

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin V Sportmedizin

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Nieß

In Zusammenarbeit mit der

Universitätsklinik für Anästhesiologie und Transfusionsmedizin

Abteilung Transfusionsmedizin ZKT

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

**Einflüsse von Ausdauertraining auf die Expression von
Hitzeschockproteinen und induzierbarer NO-Synthase.
Eine Analyse auf mRNA-Ebene**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Monika Nadja Annette Vogel
aus
Tübingen
2005**

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Niess

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Leukozytenverhalten.....	1
1.2	Einflüsse von Ausdauertraining.....	4
1.2.1	Trainingsbedingte Alteration von Abwehrfunktionen.....	4
1.2.2	Mechanismen zur Minderung oxidativen Stresses und seiner Folgen.....	5
1.2.3	Stressproteine.....	5
1.2.3.1	HSP72 und HSP27.....	7
1.2.3.2	HSP32 oder Hämoxygenase-1 (HO-1).....	9
1.2.4	Induzierbare NO-Synthase (i-NOS oder NOS2).....	10
1.3	Fragestellung.....	12
2.	Material.....	14
2.1	Probanden.....	14
2.2	Zellmaterial.....	14
2.3	Testkits.....	15
2.4	Geräte.....	15
2.5	Chemikalien.....	16
2.6	Festmaterialien.....	16
2.7	Puffer und Lösungen.....	17
2.8	Immunstimulatoren.....	17
2.9	Molekularbiologische Materialien.....	18
2.9.1	Oligonukleotide.....	18
2.9.2	Enzyme.....	18
2.9.3	Sonstige Materialien.....	18
3.	Methoden.....	20
3.1	Studiendesign.....	20
3.2	Satistik.....	21

3.2.1	Vergleich der basalen Expression.....	21
3.2.2	Einfluss der in vitro Stimulationen.....	22
3.3	Zellisolation und Stimulation.....	22
3.3.1	Isolation mononukleärer Zellen aus Vollblut.....	22
3.3.2	Stimulation.....	23
3.3.2.1	Stimulation mit LPS + Zytokinen und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat.....	23
3.3.2.2	Expression der Hitzeschockproteine HSP27, HSP72 und HSP32.....	24
3.3.3	Separation von Monozyten und Lymphozyten mittels magnetischer Antikörper (MACS).....	24
3.3.3.1	Prinzipien der Zellseparation mittels magnetischer Antikörper.....	24
3.3.3.2	Ablauf der Separation von Monozyten und Lymphozyten.....	25
3.4	Isolierung der RNA.....	26
3.5	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	27
3.6	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	28
3.6.1	Prinzipien der Reversen Transkription.....	28
3.6.2	Prinzipien der Polymerase-Kettenreaktion.....	29
3.6.3	Quantifizierung.....	30
3.6.3.1	Kinetik: der Plateau-Effekt.....	30
3.6.3.2	β -Aktin als endogener Standard.....	31
3.6.3.3	Amplifikationseffizienz.....	32
3.7	Durchführung der Reversen Transkription (RT).....	33
3.8	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
3.9	Gelelektrophorese.....	35
3.10	Auswertung der Signalintensitäten.....	36
4.	Ergebnisse.....	38
4.1	Vorversuche.....	38
4.1.1	Ergebnisse der Trennungsversuche von Lymphozyten und Monozyten.....	38
4.1.2	Abhängigkeit der Transkription des β -Aktin-genes von der Stimulationsart.....	39

4.1.3	Bestimmung des Bereiches der exponentiellen Amplifikation.....	40
4.2.	Stressproteinexpression in PBMC.....	41
4.2.1.	Expressionsverhalten vor und nach Hitzeschock.....	41
4.2.1.1	Vergleich der thermoneutralen Expression.....	41
4.2.1.2	Vergleich des Einflusses der Hitzebelastung auf die HSP27- Expression.....	46
4.2.1.3	Vergleich des Einflusses der Hitzebelastung auf die HSP72- Expression.....	50
4.2.2	Vergleich der hitzeinduzierten Expression der Hämoxigenase-1 (HO-1 oder HSP32).....	51
4.2.3	Vergleich der thermoneutralen und hitzeinduzierten Expression der iNOS.....	54
4.2.4	Zusammenfassung der Hitzestimulation.....	54
4.3	Induzierbarkeit der iNOS mit LPS und Zytokinen oder mit PMA..	57
4.3.1	Stimulation mit LPS und Zytokinen.....	57
4.3.1.1	Abhängigkeit der Reaktion auf Stimulation mit LPS und Zytokinen vom Alter des Probanden.....	59
4.3.1.2	Abhängigkeit der Reaktion auf Stimulation mit LPS und Zytokinen vom Trainingszustand in beiden Gruppen.....	59
4.3.2	Stimulation mit PMA.....	61
4.3.3	Zusammenfassung der Reaktion auf PMA oder LPS und Zytokine.....	61
5.	Diskussion.....	64
5.1	Stressreize bei Ausdauersport (Ausdauersport und Immunsystem).....	64
5.2	Trainingsbedingte Anpassungsmechanismen zur Minderung von oxidativem Stress und seinen Folgen.....	67
5.3	Stimulation mit Hitzeschock.....	68
5.3.1	Stressoren bei Hitze.....	72
5.3.2	Hämoxigenase-1.....	76
5.4	Stimulation isolierter PBMC mit LPS und Zytokinen oder PMA:	

	Analyse der iNOS-Expression.....	77
5.4.1	Altersabhängigkeit, Subpopulationen der Leukozyten und andere Begleitvariablen.....	80
5.4.2	Mögliche Einflüsse der Verarbeitung in vitro.....	82
5.4.3	Ausblick.....	83
6.	Zusammenfassung.....	86
7.	Verzeichnis der Abkürzungen.....	88
8.	Verzeichnis der Abbildungen.....	90
9.	Literaturverzeichnis.....	92
10.	Dank.....	107
11.	Lebenslauf.....	108

1. Einleitung

Während der Evolution war körperliche Leistungsfähigkeit ein Selektionsvorteil. Dass der menschliche Organismus schließlich an ein Leben mit Belastungsreizen angepasst ist und diese zu einem gewissen Grade auch braucht, ist allein angesichts seines entwicklungsgeschichtlichen Hintergrundes denkbar.

Mäßiges Ausdauertraining kann das Abwehrsystem stärken, während andererseits intensive Ausdauerbelastungen das Risiko von Infektionen besonders der oberen Atemwege steigern [Fitzgerald 1991; Nieman 1994]. Auch bei Betrachtung der physiologisch messbaren Reaktionen des Körpers muss sowohl zwischen moderatem und intensivem Sporttreiben, als auch zwischen akuter Belastung und regelmäßigem Training unterschieden werden.

Training bedeutet die ständige Wiederholung einzelner Belastungen, auf welche der Organismus mit Anpassung reagiert. Zweck der Adaptationsprozesse ist eine Ökonomisierung des unbeschadeten Umganges mit diesen, das Gleichgewicht bedrohenden Reizen. Nahezu alle Organsysteme und Funktionsabläufe werden bei Ausdauersport, wie Langstreckenlauf oder Radfahren beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit sollen Einflüsse umfangreichen, intensiven Ausdauertrainings auf Funktionen des Immunsystems untersucht werden.

1.1 Leukozytenverhalten

Die Reaktion der Leukozyten auf eine körperliche Belastung wurde bereits eingehend untersucht. Bereits 1893 wurde nachgewiesen, dass eine zehnminütige intensive Belastung zu einer peripheren Leukozytose führt [Schultz 1893]. Dieses Ergebnis gilt nach zahlreicher Reproduktion als unumstritten.

Ein während der Belastung beginnender und in der Regenerationsphase persistierender Anstieg neutrophiler Granulozyten wird vermutlich durch neuroendokrine Faktoren mit resultierendem Anstieg von Katecholaminen, Glucocorticoiden und Wachstumshormonen verursacht [Pedersen et al 1998; Steensberg et al 2002]. Auch von einer zytokinvermittelten Steigerung der

Phagozytoseaktivität kann man trotz einiger widersprüchlicher Berichte ausgehen [Ortega 1994; Pyne 1994].

Die in peripherem Blut zirkulierenden oder an Endothelzellen adhärenen Monozyten stellen ein frühes Stadium der später in den Geweben ansässigen Makrophagen dar. Die zugehörigen Stammzellen, Promyelozyten können sich im Knochenmark zu Vorläufern von Monozyten oder aber von neutrophilen Granulozyten entwickeln, was einige phänotypische Ähnlichkeiten dieser phagozytierenden Zellen erklärt [Michna 1988].

Neben neuroendokrinen Einflüssen induzieren bei Trauma oder Entzündung freigesetzte Zytokine die Differenzierung der Zellen im Knochenmark und deren Freisetzung ins Blut [Unanue 1993; Ziegler-Heitbrock 1996]. Auch auf sportliche Belastung reagieren Monozyten mit Aktivitätssteigerung und Anreicherung in der Peripherie. Wenn auch deren Beitrag zur Leukozytose angesichts ihres vergleichsweise geringen Anteils (5-15% der Leukozyten) weniger ins Gewicht fällt, so kann doch ihre Zahl im Blut um 50-100% ansteigen [Bury et al 1995; Gabriel et al 1992; Landmann et al 1984; Woods et al 1999].

Die Erkenntnisse über eine belastungsvermittelte Alteration der Funktionen dieser leukozytären Subpopulation entstammen vorwiegend Untersuchungen an Gewebsmakrophagen. Eine Steigerung von Chemotaxis, Adhärenzvermögen, und Phagozytose steht hier einer geringeren Expression des MHC-II-Proteins und der, damit verbundenen, geminderten Antigenpräsentation gegenüber [Fehr et al 1988; Fehr et al 1989; De La Fuente 1990; Forner 1994; Ortega 1997; Woods et al 1993; Woods et al 2000]. Entsprechend diesen Effekten wurde in Folge akuter Belastung bei Makrophagen eine gesteigerte Tumorabwehr neben einer geminderten antiviralen Kapazität beobachtet [Davis et al 1997; Davis et al 1998; Woods et al 2000].

Die allgemeine belastungsvermittelte, sekretorische Aktivitätssteigerung der Leukozyten zeigt sich in der gesteigerten Produktion einiger, für Vermittlung einer Akute-Phase-Reaktion verantwortlicher Zytokine: Interleukin (IL) 1 β , Tumornekrosefaktor (TNF) α , IL6, Interferon (IFN) $\alpha+\gamma$ und IL2 [Evans et al

1986; Northoff et al 1994; Woods et al 1994], wozu auch die Monozyten einen nicht unerheblichen Beitrag leisten [Shawn et al 2001].

Tatsächlich wird nach Ausdauerbelastung eine Akute-Phase-Reaktion beobachtet. Diese geht mit Syntheseinduktion der entsprechenden Proteine in der Leber, Freisetzung von IL6 aus Muskelgewebe, ACTH-Freisetzung und para – bzw autokrin vermittelter Aktivitätssteigerung des gesamten Immunsystems einher. Auch partiell geschädigtes Muskelgewebe wird als Ursache für eine solche Reaktion vermutet [Berg et al 1992; Febbraio et al 2002].

Einen ebenfalls durch Wachstumshormon und Katecholamine vermittelten initialen Anstieg, jedoch nach Ende der Belastung einsetzenden Abfall, zeigt die Zahl der peripheren Lymphozyten [Bury et al 1996; Steensberg et al 2002; Shek et al 1995; Pedersen et al 1998]. In Bezug auf die T-Lymphozyten wurde mehrfach, ein zur Gesamtkonzentration gegensätzlich verlaufendes Verhältnis von T-Helfer (CD4+) zu CD8-positiven Zellen beobachtet [Shek 1995]. Eine, in der lymphopenischen Nachbelastungsphase verminderte Immunglobulinproduktion in vitro stimulierter B-Lymphozyten spricht ebenso, wie der häufig beobachtete IgA-Abfall für eine zeitweise Supprimierung von deren Aktivität [Shek 1995]. Interessant verhält sich auch die NK-Zell-Population. Nach initialem Anstieg hält eine Verminderung ihrer Zahl bis zu 7 Tage nach Belastung an [Shek 1995]. Eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität dieser Zellen, die einer eventuellen Immunsuppression entgegenwirken könnte, kann durch, β -Endorphin vermittelt werden. Letzteres wird beim Sport ausgeschüttet und bindet unter anderem an die, auf NK-Zellen exprimierten δ -Rezeptoren [Pedersen et al 1998].

Reaktionen des Abwehrsystems sind in ihrer Ausprägung von Intensität und Dauer des Reizes abhängig. Auch lässt sich nicht eindeutig sagen, inwiefern sie nun Folge oder Ursache von beobachtetem, belastungsinduziertem (oxidativem) Stress sind. Bei Betrachtung von Trainingseinflüssen kann jedoch sowohl eine gewisse Toleranzentwicklung als auch eine allgemeine Alteration des Immunsystems festgestellt werden.

1.2 Einflüsse von Ausdauertraining

1.2.1 Trainingsbedingte Alteration von Abwehrfunktionen

Für eine Beeinflussung der Abwehrfunktionen durch Ausdauertraining gibt es zahlreiche Hinweise. Abhängig von Ausmaß und Intensität des Trainings kann die Abwehr gestärkt oder geschwächt werden [Fitzgerald 1991; Niemann et al 1990; Niemann 1994]. Mäßiges Ausdauertraining übt einen positiven Einfluss aus [Pedersen et al 1989]. Hohe Trainingsumfänge im Bereich von über 100 km Laufen pro Woche bergen jedoch ein erhöhtes Risiko für Infekte [Brenner et al 1994; Niemann 1994; Weidner 1994]. Zu hartes Training im anaeroben Bereich führt zu Überlastungen und möglicherweise zu einem Übertrainingssyndrom mit erhöhter Infektanfälligkeit [Fitzgerald 1991].

Immunologisch lassen sich geminderte IgA-Konzentrationen im Speichel und eine Funktionsreduktion der neutrophilen Granulozyten feststellen [Gleeson 2000; Pyne et al 1995; Smith et al 1997]. Anders scheint sich jedoch die Aktivität der NK-Zellen zu verhalten, welche auch bei hoch trainierten Athleten verstärkt ist [Niemann et al 1995 b; Pedersen et al 1989].

Abgesehen von einer Studie, bei welcher trainierte Probanden im Blut geringere Neutrophilenzahlen aufwiesen [Blannin et al 1996], deutet wenig auf trainingsbedingte Veränderungen der relativen Anteile peripherer Leukozyten hin [Niemann et al 1995 a; Woods et al 1999].

Untersuchungen des Monozyten-Makrophagen-Systems zeigen zwar ebenfalls keine Änderung der peripheren Zellzahl trainierter Athleten in Ruhe, jedoch lassen sich Alterationen von Aktivität und Reagibilität beobachten [Woods2000]. Bei Makrophagen von Versuchstieren wird von gesteigerter Phagozytose und lysosomaler Aktivität in der Folge von Training berichtet [De La Fuente 1990; Woods et al 2000]. Auch eine gesteigerte Stimulierbarkeit der tumorzytolytischen Aktivität durch LPS und IFN γ zeigen Makrophagen trainierter Mäuse [Lu et al 1999]. Auf einen Zusammenhang dieser Effekte mit reaktiver NO-Produktion wird bei der Charakterisierung der induzierbaren NO-Synthase genauer eingegangen.

1.2.2 Mechanismen zur Minderung von oxidativem Stress und seinen Folgen

Der Vergleich trainierter und untrainierter Organismen in Bezug auf deren Umgang mit Stressreizen weist auf einige Anpassungsreaktionen hin. So könnte die gedämpfte Aktivität der neutrophilen Granulozyten ihren Sinn in einer Minderung des oxidativen Stresses haben. Diesbezügliche Studien weisen auf eine durch Training langfristig verminderte Produktion freier Sauerstoff- oder Stickstoff-Radikale (reactive oxygen species und reactive nitrogen species bzw. abgekürzt ROS und RNS) sowohl stimulierter, als auch unstimulierter phagozytischer Zellen hin [Blannin et al 1996; Gabriel et al 1994; Kumae et al 1999; Pyne 1994; Pyne et al 2000 Smith et al 1990; Smith et al 1997]. Auch zeigen ausdauertrainierte Athleten eine geminderte belastungsinduzierte Schädigung von DNA-Strängen [Asami et al 1998; Niess et al 1996; Niess et al 1997]. Außerdem wurde sowohl im Muskelgewebe, als auch beispielsweise in Thrombozyten und Erythrozyten trainierter Sportler ein erhöhtes antioxidatives Potential festgestellt, wodurch das Gleichgewicht oxidierter und reduzierter Moleküle aufrechterhalten wird [Powers et al 1999 a; Powers et al 1999 b]. So können Ursachen für die oben erwähnte Minderung der ROS-Produktion bei ausdauertrainierten Athleten sowohl eine durch Antioxidantien vermittelte geringere Zellschädigung und damit eine abgeschwächte Akute-Phase-Reaktion als auch eine direkte Suppression der Immunreaktion sein [Fehrenbach et al 2001]. Die, im nächsten Abschnitt vorgestellten Proteine vermögen, neben weiteren Effekten, beides zu vermitteln.

1.2.3 Stressproteine

Änderungen im Puffmuster der glandulären Riesenchromosomen von *Drosophila buschii* stellten den ersten Hinweis für eine Änderung der zellulären Proteinsynthese im Zusammenhang mit der akuten Stressreaktion dar [Ritossa 1962]. Inzwischen ist sowohl die Bestimmung zahlreicher Stressoren, als auch die terminologische Unterteilung der von diesen induzierten Proteine erfolgt. Unter anderem durch Applikation von Temperaturen zwischen 40 und 42°C

(Hitzeschock) lassen sich die hier interessierenden, nach ihrem Molekulargewicht benannten Hitzeschockproteine (HSP) induzieren [Samali et al 1999]. Die definitive Abgrenzung zu anderen Stressproteinen erfolgt durch die Gegenwart eines funktionellen Hitzeschockelementes (HSE) in ihrer Promotorregion. Bei der Induktion der HSP unumgebar ist die Aktivierung eines Hitzeschockfaktors (HSF1). Dieser reagiert auf Hitzeschock und vermutlich auf die damit verbundene Denaturierung von Proteinen. In seinem inaktiven Zustand ist HSF1 an das 90 Kilodalton wiegende HSP90 und an HSP70 gebunden, von welchem er, durch Stressreize vermittelt, dissoziiert. Darauf erfolgt eine Trimerisierung, Phosphorylierung und Bindung an den, das HSE beinhaltenden DNA-Abschnitt, wo nun die Transkription stattfinden kann. Die hier bereits vorhandene RNA-Polymerase II lässt sich schnell aktivieren und sorgt so in Stresssituationen für eine besonders rasche HSP-Expression [Craegh et al 2000].

Der Vollständigkeit wegen seien hier die, neben HSF1 bekannten Hitzeschockfaktoren HSF2-4 erwähnt. HSF1 ist für die Hitzeschockantwort essentiell notwendig und kann dabei durch keinen der anderen vier Faktoren ersetzt werden [Mc Millan et al 1998]. HSF2 reagiert nicht auf klassische Stressreize, sondern hat eine Aufgabe in der Kontrolle der entwicklungs- und differenzierungsspezifischen Genexpression [Pirkkala et al 2001]. Die Vermittlung der Transkription von HSP70 gehört jedoch auch zum Aufgabenbereich von HSF2 [Leppä et al 1997; Morimoto 1998]. Die Expression von HSF3 wurde bisher nur bei Vögeln vorgefunden [Pirkkala et al 2001]. Hier findet bei der Reaktion auf Hitzeschock eine Kooperation von HSF1 und -3 statt, [Tanabe 1998]. Der, als neuester, bei Säugetieren entdeckte HSF ist HSF4. Durch RT-PCR ist er zwar nicht in allen Geweben nachweisbar, eine Expression beim Menschen ist jedoch gesichert [Nakai et al 1997; Tanabe et al 1999], wobei die Frage nach einer Reaktion auf Stressreize nicht geklärt ist [Pirkkala et al 2001].

HSF1 dagegen reagiert innerhalb von Minuten auf die Gegenwart von denaturierten Proteinen, Hitzeschock [Fehrenbach et al 1999; Locke 1995; Mosser et al 1988] und womöglich auf weitere, unter anderem bei

Ausdauerbelastung auftretende Reize [Locke 1995]. Die Induzierbarkeit der HSP durch solche Stressreize ist besonders vor dem Hintergrund ihrer intrazellulären Aufgabe als molekulare Chaperone zu sehen. Sie sorgen in ATP-abhängigen Reaktionen für die korrekte Faltung, Transport, Stabilisierung oder Abbau neusynthetisierter oder denaturierter Proteine [Fehrenbach et al 1999; Locke 1995; Morimoto et al 1994; Zugel et al 1999;].

Wie übrigens auch das HSE wurden HSPs während der Evolution stark konserviert und lassen sich in Hefen und Bakterien ebenso, wie in zahlreichen menschlichen Zellen nachweisen [Lindquist 1992]. Im folgenden sollen drei HSPs unterschiedlichen Molekulargewichtes vorgestellt werden.

1.2.3.1 HSP72 und HSP27

Zur Gruppe der ca. 70kD wiegenden, teilweise auch konstitutiv exprimierten HSP70 gehört das induzierbare HSP72. HSP27 andererseits gehört zu den sogenannten small HSP und unterscheidet sich weniger in seinen Induktionsmechanismen, mehr jedoch in seiner intrazellulären Aufgabe von HSP72. Die Expression beider Proteine nach sportlicher Belastung ist in zahlreichen Geweben nachgewiesen, wobei mehrere Faktoren bei der Induktion beteiligt sind [Fehrenbach et al 1999]. Temperaturunabhängige Induktionsmechanismen spielen jedoch auch hier eine bedeutende Rolle [Locke 1995]. Neben den oben genannten Stressoren (erhöhte körperliche Belastung und erhöhte Körper-Kerntemperatur) reagiert besonders HSP27 im Muskel bereits auf den, durch Kontraktion verursachten Stressreiz [Locke 2002]. Im Unterschied zu HSP70 ist das, auch als Homologes des α B-Crystallin bezeichnete HSP27 in der Lage, zelluläre Mikrofilamente vor dem Zerreißen zu bewahren [Welsh et al 1998 ; Head et al 2000]. Die HSP72-Expression im Skelettmuskel kann andererseits auch durch eine verminderte Verfügbarkeit von Glucose in Gang gesetzt werden [Febraio et al 2002].

Wie bereits oben erwähnt besteht ein enger Zusammenhang zwischen stressassoziierter Beeinträchtigung des Körpers und der Immunantwort. Die komplexe Bedeutung der HSP für das Abwehrsystem ist daher keineswegs erstaunlich. Unterschieden werden muss hier zwischen einer intrazellulären,

zytoprotektiven, immunsuppressiven und einer extrazellulären immunstimulatorischen Wirkung. Letztere besteht in einer Aktivierung von Immuneffektorzellen und einer Steigerung der Zytokinfreisetzung, worauf an dieser Stelle jedoch nicht weiter eingegangen werden soll [Asea et al 2000; Palliser 2001].

Intrazellulär steigt die HSP-Produktion infolge der Einwirkung von Zytokinen, was mit einer Toleranz der Zelle gegenüber sonst letalen Dosen von beispielsweise TNF α verbunden ist. Gleichzeitig wird die zelleigene Produktion immunmodulatorischer Botenstoffe gehemmt [Hirvonen et al 1996; Moseley 2002].

HSP tragen intrazellulär zu Toleranzentwicklung der Zellen gegenüber sonst möglicherweise letalen Bedingungen bei [Morimoto et al 1994]. In zahlreichen Geweben wurde dieser Effekt im Hinblick auf verschiedene Reize nachgewiesen. Den Untersuchungsergebnissen ist eine, intrazelluläre HSP-Akkumulation gemeinsam [Marini et al 1996; Morimoto et al 1994; Moseley 1994; Moseley 1997; Perdrizet 1995], die mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit für die Zelle verbunden ist. Wenn ein subletaler Hitzereiz durch Anreicherung protektiver Stoffe vor ansonsten letalem Hitze-Stress schützt, wird dies als Entwicklung von Thermotoleranz bezeichnet.

Eine intrazelluläre Akkumulation von HSP bewirkt Thermotoleranz isolierter Zellen und spielt außerdem eine Rolle bei der Hitzeadaptation ganzer Organismen [Maloyan et al 1999]. So wird im Zuge der Akklimatisation von Versuchstieren das schützende System der Hitzeschockproteine zu einer schnelleren Reaktion prädisponiert [Maloyan et al 1999].

Die gesteigerte HSP-Expression in Leukozyten nach akuter Ausdauerbelastung wurde mehrfach, sowohl auf mRNA – als auch auf Proteinebene nachgewiesen und ist in der Regel von Leukozytose und gesteigerter Zytokinfreisetzung begleitet [Fehrenbach et al 2000 a; Niess et al 2000; Fehrenbach et al 2001 a; Fehrenbach et al 2000 b; Niess, et al 1999 b; Ryan et al 1991].

Wie bereits erwähnt, sind hier nicht nur stoffwechselbedingte Temperaturanstiege bei der Induktion beteiligt [Pedersen 1997].

Bei Betrachtung der komplexen Effekte akuter Reize stellt sich die Frage nach dem Einfluss von Training auf Induzierbarkeit und Expression der Hitzeschockproteine. Obwohl sich der relative Stress einer Belastung bei Wiederholung durch Anpassung vermindert, wurden von Liu et al. in der Skelettmuskulatur während einer Trainingsphase persistierend erhöhte HSP-Konzentrationen beobachtet [Liu et al 1999] .

Fehrenbach et al. untersuchten diesbezüglich periphere Leukozyten. Bei mäßig trainierten Athleten fanden sich auf Proteinebene niedrigere basale Konzentrationen an HSP27 und HSP70, als dies bei untrainierten Personen der Fall war. Die mRNA-Analyse ergab bei den Trainierten zwar weniger für HSP27 codierende Transkripte, an HSP70-mRNA fand sich jedoch bei mäßig trainierten Athleten mehr, als bei der Kontrollgruppe. Eine Stimulation durch Hitzeschock zeigte, zumindest auf Transkriptionsebene ebenfalls je nach Trainingszustand der Probanden ein unterschiedliches Expressionsverhalten im Sinne stärkerer Anstiege bei trainierten Probanden [Fehrenbach et al 2000 a].

1.2.3.2 HSP32 oder Hämoxygenase-1 (HO-1)

In einigen Eigenschaften den HSP72 und 27 ähnlich ist ein weiteres, 32 kD schweres Hitzeschockprotein, welches auch als induzierbare Hämoxygenase oder HO-1 bekannt ist. Während die beiden anderen Isoenzyme HO-2 und HO-3 konstitutiv exprimiert werden, lässt sich die Expression der HO-1 neben Hitzeschock bzw. dessen biochemischen Folgen durch verschiedene weitere Stressoren induzieren. Unter anderem sind dies oxidativer Stress, Zytokine und Bakterientoxine, aber auch die Gegenwart von Häm und Fe^{2+} [Galbraith 1999; Keyse 1997]. Von einer direkten Induktion der HO-1 durch Hitzeschock kann man beim Menschen nicht ohne weiteres ausgehen, da fraglich ist, ob das zugehörige Heat- Shock- Element hier tatsächlich aktiv ist [Okinaga et al 1996]. Die HO wirkt als Schrittmacherenzym beim Hämabbau, indem sie die Reaktion



katalysiert. Für die antioxidative Wirkung werden hier vor allem Biliverdin und das daraus entstehende Bilirubin verantwortlich gemacht [Belanger et al 1997; Clarc et al 2000]. Eine weitere Aufgabe der Hämoxigenase ist allerdings auch die Induktion der Ferritinsynthese, durch deren, auch zu den Akute-Phase-Proteinen zählendes Produkt Ferritin die intrazelluläre Bindung von Fe^{2+} möglich wird [Clark 2000; Galbraith 1999; Vile 1993]. Eine weitere Reaktionsmöglichkeit der HO-1 ist ihre Interaktion mit Stickoxid (NO), wobei letzteres sowohl als Induktor wirken, als auch reziprok durch HO in seiner eigenen Synthese gehemmt werden kann [Motterlini et al 1996; Takahashi et al 1997; Willis et al 1995]. Das beim Hämabbau entstehende CO hat übrigens zum Teil ganz ähnliche Wirkungen, wie NO [Maines 1997]. Eine Induktion der Hämoxigenase durch sportliche Tätigkeit wurde sowohl in Muskelgewebe [Essig et al 1997], als auch in peripheren Leukozyten nachgewiesen [Niess 1999 b]. Da jedoch letzteres im Anschluss an einen Langstreckenlauf erfolgte, spielt hier der Einfluss einer gesteigerten Hämolyse auf die HO-Induktion neben einigen anderen, mit Belastung verbundenen Stressoren (Oxidativer Stress, Zytokinfreisetzung, LPS) ebenfalls eine Rolle.

1.2.4 Induzierbare NO-Synthase (i-NOS oder NOS2)

Ebenso komplex, wie die Bedeutung ihres Produktes Stickoxid (NO) sind Verbreitung und Aufgaben der verschiedenen Formen der NO-Synthase (NOS). Wie bei der Hämoxigenase sind auch für die NOS drei Isoenzyme bekannt. Entgegen früheren Vermutungen spielen neben der induzierbaren NOS (iNOS) auch die beiden konstitutiv exprimierten Formen neuronale NOS (nNOS) oder NOS1 und epitheliale NOS (eNOS) oder NOS3 eine Rolle im Immunsystem [Bogdan 2001]. Alle drei Isoformen katalysieren dieselbe Reaktion, bei welcher aus L-Arginin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff Citrullin und NO entstehen [Lincoln 1997]. Neben vielen neu entdeckten Aufgaben hat NO in Nervengewebe unter anderem transmitterähnliche Funktionen und in glatten Gefäßmuskelzellen eine relaxierende Wirkung. Jedoch auch die immunologische Bedeutung des von der iNOS im Monozyten-Makrophagensystem, in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie in

Natural Killer (NK) Zellen synthetisierten NO ist bereits sehr vielseitig [Lincoln 1997; Weinberg et al 1995; Xiao et al 1995]. Unterschieden werden kann hier eine Effektorfunktion von immunregulatorischen Aufgaben. Die Effektorfunktion besteht in der Erregerabwehr, welche vorwiegend durch das bereits erwähnte toxische Potential von NO• und dessen Reaktionsprodukten erfolgt. Aber auch Tumorzellen und gesunde, körpereigene Zellen können so abgetötet werden [Lowenstein et al 1994]. Immunregulatorisch sind zumindest bei Nagetieren Einflüsse auf zahlreiche Zytokine, und eine dadurch vermittelte Regulation von Lymphozyten (vorwiegend T-Helfer-Typ1 Zellen) bekannt [Barnes et al 1995]. Interessant ist der antiinflammatorische, immunsuppressive Charakter dieser NO-Funktion [Langrehr et al 1993]. So kommt es im Tierversuch zu einer iNOS- bzw. NO-vermittelten Hemmung autoimmun aktiver T-Lymphozyten [Bogdan 1998; Bogdan 2000]. Neben einer Induktion durch Hitzeschock [Kröncke et al 1995] und ROS [Bogdan 2001] stellt diese entzündungshemmende Eigenschaft der iNOS eine weitere Gemeinsamkeit mit den Hitzeschockproteinen dar. Auch eine Expression infolge Ausdauerbelastung lässt sich nachweisen. In peripheren Leukozyten erfolgte dies im Anschluss an Langstreckenläufe [Niess et al 2000 a].

