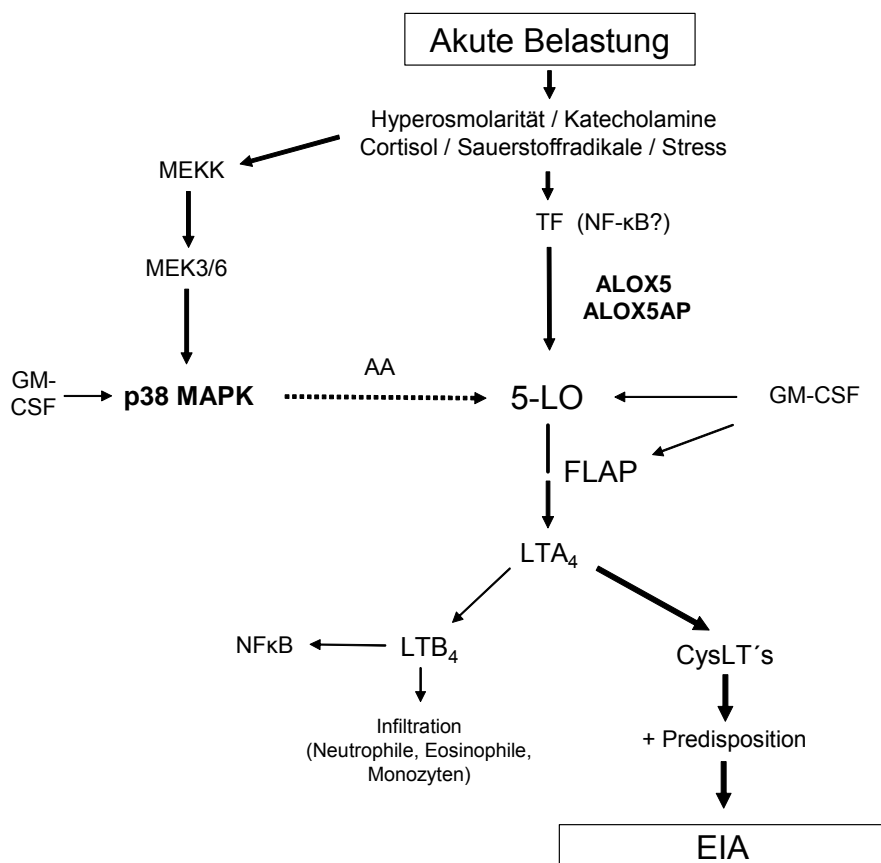


Abb. 1: Schematische Darstellung der Veränderungen der Leukotrienregulation nach akuter Dauerbelastung

Abkürzungen: AA – Arachidonsäure; CysLT – Cysteinyl-Leukotriene;
 ERK – Extracellular-signal Regulated Kinase; EIA – Exercise-induced asthma;
 LTB₄ – Leukotrien B₄; LTA₄ – Leukotrien A₄; MEKK – MAPK/ERKkinase;
 MEK3/6 – MAPK/ERK; NFκB – nuclear factor – kappa B;
 p38 MAPK (MAPK14) – Mitogen aktivierte Proteinkinase p38;
 TF – Transkriptionsfaktor / Bezeichnungen (Gen – Produkt): ALOX5 – Arachidonsäure
 Lipxygenase 5; ALOX5AP – Arachidonsäure Lipxygenase 5 aktivierendes Protein (FLAP);
 GM-CSF – Granulozyten-Monozyten koloniestimulierender-Factor

