

Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle
Transfusionsmedizin Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff
in Zusammenarbeit mit
der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin V Sportmedizin
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Nieß

Intraleukozytäre Stressantwort in ausdauertrainierten und untrainierten Probanden im Vergleich

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
INES TANJA WALDVOGEL
aus
Villingen-Schwenningen

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nieß

In Erinnerung an
Egon Sandner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	7
1.1 Hitzeschockproteine 27 und 70 (HSP27 /HSP70)	7
1.2 Induzierbare Hämoxygenase (HO-1)	10
1.3 Induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS)	11
1.4 Nuklear Faktor Kappa B (NF κ -B)	13
1.5 Körperliche Belastung und Immunsystem	13
1.6 Körperliche Belastung und oxidativer Stress	17
1.7 Fragestellung	20
2 Material	21
2.1 Probanden	21
2.2 Zellmaterial	21
3 Methoden	24
3.1 Studienaufbau	24
3.2 Abfolge der Arbeitsschritte	25
3.3 Antikörper	26
3.4 Stimulation mit Hitzeschock	26
3.5 Stimulation mit Cytokinen und LPS in isolierten PBMC	27
3.6 Zellfixierung der mononukleären Zellen	27
3.7 Intrazelluläre Antikörpermarkierung	28

3.8	Intrazelluläre Antikörpermarkierung: $\text{NF}\kappa\text{-B}$	29
3.9	Doppelmarkierung (Oberfläche und intrazellulär)	29
3.10	LPS im Vollblut in den Vorversuchen	30
3.11	Durchflußzytometrie	30
3.12	Statistik	31
3.13	Vergleich der basalen Expression	31
3.14	Vergleich der verschiedenen in vitro Stimulationen	32
4	Ergebnisse	34
4.1	Vorversuche	34
4.1.1	Stimulation mit LPS im Vollblut	34
4.1.2	Stimulation mit Cytokinen in Kombination mit LPS im Vollblut im Vergleich zu PBMC	36
4.1.3	$\text{NF}\kappa\text{-B}$ als Kontrolle	37
4.1.4	Doppelmarkierung (Oberfläche und intrazellulär)	38
4.2	Stressproteinexpression in PBMC nach Stimulation	39
4.2.1	Expressionsverhalten durch Hitzeschockstimulation	39
4.2.2	Expressionsverhalten durch Cytokinstimulation zuzüglich LPS	41
4.3	Basalexpression der Stressproteine im Vergleich TR/UT	42
4.4	Stressproteinexpression nach Hitzeschock	42
4.5	Stressproteinexpression nach Cytokinen und LPS	43
5	Diskussion	53
5.1	Diskussion der Vorversuche	53
5.1.1	Stimulation mit LPS und Cytokinen	53
5.2	Diskussion der ermittelten Ergebnisse	56
5.2.1	Expression von HSP27 und HSP70 auf Hitzeschockstimulation, Vergleich TR/UT	57
5.2.2	Expressionsverhalten der HO-1 auf Hitzeschockstimulation, Vergleich TR/UT	61

5.2.3 Expression der iNOS auf Hitzeschockstimulation, sowie auf Stimulation mit LPS und Cytokinen, Vergleich TR/UT	63
5.3 Zusammenfassung	68
Abbildungsverzeichnis	71
Tabellenverzeichnis	72
Literaturverzeichnis	73
Danksagung	88
Lebenslauf	89

Abkürzungsverzeichnis

Cyt	Cytokine
H+	Hitzeschockstimulation
H-	Negativkontrolle zur Hitzeschockstimulation
HO-1	Hämoxygenase-1
HSP27	Hitzeschockprotein 27
HSP70	Hitzeschockprotein 70
IL-1 β	Interleukin-1 beta
iNOS	induzierbare NO-Synthase
INF γ	Interferon gamma
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
μ l	Mikroliter
NF κ -B	Nuklear Faktor kappa-B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
·NO	Stickstoffmonoxid
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
ROS/RNS	reaktive Sauerstoffverbindung/Stickstoffverbindung
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TR	Trainierte
UT	Untrainierte

Kapitel 1

Einleitung

Eine in regelmäßigen Abständen sich wiederholende körperliche Belastung wird als Training bezeichnet. Anpassungsprozesse an diese Art von Beeinflussung des Organismus scheinen aus ökonomischen Gründen sinnvoll. Diese Arbeit geht der Frage nach, inwieweit sich diese Ökonomisierung bei Ausdauertrainierten auf Immunsystem und Organismus auswirkt.

1.1 Hitzeschockproteine 27 und 70 (HSP27 /HSP70)

Hitzeschockproteine sind Teil einer größeren Familie von Proteinen, die auch als Stressproteine bekannt sind, da sie eine essentielle Rolle für das Überleben der Zellen unter Stress spielen. Sie sind ausführlich studiert worden bezüglich ihrer Regulierung, Lokalisation und Funktion in der Zelle. Eingeteilt werden die HSPs nach ihrem Molekulargewicht, das zwischen 27 und 110 kDa erreichen kann (MOSELEY, 1997). Die Proteine kommen in Hefen, Prokaryonten und auch Eukaryonten vor (CRAIG, 1985) und wurden zum ersten Mal in *Drosophila* beschrieben, wo sie auf steigende Temperaturen mit Konzentrationserhöhungen im Zytoplasma reagierten (RITOSSA, 1962). Neben Hitze, die als eine der ersten Stressoren in Bezug auf zunehmende HSP-Synthese beschrieben wurde, und dem die Proteine auch ihren Namen verdanken, sind mittlerweile eine Vielfalt von Stressoren, physikalisch, chemischen und auch metabolischen Ursprungs bekannt. Neben Ischämie ((MARBER *et al.*, 1995), UV-Bestrahlung (BARBE *et al.*, 1988) und Schwermetallverbindungen, seien erhöhte Kalziumkonzentrationen, reaktive Sau-

erstoffverbindungen, abnormal gefaltete oder degradierte Proteine (WELCH, 1992) und entzündungsfördernde Faktoren wie Cytokine, insbesondere der Tumornekrosefaktor α (CIOCCA *et al.*, 1993), als die Stressoren genannt, die eine Hitzeschockproteinantwort initiieren. Eine große Bedeutung kommt den Hitzeschockproteinen dahingehend zu, daß sie wesentlich an Erkennungs-, Reparatur- und Beseitigungsprozessen denaturierter oder funktionslos gewordener Proteine, die ihrerseits als sogenannte Stressfaktoren die Bildung der HSPs anregen, beteiligt sind (Chemnetius *et al.* (1993), Craig *et al.* (1994), Hartl *et al.* (1994)). Zusätzlich zu dieser Art Proteinmanagement sind weitere Funktionen der Hitzeschockproteine zu nennen, wie die Stabilisierung des Zytoskeletts der Zelle und Proteintranslokationen zu Bestimmungsorten innerhalb der Zelle, zum Beispiel über die äußere Membran der Mitochondrien (MOSELEY, 1997), oder dem endoplasmatischen Retikulum (CHIRICO *et al.*, 1988), wobei die HSPs als schützende Begleiter für die Proteine dienen. Diese Eigenschaft wird auch als Chaperone-Funktion beschrieben, die vor allem bei regelmäßigem sportlichen Training im Hinblick auf optimierte Regeneration und Anpassung bei steigenden Trainings- und Wettkampfbelastungen zum Einsatz kommt (LEHMANN *et al.*, 1997).

Was Ausdauertraining betrifft, so stellt sich seit längerem die Frage, wie Ausdauertrainierte mit dem physischen Stress, dem sie sich regelmäßig aussetzen, fertig werden. Auf zellulärer Ebene entwickelt der Ausdauertrainierte in diesem Zusammenhang adaptive und protektive Mechanismen, die die zelluläre Homeostase aufrechterhalten. Da die HSPs als Antwort auf akute körperliche Belastung in den Leukozyten exprimiert werden (FEHRENBACH und NORTHOFF, 2001), scheint ihnen eine wesentliche Aufgabe im Hinblick auf Schutz vor Hyperthermie und oxidativem Stress oder inflammatorischen Prozessen zuzukommen.

Der ebenfalls in Zusammenhang mit Hitzeschockproteinen genannte Begriff der Thermotoleranz meint, daß nach reiner nicht übermäßig dosierter erster Hitzeexposition eine im Anschluß folgende zweite Hitzebelastung besser von den exponierten Zellen vertragen wird, selbst dann, wenn die Temperaturen im zweiten Fall höher liegen (LI, 1985). Dies stellt auch einen Adaptationsprozeß da. Ebenfalls ist eine Beteiligung der HSPs an Alterungsprozessen bekannt (HOLBROOK und UDELSMANN, 1994).

In unserem Fall wurden zwei Hitzeschockproteine beobachtet, HSP70 (induzierbare Form, auch als HSP72 bekannt) und HSP27, wobei HSP70 das besser erforschte von beiden darstellt. Alle Mitglieder der HSP70-Familie sind in der Lage Adenosintriphosphate (ATP) (WELCH und FERAMISCO, 1985) und Polypeptide

(BROWN *et al.*, 1993) zu binden. In Zellen von Säugetieren konnten vier Hauptisoformen (HSC73, HSP72, GRP75, GRP78) der HSP70-Familie identifiziert werden (BECKMANN *et al.*, 1990), wobei auch andere gewebespezifische HSP-70-ähnliche Proteine existieren (DOMANICO *et al.*, 1993). Alle Hauptisoformen sind an spezifischen zellulären Wirkorten lokalisiert (Zytoplasma, Zellkern, Mitochondrium, Endoplasmatisches Retikulum), wo sie mit Hilfe von Proteinen bestimmte Funktionen vermitteln (BECKMANN *et al.*, 1990). Eine bekannte Isoform stellt HSC73 dar, was in den meisten Zellen synthetisiert wird, jedoch nur schwach stressinduzierbar ist (LOCKE *et al.*, 1990). Eine zweite Isoform ist HSP72, welches eng verwandt mit HSC73 ist und als die induzierbare Isoform der HSP70-Familie betrachtet werden kann (LOCKE *et al.*, 1990). Gerade dieses Protein ist auch in den letzten Jahren verstärkt auf seine Rolle in Immunprozessen hin untersucht worden. So wurde von G. Fincato (1991) entdeckt, daß hitzeinduzierte Proteine vom Typ HSP70 in mononukleären Phagozyten exprimiert werden und in Zusammenhang mit der Aktivität von bakteriellen Produkten wie Lipopolysaccharid (LPS) und Zytokinen vermehrt gebildet werden, bzw. von diesen zur Synthese angeregt werden können. Die Beziehung der Hitzeschockproteine vom HSP70-Typ zu Zytokinen und dem von Bakterien exprimierten Endotoxin (LPS) erscheint im Zusammenhang mit schweren systemischen Entzündungsreaktionen (Sepsis) sehr interessant. Viele *in vitro*-Studien haben gezeigt, daß die Expression von HSP70 die LPS-induzierte Produktion von Interleukin 1β und $TNF\alpha$ in humanen Monozyten und Maus-Makrophagen herabsetzt (Hall *et al.* (1994), Jäättelä *et al.* (1993), Klostergaard *et al.* (1989)), was sich in Bezug auf die Sepsis günstig auswirken könnte. Schroeder *et al.* (1999) konnten jedoch demonstrieren, daß auch die Kapazität des HSP70 erschöpfbar ist, nämlich abhängig von Menge und Inkubationszeit des zugeführten Endotoxins. Somit sind die genauen Mechanismen, die bei der Entzündungskaskade in Interaktion mit HSP70 ablaufen, noch nicht geklärt.

Deutlich wird jedenfalls, daß, neben der Rolle als intrazellulärem molekularem Chaperone, das Hitzeschockprotein 70 als ein potenter Helfer bei Immunantworten wirken kann, indem es laut Asea (2000) auch im extrazellulären Milieu als Zytokin agiert, welches die funktionellen Eigenschaften immunkompetenter Zellen beeinflusst. Darüberhinaus ist HSP70 auch durch seine Interaktion mit verschiedenen Proteinen und Stabilisierung von Proto-Onkogenen bei Krebskrankheiten und ihrer Therapie involviert (FULLER *et al.*, 1994).

Für das kleinere HSP27 ist eine Beteiligung insbesondere an Signaltransduktions-, Wachstums-, Differenzierungs- und Transformationsprozessen belegt (ARRIGO und

WELCH, 1987). Außerdem wird es mit dem schon bereits beschriebenen Vorgang der Thermotoleranz assoziiert (LANDRY *et al.*, 1989). Zytokine und Wachstumsfaktoren bewirken eine Phosphorylierung des Proteins (GUESDON *et al.*, 1993), was die Resistenz der Zellen gegenüber TNF α erhöht (MEHLEN *et al.*, 1995). Die molekularen Mechanismen, die einen möglichen Schutz gegen TNF α bilden sollen, sind jedoch noch unbekannt (MEHLEN *et al.*, 1995). In Hinblick auf immunologische Funktionen wird HSP27 häufig in Krebszellen gefunden. In endometrischen Karzinomen zum Beispiel ist seine Anwesenheit mit dem Grad der Tumordifferenzierung, ebenso wie mit dem Vorhandensein von Östrogen- und Progesteronrezeptoren korreliert (CIOCCA *et al.*, 1993).

1.2 Induzierbare Hämoxygenase (HO-1)

Die Hämoxygenase (HO) ist hauptverantwortlich für den physiologischen Abbau des Häms zu äquimolaren Mengen von Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen. Sie ist deshalb hauptsächlich in Organen (Leber, Milz) zu finden, in denen aufgrund des hohen Abbaus an veralteten Erythrozyten besonders viele Hämmoleküle anfallen. Mittlerweile sind drei Isoformen der Hämoxygenase (HO-1, HO-2, und HO-3) (ELBIRT und BONKOVSKY, 1999) identifiziert worden, wobei HO-1 immer noch die einzige Form ist, die ubiquitär vorkommt und induzierbar ist. Zu den chemischen und umweltbedingten Stimulatoren, die dafür bekannt sind, die HO-1-Expression zu induzieren, gehören das Häm-Molekül (Lincoln *et al.* (1988), Gabis *et al.* (1996)), andere Metalloporphyrine (CABLE *et al.*, 1994), Zytokine (FUKUDA und SASSA, 1993), Prostaglandine (ROSSI und SANTORO, 1995), ultraviolettes Licht (Keyse und Tyrrell (1989), Vile *et al.* (1994)), Wasserstoffperoxid (KEYSE und TYRRELL, 1989), Lipopolysaccharide (LPS) (CAMHI *et al.*, 1995a), oxidativer Stress (Applegate *et al.* (1991), Stocker (1990)) und Hitzeschock (Shibahara *et al.* (1987), Gabis *et al.* (1996)).

Aufgrund all dieser Faktoren ist es nicht verwunderlich, daß die HO-1 auch aufgrund ihrer genetischen Struktur zur Familie der Stressproteine gezählt wird und wegen ihrer Induzierbarkeit durch Hitzeschock, die bislang allerdings nur in Zellen von Ratten signifikant nachgewiesen wurde, auch als Hitzeschockprotein (HSP32) bekannt ist (SHIBARA *et al.*, 1989). Eine bedeutende Rolle spielt das Enzym durch seine antioxidativ wirkende Schutzfunktion, die im Abwehrapparat jeder Zelle zum Ausdruck kommt (MAINES, 1988). Die Expression der HO-1 wurde in vielen Stu-

dien (Applegate *et al.*(1991), Stocker (1990), Maines (1997), Abraham (1996)) in Zusammenhang mit oxidativem Stress in unterschiedlichsten Geweben von Säugtieren untersucht. Auch als Antwort auf sportliche Belastung, die als Stressfaktor eine Anhäufung oxidativ schädigender Substanzen, wie ROS (reaktive Sauerstoffradikale) auslösen kann, wird die Schutzfunktion der HO-1 angenommen (ESSIG *et al.*, 1997). Ebenso konnte ein Zusammenhang der HO-1 zu regelmäßigem Ausdauertraining im Rahmen eines wettkampfmäßig absolvierten Halbmarathons hergestellt werden (NIESS *et al.*, 1999), (PASSEK, 2000).