Die für Regulation der iNOS bekannten Mediatoren sind neben den bereits genannten ROS (reactive oxygen species) Zytokine wie TNF α , IFN γ , IL1, IL2 und bakterielle Membranbestandteile wie LPS [Bogdan 2001; Lincoln 1997]. Neben einer Aktivierung kationischer Aminosäuretransporter (CAT) und konsekutiver Aufnahme von L-Arginin in die Zellen und einigen weiteren Wirkungen binden letztere an den, unter anderem von Monozyten exprimierten Rezeptor CD14 und induzieren so die Synthese von iNOS mRNA [Bogdan 2001].

Im Zusammenhang mit trainingsinduzierter Steigerung der antitumoralen Aktivität von Makrophagen bei Versuchstieren wird von einer iNOS - und NO-Syntheseinduktion berichtet [Lu 1999]. Lu et al. verglichen parallel zur zytolytischen Kapazität die, durch LPS und IFN γ induzierte Synthese von iNOS und NO $_2$ -. Der Vergleich stimulierter iNOS-Produktion von Makrophagen trainierter und untrainierter Mäuse erfolgte hier mit Hilfe der Reversen-

Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Parallel zu einer trainingsbedingten Steigerung der iNOS-Aktivierung auf RNA-Ebene kann eine verstärkte Tumorabwehr festgestellt werden [Lu et al 1999]. Bei trainierten Nagetieren wurde eine Drosselung der basalen iNOS Expression in Makrophagen nicht beobachtet. Ein derartiger Effekt zeigte sich jedoch beim Vergleich von humanen Leukozyten trainierter und untrainierter Probanden [Niess et al 2002 b]. Ebenfalls mit Hilfe einer RT-PCR wurden von Niess et al. die Werte der unstimulierten iNOS Produktion verglichen, wobei sich bei den ausdauertrainierten Athleten weniger mRNA in Leukozyten nachweisen ließ. Wie sich der Einfluss von Ausdauertraining auf die induzierte Expression der iNOS in humanen PBMC verhält ist eine der Fragen, denen in dieser Arbeit nachgegangen werden soll.

1.3 Fragestellungen:

Die Aufgaben der vorgestellten Proteine in Stressmomenten sind offensichtlich ebenso zahlreich, wie bedeutungsvoll. Die Induktion dieser Proteine durch akute sportliche Belastung wurde in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Bereits beschriebene trainingsbedingte Veränderungen von Regulation und Expression der HSP in Leukozyten weisen jedoch auf eine mögliche Beteiligung weiterer Anpassungsmechanismen hin. Andererseits ist aber auch ein direkter Zusammenhang von HSP-Akkumulation und Resistenz von Zellen und Geweben bekannt [Moseley 2002].

Auch die induzierbare NO-Synthase zeigt im Tiermodell eine trainingsabhängige Alteration ihrer Expression, welche bei trainierten Nagetieren mit einer gesteigerten Zytotoxizität der Makrophagen einhergeht [Lu et al 1999].

Um genauere Erkenntnisse über Modulationen von Stressreaktionen in leukozytären Subpopulationen des Menschen zu erhalten, soll in der vorliegenden Arbeit folgender Frage nachgegangen werden:

Wie wirkt sich regelmäßiges Ausdauertraining auf basale und stimulierte mRNA- Expression von HSP und iNOS in peripheren mononukleären Zellen aus?

Als Untersuchungsgut diente venöses Vollblut unbelasteter Probanden einer trainierten (TR) und einer untrainierten (UT) Personengruppe.

Auf Transkriptions- bzw. mRNA-Ebene geklärt werden sollten:

1. Trainingseinflüsse auf mögliche Prozesse einer Toleranzentwicklung (HSP-Produktion):

Kann Ausdauertraining die Hitzeschockantwort, d.h. die Stimulierbarkeit der Synthese von HSP27, HO-1 und HSP72 in mononukleären Zellen verändern?

2. Trainingseinflüsse auf Abwehrfunktionen der Zellen (iNOS-Produktion):

Beeinflusst Ausdauertraining die Stimulierbarkeit der iNOS-Produktion in mononukleären Zellen?

Die Expression der iNOS wurde in vitro durch Stimulation von PBMC mit den Zytokinen $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ und mit LPS induziert.

Weitere PBMC-Proben wurden entweder dem Phorbol-ester PMA oder ebenfalls einem Hitzereiz ausgesetzt.

Auch hier fand der Vergleich von TR und UT anschließend auf mRNA-Ebene statt.

2. Material

2.1 Probanden

Die Gruppe der Probanden bestand aus 42 stoffwechselgesunden, nichtrauchenden, männlichen Personen im Alter von durchschnittlich 30,2 (27,9-32,4) Jahren (Tab. 3).

In den Tagen vor der Blutabnahme waren sie keinem außergewöhnlichen physischen oder psychischen Stress ausgesetzt und hatten während der vorangegangenen Wochen sowohl auf die Einnahme von Vitaminpräparaten als auch auf Saunabesuche und andere Aufenthalte in warmer Umgebung verzichtet.

Einen Teil der Probandengruppe bildeten 22 ausdauertrainierte Sportler (TR), welche pro Woche regelmäßig und wettkampforientiert seit mindestens 5 Jahren Lauftraining oder allgemeines Ausdauertraining (Laufen, Schwimmen, Radfahren; durchschnittlich 10,2 h/Woche) absolvierten. Die individuelle anaerobe Schwelle lag bei einem, in dieser Gruppe durchgeführten Routine-Laufbandtest durchschnittlich bei 4,1 m/s, was für einen recht guten Trainingszustand spricht [Roecker 1998].

Die andere Hälfte bestand aus 20, nicht spezifisch trainierten Kontrollpersonen, welche wöchentlich weniger als 2 Stunden sportlich aktiv waren.

2.2 Zellmaterial

Es wurden aus venösem Vollblut isolierbare, periphere mononukleäre Zellen (PBMC) verwendet. Im einzelnen sind dies:

-Lymphozyten

- B-Lymphozyten

- T-Lymphozyten

- CD8/zytotoxische Zellen

- CD4/T-Helfer Zellen

- Null-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

-Monozyten

-Reste von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten

Anzahl der Zellen bei trainierten und untrainierten Probanden sind in Tabelle 2 aufgeführt.

2.3 Testkits

GeneAmp®RNA Components	PCR-KIT	Perkin Elmer, Weiterstadt
Rneasy Mini Blood Kit		Quiagen Germany, Hilden

2.4 Geräte

2219 Multitemp.2, Circulator	Termostatic	LKB Bromma, Schweden
EBA 12R Zentrifuge		Hettich, Tuttlingen
Gelelektrophoresekammern und Spannungsgerät		Life Technologies, Karlsruhe
Gene Amp® PCR System 9700 Thermal Cycler		Perkin Elmer, Weiterstadt
MP4 Land Camera mit UV-Leuchttisch		Biometra, Göttingen
Photometer		Pharmacia, Freiburg
-20°C Schrank		Linde, Siegen
-80°C Schrank		Labotec, Göttingen
Raytest UV-Kammer		Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
mit angeschlossener Digitalcamera DIANA/95 1,6		Raytest isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
2-D Densitometrie Programm AIDA Version 2.0		Raytest isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
Laserdrucker		Hawlett and Packard
Wasserbad		GFL-GmbH, Burgwedel
Stericult 200 Incubator		Forma Scientific, USA
Vortex-Gerät Typ REAX top		Heidolph, Kehlheim

Sterile Werkbank	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Durchflußzytometer Cell Dyn	Abbot GmbH, Wiesbaden-Delkenheim

2.5 Chemikalien

Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid Stammlösung (10ng/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na-EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dichtegradient Lymphoflot	Biotest, Dreieich

Heparin-Natrium „Multi“ 10000 I.E./ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.6 Festmaterialien

EDTA-S-Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf-Pipetten (1-10, 10-100, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf PCR tube (0,2ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf 1,5 und 2 ml Tubes	Eppendorf, Hamburg
Falcon, 50 ml Blue Max™ Polypropylen	Becton Dickinson, USA
Falcon, 15ml	Becton Dickinson, USA
Polaroid-Filme, T667 ISO 7000	Polaroid
Safe Seal-Tips® Sterile Filter (10, 100, 1000 µl)	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Nitro-Handschuhe Nitra-Touch	Ansell GmbH, München
Fortuna® Pasteurpipetten	Poulten & Graf GmbH, Wertheim
MiniMACS-Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Darin enthalten:	

MiniMACS
Hochleistungs-Dauermagnet,
MACS-Ständer,
Säulen für positive Trennung,

2.7 Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser:

0,1% DEPC (Diethylpyrokarbonat) in
a.bidest 15' unter Rühren lösen.

Sigma-Aldrich, Steinheim

Danach autoklavieren

DTT (Dithiothreitol)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Mit DEPC-Wasser 2,5 molar ansetzen.

Bei -20°C dFNrieren

50xTAE-Puffer

2M Tris und 0,05 M Na₂EDTA

Sigma-Aldrich, Steinheim

mit Eisessig auf pH 7,5-8,0 einstellen

Merck, Darmstadt

Tris-Puffer

Sigma-Aldrich, Steinheim

10 mM Tris-Cl

PBS (phosphate buffered saline)

Life Technologies, Eggenstein

Aqua dest.

Delta Pharma, Boehringer Ingelheim

RPMI (Rosewell Park Memorial
Institute) Medium

Biochrom KG, Berlin

Hepes 1M

Biochrom KG, Berlin

PBS-Puffer

PBS mit jeweils bezogen auf die
Endmenge 0,5% BSA

Life Technologies, Eggenstein

Sigma-Aldrich, Steinheim

(Bovine Serum Albumin) und

2mM EDTA mischen

Sigma-Aldrich, Steinheim

2.8 Immunstimulatoren

IFN γ (Interferon- γ)

R&D Systems, Wiesbaden

LPS (Lipopolysaccharid) von

Sigma-Aldrich, Steinheim

Salmonella Minnesota

PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)

TNF α (Tumornekrosefaktor- α)

Sigma-Aldrich, Steinheim

R&D Systems Wiesbaden

2.9 Molekularbiologie

2.9.1 Oligonukleotide

Die mittels Standard-HPLC gereinigten Oligonukleotidprimer der Firma Interaktiva, Ulm wurden in aqua bidest. zu 100 pmol/ μ l gelöst und konnten so bei -80°C aufbewahrt werden.

Tabelle 1: Stressprotein-Oligonukleotidprimersequenzen

<u>Stressprotein</u> Sense Primer	Antisense Primer	Amplifikat (bp)
<u>HSP27</u> CACGAGGAGCGGCAGGACGAG	CAGTGGCGGCAGCAGGG GTGG	285
<u>HSP72</u> CTCCAGCATCCGACAAGAAGC	ACGGTGTTGTGGGGGTTT AGG	234
<u>HO-1</u> CAGGCAGCGAATGCTGAGTTC	GATGTTGAGCAGGAACGC AGT	555
<u>I-NOS</u> CGGTGCTGTATTTCTTACGAGG CGAAGAAGG	GGTGCTGCTTGTAGGAG GTCAAGTAAAGGGC	258
<u>β-Aktin</u> GGCGGCACCACCATGTACCCT	AGGGGCCGGACTCGTCAT ACT	202

2.9.2 Enzyme

MuLV Reverse Transkriptase

RED TAQ DNA Polymerase (1U/ μ l)

Perkin Elmer, Weiterstadt

Sigma-Aldrich, Steinheim

2.9.3 Sonstige Materialien

RNAse Inhibitor

Perkin Elmer, Weiterstadt

Oligo-d(T)16-Primer	Perkin Elmer, Weiterstadt
dGTP, 10mM	Perkin Elmer, Weiterstadt
dATP, 10mM	Perkin Elmer, Weiterstadt
dTTP, 10mM	Perkin Elmer, Weiterstadt
dCTP, 10mM	Perkin Elmer, Weiterstadt
10xPCR Puffer	Perkin Elmer, Weiterstadt
100 bp DNA-Leiter (Bandenmarker)	Life Technologies
Magnetgelabelte AntiCD-14 IgG2a der Maus (MACS-MikroBeads)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

3. Methoden

3.1 Studiendesign

Um eine besonders gute Vergleichbarkeit zu erreichen und um eventuelle Einflüsse tagesabhängiger methodischer Variabilität ausschließen zu können, wurde an den Versuchstagen jeweils 2 trainierten und 2 untrainierten Probanden Blut abgenommen. Die Blutabnahmen erfolgten morgens zwischen 8:00 und 9:00 Uhr in sitzender Position. Von den 80 ml in EDTA-Monovetten abgenommen venösen Blutes wurden 40 ml für die RNA-Isolierung eingesetzt. Weitere 40 ml standen für die, parallel zur Reversen Transkription und PCR ablaufende Analyse auf Proteinebene zur Verfügung.

Um Hinweise auf eventuell vorangegangene Stressmomente zu erhalten, wurden für jeden Probanden eine Blutbildanalyse, sowie die Bestimmung relevanter Laborparameter, durchgeführt. Mit Hilfe von Fragebögen wurden sowohl anthropometrische als auch anamnestische und trainingsspezifische Daten erhoben. Gefragt wurde außerdem nach ungewöhnlicher Anstrengung, Medikamenteneinnahmen, Tabakkonsum, Saunabesuchen oder Krankheiten, welche als Ausschlusskriterien galten.

Die Werte sind in den folgenden Tabellen (Tab. 2 und 3) als Mediane mit den zugehörigen 95% Konfidenzintervallen zusammengestellt:

Tabelle 2: Anzahl der Zellen leukozytärer Subpopulationen bei TR und UT

Leukozytäre Subpopulation	Zellzahl ($10^9/l$) bei Trainiert (TR) n=22	Zellzahl ($10^9/l$) bei Untrainiert (UT) n=20
Neutrophile Granulozyten	2,64 (2,32 - 2,96)	2,75 (2,42 - 3,09)
Lymphozyten	1,93 (1,69 - 2,18)	1,90 (1,64 - 2,16)
Monozyten	0,43 (0,38 - 0,49)	0,49 (0,43 - 0,55)
Eosinophile Granulozyten	0,25 (0,20 - 0,30)	0,20 (0,14 - 0,26)
Basophile Granulozyten	0,06 (0,03 - 0,06)	0,05 (0,05 - 0,06)

Tabelle 3: Anthropometrische Daten, Trainingsumfänge und Laborwerte der Probanden

Parameter	Trainiert (TR) n=22	Untrainiert (UT) n=20
Alter (Jahre)	31,5 (28,5-34,6)	28,5 (25,4-31,6)
Größe (cm)	177 (175-181)	181 (178-184)
Gewicht (kg)	68 (64,3-71,7)	77,9 (74,1-81,7)
BMI (kg/ m ²)	21,6 (20,6-22,7)	23,7 (22,8-24,7)
Ausdauertraining (h/Woche)	10,2 (8,7-11,9)	< 2
CRP (mg/l)	0,19 (0,10-0,29)	0,21 (0,11-0,31)
Cortisol (µg/dl)	20,1 (17,7-22,4)	17,8 (15,4-20,3)
Harnstoff (mg/dl)	33,1 (29,5-36,6)	28,8 (25,3-32,3)
Harnsäure (mg/dl)	5,5 (4,9-6,0)	5,1 (4,5-5,7)
CK (U/l)	88 (62-113)	63 (36-90)

3.2 Statistik

Die Statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Software-Pakets JMP 4.0 (SAS Institute, Cary, USA).

3.2.1 Vergleich der basalen Expression

Um Unterschiede des basalen Expressionsverhaltens der Stressproteine bei trainierten und untrainierten Probanden zu erkennen wurden Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle errechnet. Eine Darstellung derselben erfolgte mit rautenförmigen, sogenannten Diamonds, deren Querachse auf Höhe der Mittelwerte liegt, während die senkrechte Achse Lage und Ausmaß der Konfidenzintervalle repräsentiert. Zusätzlich erscheinen alle Einzelwerte in den Diagrammen (Abb. 7-10).

Eine eventuelle Überlappung der Konfidenzintervalle wird bereits bei Betrachtung der Diamonds sichtbar. Die Prüfung von Signifikanzen jedoch erfolgte zusätzlich durch Anwendung des zwei-Proben t-Test für ungepaarte

Betrachtungen. Bei $p < 0,05$ wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen.

3.2.2 Einfluss der in vitro Stimulationen

Ähnlich wie die Expression in unstimulierten Zellen wurden die Effekte der in-vitro Stimulation durch Errechnung von Mittelwerten und 95%-Konfidenzintervallen verglichen. Auch die Darstellung der individuellen Differenzen zwischen Stimulations- und Kontrollbedingungen erfolgte in einem Diagramm mit eingezeichneten Diamonds. Von einem signifikanten Einfluss der Reize auf das Expressionsverhalten wurde ausgegangen, wenn die Raute keine Verbindung zum Nullpunkt zeigte, wenn die Nulllinie also außerhalb des 95%-Konfidenzintervalles lag (Abb. 11, 13-15, 17, 18, 20 und 23) [Gardner 1986]. Der Signifikanzlevel für Unterschiede zwischen TR und UT wurde bei Anwendung des t-Test ebenfalls bei $p < 0,05$ festgelegt.

Die Normalverteilung der errechneten Differenzen wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Test geprüft [Royston 1982]. Eine ausreichende Signifikanz wurde für $p > 0,01$ bzw. $W > 0,01$ angenommen. Bei fehlender Normalverteilung bzw. $W < 0,01$ erfolgte eine erneute Prüfung nach Logarithmierung der Werte (Abb. 12 und 16).

3.3 Zellisolation und Stimulation

Für die Expressionsanalyse der verschiedenen Stressproteine wurde auf unterschiedliche Art mit den Blutproben verfahren.

3.3.1 Isolation mononukleärer Zellen aus Vollblut

Falcon Röhrrchen mit dem Fassungsvermögen 15ml wurden mit 5-7ml des gekühlten Dichtegradienten Lymphoflot gefüllt. Anschließend wurde das in sterilen EDTA-Röhrrchen gewonnene Vollblut im Verhältnis 1:1 darübergeschichtet.

Nach 20 min. Zentrifugation bei 400xg und ohne Bremse entstand ein Ring aus mononukleären Zellen in den Falcon Röhrrchen, welcher mit Pasteurpipetten abgetragen wurde. Der aus Plasma, und den übrigen Blutzellen bestehende

Rest wurde hier nicht weiter verwendet. In 2 Waschgängen mit jeweils 50 ml PBS wurden die Zellen von restlichem Lymphoflot und darin suspendierten Thrombozyten gereinigt. Im ersten Waschgang wurden die Zellen in 1x PBS suspendiert und 10 Minuten lang bei 230xg zentrifugiert. Darauf folgte das Abschütten des Überstandes und Resuspension des entstandenen Zellpellets mit dem Vortex-Gerät. Beim zweiten Waschgang wurden die Zellen erneut in PBS suspendiert und mit 110xg zentrifugiert.

3.3.2. Stimulation

3.3.2.1. Stimulation mit LPS + Zytokinen und mit Phorbol-ester

Die Expression des Enzyms induzierbare NO-Synthase in peripheren mononukleären Zellen wurde einerseits mit Hilfe von LPS und den Cytokinen TNF α und IFN γ und andererseits mit dem Phorbolsäureester PMA (Phorbol-Myristat-Azetat) stimuliert. Durch einige Vorversuche wurden auf Proteinebene die, für die gegebenen Versuchsbedingungen effektivsten Stimulationsverhältnisse bestimmt [Waldvogel 2005].

Etwa $0,8-2 \times 10^7$ gereinigte, mononukleäre Zellen wurden nun in je 2ml RPMI suspendiert und in 50ml Falcon Blue Caps mit den Stimulatoren versehen. Eine der 3 Suspensionen verblieb als Negativkontrolle ohne Zugabe weiterer Substanzen.

Um eine Kontamination der Negativkontrollen und des Labors zu vermeiden wurden die folgenden Schritte an der sterilen Werkbank bei laminarem Luftzug durchgeführt.

Zur zweiten der 3 Suspensionen wurden LPS (100ng/ml), TNF α (50ng/ml) und IFN γ (50ng/ml) gegeben. Zur dritten Suspension wurde 1mM PMA (3080ng/ml) pipettiert. Danach war besonders wegen der Neigung des LPS zu Adhärenz an Kunststoffflächen auf gutes Durchmischen zu achten.

Die Proben wurden nun für einen Zeitraum von 3h bei 37°C inkubiert. Danach fand zur Reinigung von Stimulatoren für 15 Minuten eine weitere Zentrifugation bei 200x g in 50 ml PBS statt. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet resuspendiert und weiterverarbeitet.

3.3.2.2. Expression der Hitzeschockproteine HSP27, HSP72 und HSP32

Um Hinweise auf eine, trainingsabhängig unterschiedliche Induzierbarkeit der HSP-Expression zu erhalten, wurden die Zellen einem Hitzereiz unterzogen.

Das Blut aus den EDTA-Röhrchen wurde zu je 5ml auf zwei 50ml Falcon Blue Caps verteilt. Eines der Aliquots wurde zunächst für 2h bei 41,8°C im Wasserbad und danach für 1h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das andere diente als Negativkontrolle und verblieb ohne Hitzereiz für 3h bei 37°C im Brutschrank.

Die Isolierung der mononukleären Zellen folgte hier im Anschluss an die Stimulation, wobei genauso verfahren wurde, wie im Falle der Stimulation durch Cytokine, LPS und PMA.

3.3.3. Separation von Monozyten und Lymphozyten mittels magnetischer Antikörper (MACS)

3.3.3.1. Prinzipien der Zellseparation mittels magnetischer Antikörper

Im Gegensatz zu Lymphozyten exprimieren Monozyten, Makrophagen und zum Teil auch Granulozyten an Ihrer Oberfläche den CD14-Rezeptor.

Zur Auftrennung der PBMC in Lymphozyten und Monozyten werden letztere mit monoklonalen Anti- CD14 Antikörpern (CD14 MicroBeads) markiert.

CD14-MicroBeads sind monoklonale Antikörper aus Mäuseserum, welche am menschlichen CD14-Rezeptor ankoppeln. Es handelt sich dabei um Mäuse-IgG2a, welche mit ihrem Fc-Ende an molekulare Mikromagneten gebunden sind. Während der 15minütigen Inkubation binden diese mit dem Fab-Ende an die suspendierten Zellen. Der auch als LPS-Rezeptor bekannte CD14 ist auf der Membranoberfläche von Monozyten und Makrophagen besonders stark exprimiert, was eine positive Selektion dieser Population ermöglicht.

Die Separation erfolgt in einer Säule, welche in einem Magnetfeld (MACS-Separator) platziert wird. Die magnetisch markierten CD14-positiven Zellen (hier vorwiegend Monozyten) verbleiben in der Säule, während die CD14-negativen Zellen (Lymphozyten) hindurchlaufen und aufgefangen werden können. Nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld können die CD14-

positiven Zellen (Monozyten) diese ebenfalls passieren und aufgefangen werden.

3.3.3.2. Ablauf der Separation von Monozyten und Lymphozyten

Die im Folgenden erläuterten Arbeitsschritte und Inkubationen fanden alle bei 6-12 °C bzw. auf Eis statt.

Mit Hilfe des miniMACS Separators der Firma Miltenyi Biotec können bis zu 2×10^7 Leukozyten in Subpopulationen aufgetrennt werden. Dies entspricht in etwa der aus 9ml Vollblut isolierbaren Menge an PBMC.

Nach Stimulation und Reinigung wurden jeweils ca. 10^7 Zellen in 80µl gekühltem PBS-Puffer (siehe Material, 2.7.) suspendiert. Dazu wurden 20µl einer Suspension von magnetisch markierten CD14 Antikörpern (MACS CD14-Beads) gegeben. Nach gutem Durchmischen wurde 15 Minuten im Kühlschrank (bei 6-12°C) inkubiert. Anschließend wurden die PBMC zur Entfernung nicht gebundener Antikörper in 1-2ml Puffer gewaschen und für 10 min. bei 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Vor der darauffolgenden Resuspension der Zellen in 500µl Puffer wurde gründlich im Vortexgerät geschüttelt, um eventuelle Zellaggregate aufzulösen.

Eine Säule wurde im Magneten platziert und zunächst mit 500µl zellfreien PBS-Puffers benetzt. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde ein sauberes 1,5ml Eppendorf-Gefäß unter der Säule platziert. Die Suspension aus teilweise markierten PBMC und 500µl PBS-Puffer wurde auf die Säule pipettiert. Am unteren Ende der Säule wurden nicht markierte, CD14-negative Zellen aufgefangen. Nach Durchlauf der Suspension wurde 3 mal mit jeweils 500µl PBS-Puffer nachgespült, um restliche Lymphozyten aus der Säule zu waschen. Dieser Durchfluss wurde ebenfalls aufgehoben.

Die Monozyten wurden gewonnen, indem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und über einem frischen 1,5ml Eppendorf-Gefäß platziert wurde. 1ml PBS Puffer wird aufgetragen und mit einem Stempel durch die Säule gepresst. Der Durchfluss wurde als Monozyten-Eluat aufgefangen.

Eine Verbesserung der Trennungsergebnisse ließ sich durch Drosselung der Durchlaufgeschwindigkeit erreichen: Applizierte man am unteren Ende der Säule eine Kanüle, erhöht sich die Verweildauer der Zellen im Magnetfeld, wodurch die markierten Monozyten und Makrophagen effektiver zurückgehalten wurden.

Die Zusammensetzungen sowohl des Lymphozyten-, als auch des Monozyten-Eluates wurden mit dem Cell-Dyn bestimmt. Anschließend wurde 10 Minuten bei 300xg zentrifugiert, die Überstände wurden verworfen und das Zellpellet mit Hilfe des Vortex-Gerätes aufgelöst.

3.4 Isolierung der RNA

Die RNA-Extraktion aus PBMC wurde für alle Proben unabhängig von der vorangegangenen Stimulationsart auf dieselbe Art und Weise durchgeführt. Die gereinigten Zellen erfuhren zu diesem Zweck eine Verarbeitung mittels des RNeasy Blood Kit.

Je $1,5 \times 10^7$ Zellen wurde 1ml des stark denaturierenden, weil Guanidinisocyanat enthaltenden RLT-Puffers auf die, nach der Zentrifugation und Resuspension bzw. Desintegration am Boden des Röhrchens befindlichen mononukleären Zellen pipettiert. Anschließend wurde kurz geschüttelt. Die Zugabe des RLT-Puffers erfolgte zum Zweck sowohl einer vollständigen Lyse der Leukozyten als auch einer Zerstörung ubiquitärer RNAsen. Dem RLT-Puffer musste initial noch das wegen seiner Fähigkeit Disulfidbrücken zu spalten, ebenfalls denaturierend wirkende DTT (Dithiothexitol) zugegeben werden (10µl DTT/ml RLT-Puffer). Anschließend wurden je zwei 500µl Aliquots des zähflüssigen Lysates auf jeweils einen QIAshredder pipettiert und über 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in der Mikrozentrifuge homogenisiert.

Als nächstes wurde 70%iges Ethanol im Verhältnis 1:1 (500µl) dem Homogenisat zugegeben. Ethanol schafft günstige Bedingungen für die Bindung der RNA an die später verwendete Silikatmembran. Zu demselben Zweck wurde für alle Arbeitsschritte bis zur Eluierung der RNA, Raumtemperatur eingehalten und im Kühlschrank aufbewahrte Chemikalien in der benötigten Menge auf ca. 20°C gebracht, bevor sie eingesetzt wurden.

Es wurden von den, zu diesem Zeitpunkt im 2ml Tube enthaltenen 1000µl Lysat 500µl auf die Säule (QIA-spin-column) aufgebracht und 15 Sekunden bei 8000xg zentrifugiert. Nach Verwerfung des Durchflusses wurde mit der zweiten Hälfte auf die gleiche Art verfahren. Die RNA war nun an der in der Säule befindlichen Membran gebunden. Um möglicherweise vorhandenes, kontaminierendes Material zu entfernen wurden nun weitere Waschschriffe durchgeführt.

Die Membran wurde zunächst mit 700 µl RWI-Puffer bei 8000xg 15 Sekunden, dann zweimal mit jeweils 500 µl RPE-Puffer gewaschen (erst 15 Sekunden bei 8000xg dann 2 Minuten bei 20000xg bzw. bei maximaler Geschwindigkeit). Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nach dem Waschschriff mit RWI-Puffer wurde die Säule auf ein neues, RNase-freies 2 ml Tube aufgebracht.

Nachdem die Säulen nach dem zweiten RPE-Durchlauf nochmals auf ein neues 1,5ml tube aufgebracht worden waren, wurden nun 30µl des RNase-freien Wassers unter sorgfältiger Blickkontrolle direkt auf die Membran pipettiert. Durch zweiminütiges Einwirken des Wassers auf der Membran konnte die Effizienz des Eluierens noch weiter gesteigert werden. Die RNA-Isolierung war schließlich nach einminütigem Zentrifugieren bei 8000xg und Auffangen des Eluates abgeschlossen.

Falls die in 30µl RNase-freiem Wasser gelöste RNA nicht direkt weiter verarbeitet wurde, wurde sie bei -70°C aufbewahrt .

3.5 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Um die Konzentration der extrahierten, in RNase-freiem Wasser gelösten RNA zu bestimmen, erfolgte eine Messung der Absorption bei 260nm (A_{260}). Dabei war zu beachten, dass nur über 0,1 liegende Absorptionswerte ein aussagekräftiges Messergebnis garantieren. In einer 70µl-Quarzküvette wurden 4µl Probe (im Verhältnis 1:17,5) verdünnt mit 66µl Tris-Cl-Puffer vermessen, nachdem das Photometer mit letzterem geeicht worden war.

Einer Absorption von 1 bei 260nm entspricht eine Konzentration von 40µg RNA/ml.

Aus den gegebenen Größen Verdünnungsfaktor, Absorptionswert (A_{260}) und optische Dichte der RNA kann die RNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet werden:

$$C_{\text{RNA}} = \text{Verdünnungsfaktor}(=17,5) \times A_{260} \times [\text{Lichtabsorption}/\mu\text{g}]^{-1} (=40\mu\text{g/ml}) \\ = A_{260} \times 700 (\mu\text{g/ml}).$$

Durch Multiplikation mit dem Probenvolumen (30 μ l) lässt sich dann die Gesamtausbeute berechnen. Letztere ist gewissen Schwankungen unterworfen; In der Regel konnten Ausbeuten von 0,5-1,0 μ g RNA pro ml Vollblut erreicht werden.

