

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
der Universität zu Köln
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. W. Böttiger

Auswirkung einer hypobaren Hypoxie (15.000ft) auf den Proteinstoffwechsel nach 30 und 60 Minuten bei gesunden Probanden

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Lukas Christopher Nerlich
aus Köln

promoviert am 24. März 2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Professor Dr. med. J. Hinkelbein
2. Gutachter: Privatdozent Dr. rer. medic. K. P. Pfannkuche

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Ausfertigung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herrn Prof. Dr. med. Jochen Hinkelbein
Frau Priv.-Doz. Dr. med. Stefanie Jansen
Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Moritz Meyer

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden molekularbiologischen Aufbereitungen der Serumproben (2D-Gelelektrophorese, Massenspektrometrie und Identifikation der Proteine mittels Mascot-Software) wurden durch das Unternehmen „TopLab“ in Martinsried durchgeführt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden bioinformatischen Netzwerkanalysen, Datenanalysen und -interpretationen der differenziell exprimierten Proteine sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Jochen Hinkelbein von mir selbst ausgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen

Köln, den

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. med. Jochen Hinkelbein** für die Überlassung des Promotionsthemas, die angenehme und geduldige Einführung in die wissenschaftliche Tätigkeit und die Möglichkeit der ständigen persönlichen Kontaktaufnahme. Durch seine hervorragende Betreuung begleitete er den Prozess der Planung, Durchführung sowie Auswertung bis zur letztendlichen Fertigstellung der Dissertationsschrift mit großem Engagement.

In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei **Herrn Prof. Dr. med. Bernd W. Böttiger**, Direktor der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, für die Ermöglichung dieser Arbeit an seiner Klinik bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei **Frau Priv.- Doz. Dr. med. Stefanie Jansen** und **Herrn Priv.- Doz. Dr. med. Moritz Meyer** für den unkomplizierten und freundlichen Austausch sowie die regelmäßige Unterstützung während der Versuchsdurchführung und der Versuchsplanung bedanken. Durch ihre Forschungstätigkeit an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Uniklinik Köln führten sie bereits Studien unter hypobar hypoxischen Bedingungen durch, von deren Erfahrungen ich maßgeblich profitieren konnte.

Ein weiterer Dank gilt **Herrn Dr. med. Jan Schmitz**, der zu unterschiedlichen Phasen der Studie zum erfolgreichen Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Nicht unerwähnt lassen möchte, dass ohne die zahlreichen Probanden, die Durchführung der Studie nicht möglich gewesen wäre. Für diesen Einsatz bin ich ihnen sehr dankbar.

Ein ganz persönlicher Dank gilt **meinen Eltern, meiner Familie** sowie **meinen Freunden**, die mich durch ihre fortwährende Unterstützung nicht nur während des gesamten Promotionsvorhabens motivierten, sondern mich auch auf meinem gesamten beruflichen und persönlichen Werdegang liebevoll begleiteten.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 ZUSAMMENFASSUNG	9
2 EINLEITUNG	10
2.1 Ausgangspunkt zur Durchführung der Studie	11
2.2 Hypothese und Ziel der Arbeit	11
3 MATERIAL UND METHODEN	12
3.1 Definitionen	12
3.1.1 Hypobare Hypoxie	12
3.1.2 Proteomik	13
3.1.3 Plasmaproteine und deren Modifikationen	14
3.2 Studiendesign	15
3.3 Auswahl der Probanden und Versuchsgruppenbildung	16
3.4 Dokumentation der Sauerstoffsättigung.....	17
3.5 Druckkammer und Druckprofil.....	17
3.6 Versuchsablauf	18
3.7 Externe Laborarbeiten	18
3.7.1 Probenreinigung (Proteinisolierung).....	18
3.7.2 BCA-Assay	19
3.7.3 1D SDS PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese).....	19
3.8 2D DIGE	21
3.8.1 Probenmarkierung und 2D-DIGE Versuchsablauf	21
3.8.2 Bilderfassung.....	23
3.8.3 Computergestützte Auswertung der 2D-Gele	23
3.9 MALDI-TOF	25
3.10 Mascot	26

3.11	Bioinformatische Netzwerkanalysen	27
3.11.1	STRING	27
3.11.2	GeneMania.....	28
3.11.3	Perseus.....	28
3.12	Ethik.....	29
4	ERGEBNISSE	30
4.1	Probandencharakteristika	30
4.2	Sauerstoffsättigung.....	31
4.3	Probenaufbereitung	34
4.4	2D DIGE	34
4.5	Delta 2 D	39
4.6	Vergleiche.....	40
4.6.1	Vergleich 1: Interventionsgruppe 30 min vs. Kontrollgruppe 30 min	40
4.6.2	Vergleich 2: Interventionsgruppe 60 min vs. Kontrollgruppe 60 min	43
4.6.3	Vergleich 3: Interventionsgruppe 30 min vs. Interventionsgruppe 60 min	46
4.7	Bestimmung relevanter Proteinspots	48
4.8	Mascot-Analyse	49
4.9	STRING-Analyse	50
4.9.1	Kontrollgruppe 30 min vs. Interventionsgruppe 30 min.....	50
4.9.2	Kontrollgruppe 60 min vs. Interventionsgruppe 60 min.....	50
4.9.3	Interventionsgruppe 30 min vs. 60 min.....	51
4.10	GeneMania.....	53
4.10.1	Kontrollgruppe 30 min vs. Interventionsgruppe 30 min.....	53
4.10.2	Kontrollgruppe 60 min vs. Interventionsgruppe 60 min.....	54
4.10.3	Interventionsgruppe 30 min vs. 60 min.....	56
4.11	Perseus.....	58
5	DISKUSSION	59
5.1	Proteine des Komplementsystems.....	59

5.2	Funktion der differenziell exprimierten Proteine.....	60
5.2.1	30 min Hypobare Hypoxie vs. 30 min Kontrolle	60
5.2.2	60 min Hypobare Hypoxie vs. 60 min Kontrolle	61
5.3	Hypobare Hypoxie und ihr Einfluss auf das Komplementsystem.....	64
5.4	Limitationen der Methoden.....	65
5.4.1	Allgemeine Limitationen	65
5.4.2	Modellbedingte Limitationen	66
5.4.3	Limitationen der Proteindifferenzierung	67
5.4.4	Limitationen bioinformatischer Netzwerkanalysen	68
5.5	Beurteilung der postulierten Hypothesen und Ziele.....	68
5.6	Klinische Bedeutung und Ausblick	69
6	LITERATURVERZEICHNIS	70
7	ANHANG	73
7.1	Abbildungsverzeichnis	73
7.2	Tabellenverzeichnis	74
7.3	Lebenslauf	75

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µA	Mikroampere
ALB	Serum Albumin
AMS	engl. acute mountain sickness
BCA-Assay	engl. bicinchoninic acid assay
C1	Complement factor 1
C1QB	Complement C1q subcomponent subunit B
C3	Complement factor 3
C4	Complement factor 4
C5	Complement factor 5
CFH	Complement factor H
CFHR	Complement factor H related proteins
CFHR1	Complement factor H-related protein 1
CFI	Complement factor I
cm	Zentimeter
Cu ²⁺	zweiwertiges Kupferion
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
et. al.	et aliae/et alia/et alii
FDR	engl. false discovery rate
g	Gramm
GC	Vitamin D-binding Protein
HACE	engl. high-altitude cerebral edema
HAPE	engl. high-altitude pulmonary edema
hPa	Hektopascal
HPX	Hemopexin
ID	Identifikation
IgA	Immunglobuline A
IgD	Immunglobuline D
IgE	Immunglobuline E
IgG	Immunglobuline G
IgM	Immunglobuline M
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
KEGG	kyoto encyclopedia of genes and genomes
Kg	Kilogramm
kVh	Kilovolt Stunde
m. ü. NN	Meter über Normal-Null
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
mA	Milliampere
MALDI-TOF	engl. Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight
mbar	Millibar
mbar/min	Millibar/Minute
min	Minute
mM	Millimol
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid

MW	engl. molecular weight
N=	Anzahl=
nm	Nanometer
Nr	Nummer
pH	lat. potentia Hydrogenii
PLG	Plasminogen
PPI	engl. protein-protein interaction
ppm	engl. parts per million
SDS PAGE	engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERPINF1	Pigment epithelium-derived factor
SpO ₂	Sauerstoffsättigung
STRING	Search tool for the retrieval of interacting genes/proteins
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
V	Volt
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
1D-Gelelektrophorese	eindimensionale Gelelektrophorese
2D-Gelelektrophorese	zweidimensionale Gelelektrophorese

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um Proteinexpressionsveränderungen sowie Protein-Interaktionen im menschlichen Blutserum nach hypobarer Hypoxie entsprechend 15.000 ft in 30 min bzw. 60 min Zeitintervallen zu untersuchen.

Insgesamt nahmen 80 männlichen Probanden an der Studie in der Druckkammer des Universitätsklinikums Köln teil. Die gewonnenen Blutserumproben wurden durch Methoden der Proteomik aufbereitet. Mittels 2D-DIGE, MALDI-TOF und Mascot-Analyse konnten signifikant differenziell exprimierte Proteine aus den Proben identifiziert werden.

Anschließende bioinformatischen Netzwerkanalysen (STRING/GeneMania) analysierten den Einfluss der differenziell exprimierten Proteine auf den Proteinstoffwechsel und dessen Regulationsmechanismen. Durch die Software „Perseus“ wurden die Proteinexpressionsunterschiede in einer Heatmap visualisiert und eine Clusteranalyse durchgeführt.

Im 30 min Vergleich stellten sich drei zwischen den Proben differenziell exprimierte Proteine dar. Im 60 min Vergleich zeigten sich 9 unterschiedliche Proteine mit signifikantem Expressionsunterschied.

Insbesondere konnte zum Ausdruck gebracht werden, dass bereits kurze Expositionen von 30 min bzw. 60 min gegenüber hypobarer Hypoxie allgemein einen Einfluss auf die Proteinexpression im Probandenserum haben. Eine längere Exposition (60 min) gegenüber einer kürzeren Exposition (30 min) erzeugte deutlich mehr differenzielle Proteinexpressionsmuster.

Während 30 min der entsprechenden hypobaren Hypoxie keinen Einfluss auf Signalkaskaden zeigte, bewirkte eine 60-minütige Intervention Proteinexpressionsunterschiede, die mit der Regulierung des Komplementsystems in Verbindung stehen. Gleichwohl zeigten sich in der vorliegenden Studie für beide Zeitintervalle ebenfalls einzelne Proteine der Akuten-Phase-Reaktion sowie der Gerinnungsfunktion signifikant erhöht.

Diese Ergebnisse ergänzen somit Beobachtungen aus Studien, die auch signifikante Veränderungen an Proteinen des Komplement- und des Immunsystems nach simulierter, hypobarer Hypoxie nachweisen konnten.

Weitere Studien müssen zeigen, ob die identifizierten Expressionsunterschiede nun allgemein hemmend oder stimulierend auf die Immunreaktion einwirken und ob die Studienergebnisse auch auf das weibliche Geschlecht übertragbar sind. Von Interesse wäre es ebenfalls weitere Höhenprofile, Expositionszeiträume sowie Untersuchungsmedien (Urin, Liquor) zu analysieren. Eine Variation des Zeitpunktes der Probenentnahme könnte zu einer Detektion molekularbiologischer Anpassungsvorgänge und deren Abfolge beitragen. Möglicherweise lassen sich hieraus Biomarker zur Prävention höhenassoziierter Pathologien ableiten.

2 Einleitung

Es scheint zum Wesen des Menschen zu gehören, sich stets neue Horizonte zu erschließen. Somit ergründete er zunehmend durch eine Vielzahl von Hilfsmitteln auch den Luftraum. Bereits in der griechischen Mythologie wird von dem Versuch des Ikarus berichtet, dessen Übermut und das Streben zu immer größeren Höhen letztendlich zu seinem Absturz führte ¹. Die Anfänge der Flughistorie waren vor allem von physikalischen Grenzgängen geprägt. Inzwischen stellen die höhenphysiologischen Gesetzmäßigkeiten und ihre Auswirkungen auf den menschlichen Organismus die moderne Luftfahrt vor große Herausforderungen ².

Der mit zunehmender Flughöhe abfallende Atmosphärendruck führt zu einem abfallenden Sauerstoffpartialdruck im Gasaustauschprozess der Lungen mit resultierender Sauerstoffunterversorgung in den Körpergeweben (Hypoxie). Um dieses Missverhältnis auszugleichen, sind multiple Anpassungsvorgänge des Körpers notwendig, die in Abhängigkeit der Ausprägung sowie zeitlichen Exposition gegenüber hypobarer Hypoxie greifen ³⁻⁵.

Ein Versagen dieser Regulationsmechanismen kann zu höhenassoziierten Pathologien wie der akuten Bergkrankheit (AMS), dem Höhenlungenödem (HAPE) sowie dem Höhenhirnödem (HACE) führen ⁴⁻⁶.

Diese Vorgänge können zum einen durch Änderungen der Vitalparameter (Tachykardie, Hyperventilation und Abfall der Sauerstoffsättigung) erfasst werden, zum anderen konnten bereits auch Anpassungen der Stoffwechselregulation als Reaktion auf hypobare Hypoxie festgestellt werden ^{3,7}.

Das Forschungsgebiet der Proteomik entwickelt sich zunehmend zu einem leistungsfähigen Ansatz, um Anpassungsvorgänge des Proteoms an sich wechselnde Umweltbedingungen zu untersuchen. Proteine sind an Regulationsmechanismen des Stoffwechsels maßgeblich beteiligt. Massenspektrometrie zur Proteinidentifikation als auch bioinformatische Netzwerkanalysen zur Identifikation von Signalkaskaden des Stoffwechsels stellen dabei bedeutende Methoden der Proteomik dar. Das Wissenschaftsgebiet der Proteomik bildet das Proteom als Interaktion des Genoms mit seiner Umwelt ab und ist insbesondere in der Lage, dynamische Prozesse darzustellen ⁸.

Besonders attraktiv ist die einfache Probengewinnung, die die Erfassung kurzfristiger Veränderungen des Serumproteoms ermöglicht und somit beteiligte Stoffwechselwege und Anpassungsvorgänge auf molekularer Ebene aufgeklärt ^{9,10}. Durch moderne Druckkammertechniken lassen sich heutzutage sowohl hypobare als auch hyperbare Druckverhältnisse simulieren. Deren Ergebnisse können zu Forschungszwecken ausgewertet werden und im Idealfall diagnostischen und therapeutischen Zwecken dienen ⁶. Konzentrationsunterschiede der Proteine im Blutserum sind zur Ableitung von Stoffwechselanpassungen des Körpers auf hypobare Hypoxie geeignet ^{6,10}.

Im Jahr 2019 starteten 124,4 Millionen Passagiere von deutschen Flughäfen, dies bedeutete einen Zuwachs von 37 % in einem 10 Jahresvergleich ¹¹. Angesichts der häufigen Expositionen des Menschen gegenüber hypobarer Hypoxie ist das Bedürfnis nach Informationen zu kurzfristigen sowie langfristigen Auswirkungen auf den Körper von besonderem Interesse ⁵.

Angesichts der stetig steigenden Passagierzahlen im kommerziellen Luftverkehr ist ein weitreichendes Verständnis höhenassoziierter Pathologie von besonderem Interesse. Diese Studie sollte somit Veränderungen des Proteinstoffwechsels bei simulierter, hypobarer Hypoxie aufzeigen, um Grundlagen für prognostische sowie diagnostische Überlegungen zu liefern.

2.1 Ausgangspunkt zur Durchführung der Studie

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war eine bereits veröffentlichte Studie von Hinkelbein et al. Diese zeigte jüngst bei Probanden, die 30 Minuten lang einer hypobaren Hypoxie (8000 ft) ausgesetzt worden waren, dass sie, anders als in der 30-minütigen Kontrollgruppe (normobarer Zustand), Expressionsunterschiede bei Proteinen zur Regulation der Hämostase (vier Proteine); dem Metabolismus (fünf Proteine) und der Leukozyten vermittelten Immunantwort (fünf Proteine) aufwiesen. ⁴

Von großem Interesse war es nun herauszufinden, welchen Einfluss eine stärkere und länger andauernde hypobare Hypoxie auf den menschlichen Stoffwechsel hat und wie sich die Expressionsdynamik der Serumproteine dabei entwickelt.

2.2 Hypothese und Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Studie wurde zum einen die Hypothese (H1) aufgestellt, dass eine hypobare Hypoxie entsprechend 15000 ft zu einem signifikanten Unterschied der Proteinexpression zwischen den Kontrollgruppen und den Interventionsgruppen (Vergleich 1 und 2) führt und zum anderen eine längere zeitliche Exposition gegenüber hypobarer Hypoxie vermehrt differenziell exprimierte Proteine zeigt (Vergleich 3).

Weiterführend wurde geprüft, ob die Studienergebnisse von Hinkelbein et. al., dass eine hypobare Hypoxie entsprechend 8.000 ft bei 30 min einen Einfluss auf die Blutgerinnung und das Immunsystem hat, auf eine simulierte hypobare Hypoxie entsprechend 15.000 ft bei 30 min bzw. 60 min übertragbar ist. Des Weiteren soll geprüft werden, ob weitere Stoffwechselwege signifikant beeinflusst wurden, die möglicherweise Hinweise auf höhenassozierte Pathologien aufzeigen.

3 Material und Methoden

Ziel der vorliegenden Studie ist es, Auswirkungen einer hypobaren Hypoxie entsprechend einer simulierten Höhe von 15.000 ft, in 30 Minuten bzw. 60 Minuten Zeitintervallen an 80 männlichen Probanden zu untersuchen. Dazu wurden Untersuchungstechniken der Proteomik sowie bioinformatische Netzwerkanalysen angewandt, um qualitative und quantitative Vergleiche des Serumproteoms durchzuführen und signifikant beeinflusste Stoffwechselwege zu identifizieren.

3.1 Definitionen

3.1.1 Hypobare Hypoxie

Der Organismus ist während des Aufenthalts in der Hochebene oder beim Fliegen einem im Vergleich zur Meereshöhe geringerem Atmosphärendruck ausgesetzt, der mit zunehmender Höhe kontinuierlich abnimmt ¹².

Der Terminus „Hypobare Hypoxie“ beschreibt einen durch zunehmende Höhe logarithmisch abfallenden Umgebungsdruck, der eine daraus entstehende Gewebehypoxie auslöst.

Die Gaszusammensetzung der Atmosphäre besteht vereinfacht aus Stickstoff (78 %), Sauerstoff (21 %), Kohlendioxid (0.03 %) und einem geringen Anteil an Edelgasen und bleibt mit zunehmender Höhe konstant. Auf Meereshöhe beträgt der Luftdruck der Erdatmosphäre 1013,25 hPa. Der Abfall des Luftdruckes wird durch die barometrische Höhenformel annähernd beschrieben und ergibt in etwa 1 hPa je 8 Meter. Beim Flug mit einem Verkehrsflugzeug wirkt ein Kabinendruck auf den Körper ein, der den Druckverhältnissen von ca. 8000 ft entspricht ⁵.

Nach dem Dalton'schen Gesetz ergibt sich der Teildruck eines Gases aus seinem prozentualen Anteil an dem Gasgemisch. Somit sind die für den menschlichen Organismus besonders wichtigen Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdrücke bei konstanten Bedingungen abhängig vom Gesamtdruck. Vor allem der geringe Sauerstoffpartialdruck in der inspirierten Luft muss durch den Körper auf unterschiedliche Weise kompensiert werden, um Pathologien zu vermeiden.

Kurzfristig erhöhen sich kompensatorisch die Atemtiefe, die Atemfrequenz sowie die Herzfrequenz, um das Gewebe suffizient an einem Gasaustausch zu beteiligen ^{3,5}. Außerdem kommt zu einer Verengung der Lungengefäße sowie langfristig zu einer Erhöhung der Erythropoetin-Produktion.

Plötzliche Druckänderungen können im luftgefüllten Mittelohrraum sowie den Nasennebenhöhlen zu einem eingeschränkten Druckausgleich über die Eustachische Röhre führen. Schmerzen, Disäquilibrium sowie Hörverlust können die Folge sein ⁵.

Zelluläre Reaktionen auf hypobare Hypoxie werden durch Expressionsunterschiede bestimmter Gene realisiert, die über Regulationsmechanismen zu einer veränderten Proteinexpression führen¹⁰. Eine Schlüsselfunktion nimmt dabei der Hypoxie induzierbare Faktor 1 (HIF1) ein, der die Sauerstoffversorgung des Gewebes unter hypoxischen Bedingungen durch Aktivierung von Genen erleichtert¹⁰.

Vor allem Phosphorylierungen sowie posttranslationale Modifikationen von Proteinen kompensieren die kurzfristige Reduktion der Sauerstoffversorgung¹⁰.

Bei Erschöpfung der höhenassoziierten Kompensationsmechanismen kann es, abhängig von der Aufstiegs geschwindigkeit, der absoluten Höhenänderung und der individuellen Physiologie, zur Ausprägung einer Höhenkrankheit (AMS) kommen¹³. Der Schweregrad der AMS kann anhand der Lake Louise Kriterien abgeschätzt werden³ und kann konsekutiv zu den bedrohlichen Krankheitsbildern des höhenassoziierten Lungenödems (HAPE) und des höhenassoziierten Hirnödems (HACE) führen^{5,13-15}.

Präventiv wirken neben einem angemessenen Aufstiegsprofil und ausreichender Akklimatisierung auch eine künstliche Anhebung der Sauerstoffkonzentration und/oder die Erhöhung des Luftdruckes. Letzteres findet beispielsweise Anwendung in Flugzeugkabinen. Der Höhenabstieg stellt zur Behandlung aller Formen von höhenassoziierten Pathologien die wirksamste Intervention dar^{5,14}.

Wissenschaftliche Studien haben sich zum Ziel gemacht, Biomarker zu detektieren, die das Auftreten von höhenassoziierten Pathologien prognostizieren können⁸. Besonders posttranslationale Modifikationen von Proteinen spiegeln eine realitätsnahe Anpassung des Organismus auf hypobare Hypoxie wider und können mithilfe von Analyseverfahren der Proteomik erfasst werden⁴.

Hypobare Druckkammern ermöglichen eine Versuchsdurchführung unter standardisierten Bedingungen und können durch ihre gute Steuerbarkeit zu einem kontrollierten Versuchsablauf mit maximaler Probandensicherheit beitragen.

3.1.2 Proteomik

Die Proteomik hat sich durch Verbesserungen biologischer Methoden und den computergestützten technologischen (bioinformatischen) Fortschritt stetig weiterentwickelt und stellt mittlerweile einen leistungsfähigen Ansatz dar, um Daten mit hohem Durchsatz zu generieren¹⁶.

Gene tragen die Erbinformation und dienen als Vorlage der Proteinsynthese. Das Forschungsgebiet der Genomik beschäftigt sich mit der systemischen Untersuchung des Genoms, also der Gesamt-DNA einer Zelle oder eines Organismus.

Das Transkriptom wiederum ist definiert als die Gesamtheit aller mRNA und die Vorlage der Proteinsynthese in einem als Translation bezeichneten Prozess. Es spiegelt eine Genauswahl wider, die auf jeweilige Umwelteinflüsse reagiert und eine Auswahl der gesamten Geninformation darstellt.

Als Proteom wird die Gesamtheit aller Proteine des Organismus bezeichnet, welche zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert werden. Es stellt eine dynamische Reflexion einer Gen-Umweltbeziehung dar und schließt posttranslationale Proteinmodifikationen mit ein. Das Gen unterliegt auf dem Weg zum regulierten Protein einer Vielzahl von Variationen und Modifikationen. Posttranslationale Modifikationen, wie etwa Phosphorylierungen und Alkylierungen stellen grundlegende Regulationsmechanismen dar, die die Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen und der Proteomik gut zugänglich sind. Dadurch kann das Verständnis von Anpassungsvorgängen auf sich ändernde Umweltbedingungen durch die Proteomik entscheidend erweitert werden ⁸.

Proteomanalysen beruhen vor allem auf massenspektrometrischen Analyseverfahren zur Proteinidentifikation und einer Untersuchung der Proteininteraktion durch bioinformatische Netzwerkanalysen. Eine besondere Herausforderung stellt die Erfassung von niedrigfrequenten Proteinen des Organismus dar, die unterschiedlichste Aufreinigungs- und Trennungsmethoden bedürfen. Ein bedeutender Vorteil der Proteomik ist die einfache Probengewinnung über das Probandenserum. Durch die Untersuchung des Blutserums lassen sich sensitive Veränderungen des Proteoms erkennen und regulierte Signalkaskaden identifizieren.

3.1.3 Plasmaproteine und deren Modifikationen

Proteine bestehen aus Aminosäureketten und kommen in verschiedenen Zellkompartimenten vor. Plasmaproteine sind durch ihr Vorkommen im Blutplasma durch Blutabnahmen eine leicht zugängliche Probe. Mit Ausnahme der Immunglobuline werden sie in der Leber produziert und haben vielfältige Funktionen. Eine Transportfunktion erfüllen sie, indem sie mit Hormonen, Vitaminen, Mineralien, Ionen, Medikamenten oder wasserunlöslichen Stoffen wie Lipiden eine Bindung eingehen. Effektorfunktionen führen Plasmaproteine als Enzyme aus, indem sie Reaktionen katalysieren.