Interessanterweise kommt bei der Hämabbaukaskade auch dem Endprodukt, dem Bilirubin, eine nützliche Rolle zu. Es wird als sehr effektives Antioxidans betrachtet, das Schutz vor wasserlöslichen Peroxiden bietet und vor allem in Membranen sehr potent (STRYER, 1996) ist. Clark *et al.* (2000) haben die zytoprotektive Wirkung des Bilirubins gegenüber oxidativem Stress verdeutlicht.

Abschließend soll die Funktion der HO-1 im Entzündungsstoffwechsel aufgezeigt werden, wobei sie einen für die Überwindung des Prozesses mitentscheidenden Platz einnimmt (WILLIS *et al.*, 1996). Bei schwerer Sepsis, die aufgrund der exzessiven systemischen Entzündung zu oxidativem Stress mit daraus resultierenden Multiorganversagen führen kann, wird vermutet, daß HO-1 eine der Schlüsselfunktionen einnimmt (TAKAHASHI *et al.*, 1999). Takahashi *et al.* beobachteten dazu die HO-1 Expression in Ratten nach vorangegangener intraperitonealer Lipopolysaccharid (LPS)-Injektion. Dabei zeigte sich etwa drei Stunden nach LPS-Injektion eine signifikante Expression der HO-1 in Leber, Lunge und Nieren der Ratten.

1.3 Induzierbare Stickoxidsynthese (iNOS)

Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) ist ein kurzlebiges, gasförmiges freies Radikal, welches als wichtiger Botenstoff bei Signalübertragungsprozessen von Vertebraten, innerhalb einer Zelle oder zwischen zwei benachbarten Zellen, fungiert. Es wird aus Arginin in einer komplexen Reaktion mit Hilfe von NADPH und O_2 gebildet und nimmt damit eine zellschützende Rolle ein, da es die Bildung reaktiver, toxisch wirkender Sauerstoffradikale (ROS) durch das Superoxidradikal O_2^- zunächst verhindert. In höheren Konzentrationen jedoch wirkt auch $\cdot\text{NO}$, in seiner Eigenschaft als freies Radikal, auf körpereigene Strukturen und Gewebe schädigend.

Als Katalysator der $\cdot\text{NO}$ -Reaktion dient die Stickstoffmonoxidsynthese (NOS), die in drei Isoformen bekannt ist. Während cNOS (Isoform 1) in neuronalen Zel-

len gefunden wurde und eNOS (Isoform 3) seine Bedeutung als endotheliale Variante bei Gefäßrelaxation findet, konnte die iNOS als einzige induzierbare Isoform bislang in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, in T-Lymphozyten, in mesangialen Zellen (Weinberg *et al.* (1995), Wallerath *et al.* (1997)) und in Monozyten/Makrophagen isoliert (REILING *et al.*, 1994) werden. Vor allem die Anwesenheit der iNOS im zuletzt genannten Zelltyp deutet darauf hin, daß sie bzw. $\cdot\text{NO}$ in Abwehrprozessen immunkompetenter Zellen als mitwirkender Faktor anzusehen ist.

Aufgrund dieser Tatsache ist seit langem die Regulation der iNOS, die weitgehend auf Transkriptionsniveau erfolgt, in Zusammenhang mit entzündlichen, autoimmunologischen und chronischen Erkrankungen (Barnes and Liew (1993), Danner *et al.*(1995), Kashem *et al.*(1996), Birks and Yacoub (1997)) untersucht worden. In in-vitro Studien, die vor allem in Nagerzellen erfolgreich durchgeführt werden konnten, bediente man sich zum Beispiel Zytokinkombinationen aus $\text{IL-1 } \beta$, $\text{TNF } \alpha$ und $\text{INF } \gamma$ als iNOS-Induktoren (KROENCKE *et al.*, 1995). Desweiteren sind Lipopolysaccharide (LPS) (NUSSLER und BILLIAR, 1993), geringe Mengen an $\cdot\text{NO}$ selbst (SHEFFLER *et al.*, 1995), sowie Hitzeschock (KROENCKE *et al.*, 1995) und Hypoxie (MELILLO *et al.*, 1995) als regulierende Faktoren bekannt.

Trotzdem gehen die Meinungen über die Stimulierbarkeit der iNOS mit LPS und Zytokinen in humanen Blutzellen v. a. in Monozyten/Makrophagen auseinander. Es wird angenommen, daß die klassischen iNOS-Induktoren ($\text{IFN } \gamma$, $\text{TNF } \alpha$, LPS), die in Makrophagen von Nagern einen deutlichen $\cdot\text{NO}$ -Anstieg hervorrufen, in humanen Makrophagen jedoch aufgrund eher geringer iNOS-, bzw. $\cdot\text{NO}$ -Expression andere Wege zur $\cdot\text{NO}$ -Generierung gehen (Konur *et al.* (1996), Oliveira *et al.* (1999), Weinberg *et al.*(1995)).

Angeblich spielt auch die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors Nuklear Factor kappaB ($\text{NF } \kappa\text{B}$), der das Ansprechen der Gene auf Stimulatoren wie LPS und $\text{IFN } \gamma$ fördern soll (ZHANG *et al.*, 1996), eine wichtige Rolle bei der iNOS-Gen-Expression auf Transkriptionsebene.

Der Einfluß körperlicher Belastung auf die Expression der iNOS- und $\cdot\text{NO}$ -Produktion in immunkompetenten Zellen ist noch weitgehend ungeklärt. Es wurden z. B. erhöhte Nitratausscheidungen im Urin von Triathleten nach einem Wettkampf gefunden (BROUWER *et al.*, 1997), was auf eine erhöhte $\cdot\text{NO}$ -Bildung während und nach der Belastung hinweist. Zusätzlich zu anderen Quellen, wie der endothelialen und neuronalen $\cdot\text{NO}$ -Synthese, könnte dies das Ergebnis einer gesteigerten

gerten \cdot NO-Erzeugung über die iNOS in Leukozyten sein. In einer neueren Studie zeigten Niess *et al.* (2003), daß sich in Leukozyten von Ausdauertrainierten erhöhte iNOS-Konzentrationen nach Stimulation mit Stressoren wie LPS und Cytokinen befanden.

Diese wenigen verfügbaren Daten scheinen darauf hinzuweisen, daß die Expression der iNOS in Leukozyten durch größere körperliche Anstrengung bzw. Ausdauertraining induziert werden kann.

1.4 Nuklear Faktor Kappa B (NF κ -B)

Der redoxensitive Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor Kappa B ist ein Heterodimer, das sich aus zwei Untereinheiten p50 und p65 zusammensetzt. Über eine weitere Komponente, den sogenannten inhibitory subunit- κ -B (I- κ -B) wird der Transkriptionsfaktor im Zytoplasma in inaktivem Zustand gehalten. Extrazelluläre Stimuli wie Cytokine, Mitogene, Bakterien, Viren und reaktive Sauerstoffradikale (ROS) können eine Inaktivierung von I- κ -B einleiten. Beim Abbau von I- κ -B wandert NF κ -B zum Zellkern, um dort in seiner transkriptionischen Eigenschaft, die Expression von Zielgenen zu induzieren. Als wichtige Komponente für die Ausübung dieser Expression benötigt NF κ -B einen intermediären zellulären Redoxstatus, da zu hohe Konzentrationen von ROS seine Funktion wiederum hemmen.

NF κ -B-assoziierte Zielgene kodieren für eine Vielzahl immunrelevanter Proteine wie Cytokine, Adhäsionsmoleküle, Akute-Phase-Proteine, Immunrezeptoren, Stressproteine und auch die iNOS (ROEBUCK, 1999). Es wird also deutlich, daß NF- κ -B eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen und inflammatorischen Prozessen inne hat.

1.5 Körperliche Belastung und Immunsystem

Seit mehreren Jahren wurden die Einflüsse sportlicher Ausdauerbelastung auf den menschlichen Körper in einer Vielzahl von Studien untersucht (BRINES *et al.*, 1996), (HOFFMAN-GOETZ, 1996), (KEAST *et al.*, 1988). Dies geschieht nicht zuletzt deshalb, weil körperliche Belastung hormonelle und immunologische Veränderungen hervorrufen kann, wie sie auch durch klinische körperliche Stressfaktoren (zum Beispiel Trauma, Verbrennung, Sepsis, Hypoxie und Hyperthermie) verursacht werden (SHEPHARD und SHEK, 1998). Von immunologischen Veränderungen

betroffen sind bei körperlicher Belastung die Organsysteme der Haut, des Respirationstrakts, des Muskelapparats und das Blutsystem mit einer Reihe von Zellen unterschiedlicher Funktionen. Es gilt vor allem, diese Vielzahl an zellulären Veränderungen während und nach der Belastungssituation zu betrachten, bzw. zwischen akuten sowie mittel- und langfristigen Veränderungen zu unterscheiden. Im Blutsystem wird als Antwort auf Belastung eine Leukozytose erwartet, die abhängig von Belastungsintensität und -umfang unterschiedlich stark ausfällt und häufig zweigipflig verläuft.

Getragen wird dieser Anstieg der weißen Blutkörperchen im Wesentlichen von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und einer Subpopulation von Lymphozyten, den NK-Zellen (natürliche Killerzellen)(MCCARTHY und DALE, 1988). Bei der Freisetzung dieser Zellen aus RES-kompetenten Organen (Lunge, Darm, Leber, Knochenmark und Milzsinusoiden) sind neurohumorale Auslöser wie Katecholamine, Cortisol, Wachstumshormone, β -Endorphine sowie Cytokine als auch ein gesteigertes Herz-Zeit-Volumen als hämodynamischer Initiator beteiligt. Wenn man nun diese Mechanismen und Vorgänge betrachtet, die bei der Freisetzung von Leukozyten als Antwort auf körperliche Belastung ablaufen, fällt eine gewisse Ähnlichkeit zu akut ablaufenden Entzündungsreaktionen oder Akute-Phase-Reaktionen auf, wie Berg *et al.* (1992) beschrieben. Dem Prinzip nach folgt diese Art von Immunreaktion einer Entzündungsreaktion, die durch Cytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α eingeleitet wird und in ihrem Verlauf mit Temperaturanstieg, Ödembildung und Permeabilitätssteigerung der Zellmembran reagiert. Weiterhin führt sie zur Aktivierung immunkompetenter Zellen, zur Freisetzung von Arachidonsäurederivaten, hepatischer Proteinaseinhibitorsynthese, Peroxidbildung und konsekutivem Verbrauch von Oxidationsinhibitoren, zu denen auch die Stressproteine zählen. In welchem Zusammenhang stehen nun aber diese zellulären Veränderungen zu Intensität und Umfang der Belastung, und welche Veränderungen der Organsysteme wurden in Abhängigkeit davon beobachtet?

Hier werden zunächst die neutrophilen Granulozyten betrachtet, die als prozentualer Hauptvertreter der Leukozyten eine bedeutende Rolle im unspezifischen zellulären Immunsystem spielen, da sie zu den sehr frühen Schutzmechanismen zählen, die als Antwort auf Verletzung oder Entzündung zum Einsatz kommen. Einer Infektion wirken diese Zellen durch ihre Fähigkeit zur Adhärenz, Chemotaxis, Phagozytose, oxidativem Burst, Degranulation und Vernichtung von Erregern entgegen. Während körperlicher Belastung und vor allem in der Nachbelastungsphase, wie ein 1920 durgeführter Boston-Marathon schon zeigte, ist eine ausgeprägte Neu-

trophilie zu erwarten. Zur Funktion der neutrophilen Granulozyten läßt sich als Antwort auf moderate körperliche Belastung eine Verstärkung hinsichtlich Chemotaxis, Phagozytosefähigkeit und oxidativem Burst feststellen (PEDERSEN und HOFFMAN-GOETZ, 2000). Extreme körperliche Belastung allerdings reduziert diese Funktionen mit Ausnahme der Chemotaxis und Degranulierfähigkeit (ORTEGA *et al.*, 1993), (SMITH *et al.*, 1992). Studien in Bezug auf Ausdauersport berichten, daß die Neutrophilen-Funktion (oxidativer Burst und Phagozytosefähigkeit) bei Ausdauerathleten der Norm entspricht, hingegen in sehr intensiven Trainingszeiten dieser Athleten deutlich vermindert ist (BAJ *et al.*, 1994), (HACK *et al.*, 1994).

Für die Monozytenpopulation konnte ebenfalls ein belastungsinduzierter Anstieg im Blut ermittelt werden, der unabhängig von Dauer und Intensität des gewählten Belastungsprotokolls ist (FIELD *et al.*, 1991). Ihre Funktion und Enzymausstattung ähnelt sehr derjenigen neutrophiler Granulozyten, wobei der Schwerpunkt der Monozyten in der Ausdifferenzierung zum Makrophagen mit ausgeprägter Phagozytosefähigkeit liegt.

Beide Zellpopulationen können bei Aktivierung zu vermehrter Generierung und Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen führen (HALLIWELL, 1998), was unten näher erläutert werden wird.

Während nun die Konzentration der neutrophilen Granulozyten im Blut sowohl während als auch nach körperlicher Belastung erhöht ist (PEDERSEN, 1991), verhält sich dies nicht bei allen Subpopulationen der Leukozyten gleich. Zum Beispiel zeigen die Lymphozyten mit ihrer Hauptpopulation, den NK-Zellen, einen deutlichen Anstieg während der akuten Belastungsphase, allerdings einen ebenso signifikanten Abfall nach sehr intensiver akuter Belastung. Dieser Abfall kann die Lymphozytenzahl im Vergleich zur Vorbelastungsphase noch unterschreiten und ist in seiner Dauer abhängig von Belastungsumfang und -intensität (HOFFMAN-GOETZ und PEDERSEN, 1994). Für diesen Abfall der NK-Zellen als auch ihrer Aktivität nach intensiver Belastung machen Tvede *et al.* (1993) Prostaglandine verantwortlich, die durch die erhöhte Monozytenzahl ausgeschüttet werden. Da NK-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von akuten und chronischen Entzündungen einnehmen und ebenso bei der Eindämmung maligner Prozesse beteiligt sind, müssen diese Veränderungen in Bezug auf sehr intensiv trainierende oder gar übertrainierte Sportler kritisch betrachtet werden.

Demnach sind in den letzten Jahren zahlreiche Studien (CANNON, 1993), (FRI-

MAN und ILBACK, 1992), (NIEMAN und PEDERSEN, 1999) aufgestellt worden, um den Zusammenhang von körperlicher Belastung und möglicherweise dadurch induzierte Infektionen des menschlichen Körpers zu untersuchen. Vor allem bei Ausdauertrainierten scheinen Infektionen des oberen Respirationstraktes (URTI) nicht selten zu sein, zumindest ist das Risiko zu URTI in Phasen extremen Trainings oder Wettkampfsituationen erhöht (NIEMAN, 2000). Erklärbar sind diese Prozesse unter anderem durch den schon erwähnten Abfall immunkompetenter Zellen (Lymphozytenabfall hauptsächlich nach intensivem Kurzdauertrainig, Abfall der Neutrophilen Granulozyten nach extremer Ausdauerbelastung) als auch durch supprimierte IgA-Konzentrationen. IgA wird normalerweise als Hauptvertreter in der Schleimhaut des Atmungstraktes gefunden (TVEDE *et al.*, 1989). Da die IgA-produzierenden B-Zellen, so konnte in einer *in vitro* Studie nachgewiesen werden, nicht belastungsinduziert supprimiert sind, vermutet man auch hier, daß die IgA-Verminderung durch von Monozyten produzierte Prostaglandine beeinflusst wird. Zu diesem IgA-Verlust unter Belastung können auch Mikroblutungen im Bereich des Intestinaltraktes gerechnet werden, infolge derer es zu einer Dysfunktion der Intestinalschleimhaut kommt und unter Umständen zu einer daraus resultierenden Einschwämmung körpereigener Bakterientoxine (BOSENBERG *et al.*, 1988). Diese Endotoxine, die auch als Lipopolysaccharide (LPS) bekannt und in gramnegativen Stäbchenbakterien zu finden sind, verursachen eine Makrophagenanflutung und somit eine Entzündungsreaktion des Darmes (NORTHOFF und BERG, 1991).