4 Diskussion

Körperliche Belastung geht mit einer Akute-Phase-Reaktion einher, die vielfältige Veränderungen induziert und in Verbindung mit einer vorliegenden Prädisposition auch zu einem EIA führen kann. Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Regulation asthmarelevanter Gene nach akuter körperlicher Belastung sowie in Verbindung mit der Ausdauerleistungsfähigkeit. So konnte in einer Vorstudie schon an einem kleineren Kollektiv gezeigt werden, dass eine akute Dauerbelastung zu einer Hochregulation des Leukotrienstoffwechsel auf mRNA-Ebene sowie zu einem Anstieg der Endprodukte LTB₄ und LTC₄ im Blut führt (Hilberg et al., 2005). LTC₄ gehört mit LTD₄ und LTE₄ zu den Cysteinyl-Leukotrienen. Diese sind potente Bronchokonstriktoren sowohl an den großen als auch an den kleinen Atemwegen, haben aber auch zusätzliche Effekte auf das Gefäßsystem, die mucoziläre Clearance und die eosinophile Inflammation (Wenzel, 2003). LTB₄, aber auch LTE₄ induzieren eine zelluläre Infiltration der Bronchialschleimhaut, vor allem durch neutrophile und eosinophile Granulozyten (Kroegel et al., 1997). Der biologische Effekt der Leukotriene ist nicht nur um das 1000fache stärker, sondern mit 30-40 Minuten in der Dauer auch vierfach länger im Vergleich zum Histamin (Kroegel et al., 1997). Die akute körperliche Dauerbelastung induzierte in beiden Gruppen eine Hochregulation von ALOX5 und ALOX5AP. Diese codieren die Bildung der 5-Lipoxygenase (5-LO), des zentralen Enzyms bzw. FLAP, des 5-LO-aktivierenden Proteins im Leukotrienstoffwechsel (vgl. Abb. 1). Darüber wird die Bildung der Leukotriene verstärkt, was bei entsprechender Disposition und entsprechender Belastung zu einer verstärkten Bronchokonstriktion unter bzw. nach Belastung führen kann. Parallel zur verstärkten Bildung wird die 5-LO aber zusätzlich auch stärker aktiviert. In der Studie konnte eine vermehrte mRNA-Bildung der p38MAPK (MAPK14) nachgewiesen werden. Diese aktiviert arachidonsäureabhängig die 5-LO. Diese komplexen asthmaspezifischen Regulationswege nach akuter körperlicher Belastung sind schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Der Trainingszustand hat auf die Auslenkungen des Leukotrienstoffwechsels keinen Einfluss. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass die Belastung und auch der Trainingszustand die mRNA-Expression der Prostaglandinsynthase1 (PTGS1, siehe Tab. 1) vermindert, was möglicherweise mit einer Reduktion der Prostaglandin-E₂-Konzentration im Blut einhergeht. PGE₂ wirkt bronchodilatatorisch, eine Verminderung kann den bronchokonstriktorisches Zustand verstärken. Dies kann ein Hinweis auf trainingsbedingte Veränderungen bei Ausdauerathleten mit verstärktem EIA sein.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass eine akute körperliche Ausdauerbelastung zu einer Aktivierung des Leukotrienstoffwechsels auf genetischer Ebene führt, was in Kombination mit einer vorliegenden Prädisposition zum EIA führen kann. Körperliche Belastung und Ausdauertraining haben einen Einfluss auf den Prostaglandinstoffwechsel, was

möglicherweise die bronchodilatatorischen Effekte moduliert und damit bei vorliegender Disposition die Bronchokonstriktion fördert. In Anbetracht der Dopingproblematik und wachsender Skepsis besonders hinsichtlich der Sicherheit lang wirkender Beta-Agonisten sowie dem zunehmendem Verständnis physiologischer Zusammenhänge im Leukotrienstoffwechsel wäre ein vermehrter Einsatz von Leukotrienantagonisten beim EIA ernsthaft zu diskutieren.

5 Literatur

- Anderson, S. D. & Kippelen, P. (2005). Exercise-induced Bronchoconstriction: Pathogenesis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 5, 116-122.
- Hilberg, T., Deigner, H. P., Moller, E., Claus, R. A., Ruryk, A., Glaser, D., Landre, J. B., Brunkhorst, F. M., Reinhart, K., Gabriel, H. H. & Russwurm, S. (2005). Transcription in response to physical stress-clues to the molecular mechanisms of exercise-induced asthma. *Faseb J*, 19, 1492-1494.
- Kroegel, C., König, W. & Jäger, L. (1997). Erweiterte Therapie des Asthma brochiale. *Deutsches Ärzteblatt*, 94, A1802-1810.
- Storms, W. W. (1999). Exercise-induced asthma: diagnosis and treatment for the recreational or elite athlete. *Med Sci Sports Exerc*, 31 (1 Suppl), 33-38.
- Storms, W. W. (2003). Review of exercise-induced asthma. *Med Sci Sports Exerc*, 35 (9), 1464-1470.
- Wenzel, S. E. (2003). The role of leukotrienes in asthma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69, 145-155.