Um den Reinheitsgrad der gewonnenen RNA abzuschätzen wurde eine weitere Absorptionsbestimmung bei 280nm Wellenlänge durchgeführt. Der aus A_{260} und A_{280} gebildete Quotient sollte möglichst keinen Wert unterhalb von 1,7 annehmen, da reine RNA Werte von 1,8-2,1 liefert. Eine zu starke Absorption bei 280nm weist auf Kontamination mit Proteinen hin. Dieser Quotient hängt jedoch auch von den herrschenden pH-Verhältnissen ab, weshalb für die Verdünnung vor den Messungen 10mM Tris-Cl-Puffer verwendet wurde.

Eine Kontamination mit DNA ist im durchgeführten Versuchsablauf zwar unwahrscheinlich, da keine DNAsen eingesetzt wurden jedoch denkbar. Eine Kontamination der gewonnenen RNA mit DNA kann photometrisch nicht ausgeschlossen werden da DNA, wie auch RNA vorwiegend Licht der Wellenlänge 280nm absorbiert.

3.6 Reverse Transkription und Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkription und die anschließende Polymerasen-Kettenreaktion wurden mittels des GeneAmp-RNA-PCR Kits der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

3.6.1 Prinzipien der Reversen Transkription

Bei der RNA- Isolation erhält man die Gesamtheit zytoplasmatischer RNA. Für die Reverse Transkription (RT) soll aber nur mRNA eingesetzt werden. Letztere

enthält an ihrem 3'Ende eine, bis zu 200 Adenylreste enthaltende Sequenz (Poly-A-Schwanz), was man sich bei der spezifischen Umschreibung von mRNA in c-DNA zunutze macht.

Der Oligo-dT-Primer bindet hier vor Beginn der Reversen Transkription und markiert so den Ansatzpunkt der RNA-abhängigen Polymerase. Letztere katalysiert nun die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (c-DNA oder copy-DNA).

3.6.2 Prinzipien der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Folgende drei Reaktionsschritte laufen während jedes einzelnen Replikationszyklus der PCR ab:

1. DNA-Denaturierung oder Melting: Die anfangs doppelsträngig vorliegende DNA wird in zwei Einzelstränge „aufgeschmolzen“.
2. Primer-Annealing: Die spezifischen Primer docken an die entsprechende, komplementäre DNA-Sequenz an und markieren hier die Startposition der Polymerase.
3. Primer-Extension: Entlang des Einzelstranges werden mit Hilfe einer DNA-abhängigen, DNA-Polymerase die komplementären DNA-Sequenzen mit im Reaktionsansatz enthaltenen Nukleotiden polymerisiert. Es entsteht wieder ein Doppelstrang.

Das Risiko falsch-positiver Resultate durch Kontamination ist bei der Polymerasen-Kettenreaktion relativ hoch. Um dieses zu minimieren ist die Verwendung von ausschließlich gestopften Pipettenspitzen und autoklavierten Lösungen obligatorisch. Außerdem sollten Handschuhe getragen und die Arbeit an einem eigenen, sauberen Arbeitsplatz durchgeführt werden. Zur Kontrolle wird zur PCR auch ein Ansatz ohne hinzugefügte c-DNA eingesetzt, in welchem sich später kein Amplifikat finden darf.

3.6.3 Quantifizierung

3.6.3.1 Kinetik: der Plateau-Effekt

Da mit jedem Zyklus das Ausgangsmaterial verdoppelt wird, steigt die Menge der Nukleinsäuren im Verlauf einer Polymerasen-Kettenreaktion der Theorie nach exponentiell an. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass die Amplifikation zwar initial tatsächlich exponentiell verläuft, im weiteren Verlauf jedoch zunehmend an Effizienz verliert und schließlich sogar ganz zum Erliegen kommen kann. Für dieses als Plateau-Effekt bekannte Phänomen werden folgende, teilweise nur unvollständig kontrollierbare Faktoren verantwortlich gemacht:

1. Abnehmende Effizienz des Denaturierungsvorganges

Besonders bei grenzwertigen Schmelztemperaturen steigt mit steigender DNA-Konzentration die Gefahr einer unvollständigen Auftrennung der Doppelstränge. Als melting-temperature empfiehlt es sich daher 94-95°C zu wählen.

2. Kompetitive Hemmung des Primer-Annealing

Zu einer Änderung des Verhältnisses Primer/DNA-Stränge im Laufe der Reaktion kommt die Fähigkeit der entsprechenden Sequenzen, auch untereinander ein sogenanntes Reannealing durchzuführen.

3. Inaktivierung der DNA-Polymerase und Substratüberschuss

Die frei gelöste Enzymmenge nimmt unter anderem auch temperaturbedingt mit fortschreitender Reaktion ab. Möglicherweise kommt es auch zu einer Akkumulation von Polymerase-Inhibitoren, wie zum Beispiel Pyrophosphat. Zugleich steigt mit wachsender Zahl an DNA-Strängen die Substratmenge.

Nach welchem Replikationszyklus die Vermehrung ihren exponentiellen Charakter verliert hängt sowohl von der Menge an eingesetztem Ausgangsmaterial als auch von der untersuchten Sequenz ab. Nur zwischen Sequenzen, die im exponentiellen Bereich amplifiziert wurden, können quantitative Vergleiche angestellt werden. Die Anzahl an exponentiell

vermehrten Zyklen muss für jede Sequenz in kinetischen Vorversuchen ermittelt werden, damit die Reaktionen vor Eintritt des Plateau-effektes beendet werden können.

3.6.3.2 β -Aktin als endogener Standard

Um bei der Expressionsanalyse der Stressproteine möglichst nur die Effekte der verschiedenen Reize zu quantifizieren, wird die Menge an exprimierter, amplifizierter Sequenz zu der eines Standards ins Verhältnis gesetzt.

Selbst nach photometrischer Vermessung und Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA sind gewisse Schwankungen der in die RT-PCR eingeschleusten Menge nicht auszuschließen. Durch die Polymerase-Kettenreaktion werden diese Differenzen potenziert und können bei der Quantifizierung schließlich zu falschen Ergebnissen führen.

Um solche Fehler zu vermeiden hat sich vielfach die parallel durchgeführte Analyse der exprimierten β -Aktin-Sequenz bewährt. Dabei handelt es sich um ein in seiner Expression von äußeren Einflüssen, insbesondere aber auch von den gewählten Versuchsbedingungen, weitgehend unabhängiges, so genanntes housekeeping gene.

Trotz der in humanen Leukozyten relativ strikt konstitutiven Expression des β -Aktin-Gens, muß seine Unabhängigkeit von den Versuchsbedingungen speziell überprüft werden s. Abb. 1.

Aus der später für das Target gemessenen Signalintensität und dem entsprechenden Wert für β -Aktin wird ein Quotient gebildet. Dieser repräsentiert dann die in der Probe vorhandene, relative, mRNA-Menge der jeweiligen Sequenz. Es können so semiquantitative Vergleiche angestellt werden.

Ein möglicher Expressionsanstieg (oder -abfall) IFNolge der Stimulation wird bei Betrachtung der Differenz der relativen mRNA-Mengen in stimulierter Probe und Negativkontrolle berechenbar.

Ein weiterer Vorteil des mit dem Primer für β -Aktin amplifizierten, 202 Basenpaare betragenden, PCR-Produktes ist die Möglichkeit, eine Probenkontamination mit DNA-Material auszuschließen. Grund hierfür ist die

Tatsache, dass das gewählte Fragment eine Exon4/Intron5/Exon5-Sequenz des β -Aktins umspannt. Somit würde bei Amplifizierung eines kontaminierenden DNA-Moleküls ein längerer, wegen Einbeziehung der Intronsequenz 312 Basenpaare enthaltender Abschnitt amplifiziert. In der später durchgeführten Gelelektrophorese ließe sich dieser abgrenzen.

3.6.3.3 Amplifikationseffizienz

Die Amplifikationseffizienz ist der bei jedem Zyklus tatsächlich replizierte Anteil an Template. In der Realität wird keine Effizienz von 100% erreicht, wobei diese selbst bei identischen Bedingungen und identischer Sequenz zwischen 80% und 99% schwanken kann [Wiesner R.J. et al 1992].

Bei exponentiell verlaufender Amplifikation haben bereits sehr kleine Effizienzunterschiede eine große Auswirkung auf die Produktausbeute [Siebert P.D. 1993], was bei Betrachtung folgender, den PCR-Ablauf beschreibender Formel deutlich wird:

$$N=N_0(1+E)^n$$

Die nach Einsatz einer bekannten initialen DNA-Molekülzahl N_0 nach Ablauf von n Zyklen im Produkt enthaltene finale Molekülzahl N lässt sich in Abhängigkeit von der Amplifikationseffizienz E berechnen.

Einfluss auf eine unvollständige Verarbeitung der Targets haben unter anderem folgende Faktoren:

- Die Zusammensetzung der zu amplifizierenden Sequenz hat durch den variierenden Anteil an Cytosin- und Guaninbasen einen Einfluss auf den Schmelzpunkt der Doppelstrang-DNA. Außerdem können dadurch auch die Effektivität von Primerbindung und Polymeraseaktivität beeinträchtigt werden. Mit der Bedeutung der Sequenz des Primers verhält es sich ähnlich.

- Die Länge des Targets spielt in vitro in erster Linie bei Sequenzen von über 3000 Basenpaaren eine problematische Rolle. Allerdings haben manche Untersuchungen auch für Targets von weniger, als 1000 Basenpaaren eine mit der Sequenzlänge absinkende Effektivität der Taq-DNA-Polymerase gezeigt [Coker G. T. et al 1990].

- Probenverunreinigung kann zum Beispiel zu reversibler oder irreversibler Polymerasehemmung oder zu Konformationsänderungen der Targets führen

Diese Tatsachen machen eine Optimierung der eingesetzten Chemikalien- und Enzymkonzentrationen sowie der Temperatur- und Zeitprofile für die einzelnen Sequenzen erforderlich [Sardelli A. D. 1993]. Dennoch dürfen, selbst wenn diese Optimierungen durchgeführt werden, trotz übereinstimmender Zyklenzahl und Zielsequenz auftretende sogenannte „tube to tube variations“ bei Interpretation der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden [Gilliland G. 1990, Kellog D.E. 1990].

3.7 Durchführung der Reversen Transkription (RT)

Da RNA das Ausgangsmaterial darstellte, musste zunächst mit Hilfe von unspezifischen Oligo-dT-Primern und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase eine aus Desoxyribonukleotiden bestehende Kopie (copy-DNA) hergestellt werden. Der folgende Reaktionsansatz wurde aus den im Kit der Firma Perkin Elmer gelieferten Reagenzien hergestellt:

Tabelle 4 : Komponenten für den RT-Ansatz

Komponente	Volumen	Endkonzentration in 10µl
25mM MgCl ₂	2,0µl	5mM
10xPCR Puffer	1,0µl	1mM
DEPC-Wasser	je nach RNA-Volumen 0-1,4µl	
dDATP	1,0µl	1mM
dDCTP	1,0µl	1mM

dDGTP	1,0µl	1mM
dDTTP	1,0µl	1mM
Komponente	Volumen	Endkonzentration in 10µl
RNAse Inhibitor	0,5µl	1,0U/µl
MuV Reverse Transkriptase	0,5µl	2,5U/µl
Oligo-dT	0,5µl	2,5U/µl
RNA	Je nach Konzentration 0,1-1,5µl	10ng/µl

Den 5 untersuchten Proteinen (HSP27, HO-1, HSP72, iNOS und β -Aktin) entsprechend wurden je RNA-Probe 5 RT-Ansätze benötigt. Um die Äquivalenz der Bedingungen zu optimieren wurde zunächst ein gemeinsamer sechsfacher Ansatz hergestellt. Nach Ablauf der RT konnte dieser auf 5 PCR-Tubes verteilt werden. Der sechste Teil ging durch Verdunstung und Adhärenz an Pipettenspitzen verloren.

Zu einer Probe gehörende, in 9µl DEPC- und RNAse-freiem Wasser gelöste 600ng RNA (6x1,5µl=9µl) wurden mit 51µl (=6x8,5µl) RT-Reaktionsansatz durchmischt und im Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer in cDNA umgeschrieben [Veith 2000].

Die Temperaturen und Zeiten alterierten je nach Phase der Reaktion folgendermaßen:

20°C	10 Minuten	→	Inkubation/ Reverse Transkription
42°C	15 Minuten	→	Reverse Transkription
99°C	5 Minuten	→	Denaturierung
5°C	5 Minuten	→	Kühlen

3.8 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Zu 10µl RT-Produkt wurden hinzugefügt:

4µl 10xPCR-Puffer

31,5µl aqua bidest.

2µl der beiden Primer (je 1µl sense und antisense 10pM konzentriert)
2,5µl Taq-Polymerase (1U/µl).

Das für die PCR im GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler eingesetzte Gesamtvolumen betrug schließlich 50µl.

Für die Prozessierung jeder der 5 Sequenzen sind verschiedene Temperaturbedingungen optimal.

Tabelle 5: PCR-Bedingungen bei der Amplifikation der Stressproteine

Target-Gen	Melting	Annealing	Extension
HSP27	95°C	69°C	72°C
HSP72	95°C	62°C	72°C
iNOS	94°C	77°C	68°C
HO-1	94°C	56°C	72°C
β-Aktin	94°C	64°C	72°C

Den Reaktionszyklen ging zu Beginn bei jeder Sequenz ein 4 Minuten dauerndes einleitendes Aufschmelzen bei 94°C voraus. Auch die letzten 10 Minuten liefen für jede Sequenz nach der jeweils unterschiedlichen Zyklenzahl einheitlich bei 72°C ab. Hier sollte die Fertigstellung aller begonnenen Amplifikate sichergestellt werden [Veith 2000].

3.9 Gelelektrophorese

Zur Identifikation der fünf verschiedenen Amplifikate bedient man sich ihrer Basenpaarlänge und der in Lösung negativen Ladung von Nukleinsäuren. Es erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung in der Horizontalgelkammer. Je kürzer ein DNA-Fragment ist, desto weiter wandert es nach Anlage eines Spannungsfeldes im Gel in Richtung Anode.

Bei Fragmentgrößen von 200-550 Basenpaaren bietet sich die Verwendung von 2% Agarosegelen an [Veith 2000]. In 100ml des Laufpuffers (in diesem Falle TAE-Puffer) wurden 2g Agarose aufgekocht und ca. 2 Minuten lang geschwenkt. Sobald keine Blasen mehr entstanden, wurde das Gel in die vorbereitete Kammer gegossen, wo es durch Polymerisation der Agarose nach

ca. 45 Minuten fest wurde. Durch vorher applizierte Kunststoffeinsätze waren im Gel Aussparungen (sogenannte Slots) entstanden, in welche nun jeweils exakt 13µl PCR-Produkt pipettiert wurden. In einem der Slots wurden DNA-Standardfragmente mit bekannter Anzahl an Basenpaaren (DNA-Basenpaarleiter) appliziert, welche als Referenzbanden für den Größenvergleich dienten. Nach ca. 45 min. langer Applikation einer Spannung von 70 Volt waren die Nukleinsäuren im Gel soweit gewandert, dass ihre Basepaarlänge identifiziert werden konnte. Zu diesem Zweck wurde die zurückgelegte Strecke der Amplifikate mit derjenigen der DNA-Standardfragmente verglichen.

Direkt im Anschluss an die Elektrophorese wurden alle DNA-Fragmente 5 Minuten lang gefärbt, indem das Gel in eine Lösung von 1µg/ml Ethidiumbromid verbracht wurde. Nicht an DNA gebundenes Ethidiumbromid wurde während weiterer 5 Minuten in aqua dest. ausgewaschen. Ethidiumbromid ist eine stark mutagene Substanz, weshalb bei Kontakt immer die undurchlässigen Nitrilhandschuhe getragen werden mussten.

Unter UV-Licht (312nm) imponierten die Banden nun in, je nach DNA-Menge unterschiedlicher Intensität. Vor der Auswertung in der UV-Kammer der Firma Raytest erfolgte eine Abbildung auf Polaroidfilm.

3.10 Auswertung der Signalintensitäten

Ethidiumbromid ist eine übliche, für Doppelstrang-DNA verwendete Fluoreszenzfärbung. Es interkaliert zwischen DNA Basen und emittiert in diesem Zustand bei Bestrahlung mit UV Licht (312nm) orange bis rosarotes Licht (595nm).

Eine direkt an die UV-Kammer angeschlossene, mit dem entsprechenden Filter versehene DIANA (Digital Image Analyzer) CCD-Kamera der Firma Raytest verarbeitete die Emissionsintensitäten der Banden in ein Tagged Image File Format (tiff). Die Daten können so der Messung und Auswertung mittels des AIDA (advanced image data analyzer) 2D-Densitometrie-Programmes zugeführt werden. In einem bestimmten Intensitätsbereich sind die erhaltenen Werte direkt proportional zur Emissionsintensität und somit auch zu der, in den

einzelnen Banden enthaltenen DNA-Menge. Die Einhaltung des linearen Intensitätsbereiches war durch die Optimierung der Belichtungszeit und durch die Kalibrierung des Gerätes gewährleistet. Die aus der Messung resultierenden Werte werden als arbitrary units (a.u.) angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Ergebnisse der Trennungsversuche von Lymphozyten und Monozyten

Trotz zahlreicher Versuche konnten mit Hilfe magnetisierter Antikörper (MACS) keine reinen Populationen von Monozyten und Lymphozyten gewonnen werden.

Eine Messung mit Hilfe des Cell-Dyn-Gerätes der Firma Abbot ergab folgende Schwankung der Zusammensetzung einzelner Durchlaufaktionen:

Tabelle 6: Mit MACS-Trennung erzielte Reinheitsgrade

Population	1.Durchlauf mit Magnet	2.Durchlauf ohne Magnet
Monozyten	3,7-19,6%	22,1-84,4%
Lymphozyten	71,5-85,9%	14,6-58,4%

Die, mit dieser Methode erzielten Reinheitsgrade wurden für nicht ausreichend befunden.

Inclusive MACS-Trennung dauerte die in-vitro Verarbeitung der Zellen bis zur RNA-Isolierung ca 15 h. Im Anschluss durchgeführte photometrische RNA-Quatifizierungen und –Reinheitsbestimmungen (s. Kap. 3.5.) zeigten folgende Ergebnisse.

Tabelle 7: RNA-Ausbeute nach MACS-Trennung

Eluat	durchschnittliche Absorption bei 260nm	Verhältnis 260/280	durchschnittliche RNA-Konzentration (µg/ml)	durchschnittliche RNA-Ausbeute (µg/ml Vollblut)
Lymphoeluat	0.079	>1,7	3,15	0,26
Monoeluat	0.035	>1,7	1,4	0,06

Nach MACS-Trennung isolierte RNA wurde unverdünnt photometrisch vermessen. Dennoch lagen die Absorptionswerte unter dem Grenzwert (0,1) für

ein aussagekräftiges Messungsergebnis. Dennoch berechnete RNA-Konzentrationen und –Ausbeuten sind daher mit Vorbehalt zu betrachten. Die Tatsache, dass der Quotient der Absorptionswerte bei 260nm und 280nm durchweg größer war, als 1,7, spricht gegen eine Kontamination mit Proteinen.

4.1.2 Abhängigkeit der Transkription des β -Aktin-genes von der Stimulationsart

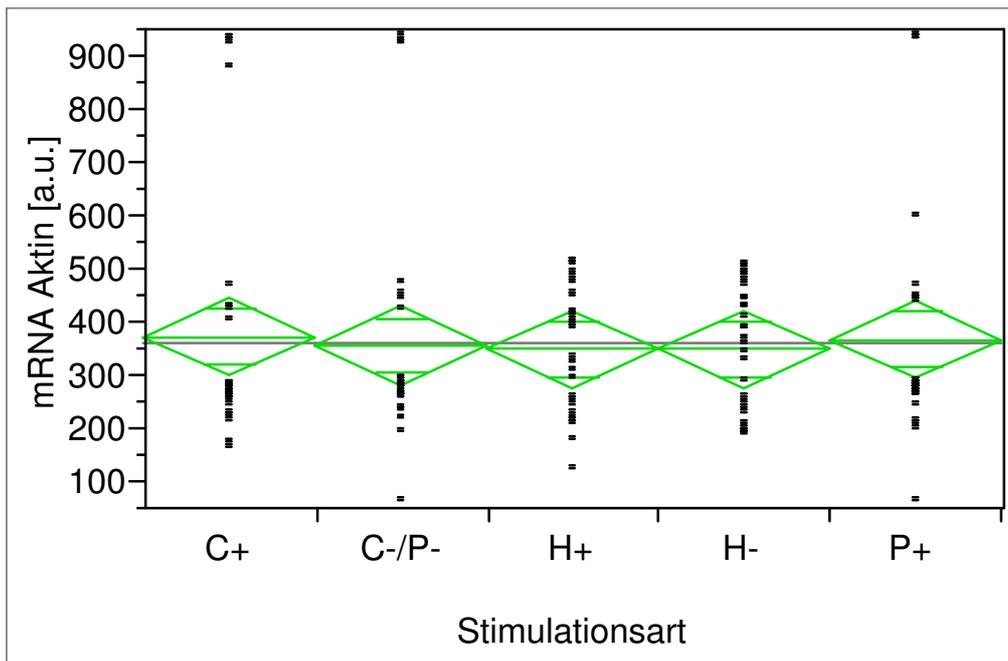


Abbildung 1 : β -Aktin-mRNA-Expression in PBMC in Abhängigkeit von der Stimulationsart.

- C+: Stimulation mit LPS und Cytokinen
- C-/P-: Negativkontrolle für C+
- H+: Stimulation mit Hitzeschock
- H-: Negativkontrolle für H+
- P+: Stimulation mit PMA
- a.u.. arbitrary unit

Für genauere Erläuterung der verschiedenen Verarbeitungs- und Stimulationsformen des Zellmaterials siehe Kapitel 3.3.

Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle aller behandelten Proben wurden errechnet. Eine Darstellung der Werte erfolgte mit rautenförmigen, sogenannten Diamonds, deren Querachse auf Höhe der Mittelwerte liegt, während die senkrechte Achse Lage und Ausmaß der Konfidenzintervalle repräsentiert. Zusätzlich erscheinen alle Einzelwerte im Diagramm. Zusätzlich erscheint der Gesamtmittelwert (380 a. u.) als Linie. Da β -Aktin selbst der Standardparameter ist, konnte eine Korrektur der Messungenauigkeit von Pipetten und Photometer in diesem Falle nicht durchgeführt werden.

In Abb. 1 zeigt sich zumindest bezogen auf die Mittelwerte aller Proben, dass die Transkription des β -Aktin-genes durch die verschiedenen Stimulationsarten weitgehend unbeeinflusst war.

4.1.3 Bestimmung des Bereiches der exponentiellen Amplifikation

Für die Zusammensetzung der Reagenzien und die Menge an eingesetzter RNA (100 ng) konnten die Verhältnisse einer bereits etablierten RT-PCR übernommen werden. Die optimalen Zyklenzahlen bedurften jedoch wegen der leicht abweichenden Versuchsbedingungen einer wiederholten experimentellen Bestimmung.

Die Ergebnisse sind in folgenden Diagrammen (Abbildung 2-6) dargestellt.

Auf der Abszisse sind die verschiedenen Zyklenzahlen eingetragen, während auf der Ordinate die Signalintensitäten der PCR-Banden in der Einheit arbitrary units (a.u.) abzulesen sind.

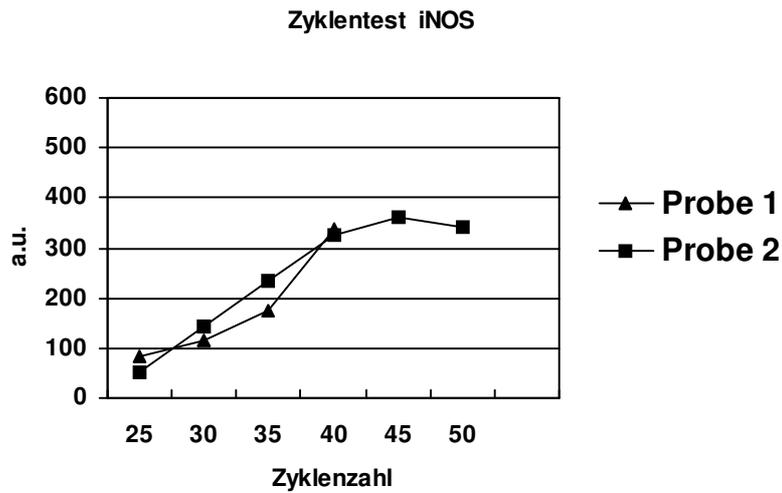


Abbildung 2: Zyklentest i-NOS

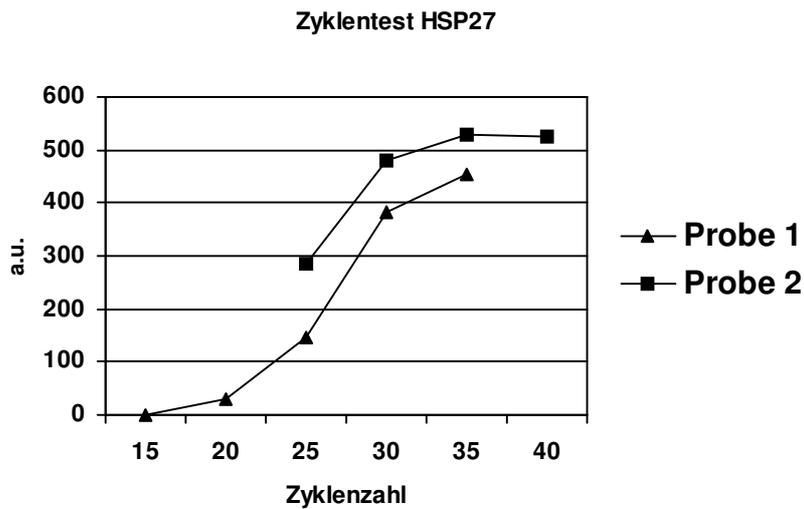


Abbildung 3: Zyklentest HSP27

Für iNOS und HSP27 ließ sich der Bereich der höchsten Steigung der Kurve, welcher der exponentiellen Vermehrungsphase entspricht, nach einer Serie (▲) nicht klar erkennen, weshalb hier jeweils ein zweiter Test mit anderen Intervallen und mRNA eines anderen Probanden (●) durchgeführt wurde.

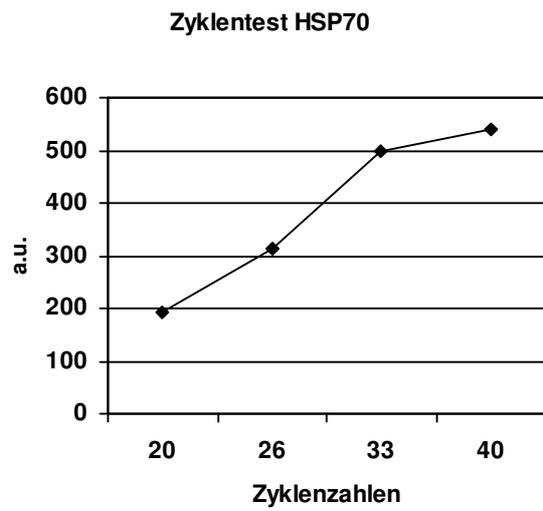


Abbildung 4: Zyklentest HSP72

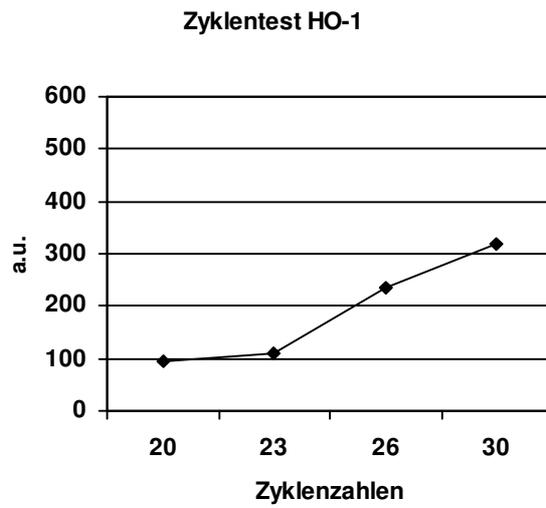


Abbildung 5: Zyklentest Hämoxygenase-1

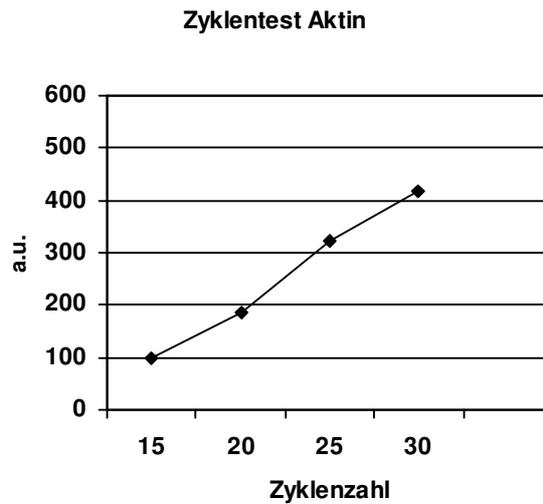


Abbildung 6: Zyklentest β -Aktin

Für die PCR wurden schließlich folgende Zyklenzahlen ausgewählt:

Tabelle 7: Zyklenzahlen der PCR

iNOS	30	Zyklen
HSP 27	28	Zyklen
HSP 70	28	Zyklen
HO-1	25	Zyklen
β -Aktin	24	Zyklen

4.2 Stressproteinexpression in PBMC

In PBMC exprimierte mRNA verschiedener Stressproteine wurde in Abhängigkeit von den jeweiligen Bedingungen semiquantitativ verglichen.

4.2.1 Expressionsverhalten vor- und nach Hitzeschock

4.2.1.1 Vergleich der thermoneutralen Expression

Nach dreistündiger thermoneutraler Inkubation des venösen Vollblutes ließ sich folgendes Expressionsverhalten in PBMC erkennen:

TR: ausdauertrainierte Probanden

UT: Kontrollgruppe

Auf der Ordinate der Diagramme sind jeweils die, mittels AIDA und DIANA errechneten Signalintensitäten in der Einheit arbitrary units (a.u.) aufgetragen. Diese stehen quantitativ im proportionalen Verhältnis zu, aus der RT-PCR resultierenden DNA-Mengen.