In jede lokale Antwort auf Entzündung oder Infektion und vor allem auf Gewebeverletzung wie zum Beispiel Muskelgewebe ist die Produktion und Freisetzung von Cytokinen involviert. Wie schon weiter oben erwähnt sind sie als eine der ersten Faktoren an der sogenannten Akute-Phase-Reaktion beteiligt, indem sie die Ausschüttung immunkompetenter Zellen, wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten bzw. Makrophagen zur Antigenbeseitigung und Reparatur von Gewebeschäden erleichtern. Man unterscheidet inflammatorische (z. B. IL-6) und proinflammatorische Cytokine (z. B. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$), die gemeinsam mit C-reaktivem Protein (CRP), α_2 -Makroglobulin und Transferrin an dieser inflammatorischen Reaktion beteiligt sind.

Der Zusammenhang zwischen körperlicher Belastung und dadurch induzierte Cytokin-Ausschüttung ist in mehrfachen Studien diskutiert worden (NORTHOFF und BERG, 1991), (OSTROWSKI *et al.*, 1998), (VANTITIS und GRAAFSMA, 1991), (DUFAUX und ORDER, 1989). Der Nachweis von multiplen Cytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6, IL-2-Rezeptoren und $\text{INF}\gamma$ im Urin nach körperlicher Belastung zeigt,

daß die Expression von einem breiten Spektrum von Cytokinen als Antwort auf körperliche Belastung möglich ist (SPRENGER *et al.*, 1992). Die unterschiedliche Cytokin-Freisetzung im Rahmen von sportlichen Tätigkeiten kann mit der Art der körperlichen Aktivität, ebenso wie mit Intensität und Ausdauer zusammenhängen (PEDERSEN *et al.*, 1998). Demnach wurden zum Beispiel erhöhte Cytokin-Werte hauptsächlich nach exzentrischer Belastung gefunden (BRUUNSGAARD *et al.*, 1997). Weiterhin zeigen neuere Arbeiten, daß die Cytokin-Antwort, die durch belastungsinduzierten Muskelschaden auftritt, derjenigen ähnelt, wie sie bei Traumapatienten beobachtet wurde (OSTROWSKI *et al.*, 1999). Auch wenn es gewisse Parallelen in der inflammatorischen Reaktion bei körperlicher Belastung sowie bei Trauma und auch Sepsis gibt, wird durch körperliche Belastung allein keine Sepsis ausgelöst, was für eine Anpassung des Körpers an die Cytokinfreisetzung unter Belastung und entsprechende Gegenreaktionen spricht (PEDERSEN und HOFFMAN-GOETZ, 2000).

1.6 Körperliche Belastung und oxidativer Stress

Die Bildung reaktiver Sauerstoff (ROS)- und Stickstoffderivate (RNS) ist eine generelle Begleiterscheinung oxidativer Prozesse bei höheren Organismen. Zu den wichtigsten Vertretern dieser auch unter dem Oberbegriff freie Radikale zusammengefaßter Derivate gehören das Superoxid- (O_2^-) und das Stickoxidradikal ($\cdot NO$). Desweiteren sind das Hydroxyl-Radikal (OH), die Hypochlorsäure (HOCL) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu nennen. Untersuchungen der letzten Jahre lassen erkennen, daß freie Radikale in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielen und auch unter körperlicher Belastung vermehrt gebildet werden. Generierungsmechanismen von ROS/RNS, ihre schädigende Wirkung und mögliche Schutzmechanismen, sowie der Zusammenhang zu körperlicher Belastung und Immunfunktion sollen im Verlauf näher erläutert werden.

Mögliche Generierungsmechanismen für ROS/RNS können durch die mitochondriale Atmung, das Xantinoxidasesystem und im Rahmen Metallionenkatalysierter Reaktionen entstehen. Ersterem obliegt eine Entstehung von Superoxidradikalen (O_2^-) infolge unvollständiger Reduzierung des bei der Atmung aufgenommenen Sauerstoffs (CAMHI *et al.*, 1995b), (DÖLL, 1994). Da unter sportlicher Belastung vermehrt Sauerstoff umgesetzt wird, entsteht auch vermehrt Superoxid in den Mitochondrien der Muskelzellen (SJÖDIN *et al.*, 1990). Das Enzym Xan-

inoxidase wird beim Abbau von AMP eingesetzt, welches durch den gesteigerten ATP-Abbau aufgrund unter körperlicher Belastung erhöhtem ATP-Bedarf entsteht. Dabei katalysiert die Xanthinoxidase die beiden letzten Schritte (Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnsäure) im Purinbasenabbausystem unter Bildung von O_2^- (SUMIDA *et al.*, 1989). Ein weiterer Mechanismus der ROS-Bildung wird durch die Umwandlung von H_2O_2 zu dem wesentlich aggressiveren Hydroxyl-Radikal OH mit Hilfe der Fenton-Reaktion in Anwesenheit von Eisen dargestellt (FENTON, 1894). Diese Umwandlung kann mit Hilfe der Superoxiddismutase (SOD) überall dort stattfinden, wo es zu einer gesteigerten Freisetzung von Eisen, dem Endprodukt des Hämoglobinabbaus kommt. Ein belastungsinduzierter Muskelschaden kann eben diesen Abbau begünstigen und die Fentonreaktion einleiten, wie O. Heine *et al.* (1995) im Rahmen eines Langstreckenlaufs zeigten. ROS/RNS können also nach körperlicher Belastung durch unterschiedlich ablaufende Reaktionen im biochemisch-physiologischen System des Menschen entstehen.

Weiterhin kann es zur Bildung von ROS/RNS durch immunkompetente Zellen, wie neutrophile Granulozyten sowie Monozyten/Makrophagen kommen, was zum Zwecke der Abwehr von Mikroorganismen geschehen kann und damit positiv auf den Schutz des Immunsystems wirkt (DÖLL, 1994). Die Zellen werden unter körperlicher Belastung aktiviert (GABRIEL und KINDERMANN, 1997), (PYNE, 1994). An ihrer Fähigkeit zur Bildung und Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale sind Cytokine beteiligt, die zum Beispiel die Stimulierbarkeit von neutrophilen Granulozyten zur Freisetzung von ROS steigern können (GOUGEROT-PODICALO *et al.*, 1996).

Eine wichtige Funktion dieser freien Radikale wurde schon genannt, nämlich die Fähigkeit zur Immunabwehr von pathogenen Mikroorganismen und Tumorzellen im unspezifischen Immunsystem, was am Krankheitsbild der chronischen Granulomatose verdeutlicht werden kann. Aufgrund eines Defektes der NADPH-Oxidase bleibt den Neutrophilen die Möglichkeit zur O_2^- -Produktion versagt (MALECH und GALLIN, 1987), ein Zustand, der mit einer erhöhten Infektinzidenz einhergeht. Darüberhinaus spielen ROS eine wichtige Rolle bei der Stimulation von Transkriptionsfaktoren wie des oben beschriebenen $NF\kappa$ -B, sie leiten die Zellapoptose ein und sind an adaptiven Trainingprozessen beteiligt (ROEBUCK, 1999).

Allerdings sind diese destruirenden Effekte der freien Radikale im Sinne der Immunabwehr nur so lange als positiv zu bewerten, solange es nicht zu erhöhten Konzentrationen von ROS/RNS kommt und damit zu einem Überwiegen freier Radikalbildner, welche nun nicht mehr durch die antioxidativen Schutzmechani-

men (weiter unten erläutert) ausgeglichen werden können. Diesen Zustand nennt man oxidativen Stress, dessen Entstehung durch Krankheit, Umwelteinflüsse oder körperliche Belastung hervorgerufen werden kann (DÖLL, 1994), (THIDUS und HOUSTON, 1995), (WINNEFELD, 1996). Die Folge sind Schäden an Proteinen, Nucleinsäuren und Membranlipiden. Die oxidativen Eigenschaften von ROS/RNS führen zur Oxidation zum Beispiel von Membranlipiden, was auch als Lipidperoxidation bezeichnet wird. Dabei wird aus dem betroffenen Lipid selbst durch Abzug von Wasserstoffatomen ein sehr reaktives Peroxylradikal (ARUOMA, 1994), was weitere oxidative Kettenreaktionen an Lipiden der Zellmembran und auch an anderen Stellen des Organismus einleiten kann. Durch die Peroxidation ändert sich die Membranfluidität und -funktion, letztendlich kommt es über einen unkontrollierten Calcium-Einstrom zum Zelltod (WINNEFELD, 1996). Eine Oxidation von Proteinen führt sowohl zu beschleunigter Proteindegradation als auch zu Störung der physiologischen Funktion, was am Beispiel der Glutaminsynthetase demonstriert werden kann (LEVINE, 1983). Ebenfalls eine funktionelle Beeinträchtigung erfahren Enzyme mit Thiolgruppen. Und auch die Beschädigung der DNA durch ROS/RNS durch Oxidation kann einen potentiellen Faktor in der Karzinogenese darstellen (SIMIC, 1992). Neben Karzinogenese und Arteriosklerose (siehe Lipidperoxidation) scheint oxidativer Stress in gewissem Maße auch an Alterungsprozessen sowie entzündlichen und neurovegetativen Erkrankungen beteiligt zu sein (HALL, 1994), auch wenn nicht geklärt ist, ob oxidativer Stress Ursache oder Folge dieser Erkrankungen ist.

In Bezug auf körperliche Belastung können oben genannte Veränderungen natürlich eine Gefahr für Sportler und vor allem für Hochleistungssportler darstellen, da es aufgrund der Erhöhung der Körperkerntemperatur (PEDERSEN *et al.*, 1997) und aufgrund des erhöhten Sauerstoffumsatzes unter körperlicher Belastung zur Bildung freier Radikale (ROS/RNS) kommt.

Aus diesem Grund beschäftigen sich Forschungsgruppen seit längerem mit den antioxidativen Schutzmechanismen des Körpers, die ROS/RNS entgegenwirken. Hierbei kann man exogene Antioxidantien wie zum Beispiel Vitamin A, C und E von endogenen unterscheiden, zu denen neben der schon erwähnten Superoxiddismutase (SOD), die Catalase, die Glutathionperoxidase und schließlich unsere bereits oben beschriebenen Stressproteine gehören.

1.7 Fragestellung

Alle genannten Stressproteine, zu denen auch die Stickoxidsynthase gezählt werden kann, können wichtige Funktionen im Immunsystem von Leistungssportlern übernehmen. Vor allem in Bezug auf inflammatorische Prozesse stellt sich immer wieder die Frage, ob Sportler gut oder vielleicht sogar besser abgehärtet (geschützt) sind als Normalpersonen. Viele Studien, die die immunkompetenten Zellen von Sportlern unmittelbar nach körperlicher Belastung untersucht haben, bekräftigen die Annahme, daß die Stressproteine auf die Belastung zytoprotektiv reagieren. Allerdings gibt es nach wie vor nur wenige Studien, die die Expression von Stressproteinen in Ruhe bzw. unter Trainingsbedingungen jedoch nicht unmittelbar nach der Akutbelastungsphase untersucht haben und mit der Reaktion von untrainierten Probanden verglichen haben.

In diesem Zusammenhang ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Lassen sich die Stressproteine (HSP27, HSP70, HO-1, iNOS) in mononukleären Zellen von Trainierten und Untrainierten (im Ruhezustand) mit LPS stimulieren? Was zeigt sich auf Proteinebene?
2. Läßt sich die iNOS in mononukleären Zellen von Trainierten und Untrainierten (im Ruhezustand) mit Cytokinen und LPS stimulieren? Welche Ergebnisse und Unterschiede lassen sich auf Proteinebene erkennen?
3. Wie sieht die Expression der Stressproteine nach Stimulation mit Hitzeschock aus?
4. Gibt es Unterschiede in der Basalexpression aller oben genannten Enzyme in mononukleären Zellen von trainierten und untrainierten Probanden im Ruhezustand? Welche Unterschiede zeigen sich auf Proteinebene?
5. Gibt es Unterschiede bei Trainierten und Untrainierten (im Ruhezustand) im Anstieg der Stressproteine in mononukleären Zellen durch Hitzeschockexposition?
6. Gibt es Unterschiede bei Trainierten und Untrainierten (im Ruhezustand) hinsichtlich iNOS-Expression nach Cytokin- und LPS-Stimulation?
7. Welchen Einfluß hat regelmäßiges, intensives Laufausdauertraining auf die Streßreaktion der Leukozyten gemessen anhand ihrer intrazellulären Proteinexpression von HSP27, HSP70, HO-1, iNOS. In einer Querschnittstudie wurden Leukozyten von trainierten und untrainierten Probanden verglichen.

Kapitel 2

Material

2.1 Probanden

Die Versuchspersonen setzten sich zusammen aus einer Gruppe von 22 trainierten männlichen Sportlern (TR), die seit mehr als 5 Jahren mindestens 50 km Lauftraining oder 7 Stunden Ausdauertraining (laufen, schwimmen, radfahren) pro Woche absolvierten und einer Kontrollgruppe von 20 nicht trainierten (UT) ebenfalls männlichen Normalpersonen, deren sportliche Aktivitäten weniger als 2 Stunden pro Woche betragen.

Alle Probanden waren einen Tag vor der Blutentnahme wenig oder überhaupt nicht körperlich aktiv, hatten sich keinem außergewöhnlichen psychischen Stress ausgesetzt und auf Aufenthalte in warmen Gefilden oder in der Sauna verzichtet.

Ebenso waren alle Studienteilnehmer Nichtraucher und stoffwechselgesund und konsumierten weder Medikamente noch Vitaminpräparate.

Das Durchschnittsalter der Probanden betrug $30,2 \pm 7,1$ Jahre.

2.2 Zellmaterial

Es wurden aus humanem, venösem Vollblut isolierte mononukleäre Zellen (PBMC) zur Antikörpermarkierung und durchflußzytometrischen Auswertung verwendet. Zu dieser Zellgruppe gehören

- Lymphozyten (70-95%)
 - B-Lymphozyten

Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, Steinheim
Tumornekrosefaktor α (TNF α)	R & D Systems, Wiesbaden
Interferon γ (INF γ)	R & D Systems, Wiesbaden

Tabelle 2.1: Verwendete Stimulatoren

Mouse IgG1 Isotyp Kontrolle	Biozol Diagnostica, Eching
Anti-Heme Oxygenase-1 (= HO-1), IgG1	Biomol, Hamburg
Anti-Hitzeschockprotein 27 (= HSP27), IgG1	Biomol, Hamburg
Anti-Hitzeschockprotein 70 (= HSP70), IgG1	Biomol, Hamburg
Anti-NOS2(C-11) (= iNOS), IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Mouse IgG+IgM (= Sekundärantikörper), Fluorescein (DTAF) konjugiert	Dianova, Hamburg
CD 14 (= Oberflächenmarker), PE konjugiert	Becton Dickinson, USA
Anti-NF Kappa B, p65 (RelA), polyklonal	Biomol, Hamburg
Anti-Rabbit IgG (= Sekundärantikörper) Fluorescein (DTAF) konjugiert,	Dianova, Hamburg

Tabelle 2.2: Verwendete Antikörper

– T-Lymphozyten

- * CD8/zytotoxische Zellen
- * CD4/T-Helferzellen
- * Null-Zellen, K-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

- Monozyten (5-16%)

Venöses Blut wurde den Probanden in EDTA-Röhrchen immer morgens zwischen 8.00 und 9.00 Uhr zu gleichen Zeiten in sitzender Position aus der Ellbeugenvene abgenommen.