Spezifische Membranproteine tragen zur Kompartimentierung der Zelle bei und schaffen somit Reaktionsräume. Ihr Vorkommen im Blutplasma kann beispielsweise bei Zellschädigung nachgewiesen werden. Die Größe, das Molekulargewicht sowie chemische, physikalische als auch biochemische Eigenschaften der jeweiligen Proteine sind für deren Barrieregängigkeit zuständig. Jene Proteincharakteristika sind ebenso verantwortlich für Interaktionen untereinander und deren Löslichkeit im Blutplasma. Konzentrationsverhältnisse der einzelnen

Plasmaproteine zueinander sind zur Analyse physiologischer und pathophysiologischer Zustände von immenser Bedeutung und variieren teils stark durch Exposition mit unterschiedlichsten Umweltbedingungen. Die höchste Plasmaproteinkonzentration weist das humane Serumalbumin auf ¹⁷. Es ist zur Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks der Gefäße sowie zum Molekültransport von immenser Bedeutung. Auch die Immunglobuline IgG, IgA und IgM sind Plasmaproteine, die in den Plasmazellen des Knochenmarks produziert werden und wie Proteine des Komplementsystems Teil des humoralen Immunsystems sind. Gerinnungsfaktoren sind Plasmaproteine, die von essenzieller Bedeutung für die Blutgerinnung sind ¹⁸.

Posttranslationale Modifikationen können die Eigenschaften und Funktionen von Proteinen über eine veränderte Proteinstruktur beeinflussen und Signalwege dadurch regulieren ⁸.

Bekanntere Modifikationen stellen unter anderem die Phosphorylierung, die Lipidierung und die Glykosylierung dar. Ein entscheidender Vorteil der Proteomik ist die Miterfassung eben dieser Proteinmodifikationen. Diese chemisch modifizierten Proteine können sich in ihrer Ladung, Konformation und Stabilität teilweise erheblich voneinander unterscheiden. Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben resultieren daraus schlussendlich veränderte Wanderungsprofile. Diese Tatsache trägt entscheidend zur Komplexität proteomischer Studien bei und erfordert eine sorgfältige Analyse der Auswirkungen auf die Stoffwechselfunktion.

Varianzen im Zeitpunkt des Zellzyklus und unterschiedliche Ausprägungen der Zellantwort auf sich wechselnde Umweltbedingungen lassen Rückschlüsse vonseiten des identifizierten Proteins zur dahinterstehenden Genetik nur in geringem Umfang zu. Vielmehr ist eine synergistische Betrachtung von Genom und Proteom zur Identifikation höhenassoziierter Anpassungsvorgänge des Proteinstoffwechsels von Vorteil.

3.2 Studiendesign

In der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektiv klinisch randomisierte Studie, die am Universitätsklinikum zu Köln durchgeführt wurde. Einflüsse einer hypobaren Hypoxie wurden in der vorliegenden Studie an 80 Probanden in drei Vergleichen analysiert (s. Tabelle 1). Dabei wurden die Probanden vier unterschiedlichen Versuchsgruppen randomisiert zugeteilt:

- Hypobare Hypoxie entsprechend 15000 ft für 30 Minuten, N=20
- Hypobare Hypoxie entsprechend 15.000 ft für 60 Minuten, N=20
- Kontrollgruppe (0ft) für 30 min, N=20
- Kontrollgruppe (0ft) für 60 min, N=20

Verglichen wurden anschließend die Blutserumproben dieser jeweils 20 Probanden mit den Blutserumproben jener Probanden, die in gleicher Anzahl und Zeit keiner hypobaren Hypoxie ausgesetzt waren (Vergleich 1 und 2). In einem dritten Vergleich wurden die Proteinexpressionsprofile beider Interventionsgruppen mit unterschiedlicher zeitlicher Exposition (30 vs. 60 Minuten) miteinander verglichen. Differenziell exprimierte Proteine zwischen den Versuchsgruppen wurden anschließend durch bioinformatische Netzwerkanalysen auf ihre Regulierung und Interaktion hin untersucht.

Abbildung 1: Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen



3.3 Auswahl der Probanden und Versuchsgruppenbildung

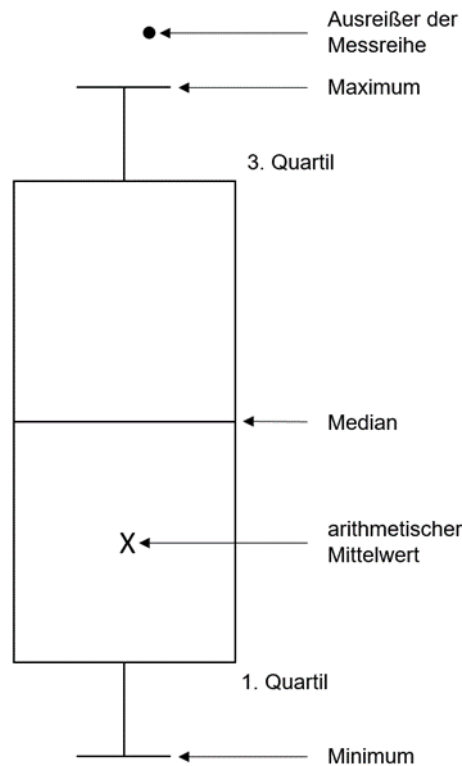
Insgesamt wurden 80 Männer im Alter zwischen 18 und 70 Jahren rekrutiert, die keine akuten oder chronischen Vorerkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, des Hals-Nasen-Ohrenbereiches oder der Lunge aufwiesen. Des Weiteren durften keine Einschränkungen des Druckausgleiches während eines Fluges bekannt sein. Klaustrophobie stellte ebenfalls ein Ausschlusskriterium zur Teilnahme dar.

Die Probanden wurden in vier unterschiedliche Versuchsgruppen in randomisierter Weise eingeteilt. Jede Versuchsgruppe beinhaltete 20 Probanden. Die beiden sogenannten „Interventionsgruppen“ waren 30 bzw. 60 Minuten einer hypobaren Hypoxie entsprechend 15.000 ft ausgesetzt. Bei zwei weiteren Versuchsgruppen wurden im gleichen Zeitintervall keine hypobare Hypoxie simuliert (Kontrollgruppen), um Vergleichswerte zu erhalten. Sie wurden gleichwohl in die Druckkammer gesetzt, es fand jedoch keine Druckinitiation statt.

3.4 Dokumentation der Sauerstoffsättigung

Zur Kontrolle der Vitalparameter wurde bei jedem Probanden vor, während und nach dem Aufenthalt in der Druckkammer die periphere Sauerstoffsättigung gemessen und dokumentiert. Die Sauerstoffsättigungen der Probanden wurden entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeiten in Whiskers Boxplots dargestellt (Schemazeichnung Abb. 2).

Abbildung 2: Schemazeichnung statistischer Messwerte



3.5 Druckkammer und Druckprofil

Die Druckkammer der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Köln der Firma Haux Life Support (Karlsbad, Deutschland) ist für den Ein-Personen Betrieb zugelassen und wird hauptsächlich zu Forschungszwecken verwendet. Druckprofile lassen sich sowohl unter hyperbaren als auch hypobaren Bedingungen steuern. Außerdem ist die Wahl eines manuellen oder automatischen Modus möglich. Innentemperatur, Luftfeuchtigkeit und Atemgasgehalt der Druckkammer entsprechen den Parametern des Raumes.

Für die Versuchsdurchführung wurde zur besseren Vergleichbarkeit das Druckprofil im computergesteuerten Modus durchgeführt. Für die Interventionsgruppen mit einem Ziel-Umgebungsdruck entsprechend 15.000 ft (572 mbar), wurde eine Druckänderungsrate von 85,6 mbar/min gewählt und nach 5 Minuten erreicht.

3.6 Versuchsablauf

Nach Prüfung der Zulassungskriterien zur Studienteilnahme und der Aufklärung des Probanden konnte der Versuch beginnen. Jedem Probanden wurde sowohl vor als auch nach dem Druckkammeraufenthalt Blut abgenommen und unmittelbar bei 5.000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

Anschließend wurden die Proben bei -80 °C tiefgefroren. Die Probanden, die zur „Kontrollgruppe 30 min“ bzw. „Kontrollgruppe 60 min“ gehörten, nahmen in der Druckkammer Platz, wurden jedoch keiner hypobaren Hypoxie ausgesetzt. Die Probanden der Interventionsgruppen begannen mit einer 5 Minuten andauernden Druckänderungsphase, bis der Umgebungsdruck in der Kammer einen Wert von 572 mbar erreicht hat. Daraufhin waren die Probanden entweder 30 Minuten oder 60 Minuten der konstanten hypobaren Hypoxie ausgesetzt. Eine 5-minütige Dekompensationsphase schloss sich an, bis der Ausgangsumgebungsdruck erreicht wurde.

Während des Versuchs wurde die periphere Sauerstoffsättigung stetig gemessen und ein SpO₂-Wert von 68 % bzw. die Abnahme des Wohlbefindens des Probanden als Abbruchkriterium des Versuchs gewählt.

Nach Erreichen des Ausgangsumgebungsdruckes wurde dem Probanden ein zweites Mal Blut abgenommen, dessen Serum ebenso wie jenes der Vorprobe anschließend bei -80 °C tiefgefroren wurde.

3.7 Externe Laborarbeiten

Die im Versuch gewonnenen Blutserumproben wurden an das Labor TobLab (Martinsried, Deutschland, ISO 9001:2015) zur Vorbereitung der eigenen untersuchungsspezifischen Analyse gesendet und dort biochemisch ausgewertet. Die im Labor durchgeführten Untersuchungsschritte bis zur Proteinbestimmung (Kapitel 3.7.1.-3.10) und deren Ergebnisse ergeben sich aus den Untersuchungsberichten des Labors und werden nachfolgend übernommen bzw. zusammengefasst oder ergänzt.

3.7.1 Probenreinigung (Proteinisolierung)

Die Reinigung der Blutserumproben von zellulären Bestandteilen, Verunreinigungen und hoch abundanten Proteinen erfordert die Berücksichtigung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Proteine, die sich untereinander stark voneinander unterscheiden.

Mit Hilfe immunologischer Separation durch „High Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Resin“ wurden die zuvor bei Raumtemperatur aufgetauten Serumproben im Labor (TopLab, Martiensried) von den hoch abundanten Proteinen; Human Serum Albumin

(HSA), Albumin, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, Kappa- und Lambda-Lichtketten, Alpha-1-säuerliches Glykoprotein, Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-2-Makroglobulin, Apolipoprotein A1, Fibrinogen, Haptoglobin und Transferrin getrennt. Durch diesen Schritt wurden >95 % dieser 14 hochfrequenten Proteine, welche 95 % der Plasmaproteine ausmachen, aus den Serumproben abgetrennt, um die niedrigfrequenten Proteine einer anschließenden Identifizierung durch Massenspektrometrie und 1D- oder 2D-Gelelektrophorese, zuzuführen. 50 µl jeder einzelnen Serumprobe wurden gepoolt, anschließend 4x 10 µl Serum auf vier High Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Säulen aufgetragen und 10 Minuten lang inkubiert. Das Depletionsharz enthält hochspezifische immobilisierte Antikörper, die eine spezifische Interaktion mit den hoch abundanten Proteinen eingehen. Zur Erfolgskontrolle wurde das nun mit niedrigfrequenten Proteinen angereicherte Filtrat mithilfe einer SDS PAGE-Analyse und einem BCA-Assay untersucht.

Der weiterhin erhebliche Anteil hoch abundanter Proteine in der Probe erforderte einen weiteren Depletionsvorgang. Die vollständige Probe jeder Versuchsgruppe wurde dazu in einem 2 ml „Lo-Bind-Reaktionsgefäß“ für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE und BCA-Assay analysiert. „Die Abreicherung von Proteinen mit hoher Häufigkeit ermöglicht den Nachweis von Proteinen mit geringerer Konzentration in der Probe und die anschließende Identifizierung durch Massenspektrometrie, 1D- oder 2D-Gelelektrophorese“.

3.7.2 BCA-Assay

Die zweiwertigen Kupferionen der Bicinchoninsäure reagieren proportional zur kupferreduzierenden Proteinkonzentration zu einwertigen Kupferionen. BCA bildet gemeinsam mit Cu^{2+} einen violetten Farbstoff mit einer Wellenlänge von 562 nm, der fotometrisch ausgewertet werden kann. Somit kann durch Messung des Absorptionsspektrums der Proteingehalt unbekannter Proben mit bekannten Proteinstandards verglichen werden. Für den Versuch wurde ein Pierce™ BCA Protein Assay Kit (#23225) und ein Fotometer der Marke BioSpectrometer® Basic (Eppendorf AG Hamburg), verwendet.

3.7.3 1D SDS PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die zur Molekülmassenauftrennung verwendet wird und Rückschlüsse auf die Reinheit und Konzentration des Proteingemisches erlaubt.

In einem ersten Schritt werden die Proteine mit dem Detergens „SDS“ bei 90 °C denaturiert und erhalten eine einheitliche, negative Ladung. Die Eigenladung der Proteine folgt einem annähernd gleichen Verhältnis von Ladung/Masse (1,4 g SDS pro 1 g Protein). Es besteht

eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molmasse und den Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid Micellen.

Das im Experiment verwendete diskontinuierliche Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem wurde durch Laemmli im Jahre 1970 eingeführt. Das SDS-Protein Anion wandert im elektrischen Feld zur Anode.¹⁹

Die Mobilität der Protein-Ionen wird durch die spezifische Molmasse bestimmt, wonach sich ein Geschwindigkeitsgradient zwischen langsam laufenden, schweren Proteinen zu sich schnell bewegenden, leichten Proteinen einstellt. Die Protein-Ionen lassen sich entweder durch den spezifischen Nachweis eines Proteins durch Western Blot oder durch einen Farbstoff wie Coomassie-Blau darstellen.¹⁹

Im Versuch wurden 5 µl jeder gepoolten Serumprobe mit 250 µl Wasser (HPLC-Grad) und 245 µl 3-fach reduziertem SDS-Probenpuffer [30 % Glycerin; 187,5 mM Tris pH 6,8; 6 % SDS, 3 % DTT] verdünnt.

Des Weiteren wurden 1/25 der Serumproben nach der Depletion (~55-60 µl) mit 30 µl 3-fach reduziertem SDS-Probenpuffer [30 % Glycerin; 187,5 mM Tris pH 6,8; 6 % SDS; 3 % DTT] verdünnt. Anschließend wurden die Proben für 5 min lang bei 90 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte auf einem Tris-Glycin-Gel T (4-20 %) von Serva (SERVAGel™ TG 4-20, Kat. Nr. 43230.01 der Firma Serva, Heidelberg, Deutschland). Pro Spur wurden 5 µl der präparierten Proben vor der Depletion und 1/3 der präparierten Proben nach der Depletion (27-30 µl) auf das Gel geladen.

Zur Abschätzung des Molekulargewichtes der Proteine wurden 5 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Protein-Testmischung 6, Kat. Nr. 39207.01 der Firma Serva, Heidelberg, Deutschland) und 5 µl eines vorgestellten Proteinmarkers (Serva Triple Color Protein Standard III, Kat. Nr. 39258 der Firma Serva, Heidelberg, Deutschland) ebenfalls pro Gel geladen. Der ungefärbte Serva-Standard enthielt Massen, die 97, 67, 45, 29, 21, 12,5 bzw. 6,5 kDa entsprachen. Der vorgefärbte Standard bestand aus blau markierten Proteinen bei 245, 180, 135, 100, 63, 48, 35, 20, 17, 11 und 5 kDa, einem rot markierten Protein bei 75 kDa und einem grün markierten Protein bei 25 kDa. Bahnen ohne Proteinbelastung wurden stattdessen mit 1x Probenpuffer gefüllt, um einen gleichmäßigen Gel-Lauf zu gewährleisten.

Der Gel-Lauf wurde für 20 Minuten bei 10 mA durchgeführt. Die größte Trennfähigkeit wurde bei 25 mA und einer Begrenzung auf 500 V beobachtet. Nach 90 min wurde der Vorgang abgeschlossen und das Gel mit kolloidaler Coomassie-Färbung visualisiert. Anschließend nach Entfärbung durch deionisiertes Wasser, wurde ein visueller Scanner (CanoScan 9900F) mit einer Auflösung von 300 dpi angewandt.

3.8 2D DIGE

Eine sehr häufig verwendete Proteinfractionierungstechnik der Proteomik stellt die 2D-DIGE dar, welche die isoelektrische Fokussierung mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese kombiniert. Besonders um die Proteinexpressionsniveaus zweier Proben miteinander zu vergleichen, ist die 2D-DIGE die Methode der Wahl.

Nach der Proteinreinigung werden die Proben mit Cyanin-Farbstoffen markiert. Die Cyanin-Farbstoffe reagieren mit 1-2 % der Lysinreste der zu analysierenden Proteine durch kovalente Bindungen. Die drei Cyaninfarbstoffe Cy2 (Interner Standard), Cy3 und Cy5 weisen unterschiedliche Anregungs- und Emissionswellenlängen auf. Die Zuteilung der Farbstoffe zu den jeweiligen Versuchsgruppen ermöglicht eine gleichzeitige Migration mehrerer Proteinproben in einem Gel und dient der besseren Vergleichbarkeit.

Der interne Standard beinhaltet das Proteom der Interventions- als auch der dazugehörigen Kontrollgruppe. Er ist wichtig, um biologische- und experimentelle Variationen zu bewerten. Die Auftrennung der Probe geschieht in zwei Dimensionen. Das Protein wandert zunächst horizontal im elektrischen Feld so weit, bis der Umgebungs-pH-Wert seinem isoelektrischen Punkt entspricht und die Nettoladung gleich null ist. Nach der horizontalen Ausrichtung der Proteine gemäß ihrer Ladung schließt sich die vertikale Auftrennung der Proteine nach ihrer Molmasse an. Dabei erhalten die Proteine durch das SDS-haltige Gel eine einheitlich negative Nettoladung und bewegen sich senkrecht zur ersten Dimension entsprechend ihrem individuellen Molekulargewicht. Dabei wandern kleinere Moleküle relativ weiter als große Moleküle ^{20,21}.

Die Spot-Muster der Gele werden durch komplexere Algorithmen computergestützt abgeglichen und analysiert. Bildanalyseprogramme scannen die fluoreszenz-markierten Proteine und visualisieren das Proteinspotmuster.

3.8.1 Probenmarkierung und 2D-DIGE Versuchsablauf

Im Versuch wurden die Proteinproben zunächst gepuffert und aufkonzentriert. 100 µg Protein jeder entnommenen Serumprobe wurde mit einem Markierungspuffer verdünnt (30 mM Tris, pH 8.5; 7 M urea; 2 M thiourea, 4 % CHAPS, Roche complete protease inhibitor cocktail, Pefablock SC protease inhibitor) und mit einem Ultrafiltrationsgerät (Vivaspin 500) bis zu einem Cut-off Wert von 5 kDa neu gepuffert. Die für das Experiment verwendeten Serva-Farbstoffe (Sci2, Sci3 und Sci5), weisen identische Eigenschaften wie Cy2®, Cy3® und Cy5® der Marke GE Healthcare Company auf (Tabelle 1).

Insgesamt wurden die Proben dreifach verdünnt und volumenreduziert, bis sich in 75 µl Markierungspuffer schließlich eine Proteinkonzentration von 1,33 mg/ml befand. Anschließend wurden 50 µg des gepoolten Serums der Kontrollgruppen 30 min und 60 min jeweils mit „Sci3“

markiert. 50 µg des gepoolten Serums der 30 min und 60 min Interventionsgruppen wurden mit „Sci5“ versetzt.

Zusätzlich wurden 25 µg der 30 min Interventionsgruppe mit 25 µg der dazugehörigen Kontrollgruppe zu einem 50 µg internen Standard zusammengeführt. In Analogie dazu wurden die 60 min Gruppen ebenfalls zu einem internen Standard zusammengefasst. Beide internen Standards wurden jeweils mit Sci2 (blau) markiert. Für jede Markierungsreaktion mit Sci2, Sci3 und Sci5 wurden 50 µg Protein (16,7 µl) auf 400 pmol SciDye aufgebracht.

Nachdem die Reaktion für 30 min auf Eis stattfand, wurde diese durch Zugabe von Lysin nach weiteren 10 Minuten gestoppt.

Tabelle 1: Anfärbung der Proben

Reaktion	Gel	Probe	Protein [µg]	Dye
1	1	Interner Standard	50 µg	Sci2
2		Kontrolle 30 min	50 µg	Sci3
3		Interventionsgruppe 30 min	50 µg	Sci5
4	2	Interner Standard	50 µg	Sci2
5		Kontrolle 60 min	50 µg	Sci3
6		Interventionsgruppe 60 min	50 µg	Sci5

Die markierten Proben, deren Reaktion in einem 2D-DIGE-Gel gemeinsam ablaufen sollten, wurden zusammengefasst und mit Lysepuffer B (7 M urea; 2 M thiourea; 4 % CHAPS; Roche complete protease inhibitor cocktail, Pefablock SC protease inhibitor) auf 140 µl aufgefüllt und anschließend (2 % Servalyte und 1 % DTT) ergänzt.

Schließlich wurden 180 µl Rehydratationspuffer (6 M urea; 2 M thiourea; 2 % CHAPS; 1 % DTT; 1 v/v % Servalyte 3-10 Iso-Dalt for 2D, Roche complete protease inhibitor cocktail; Pefablock SC protease inhibitor) zu jeder Probe hinzugefügt. Zur Durchführung der ersten Dimension wurden die Proben unmittelbar nach der Markierung auf zwei 18 cm IPG-Streifen der Firma Serva (T= 4 %; C= 2.7 %) mit „In-Gel-Rehydratation“ gegeben.

Die IPG-Streifen wurden mit 320 µl der Probe für 16 Stunden bei Raumtemperatur rehydriert. Die isoelektrische Fokussierung wurde bei insgesamt ~83 kVh durchgeführt. Die Temperatur der Reaktionen betrug 20 °C. Die Stromstärke war auf 75 µA pro Bande begrenzt. Zur Anwendung kam die IEF 100 Fokussiereinheit von Hofer.

Die IPG-Streifen wurden mit Dithiothreitol für 10 Minuten, zur Reduktion der Proteine, behandelt. Die anschließende Alkylierung der freien Sulfhydrylgruppen wurde für weitere 10 Minuten durch Beimengung einer Iodacetamidlösung erreicht.

In der zweiten Dimension wurden die Proteine auf zwei handgemachte Gele (T= 13 %, C= 2,6 %) mit einem SDS Glycin-Tris-Puffer gegeben und ein Molekulargewichtsstandard

(SERVA Electrophoresis GmbH, Protein-Testmischung 6) zur Kontrolle der zweiten Dimension verwendet, um 97, 67, 45, 29, 21, 12,5 bzw. 6,5 kDa abzubilden.

3.8.2 Bilderfassung

Zur Visualisierung der Proteinmuster wurden die 2D DIGE Gele durch einen Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) mit einer Auflösung von 100 µm gescannt.