Bei den Ordinatenwerten handelt es sich um Verhältniswerte. Die, für die untersuchten Proteine erhaltenen Signalintensitäten wurden mit den entsprechenden Werten für das konstitutiv exprimierte β -Aktin ins Verhältnis gesetzt. So konnte dafür gesorgt werden, dass relative mRNA-Quantitäten zur Darstellung kommen.

Einzelwerte der Probanden erscheinen als schwarze Punkte, während die 95% Konfidenzintervalle durch die senkrechte Achse der Rauten bzw. Diamonds repräsentiert werden.

Mittelwerte der Gruppen liegen jeweils auf Höhe der Querachsen besagter Rauten.

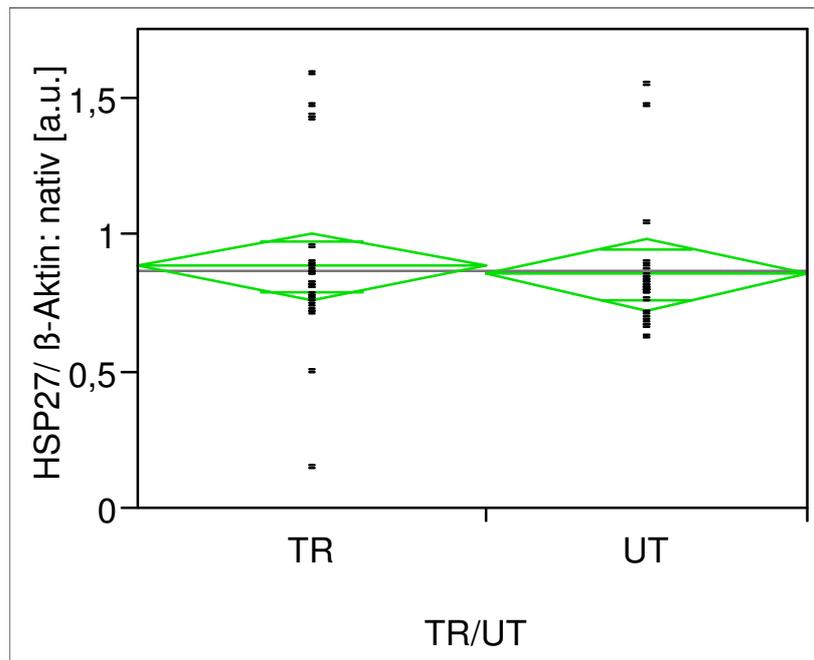


Abbildung 7: Relative HSP27-mRNA-Expression in unstimulierten PBMC

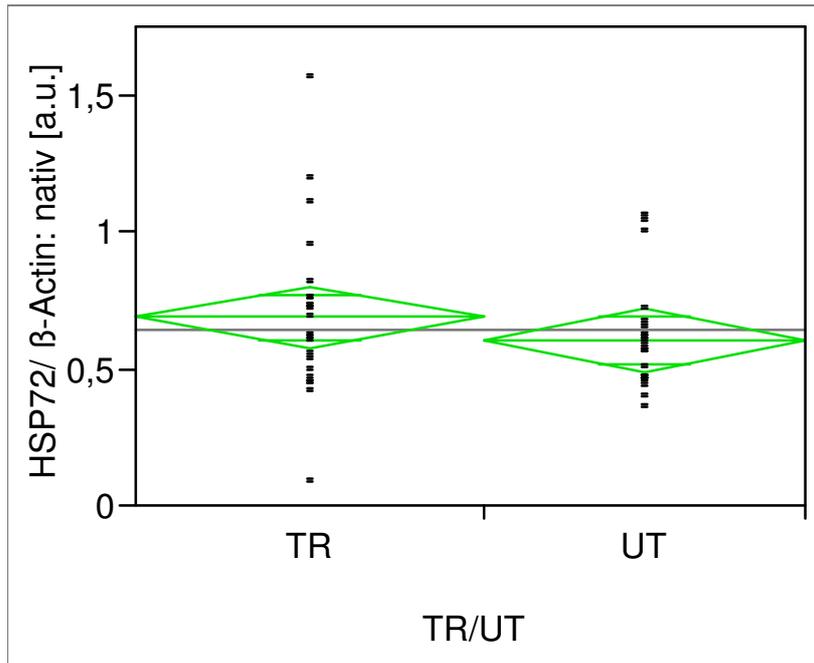


Abbildung 8: Relative HSP72-mRNA-Expression in unstimulierten PBMC

TR: ausdauertrainierte Probanden

UT: Kontrollgruppe

In Abb. 7 und 8 zeigen sich bezüglich HSP27 und HSP72 kaum Unterschiede im Expressionsverhalten von unstimulierten PBMC beider Gruppen.

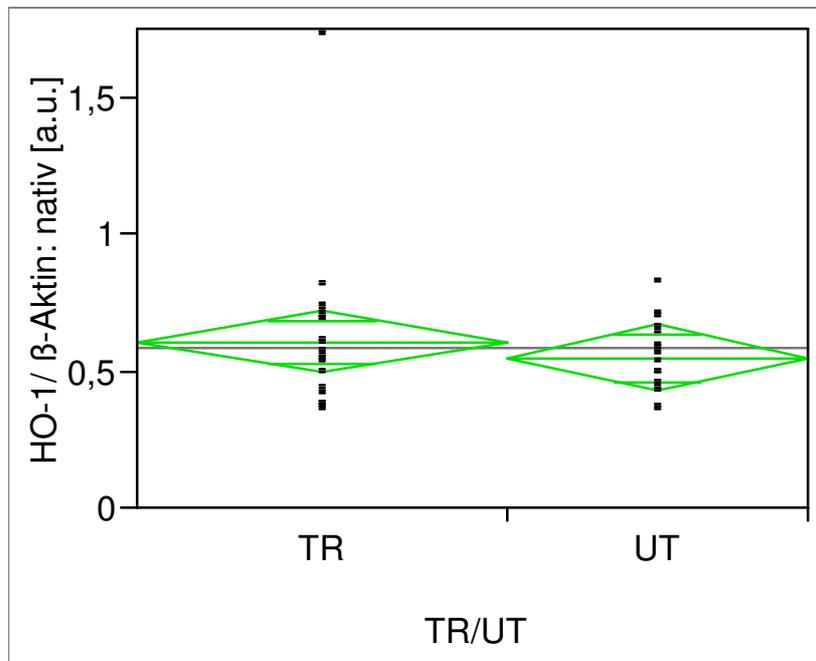


Abbildung 9: Relative HO-1-mRNA-Expression in unstimulierten PBMC

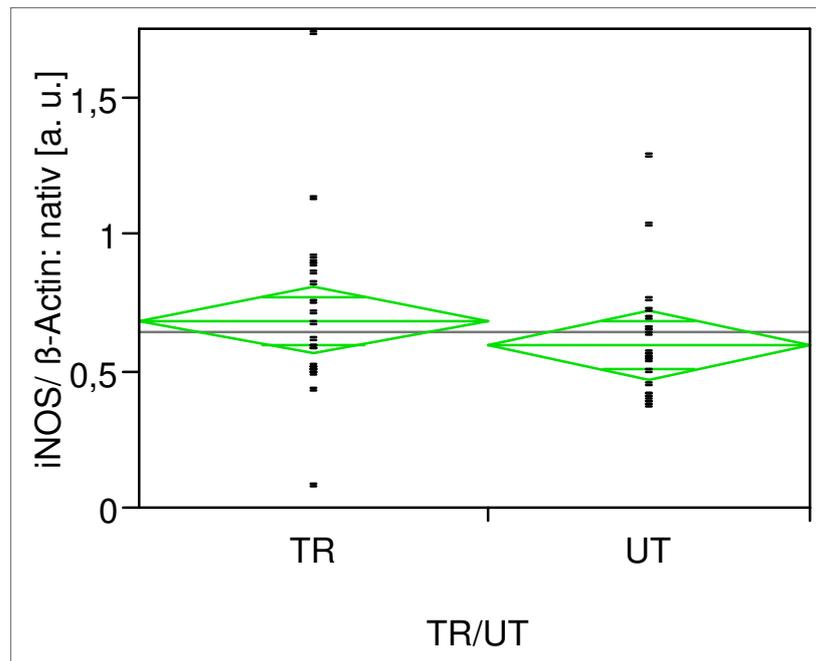


Abbildung 10: Relative iNOS-mRNA-Expression in unstimulierten PBMC

TR: ausdauertrainierte Probanden

UT: Kontrollgruppe

Bei keiner der vier untersuchten mRNAs ließen sich, bezüglich der thermoneutralen Expression signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. Durch die Lage der Rauten ist sichtbar, dass sich die 95% Konfidenzintervalle überlappten.

4.2.1.2 Vergleich des Einflusses der Hitzebelastung auf die HSP27-Expression

Eine zweistündige Inkubation des venösen Vollblutes bei 41,8°C mit darauf folgender einstündiger Lagerung bei 37°C hat, je nach Probandengruppe unterschiedliche Auswirkungen auf die anschließend isolierte Menge an spezifischer mRNA.

Die, bereits dargestellten Nativwerte wurden von den, nach Hitzeschock erhaltenen Signalintensitäten subtrahiert. Auf diesem Wege wurden die, im folgenden Abschnitt aufgeführten Differenzen (Diff) errechnet. Letztere

repräsentieren den Einfluss der Hitzeapplikation auf die Expression von HSP und iNOS in PBMC.

Die Ordinatenwerte tragen auch hier die Einheit arbitrary unit (a. u.).

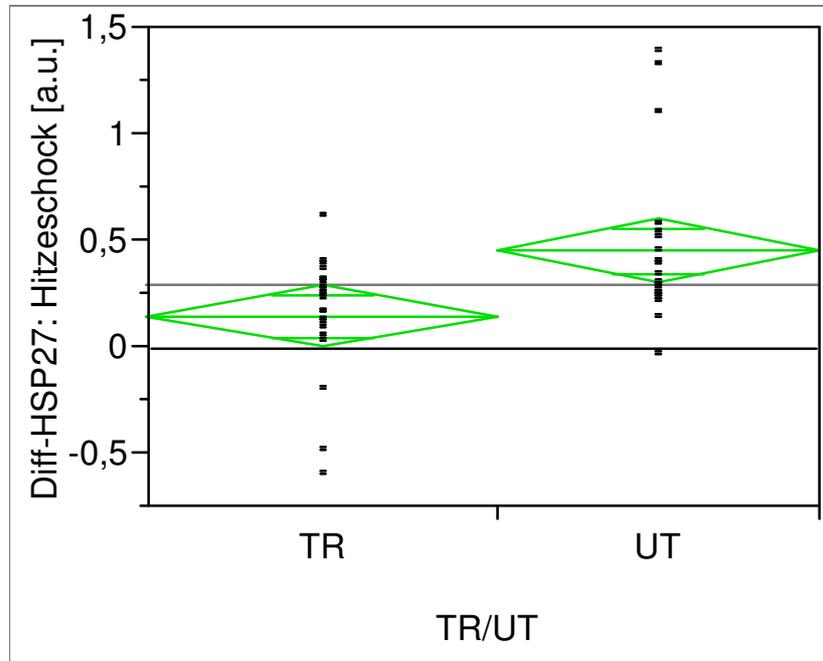


Abbildung 11: Einfluss der Hitzestimulation auf die relative HSP27-mRNA Expression

Dass die Hitzestimulation sowohl bei TR, als auch bei UT zu vermehrter HSP27-Expression führte zeigte sich an der Lage der 95%-Konfidenzintervalle über der Nulllinie. Bei TR erstreckt sich das 95%-Konfidenzintervall der Differenzen über (gerundete) Werte von ca. 0,004 – 0,291 (a.u.).

Die relativ geringe Streuung der Einzelwerte beider Gruppen sah man auch an der Kürze der senkrechten Achsen, bzw. der schmalen Form der Rauten. Dennoch erscheinen, besonders bei TR auch einige negative Δ -Werte, wodurch eine Minderung der, nach Hitzeschock isolierbaren mRNA Menge in PBMC dieser Probanden signalisiert wird. Wenige, weit über dem Mittelwert liegende Δ -Werte bei UT deuten eine besonders starke Reaktion auf die Hitzestimulation bei diesen Probanden hin.

Ein Unterschied zwischen den Gruppen TR und UT zeigte sich ebenfalls bereits bei visueller Prüfung, da sich die senkrechten Achsen der Rauten nicht

überlappen. PBMC trainierter Athleten wiesen auf mRNA-Ebene einen weit geringeren Anstieg der HSP27-Expression vor, als dies bei der Kontrollgruppe der Fall war. Zusätzliche Anwendung des ungepaarten t-Test ($p < 0,05$) ergab einen signifikanten Unterschied zwischen TR und UT.

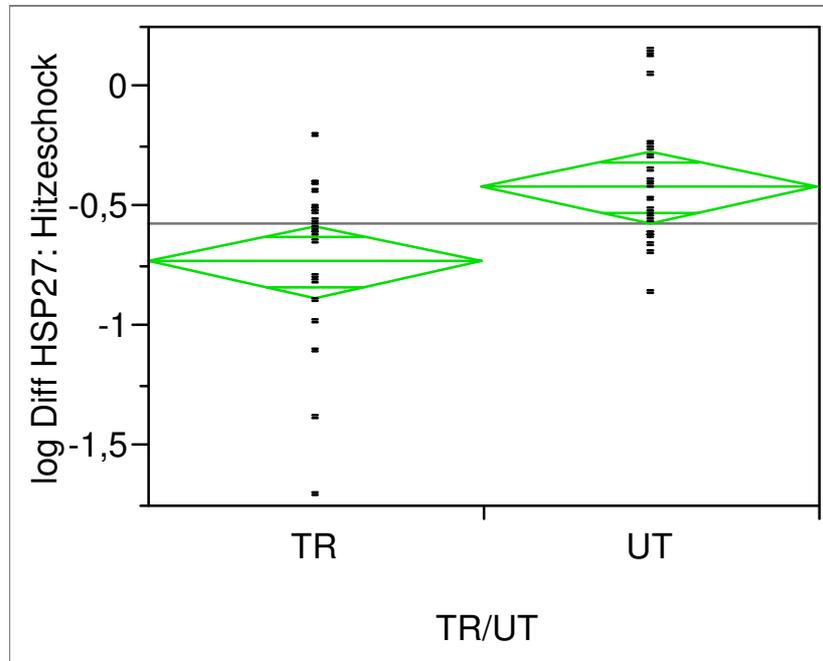


Abbildung 12: Einfluss der Hitzestimulation auf die relative HSP27-mRNA Expression. Darstellung mit logarithmierten Werten

Für die errechneten Differenzen zwischen nativen und hitzestimulierten Proben ergab sich bei Anwendung des Shapiro-Wilk-Test nur eine unzureichende Übereinstimmung mit einer Normalverteilung (p bzw. $W > 0,01$). Nach Logarithmierung der Werte waren diese jedoch ausreichend normal verteilt (p bzw. $W < 0,01$). Ein daraufhin erneut durchgeführter ungepaarter t-Test ergab ebenso einen signifikanten Unterschied zwischen TR und UT (Abb. 12; $p < 0,05$).

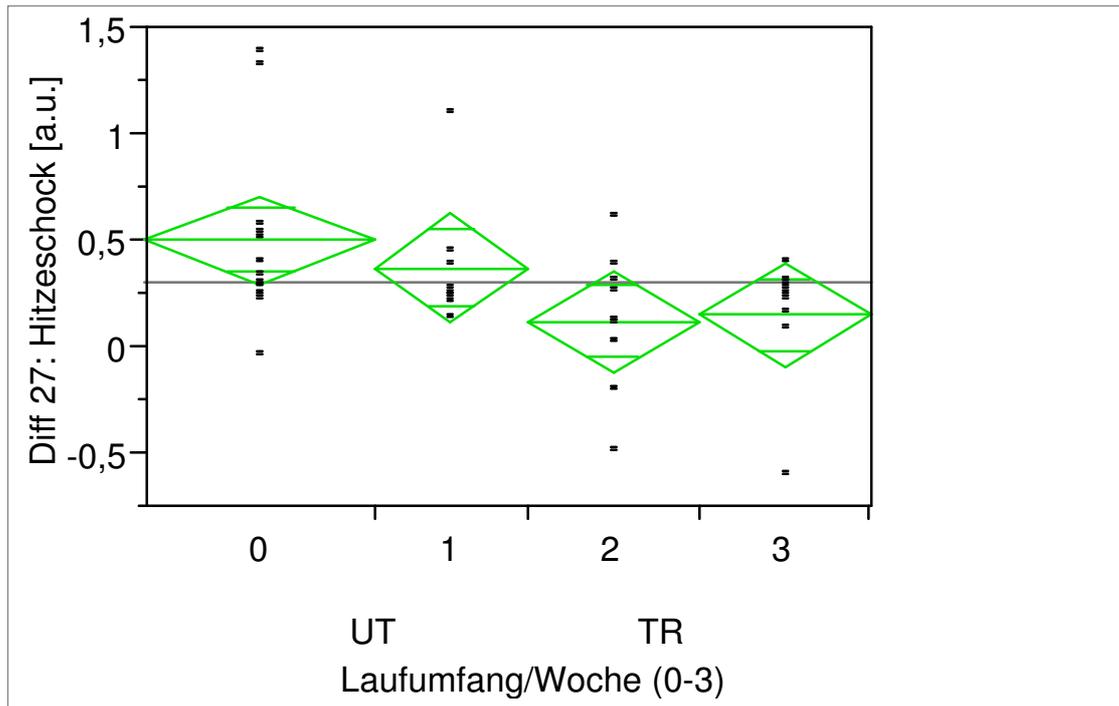


Abbildung 13: Abhängigkeit der Stimulierbarkeit von HSP27 vom Trainingszustand in beiden Gruppen

Die beiden Gruppen TR und UT lassen sich je nach körperlicher Betätigung in zwei Untergruppen aufteilen und zeigen eine tendenziell untergruppen- bzw. trainingsabhängig unterschiedliche Stimulierbarkeit durch Hitzeschock.

In der Gruppe der ausdauertrainierten Probanden (TR) war das Zuordnungskriterium zu Untergruppe 2 bzw. 3 ein wöchentlicher Trainingsumfang unter bzw. über 70 km Ausdauertraining/ Woche. Die untrainierten Probanden (UT) wurden bei gelegentlicher sportlicher Tätigkeit der Untergruppe 1 und bei gänzlicher Verneinung einer solchen der Untergruppe 0 zugeordnet.

Abbildung 13 zeigt übereinstimmend mit Abb. 11 höhere (bzw. über dem Gesamtmittelwert liegende Mittelwerte in der Gruppe UT, bzw. den Untergruppen 0 und 1, als in der Gruppe TR, bzw. den Untergruppen 2 und 3.

Eine leichte Steigerung der körperlichen Aktivität, wie in Untergruppe 1 hat bereits einen bemerkbaren Einfluss auf die Stimulierbarkeit der HSP27-Expression in mononukleären Zellen.

Andererseits wird in den ausdauertrainierten Untergruppen 2 und 3 kein bedeutender Unterschied der Stimulierbarkeit zwischen den mehr oder weniger umfangreich trainierten Untergruppen deutlich.

4.2.1.3 Vergleich des Einflusses der Hitzebelastung auf die HSP72-Expression

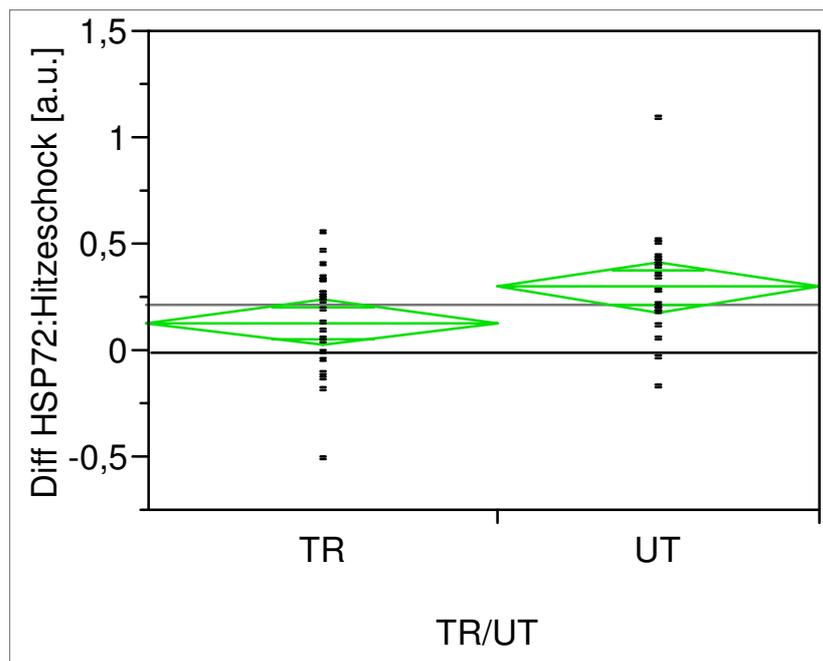


Abbildung 14: Einfluss der Hitzestimulation auf die relative HSP72-Expression

Auch auf die HSP72-Expression hatte der Hitzeschock bei der Mehrheit der Probanden einen stimulierenden Einfluss: Die Rauten lagen in beiden Gruppen über der Nulllinie. In der Gruppe TR erstreckte sich das 95%Konfidenzintervall der Differenzen über (gerundete) Werte zwischen ca. 0,027 – 0,242.

Einige negative Einzelwerte waren jedoch auch hier in beiden Gruppen vorhanden.

Die bildliche Darstellung der unterschiedlichen Induzierbarkeit von HSP72 zeigt zwar eine geringe Überlappung der beiden Konfidenzintervalle, Signifikanzen des Unterschiedes zwischen TR und UT wurden jedoch bei Anwendung des ungepaarten t-Test ($p < 0,05$) deutlich.

Wie in Abb. 13 am Beispiel des HSP27 gezeigt wurde, lassen sich die beiden Gruppen TR und UT je nach körperlicher Betätigung in zwei Untergruppen aufteilen. Eine tendenziell untergruppen- bzw. trainingsabhängig unterschiedliche Stimulierbarkeit durch Hitzeschock trifft für die Expression des HSP72 jedoch in weit geringerem Maße zu. Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle der Untergruppen 0 und 1 bzw. 2 und 3 entsprechen sich hier weitgehend.

4.2.2 Vergleich der hitzeinduzierten Expression der Hämoxigenase-1

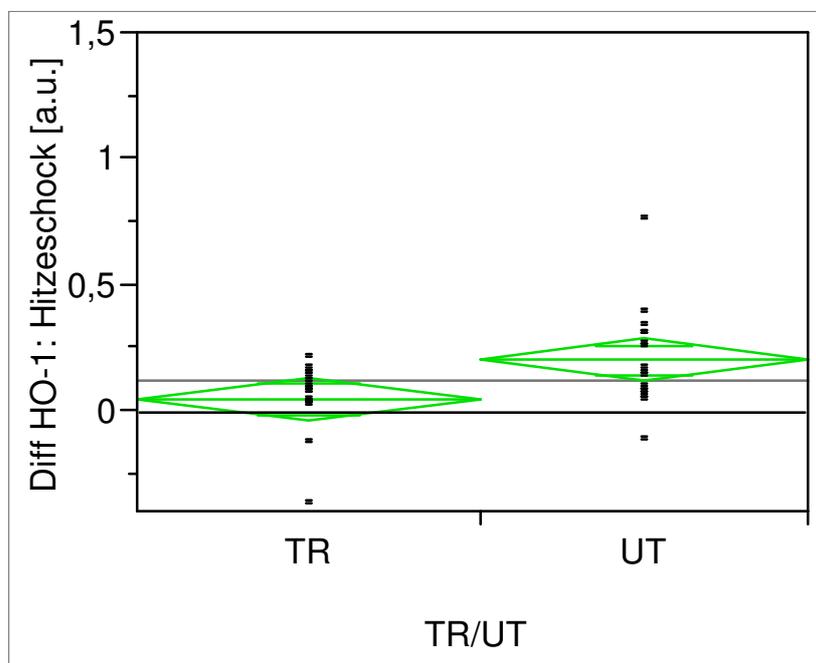


Abbildung 15: Einfluss der Hitzestimulation auf die Expression der HO-1

Die Hitzestimulation führte nur in der Gruppe UT zu einem signifikanten Anstieg der Expression der HO-1, was durch die Lage der 95%Konfidenzintervalle deutlich wird. Bei TR schloss letzteres den Nullpunkt ein.

Dennoch lag die Mehrzahl der Einzelwerte beider Gruppen im positiven Bereich.

Die Prüfung auf Signifikanz des Unterschiedes zwischen TR und UT mittels des ungepaarten t-Test ($p < 0,05$) fiel auch für die Expression der HO-1 positiv aus. In PBMC untrainierter Probanden ließ sich die isolierbare Menge an für HO-1

kodierender mRNA durch Hitzeapplikation effektiver steigern, als dies in Zellen der Gruppe TR der Fall war.

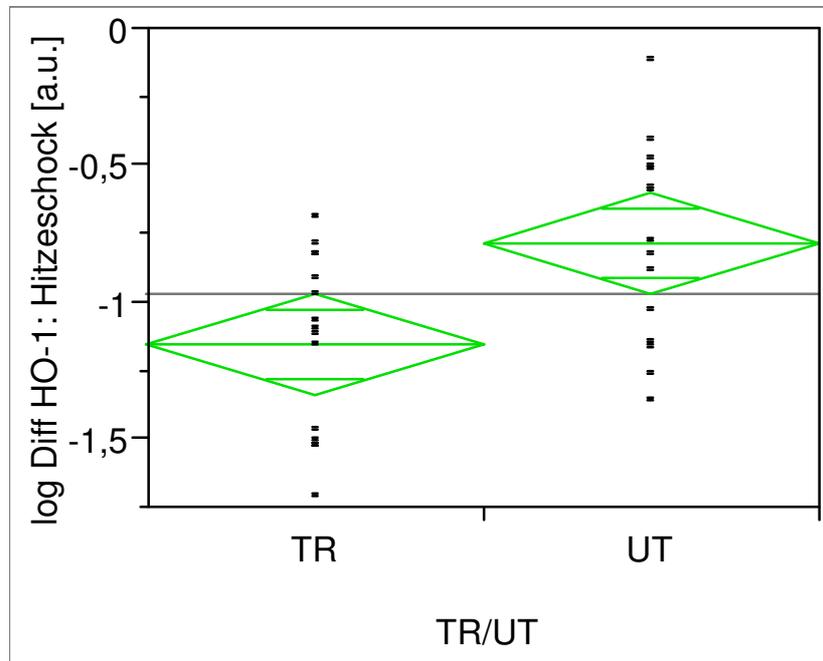


Abbildung 16: Einfluss der Hitzestimulation auf die Expression der HO-1. Darstellung mit logarithmierten Werten

Für die errechneten Differenzen zwischen nativen und hitzestimulierten Proben ergab sich bei Anwendung des Shapiro-Wilk-Test nur eine unzureichende Übereinstimmung mit einer Normalverteilung (p bzw. $W > 0,01$). Nach Logarithmierung der Werte waren diese jedoch ausreichend normal verteilt (p bzw. $W < 0,01$). Ein daraufhin erneut durchgeführter ungepaarter t-Test ergab ebenso einen signifikanten Unterschied zwischen TR und UT ($p < 0,05$).

Wie in Abb. 13 am Beispiel des HSP27 gezeigt wurde, lassen sich die beiden Gruppen TR und UT je nach körperlicher Betätigung in zwei Untergruppen aufteilen. Eine entsprechende untergruppen- bzw. trainingsabhängige Stimulierbarkeit durch Hitzeschock trifft auch für die Expression der HO-1 zu.

In Untergruppe 0 (ganz ohne Training) war die Reaktion auf Hitzeschock bzw. der errechnete Expressionsanstieg der HO-1 am stärksten ausgeprägt. Mittelwert der Differenzen: 0,228 (0,113-0,344) a.u.

Untergruppe 1 (gelegentliche sportliche Betätigung) zeigte bereits niedriger liegende Werte. Mittelwert der Differenzen: 0,160 (0,012-0,309) a.u.

Beinahe genau auf der Nulllinie lag der Mittelwert des errechneten Expressionsanstieges bei Untergruppe 2 (weniger, als 70 Laufkilometer/Woche). Mittelwert der Differenzen: 0,008 (-0,129 - 0,146)

In Untergruppe 3 (mehr, als 70 Laufkilometer/ Woche) lagen Mittelwert und 95% Konfidenzintervall der errechneten Expressionsanstiege etwas höher, als in Untergruppe 2 jedoch nicht so hoch wie bei den Untergruppen 0 und 1 der Gruppe TR. Mittelwert der Differenzen: 0,058 (-0,079-0,196).