Lymphoflot	Fa. Biotest, Dreieich
Fix & Perm (= Reagenz A & B)	An der Grub, Kaumberg
Natriumazid (= NaN_3 0,1 %)	Merck, Darmstadt
Bovines Albumin (= BSA 0,1 %)	Sigma, Steinheim

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien

PBS	Life Technologies, Eggenstein
Aqua dest.	Delta Pharma, Boehringer Ingelheim
RPMI (zuzüglich Hepes)	Biochrom, Berlin

Tabelle 2.4: Verwendete Pufferlösungen und Medien

Zentrifuge mit Platteneinsatz	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Wasserbad	GFL-GmbH, Burgwedel
Stericult 200 Incubator	Forma Scientific, USA
Mikroshaker, Mikromix 4	Milenia
Vortex-Gerät Typ REAX top	Heidolph, Kehlheim
Durchflußzytometer Epics XL2-MCL	Coulter, Krefeld
Sterile Werkbank (Flow)	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau

Tabelle 2.5: Verwendete Geräte

EDTA-Blutentnahmemonovette	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg
50 ml Blue Caps	Greiner, Frickenhausen
Falcon, 15 ml	Becton Dickinson, USA
FACS-Röhrchen (Falcon)	Becton Dickinson, USA
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Einmalpipetten (5, 10, 25 ml)	Costar Bodenheim
Pipettenspitzen gelb, blau	Eppendorf Hamburg
Eppendorf 1,5 ml und 2 ml Tubes	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatte, Rundboden	Cellstar, Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Tabelle 2.6: Verwendete Labormaterialien

Kapitel 3

Methoden

3.1 Studienaufbau

Allen 42 Probanden wurden nach deren schriftlich gegebener Einverständniserklärung morgens zwischen 8.00 und 9.00 Uhr jeweils 80 ml peripheres EDTA-Blut in EDTA-Monovetten in sitzender Position abgenommen.

Ebenso wurde von jedem Probanden eine Blutbildanalyse durchgeführt, sowie einzelne Laborparameter bestimmt, die Aufschluß über vorangegangene Streßsituationen geben konnten. Der Trainingszustand des einzelnen Studienteilnehmers und entsprechende anthropometrische Daten wurden in Fragebögen ermittelt.

Folgende Tabellen stellen dazu sämtliche Werte als Mediane mit 95% Konfidenzintervall dar.

Leukozytäre Subpopulation	Trainiert (TR) ($10^9/l$)	Untrainiert (UT) ($10^9/l$)
Neutrophile	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	0.25 (0.20–0.30)	0.20 (0.14–0.26)
Basophile	0.06 (0.03–0.06)	0.05 (0.05–0.06)
Gesamtleukozyten	5.36 (4.55–6.18)	5.40 (4.13–6.67)

Tabelle 3.1: Anzahl der Zellen leukozytärer Subpopulationen bei Trainierten ($n = 22$) und Untrainierten ($n = 20$)

Parameter	Trainiert (TR)	Untrainiert (UT)
Anthropometrische Daten		
Alter (Jahre)	31.5 (28.5–34.6)	28.5 (25.4–31.6)
Größe (cm)	177 (175–181)	181 (178–184)
Gewicht (kg)	68.0 (64.3–71.7)	77.9 (74.1–81.7)
Laborwerte		
CRP (mg/l)	0.19 (0.10–0.29)	0.21 (0.11–0.31)
Cortisol ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	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)

Tabelle 3.2: Anthropometrische Daten und Laborwerte bei Trainierten und Untrainierten

3.2 Abfolge der Arbeitsschritte

Da die durchgeführten Analysen eine unterschiedliche Reihenfolge der Arbeitsschritte erforderten wird an dieser Stelle eine Übersicht vorangestellt. Stimuliert wurde auf zwei verschiedene Arten; zum einen mit Hitzeschock, zum anderen mit Cytokinen und LPS. Die Stimulation mit Hitzeschock lief nach folgendem Schema ab:

1. Blutabnahme
2. Stimulation mit Hitzeschock
3. Inkubation
4. Auftrennen der Zellen mit Dichtegradient
5. Analyse (HSP27, HSp70, HO-1, iNOS)

Die LPS-, und Cytokin-Stimulation wurde durchgeführt wie folgt:

1. Blutabnahme
2. Auftrennen der Zellen mit Dichtegradient
3. Stimulation der PBMC mit LPS und Cytokinen

4. Inkubation
5. Analyse (iNOS, NF κ -B)

Man beachte den Unterschied der Hitzeschockstimulation zur LPS- und Cytokin-Stimulation in Schritt 2 und 3. Die Überlegungen dazu und die Durchführung der Stimulationen wird in den nächsten Abschnitten im Detail beschrieben.

3.3 Antikörper

Es wurden insgesamt vier verschiedene monoklonale Antikörper verwendet: gegen die Hitzeschockproteine HSP 27 und HSP 70, gegen die HO-1 (bzw. HSP 32) und gegen die iNOS.

Die mit Hitzeschock stimulierten Zellen wurden mit jeweils allen vier Antikörpern markiert. Die Zellen, die mit Cytokinen und LPS stimuliert wurden, wurden nur mit Antikörpern gegen die iNOS markiert.

3.4 Stimulation mit Hitzeschock

Zunächst wurden von jedem Probanden jeweils 5 ml EDTA-Blut auf zwei 50 ml Falcon Blue Caps verteilt, wovon ein Blue Cap als Negativkontrolle 3 h lang bei 37°C inkubiert wurde, während die zweite Blutprobe 2 h lang in einem Wasserbad bei 41,8°C einem in-vitro Hitzestress ausgesetzt wurde und danach eine weitere Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubierte.

Im Anschluß an die Stimulation konnten mononukleäre Zellen von den restlichen Zellen des EDTA-Blutes mit Hilfe des Dichtegradienten Lymphoflot isoliert werden. Hierzu wurde das inkubierte Blut im Verhältnis 1:1, in unserem Fall 5 ml Blut auf 5 ml vorgelegten Dichtegradient aufgetragen und 20 Minuten bei $400 \times g$ und 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Der entstandene Zellring aus mononukleären Zellen wurde daraufhin abpipettiert. Nach 2 ergänzenden Waschschritten mit jeweils 50 ml PBS-Puffer konnten die Zellen fixiert und anschließend mit Antikörpern markiert werden.

Ein Waschschriff setzt sich zusammen aus Auffüllen der Zellen mit PBS-Puffer, anschließender Zentrifugation, danach Abschütten des Überstandes und Resuspension des Zellpellets mit dem Vortex-Gerät.

Beim Auftrennen der Zellen mit Lymphoflot sind die Dauer und Zentrifugenumdrehungen festgelegt, demnach wird im ersten Waschschrift 10 Minuten mit $230 \times g$ und im zweiten Schritt 10 Minuten mit $110 \times g$ zentrifugiert.

3.5 Stimulation mit Cytokinen und LPS in isolierten PBMC

Da zahlreiche Vorversuche von LPS- und Cytokin-Stimulation im Vollblut kaum Effekte gezeigt haben, sind wir dazu übergegangen, die mononukleären Zellen (PBMC) erst nach Isolierung aus dem Vollblut zu stimulieren (beides wird im Ergebnisteil gezeigt).

Es wurden dazu 2malig je 5 ml Blut über je 5 ml Lymphoflot im Verhältnis 1:1 geschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei $400 \times g$ konnte der Zellring abgetragen werden und nach 2maligem Waschen mit PBS-Puffer (Waschschritte siehe Hitzeschockstimulation) wurde der Zellbestand mit je 2 ml RPMI-Medium resuspendiert. In diesem Medium wurde eine Zellprobe mit LPS (End-Konz.: 100 ng/ml) und Cytokinen stimuliert. Als Cytokine wurden $\text{TNF}\alpha$ in einer Konzentration von 50 ng/ml und $\text{INF}\gamma$ ebenso mit 50 ng/ml verwendet. Die 2. Probe stellte die Negativkontrolle ohne Stimulation dar.

Im Anschluß daran wurden die Proben 3h lang (siehe Ergebnisteil zur Erläuterung) bei 37°C inkubiert, bevor sie weiterverarbeitet wurden. Damit die Fixierung erfolgen konnte, wurden die Zellen, die mit LPS und Cytokinen stimuliert wurden, nach abgelaufener Inkubationszeit durch einen zusätzlichen Waschschrift mit jeweils 50 ml PBS-Puffer von dem RPMI-Medium gereinigt. Dieser Schritt dauerte 15 Minuten bei einer Zentrifugenumdrehung von $200 \times g$.

3.6 Zellfixierung der mononukleären Zellen

Zur Zellfixierung diente die formaldehydhaltige Lösung Reagenz A aus dem Fix & Perm Kit. Je nach Anzahl der Ansätze (1 Ansatz entspricht 1×10^6 Zellen) wurde im 15 ml-Röhrchen dem resuspendierten Zellpellet die entsprechende Menge an Reagenz A ($50 \mu\text{l}$ Reagenz A/ 1×10^6 Zellen) zugesetzt.

Im Anschluß daran, wurden die Zellen im Vortex-Gerät kurz aufgeschüttelt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Mit 15 ml modifiziertem PBS-Puffer (zuzüglich je 0,1% NaN_3 und 0,1 % BSA; = FACS-Puffer) folgte ein Waschschrift mit einer 5-minütigen Zentrifugation von $200 \times g$, der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet gevortext. Daraufhin wurde den Zellen pro Ansatz 200 μl modifizierter PBS-Puffer zugesetzt und nach erneutem Durchmischen im Vortex-Gerät konnten die Zellen auf die Mikrotiterplatte übertragen werden, indem in jedes Well 200 μl Zellsuspension pipettiert wurde.

Ein letzter Waschschrift wurde nun in der Mikrotiterplatte durchgeführt, indem wie oben 5 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert wurde. Die Überstände wurden abgeschüttet und die Zellen im Mikrohaker resuspendiert. In allen weiteren Waschschriften, die in der Mikrotiterplatte erfolgten, wurde 200 μl gekühlter FACS-Puffer je Well aufgetragen, anschließend bei 10°C mit der zuletzt beschriebenen Zentrifugeneinstellung zentrifugiert und wieder nach Abgeschütten des Überstandes im Mikrohaker resuspendiert.

3.7 Intrazelluläre Antikörpermarkierung

Für die durchflußzytometrische Messung und Auswertung der relevanten Parameter war eine intrazelluläre, indirekte Antikörpermarkierung notwendig.

Hierfür wurde das Detergenz Reagenz B aus dem Fix & Perm Kit als Permeabilisator benötigt, um die Zellmembran für die Antikörper durchlässig zu machen. Dabei wurden pro Well 50 μl Reagenz B und 1 μg des entsprechenden Primäran-tikörpers, der in 20 μl FACS-Puffer gelöst war, unmittelbar nach der Permeabili-sierung aufgetragen und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Der Inkuba-tionszeit schlossen sich zwei weitere Waschschrift an.

Daraufhin erfolgte die Markierung mit dem Fluorescein-konjugierten Sekundäran-tikörper, wobei pro Ansatz mit 1 μg , gelöst in 20 μl FACS-Puffer, markiert wurde. Eine 20-minütige Inkubation im Dunkeln und zwei weitere Waschschrift bildeten den Abschluß der intrazellulären Antikörpermarkierung.

3.8 Intrazelluläre Antikörpermarkierung: NF κ -B

Zur Verifizierung der Stimulierbarkeit sprich der Reaktionsfähigkeit der Zellen auf LPS- und Cytokinstimulation wurde die Expression des LPS-sensitiven Transkriptionsfaktors NF κ -B gemessen. NF κ -B stellt in menschlichen Makrophagen die Basis für die NO-Produktion durch LPS- und INF γ -Stimulation dar, wie Zhang *et al.* (1996) vermuten. Im weiteren Verlauf wird dies noch ausführlich diskutiert werden. Im Wesentlichen gab es keine großen Unterschiede in der Methode zu der oben beschriebenen Stimulation mit Cytokinen und LPS. Es wurde mit denselben Konzentrationen einmal mit LPS allein und einmal mit LPS plus Cytokinen in RPMI resuspendierten Zellen stimuliert. Die Inkubationszeit betrug allerdings 12 Stunden. Der NF κ -B Antikörper wurde mit 1 μ g, gelöst in 20 μ l FACS-Puffer eingesetzt, als Zweitantikörper verwendeten wir einen Rabbit-Antikörper ebenfalls 1 μ g, gelöst in 20 μ l FACS-Puffer pro Well.

3.9 Doppelmarkierung (Oberfläche und intrazellulär)

Bei der Doppelmarkierung wurde nach stattgefundener Auftrennung der Zellen mit Hilfe des Dichtegradienten (Mengenangaben sowie Waschschrte entsprechen den gleichen Arbeitsschritten wie in Stimulation mit Hitzeschock beschrieben) und der anschließenden Übertragung auf die Mikrotiterplatte ein zusätzlicher Arbeitsschritt eingefügt, noch bevor die Zellen mit Reagenz A fixiert wurden. In diesem Schritt wurden die Zellen mit 1 μ g, gelöst in 20 μ l FACS-Puffer PE-CD14-Oberflächendirektmarker pro well bzw 1 μ g, gelöst in 20 μ l FACS-Puffer der entsprechender PE-Negativkontrolle markiert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit im Dunkeln und auf Eis und zwei nachfolgenden Waschschrten(je 5 Minuten, 200 \times g) erfolgten dann die Zellfixierung und intrazelluläre Markierung (siehe oben). Diese Doppelmarkierung erlaubt die Klassifizierung der beiden eingefassten Zellpopulationen Monozyten und Lymphozyten und wird im Ergebnisteil anhand der Abbildung Doppelmarkierung verdeutlicht.

3.10 Stimulation mit LPS im Vollblut im Rahmen der Vorversuche

Zur LPS-Stimulation im Vollblut wurden 2-3ml Blut aus den EDTA-Blutentnahmemonovetten in je zwei 50ml Falcon Blue Caps verteilt. Ein Blue Cap davon wurde mit LPS in Konzentrationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml stimuliert (siehe Zeit-Konzentrationsreihe im Ergebnisteil), das andere Blue Cap stellte die Negativkontrolle dar. Aufgefüllt wurde das Blut mit RPMI-Medium und Heparin (300 μ l Heparin pro 100 ml RPMI) und für 3, 6, 12 und 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen 5 Minuten bei $230 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und die Zellen im Vortexgerät resuspendiert. Anschließend wurde mit PBS-Puffer aufgefüllt und weitere 5 Minuten bei $230 \times g$ zentrifugiert, der Überstand erneut abgeschüttet und die Zellen gevortext. Die verbliebene Menge an Zellsuspension wurde nun auf die gleiche Menge Lymphoflot aufgetragen und nach den gleichen Schritten wie sie bei der Hitzeschock- und Cytokinstimulation näher beschrieben wurden zentrifugiert und desweiteren fixiert und markiert nach oben beschriebenem Schema.

3.11 Durchflußzytometrie

Die Zellen aus den Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 200 μ l modifiziertem PBS-Puffer in für die durchflußzytometrische Analyse geeignete Reagenzgläser überführt und mit weiteren 400 μ l normalem PBS-Puffer je Reagenzglas aufgefüllt.

In unserer Versuchsanordnung diente als Lichtquelle ein Argonlaser mit einer Emissionswellenlänge von 488 nm, der auf die hydrodynamisch (Zellsuspension wird mit Hilfe von Überdruck in die Meßküvette gepreßt) fokussierte Zellsuspension gerichtet wurde. Somit konnte nach Eingabe der Probe das opto-elektronische Detektionssystem die Streulicht- und Fluoreszenzlichtdaten jeder einzelnen die Meßküvette passierenden Zelle ermitteln. Entsprechend des Fluoreszenzspektrums des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs (Fluorescein) wählten wir einen Filter mit 525 nm Wellenlänge. Pro Probe wurden 100.000 positive Ereignisse, was einer Auswertung von 100.000 Zellen entspricht von den mit Hitzeschock stimulierten Zellen gemessen und 40.000 Ereignisse von den mit LPS und Cytokinen stimulierten Zellen. Mit Hilfe des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes, die am Zytometer eingestellt werden, war es nun möglich, die zwei Hauptpopulationen der mononu-

kleären Zellen (PBMC), nach Größe und Granularität zu bestimmen. Hierzu erfolgte eine Darstellung im Zwei-Parameter-Streulichthistogramm (Abb. 3.1). Die einzelnen Leukozytenpopulationen wurden nun durch Umschließen amorpher Regionen (Gating) ausgewählt und die Fluoreszenzdaten jedes einzelnen dieser Gates der weiteren Auswertung zugeführt. Das Gating bietet also die Möglichkeit, Zellpopulationen getrennt zu untersuchen und schließt tote Zellen aus. Zur genauen Verifizierung der mittels Gating eingegrenzten Leukozytenpopulationen wurden stichprobenweise Doppelmarkierungen durchgeführt, die gegen das entsprechende intrazelluläre Protein und gleichzeitig gegen CD 14, ein spezifisches Oberflächenantigen der Monozyten, gerichtet waren.