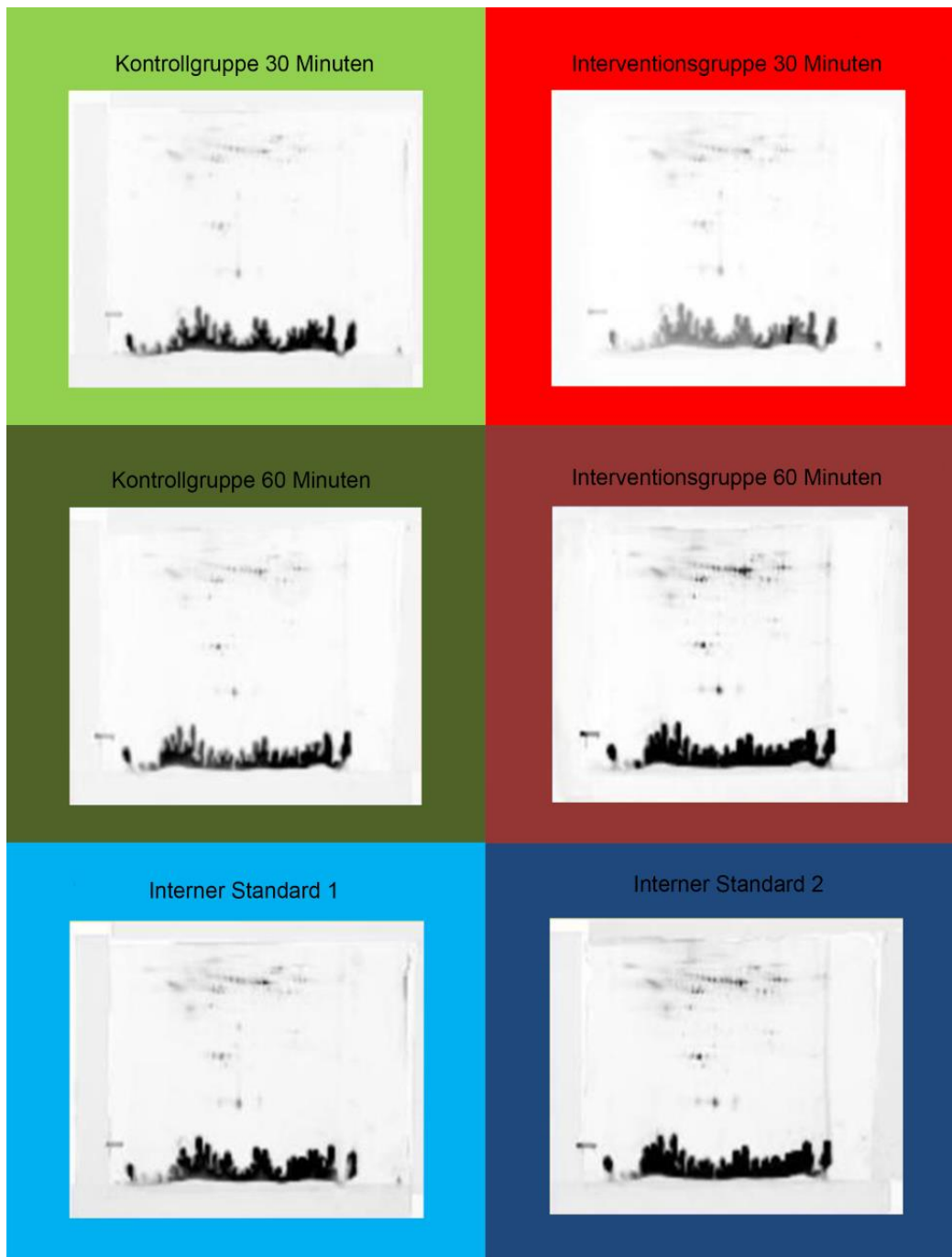
- Sci2: laser: 473 nm filter (nm): 530 DF20
- Sci3: laser: 532 nm filter (nm): 570 DF20
- Sci5: laser: 635 nm filter (nm): 665 LP

Die mit den Proben beladenen 2D-DIGE-Gele wurden über Nacht mit kolloidaler Coomassie Färbung behandelt (5 % aluminum sulfate hydrate, 10 % Ethanol, 0.02 % Coomassie G250, 2 % o-phosphoric acid). Nach Entfärbung mit deionisiertem Wasser wurden die Gele mit einem visuellen Scanner (CanoScan9900F) und einer Auflösung von 300 dpi gescannt.

3.8.3 Computergestützte Auswertung der 2D-Gele

Mithilfe der Delta 2D-Bildanalysesoftware [Decodon, Version: 4.8 Final 23 (201809271707)] wurden die Scan-Dateien weiter analysiert und nach den vier Versuchsgruppen sortiert. In Abbildung 3 sind die jeweiligen Proteinspotmuster abgebildet: 30 min Kontrollgruppe (hellgrün); Interventionsgruppe 30 min (hellrot); Kontrollgruppe 60 min (dunkelgrün); Interventionsgruppe 60 min (dunkelrot); Interner Standard 1 (hellblau); Interner Standard 2 (dunkelblau).

Abbildung 3: Proteinspotmuster der Versuchsgruppen nach 2D-Gelelektrophorese



Zur Visualisierung und Analyse wurden die Graustufenbilder der Gele in das Programm Delta 2D importiert und mit der sogenannten Warming-Strategie "In-Gel Standard Warming" bearbeitet. Der Prozess wurde automatisch durchgeführt und manuell geprüft und bestätigt. Das Cy2-Gel jeder Probe wurde mit den Cy3- und Cy5-Aufnahmen desselben Gels durch Anwendung der "Warming-Strategie" bearbeitet und anschließend eine Fusionsaufnahme aus allen Cy3- und Cy5-Bildern erzeugt.

Die Spoterkennung wurde ausschließlich im Fusionsbild durchgeführt, da es alle im Experiment entstandenen Spots enthielt. Durch geringfügige Anpassung der Detektionsparameter und der Isolierung von Staub- und Farbartefakten wurde eine Anzahl von 500-800 Spots erreicht. Das relative Graustufenwertvolumen berechnet sich aus dem Verhältnis des absoluten Graustufenwertvolumens des entsprechenden Spots zu der Gesamtheit der Graustufenwerte aller markierten Spots. Dadurch wird ein quantitativer Vergleich zwischen den Spotintensitäten der jeweiligen Gele gezogen, nachdem die Software aus der Gesamtheit der Graustufenpixel für jeden Spot das absolute Graustufenwertvolumen berechnet hat.

Zwischen den Gelbildern der Interventionsgruppen und den der entsprechenden Kontrollgruppen wurde ein quantitativer Vergleich der Spotintensitäten durchgeführt.

Für einen errechneten Wert von 2,0 bedeutet dies, dass die Spotintensität gegenüber der Referenz zweifach gestiegen ist. Ein Verhältnis von 0,5 drückt eine Verringerung um das Doppelte aus. Unveränderte Spotintensitäten haben idealerweise ein Verhältnis von 1,0. Als ein signifikanter Unterschied wurde ein Wert von $> 2,0$ bzw. $< 0,5$ angenommen.

3.9 MALDI-TOF

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie (engl. Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight) ist ein Verfahren, das durch Erzeugung von Massenspektren die Grundlage zur Proteinidentifikation anhand von Datenbanksuchen ermöglicht.

Durch einen Laserstrahl wird der Analyt an der Matrix ionisiert und in eine Gasphase überführt. Die protonierten Ionen werden anschließend am TOF-Massenanalysator in einem elektrischen Feld mit konstanter Spannung beschleunigt. Dabei verhalten sich die Ionen gemäß ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z). Aus der Größe der Ionen resultieren unterschiedliche „Flugzeiten“, die am Detektor quantifiziert werden. Das Verhältnis von Molekülmasse zu Ladung ist dem Quadrat der Flugzeit gegenüber proportional. Demnach lässt sich die jeweilige Masse des Analyten durch dessen Flugzeit berechnen. Die detektierten Peaks der Massenspektren aus der Probe bilden Proteinfingerabdrücke, die durch Datenbankrecherchen zur Proteinidentifikation führen^{22,23}.

In der vorliegenden Studie wurden die detektierten Proteinspots manuell aus dem 2D-DIGE-Gel herausgelöst. Unter Verwendung eines Acetonitril enthaltenen Puffers, wurden die Proben entfärbt. Über Nacht wurde eine In-Gel-Verdauung mit 0,006-0,02 μg Trypsin (Serva, Sequenzierungsgrad, Kat. Nr. 37283) in 10 mM NH_4HCO_3 Puffer durchgeführt. Anschließend wurden die Proben auf einer Matrix (10 mg/ml α -Cyanohydroxymizsäure) co-kristallisiert.

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem 48000 Proteomics Analyser MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer (ABSciex) im Positivionenreflektormodus (Erfassungsbereich m/z 700-4500) erzeugt. Das gleiche Gerät wurde auch für die Tandem-Massenspektrometrie genutzt. 4.000 Aufnahmen wurden zu 125 Aufnahmen pro Subspektrum zusammengefasst. GPS Explorer-Software (AB Sciex) verarbeitete die Rohdaten.

Die Kalibrierung erfolgte extern durch einen Peptidkalibrierungsstandard. Abschließend konnten die gemessenen monoisotopischen Peptidmassen und die Tandem-MS-Spektren miteinander kombiniert werden. Mit der Datenbank „Swissprot“ (20259 menschliche Sequenzen; Aktualisierung: Januar 2018) unter Verwendung der Mascot-Software, konnte die Proteinidentifikation schließlich abgeschlossen werden.

3.10 Mascot

Die Mascot-Software ermöglicht auf Grundlage massenspektrometrischer Daten eine wahrscheinlichkeitsbasierte Identifizierung von Proteinen. Das Programm lässt sich auf der Webseite von Matrix Science (www.matrixscience.com) kostenfrei nutzen. Um wahrscheinlichkeitsassoziierte Scores für Proteine zu berechnen, werden die durch Massenspektrometrie gefundenen Peptidfragmentierungsspektren mit Sequenzdatenbanken abgeglichen und deren Signifikanz als statistische Scores angegeben.⁹

Der Mascot-Score ist ein statistischer Score, um auszudrücken, wie gut die experimentellen Daten mit der Datenbanksequenz übereinstimmen. Er ist der summierte Score der einzelnen Peptide eines Proteins. Je höher er sich ausdrückt, desto größer die Wahrscheinlichkeit, dass der gefundene Proteinspot das jeweilige Protein darstellt. Ein Mascot-Score >100 wurde zur Festlegung des zugrunde liegenden Proteins als Grenzwert angenommen und seine Ausprägung als Entscheidungskriterium zwischen mehreren in Frage kommenden Proteinen herangezogen. Darüber hinaus wird als Validierungsmethode auch die FDR (False Discovery Rate) ($FDR = FP/(FP+TP)$) aus „false positive“ und „true positive“ berechnet.

Eine Carbamidomethylierung von Cystein wurde als feste Modifikation und die Oxidation von Methionin als variable Modifikation festgelegt. Eine Enzymsspaltung bis zu einer fehlenden Spaltstelle wurde toleriert. Die Vorläufermassentoleranz wurde auf 100 ppm und die Fragmentionenmassentoleranz auf 0,5 Da eingestellt.

3.11 Bioinformatische Netzwerkanalysen

3.11.1 STRING

Die aus der Massenspektrometrie erhaltenen und durch Mascot ausgewerteten Daten wurden durch die Software „STRING“ (Search tool for the retrieval of interacting genes/proteins) weiterverarbeitet. In der neuesten Version (Stand Dezember 2019) von STRING 11.0 (<https://string-db.org/>) werden insgesamt 5.090 Organismen erfasst und deren Proteininteraktionsinformationen durch Datenbankrecherchen und rechnerische Vorhersagen beschrieben.

Die Integration der Daten umfasst ebenfalls direkte (physikalische) wie indirekte (funktionale) Proteininteraktionen. Proteinassoziationen definieren sich sowohl durch hemmende als auch durch unterstützende Interaktionen²⁴. Die Kombination beider Interaktionstypen wird gewählt, da physikalische Wechselwirkungen lediglich <1 % der theoretisch möglichen Wechselwirkungen abdecken²⁵. Es ist daher wichtig, möglichst viele Arten der Wechselwirkungen zu erfassen und zu integrieren. Dazu zählen: „stabile physikalische Assoziationen, transiente Bindungen, Substratverkettungen, Informationsvermittlungen und andere“²⁶.

Die durch die Mascot-Analyse charakterisierten Proteine können auf der Software-Plattform hochgeladen werden, und es kann zwischen unterschiedlichen Operatoren gewählt werden. Es lassen sich 7 verschiedene Funktionen einstellen:

- Experimentenkanal
- Datenbankkanal
- Textmining-Kanal
- Koexpressionskanal
- Nachbarschaftskanal
- Fusionskanal und
- Koexistenzkanal.

Die „KEGG-Datenbank“ (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) und die „Gene ontology“ bilden dabei eine wichtige Referenz. Die haben sich zum Ziel gemacht, „funktionale Hierarchien biologischer Systeme in verschiedenen Organismen“ bioinformatisch zu repräsentieren. Außerdem werden Klassifizierungssysteme verwendet, die auf „Text mining“ beruhen. STRING erstellt Assoziationsnetzwerke, die anschließend in Grafiken visualisiert werden. Es besteht die Möglichkeit, Verlinkungen zu zugrunde liegender Literatur zu folgen. In der vorliegenden Studie wurden alle oben aufgeführten Operatoren/Analysegrundlagen verwendet. Außerdem wurde bei allen Vergleichen das höchstmögliche Konfidenzintervall (0,900) gewählt.

3.11.2 GeneMania

Eine weitere Möglichkeit einer bioinformatischen Netzwerkanalyse bietet die Online-Software „GeneMania“ (<https://genemania.org/>), auf welcher sich experimentell gefundene Gen-Namen hochladen lassen ²⁷. Es wird eine Liste mit Genen erstellt, welche funktionelle sowie vorhergesagte Ähnlichkeiten berücksichtigt und auf derzeit verfügbare Genomik- und Proteomik Datenbanken zugreift. GeneMania erweiterte diese Liste mit weiteren Proteinen, für welche ähnliche Funktionen innerhalb biologischer Netzwerke vorhergesagt werden.

Für das vorliegende Experiment wurde die automatische Gewichtungsmethode von GeneMania gewählt, die 20 weitere Proteine in die Analyse mit einbezieht. Eine große Zahl der Datensätze wurde von „GEO, BioGRID, Pathway Commons und I2D sowie von organismusspezifischen, funktionellen Genomik-Datensätzen gesammelt ²⁸.

Grundlage der Verknüpfungsnachweise bilden die Kategorien: „Co-Expression“, „Co-Lokalisation“, „Genetische Interaktion“, „Signalwege“, „Physikalische Interaktionen“, „Vorhersagen“, „Geteilte Proteindomänen“, „Andere (diese lassen sich keinem der Interaktionen zuordnen)“ und das selbst hochgeladene Netzwerk. Hierbei lassen sich unterschiedliche Gewichtungsalgorithmen wählen ²⁷.

Die Anzahl der assoziierten Proteine, die zusätzlich zu den gefundenen Proteinen in die Analyse mit einbezogen werden sollen, kann manuell festgelegt werden. Standardmäßig werden 20 der relevantesten Proteine zu dem Netzwerk hinzugefügt und eine durch GeneMania qualifizierte Gewichtungsmethode der Quellenpriorisierung angewandt. Eine eigene Gewichtung unter Einbeziehung unterschiedlicher Interaktionsnachweise kann durch den Nutzer ebenfalls gewählt werden.

Für die vorliegende Studie wurde die durch Mascot-Analyse als differenziell exprimierten Gennamen der Proteine auf der GeneMania-Plattform hochgeladen. Es wurden alle oben genannten verfügbaren Interaktions-Analysen angewandt und mit 20 durch GeneMania berechneten verwandten Proteinen ergänzt. Somit ließen sich mögliche, durch hypobare Hypoxie beeinflusste Stoffwechselwege nachvollziehen.

3.11.3 Perseus

Perseus ist eine Softwareplattform des Max-Planck-Institute of Biochemistry und lässt sich unter <https://maxquant.net/perseus/> kostenlos downloaden. Perseus stellt eine Möglichkeit der Datenvisualisierung und Interpretation von experimentellen Ergebnissen proteomischer Experimente dar. Die in Matrixformat organisierten Daten können in Form von Heatmaps visualisiert und somit quantitative Vergleiche durchgeführt werden ²⁹. Die Matrix ist klassischerweise so aufgebaut, dass Spalten die Zugehörigkeit der Probe zur jeweiligen Versuchsgruppe und Zeilen die identifizierten Proteine darstellen. Zusätzlich wird die

Datenmatrix farblich wiedergegeben und nach hierarchischen Cluster-Algorithmen gruppiert. Die Entfernungen zwischen den Clustern werden entsprechend ihren Ähnlichkeiten bezogen auf ihre relativen Expressionsverhältnisse in einer Heatmap visualisiert. Die Wertebereiche der Datenmatrix werden bestimmten Farben zugewiesen. Somit können Auf- und Ab-Regulationen von Proteinen gut miteinander verglichen werden.

Die Farbskala reicht von Hellgrün für niedrige relative Expressionsniveaus zu Dunkelrot für relativ höhere Expressionsniveaus²⁹.

Die aus der Studie erfassten relativen Proteinexpressionsverhältnisse wurden in Form einer Exceltabelle als Textdatei auf der Plattform hochgeladen. Die Tabelle bestand aus den Proteinnamen (Zeilen) und der dazugehörigen Ratio entsprechend der Versuchsgruppen (Spalten). Bei der Funktion „Z-Score“ wird der Mittelwert jeder Zeile/Spalte von jedem Wert abgezogen. Das Ergebnis wird anschließend durch die Standardabweichung der Zeile/Spalte geteilt.

In einem nächsten Schritt wurde eine hierarchische Clusterbildung der Zeilen und Spalten durchgeführt und eine „Heatmap“ der Matrix mit dazugehörigem Dendrogramm erzeugt. Dabei stellen die drei Säulen die Expressionsunterschiede zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe (30 min) sowie der Kontroll- und Interventionsgruppe (60 min) von links nach rechts in der „Heatmap“ dar. Der Farbgradient der „Heatmap“ visualisiert von Hellgrün (niedrige Werte) zu Dunkelrot (hohe Werte) Veränderungen der Proteinexpression.

3.12 Ethik

Die freiwillige schriftliche Einwilligung des Probanden erfolgte nach ausführlicher mündlicher Aufklärung durch die Studienleiter.

Ein positives Votum der Ethikkommission Köln (Nr. 18-045) lag vor. Die Studie wurde bei clinicaltrials.gov unter der Nummer-NCT0382367 registriert.

4 Ergebnisse

Ziel der Studie war es, Einflüsse auf das Serumproteom während einer 30 bzw. 60-minütigen hypobaren Hypoxie entsprechend 15000 ft mit dem Serumproteom der Kontrollgruppen zu vergleichen, die während des gleichen Zeitintervalls keiner hypobaren Hypoxie ausgesetzt waren. Insgesamt konnten dazu 79 Probandenseren ausgewertet werden. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse geben Rückschlüsse auf mögliche Proteinexpressionsunterschiede zwischen den Interventions- und Kontrollgruppen sowie zwischen den Interventionsgruppen untereinander. Des Weiteren wurden mithilfe bioinformatischer Netzwerkanalysen Signalkaskaden und deren Interaktionen analysiert, die durch hypobare Hypoxie entsprechend 15000 ft in ihrer Regulation beeinflusst wurden.

4.1 Probandencharakteristika

Insgesamt nahmen 80 männliche Probanden im Alter von 18-57 Jahren an der Studie teil. Die Spannweite der Körpergröße betrug 172 cm–203 cm und die Spannweite des Körpergewichts lag bei 63 kg-130 kg. In Tabelle 2 sind die statistischen Messwerte zu den jeweiligen Probandencharakteristika aufgeführt.

Tabelle 2: Probandencharakteristika

	Gruppe	M	P-Wert	SD	Median	Mini	Max
Alter	30 min Intervention	25,7	0,8	9,4	22	18	57
	30 min Kontrolle	23,7		5,9	22	18	44
	60 min Intervention	27,7	0,2	8,4	24	18	47
	60 min Kontrolle	24,1		7,5	23,5	18	52
Größe	30 min Intervention	183,4	0,5	6,8	184,5	173	195
	30 min Kontrolle	185,3		7,1	183	176	203
	60 min Intervention	186,7	0,5	8,9	184	172	200
	60 min Kontrolle	184,2		4,4	185	175	193
Gewicht	30 min Intervention	79,9	0,5	7,0	79	63	90
	30 min Kontrolle	83,4		13,3	81	67	130
	60 min Intervention	81,9	0,8	9,2	81	66	95
	60 min Kontrolle	81,8		10,6	81	65	110

Legende: Alter in Jahren; Größe in cm; Gewicht in kg

M= Mittelwert; SD= Standardabweichung; Mini= Minimum; Max= Maximum

P-Wert bei zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test ($\alpha = 0,05$)

4.2 Sauerstoffsättigung

Nachfolgend sind die statischen Messwerte entsprechend der Schemazeichnung aus Kapitel 2.4 in Whiskers Boxplots (Abb.4-7) integriert. Bei beiden Interventionsgruppen (Abb. 5+7) konnte während der Exposition gegenüber hypobarer Hypoxie einen Abfall der peripheren Sauerstoffsättigung nachgewiesen werden. Die x-Achse stellt den Zeitpunkt der Messung dar, auf der y-Achse ist die periphere Sauerstoffsättigung abgebildet. Ausreißer der Messreihe sind als Punkte dargestellt.