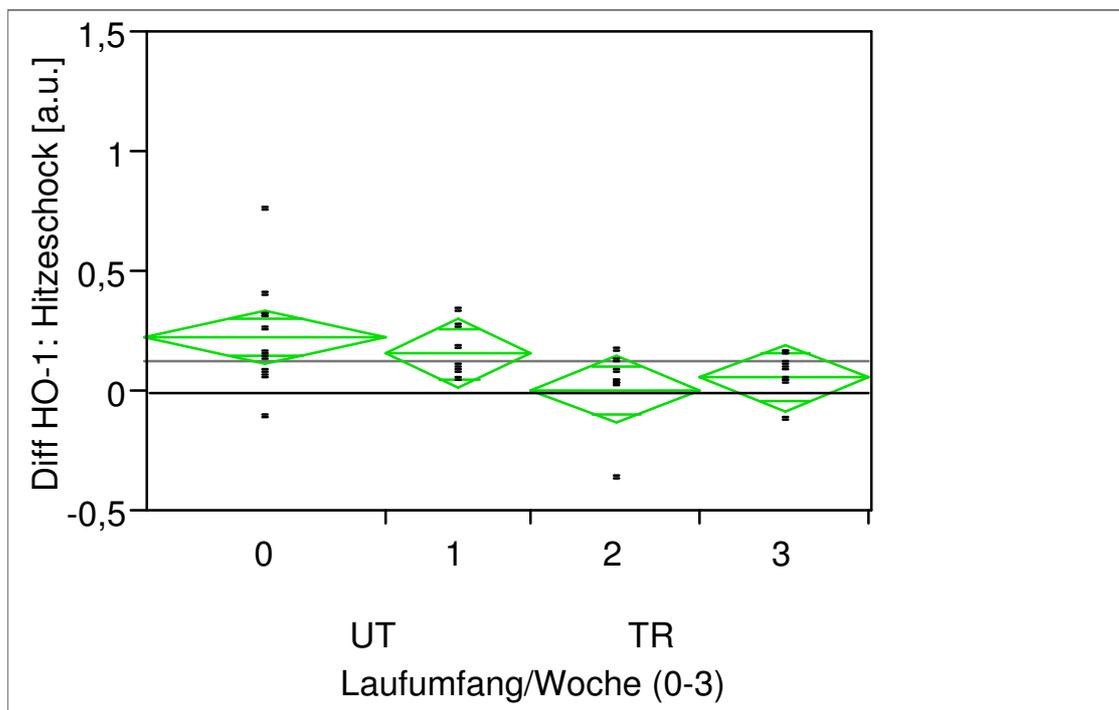


Abbildung 17: Abhängigkeit der Stimulierbarkeit der HO-1 vom Trainingszustand in beiden Gruppen

4.2.3 Vergleich der thermoneutralen und hitzeinduzierten Expression der iNOS

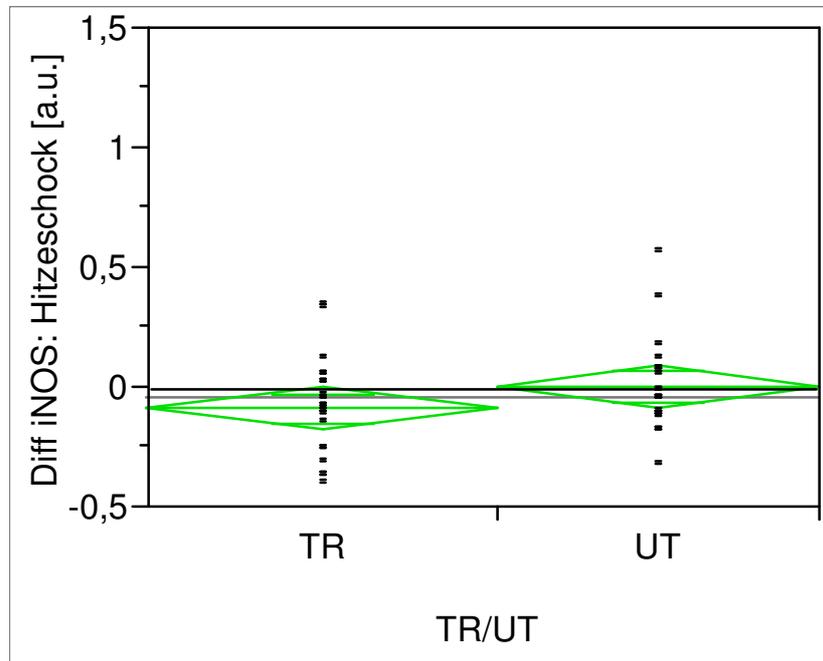


Abbildung 18: Einfluss der Hitzestimulation auf die Expression der iNOS

Die iNOS reagierte bei Hitzeschock bezüglich ihrer Expression auf mRNA-Ebene anders, als die Hitzeschockproteine.

Die Konfidenzintervalle beider Gruppen schlossen den Nullpunkt ein, obgleich bei TR sogar zahlreiche negative Einzelwerte zu sehen waren.

Weder die Lage der Rauten, noch eine Anwendung des ungepaarten t-Test zeigten einen signifikanten Unterschied des Verhaltens der PBMC beider Gruppen.

4.2.4 Zusammenfassung der Hitzestimulation

Während sich die, aus unstimulierten PBMC isolierte, relative mRNA-Menge nicht signifikant zwischen den Gruppen TR und UT unterschied (Abb. 7-10), zeigten Zellen trainierter und untrainierter Probanden bei Hitzeschock Differenzen bezüglich ihrer HSP-Expression.

Die isolierte, relative Menge an, für HSP27 und HSP72 kodierender mRNA ließ sich in beiden Gruppen durch Hitzeapplikation steigern. Signifikant höhere

Expressionsanstiege beider Hitzeschockproteine zeigten jedoch PBMC untrainierter Probanden (Abb. 11-14).

Die induzierbare Hämoxigenase (HO-1) erfuhr nur in der Gruppe UT einen signifikanten Expressionsanstieg durch Hitzeschock. Wie auch bei HSP27 und HSP72 reagierten PBMC untrainierter Probanden auch in Bezug auf die HO-1 Expression auf mRNA-Ebene stärker auf die Hitzeapplikation, als Zellen der Gruppe TR (Abb. 15-17).

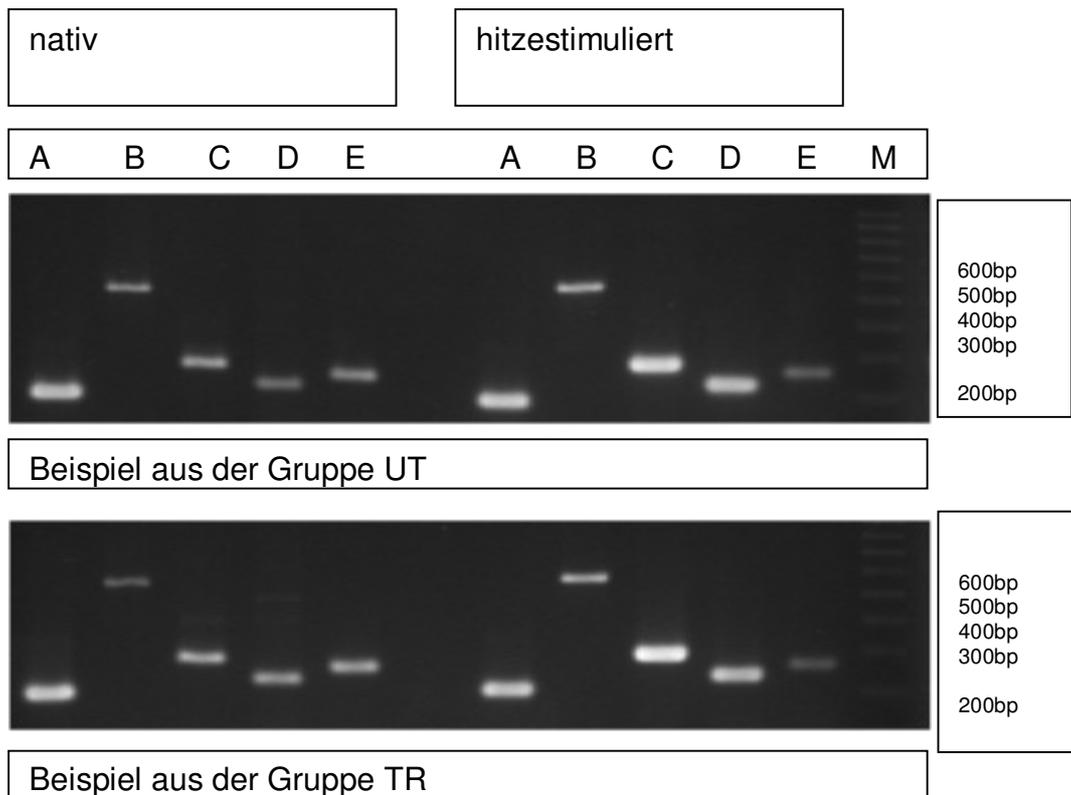
Weder vor, noch nach Hitzeschock unterschied sich die Expression der induzierbaren NO-Synthase zwischen den Gruppen TR und UT (Abb. 10 und 18).

Mit dem Alter der Probanden zusammenhängende Unterschiede im Expressionsverhalten ließen sich weder bei den untersuchten HSP, noch bei der HO-1 oder der iNOS erkennen.

Auf folgender Abbildung eines, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels sind die Produkte der RT-PCR als Banden zu sehen. Nativproben sind auf der linken Seite aufgetragen, hitzestimierte Proben jeweils rechts.

Im oberen Bild handelt es sich um Produkte, aus PBMC eines untrainierten Probanden isolierter mRNA, während die PCR-Produkte darunter aus mRNA eines trainierten Probanden gewonnen wurden.

Bei den verschiedenen Amplifikaten handelt es sich - von links nach rechts - um: A: β -Aktin, B: HO-1, C: HSP27, D: HSP72 und E: iNOS. Ganz rechts wurde die Basenpaarleiter (M) aufgetragen.



- A = β -Aktin (202 bp)
- B = HO-1 (555 bp)
- C = HSP27 (285 bp)
- D = HSP72 (234 bp)
- E = iNOS (258 bp)
- M = Basenpaarmarker
- UT = untrainierte Probanden
- TR = trainierte Probanden
- bp = Basenpaare

Abbildung 19: Beispiel Eines Agarosegels. Einfluss der Hitzestimulation

Auf der linken Seite wurden jeweils Nativproben aller vier untersuchten Proteine und des Standards, β -Aktin aufgetragen. Rechts sind die Banden

hitze-stimulierter Proben zu sehen. Der obere Ausschnitt des Gels zeigt das Beispiel eines untrainierten Probanden, der untere das eines trainierten.

Auf der Photographie zu erkennen ist:

1. Die unveränderte Expression von β -Aktin: Bei beiden Probanden zeigt sich die Bande des β -Aktin in ihrer Ausprägung kaum durch die Hitze-stimulation beeinflusst. Dies spricht für den konstitutiven Charakter der β -Aktin-Expression in PBMC.
2. Die, durch Hitze-stimulation gesteigerte Expression der Hitzeschockproteine beider Probanden: Auf der rechten Seite sind die Banden der Hitzeschockproteine (B-D) in beiden Bildausschnitten stärker ausgeprägt.
3. Der, bei UT höhere Anstieg der HSP-Expression: Bei einem Vergleich der rechten und linken Bildseite lässt sich im oberen Abschnitt eine ausgeprägtere Differenz der Bandenintensitäten erkennen.

4.3. Induzierbarkeit der iNOS mit LPS und Zytokinen oder mit PMA

Bereits isolierte und in RPMI-Medium resuspendierte PBMC wurden der dreistündigen Inkubation mit

1. LPS (100 ng/ml), $\text{IFN}\gamma$ (50 ng/ml) und $\text{TNF}\alpha$ (50 ng/ml)
2. PMA (3080 ng/ml)
3. keinem der Stoffe (=Negativkontrolle)

ausgesetzt.

Der semiquantitative Vergleich anschließend isolierter, für die iNOS kodierender mRNA ergab folgende Unterschiede zwischen den Gruppen TR und UT.

4.3.1. Stimulation mit LPS und Zytokinen

Bei Untersuchung eines Einflusses der Stimulation wurden, wie auch im Falle des Hitzeschocks die Werte der unstimulierten Kontrollen von denen stimulierter Proben abgezogen. Die resultierenden Differenzen (Δ -Werte) sind

in Abbildung 20 als Mittelwerte (waagerechte Achse der Rauten) und 95% Konfidenzintervalle (senkrechte Achse der Rauten) dargestellt.

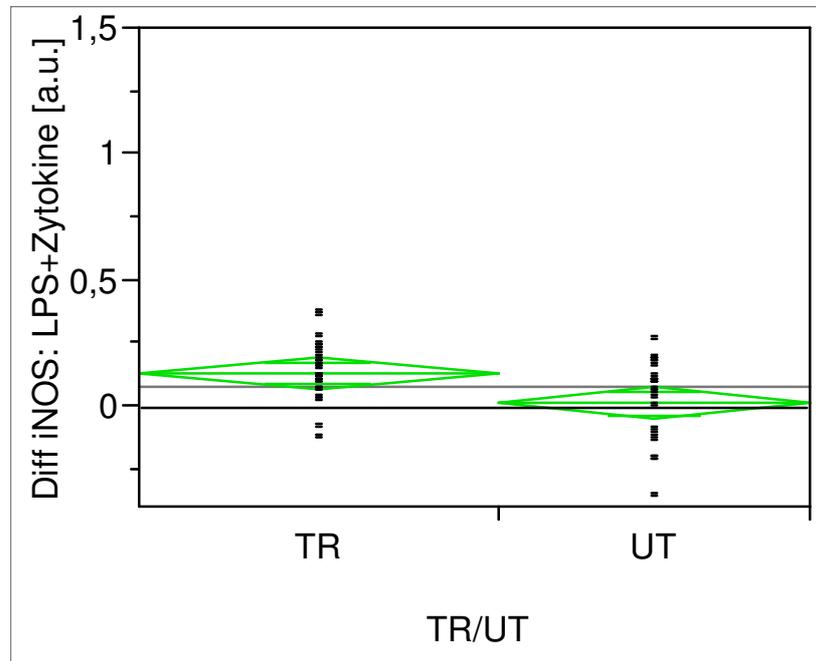


Abbildung 20: Einfluss der Stimulation mit LPS und Zytokinen auf die iNOS-Expression

Nur bei der Gruppe TR liegt die Raute über dem Nullpunkt, was für eine signifikante Steigerung der iNOS-Expression in PBMC dieser Gruppe spricht. Bei UT zeigt sich kein, durch LPS und Zytokine induzierter Anstieg der iNOS-Expression. Die waagerechte Achse der Raute liegt hier auf Höhe des Nullpunktes.

Der Unterschied zwischen den Gruppen wird außerdem trotz Überlappung der Rauten bei Anwendung des ungepaarten t-Test ($p < 0,05$) deutlich.

4.3.1.1. Abhängigkeit der Reaktion auf Stimulation mit LPS und Zytokinen vom Alter des Probanden

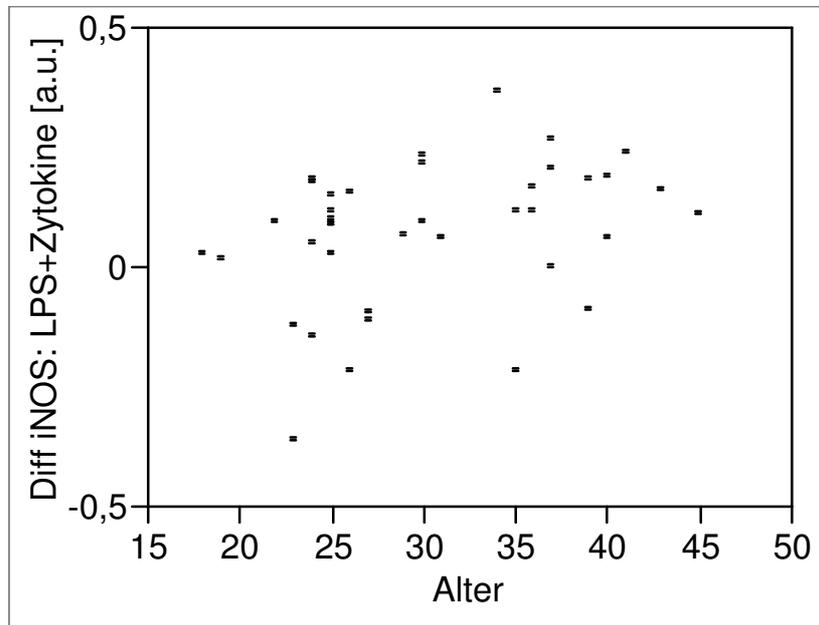


Abbildung 21: Abhängigkeit der Reaktion auf Stimulation mit LPS und Zytokinen vom Alter des Probanden

Die Differenzen der Werte stimulierter Proben und der zugehörigen Kontrollwerte erwiesen sich bei visueller Prüfung als, vom Alter des Probanden weitgehend unabhängig. Dies wurde durch die unabhängige Verteilung der Einzelwerte in Abbildung 21 sichtbar.

4.3.1.2. Abhängigkeit der Reaktion auf Stimulation mit LPS und Zytokinen vom Trainingszustand in beiden Gruppen

Die Stimulierbarkeit der iNOS-Expression stieg nicht proportional zum Trainingszustand.

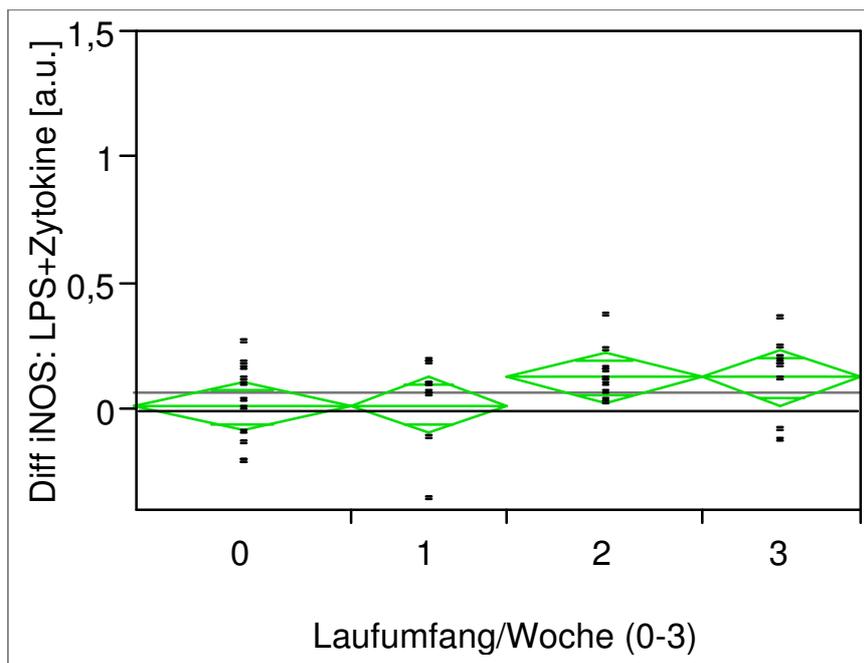


Abbildung 22: Abhängigkeit der Reaktion auf die Stimulation mit LPS und Zytokinen vom Trainingszustand in beiden Gruppen

Wie bereits in Abschnitt 4.2.1.2. am Beispiel des HSP27 gezeigt lassen sich die beiden Gruppen TR und UT je nach körperlicher Betätigung in zwei Untergruppen aufteilen.

In der Gruppe der ausdauertrainierten Probanden (TR) war das Zuordnungskriterium zu Untergruppe 2 bzw. 3 ein wöchentlicher Trainingsumfang unter bzw. über 70 km Ausdauertraining/ Woche. Die untrainierten Probanden (UT) wurden bei gelegentlicher sportlicher Tätigkeit der Untergruppe 1 und bei gänzlicher Verneinung einer solchen der Untergruppe 0 zugeordnet.

Abbildung 22 zeigt übereinstimmend mit Abb. 20 und 24 höhere (bzw. über dem Gesamtmittelwert liegende Mittelwerte in der Gruppe TR, bzw den Untergruppen 2 und 3, als in der Gruppe UT, bzw den Untergruppen 0 und 1.

Eine leichte Steigerung der körperlichen Aktivität, wie in Untergruppe 1 hat kaum einen bemerkbaren Einfluss auf die Stimulierbarkeit der iNOS-Expression in mononukleären Zellen.

Ähnlich wird in den ausdauertrainierten Untergruppen 2 und 3 kein bedeutender Unterschied der Stimulierbarkeit zwischen den mehr oder weniger umfangreich trainierten Untergruppen deutlich.

4.3.2 Stimulation mit PMA

Auch hier handelt es sich bei den errechneten Δ -Werten um Differenzen der stimulierten Proben und der unstimulierten Kontrollen.

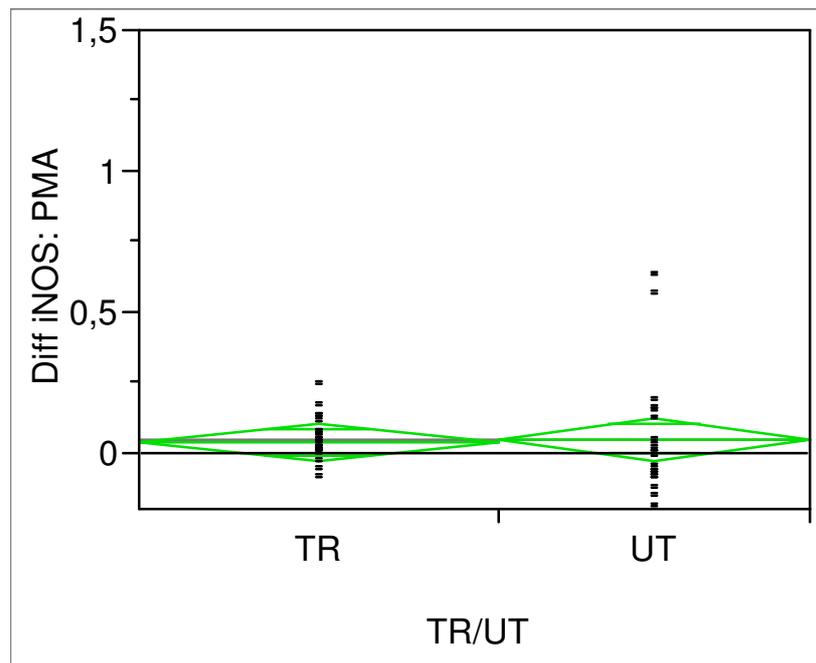


Abbildung 23: Einfluss der Stimulation mit PMA auf die iNOS-Expression

Die Stimulation der PBMC mit PMA führte in keiner der beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der iNOS-Expression: Die 95%Konfidenzintervalle schliessen den Nullpunkt ein.

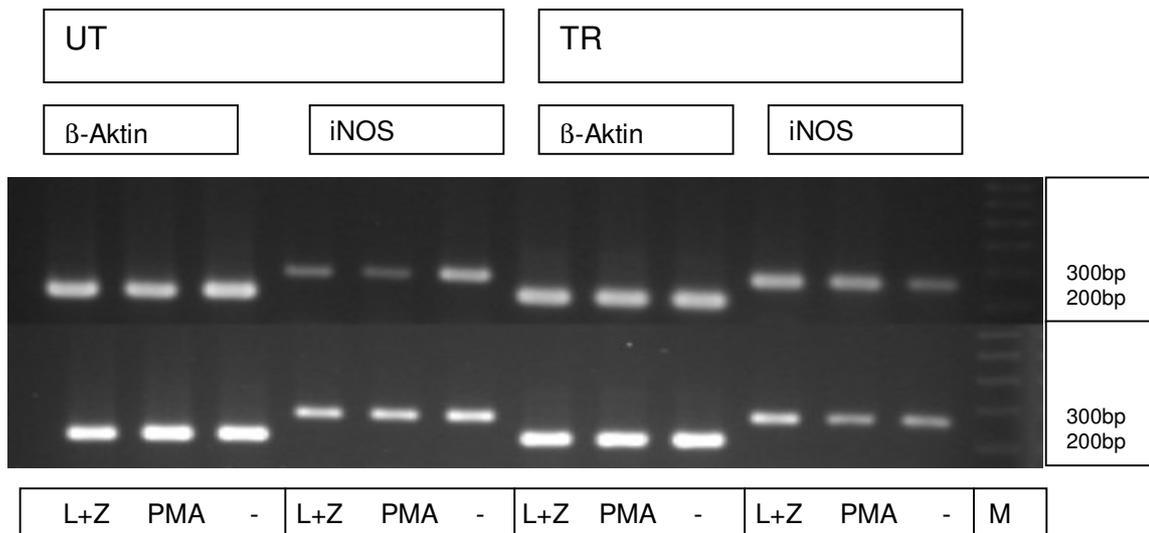
Dass sich die beiden Gruppen bezüglich der iNOS-Expression bei Stimulation mit PMA nicht unterschieden, wird durch die Lage der Rauten sichtbar. Sowohl Mittelwerte, als auch 95%Konfidenzintervalle entsprechen sich weitgehend.

4.3.3. Zusammenfassung der Reaktion auf PMA oder LPS und Zytokine

Bei den ausdauertrainierten Probanden (TR) ließ sich die Expression der iNOS in PBMC durch Inkubation mit LPS und Zytokinen steigern (Abb. 20, 22 und

24). Dieses Verhalten zeigte sich als unabhängig vom Alter der Probanden (Abb. 21). In der Gruppe TR führte ein Trainingsumfang von mehr oder weniger als 70 km zu keinen unterschiedlichen Ergebnissen (Abb. 22).

Die Reaktion der PBMC auf Inkubation mit PMA zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen TR und UT (Abb. 23)



- UT = Proben zweier untrainierter Probanden
- TR = Proben zweier trainierter Probanden
- L+Z = Mit LPS und Zytokinen stimulierte Proben
- PMA = Mit PMA stimulierte Proben
- (-) = unstimulierte Proben
- M = Basenpaarmarker
- bp = Basenpaare

Abbildung 24: Ausschnitt eines Agarosegels: zwei trainierte und zwei untrainierte Probanden

Bei Betrachtung der Photographie lässt sich erkennen:

1. β-Aktin-Banden zeigen sich in unveränderter Ausprägung
2. Die, auf der linken Seite liegenden Banden der beiden untrainierten Probanden (UT) sind im Falle der Stimulation mit LPS und Zytokinen

(L+Z) nicht stärker ausgeprägt, als diejenigen, welche zu den Kontrollen (-) gehören.

3. Die, rechts liegenden Banden der trainierten Probanden sind im Falle der Stimulation mit LPS und Zytokinen stärker ausgeprägt, als unstimulierte Kontrollen repräsentierende Banden.

5. Diskussion

Auswirkungen körperlichen Trainings auf den Organismus sind vielfältig. Nahezu alle Organsysteme und Kompartimente des Körpers werden beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurden gewisse Modulationen des Immunsystems untersucht.

Mäßiges Ausdauertraining kann das Abwehrsystem stärken, während andererseits intensive Ausdauerbelastungen das Risiko von Infektionen besonders der oberen Atemwege steigern (Nieman D.C.). Auch bei Betrachtung der physiologisch messbaren Reaktionen des Körpers muss sowohl zwischen moderatem und intensivem Sporttreiben, als auch zwischen akuter Belastung und regelmäßigem Training unterschieden werden. Letzteres stellt eine ständige Wiederholung akuter Reize dar. Zur Ökonomisierung des Umganges mit diesen, das Gleichgewicht beeinflussenden Reizen erfolgt eine Anpassungsreaktion, sodass die, bei trainierten Personen beobachteten Langzeitveränderungen als Folge von Anpassungsprozessen gesehen werden können.

5.1 Stressreize bei Ausdauersport (Ausdauersport und Immunsystem)

Das Stoffwechselgleichgewicht von Zellen und Gesamtorganismus sind bei dynamischer Belastung unter anderem durch zwei, das Immunsystem betreffende Veränderungen bedroht [Pedersen et al 1997]. Zum einen kommt es zur Erhöhung der Körperkerntemperatur und zum anderen zu einer Steigerung des Sauerstoffumsatzes und einer damit verbundenen vermehrten Entstehung freier Radikale.

Freie Radikale sind hochreaktive Verbindungen oder Atome, welche ein freies, ungepaartes Elektron besitzen [Asmus et al 2000; Halliwell et al 1989]. Durch oft spontane Reaktionen entstehen daraus zum Teil noch aggressivere Verbindungen, welche organische Moleküle oxidieren und somit zerstören [Halliwell 1998]. Biochemisch wird zwischen Sauerstoffderivaten (Reactive Oxygen Species /ROS) und Stickstoffderivaten (Reactive Nitrogen Species /RNS) unterschieden. Die wichtigsten Vertreter der ROS sind mit zunehmendem Gefährdungspotential Superoxidanionen $O_2^{\bullet-}$,

Hydrogenperoxid H_2O_2 , Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ und Hydroxylradikale $\text{OH}\cdot^-$. Bei den RNS spielen direkte Produkte der NO-Synthase ($\text{NO}\cdot$, NO^- , NO^+) und deren Reaktionsprodukte (u.a. NO_2 , NO_2^- , NO_3^- , N_2O_3 , N_2O_4 , ONOO^-) eine Rolle im Immunsystem [Bogdan 2001]. Im einzelnen handelt es sich bei ROS und RNS jedoch um zahlreiche Stoffe unterschiedlicher Herkunft.

Untersuchungen menschlichen Serums mit Hilfe von Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie nach erschöpfender körperlicher Arbeit zeigen eine vermehrte Entstehung freier Radikale bei körperlicher Belastung [Ashton 1998]. Eine weitere Studie liefert Daten für linear ansteigende F2-Isoprostan Konzentrationen während einer Ausdauerbelastung. Dabei handelt es sich um Peroxidationsprodukte der Arachidonsäure im Serum, welche indirekt auf die Gegenwart oxidierenden Potentials hinweisen [Steensberg 2002].

Eine der Ursachen für die Radikalanreicherung ist der gesteigerte ATP-Abbau infolge des erhöhten ATP-Bedarfs. Als Nebenprodukt der Atmungskette entstehen in Mitochondrien auch unter Ruhebedingungen Superoxide ($\sim 4\%$ des O_2 werden zu $\text{O}_2\cdot^-$). So kommt es allein durch den gesteigerten Energieumsatz des arbeitenden Muskels zu einer verstärkten $\text{O}_2\cdot^-$ -Produktion. [Benzi 1993; Boveries et al 1973; Halliwell et al 1989; Halliwell, 1994; Niess et al 1999]. Der entstehende AMP-Überschuss verursacht außerdem folgende Änderung des Purinstoffwechsels. Aus AMP entsteht über die Zwischenprodukte IMP und Inosin Hypoxanthin, welches mit Hilfe der Xanthinoxidase zu Xanthin und schließlich zu Harnsäure und $\text{O}_2\cdot^-$ umgesetzt wird. Die normalerweise in Dehydrogenaseform vorliegende Xanthinoxidase erfährt ihre Konversion zur Oxidase durch weitere, beim Sport auftretende Faktoren [Niess et al 1999; Fehrenbach et al 2001]. Es sind dies unter anderem Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Menge und Hyperthermie [Sutton et al 1980; Hellsten-Westing et al 1991; Parks 1986].

Eine Quelle für die besonders toxischen, weil nicht vom Körper inaktivierbaren Hydroxylradikale stellt die Fenton Reaktion dar. Das dafür benötigte freie Fe^{2+} reagiert mit H_2O_2 zu Fe^{3+} , $\text{OH}\cdot$ und OH^- [Fenton 1894]. Besonders bei, mit partieller Hämolyse verbundenen Belastungen, wie zum Beispiel

Langstreckenlauf, kann es unter Umständen zu einem gesteigerten Angebot an freiem Eisen kommen [Heine 1995].

Auch die weiter unten ausführlicher dargestellte spontane Aktivitätssteigerung phagozytierender Zellen [Guarnieri 1992] führt besonders zu einer Anreicherung sowohl extra -, als auch intrazellulärer RNS [Suzuki et al 1996]. Katalysiert durch die NADPH-Oxidase von Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten entsteht aus NADPH^+H^+ und O_2 das Superoxidradikal $\text{O}_2\bullet^-$ [Bellavite 1988; Lindsay 1997], welches von der Superoxiddismutase (SOD) teilweise zu H_2O_2 und von der Myeloperoxidase weiter zu hypochloriger Säure (HOCl) umgesetzt wird. Außerdem entstehen aus L-Arginin durch die induzierbare NO-Synthase unter anderem in Monozyten, Neutrophilen und Eosinophilen und in T-Lymphozyten $\text{NO}\bullet$ + Zitrullin [Lincoln 1997]. Ersteres kann mit $\text{O}_2\bullet^-$ zu Peroxinitrit ONOO^- reagieren [Asmus et al 2000; Halliwell et al 1989; Lincoln 1997; Niess et al 1999 a].