Die Darstellung der aus den einzelnen Gates stammenden Daten der Einzel-Fluoreszenzmessung erfolgte im Ein-Parameter-Histogramm mit einer logarithmischen Skalierung der x-Achse von 0,1 bis 100.000, Abbildung 3.1 zeigt zur Veranschaulichung eine logarithmische Skalierung der x-Achse von 0,1 bis lediglich 1000. Mittels einer parallelen Mitdarstellung der Daten der Negativkontrolle konnte eine Trennung in negative und positive Ereignisse vorgenommen werden, was dem Abgleich der Hintergrundfluoreszenz bzw. der Verringerung unspezifischer Bindungen diente. Die Angabe der Daten der Fluoreszenzmessung erfolgte in Prozent positiver Zellen und als Mittelwert der Fluoreszenzintensität aller positiver Ereignisse (mfc).

3.12 Statistik

Die statistischen Berechnungen und die graphischen Darstellungen der erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Software-Pakets JMP (SAS Institute Inc., USA) für Windows98 vorgenommen.

3.13 Vergleich der basalen Expression

Um Unterschiede des basalen Expressionsverhaltens bei trainierten und untrainierten Probanden zu erkennen, wurden Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle errechnet. Mit Hilfe von Rauten (Diamonds) (Abb. 3.2), deren Querachse auf Höhe der Mittelwerte liegt, während die senkrechte Achse Lage und Ausmaß der Konfidenzintervalle repräsentiert, wurden diese Werte dargestellt. Die einzelnen Punkte stellen die jeweiligen Probanden nach ihrem Expressionsverhalten dar.

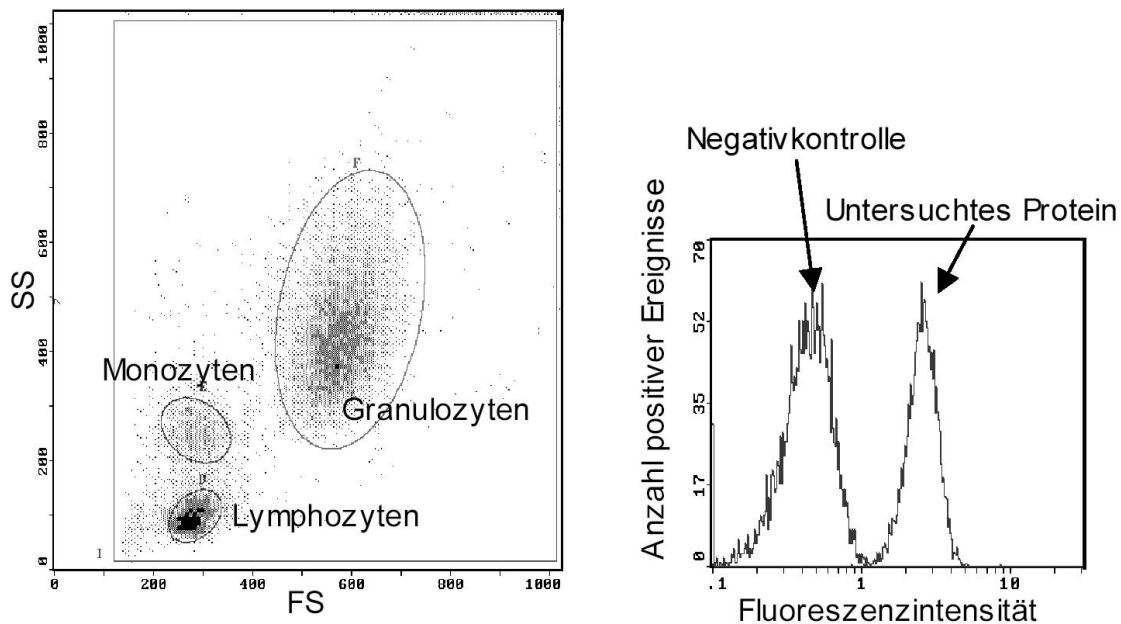


Abbildung 3.1: Die linke Graphik zeigt das Beispiel eines Streulicht-Histogramms (Zweiparameter-Punkthistogramm) von Leukozyten. Die einzelnen Zellpopulationen werden nach ihren Unterschieden hinsichtlich Zellgröße (Vorwärtsstreulicht= FS) und Granularität (Seitwärtsstreulicht=SS) im Durchflußzytometer differenziert. Die rechte Graphik stellt ein Häufigkeits-Histogramm der Fluoreszenzintensität dar. Die x-Achse repräsentiert die Signalstärke (logarithmische Skalierung von 0,1 bis 100), die y-Achse die Zellzahl. Das Histogramm links stellt die Daten der Negativkontrolle dar, das Histogramm rechts die positiven Ereignisse des untersuchten Proteins.

Eine eventuelle Überlappung der 95%-Konfidenzintervalle wird schon bei Betrachtung der Diamonds sichtbar und zeigt, daß Messwerte/Gruppen nicht signifikant verschieden sind (GARDNER und ALTMAN, 1986). Die Prüfung der Signifikanzen erfolgte zusätzlich durch Anwendung des 2-Proben t-Tests für ungepaarte Betrachtungen. Bei $p < 0,05$ wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen.

3.14 Vergleich der verschiedenen in vitro Stimulationen

Auch hierbei wurden Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall gegeneinander betrachtet. Ebenso wurden die Differenzen vor und nach Stimulation in Diamonds dargestellt. Von einem Einfluß der Reize auf das Expressionsverhalten wurde dann

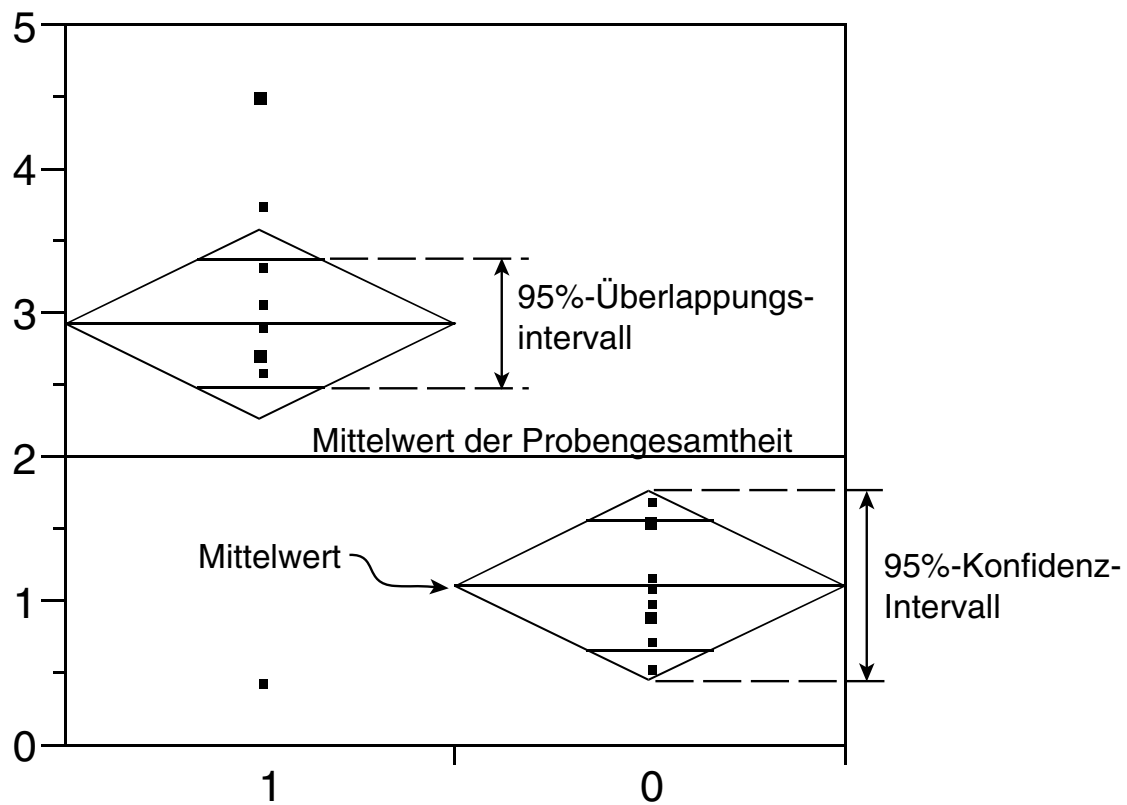


Abbildung 3.2: Die in den Abbildungen verwendeten Symbole und ihre Entsprechungen

ausgegangen, wenn die Raute keine Verbindung zum Nullpunkt aufwies, dieser somit außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls lag. Der Signifikanzlevel für Unterschiede zwischen TR und UT wurde bei Anwendung des t-Tests ebenfalls bei $p < 0,05$ festgelegt.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Stimulation mit LPS im Vollblut

Die Vorversuche zu dieser Studie dienten der Etablierung der Stimulation mit LPS im Vollblut. Die Zeit-Konzentrationskurven in den folgenden Abbildungen geben näher Aufschluß darüber. Es ist ein repräsentatives Beispiel aus mehreren Wiederholungen der Experimente für die iNOS und für HSP70 dargestellt.

Die Abbildungen 4.1–4.2 zeigen die Expression von HSP70 und der iNOS in Abhängigkeit von Inkubationszeit und LPS-Konzentration. Die Inkubationszeiten betragen 3, 6, 12 und 24 Stunden, die LPS-Konzentrationen reichten von 0 ng/ml (Negativkontrolle) über 1 ng/ml, 10 ng/ml bis hin zu 100 ng/ml LPS. Die Abszisse zeigt die Inkubationszeit in Stunden. Die Ordinate stellt die Expression des entsprechenden Proteins in Lymphozyten (Diagramm links) und Monozyten (Diagramm rechts) gemessen an der Fluoreszenzintensität (mfc) dar. Die einzelnen Kurven beschreiben die unterschiedlichen LPS-Konzentrationen, die bei der Stimulation verwendet wurden.

Abbildung 4.1 beschreibt die HSP70-Expression nach Stimulation. Die Monozyten scheinen eine ansteigenden Tendenz in Abhängigkeit der Inkubationszeiten aufzuzeigen. Jedoch zeigt sich nach der Inkubationszeit von 6 Stunden vor allem bei der Konzentration von 100 ng/ml eher ein Abfall der HSP70-Expression als ein Anstieg. Signifikante Ergebnisse konnten auch nach mehrfacher Wiederholung der Messungen nicht erfaßt werden.

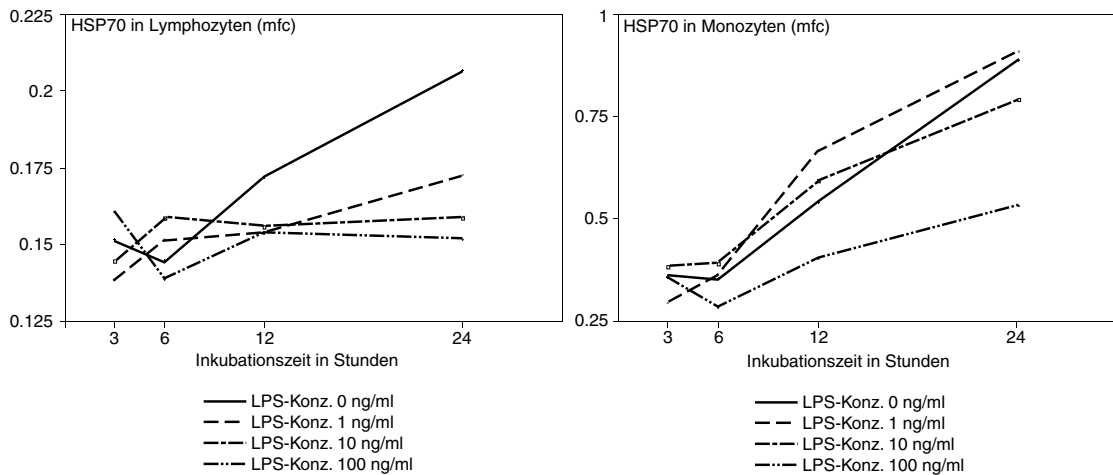


Abbildung 4.1: HSP70-Expression in Abhängigkeit von Inkubationszeit und LPS-Konzentration gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc)

Auch die Abbildung der iNOS-Expression 4.2 weist sehr geringfügige Veränderungen auf. Ähnlich der Ergebnisse der HSP70-Expression zeigt sich hauptsächlich bei den Monozyten aber auch bei den Lymphozyten ein geringer Anstieg der Konzentrationskurven der jedoch insgesamt nicht wesentlich ins Gewicht fällt.

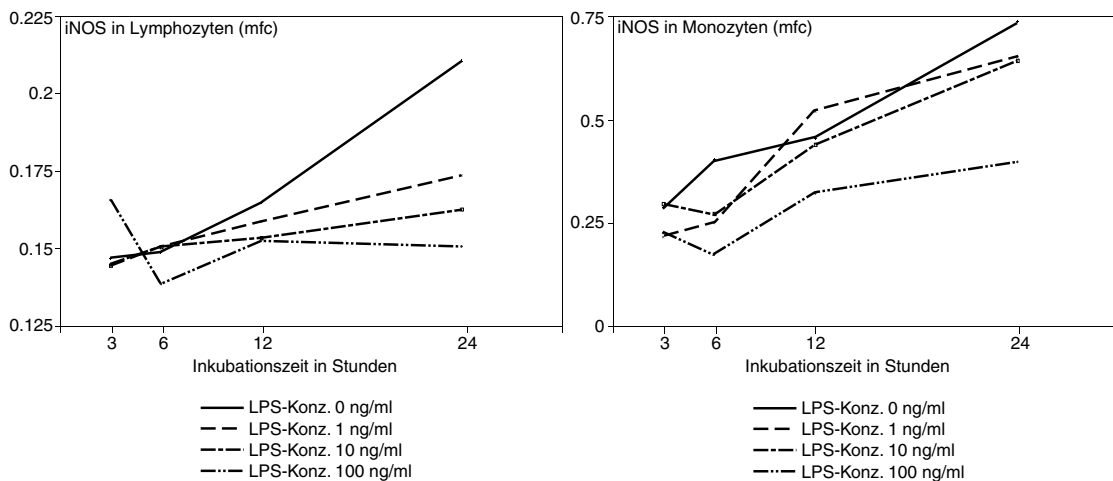


Abbildung 4.2: iNOS-Expression in Abhängigkeit von Inkubationszeit und LPS-Konzentration gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc)

Mit unserer Methode (siehe auch Material und Methoden) der LPS-Stimulation im Vollblut konnten weder durch unterschiedliche LPS-Konzentrationen noch durch unterschiedliche Inkubationszeiten signifikante Ergebnisse erzielt werden, was für alle verwendeten Stressproteine gleichermaßen gilt. Dies soll anhand der Zeit-Konzentrations-Kurven der HSP70- und der iNOS-Expression (Abb. 4.1 und Abb. 4.2) demonstriert werden. Die Abbildungen lassen keine Abhängigkeit von

der LPS-Konzentration erkennen. Eine Abhängigkeit zur Inkubationszeit scheint in geringem Maße zu bestehen, ist jedoch ebenfalls nicht signifikant.

Aus diesem Grund setzten wir zusätzliche Stimulatoren wie Cytokine vor allem zur Induktion der iNOS ein und versuchten neben der Vollblutstimulation, PBMC isoliert zu stimulieren (siehe unten).