Abbildung 4: Sauerstoffsättigung 30 min Kontrolle

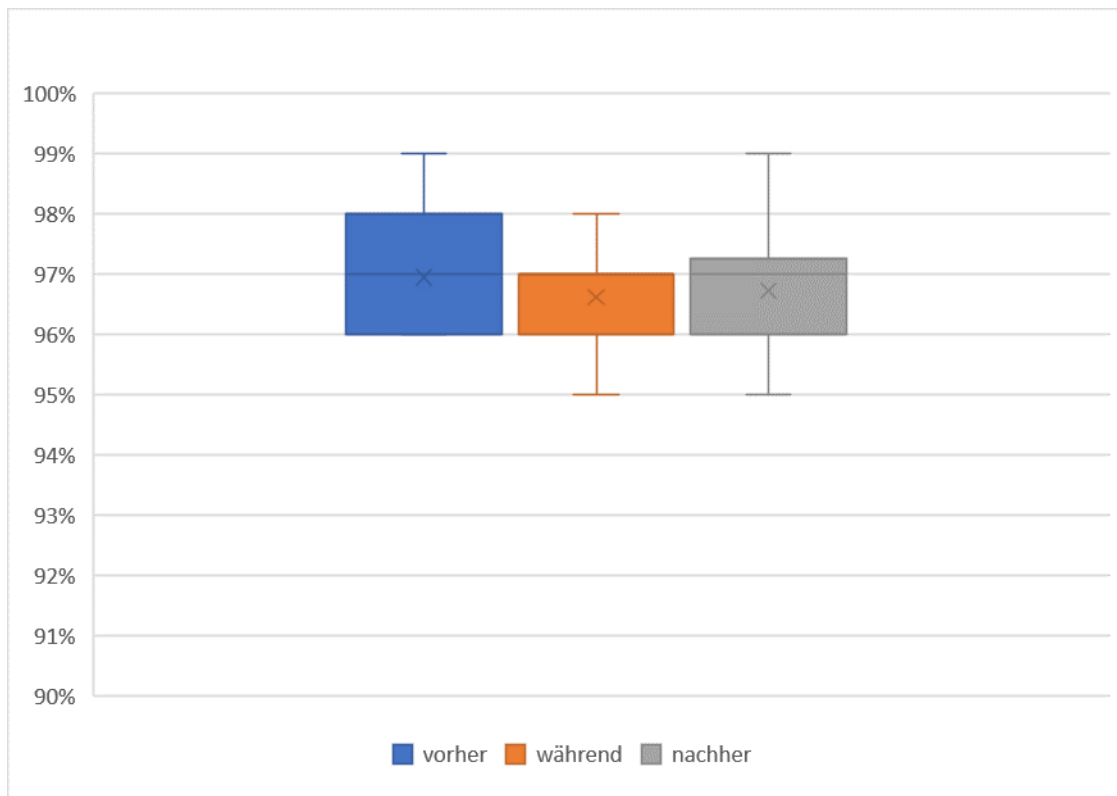


Abbildung 5: Sauerstoffsättigung 30 min hypobare Hypoxie

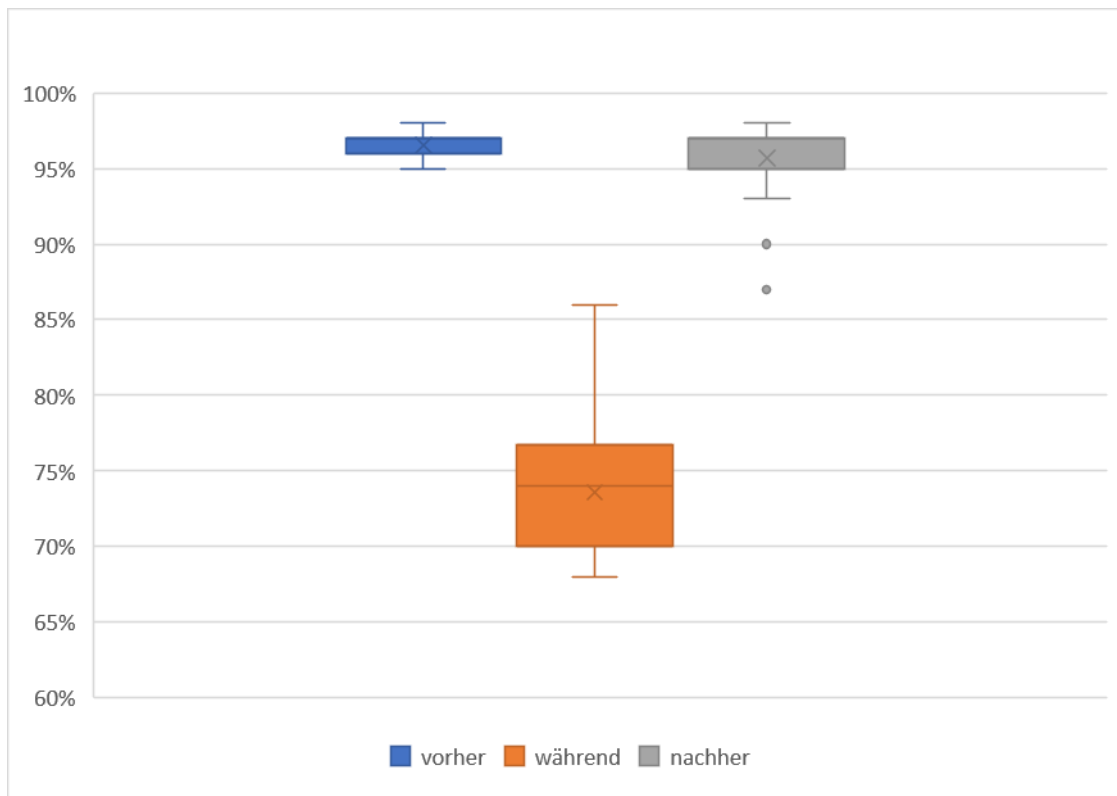


Abbildung 6: Sauerstoffsättigung 60 min Kontrolle

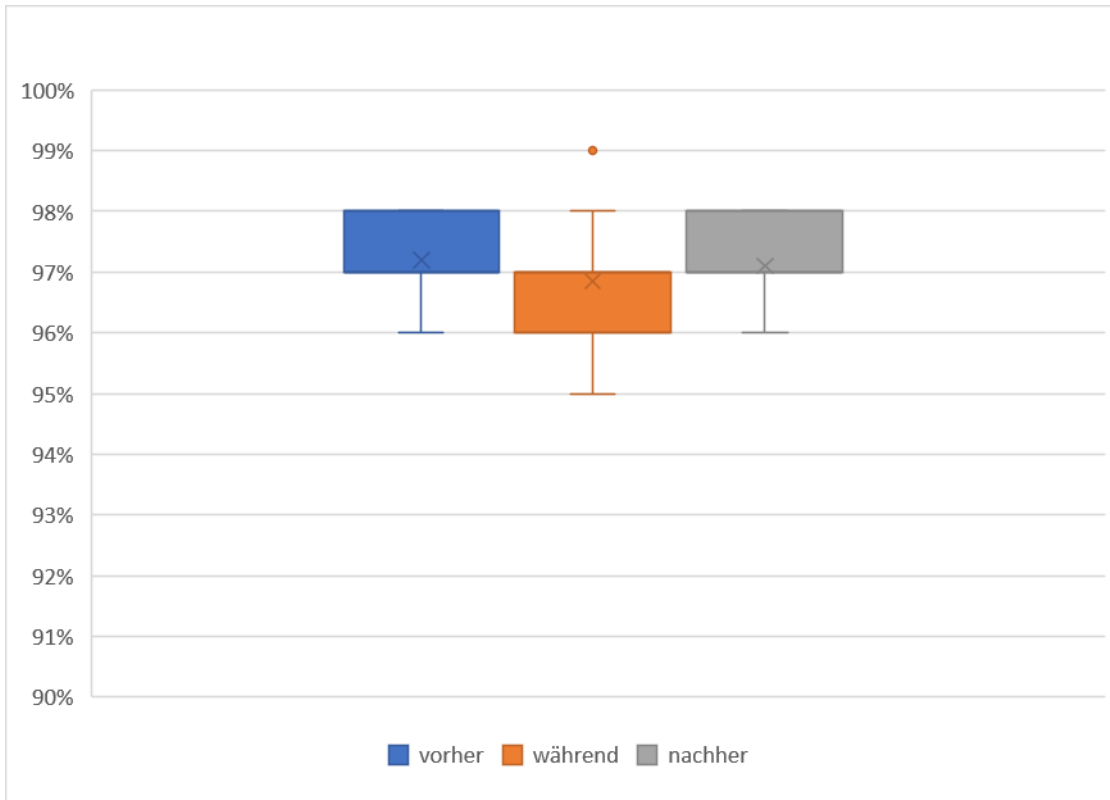
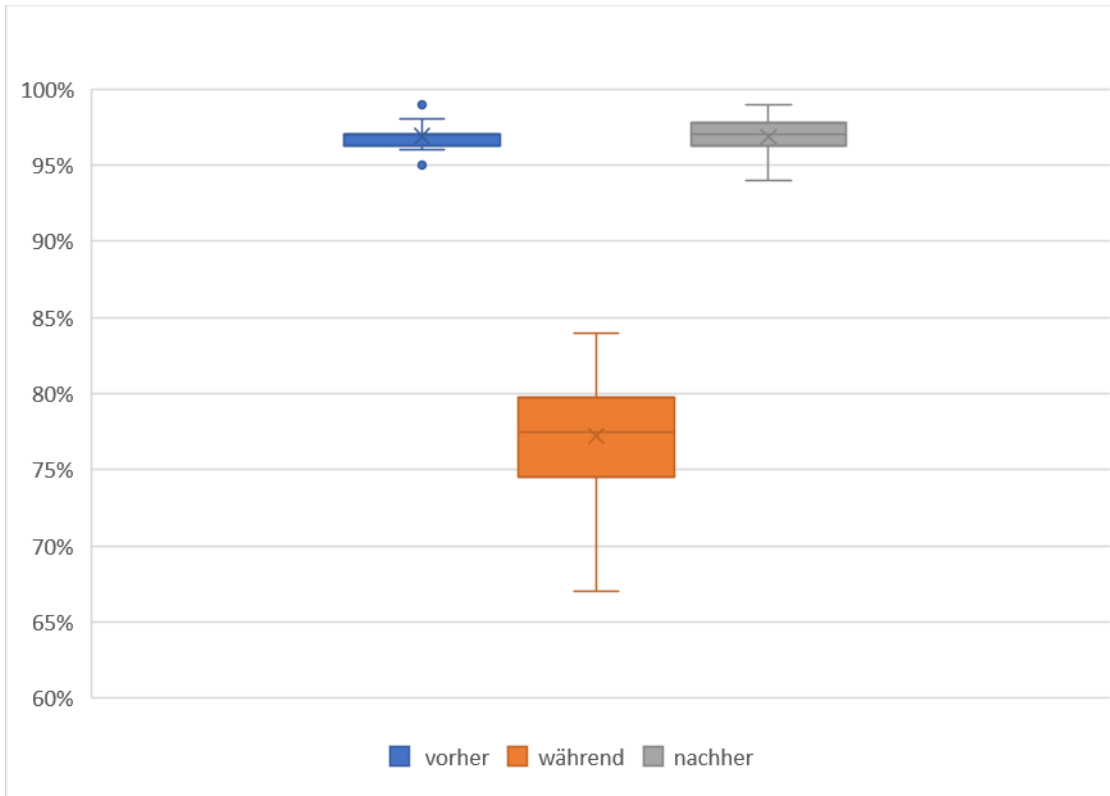


Abbildung 7: Sauerstoffsättigung 60 min hypobare Hypoxie



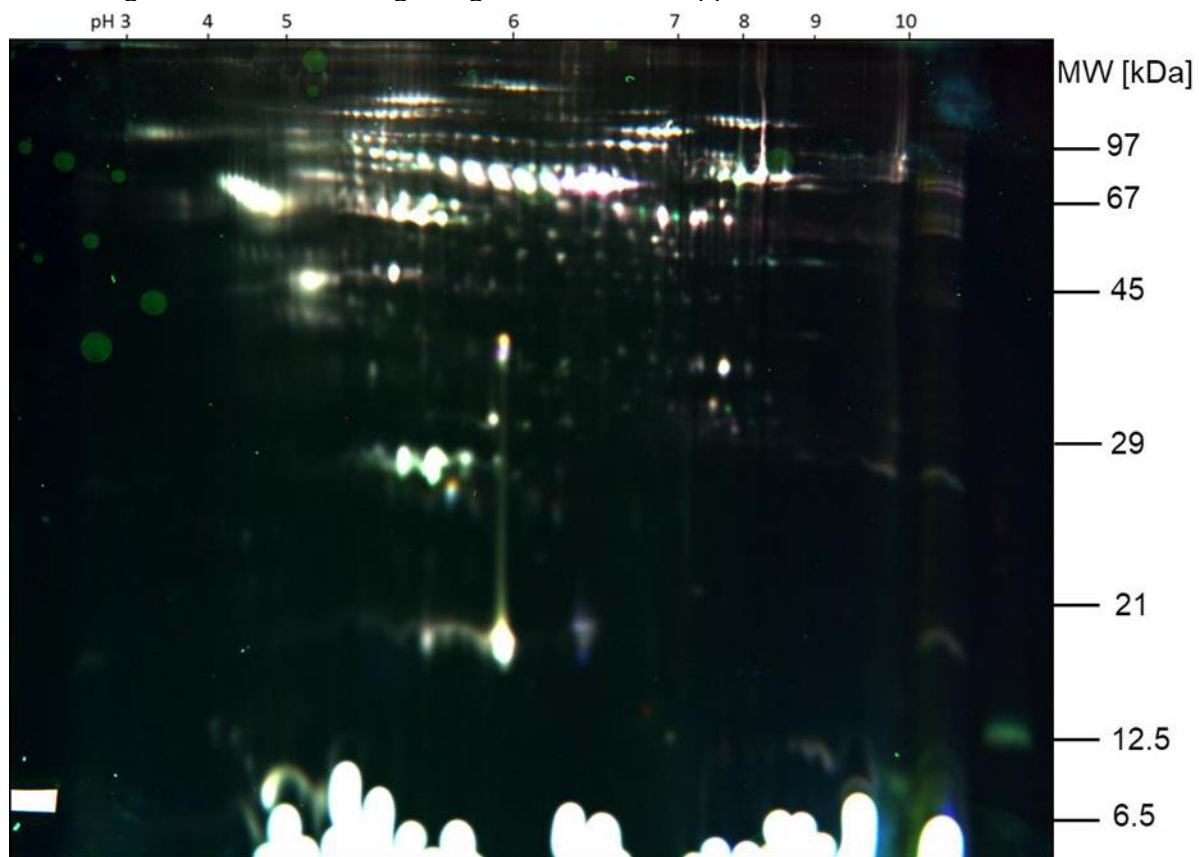
4.3 Probenaufbereitung

Nach dem ersten Depletionsvorgang durch SDS PAGE ließen sich zunächst noch hohe Konzentrationen von Albumin in den Proben (>20 % Albumin) nachweisen. Nach einem weiteren Depletionsvorgang wurden 85-94 % der in der Ausgangsprobe vorhandenen Proteine abgereichert. Eine Gesamtproteinkonzentration von 60 µg/µl wurde gemäß Literatur zur Berechnung der Proteinausbeute nach Depletion angenommen. Die Konzentrationen wurden mit einem BCA-Assay bestimmt und waren für das sich anschließende 2D DIGE-Experiment ausreichend.

4.4 2D DIGE

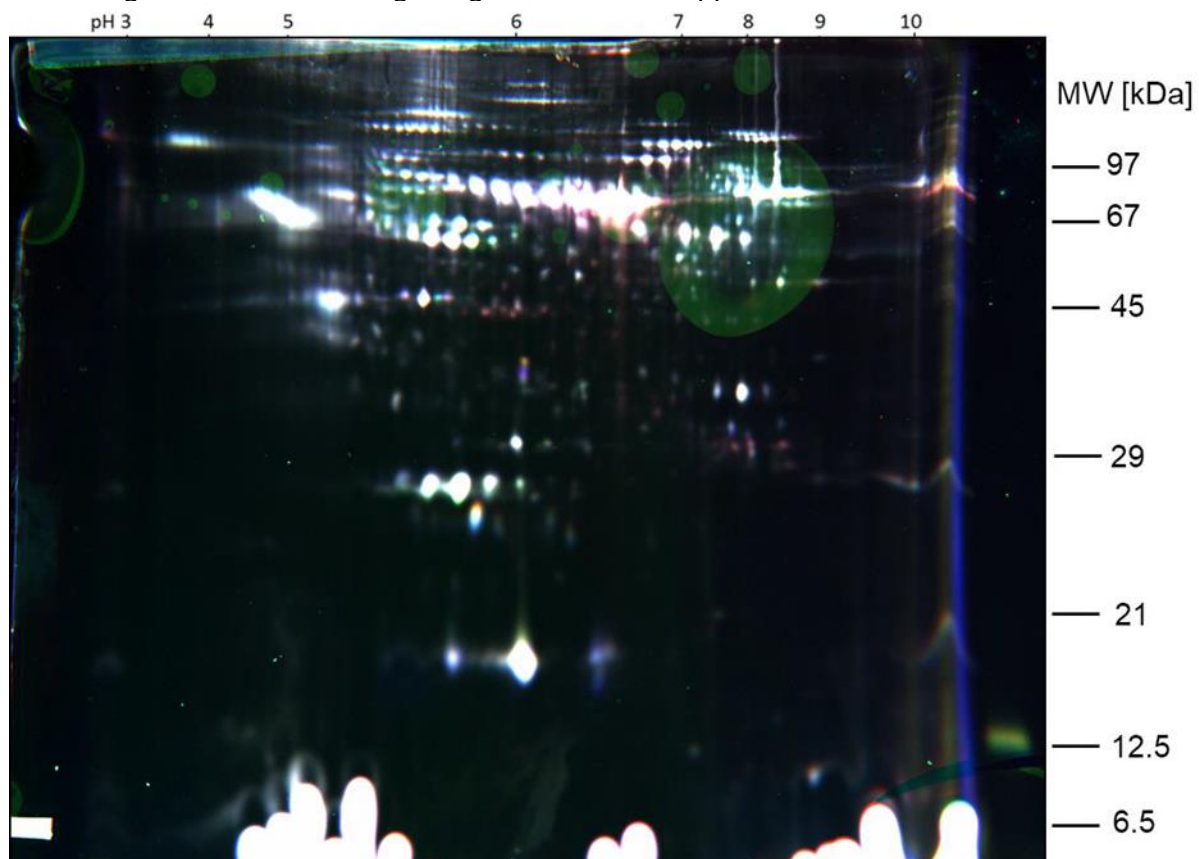
Die zwei 2D DIGE-Gele mit den durch ScyDyes markierten Proben wurden anschließend durch einen Fluoreszenzscanner visualisiert. Die Proben der Kontrollgruppen wurden mit Sci3 markiert. Die Proben der Interventionsgruppen wurden mit Sci5 markiert. Der interne Standard erhielt eine Markierung durch Sci2. Abbildung 8 (30 min Vergleich) und Abbildung 9 (60 min Vergleich) zeigen ein Fusionsbild aller drei Fluoreszenten. Die nachfolgenden 2D DIGE-Überlagerungsbilder stellen das Wanderungsverhalten der Analyten im elektrischen Feld dar. Bei visueller Betrachtung konnten die mit roten Pfeilen markierten Proteinspots im 30 min Vergleich (Abb. 10) und im 60 min Vergleich (Abb. 11) identifiziert werden.

Abbildung 8: 2D DIGE Überlagerungsbild 30 min Gruppen mit Standard



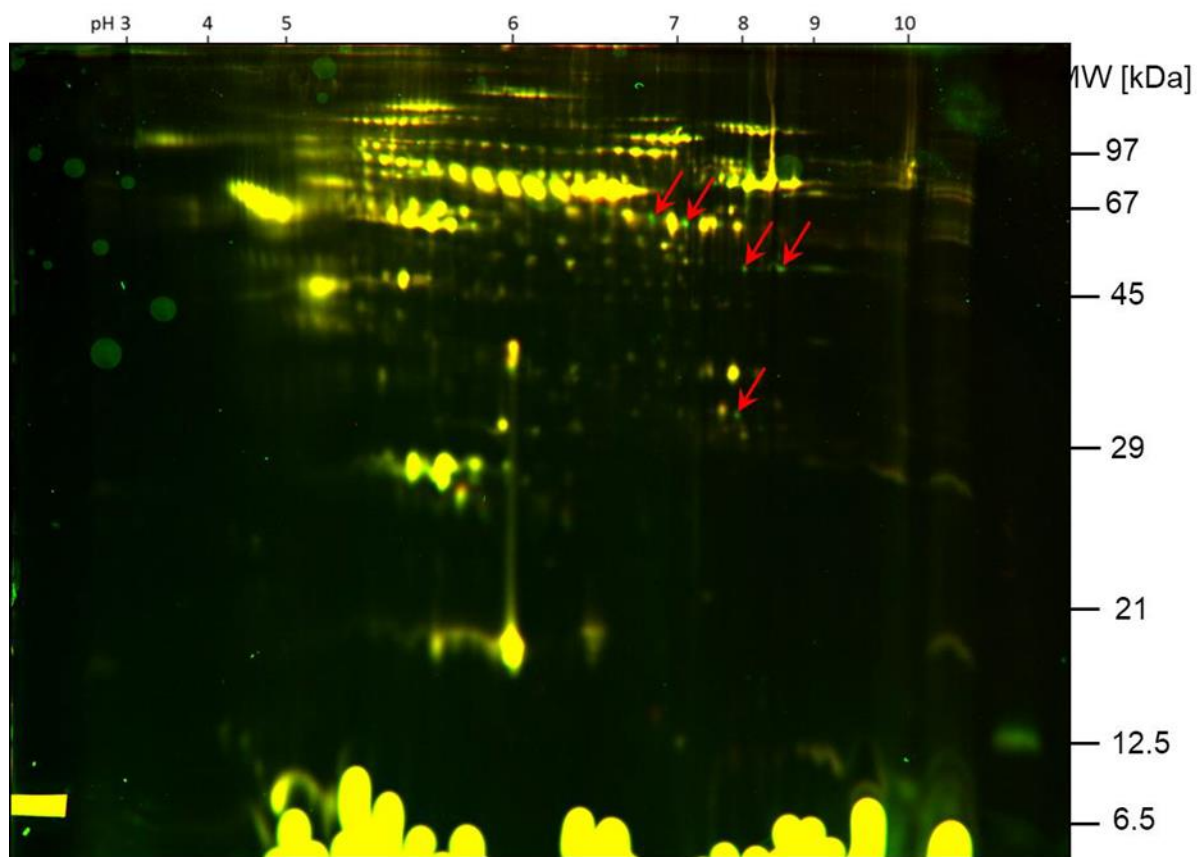
Sci2 (blau): Interner Standard
Sci3 (grün): Kontrolle 30 min.
Sci5 (rot): 30 min hypobare Hypoxie

Abbildung 9: 2D DIGE Überlagerungsbild 60 min Gruppen mit Standard



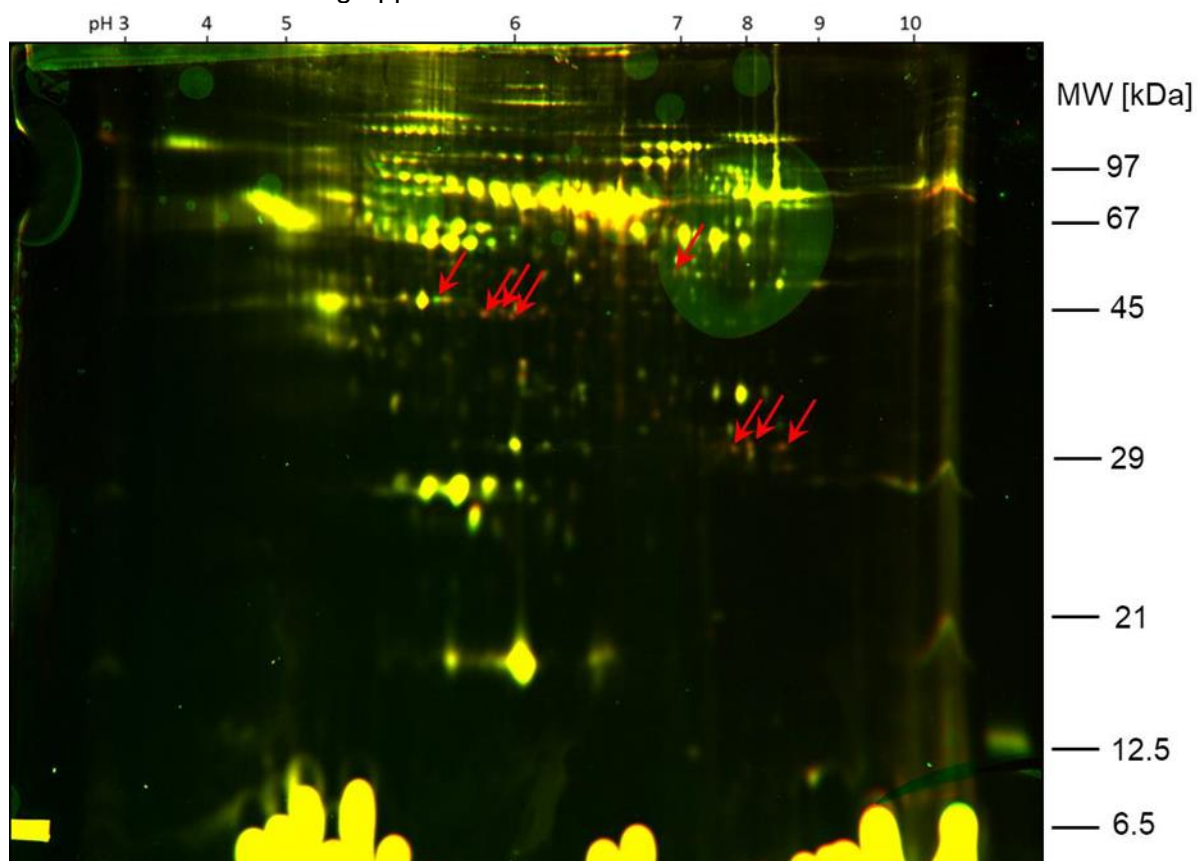
Sci2 (blau): Interner Standard
Sci3 (grün): Kontrolle 60 min.
Sci5 (rot): 60 min hypobare Hypoxie

Abbildung 10: 2D DIGE Überlagerungsbild 30 min Interventionsgruppe mit 30 min Kontrollgruppe



Sci3 (grün): Kontrolle 30 min.
Sci5 (rot): 30 min hypobare Hypoxie
→ Markierung der bereits bei visueller Betrachtung differenziell exprimierte Proteinspots

Abbildung 11: 2D DIGE Überlagerungsbild 60 min Interventionsgruppe mit 60 min Kontrollgruppe



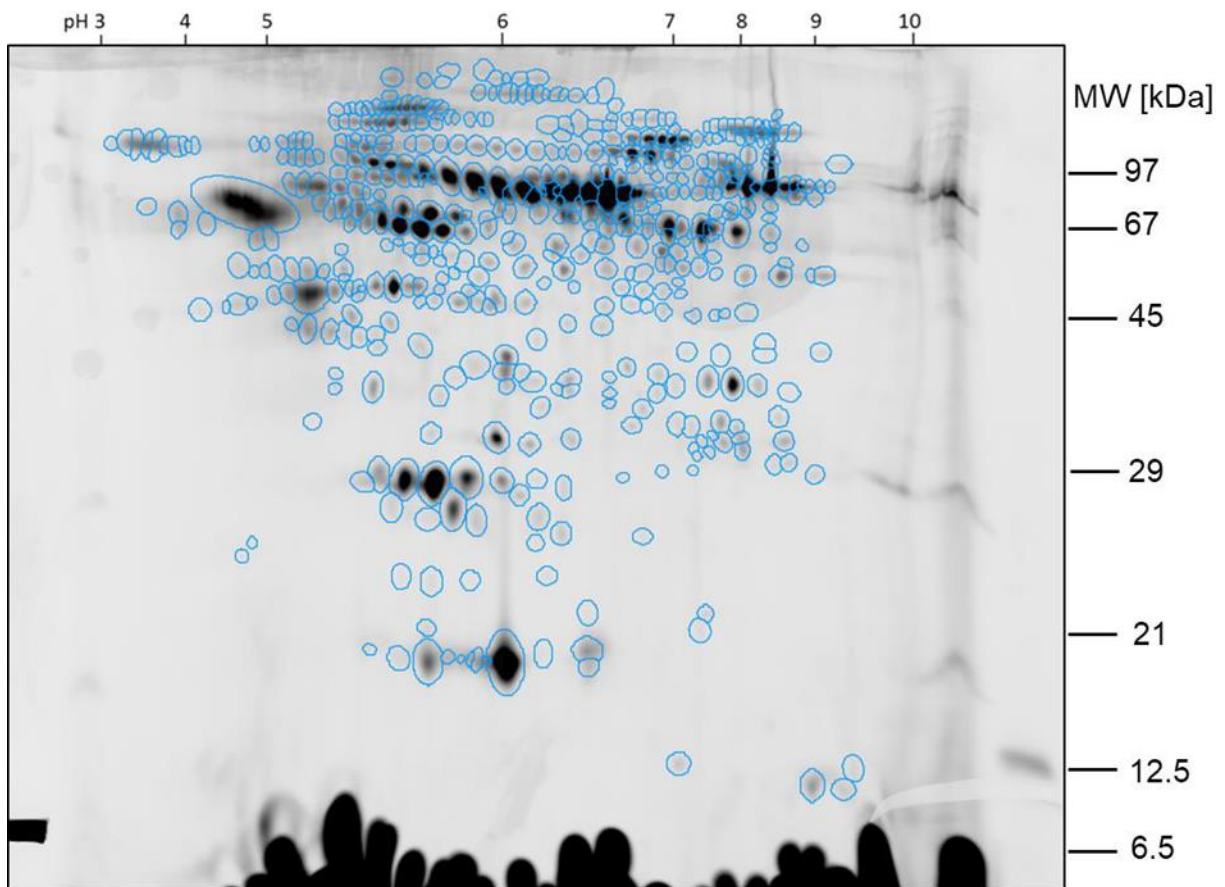
Sci3 (grün): Kontrolle 60 min.
Sci5 (rot): 60 min hypobare Hypoxie
→ Markierung der bereits bei visueller Betrachtung differenziell exprimierte Proteinspots

4.5 Delta 2 D

Durch die Delta 2 D-Bildanalysesoftware wurde von jeder Versuchsgruppe ein Bild und zwei Bilder des internen Standards erzeugt. Somit konnte das Delta 2D-Warping an insgesamt 6 Gelbildern durchgeführt werden.