Bei der Betrachtung belastungsabhängiger Änderungen des Sauerstoffmetabolismus ist zu beachten, dass nicht nur ein gesteigerter O_2 - Umsatz, sondern auch intermittierende Ischämiezustände das Immunsystem zu aktivieren vermögen [Klokke et al 1995]. Wenngleich die Mehrzahl der unter Trainingsbedingungen entstehenden hochreaktiven Verbindungen von essentieller Bedeutung für das Abwehrsystem ist, stellen sie doch eine nicht unwesentliche Gefährdung körpereigener Biomoleküle dar. Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) erhöht das Atheroskleroserisiko, mehrfach ungesättigte Fettsäuren verlieren durch Peroxidation ihre Fähigkeit, für die Membranintegrität zu sorgen. Ebenfalls eine funktionelle Beeinträchtigung erfahren Enzyme mit Thiolgruppen. Nicht zuletzt ist die mutagene Kapazität der Radikale infolge der DNA-Schäden, die sie verursachen können von Bedeutung [Niess et al 1999 a; Heine 1995; Hartmann 1998].

Ebenfalls zu oxidativem Stress und Denaturierung organischer Moleküle führt die, bei Ausdauerbelastung häufig beobachtete Überwärmung [Pedersen et al 1997]. Ein Anstieg der Körperkerntemperatur bis auf 41°C ist keine Seltenheit, was angesichts der Tatsache, dass bei Muskelarbeit 80% der aus O_2 gewonnenen Energie in Wärme übergehen nicht verwunderlich ist [Gleeson

1998; Hargreaves et al 1998]. Gegen Fieber als Ursache der Temperaturanstiege spricht außerdem deren Reproduzierbarkeit nach Gabe von Prostaglandinhibitoren, durch welche eine fieberbedingte Temperatursteigerung verhindert wird [Pedersen et al 1997]. Eine der von hypothalamischen Regelzentren ergriffenen Maßnahmen zur Wiederherstellung des niedriger liegenden Sollwertes ist die Aktivierung des sympathischen Nervensystems, die unter anderem eine Aktivierung der ekkrinen Schweißdrüsen zur Folge hat [Armstrong et al 1998]. Neben einer weiteren Steigerung metabolischer Aktivität und des damit verbundenen O₂-Verbrauches können Katecholamine auch Zahl und Aktivität der Leukozyten beeinflussen, wobei die Steigerung des Blutflusses einen bedeutenden Beitrag zur Ausschwemmung der Zellen aus temporären Speichern leistet [Tvede et al 1994; Woods et al 1999]. Bei akuter extremer Überwärmung beobachtete Ischämiezustände des Intestinaltraktes sind vermutlich ebenfalls als Wirkung des Sympathikus zu verstehen. Durch Mikroblutungen kommt es hier zur Einschwemmung von Lipopolysacchariden (LPS), welche auf der Zellwand gramnegativer Bakterien lokalisiert sind [Bosenberg et al 1988]. LPS gilt als einer der potentesten Aktivatoren von Monozyten und Makrophagen und stimuliert unter anderem durch Bindung an den CD14-Rezeptor deren iNOS-Produktion [Bogdan 2001].

5.2 Trainingsbedingte Anpassungsmechanismen zur Minderung von oxidativem Stress und seinen Folgen

Sowohl im Muskelgewebe, als auch beispielsweise in Thrombozyten und Erythrozyten trainierter Sportler wurde ein erhöhtes antioxidatives Potential festgestellt, wodurch das Gleichgewicht oxidierter und reduzierter Moleküle aufrechterhalten wird [Powers et al 1999 a; Powers et al 1999 b]. So können Ursachen für die oben erwähnte Minderung der ROS-Produktion bei ausdauertrainierten Athleten sowohl eine durch Antioxidantien vermittelte geringere Zellschädigung und damit eine abgeschwächte Akute-Phase-Reaktion als auch eine direkte Suppression der Immunreaktion sein

[Fehrenbach et al 2001]. Die, im nächsten Abschnitt vorgestellten Proteine vermögen, neben weiteren Effekten, beides zu vermitteln.

Hitzeschockproteine (HSP) sorgen intrazellulär für korrekte Faltung, Transport, Stabilisierung oder Abbau, sowohl neusynthetisierter, als auch denaturierter Proteine [Morimoto et al 1994; Fehrenbach et al 1999; Zugel et al 1999, Locke et al 1995 b]. Exprimiert werden sie, wenn die Zelle Stressreizen, wie z.B. Hitzeschock ausgesetzt wird [Locke et al 1995 b; Mosser et al 1988].

Mit Akkumulation von HSP geht eine gesteigerte Toleranz der Zellen gegenüber sonst eventuell letalem Stress einher [Samali et al 1999].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Hitzeschockproteine HSP72, HSP27 und HSP32 untersucht, wobei letzteres meist unter dem Namen Hämoxigenase-1 (HO-1) erwähnt wird.

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) oder NOS2 hat eine komplexe immunologische Bedeutung [Lincoln et al 1997; Weinberg et al 1995; Xiao et al 1995]. In erster Linie der Abwehr dient die von der iNOS katalysierte Synthese des toxischen NO• [Lowenstein et al 1994]. Wie auch die HSP wird die iNOS unter anderem durch ROS oder Hitzeschock induziert. Außerdem wurde infolge akuter Ausdauerbelastung eine verstärkte Expression in peripheren Leukozyten nachgewiesen [Niess et al 2000].

5.3 Stimulation mit Hitzeschock

Die Expressionsanalyse der Hitzeschockproteine HSP27, HSP70 und HO-1 bzw. HSP32 auf mRNA-Ebene ergab bei unstimulierten peripheren mononukleären Zellen (PBMC) keine signifikanten Unterschiede zwischen TR und UT (Abb. 7-10).

Zweistündige Hitzeexposition jedoch führte zu der erwarteten Expressionszunahme. Allerdings ließ sich mittels RT-PCR in den Zellen untrainierter Probanden mehr, für HSP kodierende mRNA detektieren, als dies bei trainierten Personen der Fall war (Abb. 11-17 und 19).

Für einen Einfluss regelmäßiger Belastung (Training) auf die HSP-Expression in Leukozyten gibt es bereits Hinweise. Fehrenbach et al beobachteten bei einer, an Gesamtleukozyten durchgeführten Analyse von HSP70 und HSP27 auf Proteinebene Trainingseffekte im Sinne einer Drosselung basaler (unstimulierter) Expression. Die, in zitiertem Studie durchgeführte semiquantitative RT-PCR zeigte bei Trainierten eine geringere basale Expression des HSP27, jedoch höhere Werte für HSP70, als dies bei der Kontrollgruppe der Fall war. Bei trainierten Probanden wurden außerdem infolge in vitro Hitzeschock vergleichsweise gesteigerte Expressionsanstiege bzw. Stimulierbarkeiten vermerkt [Fehrenbach et al 2000 a].

Das Verhalten von ausschließlich mononukleären Zellen in Bezug auf ihre mRNA –Produktion in Abhängigkeit vom Trainingszustand des Probanden wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit unseres Wissens erstmalig untersucht.

Die oben erwähnten früheren Analysen des Expressionsverhaltens mittels RT-PCR fanden an Gesamtleukozyten statt.

Getrennte Untersuchungen der Subpopulationen Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten auf Proteinebene geben jedoch Hinweise auf erhebliche Unterschiede in der HSP-Expression. So fanden Fehrenbach et al. mittels Durchflußzytometrie, bzw. FACS-Analyse nach akuter Ausdauerbelastung kaum HSP27 und HSP70-positive Lymphozyten, wohl aber belastungsinduzierte Anstiege der HSP in Mono- und Granulozyten [Fehrenbach et al 2000 a],

Parallel zu der, in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RT-PCR fand mit einem Teil derselben Blutproben ebenfalls eine Expressionsanalyse auf Proteinebene mittels Durchflußzytometrie (FACS) statt [Fehrenbach et al 2003, Waldvogel 2005]. Das FACS-Gerät erlaubt eine getrennte Betrachtung der zu den PBMC gehörenden Lymphozyten und Monozyten.

Zum Zweck einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde auch vor der mRNA-Analyse eine Trennung der Zellen durchgeführt. Nach Isolation der PBMC mittels des Dichtegradienten Lymphoflot wurde eine weitere Auftrennung

in Lymphozyten und Monozyten mittels magnetischer CD14-Antikörper (MACS) durchgeführt.

In der eigentlichen Versuchsreihe wurde schließlich jedoch aus einigen Gründen auf diese Art der Leukozytentrennung verzichtet:

1. Eine wiederholte Stimulation des monozytären CD14-Rezeptors durch LPS einerseits und durch Bindung der magnetischen Antikörper andererseits sollte vermieden werden.
2. Die hohe Anzahl an zusätzlichen Zentrifugations – und Inkubationszeiten stand in Bezug auf die damit verbundenen Stressreize in ungünstigem Verhältnis zur eigentlich untersuchten Stimulation der Zellen. Zum Beispiel kann die Adhärenz der Zellen an verschiedene Plastikgefäße und –säulen einen undefinierbaren Stimulationsreiz darstellen.
3. Die Verarbeitung der Leukozyten in vitro dauerte inklusive MACS-Trennung bis zur Isolierung der mRNA ca. 15 h. Vorsichtsmassnahmen, wie teilweise Verarbeitung auf Eis und unter laminarem Luftzug wurden weitgehend eingehalten. Dass vermutlich dennoch ubiquitäre RNAsen wirksam wurden zeigt die geringe RNA-Ausbeute nach MACS-Trennung (Tab 7).
4. Für die Gewinnung einer ausreichenden RNA-Menge aus Monozyten ist außerdem wegen ihres relativ Geringen Anteils an der Zahl der PBMC (ca 10%) das 10fache Volumen an Vollblut erforderlich.

Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit mittels RT-PCR das Expressionsverhalten von Lymphozyten und Monozyten nicht getrennt untersucht.

Im Gegensatz zu den, aufgrund der Ergebnisse der Studie von Fehrenbach et al bestehenden Erwartungen fand sich in PBMC ausdauertrainierter Probanden weder signifikant weniger, für HSP27, noch mehr, für HSP70 kodierende mRNA, als in den Zellen nicht spezifisch trainierter Kontrollpersonen [Fehrenbach et al 2000 a]. Auch die Applikation eines Hitzereizes zeigte bei Betrachtung mononukleärer Zellen andere Effekte, als aufgrund der genannten Untersuchung erwartet werden konnte. So folgte zwar auf den Hitzeschock der

übliche Expressionsanstieg aller untersuchten Proteine, war jedoch in seinem Ausmaß bei trainierten Probanden bei weitem weniger ausgeprägt. Statistisch signifikant wurde dieser offensichtliche Trainingseffekt bei Vergleich der Induzierbarkeit von HSP27, HSP72 und HO-1.

Ein bedeutender methodischer Unterschied zwischen beiden Studien besteht in der Untersuchung von Gesamtleukozyten bei Fehrenbach et al und der Untersuchung von ausschliesslich PBMC in der vorliegenden Arbeit [Fehrenbach et al 2000 a]. Eventuelle Trainingseffekte auf neutrophilen Granulozyten, welche nicht zu den PBMC gehören haben hier im Gegensatz zu der zitierten Studie keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

Nach Berichten einiger Autoren sind sich die beiden phagozytierenden Subpopulationen, Monozyten und Granulozyten in ihrem Verhalten nach akuter Ausdauerbelastung bezüglich charakteristischer Aspekte recht ähnlich [Fehrenbach et al 2000 b; Niess et al 1999 a; Niess et al 1999 b; Niess et al 2000 a; Smith et al 1990].

Dies betrifft auch eine Steigerung der Phagozytose, welche mit der, für Verdauung und Abtötung aufgenommener Fremdkörper notwendigen ROS- und RNS-Produktion verbunden ist. In den beiden, zum Phagozytensystem zählenden Subpopulationen ist nun auch die reaktive Synthese von HO-1 [Niess, Passek 1998], HSP27 und HSP70 stark ausgeprägt [Fehrenbach Passek 2000]. Zu erklären ist dies durch einen, angesichts der intrazellulären Radikalanreicherung gesteigerten Bedarf an antioxidativem und proteinschützendem Potential [Fehrenbach et al 2000 b; Kantengwa et al 1991; Kilgore et al 1998]. Die isolierte Betrachtung mononukleärer Zellen bezüglich trainingsbedingter Modulation der Hitzeschockreaktion lässt also ähnliche Ergebnisse wie eine Untersuchung ohne Entfernung der Neutrophilen Granulozyten erwarten.

Für die, im Vergleich zu der Untersuchung von Fehrenbach et al widersprüchlichen Ergebnisse kann neben der Abtrennung der neutrophilen Granulozyten auch noch ein weiterer methodischer Unterschied eine Rolle spielen:

Die Nativproben (=unstimulierte Kontrollen) verblieben bei den Experimenten dieser Arbeit für 3h bei 37°C im Brutschrank, sodass ein potentieller Einfluss der dreistündigen Lagerung ausgeschlossen werden konnte. Demzufolge fand der Vergleich von TR und UT in Bezug auf die basale Expression erst nach besagter Inkubation statt. Sie spiegelt daher nicht wirklich die Expression der Nativproben wider, sondern ist ein Vergleich der Expression nach 3h Lagerung. Denkbar wäre also eine bei TR, verglichen mit UT relativ stärkere HSP-Expression während jener 3h zwischen Blutentnahme und RNA-Isolierung. D.h. eine Stimulation der so genannten, basalen Expression durch die Inkubationszeit per se. Die schwächeren Anstiege durch Hitzeschock bei TR wiederum ließen sich durch trainingsbedingte Adaptation an wiederholte Stressreize im Sinne einer „Downregulation“ zelleigener Radikalproduktion und vermehrte Bildung antioxidativ wirksamer Stoffe in dieser Gruppe erklären.

Eine dritte Abweichung im Studiendesign der vorliegenden Arbeit von dem der zitierten Studie von Fehrenbach et al ist ein größerer Anteil an sehr umfangreich (> 70 km/Woche) trainierten Probanden.

Um genauere Erkenntnisse über den Einfluss der wöchentlichen Trainingskilometer auf die HSP-Expression bei Hitzeschock zu erhalten wurden die Gruppen UT und TR nach ansteigendem Trainingsumfang in die vier Untergruppen 0-3 aufgeteilt.

Die Stimulierbarkeit der HSP-Expression in Untergruppe 2 der Trainierten Probanden (TR) deren Laufumfang im letzten Vierteljahr weniger als 70 Wochenkilometer betragen hatte konnte so getrennt analysiert werden.

Wie in Abb. 13 am Beispiel des HSP27 sichtbar wird, zeigte sich jedoch auch bei ausdauertrainierten Probanden der Untergruppe 2 eine geringere Reaktion auf Hitzeschock, als dies in der Gruppe UT der Fall war.

5.3.1 Stressoren bei Hitze

Wie auch in ganzen Organismen bewirkt die Temperaturerhöhung eine Anregung des Zellstoffwechsels [Moseley1994]. Interessanterweise kann Hitze zusätzlich zu einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung führen. In Kombination mit einer Steigerung metabolischer Aktivität führt dies zur

Anreicherung von Adenosinderivaten aus dem ATP-Abbau. Dies sind in erster Linie Xanthin und Hypoxanthin, welche im Zuge ihrer Verstoffwechslung durch die Xanthinoxidase zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beitragen [Moseley 1994].

Die Lagerung in den geschlossenen Kunststoffröhrchen kann außerdem zu Stressreizen, wie Hypoxie, Nährstoffmangel, Änderung des pH-Wertes, partieller Hämolyse und Adhärenz an die Fremdoberfläche führen, um nur einige Beispiele zu nennen [Iwaki et al 1993; Webb et al 2001; Welch et al 1991]. Durch Hitzeapplikation können diese, teilweise das Redoxgleichgewicht der Zelle störenden Faktoren vermutlich potenziert werden.

Eine weitere Folge der Überwärmung ist außerdem eine gewisse Verflüssigung und Destabilisierung der Zellmembranen [Mejia et al 1995; Revathi et al 1994], was ebenfalls zu einer Induktion der HSP-Synthese führt [Vigh et al 1998]. Zusätzlich können erhöhte Temperaturen direkt denaturierend auf Proteine der Membranen, des Zytoskeletts oder des Enzymapparates wirken [Moseley 1994]. Die, das Zytoskelett schützende Funktion von HSP27 [Head et al 2000] die antioxidative Wirkung der Hämoxigenase-1 [Marini et al 1996; Niess et al 1999 b; Stocker 1990] und der allgemeine Beitrag der HSP zu Schutz, Neufaltung, Transport und Recycling oder Abbau denaturierter Proteine [Essig et al 1997] kommen so in überwärmten Zellen zum Einsatz.

Hitzeschockproteine stellen jedoch trotz ihrer vielen Aufgaben und ihrer großen Bedeutung keineswegs das gesamte protektive Arsenal der Zelle dar. Im Hinblick auf Oxidationsschutz gibt es einige Berichte über trainingsbedingte Aktivitätserhöhung antioxidativer Systeme, sowohl im Muskel, als auch in Blutzellen. Ein gesteigertes Angebot an Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Glutathion wurde bei trainierten Versuchstieren in der Muskulatur festgestellt [Powers et al 1999]. Aber auch in humanen Erythrozyten, Muskelzellen oder im Serum ausdauertrainierter Probanden lassen sich, teilweise sogar in Korrelation mit dem Trainingsumfang, erhöhte Werte von Glutathionreduktase, -peroxidase und -schwefeltransferase, Katalase, Superoxiddismutase und Glutathion selbst nachweisen. [Evelo et al 1992; Hellsten Y.1994; Higuchi et al 1985, Kanter et al 1985; Mena et al 1991;

Robertson et al 1990]. Ein Einfluss dieser Stoffe ist insofern wahrscheinlich, als Glutathion und Superoxiddismutase direkt zur Entwicklung von Hitzetoleranz beitragen können [Mitchell et al 1983; Privalle et al 1987]. Im Zusammenhang mit der, bei trainierten Athleten schwächeren Hitzeschockantwort ist dies deswegen interessant, weil sich die HSP –Expression durch einige antioxidativ wirksame Stoffe drosseln lässt [Hamilton et al 2002]. Eine, durch Antioxidantien abgeschwächte oder aufgehobene Stimulierbarkeit der Expression von HSP27 und HSP72 durch Hitzeschock oder sportliche Belastung wurde bereits mehrfach festgestellt [Gormann et al 1999; Hamilton et al 2002; Niess et al 2002 a; Ushakova et al 1996].

Als ein weiterer Trainingseffekt wird, neben der verstärkten Ausbildung reduzierender Systeme bei Athleten eine Drosselung des oxidativen Potentials phagozytischer Zellen beobachtet [Blannin et al 1996; Pyne et al 2000; Smith et al 1997], was möglicherweise zu einem verringerten Bedarf an protektivem Material führt.

Wahrscheinlich spielen aber noch weitere, bisher nicht vollständig bekannte Faktoren bei der Entwicklung der Thermotoleranz eine Rolle. Über Unterschiede in der tatsächlichen Beeinträchtigung der PBMC durch die Hitzeapplikation können hier keine sicheren Aussagen gemacht werden. Auch scheint die allgemeine Minderung des prooxidativen Zustandes bei ausdauertrainierten Personen kaum Folge einer gesteigerten HSP-Expression zu sein. Ein umgekehrter Zusammenhang im Sinne der geringeren Radikalanreicherung [Benoni et al 1995; Smith et al 1990] und Molekül-Denaturierung als Ursache eines geminderten HSP Bedarfes erscheint, wie bereits von Fehrenbach et al. vermutet [Fehrenbach et al 2000 b] auch angesichts der vorliegenden Ergebnisse wahrscheinlicher.

Die Tatsache, dass sich durch Training nicht nur eine erhöhte Toleranz der Zellen, sondern auch eine Anpassung des ganzen Körpers an Hitzeexposition erreichen lässt, wurde bereits in anderen Studien nachgewiesen [Fehrenbach et al 2001 a; Ryan et al 1991]. Begleitet wird diese Adaptation an eine Belastung unter Hitzebedingungen sowohl von einem rascheren Abfall der HSP72-Expression in peripheren Leukozyten, als auch - übereinstimmend mit den

Ergebnissen dieser Arbeit - von einer geringeren Reaktion der angepassten Leukozyten auf in vitro Hitzeschock [Fehrenbach et al 2001 a; Ryan et al 1991]. Dies deutet ebenfalls auf eine Beteiligung anderer Faktoren bei der Adaptation und bei der Entwicklung von Hitzetoleranz hin. Zugleich wird die These einer durch wiederholte Reize gebahnten Hitzeschockantwort und ihrer essentiellen Notwendigkeit für die Toleranzentwicklung angegriffen.

Die parallel mittels Durchflußzytometrie durchgeführte Untersuchung von Monozyten und Lymphozyten auf induzierte Expression der HSP ergab zwar kaum Unterschiede zwischen TR und UT, Konzentrationsanstiege waren nach Hitzestimulation jedoch deutlich erkennbar [Fehrenbach et al 2003, Waldvogel 2005]. Auch die Vermutung einer, in Lymphozyten relativ geringen HSP70-Expression konnte durch differenzierte Betrachtung der Subpopulationen auf Proteinebene erneut belegt werden. Die Tatsache eines in PBMC trainierter und untrainierter Personen gleichermaßen stattfindenden Anstieges der Proteinsynthese steht nun einer unterschiedlichen mRNA Expression gegenüber. Ursächlich könnte hier eine, bei regelmäßigem Ausdauertraining stattfindende Ökonomisierung der Translation beteiligt sein, sodass weniger mRNA für die Synthese einer größeren Proteinmenge ausreicht [Fehrenbach et al 2003, Waldvogel 2005].

Auch im Muskel des hoch trainierten Ruderers ruft eine akute Trainingsbelastung keinen Anstieg von HSP72 hervor. Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene. Dies weist ebenfalls auf eine trainingsbedingte Adaptation hin [Nething et al 2004]

Das Ergebnis einer, bei trainierten Ausdauersportlern abgeschwächten Hitzeschockantwort gilt aufgrund der ausschließlichen Untersuchung männlicher Probanden nicht ohne weiteres für die Gesamtbevölkerung. Ein Grund dafür ist das, im weiblichen Organismus ungleich höhere Östrogenvorkommen. Zumindest für Muskelgewebe sind Interaktionen des möglicherweise antioxidativ wirksamen Hormons mit HSP70 bekannt [Tiidus 1995; Bar et al 1997]. Im Herzmuskel der Ratte ließ sich neuerdings eine direkte Hemmung belastungsvermittelter HSP72-Expression durch Östrogene nachweisen [Paroo et al 2002]. Verantwortlich für diesen Effekt ist vermutlich

eine membranstabilisierende und damit, für die Zelle stressreduzierende Östrogenwirkung [Wiseman 1994]. Auch HSP27 zeigt Interaktionen mit Östrogen, wobei das Hormon hier einen induzierenden Effekt hat. Im Promotorabschnitt von HSP27 findet sich auch tatsächlich ein östrogen-responsiver Abschnitt [Hickey et al 1986; Locke 1997].

5.3.2 Hänoxigenase-1

Auf mRNA-Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene [Fehrenbach et al 2003, Waldvogel 2005] erfuhr die HO-1 ebenfalls einen Expressionsanstieg infolge der zweistündigen Hitzeapplikation in vitro (Abb.15). Auch hier war der Effekt bei untrainierten Probanden deutlicher ausgeprägt. In PBMC nachgewiesene mRNA stammt vermutlich größtenteils aus Monozyten. Das Enzym ist zwar auch in Lymphozyten nachweisbar, liegt dort jedoch in geringerer Menge vor [Niess 1999 b].

Expressionsanstiege infolge Hitzeschock können ihre Ursache in einer in vitro stattfindenden partiellen Hämolyse und damit verbundener Freisetzung der Induktoren Häm und Eisen haben [Galbraith 1999]. Ersteres stellt neben seinem Derivat Hämin einen der potentesten Induktoren der HO-1 dar [Clark et al 2000; Galbraith 1999; Okinaga et al 1996; Shibahara et al 1989]. Freies Eisen stellt (wie bereits in Kap. 5.1 erläutert) über die Fenton Reaktion außerdem eine Quelle für die besonders toxischen, weil nicht vom Körper inaktivierbaren Hydroxylradikale dar. Fe^{2+} reagiert mit H_2O_2 zu Fe^{3+} , $\text{OH}\cdot$ und OH^- [Fenton 1894]. Bei, mit partieller Hämolyse verbundenen Belastungen, wie zum Beispiel Langstreckenlauf, kommt es in vivo unter anderem zu einem gesteigerten Angebot an Häm und freiem Eisen [Heine 1995]. Trainierte Ausdauersportler haben deshalb vermutlich auch hier Kompensationsmechanismen entwickelt, welche sich auf mRNA-Ebene in einer geringeren HO-1-Expression widerspiegeln können. Eine Unterdrückung der HO-1-Expression ist in vitro ebenfalls mittels antioxidativ wirksamer Substanzen möglich [Okinaga et al 1996]. Auch zeigen HO-1-positive Leukozyten in Stresssituationen eine verbesserte Überlebensrate [Kurata et al 1996].

In vitro sind außerdem Zytokinfreisetzung und konsekutive HO-1 Expression denkbar. Die direkte Aktivierung des zugehörigen Heat shock elementes, wie sie der Transkription von, für HSP27 und HSP70 kodierenden Abschnitten vorangeht ist zwar in Geweben der Ratte [Raju et al 1994], nicht jedoch beim Menschen nachgewiesen [Okinaga et al 1996]. Die Induktion in Zellen des humanen Makrophagensystems allein durch Hitze wird daher kontrovers diskutiert [Okinaga et al 1996]. Für trainingsabhängige Differenzen der Expressionsanstiege können, angesichts der ebenfalls stressmindernden Eigenschaften von HSP32 trotzdem ähnliche Ursachen eine Rolle spielen, wie sie zur Erklärung der HSP-Expression herangezogen werden.

5.4 Stimulation isolierter PBMC mit LPS und Zytokinen oder PMA: Analyse der iNOS-Expression

Eine semiquantitative Analyse der induzierbaren Stickstoffoxidsynthase (iNOS) nach Hitzeschock der mononukleären Zellen ergab weder hinsichtlich einer Reaktion der Zellen auf die Überwärmung, noch in Bezug auf Differenzen zwischen TR und UT ein signifikantes Ergebnis (Abb. 18). Über eine Induktion der iNOS durch Hitzeschock wird zwar berichtet [Goldring et al 2000], das als Costimulator eingesetzte LPS spielt in der erwähnten Studie jedoch womöglich eine größere Rolle, als der thermische Reiz.

Interessanter sind Ergebnisse der Stimulation mit LPS und Zytokinen. Auf allen Ebenen (Transkription, Translation, Enzymaktivität und NO-Synthese) ist die Regulation der iNOS äußerst komplex [Bogdan 2000; Lincoln 1997; Hecker et al 1996]. Allein in Bezug auf Rückkoppelungsmechanismen sind sowohl negative, als auch positive Feedbackmechanismen bekannt [Bogdan 2001]. Zwar hängt dies teilweise von Art und Stärke des Reizes ab [Bogdan 2001], in der vorliegenden Untersuchung zeigten sich jedoch zusätzlich interindividuelle Unterschiede der Probanden bezüglich der iNOS-Expression. Dennoch lässt die Betrachtung der Mittelwerte beider Gruppen (TR und UT) eine möglicherweise trainingsbedingte Alteration der iNOS Expression erkennen (Abb. 20).

Der semiquantitative Vergleich der basalen iNOS mRNA ergab in der vorliegenden Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abb. 10). Eine, an Gesamtleukozyten durchgeführte Analyse von Niess et al ergab jedoch bei trainierten Probanden weniger, für iNOS kodierende mRNA, als dies bei untrainierten Personen der Fall war [Niess 2002 b]. Auch die bereits erwähnte Minderung der spontanen RNS- und ROS-Produktion phagozytierender Zellen [Blannin et al 1996; Pyne et al 2000; Smith et al 1997] lässt eine Drosselung der iNOS Expression bei trainierten Personen sinnvoll erscheinen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse in PBMC und Gesamtleukozyten lassen sich womöglich durch einen besonders ausgeprägten Effekt von Ausdauertraining auf neutrophile Granulozyten erklären.

Stimulieren lässt sich die iNOS Expression in vitro unter anderem durch LPS und einige Zytokine (Interferon- α , - β , - γ , Interleukine, TNF) und den Phorbol-ester Phorbolmyristatazetat (PMA), wobei letztere mit Hilfe der Proteinkinase-C (PKC) effektiv werden [Kroencke et al 1995; Simmons et al 1994; Tabakman et al 1998].

Bakterielles Lipopolysaccharid verursacht über den Toll-like Rezeptor 4 Signale, die den Transkriptionsfaktor NF κ B aktivieren.

LPS wird von löslichem LPS bindendem Protein (LBP) gebunden. Dieser Komplex aktiviert CD14 auf der Membranoberfläche von Makrophagen wodurch Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) dazu veranlasst wird, ein Signal an den Zellkern zu geben, sodass der Transkriptionsfaktor NF κ B stimuliert wird, der schliesslich Gene der Infektionsabwehr aktiviert [Janeway et al.2001].

Eine Kombination von Stimulantien verspricht bei der Induktion die größten Erfolge [Takeichi et al 1998; Tsukahara et al 2001; Bogdan 2001; Lorsbach et al 1993]. Die Liste der beteiligten Transkriptionsfaktoren ist recht lang und beinhaltet unter anderem den Nuklearen Faktor Kappa-B (NF- κ B) und Aktivator Protein-1 (AP-1) [Bogdan 2001]. Beides sind auch auf oxidativen Stress reagierende Aktivatoren von Proliferation und Synthesetätigkeit der Zelle

[Fehrenbach et al 2001 a]. Das heterodimere NF- κ B-Protein liegt im Cytosol in Bindung an den Inhibitor I κ B vor. Applizierte Stimuli - unter anderem oxidativer Stress [Kröncke et al 1995] oder TNF- α - führen zu einer Veränderung von I κ B, was die Dissoziation des Komplexes, den Abbau von I κ B und die Translokation von NF- κ B in den Zellkern auslöst [Grimm et al 1993]. NO selbst kann in niedrigen Konzentrationen im Sinne eines positiven Feedback zu einer Aktivierung von NF- κ B und Expression der iNOS führen [Umansky et al 1998; Sheffler et al 1995]. Dieser Effekt kehrt sich jedoch sowohl bei zu großem oxidativem Stress [Arrigo 1999; Sen 2000] als auch bei einer übersteigerten NO-Produktion [Connelly et al 2001] um, sodass die daraus resultierende geminderte Effektivität von NF- κ B schließlich zu einer Drosselung der iNOS-Transkription führt [Fehrenbach et al 2001 a].