4.1.2 Stimulation mit Cytokinen in Kombination mit LPS im Vollblut im Vergleich zu PBMC

Da sich bei der LPS-Stimulation im Vollblut insgesamt wenig Effekte zeigten sind wir dazu übergegangen, alle vier Stressproteine letztendlich mit Hitzeschock zu stimulieren. Für die iNOS allerdings setzten wir zusätzlich weitere Stimulatoren wie Cytokine ($\text{TNF}\alpha$ und $\text{INF}\gamma$) ein, die auch in Kombination mit LPS zum Einsatz kamen. Bei der Stimulation mit Cytokinen machten wir auch hier den Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten und stimulierten sowohl im Vollblut als auch vorher isolierte PBMC direkt.

Die Abbildungen 4.3–4.5 beschreiben die Expression der iNOS nach Stimulation mit Cytokinen ($\text{TNF}\alpha$ und $\text{INF}\gamma$ in einer Konzentration von je 50 ng/ml) und nach Stimulation mit denselben Cytokinen in Kombination mit LPS (100 ng/ml). Jede der Abbildungen stellt einen repräsentativen Versuch aus drei Versuchen dar.

Abbildung 4.3 zeigt die iNOS-Expression von PBMC, die vor Stimulation mit Cytokinen und LPS aus dem Vollblut mittels Lymphoflot isoliert wurden, und im Vergleich dazu von im Vollblut stimulierten Zellen. Dabei ist deutlich zu sehen, daß LPS-stimulierte PBMC eine höhere iNOS-Expression aufweisen als die LPS-stimulierten Zellen im Vollblut. Außerdem zeigen sich die größten Effekte bei der kombinierten Stimulation von Cytokinen und LPS, mehr Effekte also als bei der Cytokinstimulation alleine. Im weiteren Studienverlauf wurden aufgrund dessen die mononukleären Zellen mit Cytokinen plus LPS direkt stimuliert, also nachdem sie vorher aus dem Vollblut mit Hilfe des Dichtegradienten Lymphoflot isoliert wurden.

Zusätzlich zu dem Vergleich von im Vollblut und in PBMC stimulierten Zellen wurde in Abbildung 4.4 der Versuch mit unterschiedlichen Inkubationszeiten erbracht. Hierbei ist eine Zunahme der iNOS-Expression bei den Zellen erkennbar, die über 3 Stunden inkubiert wurden. Bei der Inkubationszeit von 12 Stunden gewinnt man eher den Eindruck, daß die iNOS-Expression der Zellen herunterreguliert wird.

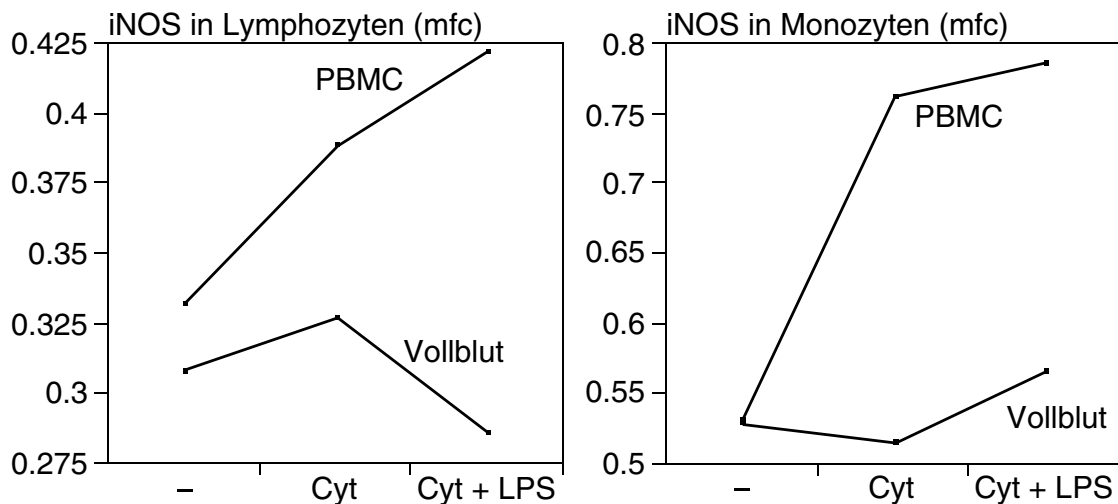


Abbildung 4.3: iNOS-Expression nach Stimulation mit Cytokinen (Cyt ($\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$)) und LPS (Cyt + LPS) im Vollblut und in PBMC. Das linke Drittel der Abszisse stellt die Negativkontrolle dar, das mittlere Drittel die Cytokinstimulation und das rechte Drittel die Stimulation mit Cytokinen plus LPS. Die Ordinate steht für die iNOS-Expression gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer.

Beides waren in diesem Fall stimulierte PBMC.

Ein weiterer Vergleich wurde durch den Versuch mit unterschiedlichen Cytokin-konzentrationen dargestellt. Abbildung 4.5 stellt die iNOS-Expression in PBMC in Abhängigkeit von unterschiedlichen Cytokinkonzentrationen, zum einen 50 ng/ml je Cytokin und zum anderen 80 ng/ml je Cytokin, dar. Ein Anstieg läßt sich bei 50 ng/ml erkennen, bei 80 ng/ml nimmt die iNOS-Expression ab.

Nach diesen Vorversuchen wählten wir für die Untersuchung der iNOS bei trainierten und untrainierten Probanden folgende Bedingungen: eine kombinierte Stimulation von Cytokinen und LPS in den Konzentrationen von 50 ng/ml je Cytokin und 100 ng/ml für LPS und eine Inkubationszeit von 3 Stunden zur Stimulation von isolierten PBMC.

4.1.3 $\text{NF}\kappa\text{-B}$ als Kontrolle

Da alle bisher dargestellten Vorversuche eine unbefriedigende Expression insbesondere der iNOS durch die LPS-Stimulation zeigten, wurde der Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{-B}$ als Zusatz herangezogen, um die Ansprechbarkeit der Zellen durch LPS zu überprüfen. $\text{NF}\kappa\text{-B}$ ist ein Transkriptionsfaktor, dessen LPS-bedingte Regulation verschiedenen Veränderungen auf Proteinebene vorangeht inklusive der

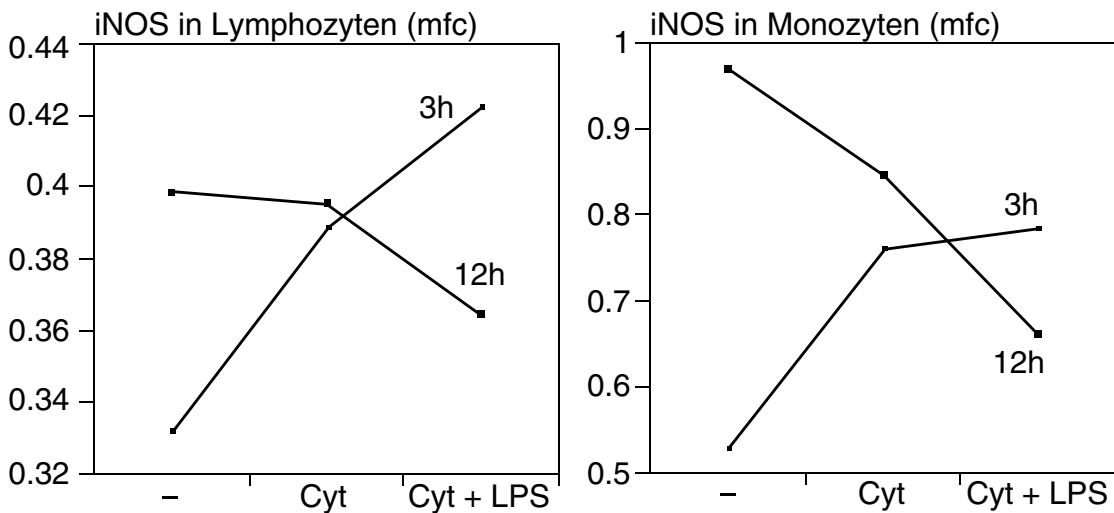


Abbildung 4.4: iNOS-Expression nach Stimulation mit Cytokinen (Cyt ($\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$)) und LPS (Cyt +LPS) in PBMC im Vergleich mit unterschiedlichen Inkubationszeiten. Das linke Drittel der Abszisse stellt die Negativkontrolle dar, das mittlere Drittel die Cytokinstimulation und das rechte Drittel die Stimulation mit Cytokinen plus LPS. Die Ordinate steht für die iNOS-Expression gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer.

iNOS-Produktion (BAEUERLE und HENKEL, 1994). Deshalb dient er als Kontrolle für eine erfolgte Beeinflussung der Zellen durch LPS. Diese Kontrolle erschien gerade wegen der heterogenen Ergebnisse auf Proteinebene notwendig. Wie sich nun in Abbildung 4.6 zeigt, sind sowohl im Vollblut als auch in PBMC signifikante Anstiege vor allem bei den Monozyten festzustellen, was die Frage der Stimulierfähigkeit positiv beantwortet. Deutlichere Anstiege von $\text{NF}\kappa\text{-B}$ sind allerdings auch hier in den direkt stimulierten PBMC im Vergleich zur Vollblutstimulation zu beobachten.

4.1.4 Doppelmarkierung (Oberfläche und intrazellulär)

Bei der durchflußzytometrischen Auswertung im Scattergramm wurden die beiden Zellpopulationen (Lymphozyten und Monozyten) anhand von Größe (Vorwärtsstreulicht=FS) und Granularität (Seitwärtsstreulicht=SS) differenziert und durch sogenannte Gates eingefasst. Zur Verifizierung der Monozyten wurde zusätzlich zur intrazellulären Antikörpermarkierung eine Oberflächenmarkierung mit dem Monozyten-spezifischen CD14-Antikörper durchgeführt. Abbildung 4.7 stellt die intrazelluläre HSP70-Markierung und die Oberflächen-CD14-Markierung dar. Das linke obere Diagramm stellt die von uns eingefassten Zellpopulationen in der Ne-

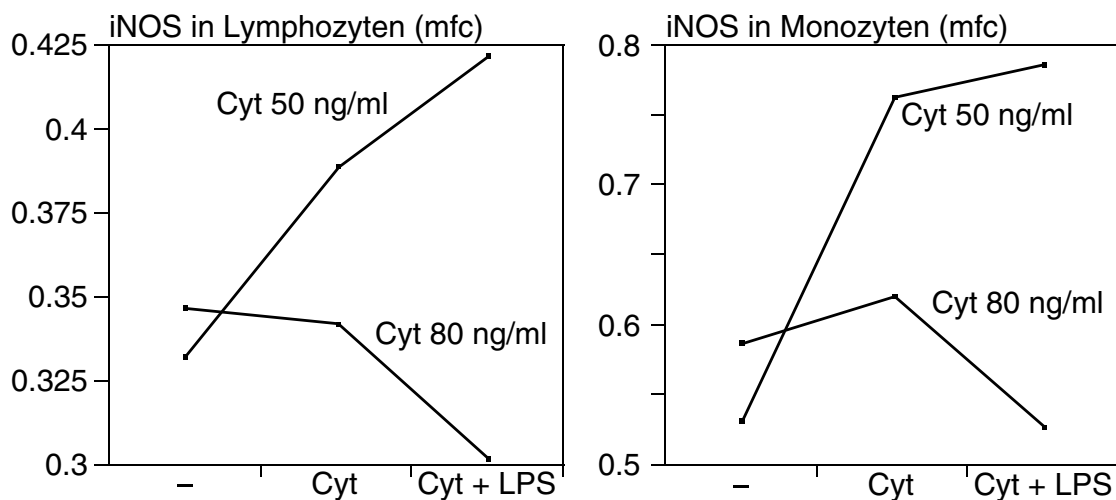


Abbildung 4.5: iNOS-Expression in PBMC nach Stimulation mit Cytokinen (Cyt ($\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$)) und LPS (Cyt +LPS) mit unterschiedlichen Cytokinkonzentrationen. Das linke Drittel der Abszisse stellt die Negativkontrolle dar, das mittlere Drittel die Cytokinstimulation und das rechte Drittel die Stimulation mit Cytokinen plus LPS. Die Ordinate steht für die iNOS-Expression gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer.

gativkontrolle dar. Das rechte obere Diagramm stellt in der mit dem Rechteck (a) eingefassten Population die Zellen dar, welche sowohl HSP70- als auch CD14-positiv sind und demnach HSP70-positiven Monozyten entsprechen. Die Darstellung dieser Population im Scatter beweist die Identität der Monozyten. Desgleichen können die HSP-70-/CD14-markierten Zellen per Ausschluss die Lage der Lymphozyten im Scatter belegen. Rechteck (b) faßt die Zellen ein, die im Scatter vorwiegend den Lymphozyten zugeordnet werden können. Die beiden unteren Diagramme beschreiben die entsprechenden Ausschnitte der beiden Zellpopulationen. Betrachtet man die Lage der Zellpopulationen in den unteren Diagrammen, so stimmen diese mit der Negativkontrolle überein, was bestätigt, daß die von uns bestimmten Zellpopulationen den Mono- und Lymphozyten entsprechen.

4.2 Stressproteinexpression in PBMC nach Stimulation

4.2.1 Expressionsverhalten durch Hitzeschockstimulation

In den Abbildungen 4.8–4.11 sind die Expressionen der vier Stressproteine vor und nach Hitzeschockstimulation im Vergleich der Gesamtheit der Probanden (TR und

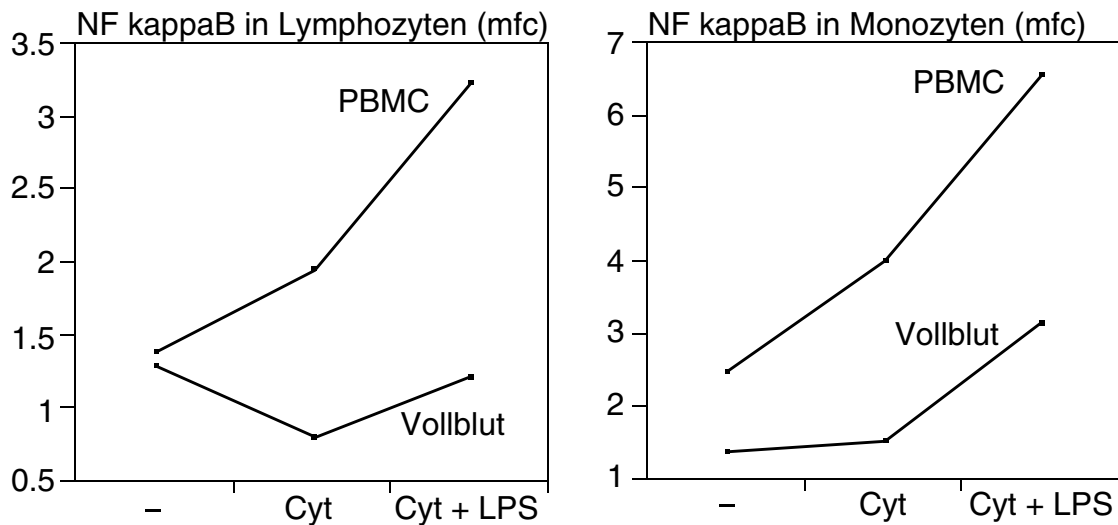


Abbildung 4.6: NF κ -B-Expression nach Stimulation mit Cytokinen (Cyt ($\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$)) und LPS (Cyt + LPS). Das linke Drittel der Abszisse stellt die Negativkontrolle dar, das mittlere Drittel die Cytokinstimulation und das rechte Drittel die Stimulation mit Cytokinen plus LPS. Die Ordinate steht für die NF κ -B-Expression gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer.

UT nicht getrennt) dargestellt. Bei der Expression der HO-1, in Abbildung 4.8, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Die 95% Konfidenzintervalle überlappen sich sichtbar.

Signifikante Ergebnisse der Hitzeschockstimulation werden bei der HSP27- und HSP70-Expression (Abbildung 4.9 und 4.10) demonstriert. Abbildung 4.9 beschreibt die stimulierte HSP27-Expression durch Hitzeschock, die in Monozyten signifikant angestiegen ist, aber nicht in Lymphozyten (siehe Überlappung der Rauten). Die Expression von HSP70 (Abbildung 4.10) zeigt sowohl für die Lymphozyten als auch für die Monozyten signifikante Ergebnisse. Die Konfidenzintervalle überlappen sich nicht und es ist ein deutlicher Anstieg durch die Hitzeschockstimulation festzustellen. Wir finden hiermit unsere Hitzeschockstimulation als methodisch korrekt bestätigt.