Der Nachweis von 514 Spots erfolgte im Fusionsgel, welches aus den durchschnittlichen Gelintensitäten der 4 Versuchsgruppen bestand (interner Standard nicht enthalten) und in Abbildung 12 dargestellt ist.

Abbildung 12: Fusionsbild aller Versuchsgruppen



4.6 Vergleiche

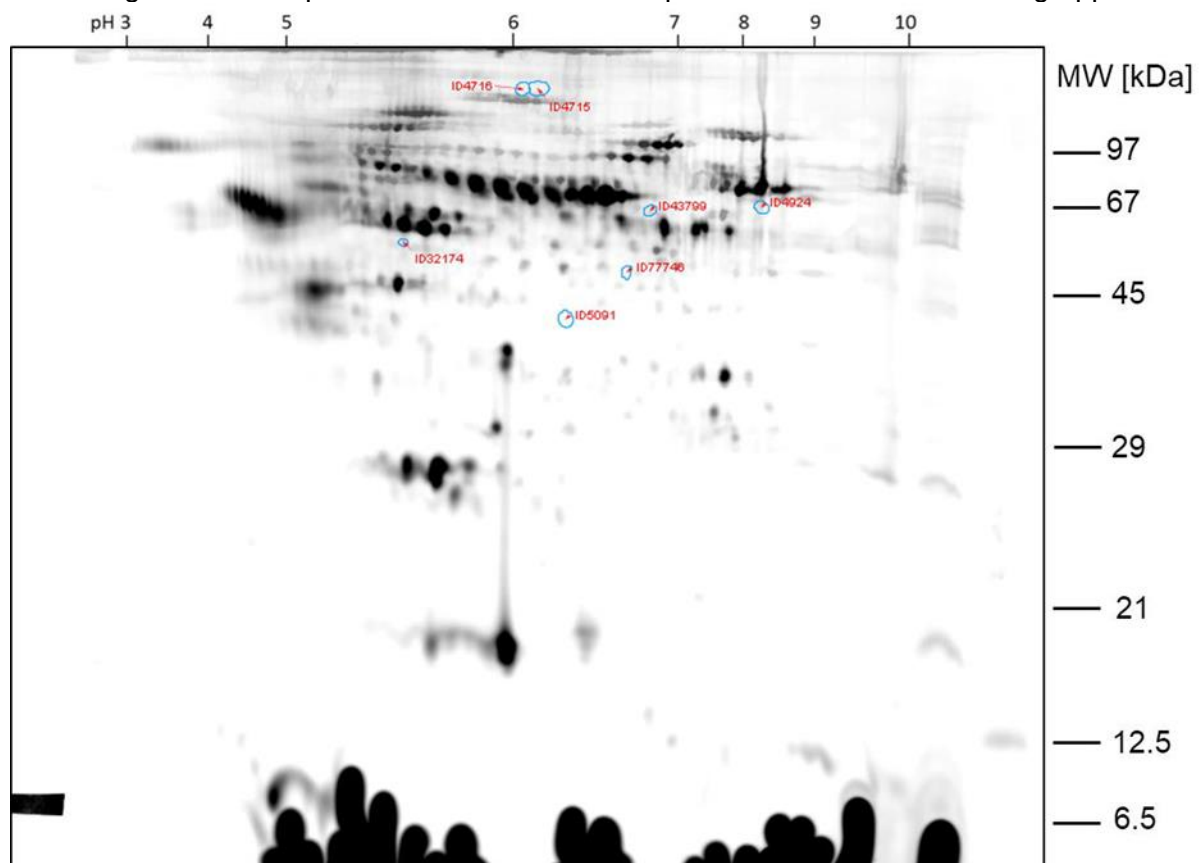
4.6.1 Vergleich 1: Interventionsgruppe 30 min vs. Kontrollgruppe 30 min

Nach Erzeugung eines Überlagerungsbildes beider 30 min Gruppen wurde eine Zweifachänderung der Spotintensität als signifikant erachtet. 94,4 % der Proteinspots waren zwischen den Proben identisch. 7 Proteinspots waren in der Gruppe der 30 min Interventionsgruppe, 22 Proteinspots waren in der 30 min Kontrollgruppe signifikant höher exprimiert.

In Abbildung 13 und 14 sind die entsprechenden Proteinspots markiert. Tabelle 3 listet die Proteinspots mit signifikant veränderter Expression auf.

Bereits durch visuelle Begutachtung zeigten sich in dem Gel die Spots der 30 min Interventionsgruppe mit der ID87229, ID68540 und ID68559 als differenziell exprimiert.

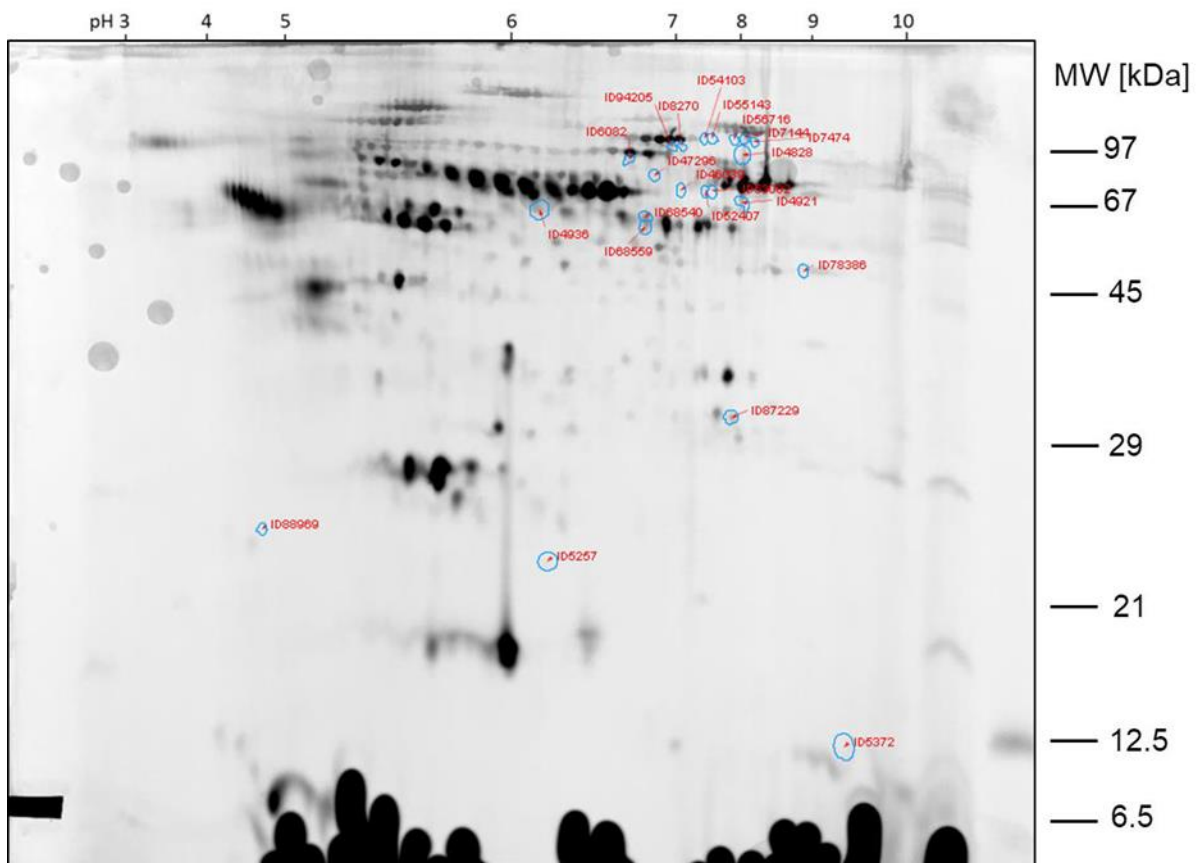
Abbildung 13: Proteinspots mit >2-fach höherer Expression in der Interventionsgruppe 30 min



ID: Identifikationsnummer des Proteinspots;

X-Achse= pH-Werte; Y-Achse= Molekülmasse (MW) in kDa

Abbildung 14: Proteinspots mit >2-fach höherer Expression in der Kontrollgruppe 30 min



ID: Identifikationsnummer des Proteinspots;

X-Achse= pH-Werte; Y-Achse= Molekülmasse (MW) in kDa

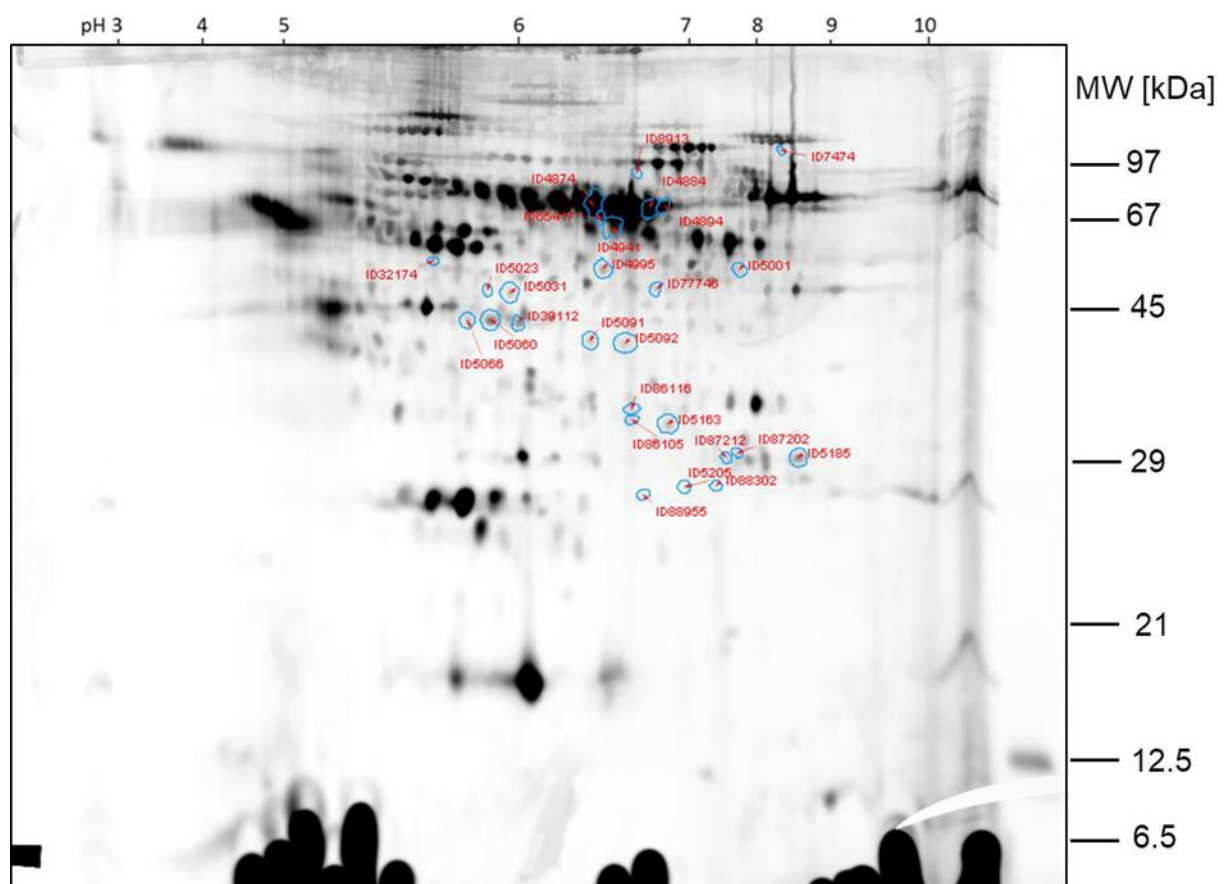
Tabelle 3: Proteinexpressionsunterschiede der 30 min Gruppen

Spot	Identifikationsnummer	Mittleres normalisiertes Spotvolumen 30 min Kontrolle	Mittleres normalisiertes Spotvolumen 30 min HH	Ratio: Hypobare Hypoxie 30 min/ Kontrolle 30 min	Änderungsverhalten
1	ID 32174	56.5	296.3	5.25	2-fach Hochregulation
2	ID 43799	17.5	72.2	4.14	
3	ID 5091	25.2	79.4	3.15	
4	ID 4716	38.2	103.4	2.71	
5	ID 4715	44.0	110.2	2.50	
6	ID 4924	81.8	191.8	2.34	
7	ID 77746	38.8	80.9	2.09	
8	ID 6082	236.7	118.2	0.50	2-fach Herunterregulation
9	ID 78386	146.7	71.0	0.48	
10	ID 68559	168.0	79.9	0.48	
11	ID 4936	315.0	148.7	0.47	
12	ID 4828	150.3	69.7	0.46	
13	ID 5372	159.2	67.9	0.43	
14	ID 94205	323.2	135.3	0.42	
15	ID 52407	161.6	66.4	0.41	
16	ID 47296	331.3	132.7	0.40	
17	ID 5257	89.2	35.7	0.40	
18	ID 4921	181.8	70.1	0.39	
19	ID 54103	171.5	65.8	0.38	
20	ID 8270	391.9	140.2	0.36	
21	ID 7144	191.7	68.4	0.36	
22	ID 68540	173.7	60.2	0.35	
23	ID 87229	233.1	73.7	0.32	
24	ID 56716	221.3	63.1	0.29	
25	ID 7474	270.0	75.7	0.28	
26	ID 46039	461.6	113.9	0.25	
27	ID 55143	191.0	37.4	0.20	
28	ID 53082	207.9	30.2	0.15	
29	ID 88969	243.6	18.1	0.07	

4.6.2 Vergleich 2: Interventionsgruppe 60 min vs. Kontrollgruppe 60 min

Das durch Delta 2D erzeugte Überlagerungsbild der 60 min Interventionsgruppe und der dazugehörigen Kontrollgruppe zeigte zu 91,8 % eine Übereinstimmung der Spotintensitäten. Als Signifikanzniveau wurde erneut eine Änderung der Expression um das 2-fache bestimmt. Demnach zeigten sich 27 Proteinspots in der 60 min Interventionsgruppe und 15 Proteinspots, die in der Kontrollgruppe um mehr als den Faktor 2 in ihrer Expression erhöht waren. In Abbildung 15 und 16 sind die zwischen den 60 min Versuchsgruppen differenziell exprimierten Proteinmuster dargestellt. Tabelle 4 listet die Proteinspots mit signifikant veränderter Expression auf.

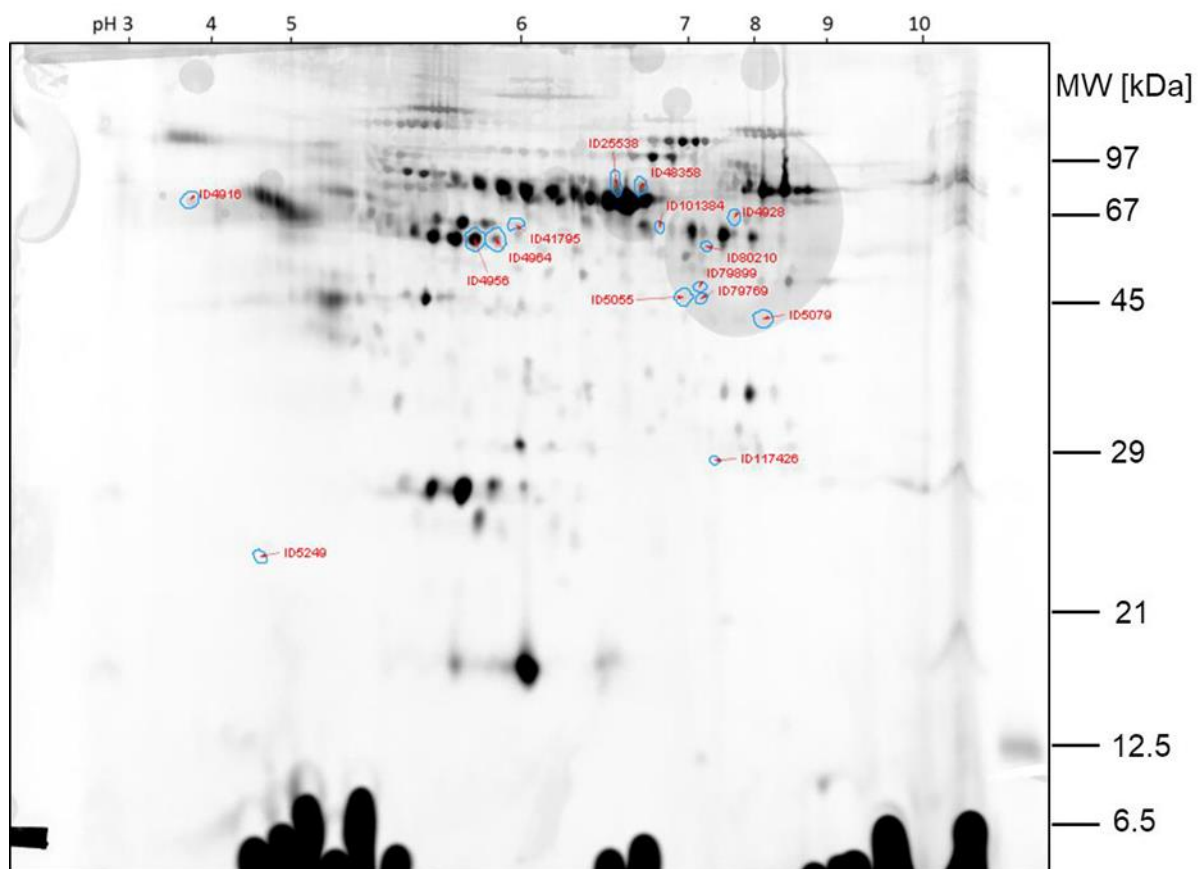
Abbildung 15: Proteinspots mit >2-fach höherer Expression in der Interventionsgruppe 60 min



ID: Identifikationsnummer des Proteinspots;

X-Achse= pH-Werte; Y-Achse= Molekülmasse (MW) in kDa

Abbildung 16: Proteinspots mit >2-fach höherer Expression in der Kontrollgruppe 60 min



ID: Identifikationsnummer des Proteinspots;

X-Achse= pH-Werte; Y-Achse= Molekülmasse (MW) in kDa

Tabelle 4: Proteinexpressionsunterschiede der 60 min Gruppen

Spot	Identifikationsnummer	Mittleres normalisiertes Spotvolumen 60 min Kontrolle	Mittleres normalisiertes Spotvolumen 60 min HH	Ratio: Hypobare Hypoxie 60 min/ Kontrolle 60 min	Änderungsverhalten
1	ID 54023	54.2	489.9	9.05	2-fach Hochregulation
2	ID 88955	45.2	283.2	6.27	
3	ID 87202	54.4	254.0	4.67	
4	ID 4941	267.7	995.1	3.72	
5	ID 32174	19.0	62.3	3.28	
6	ID 77746	70.3	218.6	3.11	
7	ID 65417	159.0	482.5	3.03	
8	ID 87212	83.7	235.0	2.81	
9	ID 5001	98.7	247.2	2.51	
10	ID 4884	96.4	226.9	2.35	
11	ID 4874	74.5	172.5	2.31	
12	ID 5091	99.4	229.3	2.31	
13	ID 86105	85.8	198.0	2.31	
14	ID 7474	109.1	244.2	2.24	
15	ID 4995	119.0	262.9	2.21	
16	ID 4894	107.3	236.8	2.21	
17	ID 5031	103.7	226.3	2.18	
18	ID 5205	119.2	258.7	2.17	
19	ID 5092	116.4	251.8	2.16	
20	ID 5185	99.6	215.3	2.16	
21	ID 5163	95.0	205.1	2.16	
22	ID 86116	81.8	174.4	2.13	
23	ID 5066	105.9	225.4	2.13	
24	ID 8913	133.1	282.2	2.12	
25	ID 39112	112.6	233.3	2.07	
26	ID 88302	97.3	199.9	2.05	
27	ID 5060	99.6	203.1	2.04	
28	ID 4964	156.8	77.8	0.50	
29	ID 4928	64.0	31.1	0.49	
30	ID 4956	158.4	76.5	0.48	
31	ID 5249	116.9	55.6	0.48	
32	ID 117426	124.1	57.9	0.47	
33	ID 41795	125.8	57.2	0.45	
34	ID 79769	176.0	73.7	0.42	
35	ID 25538	59.1	21.3	0.36	
36	ID 5055	242.9	78.5	0.32	
37	ID 101384	321.6	95.9	0.30	
38	ID 79899	192.2	50.5	0.26	
39	ID 5079	318.3	80.6	0.25	
40	ID 80210	269.2	65.8	0.24	
41	ID 4916	365.4	85.6	0.23	
42	ID 48358	74.9	0.7	0.01	

4.6.3 Vergleich 3: Interventionsgruppe 30 min vs. Interventionsgruppe 60 min

Nach Überlagerung beider Proteinspotmuster wiesen 84,8 % aller Proteinspots keinen Unterschied des Expressionsmusters auf. Eine hypobare Hypoxie von 60 min zeigte bei 56 Proteinspots im Vergleich zu einer hypobaren Hypoxie von 30 min eine höhere Proteinexpression. Bei 22 Proteinspots zeigte sich eine entgegengesetzt höhere Proteinexpression in der 30 min Interventionsgruppe.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, welche Proteinspots ebenfalls im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen eine um das 2-Fache erhöhte bzw. erniedrigte Veränderung aufwiesen. Diese Art der „Filterung“ sollte falsch-positive Treffer eliminieren (Tabelle 5).

Nach diesen Kriterien konnten 37 Proteinspots identifiziert werden, die in der Interventionsgruppe 60 min im Vergleich zur 30 min Interventionsgruppe und den Kontrollgruppen um mehr als das 2-Fache erhöht exprimiert wurden.

Analog dazu wurde nach entsprechender Filterung bei 12 Proteinspots eine um mehr als das Doppelte erhöhte Expression in der 30 min Interventionsgruppe festgestellt.

Tabelle 5: Proteinexpressionsunterschiede der Interventionsgruppen

Spot	Identifikationsnummer	Mittleres normalisiertes Spotvolumen 30 min HH	Mittleres normalisiertes Spotvolumen 60 min HH	Ratio: Hypobare Hypoxie 60 min/ Hypobare Hypoxie 30 min	Änderungsverhalten
1	ID 5023	62.5	489.9	7.84	2-fach Hochregulation
2	ID 4941	151.4	995.1	6.57	
3	ID 87202	44.9	254.0	5.66	
4	ID 65417	123.3	482.5	3.91	
5	ID 5001	67.0	247.2	3.69	
6	ID 88955	78.1	283.2	3.63	
7	ID 4995	77.9	262.9	3.37	
8	ID 5092	80.8	251.8	3.12	
9	ID 86105	64.3	198.0	3.08	
10	ID 85885	82.4	249.0	3.02	
11	ID 4884	75.9	226.9	2.99	
12	ID 4894	79.4	236.8	2.98	
13	ID 5163	70.3	205.1	2.92	
14	ID 8913	97.4	282.2	2.90	
15	ID 5091	79.4	229.3	2.89	
16	ID 5156	75.4	215.2	2.85	
17	ID 60623	84.4	239.0	2.83	
18	ID 77746	80.9	218.6	2.70	
19	ID 5031	85.5	226.3	2.65	
20	ID 5185	81.9	215.3	2.63	
21	ID 5037	77.5	201.4	2.60	
22	ID 88302	77.8	199.9	2.57	
23	ID 4974	92.1	233.9	2.53	
24	ID 39112	92.3	233.3	2.53	
25	ID 87246	70.5	177.6	2.52	
26	ID 5060	80.9	203.1	2.51	
27	ID 4965	86.8	213.3	2.46	
28	ID 4874	70.5	172.5	2.45	
29	ID 5104	85.8	204.3	2.38	
30	ID 45206	80.1	180.8	2.26	
31	ID 44196	80.3	180.9	2.25	
32	ID 4868	71.5	152.4	2.13	
33	ID 45441	87.5	186.3	2.13	
34	ID 5062	95.8	201.7	2.11	
35	ID 5066	107.2	225.4	2.10	
36	ID 86116	85.2	174.4	2.05	
37	ID 44611	83.9	167.9	2.00	
38	ID 25379	86.0	42.1	0.49	
39	ID 5108	128.8	62.2	0.48	
40	ID 38054	151.6	73.1	0.48	
41	ID 79899	107.2	50.5	0.47	
42	ID 32493	147.1	68.7	0.47	
43	ID 22142	121.7	55.1	0.45	
44	ID 5118	143.2	63.5	0.44	
45	ID 4929	139.6	58.8	0.42	
46	ID 54966	137.6	57.6	0.42	
47	ID 5246	164.6	65.4	0.40	
48	ID 5169	152.5	48.9	0.32	
49	ID 48358	122.3	0.7	0.01	

4.7 Bestimmung relevanter Proteinspots

Zur weiteren Analyse wurden nur jene Proteinspots berücksichtigt, die in mehr als einem Vergleich unterschiedliche Expressionsverhalten zeigten (Tabelle 6). Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die gefundenen, differenziell exprimierten Proteinspots tatsächlich auf Unterschiede im Probenmaterial und nicht auf Artefakten beruhen.