In humanen mononukleären Zellen der ausdauertrainierten Gruppe TR ließ sich im Gegensatz zur untrainierten Kontrollgruppe die iNOS Expression mit LPS und Zytokinen anregen (Abb. 20; Abb. 22; Abb. 24). Der Mittelwert der Expressionsanstiege lag bei den, nicht spezifisch trainierten Probanden etwa bei Null . Einen Anstieg der iNOS Expression zeigten jedoch die Zellen der trainierten Probanden (Abb. 20 und 22). Dies lässt auf eine, mit Ausdauertraining korrelierte Steigerung der Reagibilität mononukleärer Zellen beim Menschen schließen, was mit der von Woods et al bei trainierten Nagetieren gemachten Beobachtung einer gesteigerten Reagibilität von Makrophagen auf Stimulation mit LPS und Zytokinen übereinstimmt [Woods et al 2000].

Ursächlich könnte hier eine trainingsbedingt vermehrte Zytokinexposition eine Rolle spielen. Bei körperlicher Ausdauerbelastung und so auch beim Training kommt es zu Konzentrationsanstiegen einiger Zytokine [Northoff et al 1994].

Diese Zytokinanstiege führen zu einer Aktivierung der phagozytierenden Zellen. Bei regelmäßigem, intensivem Training kommt diese Situation häufiger vor. Angesichts der Bedeutung einer raschen NO-Produktion für die Immunabwehr erscheint eine erleichterte Induktion der iNOS-Expression sinnvoll.

5.4.1 Altersabhängigkeit, Subpopulationen der Leukozyten und andere Begleitvariablen

Eine negative Korrelation der Expressionsanstiege mit dem Alter der Probanden, wie sie bei Versuchstieren beobachtet wird [Woods et al 2000], ließ sich bei der hier untersuchten (allerdings jedoch vergleichsweise geringen) Altersspanne nicht feststellen (Abb. 21).

In Übereinstimmung mit Studien von Nieman et al und Woods et al ließen sich im Hinblick auf die Zahl der Leukozyten, sowie deren Subpopulationen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (TR =trainiert und UT= untrainiert) feststellen (Tab. 2) [Nieman et al 1995 a; Woods et al 1999]. Dies betraf auch die Zahl der Neutrophilen Granulozyten, was Ergebnissen einer älteren Studie widerspricht, welche auf geminderte Neutrophilenzahlen bei regelmäßigem Ausdauertraining hinweisen [Blannin et al 1996]. Auch die Bestimmung der relativen Anteile an Lympho-und Monozyten im Blut der Probanden ergab keinen Unterschied zwischen den Gruppen TR und UT. Dies ist insofern ein wichtiger Aspekt, als die Expression der iNOS nur zu geringem Teil in Lymphozyten stattfindet [Bogdan 2001; Niess et al 2000; Lincoln 1997] und dort beim Menschen nur in NK-Zellen nachgewiesen ist [Xiao et al 1995; Lincoln 1997].

Der Frage nach, bei TR und UT unterschiedlichen Reifegraden der Monozyten, wie sie bei chronisch entzündlichen Erkrankungen oder auch im Alter vorkommen [Sadeghi et al 1999; Ziegler-Heitbrock 1996], wurde hier nicht nachgegangen. Dennoch ist eine weitere mögliche Ursache für die, nur bei TR vermehrte Stimulierbarkeit durch LPS und Zytokine das, unter manchen Umständen auftretende, veränderte Verhältnis von reifen und unreifen Monozyten.

Zellen des mononukleären Phagozytensystems bleiben in der Regel nach der letzten Teilung der Vorläuferzelle (Promonozyt) ca. 17 Stunden im Knochenmark, und werden dann in den Blutkreislauf abgegeben, wo sie durchschnittlich 32 h lang als Monozyten verweilen. Nach Erreichen von Bauchhöhle, Lunge oder anderen Organen können sie dort schliesslich über 60 Tage alt werden [Boltz-Nitulescu 1978].

Verschiedene Reifegrade dieser Zellen lassen sich an der anteilmäßig unterschiedlichen Expression der Membranrezeptoren erkennen [Ziegler-Heitbrock 1996]. Bei gesunden, jungen Erwachsenen dominiert mit einem Anteil von 80% die unreife Form. Diese Zellen exprimieren relativ viel CD14 und keine nachweisbare Menge an CD16, welcher für Bindung des konstanten Anteils der schweren Kette der Immunglobuline (Fc γ) zuständig ist. Außerdem wird bei diesen weniger reifen Zellen eine gedrosselte Expression von MHC II neben gesteigerter CD11b- und CD33- Expression und vermehrter IL-10-Produktion beobachtet [Ziegler-Heitbrock et al 1993; Frankenberger et al 1996]. Reifere, phänotypisch den Makrophagen ähnelnde Monozyten tragen dagegen weniger CD14 und mehr CD16. Auch produzieren sie weniger IL-10 und exprimieren mehr MHC II und weniger CD11b und CD33. Zudem zeigen sie eine etwas geringere ROS-Generierung, als weniger reife Monozyten [Ziegler-Heitbrock et al 1993]. Chronische Entzündungen und höheres Alter prädisponieren für einen größeren Anteil an peripheren Monozyten der reiferen Form [Ziegler-Heitbrock 1996; Sadeghi et al 1999]. Andererseits ist eine Vermehrung der weniger reifen Vorstufen durch akute, anaerobe sportliche Belastung beschrieben [Steppich et al 2000].

Bedenkt man nun den Einfluss von Ausdauerbelastungen auf hormonale und zytotaktische Faktoren und deren potentielle Wirkung auf Reifung und Ausschwemmung der Immunzellen, scheint eine alterierten Verteilung der Reifegrade bei Trainierten Personen denkbar.

Physische Stressmomente wie z.B. Infektionen, Traumata oder ungewohnt hohe Trainingsbelastungen kurze Zeit vor dem Versuchstag wurden sowohl anamnestisch, als auch labortechnisch weitgehend ausgeschlossen. Die Plasmaspiegel von Kreatinkinase, Cortisol, C-reaktivem Protein und Harnstoff lagen bei beiden Gruppen durchgehend im Normbereich. Außerdem zeigten sich diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen TR und UT (Tab. 3).

5.4.2 Mögliche Einflüsse der Verarbeitung in vitro

Angesichts der bereits erwähnten Hemmung der iNOS-Transkription durch einen gesteigerten prooxidativen Zustand muss die mögliche Entstehung eines solchen Zustandes im Zuge der Stimulation in Erwägung gezogen werden. Sowohl Basalwerte, als auch Expressionsanstiege können allein durch Manipulation der Zellen beeinflusst werden. Im Gegensatz zum Hitzeschock fand die Stimulation mit LPS und Zytokinen nach Isolierung der PBMC aus Vollblut über einen Dichtegradienten statt. Die zahlreichen Zentrifugations- und Schüttelschritte können allein bereits als Stressoren agieren.

Außerdem ist zumindest für neutrophile Granulozyten eine iNOS-Anreicherung nach Adhäsion an Fremdoberflächen nachgewiesen [Webb et al 2001]. Nach dem Isolationsprozess verblieben die Negativkontrollen ebenfalls für drei Stunden bei 37°C in Kunststoffröhrchen. Die Andeutung einer gesteigerten basalen iNOS-Expression bei UT ließe sich auch durch eine größere Stresssensibilität dieser Zellen im Vergleich zu denen trainierter Personen erklären. Im Falle der Stimulation mit LPS und Zytokinen erreichte möglicherweise der toxische Einfluss dieser Stoffe bei UT bereits teilweise einen transkriptionshemmenden Grad, wozu es jedoch in den Zellen von TR dank der bereits erwähnten antioxidativen Systeme nicht kommen konnte.

Gegen diese These und für einen Einfluss des trainingsbedingten, wiederholten Kontaktes der Zellen mit LPS und Zytokinen spricht jedoch ein weiteres Ergebnis dieser Studie: Bei Stimulation mit PMA zeigten sich interessanterweise bezüglich der Reaktion der Zellen (entsprechend den Ergebnissen der Hitzestimulation (Abb.18)) keinerlei Unterschiede zwischen TR und UT (Abb.23). Neben der Stimulation mit LPS und Zytokinen wurde ein Teil der isolierten PBMC der Inkubation mit einem Phorbolster (PMA) ausgesetzt. PMA führt intrazellulär zur Entstehung von oxidativem Stress (oxidative burst) [Gabriel et al 1994] und kann ebenfalls über Aktivierung von NF-κB [Park et al 2002] die iNOS-Expression induzieren [Simmons et al 1994; Park et al 2002; Tabakman et al 1998]. Die Signaltransduktion betreffende Unterschiede der Stimulation durch PMA von derjenigen durch LPS sind teilweise jedoch auch bekannt. So kann die Induktion der iNOS durch LPS möglicherweise auch PKC-

unabhängig, mittels einer Thyrosinkinase ablaufen [Kwon et al 1997; Simmons et al 1994].

5.4.3. Ausblick

Das differierende Expressionsverhalten der iNOS (im Sinne einer Stimulierbarkeit durch LPS und Zytokine nur bei TR) lässt sich nicht eindeutig durch die in der Regel gesteigerte Aktivität reduzierender Systeme bei ausdauertrainierten Personen erklären. So spricht die indifferente Reaktion auf PMA- und Hitzestimulation dagegen. Aber auch Berichte über eine Unterdrückung der iNOS-Expression durch Antioxidantien in vitro stehen im Gegensatz zu den beobachteten Expressionsanstiegen bei TR [Hecker et al 1996].

Wie bereits erwähnt kann die, aus PBMC isolierte, für iNOS kodierende mRNA aus Monozyten oder den ebenfalls durch LPS aktivierbaren Natural Killer (NK)-Zellen stammen [Brigl et al 2003; Weinberg et al 1995; Xiao et al 1995]. Obwohl letztere zu den Lymphozyten gehören, sind sie zu unspezifischer Zytotoxizität, ohne vorangehende Antigenpräsentation fähig.

Neben einer Beeinflussung durch akute Belastung zeigen NK-Zellen trainierter Athleten auch in Ruhe eine gesteigerte Abwehrfunktion [Nieman et al 1995 a u. b; Pedersen et al 1989]. Der relative Anteil dieser Zellen an den untersuchten PBMC ist jedoch verglichen mit dem der Monozyten recht gering. Eine Beeinflussung des Ergebnisses im Sinne einer, auch in diesen Zellen bei TR stattfindenden iNOS-Induktion ist wahrscheinlich, obwohl auf Proteinebene in der Lymphozytenpopulation an den untersuchten Zeitpunkten keine Stimulationseffekte festgestellt wurden [Waldvogel 2005]

Eine wichtige Aufgabe des im Immunsystem produzierten NO liegt in der Abwehr entarteter Zellen. Wachstumshemmung und Induktion des Absterbens von Tumorzellen durch Makrophagen waren sogar die ersten, im Immunsystem entdeckten Funktionen von Stickoxid [Bogdan 2001; Nathan 1992]. Für, in Makrophagen und eosinophilen Granulozyten produziertes NO wurden in vitro inzwischen zahlreiche verschiedene Mechanismen der Inhibition von Tumorwachstum nachgewiesen [Bogdan 2001]. Zu diesen zählt unter anderem

eine Apoptoseinduktion, oder die Hemmung lebenswichtiger Enzyme in entarteten Zellen [Bogdan 2000; Bauer et al 2001]. Außerdem kann sowohl eine Ausschaltung der für iNOS kodierenden Gene, als auch eine unterdrückte Expression derselben in Korrelation mit geminderter Tumorabwehr beobachtet werden [DiNapoli et al 1996; Hung et al 1998].

Bei Nagetieren wurde in der Folge von Ausdauertraining eine gesteigerte Tumorabwehr beobachtet [Woods et al 2000]. Eine direkte Übertragung dieser Untersuchungsergebnisse auf den Menschen, ist jedoch nicht ohne weiteres möglich.

Bei Ratten zeigt sich ein Anstieg der iNOS auf Proteinebene. Im Gegensatz dazu ergibt beim Menschen die Analyse mittels Durchflusszytometrie keine signifikanten Anstiege iNOS positiver Zellen oder ihrer mittleren Fluoreszenzintensität [Waldvogel 2005]. Dies könnte durch die beim Menschen vergleichsweise strengere Kontrolle und Regulation der Translation bedingt sein [Kröncke 1995]. Auch müssen (bei Mensch und Ratte) mögliche Unterschiede zwischen Makrophagen und ihren unreifen Vorstufen, den Monozyten in Betracht gezogen werden [James 1995].

Für einen Zusammenhang von körperlicher Fitness, sportlicher Tätigkeit oder früherem, trainiertem Zustand mit verminderter Inzidenz- und/oder Mortalitätsrate einiger Krebserkrankungen gibt es zahlreiche Belege [Woods 1998]. Besonders für Kolonkarzinome und östrogenabhängige Neoplasien weiblicher Geschlechtsorgane scheint dieser Zusammenhang zu gelten [Thune 2001]. Allerdings ist hier nicht sicher, welcher, mit Training verbundene Faktor tatsächlich das positive Resultat bewirkt. Denkbar sind unter anderem auch hormonelle Einflüsse [Woods 1998], oder eine andere Kausalität im Sinne einer gemeinsamen Ursache für sportliche Aktivität und Tumorresistenz. In weiteren empirischen Studien wurden bei „Krebs-Überlebenden“ Einflüsse von körperlichem Training auf für die Tumorabwehr spezifische Funktionen des Immunsystems untersucht, wobei in 4 von 6 Untersuchungen eine gesteigerte Effektivität jener Abwehrsysteme beobachtet werden konnte [Fairey 2002]. Sowohl eine erhöhte Phagozytosekapazität peripherer Monozyten [Peters 1995], als auch verstärkte zytolytische Aktivität von NK-Zellen [Peters et al

1994; Na et al 2000] lassen sich nach Ausdauertraining beobachten. Leider fehlt in letzteren Studien jedoch bisher die Untersuchung einer Auswirkung von Training und Abwehrfunktionen auf Verlauf und Prognose der Erkrankungen [Fairey 2002].

6. Zusammenfassung

Training bedeutet die ständige Wiederholung einzelner Belastungen, auf welche der Organismus mit Anpassung reagiert. Zweck der Adaptationsprozesse ist eine Ökonomisierung des unbeschadeten Umganges mit diesen, das Gleichgewicht bedrohenden Reizen. Nahezu alle Organsysteme und Funktionsabläufe werden bei Ausdauersport, wie Langstreckenlauf oder Radfahren beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurden Einflüsse umfangreichen und intensiven Ausdauertrainings auf Funktionen des Immunsystems und zwar speziell auf die Expression von Hitzeschockproteinen und induzierbarer NO-Synthase (iNOS) in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) untersucht.

Periphere mononukleäre Zellen ausdauertrainierter, männlicher Personen (TR) reagieren anders auf, *in vitro* applizierte Reize, als Zellen untrainierter Probanden (UT).

Im Falle der Hitzeschockreaktion zeigte sich bei semiquantitativem Vergleich der mRNA ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen TR und UT bezüglich der reaktiven Expression der Hitzeschockproteine.

Die beobachtete, vergleichsweise geringere HSP-Expression bei TR lässt auf eine erworbene Toleranz der Zellen schließen. Repetitive Ausdauerbelastungen hatten möglicherweise unter anderem durch die, damit verbundenen erhöhten Körpertemperaturen zu langfristigen, intrazellulären Veränderungen geführt, wodurch der Hyperthermiereiz an Potential und stressendem Einfluss auf Zellen der trainierten Gruppe verlor. Statistisch signifikant ($p < 0,05$) war in vorliegender Studie die, mittels semiquantitativer RT-PCR festgestellte, geringere Expression von HSP27, HSP72, und HO-1 in PBMC ausdauertrainierter Probanden.

Bei Stimulation der mononukleären Zellen mittels Lipopolysaccharid (LPS), TNF- α und INF- γ zeigten die Zellen von UT und TR bezüglich der iNOS-Expression auf mRNA-Ebene ebenfalls signifikante Unterschiede im Expressionsverhalten. Applikation von Phorbolmyristatazetat (PMA) oder Hitzeschock jedoch vermochten in PBMC keine signifikante Steigerung der

Mittelwerte, bzw. 95% Konfidenzintervalle zu induzieren. Ganz zu schweigen von signifikanten, gruppenspezifischen Differenzen.

Für die, bei TR signifikant gesteigerte, mittels semiquantitativer RT-PCR erfassbare Induktion der iNOS durch LPS und Zytokine kommen einige Ursachen infrage. Anders verteilte Reifegrade, beziehungsweise unterschiedliche Rezeptorausstattung besonders der Monozyten oder eine Konditionierung der Zellen durch trainingsbedingte Zytokin-Exposition können hier unter anderem eine kausale Rolle spielen.

Die zeitgleich durchgeführte Expressionsanalyse auf Proteinebene zeigte sowohl für Hitzeschockproteine, als auch für die induzierbare NO-Synthase weitaus geringere Unterschiede zwischen TR und UT. Deshalb muss außerdem die Funktion weiterer, die Regulation von sowohl Transkription als auch Translation betreffender Feedback-Mechanismen vorhanden sein.

Ein Zusammenhang des beobachteten Expressionsmusters der PBMC mit, nach regelmäßigem Training langfristig alteriertem Abwehrverhalten von Monozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie einem veränderten Immunstatus der Athleten erscheint denkbar.

7. Verzeichnis der Abkürzungen

µl	Mikroliter
2D	2 dimensional
a. bidest	bidestilliertes Wasser
a.u.	arbitrary unit
Abb	Abbildung
AIDA	Advanced Image Data Analyzer
BMI	Body Mass Index
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementäre DNA
d.h.	das heißt
DIANA	Digital Image Analyzer
Diff	Differenzen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab	Antigen bindende Fraktion der Immunglobuline
Fc	constant Fraction (nicht variierender Teil von Immunglobulinen)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GC	Guanin-Cytosin
h	Stunden
HO	Hämoxigenase
HSE	Heat shock element
HSF	Heat shock faktor
HSP	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin-G
IL	Interleukin

iNOS	induzierbare Stickoxidsynthese
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LW	Leerwert
M	molar
MACS	Magnetic Antibody Cell Separation
Min	Minuten
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
ng	Nanogramm
NH ₄	Natriumheparin
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
p	probability /Wahrscheinlichkeit
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
RNase	Ribonuklease
RNS	Reactive Nitrogen Species (freie Stickstoffradikale)
ROS	Reactive Oxygen Species (freie Sauerstoffradikale)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunden
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tiff	tagged image file format
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett

8. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1	β -Aktin-mRNA-Expression in PBMC in Abhängigkeit von der Stimulationsart
Abbildung 2	Zyklentest iNOS
Abbildung 3	Zyklentest HSP27
Abbildung 4	Zyklentest HSP72
Abbildung 5	Zyklentest HO-1
Abbildung 6	Zyklentest β -Aktin
Abbildung 7	Relative HSP27-mRNA-Expression in unstimulierten PBMC
Abbildung 8	Relative HSP72-mRNA-Expression in unstimulierten PBMC
Abbildung 9	Relative HO-1-mRNA-Expression in unstimulierten PBMC
Abbildung 10	Relative iNOS-mRNA-Expression in unstimulierten PBMC
Abbildung 11	Einfluss der Hitzestimulation auf die relative HSP27-mRNA Expression
Abbildung 12	Einfluss der Hitzestimulation auf die relative HSP27-mRNA Expression. Darstellung mit logarithmierten Werten
Abbildung 13	Abhängigkeit der Stimulierbarkeit von HSP27 vom Trainingszustand in beiden Gruppen
Abbildung 14	Einfluss der Hitzestimulation auf die relative HSP72-Expression
Abbildung 15	Einfluss der Hitzestimulation auf die Expression der HO-1
Abbildung 16	Einfluss der Hitzestimulation auf die Expression der HO-1. Darstellung mit logarithmierten Werten
Abbildung 17	Abhängigkeit der Stimulierbarkeit der HO-1 vom Trainingszustand in beiden Gruppen
Abbildung 18	Einfluss der Hitzestimulation auf die Expression der iNOS
Abbildung 19	Beispiel Eines Agarosegels. Einfluss der Hitzestimulation
Abbildung 20	Einfluss der Stimulation mit LPS und Zytokinen auf die iNOS-Expression
Abbildung 21	Abhängigkeit der Reaktion auf Stimulation mit LPS und

- Zytokinen vom Alter des Probanden
- Abbildung 22 Abhängigkeit der Reaktion auf die Stimulation mit LPS und Zytokinen vom Trainingszustand in beiden Gruppen
- Abbildung 23 Einfluss der Stimulation mit PMA auf die iNOS-Expression
- Abbildung 24 Ausschnitt eines Agarosegels: zwei trainierte und zwei untrainierte Probanden

9. Literaturverzeichnis

1. Armstrong L.E., Maresh C.M. (1998) Effects of Training, Environment, and Host Factors on the Sweating Response to Exercise. *Int. J. Sports Med.* 19: 103-105
2. Arrigo A.B. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 936-944
3. Asami S., Hirano T., Yamaguchi R., Itoh H., Kasai H. (1998) Reduction of 8-hydroxyguanine in human leukocyte DNA by physical exercise. *Free Radic. Res.* 29: 581-584
4. Asea A., Kraeft S.-K., Kurt-Jones E.-A., Stevenson M.-A., Chen L.B., Finberg R.W., Koo G.C., Calderwood S.K. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature Med.* 6 (4): 435-442
5. Ashton T., Rowlands C.C., Jones E., Young I.S., Jackson S.K., Davies B., Peters J.R. (1998) Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 77: 498-502
6. Asmus K.-D., Bonifacic M. (2000) Free radical chemistry. In Sen C.K., Packer L., Hanninen O. eds., *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise.* Amsterdam, Elsevier: 3-54
7. Bar P.R., Amelink G.J. (1997) Protection against muscle damage exerted by oestrogen: hormonal or antioxidant action? *Biochem. Soc. Trans.* 25: 50-54
8. Barnes P.J., Liew F.Y. (1995) Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunology today* 16: 128-130
9. Bauer P.M., Buga G.M., Fukuto J.M., Pegg A.E., Ignarro L.J. (2001) Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 276(37): 34458-34464
10. Belanger S., Lavoie J.C., Chessex P. (1997) Influence of bilirubin on the antioxidant capacity of plasma in newborn infants. *Biology of the Neonate* 71: 233-238
11. Bellavite P. (1988) The superoxide-forming enzymatic system of phagozytes. *Free Rad. Biol. Med.* 4: 225-261
12. Bellavite P. (1988) The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Rad. Biol. Med.* 4: 225-261
13. Benoni G.P., Bellavite A., Adami A., Chirumbolo S., Lippi G., Brocco G., Cuzzolin L. (1995) Effect of acute exercise on some haematological parameters and neutrophil functions in active and inactive subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 70: 187-191
14. Benzi G. (1993) Aerobic performance and oxygen free radicals. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 33: 205-222
15. Berg A., Northoff H., Keul J. (1992) Immunologie und Sport. *Internist* 33: 169-178
16. Blannin A.K., Chatwin L.J., Cave R., Gleeson M. (1996) Effects of submaximal cycling and long-term endurance training on neutrophil

- phagocytic activity in middle aged men. *Br. J. Sports Med.* 30(2): 125-129
17. Bogdan C. (1998) The multiplex function of nitric oxide in (auto)immunity. *J. Exp. Med.* 187: 1361-1365
 18. Bogdan C. (2000) The function of nitric oxide in the immune system. In *Handbook of Experimental Pharmacology. Volume: Nitric Oxide: 443-492*
 19. Bogdan C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* : 907-916
 20. Boltz-Nitulescu G. (1978) Makrophagen. *Naturwissenschaftliche Rundschau* 31(8): 319-329
 21. Borger D.R., Essig D.A. (1998) Induction of HSP32 gene in hypoxic cardiomyocytes is attenuated by treatment with N-acetyl-L-cysteine. *Am. J. Physiol.* 274: H965-973
 22. Bosenberg A.T., Brock-Utne L.G., Gaffin S.L., Wells M.T.B. (1988) Strenuous exercise causes systemic endotoxemia. *J. Appl. Physiol.* 65: 106-108
 23. Boveris A., Chance B. (1973) The mitochondrial generation of nitrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-716
 24. Brenner I.K.M., Shek P.N., Shepard R.J. (1994) Acute Infections and Exercise. *Sports Med.* 17: 86-107
 25. Brigl M., Bry L., Kent S.C., Gumperz J.E., Brenner M.B. (2003) Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat. Immun.* 4 (12): 1230-1237
 26. Bury T.B., Louis R., Radermecker M.F., Pirnay F. (1996) Blood Mononuclear Cells Mobilisation and Cytokines Sekretion During Prolonged Exercises. *Int. J. Sports Med.* 17: 156-160
 27. Clark J.E., Foresti R., Green C.J., Motterlini R. (2000) Haem oxygenase-1-derived bilirubin and cytoprotection. *Biochem. J.* 615-619
 28. Coker G.T., Studelska D., Harmon S., Burke W., O'Malley K.L. (1990) Analysis of tyrosine hydroxylase and insulin transcripts in human neuroendocrine tissues. *Mol. Brain Res.* 8: 93-98
 29. Connelly L., Palacios-Calender M., Ameixa C., Moncada S., Hobbs A.J. (2001) Biphasic regulation of NF- κ B- Aktivity underlies the pro- and anti-inflammatory aktions of nitric oxide. *J. Immunol.* 166: 3873-3881
 30. Creagh E.M., Sheehan D., Cotter T.G. (2000) Heat shock proteins – modulators of apoptosis in tumor cells. *Leukemia* 14: 1161-1173
 31. Davis J.M., Davis J.M., Kohut M.L., Jackson D.A., Colbert L.H., Mayer E.P., Ghaffar A. (1997) Exercise, alveolar macrophage function and susceptibility to respiratory infection. *J. Appl. Physiol.* 83: 1461-1466
 32. Davis J.M., Kohut M.L., Jackson D.A., Hertler-Colbert L.M., Mayer E.P., Ghaffar A. (1998) Exercise effects on lung tumor metastases and in vitro alveolar macrophage anti-tumor cytotoxicity. *Am. J. Physiol.* 274: R1454-1459
 33. De La Fuente M., Martin M.I., Ortega E. (1990) Changes in the phagocytic function of peritoneal macrophages from old mice after strenuous physical exercise. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 13:

189-198

34. DiNapoli M.R., Calderon C., Lopez D. (1996) The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduced expression of the inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 183: 1323-1229
35. Essig D.A., Borger D.R., Jackson D.A. (1997) Induction of heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA in skeletal muscle following contractions. *Am. J. Physiol.* 272: C59-67
36. Essig D.A., Nosek T.M. (1997) Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can. J. Appl. Physiol.* 22: 409-428
37. Evans W.J., Meredith C.N., Cannon J.G., Dinarello C.A., Frontera V.A., Huges B.H., Knuttgen H.G. (1986) Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. *J. Appl. Physiol.* 61: 1864-1868
38. Evelo C.T.A., Palmen N.G.M., Artur Y., Janssen G.M.E. (1992) Changes in blood glutathion concentrations, and in erythrocyte glutathione reductase and glutathione-S-transferase activity after running training and after participation in contests. *Eur. J. Appl. Physiol.* 64: 354-358
39. Fairey A.S. (2002) Physical exercise and immune system function in cancer survivors: a comprehensive review and future directions. *Cancer* 94(2): 539-551
40. Febbraio M.A., Steensberg A., Walsh R., Koukoulas I., Hall van G., Saltin B., Pedersen B.K. (2002) Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle. *J. of Phys.* 538.3: 911-917
41. Fehr H.G., Lotzerich H., Michna H. (1988) Influence of physical exercise on peritoneal macrophage functions: Histochemical and phagocytic studies. *Int. J. Sports Med.* 9: 77-81
42. Fehr H.G., Lotzerich H., Michna H. (1989) Human macrophage function and physical exercise: Phagocytic and histochemical studies. *Eur. J. Appl. Physiol* 58: 613-617
43. Fehrenbach E., Niess A.M. (1999) Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exerc. Immunol. Rev.* 5: 57-77
44. Fehrenbach E., Niess A.M., Schlotz E., Passek F., Dickhuth H.-H., Northoff H. (2000 a) Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes. *J. Appl. Physiol.* 89(2): 704-710
45. Fehrenbach E., Niess A.M., Veith R., Dickhuth H.-H., Northoff H. (2001 a) Changes of HSP72-expression in leukocytes are associated with adaptation to exercise under conditions of high environmental temperature. *J. Leukoc. Biol.* 69: 747-754
46. Fehrenbach E., Niess A.M., Vogel M., Waldvogel I., Dickhuth H.-H., Northoff H. (2003) The training-regulated heat shock response differs between heat shock proteins HSP27 /HSP72/ HO-1 and expression level. *BISP Band 04 Jeschke D., Lorenz R. Hrsg. S. 53-57*
47. Fehrenbach E., Northoff H. (2001 b) Free radicals, exercise, apoptosis and heat shock proteins. *Exerc. Immunol. Rev.* 7: 66-89
48. Fehrenbach E., Passek F., Niess A.M., Pohla H., Weinstock C.,

- Dickhuth H.-H., Northoff H. (2000 b) HSP-expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32(3): 592-600
49. Fenton H.J.H. (1894) Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc* 65: 899-910
50. Fitzgerald L. (1991) Overtraining Increases the Susceptibility to Infection. *Int. J. Sports Med.* 12(1): 5-8
51. Forner M.A., Collazos M.E., Barriga C., De La Fuente M., Rodriguez A.B., Ortega E. (1994) Effect of age on adherence and chemotaxis capacities of peritoneal macrophages. Influence of physical activity stress. *Mech Ageing Dev.* 75: 179-189
52. Frankenberger M., Sternsdorf T., Pechumer H., Pforte A., Ziegler-Heitbrock H.W.L. (1996) Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: A polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87: 373-377
53. Gabriel H., Muller H.J., Urhausen H., Kindermann W. (1994) Suppressed PMA-induced oxidative burst and unimpaired phagocytosis of circulating granulocytes one week after a long endurance exercise. *Int. J. Sports Med.* 15: 441-445
54. Gabriel H., Urhausen A., Kindermann W. (1992) Mobilisation of circulating leukocyte and lymphocyte subpopulations during and after short, anaerobic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 65: 164-170
55. Galbraith R. (1999) Heme Oxygenase: Who needs it? *P.S.E.B.M.* 222: 299-305
56. Gardner M.J., Altman D.G. (1986) Confidence intervals rather than P values: estimation rather than hypothesis testing. *Brit. Med. J.* 292: 746-750
57. Gardner M.J., Altmann D.G. (1986) Confidence intervals rather than P values: estimation rather than hypothesis testing. *Brit. Med. J.* 292: 746-750
58. Gilliland G., Perrin S., Blanchard K., Bunn H. F., (1990) Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detektion and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2725-2729
59. Gleeson M. (1998) Temperature Regulation During Exercise. *Int. J. Sports Med.* 19: 96-99
60. Gleeson M. (2000) Mucosal immunity and respiratory illness in elite athletes. *Int. J. Sports Med.* 21: 33-43
61. Goldring C.E.P., Reveneau S., Chantome A., Pance A., Fleury C., Hume D.A., Sester D., Mignotte B., Jeannin J.F. (2000) Heat shock enhances transcriptional activation of the murine-inducible nitric oxide synthase gene. *FASEB J.* 14: 2393-2395
62. Gormann A.M, Heavey B., Creagh E., Cotter T.G., Samali A. (1999) Antioxidant mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 445(1): 98-102
63. Grimm S., Bäuerle A. (1993) The inducible transcription factor NF- κ B: structure-function relationship of ist protein subunits. *Biochem. J.* 290: 297-308
64. Guarnieri C., Melandri G., Caldarera I., Cervi V., Semprini F., Branzi A.