Bei der iNOS-Expression nach lassen sich nach Hitzeschockstimulation hingegen keine signifikanten Effekte nachweisen (Abbildung 4.11). Bei den Lymphozyten (Diagramm links) scheint die iNOS-Expression durch Stimulation mit Hitzeschock tendenziell eher abzunehmen.

4.2.2 Expressionsverhalten durch Cytokinstimulation zuzüglich LPS

Da die iNOS sich im Gegensatz zu den Hitzeschockproteinen (insbesondere HSP 27 und HSP 70), nicht sehr gut durch LPS allein und auch nicht durch Hitzeschock signifikant stimulieren ließ, sind wir dazu übergegangen, weitere mögliche Stimulatoren wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{INF}\gamma$ (siehe auch Vorversuche) in Kombination mit LPS zu verwenden.

Abbildung 4.12 stellt die Expression der iNOS in Lymphozyten (Diagramm links) und Monozyten (Diagramm rechts) nach Stimulation mit Cytokinen ($\text{TNF}\alpha + \text{INF}\gamma$) und LPS bei der Gesamtheit aller Probanden dar. In den beiden oberen Diagrammen der Abbildung 4.12 zeigt die Lage der 95% Konfidenzintervalle insgesamt keine Signifikanzen auf. Bei den Monozyten ist eine leichte Tendenz zu erhöhter iNOS-Expression durch die Cytokinstimulation (plus LPS) erkennbar. Die 95% Konfidenzintervalle sind dabei geringgradig in ihrer Senkrechtachse verschoben.

In den beiden unteren Diagrammen sind die Werte vor und nach Stimulation mit Cytokinen und LPS jedes einzelnen Probanden durch Linien miteinander verbunden, so daß genauere Aussagen zur Stimulierbarkeit der Zellen des einzelnen Probanden sowie seines Trainingszustandes gemacht werden können. In den Lymphozyten zeigt sich ein sehr heterogener Einfluss der Stimulation auf die intrazelluläre Expression der iNOS. Bei den Monozyten gibt es einige ganz deutliche Anstiege durch die Stimulation mit Cytokinen und LPS. Unter den Probanden, deren iNOS-Expression durch Stimulation zunimmt, befinden sich vier Trainierte und ein Untrainierter. Von diesem untrainierten Probanden ließ sich ermitteln, daß er bis vor einem halben Jahr noch regelmäßiges Ausdauertraining absolviert hat, demnach einen eher grenzwertig Untrainierten darstellt, sich aber dennoch im Rahmen unserer Studienkriterien befand. Alle Trainierten, die sich in den Diagrammen voneinander abgrenzen ließen, befanden sich in einem sehr hohen Trainingszustand (60-80 km/Woche).

4.3 Basalexpression der Stressproteine im Vergleich TR/UT

Die Expression der einzelnen Stressproteine im unstimulierten Blut der Probanden wird als Basalexpression bezeichnet. Diese Basalexpression wurde nicht sofort nach Abnahme des Blutes bestimmt, sondern erst nach einer dreistündigen Inkubationszeit des venösen Blutes bei 37°C im Brutschrank. Aus diesem Grund ist hier auch von thermoneutraler Expression die Rede, welche in den Abbildungen 4.13–4.16 jeweils dargestellt ist. In keinem der unten aufgeführten Abbildungen 4.13–4.16 sind bezüglich der thermoneutralen Expression (Basalexpression) signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Die Lage der 95%-Konfidenzintervalle weisen bei der Expression aller vier Stressproteine sowohl bei Lymphozyten als auch Monozyten deutliche Überlappungen auf. Jedoch sind bei der HO-1-Expression (Abb. 4.13) und der iNOS-Expression (Abb. 4.16) in den Lymphozyten sowie bei der Expression aller vier Stressproteine (Abbildungen 4.13–4.16) in den Monozyten tendenzielle Veränderungen hinsichtlich geringerer thermoneutraler Expressionen in der Gruppe der Trainierten (TR) erkennbar.

4.4 Stressproteinexpression nach Hitzeschockstimulation im Vergleich TR/UT

In den Abbildungen 4.17–4.20 sind die Expression der vier Stressproteine in Lymphozyten und Monozyten nach Hitzeschockstimulation im Vergleich TR/UT dargestellt. Es sind jeweils die Differenz zwischen Hitzeschock-stimulierten Daten minus entsprechender Kontrolle bei 37°C dargestellt. Abbildung 4.17 zeigt aufgrund der sich überlappenden Konfidenzintervalle (siehe Lage der Rauten) keine signifikanten Ergebnisse, die auf einen Unterschied in der HO-1-Expression in Antwort auf den Hitzeschock bei Trainierten und Untrainierten hindeuten könnten.

Abbildung 4.18 zeigt, daß die *in vitro*-Reaktion der HSP27 auf den Hitzeschock in den Monozyten der Trainierten-Gruppe (TR) im Vergleich zur Untrainierten-Gruppe (UT) tendenziell geringer ist. Signifikante Unterschiede können nicht beobachtet werden.

Ebenso verhält es sich auch in Abbildung 4.19. Es gibt keine signifikanten Unterschiede der HSP70-Reaktion auf die Hitzeschockstimulation *in vitro* bei TR/UT.

Für die Stressreaktion der iNOS nach Hitzeschock, die in Abbildung 4.20 dargestellt ist, gilt für TR/UT ähnliches. Tendentiell exprimiert die Gruppe der Trainierten (TR) sowohl in den Lymphozyten als auch in den Monozyten weniger iNOS als die Gruppe der Untrainierten (UT). Aber auch hier sind keine Signifikanzen erkennbar, die 95%-Konfidenzintervalle überlappen sich.

4.5 Stressproteinexpression (iNOS) nach Stimulation mit Cytokinen und LPS im Vergleich TR/UT

Abbildung 4.21 zeigt die Expression der iNOS in Lymphozyten und Monozyten nach Cytokin- und LPS-Stimulation bei TR und UT. Die Abszisse zeigt auch hier wieder die beiden zu vergleichenden Gruppen TR/UT, die Werte der Ordinate setzen sich zusammen aus den Differenzen der Signalintensitäten der Zellen vor und nach Stimulation. Die Lage der 95%-Konfidenzintervalle zeigt keine signifikanten Unterschiede im Vergleich TR/UT.

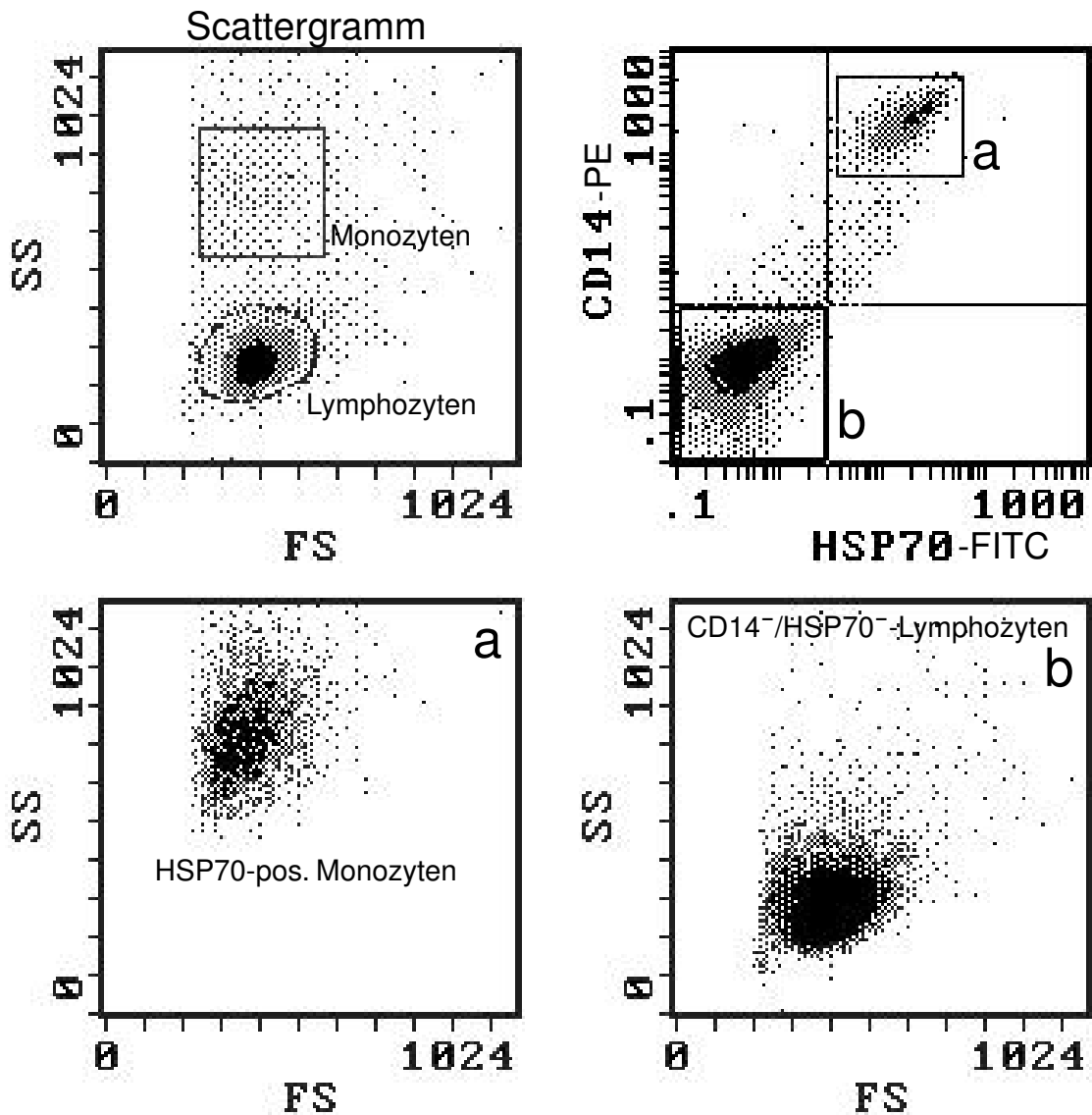


Abbildung 4.7: Intrazelluläre HSP70-Antikörpermarkierung und CD14-Markierung auf der Oberfläche zur Bestimmung der Monozyten. Das linke obere Diagramm stellt die von uns eingefassten Zellpopulationen in der Negativkontrolle dar. Das rechte obere Diagramm stellt in der mit dem Rechteck (a) eingefassten Population die Zellen dar, welche sowohl HSP70- als auch CD14-positiv sind und demnach HSP70-positiven Monozyten entsprechen. Ihre Lage im Scattergramm ist im linken unteren Diagramm dargestellt. Das im rechten oberen Diagramm eingefasste Rechteck (b) enthält CD14/HSP70-negative Zellen, die sich im Scattergramm als Lymphozytenpopulation darstellen, deren Lage im rechten untere Diagramm sichtbar wird. Diese Doppelmarkierung bestätigt die korrekte Zuordnung der beiden eingefassten Zellpopulationen.

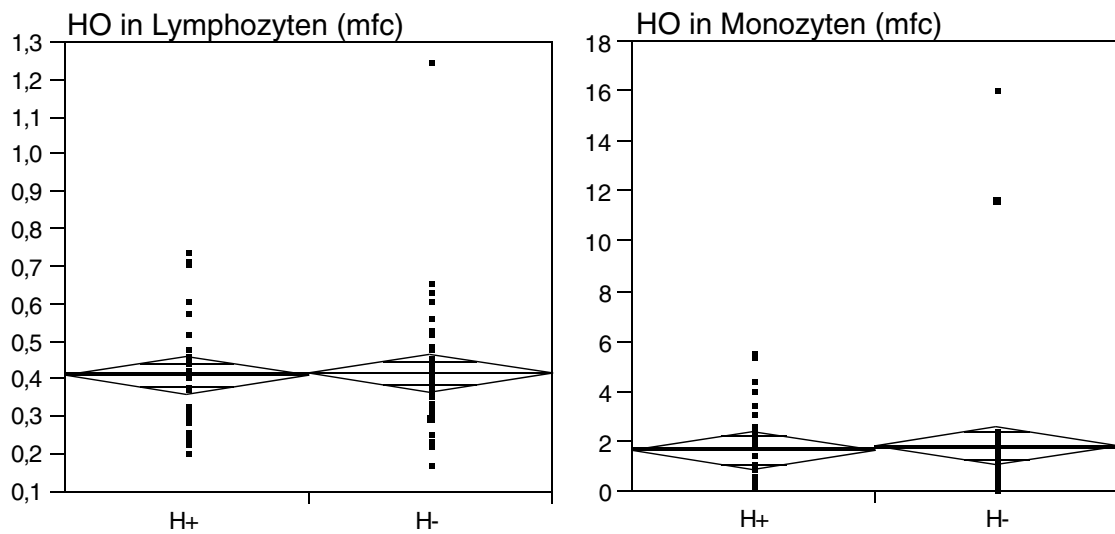


Abbildung 4.8: Expressionsverhalten der HO-1 vor (H-) und nach (H+) Stimulation mit Hitzeschock. Das linke Diagramm stellt die Expression in den Lymphozyten, das rechte Diagramm die Expression in den Monozyten dar. Auf der Abszisse besteht die linke Hälfte aus der Hitzeschockstimulation, die rechte Hälfte aus der dazugehörigen Negativkontrolle. Die Ordinate zeigt die Expression von HO-1 gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer. Die Einzelwerte der Probanden sind in Form der schwarzen Punkte dargestellt.

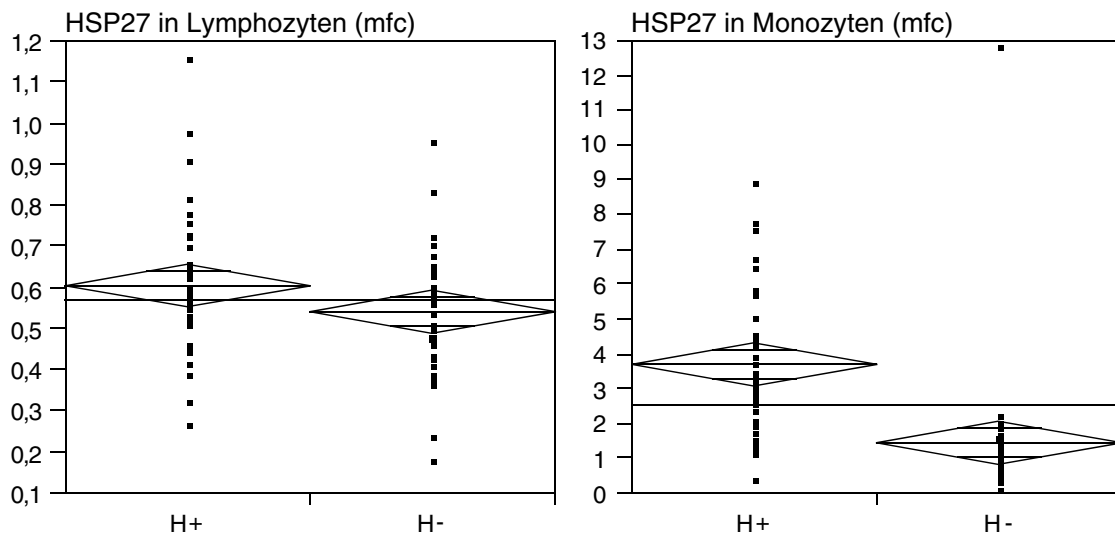


Abbildung 4.9: Expressionsverhalten von HSP27 vor (H-) und nach (H+) Stimulation mit Hitzeschock. Das linke Diagramm stellt diese Expression in den Lymphozyten, das rechte Diagramm die Expression in den Monozyten dar. Auf der Abszisse besteht die linke Hälfte aus der Hitzeschockstimulation, die rechte Hälfte aus der dazugehörigen Negativkontrolle. Die Ordinate zeigt die Expression von HSP27 gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer. Die Einzelwerte der Probanden sind in Form der schwarzen Punkte dargestellt.