Diesem Auswahlkriterium nach konnten 26 Proteinspots identifiziert werden, deren Expression in mindestens zwei Vergleichen unterschiedlich war. Die nachfolgende Tabelle stellt die gefundenen Proteinspots und die berechnete Ratio innerhalb der Versuchsgruppen dar.

Tabelle 6: Differenziell exprimierte Proteinspots in mehr als einem Vergleich

Nummerierung	Identifikationsnummer	Vergleich 1 Ratio	Vergleich 2 Ratio	Vergleich 3 Ratio
1	ID 32174	5.25	3.28	
2	ID 39112		2.07	2.53
3	ID 48358		0.01	0.01
4	ID 4874		2.31	2.45
5	ID 4884		2.35	2.99
6	ID 4894		2.21	2.98
7	ID 4941		3.72	6.57
8	ID 4995		2.21	3.37
9	ID 5001		2.51	3.69
10	ID 5023		9.05	7.84
11	ID 5031		2.18	2.65
12	ID 5060		2.04	2.51
13	ID 5091	3.15	2.31	2.89
14	ID 5092		2.16	3.12
15	ID 5163		2.16	2.92
16	ID 5185		2.16	2.63
17	ID 65417		3.03	3.91
18	ID 7474	0.28	2.24	
19	ID 77746	2.09	3.11	2.70
20	ID 79899		0.26	0.47
21	ID 86105		2.31	3.08
22	ID 86116		2.13	2.05
23	ID 87202		4.67	5.66
24	ID 88302		2.05	2.57
25	ID 88955		6.27	3.63
26	ID 8913		2.12	2.90

4.8 Mascot-Analyse

Von den 26 Proteinspots, die durch Delta 2D Bildanalyse als signifikant identifiziert wurden, konnten insgesamt 19 Proteinspots aus dem Gel identifiziert und anschließend exzidiert werden. Bei sieben Proteinspots (ID5091, ID5092, ID5163, ID86105, ID86116, ID88302 und ID88955) reichte die Proteinmenge zur weiteren Analyse nicht aus. Keratin wurde bei fünf Proteinspots als zusätzliches und bei einem Proteinspot (ID5031) als einziges mögliches Protein identifiziert und als Verunreinigung gewertet, da es kein Serumprotein ist.

Tabelle 7 zeigt die mithilfe von „Mascot“ nach den oben genannten Kriterien identifizierten Proteine, die den jeweiligen Proteinspots zugeordnet wurden.

Die dargestellten Proteine wurden nachfolgend einer bioinformatischen Netzwerkanalyse zugeführt, um Stoffwechselregulationen und Interaktionen der gefundenen Proteine auszuwerten.

Tabelle 7: Mit den Spots assoziierte Proteine

Identifikationsnummer	Gen-Name	Protein	Ratio: 30 min Gruppen	Ratio: 60min Gruppen	Ratio: 30 vs. 60 min Interventionsgruppe
ID 32174	GC	Vitamin D-binding Protein	5.25	3.28	
ID 39112	ALB	Serum Albumin		2.07	3.53
ID 48358	ALB	Serum Albumin		0.01	0.01
ID 4874	HPX	Hemopexin		2.31	2.45
ID 4884	ALB	Serum Albumin		2.35	2.99
ID 4894	ALB	Serum Albumin		2.21	2.98
ID 4941	ALB	Serum Albumin		3.72	6.57
ID 4995	CFI	Complement factor I		2.21	3.37
ID 5001	HPX	Hemopexin		2.51	3.69
ID 5023	SERPINF1	Pigment epithelium-derived factor		9.05	7.84
ID 5060	ALB	Albumin		2.04	2.51
ID 5185	C1QB	Complement C1q subcomponent subunit B		2.16	2.63
ID 65417	ALB	Serum Albumin		3.03	3.91
ID 7474	PLG	Palsminogen OS	0.28	2.24	
ID 77746	CFHR1	Complement factor h-related protein 1 OS	2.09	3.11	2.70
ID 79899	CFHR1	Complement factor H-related protein 1		0.26	0.47
ID 87202	C3	Complement C3		4.67	5.66
ID 8913	ALB	Serum Albumin		2.12	2.90

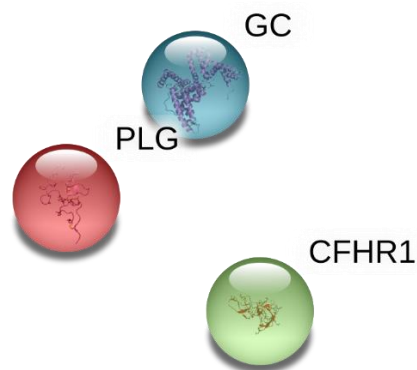
4.9 STRING-Analyse

4.9.1 Kontrollgruppe 30 min vs. Interventionsgruppe 30 min

(Datenabfrage: 08.05.2020)

Unter der Annahme des höchsten Konfidenzintervalls von 0,9 sind keine unmittelbaren Verbindungen zwischen den Proteinen (GC; PLG und CFHR1) erkennbar. Somit ergibt sich ein PPI P-Wert von 1 (Abb. 17).

Abbildung 17: 30 min Kontrollgruppe vs. 30 min Interventionsgruppe

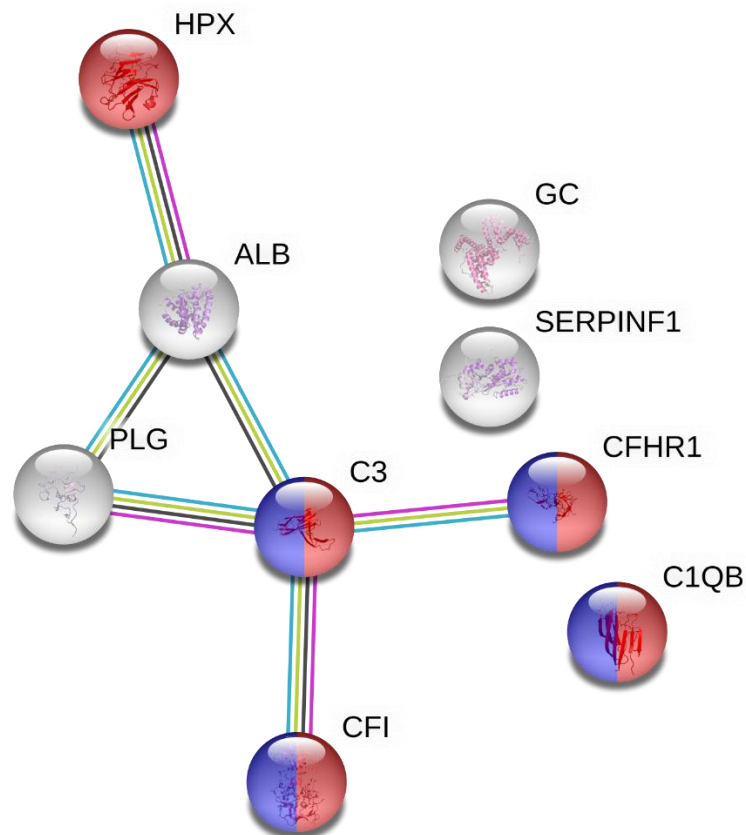


4.9.2 Kontrollgruppe 60 min vs. Interventionsgruppe 60 min

(Datenabfrage: 08.05.2020)

Im Vergleich der oben genannten Versuchsgruppen zeigten sich bei neun unterschiedlichen Proteinen veränderte Expressionsmuster. Die gefundenen Proteine bildeten insgesamt sechs Verbindungen untereinander aus. Das entsprechende Proteinnetzwerk (GC; ALB; HPX; CHI; SERPINF1; C1QB; PLG; CFHR1 und C3) zeigte dabei mit einem PPI P-Wert des gesamten Systems von 0,000000363 eine hohe Relevanz der Verknüpfungen an. Die Interventionsgruppe 60 min schien dabei Veränderungen der Immunantwort (FDR: 0,0000000502), der Proteinaktivierung sowie der Komplementregulation (jeweils FDR: 0,00000167) zu bewirken (Abb. 18).

Abbildung 18: 60 min Kontrollgruppe vs. 60 min Interventionsgruppe



Die Knotenpunkte repräsentieren die gefundenen Proteine. Die Hintergrundfarbe der Knoten entspricht dem biologischen Prozess, welcher durch das jeweilige Protein unterstützt wird. Rot: Immunantwort, Blau: Komplementsystem und Proteinaktivierung.

Die Verbindungslinien zwischen den Knoten stellen die unterschiedlichen Quellen zur Annahme einer Protein-Protein-Interaktion dar.

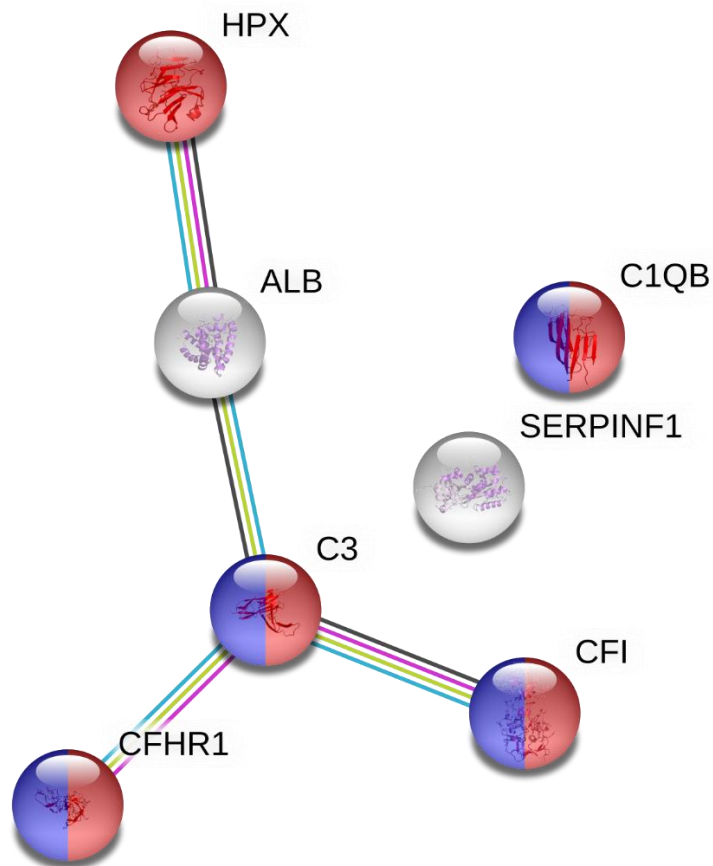
Bekannte Interaktionen	Vorhergesagte Interaktionen	Andere
Kuratierte Datenbanken	Gennachbarschaft	Textquellen
Experimentell ermittelt	Genfusionen	Co-Expression
	Gen-Co-Existenz	Proteinhomologie

4.9.3 Interventionsgruppe 30 min vs. 60 min

(Datenabfrage: 08.05.2020)

Im Vergleich beider Interventionsgruppen zeigten sich 7 unterschiedliche Proteine als differenziell exprimiert (ALB; HPX; CHI; SERPINF1; C1QB; CFHR1; C3). Der PPI P-Wert des gesamten Netzwerkes beträgt 0,0000221. STRING zeigte Unterschiede beider Gruppen in der Immunantwort (FDR: 0,00000000759) sowie der Protein-Aktivierung und des Komplementsystems (jeweils FDR: 0,000000420) (Abb. 19).

Abbildung 19: 30 min Interventionsgruppe vs. 60 min Interventionsgruppe



Die Knotenpunkte repräsentieren die gefundenen Proteine. Die Hintergrundfarbe der Knoten entspricht dem biologischen Prozess, welcher durch das jeweilige Protein unterstützt wird. Rot: Immunantwort, Blau: Komplementsystem und Proteinaktivierung.

Die Verbindungslinien zwischen den Knoten stellen die unterschiedlichen Quellen zur Annahme einer Protein-Protein-Interaktion dar.

Bekannte Interaktionen	Vorhergesagte Interaktionen	Andere
<ul style="list-style-type: none"> Kuratierte Datenbanken Experimentell ermittelt 	<ul style="list-style-type: none"> Gennachbarschaft Genfusionen Gen-Co-Existenz 	<ul style="list-style-type: none"> Textquellen Co-Expression Proteinhomologie

4.10 GeneMania

Die drei bekannten Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen wurden wie folgend ergänzend durch GeneMania analysiert.

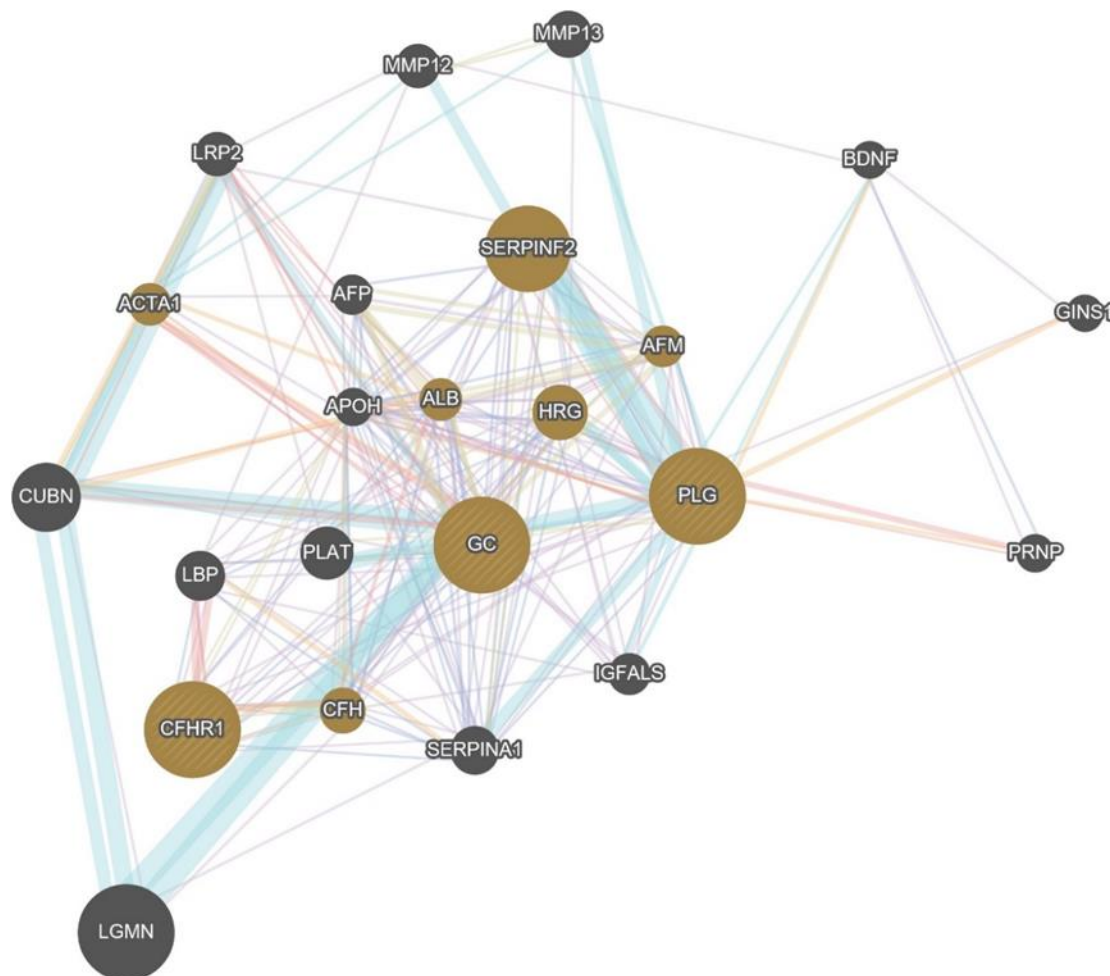
4.10.1 Kontrollgruppe 30 min vs. Interventionsgruppe 30 min

(Datenabfrage: 12.05.2020)

Bei diesem Vergleich wurden die drei als differenziell exprimierten Proteine aus den Proben mit 20 weiteren Proteinen durch GeneMania verknüpft. Daraus ergaben sich 282 Verbindungen. Grundlage der Interaktionsnachweise waren physikalische Interaktionen (67,64 %); Co-Expression (13,50 %); Vorhersage (6,35 %); Co-Lokalisation (6,17 %); Stoffwechselwege (4,35 %); Gen-Interaktionen (1,40 %) und geteilte Protein-Domänen (0,59 %).

Die geringste FDR (0,0000000000505) wurde für Blut-Mikropartikel (GC; PLG; CFHR1) berechnet und gibt keine präzise Aussage über beteiligte Signalkaskaden (Abb. 20).

Abbildung 20: 30 min Kontrollgruppe vs. 30 min Interventionsgruppe



Legende Verbindungslinien

Physikalische Interaktion	67,64%
Co-Expression	13,50%
Vorhersage	6,35%
Co-Lokalisation	6,17%
Signalweg	4,35%
Genetische Interaktion	1,40%
Geteilte Proteindomänen	0,59%

Legende Knotenpunkte

Knotenpunkte gelb:	Protein gehört zu Blut-Mikropartikeln
Knotenpunkte schraffiert:	Protein wurde in der Serumprobe gefunden
Knotenpunkte ausgefüllt:	Proteinverwandtschaft zu den Proteinen der Serumproben

4.10.2 Kontrollgruppe 60 min vs. Interventionsgruppe 60 min

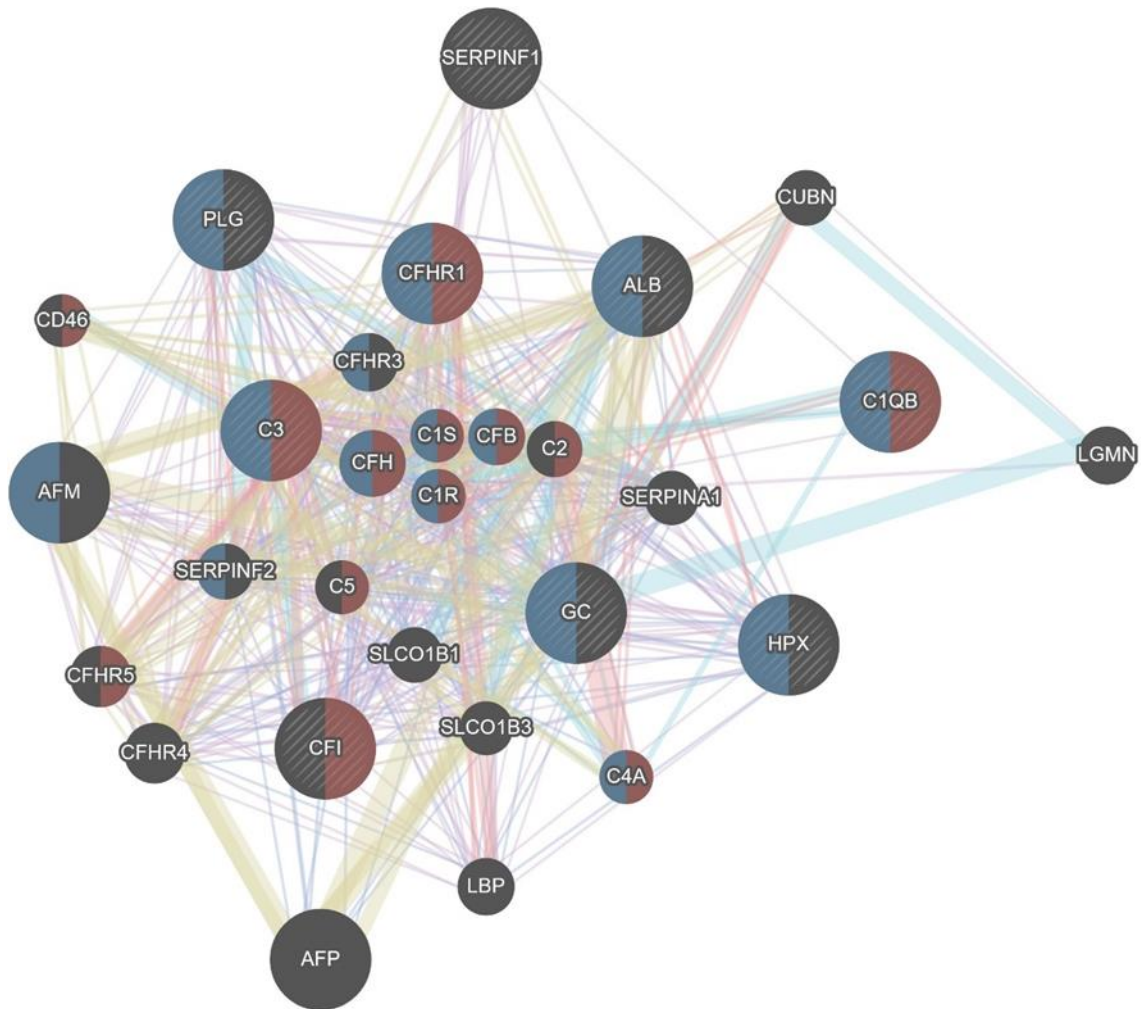
(Datenabfrage: 12.05.2020)

In diesem Vergleich wurden 9 der in den Proben differenziell exprimierten Proteine mit 20 weiteren von GeneMania als „verwandt“ bezeichneten Proteine zu einem Netzwerk zusammengefügt. Daraus ergaben sich 735 Verbindungen. Co-Expression (41,14 %); geteilte Proteindomäne (22,92 %); Co-Lokalisation (13,78 %); physikalische Interaktionen (13,03 %) sowie Signalwege (9,13 %) waren die jeweiligen Quellen zur Annahme einer Beziehung der Proteine zueinander (Abb. 21).

Folgende Stoffwechselwege wurden dabei als besonders relevant erachtet:

- Komplement Aktivierung (FDR $4.78 \cdot 10^{-24}$) (C3; CFHR1; C1QB; CFI)
- Blut Mikropartikel (FDR $3.45 \cdot 10^{-23}$) (C3; CFHR1; C1QB; HPX; GC; PLG)
- Protein Aktivierung (FDR $2.82 \cdot 10^{-22}$) (C3; CFHR1; C1QB; CFI)
- Immunantwort (FDR $4.96 \cdot 10^{-19}$) (C3; CFHR1; C1QB; CFI)

Abbildung 21: Kontrollgruppe 60 min vs. Interventionsgruppe 60 min



Legende Verbindungslinien

Co-Expression	41,14%
Geteilte Proteindomänen	22,92%
Co-Lokalisation	13,78%
Physikalische Interaktion	13,03%
Signalweg	9,13%

Legende Knotenpunkte

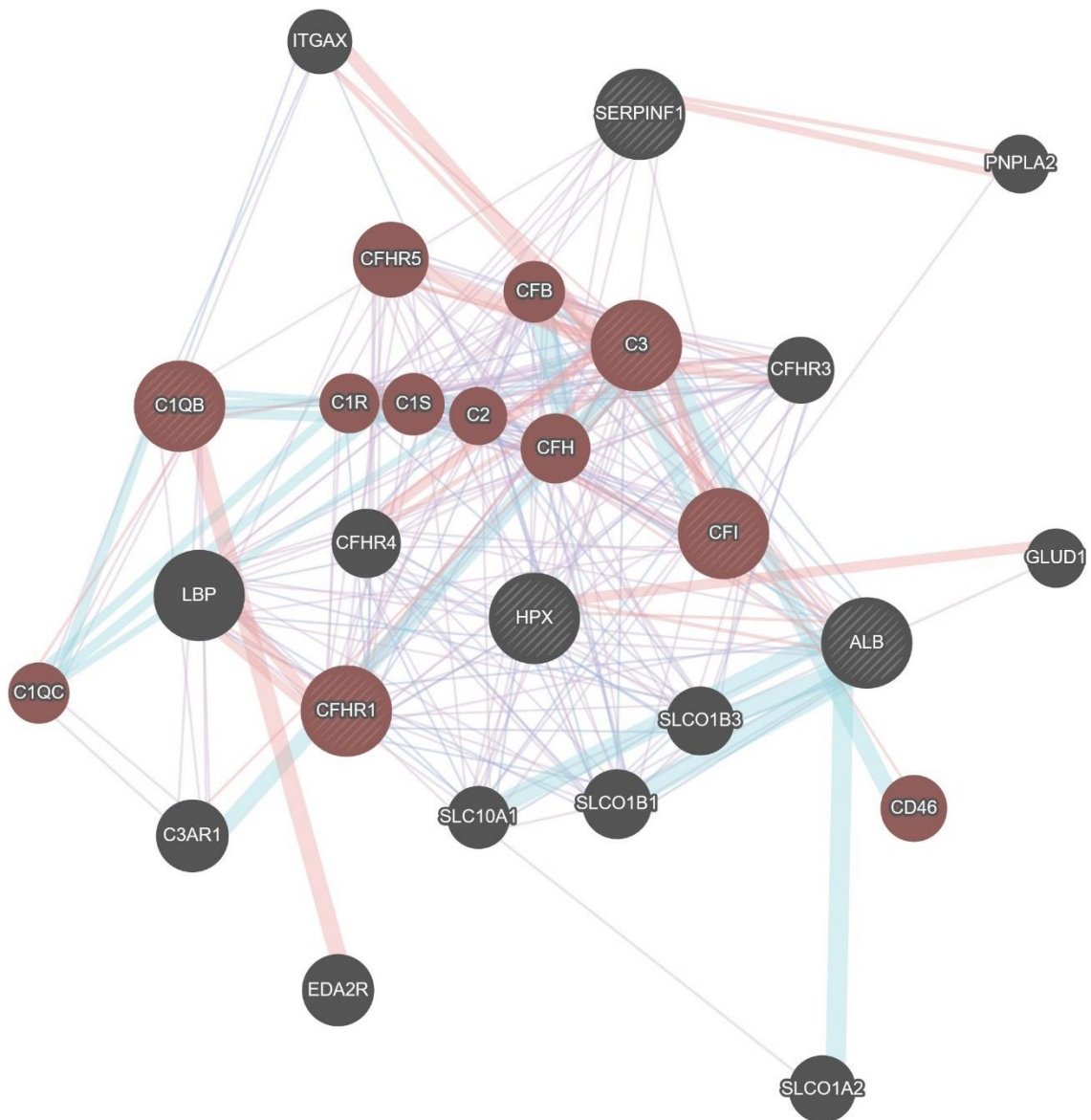
Knotenpunkt rot:	Proteine sind an Immunantwort, Proteinaktivierung und Komplementaktivierung beteiligt
Knotenpunkt blau:	Proteine gehören zu den Blut-Mikropartikeln
Knotenpunkt schraffiert:	Protein würden in den Serumproben gefunden
Knotenpunkt ausgefüllt:	Proteinverwandtschaft zu den Proteinen der Serumproben

4.10.3 Interventionsgruppe 30 min vs. 60 min

(Datenabfrage: 12.05.2020)

Die meisten Interaktionen zwischen den Interventionsgruppen wurden unter Verwendung der Analyse von: Co-Expressionen (41,74 %) gefolgt von physikalischer Interaktion (26,29 %), Signalwegen (23,47 %) und Co-Lokalisationen (8,50 %) validiert. Das Netzwerk beinhaltet inklusive der zusätzlichen verwandten Proteine 27 Proteinen mit insgesamt 357 Verbindungen. Änderungen im Komplementsystem (FDR: $7.74 \cdot 10^{-22}$), Proteinaktivierung (FDR: $4.34 \cdot 10^{-20}$) und der Immunantwort (FDR: $3.54 \cdot 10^{-17}$) zeigten den größten Zusammenhang mit hypobarer Hypoxie. C3; CFHR1; C1QB und CFI waren an allen drei Stoffwechselwegen beteiligt (Abb. 22).