- (1992) Spontaneous superoxide generation by polymorphonuclear leukocytes isolated from patients with stable angina after physical exercise. *Int. J. Cardiol.* 37: 301-307
65. Halliwell B. (1994) Free Radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 344: 721-724
66. Halliwell B., Guetteridge J.M.C. (1989) Free radicals in biology and medicine. *Oxford, Clarendon Press*
225. Hamilton K.L., Powers S.K. (2002) Heat shock proteins and reactive oxygen species *Exercise and Stress Response. Boca Raton: CRC Press LLC, Kap 6, IV, B 127-130*
67. Hargreaves M., Febbraio M. (1998) Limits to Exercise Performance in the Heat. *Int. J. Sports Med.* 19: 115-116
68. Hartmann A., Niess A.M. (1998) Oxidative DNA damage in exercise. In: Sen C.K., Packer L., Hanninen O., eds. *Oxidants and Antioxidants in Exercise. Amsterdam: Elsevier: 95-217*
69. Head M.W., Goldman J.E. (2000) Small heat shock proteins, the cytoskeleton, and inclusion body formation. *Neuropathol. and Appl. Neurobiol.* 26: 304-312
70. Hecker M., Preiss C., Klemm P., Busse R. (1996) Inhibition by antioxidants of nitric oxide synthase expression in murine macrophages: role of nuclear factor kappa B and interferon regulatory factor 1. *Br. J. Pharmacol.* 118: 2178-2184
71. Heine O., Dufaux B., Kothe A., Prinz U., Rost R. (1995) Bildung reaktiver Sauerstoffderivate und antioxidativer Schutz unter körperlicher Belastung: Übersicht. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin Sonderheft: 482-493*
72. Hellsten Y. (1994) Xanthine dehydrogenase and purine metabolism in man. *Acta Physiol. Scand.* 151 (621): 8-73
73. Hellsten-Westling Y., Sollevi A., Sjodin B. (1991) Plasma accumulation of hypoxanthine, uric acid and creatine kinase following exhausting runs of differing durations in man. *Eur. J. Appl. Physiol* 62: 380-384
74. Hickey E., Brandon S.E., Potter R., Stein G., Weber L.A. (1986) Sequence and organization of genes encoding the human 27 kDa heat shock protein. *Nucleic Acids Res.* 14: 4127-4145
75. Higuchi M., Cartier L.J., Chen M., Holloszy J.O. (1985) Superoxide Dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J. Gerontol.* 40: 281-286
76. Hirvonen M.-R., Brüne B., Lapetina E.G. (1996) Heat shock proteins and macrophage resistance to the toxic effects of nitric oxide. *Biochem. J.* 315: 845-849
77. Hung K., Hayashi R., Lafond-Walker A., Lowenstein C., Pardoll D., Levitsky H. (1998) The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.* 188(12): 2357-2368
78. Iwaki K., Chi S.H., Dillmann W.H., Mestral R. (1993) Induction of HSP70 in cultured rat neonatal cardiomyocytes by hypoxia and metabolic stress. *Circulation* 87: 2023-2032
79. James S.L. (1995) Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological Reviews* 59: 533-547

80. Janeway C., Travers P., Walport M., Shlomchik M. (2001) Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. 5th edition. *Garland Science an imprint of Taylor&Francis Books, Inc., New York*
81. Kantengwa S., Donati Y.R.A., Clerget M., Maridonneau-Parini I., Sinclair F., Mariéthoz E., Perin M., Rees A.D.M., Slosman D.O., Polla B.S. (1991) Heat shock proteins: an autoprotective mechanism for inflammatory cells? *Seminars in Immunology 3: 49-56*
82. Kanter M.L., Hamlin R.L., Unverferth D.V., Davis H.W., Merola A.J. (1985) effects of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. *J. Appl. Physiol. 59: 1298-1303*
83. Kaufmann S.H. (1990) Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today 11: 129-136*
84. Kellog D. E., Sninsky J.J., Kwok S. (1990) Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem. 189: 202-208*
85. Keyse S.M., Tyrrell R.M. (1997) Both, near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem. 262: 14821-14825*
86. Kilgore J.L., Musch T.I., Ross C.R. (1998) Physical activity, muscle and the HSP70 response. *Can. J. Appl. Physiol. 23: 245-260*
87. Klokke M., Kjaer M., Secher N.H., Hanel B., Worm L., Kappel M., Pedersen B.K. (1995) Natural Killer cell response to exercise in humans: effect of hypoxia and epidural anesthesia. *J. Appl. Physiol. 78: 709-716*
88. Kroencke K.D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. (1995) Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376: 327-343*
89. Kumae T., Yamasaki K., Ishizaki K., Ito T. (1999) Effects of summer camp endurance training on non-specific immunity in long-distance runners. *Int. J. Sports Med. 20: 390-395*
90. Kurata S., Matsumoto M., Nakajima H. (1996) Transcriptional control of the heme oxygenase gene in mouse M1 cells during their TPA-induced differentiation into macrophages. *J. Cell. Biochem. 62: 314-324*
91. Kwon G., Corbett J.A., Rodi C.P., Sullivan P., McDaniel M.L. (1995) Interleukin-1 induced nitric oxide synthase expression by rat pancreatic b-cells: evidence for the involvement of nuclear factor B in the signaling mechanism. *Endocrinology 136: 4790-4795*
92. Landmann R.M., Muller F.B., Perinin C.H., Wesp M., Erne P., Buhler F.R. (1984) Changes of immun-regulatory cells induced by psychological and physical stress: relationship to plasma catecholamines. *Clin. Exp. Immunol. 58: 127-135*
93. Langrehr J.M., Hoffman R.A., Lancaster R.J., Simmons R.L. (1993) Nitric oxide: a new endogenous immunomodulator. *Transplantation 55: 1205-1212*
94. Leppä S., Sistonen L. (1997) Heat shock response –pathophysiological implications. *Ann. Med. 29: 73-78*
95. Levy E., Vivi A., Hasin M., Tassini G., Navon G., Horowitz M., (1993) Heat acclimation improves cardiac mechanics and metabolic performance during ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol. 75: 833-*

96. Lincoln J., Hoyle C.H.V., Burnstock G. (1997) Nitric oxide in health and disease. *Cambridge UK, Cambridge University Press.*
97. Lindquist S. (1992) Heat shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr. Opin. Genet. Dev. 2: 748-755*
98. Lindsay M.A., Giembycz M.A. (1997) Signal transduction and activation of the NADPH oxidase in eosinophils. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92: 115-123*
99. Liu Y., Mayr S., Opitz-Gress A., Zeller C., Lormes W., Baur S., Lehmann M., Steinacker J. (1999) Human skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers. *J. Appl. Physiol. 86:101-104*
100. Locke M. (1997) The cellular stress response to exercise: role of stress proteins. *Exerc. Sport Sci. Rev. 25: 105-136*
101. Locke M., Noble E. G. (1995 a) Stress proteins: the exercise response. *Can. J. Appl. Physiol. 20: 155-167*
102. Locke M., Noble E.G. eds. (2002) Exercise and Stress Response. *Boca Raton: CRC Press LLC*
103. Locke M., Noble E.G., Tanguay R.M., Feild M.R., Ianuzzo S.E., Ianuzzo C.D. (1995 b) Aktivation of heat-shock transkription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am. J. Physiol. 268: 1387-1384*
104. Lorsbach R.B., Murphy W.J., Lowenstein C.J., Snyder S.H., Russel S.W. (1993) Expression of nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the syergy between interferon- γ and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem. 268: 1908-1913*
105. Lowenstein C.J., Dinermann J.L., Snyder S.H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of internal medicine 120: 227-237*
106. Lu Q., Ceddia M.A., Price E.A., Ye S.-M., Woods J.A. (1999) Chronic exercise increases makrophage-mediated tumor cytolysis in young and old mice. *Am. J. Physiol. 276: 482-489*
107. Maines M.D. (1997) The Heme Oxigenase System: A Regulator of Second Messenger Gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 517-554*
108. Maloyan A., Palmon A., Horowitz M. (1999) Heat acclimation increases the basal HSP72 level and alters ist production dynamics during heat stress. *Am. J. Physiol. 276: R1506-R1515*
109. Marini M., Frabetti F., Musiani D., Franceschi C. (1996) Oxygen radicals induce stress proteins and tolerance to oxidative stress in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol. 70: 337-350*
110. Mc Millan D.R., Xiao X., Shao L., Graves K., Benjamin I.J. (1998) Target disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J. Biol. Chem. 273: 7523-7528*
111. McCartney-Francis N.L., Song X.-Y., Mizel D.E., Wahl S.M. (2001) Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease *J. Immunol. 166: 2734-2740*
112. Mejia R., Gomez Eichelmann M.C., Fernandez M.S. (1995) Membrane fluidity of Escherichia coli during heat-shock. *Biochim. Biophys. Acta 1239: 195-200*

113. Mena P., Maynar M., Gutierrez J.M., Timon J., Campillo J.E. (1991) Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. *Int. J. Sports Med.* 12(6): 563-566
114. Michna H. (1988) The human macrophage system: activity and functional morphology. *Bibl. Anat.* 31: 1-83
115. Mitchell J.B., Russo A., Kinsella T.J., Glatstein E.(1983) Glutathione elevation during termotolerance induction and thermosensitization by glutathione depletion. *Cancer Res.* 43: 987-991
116. Morimoto R.I. (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12: 3788-3796
117. Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C. eds. (1994) The Biology of Heat Shock Proteins and Molekular Chaperones. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*
118. Moseley P.L. (1994) Mechanisms of heat adaptation : Thermotolerance and acclimatization. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 48-52
119. Moseley P.L. (1997) Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J. Appl. Physiol.* 83 (5): 1413-1417
120. Moseley P.L. (2002) The Role of heat shock proteins in modulating the immune response. In *Exercise and the stress response, Edit: Locke M. Kap. 10: 179-195*
121. Mosser D.D., Kotzbauer P.T., Sarge K.D., Morimoto R.I. (1990) In vitro activation of heat shock transcription factor DNA-binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3748-3752
122. Mosser D.D., Theodorakis N.G., Morimoto R.I. (1988) Coordinate Changes in heat shock element-binding activity and HSP70 gene transcription rates in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 8: 4736-4744
123. Motterlini R., Foresti R., Intaglietta M., Winslow R.M. (1996) NO-mediated activation of heme oxigenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am. J. Physiol.* 270: H107-114
124. Na Y.M., Kim M.Y., Kim Y.K., Ha Y.R., Yoon D.S. (2000) Exercise therapy effect on natural killer cell cytotoxic activity in stomach cancer patients after curative surgery. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 81: 777-779
125. Nakai A., Tanabe M., Kawazoe Y., Inazawa J., Morimoto R.I., Nagata K. (1997) HSF4, a new member of the human heat shock family which lacks properties of a transcriptional activator . *Mol. Cell. Biol.* 17: 469-481
126. Nathan C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064
127. Nething K. Wang L., Lin Y., Lormes W., Steinacker J.M. (2004) Blunted HSP70-Response to acute exercise in Well trained Skeletal Muscle. *Med. Sci. Sports. Exerc.:* 36/5 318
128. Nieman D.C. (1994) Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2: 128-139
129. Nieman D.C., Brendle D., Henson D.A., Suttles J., Cook V.D., Warren B.J., Butterworth D.E., Fagoaga O.R., Nehlsen-Canarella S.L. (1995 a) Immune function in athletes versus nonathletes. *Int. J. Sports Med.* 16:

130. Nieman D.C., Buckley K.S., Henson D.A., Warren B.J., Suttles J., Ahle J.C., Simandle S., Fagoaga O.R., Nehlsen-Cannarella S.L. (1995 b) Immune function in marathon runners versus sedentary controls. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: 986-992
131. Niemann D.C., Johanssen L.M., Lee J.W., Arabatzis K. (1990) Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 30: 316-328
132. Niess A.M., Fehrenbach E., Schlotz E., Northoff H., Dickhuth H.-H. (2002 a) Basal expression of leukocyte iNOS-mRNA is attenuated in moderately endurance-trained subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 87: 93-95
133. Niess A.M., Baumann M., Roecker K., Horstmann T., Mayer F., Dickhuth H.-H. (1997) Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leukocytes. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 38: 111-115
134. Niess A.M., Dickhuth H.-H., Northoff H., Fehrenbach E. (1999 a) Free radicals and oxidative stress in exercise – immunological aspects. *Exerc. Immunol. Rev.* 5: 22-56
224. Niess A.M., Fehrenbach E., Schlotz E., Sommer M., Andres C., Tschositsch K., Buttenfeld N., Golly I.C., Biesalski H.K., Northoff H., Dickhuth H.-H. (2002 b) Effects of rrr- α -Tocopherol on leucocyte expression of HSP27 in response to exhaustive treadmill exercise. *Int. J. Sports Med* 23: 445-452
135. Niess A.M., Hartmann M., Grünert-Fuchs M., Poch B., Speit G. (1996) DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int. J. Sports Med.* 17: 397-403
136. Niess A.M., Passek F., Lorenz I., Schneider E.M., Dickhut H.-H., Northoff H., Fehrenbach E. (1999 b) Expression of the antioxidant stress protein heme oxygenase-1 (HO-1) in human leukocytes – acute and adaptional responses to endurance exercise. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 184-192
137. Niess A.M., Sommer M., Schlotz E., Northoff H., Dickhuth H.-H., Fehrenbach E. (2000 a) Expression of the inducible nitric oxide synthase in human leukocytes: Responses to running exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32: 1220-1225
138. Niess A.M., Sommer M., Schneider M., Angres C., Tschositsch K., Golly I.C., Battenfeld N., Northoff H., Biesalski H.K., Dickhuth H.-H., Fehrenbach E. (2000 b) Physical Exercise-induced expression of inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in human leukocytes: effects of RRR- α -tocopherol supplementation. *Antioxid-Redox-Signal* 2(1): 113-126
139. Northoff H., Weinstock C., Berg A. (1994) The cytokine response to strenuous exercise. *Int. J. Sports Med.* 15: 167-171
140. Okinaga S., Takahashi K., Takeda K., Yoshizawa M., Fujita H., Sasaki H., Shibahara S. (1996) Regulation of heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress. *Blood* 87: 5074-5084
141. Ortega E. (1994) Physiology and biochemistry: Influence of exercise on phagozytosis. *Int. J. Sports Med.* 15: 172-178
142. Ortega E., Forner M.A., Barriga C. (1997) Exercise induced stimulation

- of macrophage chemotaxis: Role of corticosterone and prolactin as mediators. *J. Physiol. (Lond.)* 498: 729-734
143. Palliser D. (2001) Unraveling the mechanisms by which heat shock proteins activate the immune system. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 3 (1): 25-30
 144. Park S.J., Lee S.C., Hong S.H., Kim H.M. (2002) Degradation of I κ B α in activated RAW264.7 cells is blocked by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *Cell Biol. Toxicol.* 18(2): 121-130
 145. Parks D.A., Granger D.N. (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 548: 87-99
 146. Paroo Z., Haist J.V., Karmazyn M., Noble E.G. (2002) Exercise Improves Postischemic Cardiac Function in Males but Not Females. *Circ. Res.* 90: 911-917
 147. Pedersen B.K., Hoffmann-Goetz L. (2000) Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol. Rev.* 80: 1055-1081
 148. Pedersen B.K., Klokke M., Kappel M. (1997) Possible Role of Hyperthermia and Hypoxia in Exercise-Induced Immunomodulation. Pedersen B.K. *Exercise Immunology* 61-73 R. G. Landes Company
 149. Pedersen B.K., Niemann D.C. (1998) Exercise Immunology: integration and regulation. *Elsevier* 19: 204-206
 150. Pedersen B.K., Tvede N., Christensen L.D., Karlund K., Kragbak S., Halkjaer-Kristensen J. (1989) Natural killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. *Int. J. Sports Med.* 10: 129-131
 151. Perdrizet G.A. (1995) Heat Shock and Tissue Protection. *New Horizons* 3: 312-320
 152. Peters C., Lotzerich H., Niemeier B., Schule K., Uhlenbruck G. (1994) Influence of a moderate exercise training on natural killer cytotoxicity and personality traits in cancer patients. *Anticancer Res.* 14: 1033-1036
 153. Peters L., Lotzerich H., Niemeier B., Schule K., Uhlenbruck G. (1995) Exercise cancer and the immune response of monocytes. *Anticancer Res.* 14: 1033-1036
 154. Petrides P.E. (1998) in Löffler G., Petrides P.E. eds.: *Biochemie und Pathobiochemie Springer-Verlag*
 155. Pirkkala L., Nykänen P., Sistonen L. (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 15: 1118-1131
 156. Powers S.K., Demirel H.A., Vincent H.K., Coombes J.S., Naito H., Hamilton K.L., Shanely R.A., Jessup J. (1998) Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am. J. Physiol.* 275: 1468-1477
 157. Powers S.K., Ji L.L., Leeuwenburgh C. (1999 a) Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31: 987-997
 158. Powers S.K., Lennon S.L. (1999 b) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.* 58:

1025-1033

159. Privalle C.T., Fridowich I. (1987) Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84: 2723-2726
160. Pyne D.B. (1994) Regulation of Neutrophil Function During Exercise. *Sports Med.* 17: 245-258
161. Pyne D.B., Baker M.S., Fricker P.A., McDonald W.A., Telford R.D., Weidemann M.J. (1995) Effects of an intensive 12-wk training program by elite swimmers on neutrophil oxidative activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: 536-542
162. Pyne D.B., Smith J.A., Baker M.S., Telford R.D., Weidemann M.J. (2000) Neutrophil oxidative activity is differentially affected by exercise intensity and type. *J. Sci. Med. Sport* 3: 44-54
163. Quinlan R., Ijssel van den P. (1999) Fatal attraction: when chaperone turns harlot. *Nat. Med* 5(1): 25-26
164. Raju V.S., Maines M.D. (1994) Coordinated expression and mechanism of induction of HSP32 (heme oxygenase-1) mRNA by hyperthermia in rat organs. *Biochim. Biophys. Acta* 1217: 273-280
165. Revathi J.C., Chattopadhyay A., Srinivas U.K. (1994) Change in membrane organisation induced by heat shock. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 32: 941-950
166. Rhind S.G., Castellani J.W., Brenner I.K.M., Shephard R.J., Zamecnik J., Montain S.J., Young A.J., Shek P.N. (2001) Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 281: R66-R75
167. Ritossa F.A. (1962) new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573
168. Robertson J.D., Maughan R.J., Duthie G.G., Morrice P.C. (1990) Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clinical Science* 80: 611-618
169. Roecker K., Schotte O., Niess A.M., Horstmann T., Dickhuth H.-H. (1998) Predicting competition performance in long-distance running by means of a treadmill test. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30: 1552-1557
170. Royston J.P. (1982) Algorithm AS181: The W Test for Normality *Appl. Statist.* 31 176-180
171. Ryan A.J., Gisolfi C., Moseley P.L. (1991) Synthesis of 70kD stress protein by human leukocytes: effect of exercise in the heat. *J. Appl. Physiol.* 70: 466-471
172. Sadeghi H.M., Schnelle J.F., Thoma J.K., Nishanian P., Fahei J.L. (1999) Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. *Exp. Gerontol.* 34: 959-970
173. Samali A., Holmberg C.I., Sistonen L., Orrenius S. (1999) Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins. *Fed. Eur. Bioch. Soc.* 461: 306-310
174. Sardelli A. D. (1993) Plateau Effect- Understanding PCR Limitations. *Amplifications* 9: 1-5
175. Saxton J.M., Donnelly A.E., Roper H.P. (1994) Indices of free-radical-

- mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. *Eur. J. Appl. Physiol.* 142: 189-193
176. Schultz G. (1893) Experimentelle Untersuchung über das Vorkommen und die diagnostische Bedeutung der Leukocytose. *Dtsch. Archiv. Klein. Med.* 51: 234-281
 177. Sen C.K. (2000) Biological thiols and redox regulation of cellular signal transduction pathways. In Sen C.K., Packer L., Hanninen O. eds., Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Amsterdam, Elsevier: 375-402
 178. Shawn G., Rhind S.G., Castellani J.W., Brenner I.K.M., Shephard R.J., Zamecnik J., Montain S.J., Andrew J. Young A.J., Shek P.N. (2001) Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R66-R75
 179. Sheffler L.A., Wink D.A., Melillo G., Cox G.W. (1995) Exogenous nitric oxide regulates IFN-gamma plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages. *J. Immunol.* 155: 886-894
 180. Shek P.N., Sabiston P.H., Buguet A., Radomski M.W. (1995) Strenuous Exercise and Immunological Changes. *Int. J. Sports Med.* 16: 466-474
 181. Shibahara S., Sato M., Muller R.M., Yoshida T. (1989) Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter. *Eur. J. Biochem.* 179: 557-563
 182. Siebert P. D. (1993) Quantitative RT-PCR. Methods & Applications Book 3. Clontech Laboratories, Inc
 183. Simmons M.L., Murphy S. (1994) Roles of protein kinases in the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Glia* 11(3): 227-234
 184. Smith J.A., Pyne D.B. (1997) Exercise, training and neutrophil function. *Exerc. Immunol. Rev.* 3: 96-116
 185. Smith J.A., Telford R.D., Mason I.B., Weidemann M.J. (1990) Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. *Int. J. Sports Med.* 11: 179-187
 186. Steensberg A., Morrow J., Toft A.D., Bruunsgard H., Pedersen B.K. (2002) Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis and F2-isoprostanes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 87(1) 38-42 *In Process Citation*
 187. Steppich B., Dayyani F., Gruber R., Lorenz R., Mack M., Ziegler-Heitbrock H.W.L. (2000) Selective mobilization of CD14+CD16+ monocytes by exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C578-C586
 188. Stocker R. (1990) Induction of hem oxygenase as a defense against oxidative stress. *Free Radic. Res. Commun.* 9: 101-112
 189. Sutton J.R., Toews C. J., Ward G.R., Fox I. H. (1980) Purine metabolism during strenuous muscular exercise in man. *Metabolism* 29: 254-260
 190. Suzuki K., Sato H., Kikuchi T., Abe T., Nakaji S., Sugawara K., Totsuka M., Sato K., Yamaya K. (1996) Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol.* 81: 1213-1223
 191. Tabakman R., Lazarovici P., Matsuda Y., Brodie C., Ovadia H. (1998) Protein kinase C-independent selective induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages by staurosporine. *Nitric Oxide* 2(4):

- 250-258
192. Takahashi K., Hara E., Ogawa K., Kimura D., Fujita H., Shibahara S. (1997) Possible implications of the induction of human heme oxygenase by nitric oxide donors. *J. Biochem.* 121: 1162-1168
 193. Takeichi O., Saito I., Okamoto Y., Tsurumachi T., Saito T. (1998) Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 93: 275-280
 194. Tanabe M., Kawazoe Y., Takeda S., Morimoto R.I., Nagata K., Nakai A. (1998) Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *EMBO J.* 17: 1750-1758
 195. Tanabe M., Sasai N., Nagata K., Liu X.-D., Liu P.C.C., Thiele D.J., Nakai A. (1999) The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 274: 27845-27856
 196. Thune I., Furberg A.S. (2001) Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site specific. *M.S.S.E.* 33(6) *Suppl.*: 530-550
 197. Tiidus P.M. (1995) Can estrogens diminish exercise induced muscle damage? *Can. J. Appl. Physiol.* 20: 26-38
 198. Tsukahara Y., Morisaki T., Kojima M., Uchiyama A., Tanaka M. (2001) iNOS expression by activated neutrophils from patients with sepsis. *ANZ J. Surg.* 71: 15-20
 199. Tvede N., Kappel M., Karlund K. (1994) Evidence that the effect of bicycle exercise on blood mononuclear cell proliferative responses and subsets is mediated by epinephrine. *Int. J. Sports Med.* 15: 100-104
 200. Umansky V., Hehner S.P., Dumont A., Hofmann T.G., Schirmacher V., Doge W., Schmitz M.L. (1998) Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF- κ B implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur. J. Immunol.* 28(8): 2276-2282
 201. Unanue E.R. (1993) Makrophages, antigen-presenting cells and the phenomena of antigen handling and presentation. In: Paul W.E. ed. *Fundamental immunology, 3rd edn.* NewYork: Raven Press Ltd., 111-144
 202. Ushakova T., Melkonyan H., Nikonova L., Mudric N., Gogvadze V., Zhukova A., Gaziev A.I., Bradbury R. (1996) The effect of dietary supplements on gene expression in mice tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 20(3): 279-284
 203. Veith R. (2000) Semiquantitative Expressionsanalyse leukozytaerer Stressproteine nach Ausdauerbelastungen unter Hitzebedingungen mit Reverse-Transkription/Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). *Dissertation der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tuebingen*
 204. Vigh L., Maresca B., Harwood J.L. (1998) Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem. Sci.* 23: 369-374
 205. Vile G.F., Tyrrell R.M. (1993) Oxidative stress resulting in ultraviolet A

- irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J. Biol. Chem.* 268: 14678- 14681
206. Waldvogel I. (2005) In process citation *Dissertation der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tuebingen*
 207. Webb J.L., Polak J.M., Evans T.J. (2001) Effect of adhesion on inducible nitric oxide synthase (iNOS) production in purified human neutrophils. *Clin. Exp. Immunol.* 123: 42-48
 208. Weidner T.G. (1994) Literature review: Upper respiratory illness and sport and exercise. *Int. J. Sports Med.* 15: 1-9
 209. Weinberg J.B., Misokonis M.A., Shami P.J., Manson S.N., Sauls D.L., Dittmann W.A., Wood W.R., Smith G.K., McDonald B., Bachus K.E., Haney A.F., Granger D.L. (1995) Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS Protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86: 1184-1195
 210. Welch W.J., Kang H.S., Beckmann R.P., Mizzen L.A. (1991) Response of mammalian cells to metabolic stress; changes in cell physiology and structure/function of stress proteins: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167: 31-55
 211. Welsh M.J., Gaestel M. (1998) Small heat-shock protein family: function in health and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 851: 28-35
 212. Wiesner R. J. (1992) Direct quantitation of picomolar concentrations of mRNAs by mathematical analysis of a reverse transcription/exponential polymerase chain reaction assay. *Nucleic Acids Res.* 20: 5863-5864
 213. Willis D., Tomlinson A., Frederick R., Paul-Clark M.S., Willoughby D.A. (1995) Modulation of heme oxygenase activity in rat brain and spleen by inhibitors and donors of nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 1152-1156
 214. Wiseman H. (1994) Tamoxifen: new membrane mediated mechanisms of action and therapeutic advances. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 83-89
 215. Woods J.A. (1998) Exercise and resistance to neoplasia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76(5): 581-588
 216. Woods J.A., Davis J.M. (1994) Exercise, monocyte/makrophage function, and cancer. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26: 147-156
 217. Woods J.A., Davis J.M., Mayer E.P., Ghaffar A., Pate R.R. (1993) Exercise increases inflammatory macrophage anti-tumor cytotoxicity. *J. Appl. Physiol.* 75: 879-886
 218. Woods J.A., Davis J.M., Smith J.A., Niemann D.C. (1999) Exercise and cellular innate immune function. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31: 57-66
 219. Woods J.A., Lu Q., Ceddia M.A., Lowder T. (2000) Exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunol Cell Biol* 87: 545-553
 220. Xiao L. Eneroth P.H.E., Qureshi G.H. (1995) nitric oxide synthase pathway may mediate human natural killer cell cytotoxicity. *Scand. J. Immunol.* 42: 505-511
 221. Yang A.-L., Tsai S.-J., Jiang M.J., Jen C.J., Chen H. (2002) Chronic Exercise Increases both Inducible and Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Endothelial Cells of Rat Aorta. *J. Biomed. Sci* 9: 149-155

222. Ziegler-Heitbrock H.W.L. (1996) Heterogeneity of human blood monocytes: The CD14+/CD16+ subpopulation. *Immunol. Today* 17: 424-428
223. Ziegler-Heitbrock H.W.L., Fingerle G., Ströbel M. (1993) The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* 23: 2053-2058
224. Zugel U., Kaufmann S.H. (1999) Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 19-39

10. Dank

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. A.M. Niess, Herrn Prof. Dr. med. H. Northoff und Frau Dr. rer. nat. E. Fehrenbach für die Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung und stetige Beratung während der gesamten Arbeit ganz herzlich danken.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. med. H. Northoff für die großzügige Bereitstellung der Laborräume und Materialien des Institutes für Transfusionsmedizin.

Herrn Dr. med. R. Veith danke ich für die Einarbeitung in teilweise von ihm etablierte Methoden der RT-PCR.

Für die gute Arbeitsatmosphäre und angenehme Zusammenarbeit während der zahlreichen Versuchstage danke ich ganz herzlich Frau Dr. med. in spe Ines Waldvogel.

Den „trainierten“ und „untrainierten“ Versuchspersonen gilt mein besonderer Dank für Blutspende und Teilnahme an dieser Studie.

11. Lebenslauf

25.05.1978	Geburt in Tübingen als zweites von drei Kindern der Eltern Dr. med Walter Vogel und Dr. rer. nat. Victoria Vogel, geb. El Kareh
1984-1988	Besuch der Melanchthonschule Tübingen
1988-1997	Besuch des Uhlandgymnasium Tübingen
1997	Abitur (Leistungsfächer Latein und Biologie)
1997-2004	Medizinstudium an der Universität Tübingen
09.1999	Physikum
1997-2000	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Geschichte der Medizin
03.2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001-2002	Studienaufenthalt im Rahmen des Erasmus-Austauschprogrammes an der Université Victor Ségalen in Bordeaux, Frankreich
03.2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
24.04.2003- 16.08.2003	Praktisches Jahr an der Universidad Central del Ecuador in Quito (Chirurgie)
18.08.2003- 07.12.2003	Praktisches Jahr an der Université de Genève, Schweiz (Innere Medizin)
08.12.2003- 29.02.2003	Praktisches Jahr an der Universität Tübingen (Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie)
27.05.2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Ab 7. 2004	AiP bzw. Assistenzärztin am UK Tübingen in der Abteilung für Diagnostische Radiologie