Abbildung 22: Interventionsgruppe 30 min vs. Interventionsgruppe 60 min



Legende Verbindungslinien

Co-expression	41,74%
Physikalische Interaktion	26,29%
Signalweg	23,47%
Co-Lokalisation	8,50%

Legende Knotenpunkte

Knotenpunkte rot:	Proteine sind an Immunantwort, Proteinaktivierung und Komplementaktivierung beteiligt
Knotenpunkte schraffiert:	Protein würden in den Serumproben gefunden
Knotenpunkte ausgefüllt:	Proteinverwandtschaft zu den Proteinen der Serumproben

4.11 Perseus

In der Heatmap (Abb. 23) sind die Induktionsfaktoren der identifizierten Proteine anhand von unterschiedlichen Farbtintensitäten visualisiert und Ähnlichkeiten im Expressionsverhalten durch Bildung von Clustern zusammengefasst.

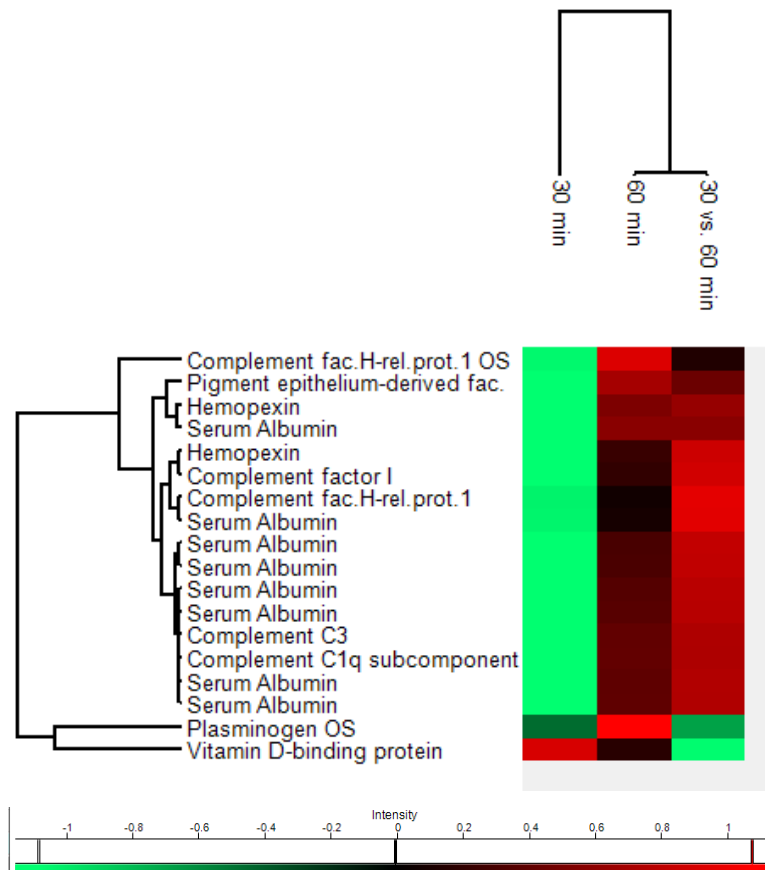
Unter Ausnahme des Vitamin-D binding proteins, welches im zeitlichen Verlauf herunterreguliert wurde, wiesen alle in der Heatmap dargestellten Proteine eine höhere Expression nach längerer Exposition gegenüber hypobarer Hypoxie auf.

„Plasminogen OS“ scheint nach den ersten 30 Minuten hypobarer Hypoxie zunächst herunterreguliert zu sein, um nach der 60. Minute eine gesteigerte Expression im Vergleich zu der dazugehörigen Kontrollprobe zu verzeichnen.

Zwei Proteine wurden durch 60 Minuten hypobare Hypoxie im Vergleich zur 60 Minuten Kontrollgruppe verringert exprimiert. Dies betrifft eine Proteinmodifikation von Albumin sowie das Complement factor H-related protein 1.

Die Verwandtschaftsbeziehungen der durch bioinformatische Netzwerkanalysen identifizierten Proteine konnten auch aufgrund ihres ähnlichen relativen Expressionsverhaltens und der Visualisierung zu Clustern mittels Perseus-Analyse bestätigt werden.

Abbildung 23: Heatmap zur Darstellung differenzieller Expressionsniveaus



5 Diskussion

Ziel der Studie war es, den Einfluss einer 30 min bzw. 60 min lang wirkenden hypobaren Hypoxie entsprechend 15000 ft (Gesamtdruck: 572 hPa) auf das Serumproteom 79 männlicher Probanden zu untersuchen. Dazu wurden die Probanden vier unterschiedlichen Versuchsgruppen zugeordnet: Interventionsgruppe 30 min (N= 20); Kontrollgruppe 30 min (N= 19); Interventionsgruppe 60 min (N= 20); sowie der Kontrollgruppe 60 min (N= 20).

Im Vergleich der 30 min Gruppen konnten 3 Proteine (GC; PLG und CFHR1) nachgewiesen werden, die signifikant differenziell exprimiert wurden. Bioinformatische Netzwerkanalysen identifizierten kein relevantes Proteinnetzwerk, wenngleich die drei Proteine jeweils Einflüsse auf das Immunsystem haben.

Dabei wurde in der 30 min Interventionsgruppe GC und CFHR1 hochreguliert und PLG im Vergleich zur 30 min Kontrollgruppe herunterreguliert.

Der 60 min Vergleich identifizierte 9 differenziell exprimierte Proteine (GC; ALB; HPX; CHI; SERPINF1; C1QB; PLG; CFHR1; C3). Bioinformatische Netzwerkanalysen wiesen eine Assoziation des Proteinnetzwerks GC; CFI; C1QB; PLG; CFHR1; C3 (STRING) bzw. C3; CFHR1; C1QB und CFI (GeneMania) mit der Regulationsmechanismen des Komplementsystems nach.

Bis auf eine Proteinmodifikation von CFHR1, welche in der Kontrollgruppe 60 min höher konzentriert war, zeigten alle weiteren differenziell gefundenen Proteine höhere Expressionsniveaus in der 60 min Interventionsgruppe.

Der Vergleich der Interventionsgruppen untereinander bestätigte die beschriebenen Beobachtungen der differenziell exprimierten Proteine in Abhängigkeit der zeitlichen Exposition.

5.1 Proteine des Komplementsystems

Das Komplementsystem, bestehend aus mehr als 30 Proteinen, ist Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems und wird kaskadenartig aktiviert. Drei unterschiedliche Wege werden unterteilt: der Klassische-, der Alternative- und der Lektin-Weg. Effektorfunktionen sind die Opsonierung und die anschließende effiziente Phagozytose von pathogenem und autoantigenem Material. Damit verbunden ist eine Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen. Alle drei Komplementwege enden in der Bildung der C3-Konvertase, die über Zwischenstufen zum lytischen Membranangriffskomplex führt. Der klassische Weg wird überwiegend über Antigen-Antikörper-Komplexe aktiviert, die IgG oder IgM enthalten. Eine antikörperunabhängige direkte Aktivierung des klassischen Weges ist auch über CRP, Gram-negative Bakterien, apoptotische Zellen und bestimmte virale Glykoproteine möglich. Der alternative Weg wird durch spontane Hydrolyse von C3 aktiviert. Die Bindung des Mannose-

bindenden Lektins an terminale Zuckerguppen von Bakterien initiiert den Lektin-Weg. C1-inhibitor, Faktor H, C4-binding protein, Faktor I und Properiden sind lösliche Regulatoren des Komplementsystems, wobei Properiden der einzig bekannte Regulator mit verstärkender Wirkung ist^{30,31}. Das Komplementsystem steht mit weiteren wichtigen biochemischen Systemen wie der Gerinnungskaskade, dem autonomen Nervensystem und Entzündungsprozessen in Verbindung, wodurch es auch für verschiedene Erkrankungen verantwortlich ist³².

In der vorliegenden Studie wurden mehrere Proteine differenziell exprimiert, die das Komplementsystem beeinflussen. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

5.2 Funktion der differenziell exprimierten Proteine

5.2.1 30 min Hypobare Hypoxie vs. 30 min Kontrolle

Im 30 min Vergleich wurden drei Proteine (GC; PLG und CFHR1) gefunden, die zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich exprimiert wurden. Alle drei Proteine konnten auch im 60 min Vergleich nachgewiesen werden.

Vitamin D-binding-protein (GC)

Gelegen auf dem GC-Gen ist das Vitamin D-binding-protein für Transport und Lagerung von Vitamin D zuständig. Des Weiteren unterstützt es die Aktivität von C5 alpha bei Entzündungen und die Aktivierung von Makrophagen sowie das Abfangen von Aktin bei Gewebeerletzungen. C5a entsteht durch die proteolytische Spaltung von C5 bei der Komplementaktivierung und wirkt als proinflammatorischer Faktor.^{33,34}

In der vorliegenden Studie wurde eine Hochregulierung des Vitamin D-binding-proteins in der 30 min Interventionsgruppe festgestellt. Zu einer ähnlichen Beobachtung ist auch eine Studie von Ahmad et al. (2014) gekommen, bei der am Rattenmodell nach 6; 12 und 24 h (25000 ft) ebenfalls eine Hochregulation der entsprechenden Proteinexpression beobachtet werden konnte.

Plasminogen (PLG)

Das nach 30 min hypobarer Hypoxie herunterregulierte Plasminogen (PLG-Gen) ist ein Proenzym von Plasmin und wird durch den gewebespezifischen Plasminogenaktivator oder die Urokinase aktiviert. Es wirkt zum einen fibrinolytisch, zum anderen sind aber auch wichtige proteolytische Eigenschaften bei Embryonalentwicklung, Gewebeumbau, Tumorerkrankung und Entzündungen mit Plasminogen assoziiert. Aktiviert zu Plasmin, kommt es zu einer Bindung von C3, C3b, C3d sowie C5 des Komplementsystems. Durch Plasminogen wird der Faktor I

vermittelte C3b Abbau in Gegenwart des Faktors H verstärkt. Die C3b Spaltprodukte besitzen keine Effektorfunktionen mehr. Plasmin ist das Schlüsselenzym der Fibrinolyse und der Hämostase. Es löst Fibrin, Fibronectin, Thrombospondin, Laminin und den Von-Willebrand-Faktor auf. Bei der Wundheilung, dem Umbau des Gewebes, der Tumormetastasierung und der Angiogenese spielt Plasmin außerdem eine wichtige Rolle ^{35,36}.

Complement-factor-H-related-protein 1 (CFHR1-Gen)

Für das Complement-factor-H-related-protein 1 (CFHR1-Gen) konnte in der 30 min Interventionsgruppe eine Hochregulation im Vergleich zur Kontrollgruppe 30 min festgestellt werden. Complement-factor-H-related-protein 1 ist ein Komplementregulatorprotein, welches die C5-Konvertaseaktivität blockiert und die C5b-Oberflächenassoziation stört. Die fünf CFHR Proteine (CFHR1-5) sind eng mit den CFH-Proteinen verwandt. CFHR1 konkurriert mit CFH um die Bindung an C3b ^{37,38}.

Zusammenfassung

Bioinformatische Netzwerkanalysen mit STRING und GeneMania identifizierten kein signifikantes Proteinnetzwerk zwischen den Proteinen, sodass keine Auswirkungen der beobachteten Proteinexpressionen auf spezifische Stoffwechselwege beobachtet werden konnten.

5.2.2 60 min Hypobare Hypoxie vs. 60 min Kontrolle

Im 60 min Vergleich konnten 18 verwertbare Proteinspots aus den 2D DIGE-Gelen isoliert werden, die sich in mehr als einem Vergleich differenziell exprimiert zeigten.

Dies entspricht 9 unterschiedlichen Proteinen (ALB; CFI; C3; CFHR1; C1QB; GC; HPX; PLG; SERPINF1). ALB (N= 8) und CFHR1 (N= 2) wurden in mehr als einer Proteinmodifikation differenziell exprimiert, was auf posttranslationale Modifikationen hindeutet.

Die drei Proteine (GC; PLG; CFHR1) des 30 min Vergleichs, die bereits kurzfristig auf hypobare Hypoxie mit einem veränderten Expressionsverhalten reagierten, wurden auch im 60 min Vergleich als differenziell exprimiert erfasst.

Unterschiedlich war jedoch das Expressionsverhalten von PLG, welches in der 30 min Interventionsgruppe eine Herunterregulierung und in der 60 min Interventionsgruppe eine Hochregulierung dokumentierte.

Außerdem konnte zusätzlich eine zweite Proteinmodifikation des CFHR1-Proteins nachgewiesen werden, das in der 60 min Interventionsgruppe gegenüber der 60 min Kontrollgruppe herunterreguliert wurde.

Hemopexin (HPX)

Hämopexin wurde in der vorliegenden Studie in zwei Proteinmodifikationen bei 60 min hypobarer Hypoxie signifikant hochreguliert. Hämopexin (HPX-Gen) ist ein Glycoprotein des Blutserums, welches freie Hämine bindet, zur Leber transportiert und dort einer Katabolisierung zuführt. Damit schützt es gemeinsam mit Haptoglobin den Körper vor Hämoglobin- vermittelten oxidativen Schäden. Ein Abfall der Hämopexinkonzentration zeigt sich beispielsweise nach vorheriger Freisetzung von Hämverbindungen. Hämopexin gehört zu den Akute-Phase-Proteinen. Es moduliert durch seine hohe Affinität zu Häm Entzündungskaskaden und schützt somit vor akuter wie chronischer Gewebeverletzung^{39,40}.

Complement factor I (CFI-Gen)

Der Complement factor I (CFI-Gen) zeigte bei 60 min Intervention eine signifikante Hochregulation verglichen mit der Kontrollgruppe 60 min. Complement factor I ist eine trypsinähnliche Serinprotease, die ein Teil des Komplementsystems darstellt und alle drei Komplementwege beeinflusst. Es hemmt die Proteine C3b und C4b durch Kofaktoren vermittelte (Faktor H und C4BP) Spaltung. Die entstandenen Fragmente können keine C3- und C5-Konvertase mehr bilden und stoppen somit die weitere Opsonierung und Bildung von Membranangriffskomplexen⁴¹.

Pigment epithelium-derived factor (SERPINF1)

Das SERPINF1-Gen kodiert für den Pigment epithelium-derived factor, der seine Effektorfunktion über eine Hemmung der Angiogenese und der Regulation der Knochendichte ausführt. Das Glycoprotein kann verschiedene posttranslationale Modifikationen eingehen und weist ein Molekulargewicht von 50 kDa auf^{42,43}. In der vorliegenden Studie war SERPINF-1 das am stärksten hochregulierte Protein der 60 min Interventionsgruppe.

Complement C1q subcomponent subunit B-protein (C1QB-Gen)

Ebenfalls hochreguliert und mit Einflüssen auf das Komplementsystem wurde das Complement C1q subcomponent subunit B-protein (C1QB-Gen) in der 60 min Interventionsgruppe nachgewiesen.

Das C1Q-Protein besteht aus sechs Kopien der drei Polypeptidketten (A, B, C) und ist mit den Proenzymen C1r und C1s assoziiert, mit denen es zur Entstehung von C1, der ersten Komponente des klassischen Komplementweges, beiträgt.

Die Aktivierung von C1s durch C1r wird durch das C1Q-Protein nach Bindung an IgG- oder IgM-haltigen Immunkomplexen initiiert.

„Dadurch stellt C1Q eine wichtige Verbindung zwischen der klassischen angeborenen Immunität und der IgG- oder IgM-vermittelten erworbenen Immunität dar“⁴⁴.

Komplementfaktor C3 (C3-Gen)

Das Expressionsverhalten des Komplementfaktors C3 (C3-Gen) mit zentraler Funktion im Komplementsystem zeigte in der 60 min Interventionsgruppe eine signifikante Hochregulation. C3 wird durch alle drei Komplementwege aktiviert, indem diese Wege die C3-Konvertase stimulieren und C3 anschließend in C3a und C3b gespalten wird. C3a ist ein Anaphylatoxin und Mediator des lokalen Entzündungsprozesses. C3b wirkt als Opsonin und ist an der Komplementkaskade beteiligt, die den Enzymkomplex zur C5-Konvertase modifiziert^{32,36}.

Albumin (ALB)

Albumin wurde im 60 min Vergleich in 8 Proteinmodifikationen zwischen den Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich exprimiert. 7 Proteinmodifikationen zeigten sich in der 60 min Interventionsgruppe hochreguliert, während eine Modifikation in der 60 min Kontrollgruppe höher exprimiert wurde.

Serum Albumin ist eines der Hauptproteine des Blutplasmas. Die Regulation des kolloidosmotischen Blutdrucks sowie der Transport von Zink, Kalzium und Magnesium sind neben Hormon- und Medikamententransport wichtige Funktionen des humanen Serumalbumins. Über 65 verschiedene genetische Varianten des ALB-Gens sind bekannt. Humanes Serumalbumin kann proinflammatorische Umgebungen durch seine antioxidativen Merkmale und Radikalfängeraktivitäten beeinflussen⁴⁵⁻⁴⁸.

Aufgrund seiner Molekülmasse von >65 kDa kann es nur bedingt zur weiteren Analyse verwendet werden, da eine Abreicherung hochabundanter und großer Proteine durch das Studienprotokoll vorgesehen war.

Zusammenfassung

Der funktionelle Einfluss auf das gesamte Komplementsystem war durch die Ergebnisse nicht abzuleiten. GC, C1QB und C3 wirkten bei Hochregulation (wie auch im Versuch) proinflammatorisch, wohingegen CFI, PLG und CFHR1 bei Hochregulation entsprechend den Untersuchungsergebnissen antiinflammatorische Eigenschaften haben. In Analyse der 60 min Gruppen wurden zwei Proteinmodifikationen des CFHR1-Proteins unterschiedlich stark exprimiert. Eine Variante wurde in der Interventionsgruppe hochreguliert, während die zweite Variante in der zugehörigen Kontrollgruppe höher exprimiert wurde. Antiinflammatorische Effekte der in der Studie hochregulierten Proteine Albumin und Hämopexin sind durch deren Wirkung als Antioxidantien zu erklären. Das in den Proben gefundene SERPINF1-Protein zeigte keine relevanten Verbindungen zu den identifizierten Stoffwechselwegen.

Die in der vorliegenden Studie differenziell exprimierten Proteine des 60 min Vergleichs scheinen insbesondere biologische Prozesse der Immunantwort und des Komplementsystems signifikant zu beeinflussen.

Vergleich mit anderen Untersuchungen

In einer Studie von Hinkelbein et al. (2017) wurden 10 Teilnehmer in einer Druckkammer einer milden hypobaren Hypoxie (8000 ft) für 30 min ausgesetzt. Es konnten 10 verschiedene Proteine (CAT, CA1, APOE, ALB, PGK1, C1QA, C1QB, CLU, GAPDH, F2) identifiziert werden, deren Expression sich nach 30 min hypobarer Hypoxie entsprechend 8000 ft signifikant unterschiedlich exprimiert zeigten. Ein Protein (C1QB) konnte in der hier diskutierten Studie nach 60 min nachgewiesen werden, wohingegen bei Hinkelbein et al. (2017) dies bereits nach 30 min hypobarer Hypoxie gelang.

Rein quantitativ zeigten sich somit in der Studie von Hinkelbein et al. bei milderer hypobarer Hypoxie (8.000 ft) mehr Proteine in ihrer Expression signifikant unterschiedlich exprimiert als bei 30 Minuten dauernder Exposition gegenüber stärkerer hypobarer Hypoxie (15.000 ft). Sowohl aus der Funktion der differenziell exprimierten Proteine als auch aus den bioinformatischen Netzwerkanalysen lassen sich folglich Beeinflussungen des Komplementsystems ebenfalls bei 60 min hypobarer Hypoxie beobachten.

5.3 Hypobare Hypoxie und ihr Einfluss auf das Komplementsystem

Die Erforschung der Auswirkungen einer hypobaren Hypoxie auf den menschlichen Organismus kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Mögliche Variablen sind dabei die zeitliche Exposition sowie die Ausprägung der hypobaren Hypoxie.

Grundlage der Überlegungen war die Studie von Hinkelbein et al., die aufgrund der dort gewonnenen Erkenntnisse den Anlass zur Durchführung der vorliegenden Studie gab.

Hinkelbein et al. analysierten das Serumproteom von Probanden (N= 10), die 30 min einer hypobaren Hypoxie (entsprechend 2400 m bzw. 8000 ft) ausgesetzt waren. Die Expression von 14 Spots (d.h. 10 Proteine: ALB, PGK1, APOE, GAPDH, C1QA, C1QB, CAT, CA1, F2 und CLU) war signifikant verändert. Die bioinformatischen Analysen ergaben Assoziationen der veränderten Proteine mit den Signalkaskaden „Regulation der Hämostase“ (vier Proteine), „Metabolismus“ (fünf Proteine) und „Leukozyten-vermittelte Immunantwort“ (fünf Proteine) ⁴.

Dadurch konnte damals schon gezeigt werden, dass bereits eine kurze Exposition gegenüber hypobarer Hypoxie eine signifikante Veränderung des Stoffwechsels und der damit verbundenen Anpassung des Immunsystems bewirken kann.

In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls Albumin und C1QB nach hypobarer Hypoxie als signifikant verändert exprimiert festgestellt werden, jedoch anders als in der Studie von Hinkelbein et al., erst nach 60 min.

Für längere Zeitexpositionen gegenüber hypobarer Hypoxie konnte bereits durch weitere Studien eine Assoziation von hypobarer Hypoxie mit einer veränderten Regulation des Immunsystems aufgedeckt werden.

Eine 2018 durch Wang et al. veröffentlichte Studie untersuchte die Expression von Akute-Phase-Proteinen und entzündlichen Zytokinen an 104 Soldaten, die schnell von 20- 60 m. ü. NN auf 3200 m. ü. NN aufstiegen. Während sich physikalische Indizes zwischen den Versuchsgruppen nicht unterschieden, konnten signifikante Unterschiede der Expression von Akute-Phase-Proteinen und entzündlichen Zytokinen (IL-1, IL-6 und TNF- α) festgestellt werden. Daraus wurde eine verbesserte Spezifität für die Diagnose der „AMS“ abgeleitet ⁴⁹.

Ahmad et al. verglichen in Ihrer Studie unter Verwendung eines proteomischen Ansatzes das Serumproteom von Eingeborenen (N= 10) in großer Höhe (3500-4000 m. ü. NN) mit den Serumproben einer Meeresspiegelkontrolle (N= 10). Die meisten differenziell exprimierten Plasmaproteine der Untersuchung stellten Akute-Phase-Proteine, Komplementkomponenten und Apolipoproteine dar. Unter anderem wiesen sie, wie auch in der vorliegenden Studie, eine Hochregulierung von Vitamin-D-bindendem Protein und Hämopexin nach. Das Komplement C3 war in den Proben von Ahmad et al. jedoch herunterreguliert und steht somit im Gegensatz zu der vorliegenden Beobachtung eines hochregulierten Komplements C3 nach hypobarer Hypoxie-Exposition. „Diese Ergebnisse zeigen, dass es einen Anpassungsmechanismus gibt, der das Entzündungsgleichgewicht Eingeborener in großen Höhenlagen, die einer hypobaren Hypoxie ausgesetzt sind, aufrechterhält ¹⁰.“

Der zentrale Komplementfaktor C3 wurde auch durch Pavlicek et al. nach 24-stündiger Druckkammerintervention (4000 m) als durch hypobare Hypoxie induziert festgestellt ⁵⁰.

Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, da ebenfalls eine Zunahme von C3 nachgewiesen werden konnte. Die Expressionszunahme konnte allerdings bereits nach 60 min hypobarer Hypoxie festgestellt werden.

5.4 Limitationen der Methoden

5.4.1 Allgemeine Limitationen

Die verwendeten Analyseverfahren der Proteomik ermöglichen es, Unterschiede in der Proteinexpression zu detektieren und dahinterstehende Proteine zu identifizieren. Die Proteinidentifikation sowie die bioinformatischen Netzwerkanalysen beruhen dabei auf datenbankgestützte Analysealgorithmen. Um valide Ergebnisse zu erhalten, ist eine umfangreich gepflegte Datenbank relevant, die spezifische Informationen zu Proteineigenschaften enthält. Des Weiteren können sich Proteine in ihren biologischen Eigenschaften stark ähneln, wodurch es zu Ungenauigkeiten kommen kann und es sich somit lediglich um wahrscheinlichkeitsbasierte Identifikationen handelt.

Insbesondere posttranslationalen Modifikationen führen dazu, dass sich die exprimierten Proteine in ihrer Funktion teilweise stark von den codierenden genetischen Informationen

abgrenzen. Des Weiteren können sich Modifikationen desselben Proteins erheblich in ihrem Masse-/Ladungsverhältnis unterscheiden und somit die korrekte Identifizierung erschweren. Ein entscheidender Vorteil proteomischer Analysemethoden ist die gute Probenzugänglichkeit und die Möglichkeit, den Einfluss von Umwelteinflüssen auf den Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt zu untersuchen.

Der Nachteil dieser plasmaproteomischen Methoden liegt darin, dass die Auswirkungen auf den Organismus lediglich auf das Plasmaproteom und nicht auf das gesamte menschliche Proteom bezogen werden können. Somit wäre denkbar, dass es im Blutplasma zu einer signifikant veränderten Anpassung gegenüber hypobarer Hypoxie kommen könnte, die jedoch keinen Einfluss auf Zielorgane hat.

Von besonderer Relevanz ist außerdem der Zeitpunkt der Probenentnahme in Relation zur Exposition. Dadurch können Anpassungsvorgänge in unterschiedlichen Phasen erfasst werden.

In der vorliegenden Studie wurde sich mit einer Expositionszeit von 30 bzw. 60 Minuten für einen kurzen Untersuchungszeitraum entschieden. Diesen Bedingungen sind Menschen während eines Fluges beispielsweise im Falle eines unerwarteten Druckabfalls ausgesetzt.

Demnach können die Ergebnisse der Studie ausschließlich auf kurzfristige Anpassungsmechanismen des Organismus bezogen werden.

5.4.2 Modellbedingte Limitationen

Die Entnahme der Blutserumproben vor und nach der Exposition gegenüber hypobarer Hypoxie erfolgte an unterschiedlichen Probanden, sodass interindividuelle Schwankungen des Probandenproteoms nicht miterfasst worden sind.

Die Probanden waren allesamt männlich, um zyklusabhängige Schwankungen des Hormonhaushaltes der Frau und mögliche damit verbundene Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Plasmaproteoms zu vermeiden. Außerdem hatten die Probanden ein Alter zwischen 18 und 57 Jahren. Somit können die Ergebnisse lediglich auf ein männliches und vergleichsweise junges Probandenkollektiv übertragen werden.

Ursprünglich war die Gruppengröße auf 20 Probanden je Gruppe festgelegt. Bei einer Probe der Kontrollgruppe 30 min war die Proteinmenge der Probe zur weiteren Analyse nicht ausreichend, sodass es dabei zu einer Fehleinschätzung der tatsächlichen Proteinkonzentration in der gepoolten Probe hätte kommen können.

Nikotinabusus, Ernährungsgewohnheiten sowie eine weiterreichende Anamnese wurden nicht erhoben. Einige Krankheitsbilder könnten dabei teilweise erheblichen Einfluss auf den Stoffwechsel der Probanden gehabt haben.

Aufgrund des geringen Alters und der persönlichen Fitness der Probanden konnte davon ausgegangen werden, dass die Studie durch etwaige Erkrankungen der Probanden, wenn überhaupt, dann nur äußerst begrenzt, beeinflusst worden ist.

5.4.3 Limitationen der Proteindifferenzierung

In einem ersten Schritt wurden die Proben durch biochemische Reaktionen aufgetrennt, um hochabundante Proteine aus den Proben zu isolieren. Trotz hochselektiver Verfahren könnten neben hoch abundanten Proteinen mithin auch niedrigfrequente Proteine bei der Probenreinigung unbeabsichtigt verworfen worden sein. Ebenso könnten hoch abundante Proteine fälschlicherweise in den Proben verblieben sein. In der vorliegenden Studie wurde sich für die Untersuchung niedrigfrequenter Proteine entschieden und der Einfluss von hochabundanten Proteinen methodenbedingt weniger beachtet.

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine geeignete Methode, um Proben entsprechend ihren biochemischen Eigenschaften aufzutrennen und die Proteine im Gel in zwei Dimensionen entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt anzuordnen. Hierbei wird das Proteom auf spezifische Proteineigenschaften hin untersucht.

Die eingeschränkte Analyse von besonders hydrophoben sowie Proteinen mit stark basischem oder saurem isoelektrischem Punkt stellt einen Nachteil der Methode dar ⁹.

Des Weiteren werden nur Proteine mit einer Molekülmasse von 10 kDa-200 kDa durch diese Methode erfasst. Somit können besonders große sowie besonders kleine Proteine nicht in dem Gel abgebildet werden.

Posttranslationale Modifikationen, die Auswirkungen auf die Proteinfunktion haben können, sind durch 2D-DIGE nur begrenzt voneinander zu differenzieren, da modifizierte Proteine ihren biochemischen Eigenschaften nach ein sehr ähnliches Wanderungsverhalten im Gel aufweisen.

Die Fluoreszierung der Proben ermöglicht eine gute Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Versuchsgruppen auf einem Gel.

Dabei müssen sich die aufgetrennten Proteine jedoch durch die verwendeten Farbstoffe markieren lassen. Die Farbmarkierung ist unter anderem von der Proteinkonzentration abhängig.

Abschließend sei erwähnt, dass Herstellung und Handhabung der Gele untersucherspezifischen Schwankungen unterlegen sind und daher nach Möglichkeit die zu vergleichenden Gele von der gleichen Person angefertigt werden sollten.

5.4.4 Limitationen bioinformatischer Netzwerkanalysen

Die zur Proteinidentifikation genutzte MASCOT-Software berechnet auf Grundlage eines wahrscheinlichkeitsbasierten Bewertungsalgorithmus die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen des jeweiligen Proteins unter Angabe einer FDR ⁹. Die Signifikanz der Proteinidentifikation bemisst sich somit aus Datenbankrecherchen. Unterschiedliche Proteindatenbanken kommen hierbei möglicherweise zu widersprüchlichen Prognosen. Außerdem muss das gesuchte Protein bereits in einer Datenbank mit seinen massenspektrometrischen Charakteristika erfasst sein. Zur Untersuchung der Proteininteraktionen wurden bioinformatische Netzwerkanalysen mittels STRING und GeneMania eingesetzt, deren statistischen Auswertungsalgorithmen ebenfalls auf Datenbankinformationen beruhen. Durch die unterschiedlichen Operatoren werden Verwandtschaftsbeziehungen und Signalkaskaden zwischen den detektierten Proteinen identifiziert.

5.5 Beurteilung der postulierten Hypothesen und Ziele

Durch hypobare Hypoxie induzierte Proteinexpressionsunterschiede sowie dadurch beeinflusste Signalkaskaden wurden unter Prüfung der in Kapitel 1.2 formulierten Hypothesen und Ziele untersucht und interpretiert.

Unterschiede in der Proteinexpression zeigten sich nach Hypobarer Hypoxie sowohl nach 30 min als auch nach 60 min andauernder Exposition.

Zwischen der 30 min Interventionsgruppe und der dazugehörigen Kontrollgruppe (3 Proteine) sowie zwischen der 60 min Interventionsgruppe und der dazugehörigen Kontrollgruppe (9 Proteine) konnten signifikant differenziell exprimierte Proteine festgestellt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Studie kann unterstellt werden, dass bereits kurze Expositionszeiten gegenüber hypobarer Hypoxie einen signifikanten Unterschied in der Proteinexpression bewirken.

Bei der Untersuchung der Auswirkungen der zeitlichen Komponente zwischen hypobarer Hypoxie und dessen Einfluss auf die Proteinexpression im Probandenserum (Vergleich 3) ist abzuleiten, dass das Ausmaß der zeitlichen Exposition gegenüber hypobarer Hypoxie mit der Proteinexpression korreliert.

Die zur Identifizierung signifikant beeinflusster Stoffwechselwege durchgeführten bioinformatische Netzwerkanalysen konnten für den 30-Minuten-Vergleich keine Stoffwechselinteraktionen nachweisen.

Ein Einfluss auf die Regulation des Immunsystems konnte hingegen durch bioinformatische Netzwerkanalysen übereinstimmend nach 60 min hypobarer Hypoxie festgestellt werden. Sechs Proteine (GC; CFI; C1QB; PLG; CFHR1; C3) waren dabei mit dem Komplementsystem assoziiert.

Einen signifikanten Einfluss auf die Blutgerinnung konnte weder bei 30 min noch bei 60 min hypobarer Hypoxie festgestellt werden. Lediglich einzelne Proteine, die auch in den Vorversuchen gefunden wurden, konnten durch die vorliegende Studie identifiziert werden. Dementsprechend konnten die Ergebnisse von Hinkelbein et al. aus den Vorversuchen, dass hypobare Hypoxie einen Einfluss auf die Aktivität des Gerinnungssystems hat, nicht hinreichend bestätigt werden.

5.6 Klinische Bedeutung und Ausblick

Neben objektiven Anpassungsvorgängen sind auch Anpassungen auf molekularer Ebene für das Verständnis höhenassoziierter Pathologien von Bedeutung. Flugmedizinisch ist es relevant zu wissen, welche Anpassungsvorgänge, bezogen auf die Zeit und das Ausmaß einer hypobaren Hypoxie auf den menschlichen Organismus wirken, um anschließend Risikoabwägungen treffen zu können.

Während in dem Vergleich der 30 min Gruppen untereinander die Proteinexpressionsunterschiede keine signifikanten Stoffwechselanpassungen bewirkten, konnten im 60 min Vergleich die oben beschriebenen Proteinexpressionsunterschiede detektiert werden. Diese stehen vor allem in Verbindung mit der Regulation des Komplementsystems.

Aufgrund der Komplexität des Komplementsystems ist es ausgesprochen schwer zu postulieren, ob die beobachteten Proteinexpressionsunterschiede nun stimulierend oder hemmend auf die Gesamtfunktion der damit verbundenen Stoffwechselwege reagieren.

Die Ergebnisse der Studie sind als zeitliche Momentaufnahme einer hypobaren Hypoxie bei 15000 ft unmittelbar nach Exposition zu sehen. Über langfristige Anpassungsvorgänge des Körpers nach hypobarer Hypoxie sind daher keine Aussagen zulässig.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Versuchsdurchführung unter experimentellen Bedingungen in einer hypobaren Druckkammer stattfand und sich die Anforderungen an den Organismus bei entsprechendem Umgebungsdruck in einem Flugzeug oder dem Aufenthalt in der Hochebene von den Versuchsbedingungen unterscheiden.

Für zukünftige Studien scheint es relevant zu sein, neben den niedrigfrequenten Proteinen auch hochabundante Proteine in den Proben nachzuweisen, die ebenfalls die Reaktion des Immunsystems beeinflussen. Von weiterem Interesse dürfte außerdem eine Variation des Untersuchungszeitpunktes in Bezug auf die simulierte hypobare Hypoxie sein, da gezeigt werden konnte, dass einige Signalkaskaden erst nach längerer Exposition reguliert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Rashid T, Kobayashi T, Nakauchi H. Revisiting the flight of Icarus: making human organs from PSCs with large animal chimeras. *Cell Stem Cell* 2014; **15**(4): 406-9.
2. Gan WH, Low R, Singh J. Aviation Medicine: global historical perspectives and the development of Aviation Medicine alongside the growth of Singapore's aviation landscape. *Singapore Med J* 2011; **52**(5): 324-9.
3. Nieto Estrada VH, Molano Franco D, Medina RD, Gonzalez Garay AG, Marti-Carvajal AJ, Arevalo-Rodriguez I. Interventions for preventing high altitude illness: Part 1. Commonly-used classes of drugs. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; **6**: CD009761.
4. Hinkelbein J, Jansen S, Iovino I, et al. Thirty Minutes of Hypobaric Hypoxia Provokes Alterations of Immune Response, Haemostasis, and Metabolism Proteins in Human Serum. *Int J Mol Sci* 2017; **18**(9).
5. Tarver WJ, Volner K, Cooper JS. Aerospace Pressure Effects. StatPearls. Treasure Island (FL); 2020.
6. Dzhaliilova D, Makarova O. Differences in Tolerance to Hypoxia: Physiological, Biochemical, and Molecular-Biological Characteristics. *Biomedicines* 2020; **8**(10).
7. Ahmad Y, Sharma NK, Ahmad MF, et al. The proteome of Hypobaric Induced Hypoxic Lung: Insights from Temporal Proteomic Profiling for Biomarker Discovery. *Sci Rep* 2015; **5**: 10681.
8. Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; **66**(1): 39-63; table of contents.
9. Gulcicek EE, Colangelo CM, McMurray W, et al. Proteomics and the analysis of proteomic data: an overview of current protein-profiling technologies. *Curr Protoc Bioinformatics* 2005; **Chapter 13**: Unit 13 1.
10. Ahmad Y, Sharma NK, Garg I, Ahmad MF, Sharma M, Bhargava K. An insight into the changes in human plasma proteome on adaptation to hypobaric hypoxia. *PLoS One* 2013; **8**(7): e67548.
11. Bundesamt S. Pressemitteilung Nr. 050 vom 18. Februar 2020. 2020.
12. Wilson MH, Newman S, Imray CH. The cerebral effects of ascent to high altitudes. *Lancet Neurol* 2009; **8**(2): 175-91.
13. Palmer BF. Physiology and pathophysiology with ascent to altitude. *Am J Med Sci* 2010; **340**(1): 69-77.
14. Smedley T, Grocott MP. Acute high-altitude illness: a clinically orientated review. *Br J Pain* 2013; **7**(2): 85-94.
15. Paralikar SJ, Paralikar JH. High-altitude medicine. *Indian J Occup Environ Med* 2010; **14**(1): 6-12.
16. Reeves GA, Talavera D, Thornton JM. Genome and proteome annotation: organization, interpretation and integration. *J R Soc Interface* 2009; **6**(31): 129-47.
17. Moman RN, Gupta N, Varacallo M. Physiology, Albumin. StatPearls. Treasure Island (FL); 2020.
18. Mathew J, Sankar P, Varacallo M. Physiology, Blood Plasma. StatPearls. Treasure Island (FL); 2021.
19. Achilli C, Ciana A, Minetti G. Oxidation of cysteine-rich proteins during gel electrophoresis. *J Biol Methods* 2018; **5**(4): e104.
20. Tannu NS, Hemby SE. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat Protoc* 2006; **1**(4): 1732-42.
21. Patton WF. Detection technologies in proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; **771**(1-2): 3-31.
22. Pavlovic M, Huber I, Konrad R, Busch U. Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *Open Microbiol J* 2013; **7**: 135-41.

-
23. Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G, Theodoridou K, Kapsimali V, Tsakris A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann Transl Med* 2018; **6**(12): 240.
 24. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research* 2019; **47**(D1): D607-d13.
 25. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic acids research* 2013; **41**(Database issue): D808-15.
 26. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research* 2015; **43**(Database issue): D447-52.
 27. Franz M, Rodriguez H, Lopes C, et al. GeneMANIA update 2018. *Nucleic acids research* 2018; **46**(W1): W60-W4.
 28. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic acids research* 2010; **38**(Web Server issue): W214-20.
 29. Key M. A tutorial in displaying mass spectrometry-based proteomic data using heat maps. *BMC Bioinformatics* 2012; **13 Suppl 16**: S10.
 30. Kirschfink M. Komplementsystem und Komplementdefekte. *Pädiatrie*: Springer; 2014: 738-43.
 31. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res* 2011; **343**(1): 227-35.
 32. Sagar A, Dai W, Minot M, LeCover R, Varner JD. Reduced order modeling and analysis of the human complement system. *PLoS One* 2017; **12**(11): e0187373.
 33. Zhang J, Kew RR. Identification of a region in the vitamin D-binding protein that mediates its C5a chemotactic cofactor function. *J Biol Chem* 2004; **279**(51): 53282-7.
 34. NAGASAWA H, UTO Y, SASAKI H, et al. Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. *Anticancer research* 2005; **25**(6A): 3689-95.
 35. Hoover-Plow J. Does plasmin have anticoagulant activity? *Vasc Health Risk Manag* 2010; **6**: 199-205.
 36. Barthel D, Schindler S, Zipfel PF. Plasminogen is a complement inhibitor. *J Biol Chem* 2012; **287**(22): 18831-42.
 37. Goicoechea de Jorge E, Caesar JJ, Malik TH, et al. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**(12): 4685-90.
 38. Hannan JP, Laskowski J, Thurman JM, Hageman GS, Holers VM. Mapping the Complement Factor H-Related Protein 1 (CFHR1):C3b/C3d Interactions. *PLoS One* 2016; **11**(11): e0166200.
 39. Delanghe JR, Langlois MR. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 2001; **312**(1-2): 13-23.
 40. Schaer DJ, Vinchi F, Ingoglia G, Tolosano E, Buehler PW. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. *Front Physiol* 2014; **5**: 415.
 41. Xue X, Wu J, Ricklin D, et al. Regulator-dependent mechanisms of C3b processing by factor I allow differentiation of immune responses. *Nat Struct Mol Biol* 2017; **24**(8): 643-51.
 42. Franco-Chuaire ML, Ramirez-Clavijo S, Chuaire-Noack L. Pigment epithelium-derived factor: clinical significance in estrogen-dependent tissues and its potential in cancer therapy. *Iran J Basic Med Sci* 2015; **18**(9): 837-55.
 43. Ziff JL, Crompton M, Powell HR, et al. Mutations and altered expression of SERPINF1 in patients with familial otosclerosis. *Hum Mol Genet* 2016; **25**(12): 2393-403.
 44. Kishore U, Ghai R, Greenhough TJ, et al. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunol Lett* 2004; **95**(2): 113-28.
 45. Kragh-Hansen U, Minchiotti L, Galliano M, Peters T, Jr. Human serum albumin isoforms: genetic and molecular aspects and functional consequences. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1830**(12): 5405-17.

-
46. Naldi M, Baldassarre M, Nati M, et al. Mass spectrometric characterization of human serum albumin dimer: A new potential biomarker in chronic liver diseases. *J Pharm Biomed Anal* 2015; **112**: 169-75.
47. Naldi M, Baldassarre M, Domenicali M, et al. Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis. *J Pharm Biomed Anal* 2016; **122**: 141-7.
48. Leblanc Y, Bihoreau N, Chevreux G. Characterization of Human Serum Albumin isoforms by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2018; **1095**: 87-93.
49. Wang C, Jiang H, Duan J, et al. Exploration of Acute Phase Proteins and Inflammatory Cytokines in Early Stage Diagnosis of Acute Mountain Sickness. *High Alt Med Biol* 2018; **19**(2): 170-7.
50. Pavlicek V, Marti HH, Grad S, et al. Effects of hypobaric hypoxia on vascular endothelial growth factor and the acute phase response in subjects who are susceptible to high-altitude pulmonary oedema. *Eur J Appl Physiol* 2000; **81**(6): 497-503.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen	16
Abbildung 2: Schemazeichnung statistischer Messwerte	17
Abbildung 3: Proteinspotmuster der Versuchsgruppen nach 2D-Gelelektrophorese	24
Abbildung 4: Sauerstoffsättigung 30 min Kontrolle	32
Abbildung 5: Sauerstoffsättigung 30 min hypobare Hypoxie.....	32
Abbildung 6: Sauerstoffsättigung 60 min Kontrolle	33
Abbildung 7: Sauerstoffsättigung 60 min hypobare Hypoxie.....	33
Abbildung 8: 2D DIGE Überlagerungsbild 30 min Gruppen mit Standard	35
Abbildung 9: 2D DIGE Überlagerungsbild 60 min Gruppen mit Standard	36
Abbildung 10: 2D DIGE Überlagerungsbild 30 min Interventionsgruppe mit 30 min Kontrollgruppe	37
Abbildung 11: 2D DIGE Überlagerungsbild 60 min Interventionsgruppe mit 60 min Kontrollgruppe	38
Abbildung 12: Fusionsbild aller Versuchsgruppen	39
Abbildung 13: Proteinspots mit >2-fach höherer Expression in der Interventionsgruppe 30 min	40
Abbildung 14: Proteinspots mit >2-fach höherer Expression in der Kontrollgruppe 30 min	41
Abbildung 15: Proteinspots mit >2-fach höherer Expression in der Interventionsgruppe 60 min	43
Abbildung 16: Proteinspots mit >2-fach höherer Expression in der Kontrollgruppe 60 min	44
Abbildung 17: 30 min Kontrollgruppe vs. 30 min Interventionsgruppe	50
Abbildung 18: 60 min Kontrollgruppe vs. 60 min Interventionsgruppe	51
Abbildung 19: 30 min Interventionsgruppe vs. 60 min Interventionsgruppe.....	52
Abbildung 20: 30 min Kontrollgruppe vs. 30 min Interventionsgruppe	53
Abbildung 21: Kontrollgruppe 60 min vs. Interventionsgruppe 60 min	55
Abbildung 22: Interventionsgruppe 30 min vs. Interventionsgruppe 60 min.....	57
Abbildung 23: Heatmap zur Darstellung differenzieller Expressionsniveaus	58

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anfärbung der Proben.....	22
Tabelle 2: Probandencharakteristika.....	31
Tabelle 3: Proteinexpressionsunterschiede der 30 min Gruppen.....	42
Tabelle 4: Proteinexpressionsunterschiede der 60 min Gruppen.....	45
Tabelle 5: Proteinexpressionsunterschiede der Interventionsgruppen	47
Tabelle 6: Differenziell exprimierte Proteinspots in mehr als einem Vergleich	48
Tabelle 7: Mit den Spots assoziierte Proteine	49

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lukas Christopher Nerlich
Geburtsdatum	30.06.1993
Geburtsort	Köln
Familienstand	ledig

Ausbildung

04/2015	Georg-August-Universität Göttingen Studium der Humanmedizin - 3. Ärztliche Prüfung (06/2021) - 2. Ärztliche Prüfung (04/2020) - 1. Ärztliche Prüfung (03/2017)
08/2019 - 12/2019	Universitätsmedizin Göttingen Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie - Studentische Aushilfe IMC-Station
08/2017 - 12/2018	Ev. Krankenhaus Göttingen-Weende - Studentische Aushilfe Intensivstation
11/2014 – 12/2018	Johanniter-Unfall-Hilfe Köln Rettungsassistent im Praktikum (Abschlussprüfung 07/2016) - Anschließend: Studentische Aushilfe im Rettungsdienst
10/2013 – 10/2014	Medakademie Berlin -Ausbildung zum Rettungsassistenten
07/2013	Elisabeth-von-Thüringen Gymnasium Köln -Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,6)
Praktisches Jahr	
12/2020 - 04/2021	Krankenhaus Porz am Rhein 3. Tertial: Innere Medizin
09/2020 - 12/2020	Arztpraxis Spieren&Kollegen (Wenden) 2. Tertial: Allgemeinmedizin
05/2020 - 09/2020	St. Vinzenz-Hospital Köln 1. Tertial: Chirurgie

Famulaturen

09/2018 - 09/2018	Uniklinik Köln Klinik für Kardiologie
07/2018 - 08/2018	Uniklinik Köln Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
01/2018 - 02/2018	Hausarztpraxis Dr. med. Alexander Lorscheidt Köln Allgemeinmedizin
07/2017 - 08/2017	Ev. Krankenhaus Göttingen-Weende Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Beruflicher Werdegang

Seit 07/2021	St. Vinzenz Hospital Köln Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie -Assistenzarzt
--------------	---