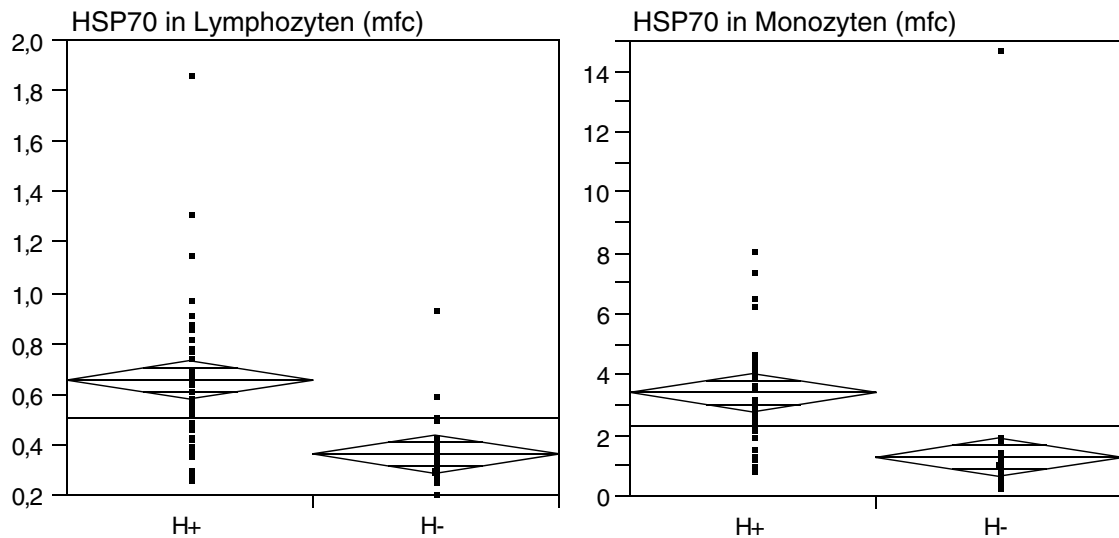


Abbildung 4.10: Expressionsverhalten von HSP70 vor (H-) und nach (H+) Stimulation mit Hitzeschock. Auf der Abszisse besteht die linke Hälfte aus der Hitzeschockstimulation, die rechte Hälfte aus der dazugehörigen Negativkontrolle. Die Ordinate zeigt die Expression von HSP70 gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer. Die Einzelwerte der Probanden sind in Form der schwarzen Punkte dargestellt.

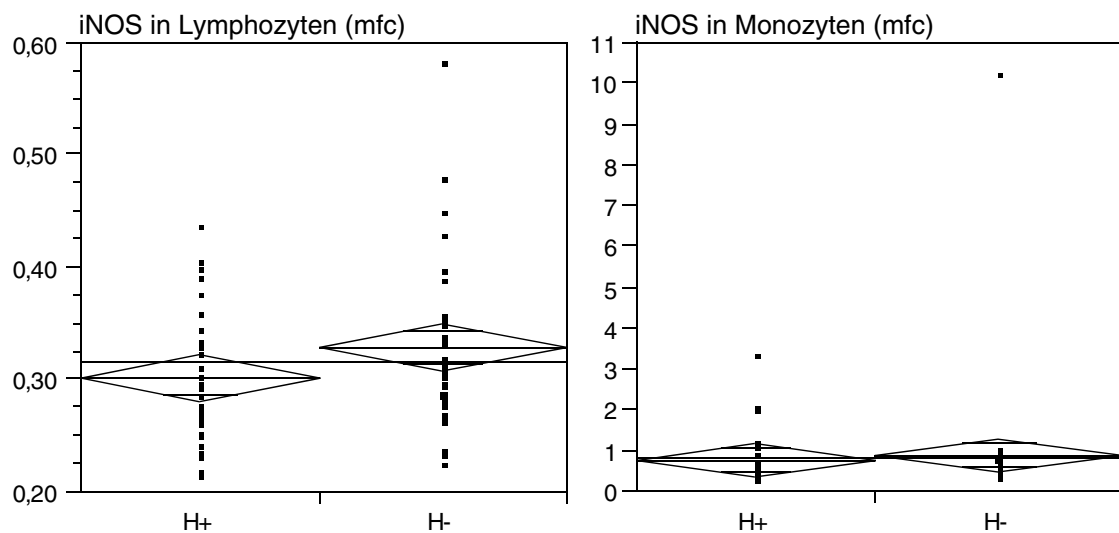


Abbildung 4.11: Expressionsverhalten der iNOS vor (H-) und nach (H+) Stimulation mit Hitzeschock. Auf der Abszisse besteht die linke Hälfte aus der Hitzeschockstimulation, die rechte Hälfte aus der dazugehörigen Negativkontrolle. Die Ordinate zeigt die Expression der iNOS gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer. Die Einzelwerte der Probanden sind in Form der schwarzen Punkte dargestellt.

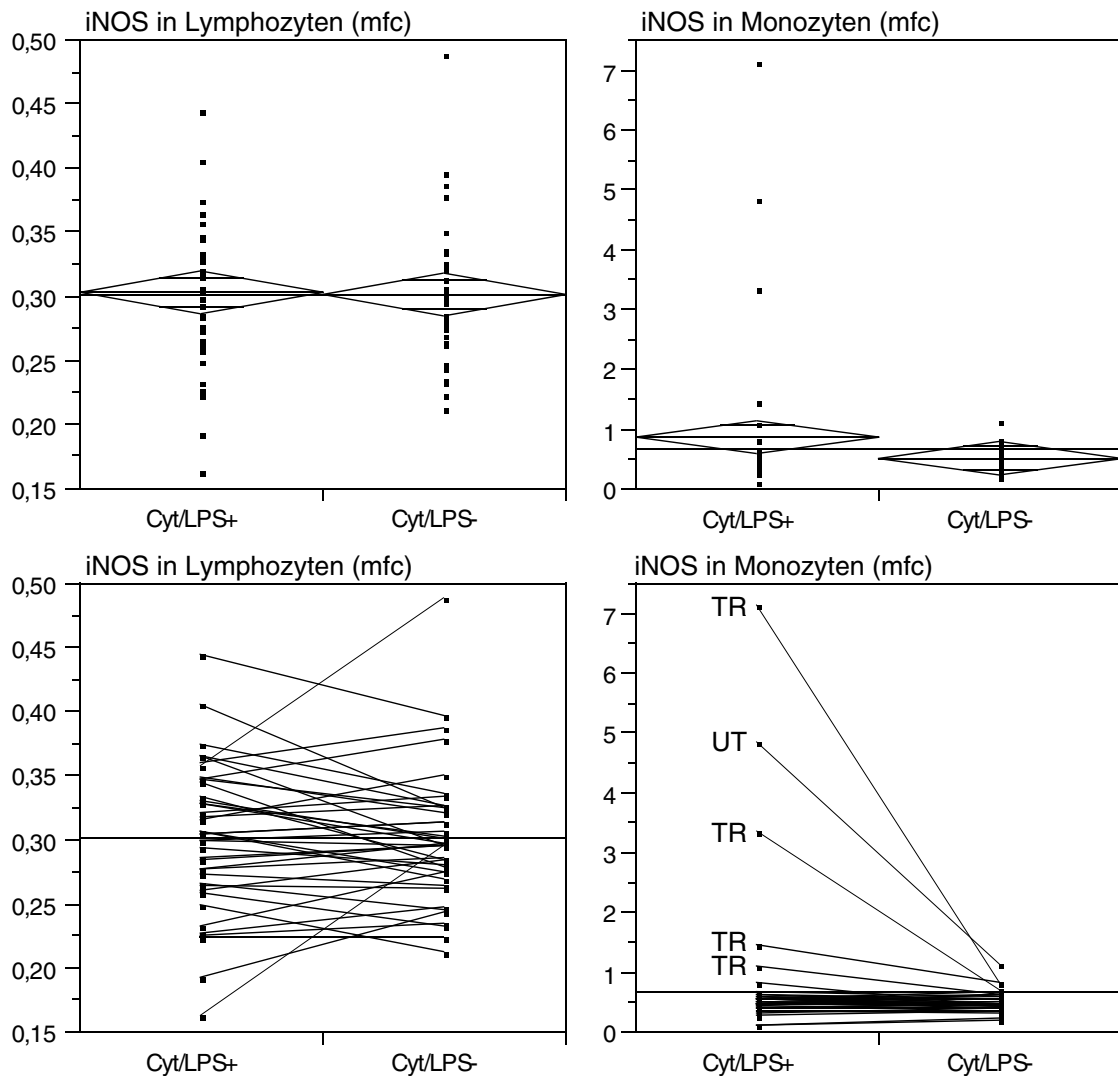


Abbildung 4.12: Expressionsverhalten der iNOS vor (Cyt/LPS-) und nach (Cyt/LPS+) Stimulation mit Cytokinen und LPS von allen Probanden. Die Abszisse kann in zwei Bereiche eingeteilt werden. Die linke Hälfte soll die Stimulation mit Cytokinen plus LPS darstellen, die rechte Hälfte die entsprechende Negativkontrolle. Auf der Ordinate stellt sich die Expression der iNOS gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) dar. Die Punkte sind die Einzelwerte der Probanden, die in den unteren Diagrammen teilweise in Trainierte (TR) und Untrainierte (UT) differenziert wurden. Die Rauten (Diamonds) stellen die 95% Konfidenzintervalle dar.

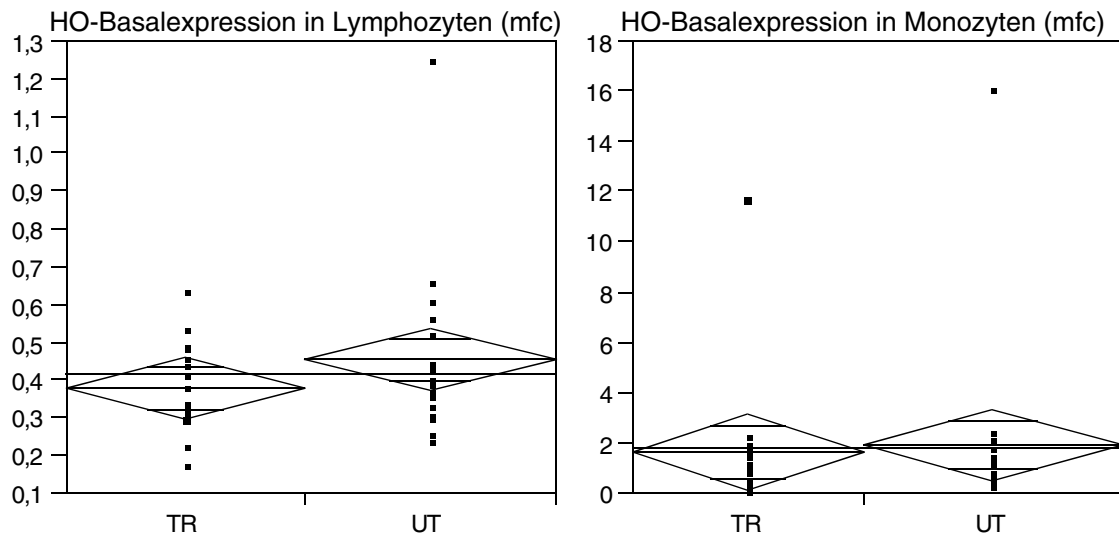


Abbildung 4.13: Basalexpression von HO-1 bei Trainierten (TR=22) und Untrainierten (UT=20) im Vergleich. Die Abszisse enthält die beiden Gruppen TR und UT. Die Ordinate zeigt die Expression von HO-1 gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer.

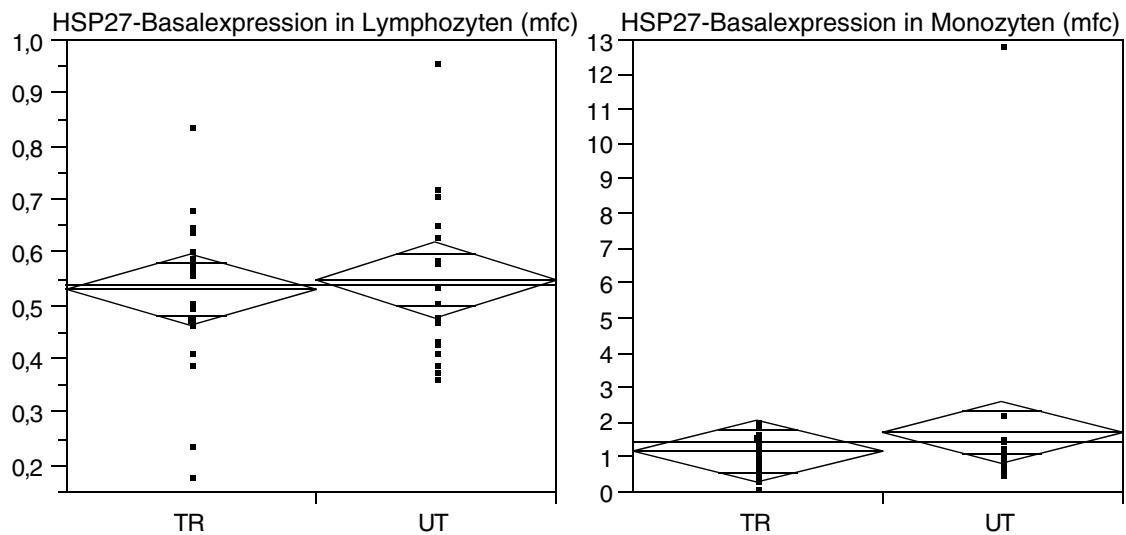


Abbildung 4.14: Basalexpression von HSP27 bei Trainierten (TR=22) und Untrainierten (UT=20). Die Abszisse enthält die beiden Gruppen TR und UT. Die Ordinate zeigt die Expression von HSP27 gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer.

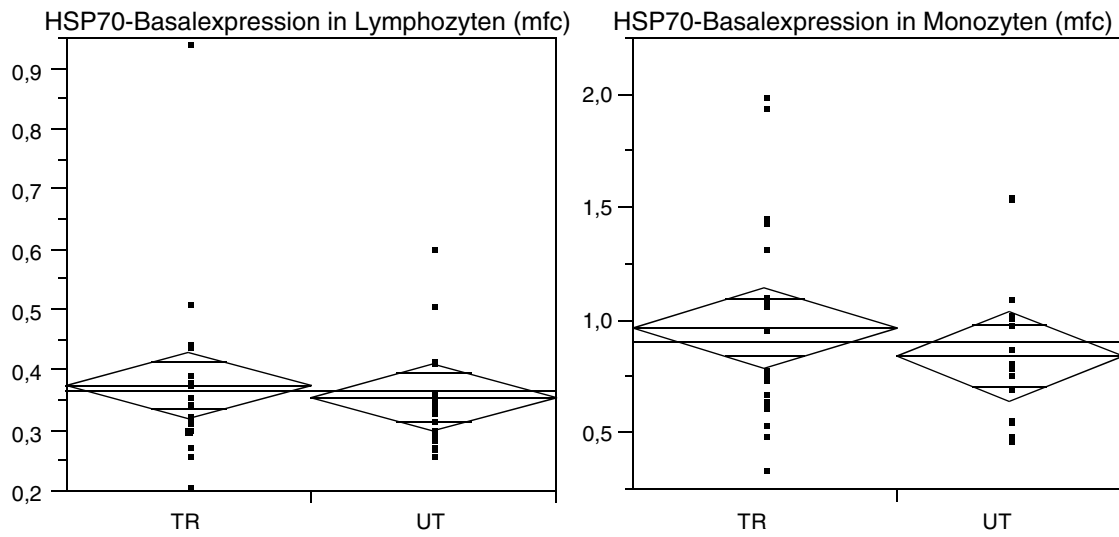


Abbildung 4.15: Basalexpression von HSP70 bei Trainierten (TR=22) und Untrainierten (UT=20). Die Abszisse enthält die beiden Gruppen TR und UT. Die Ordinate zeigt die Expression von HSP70 gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer.

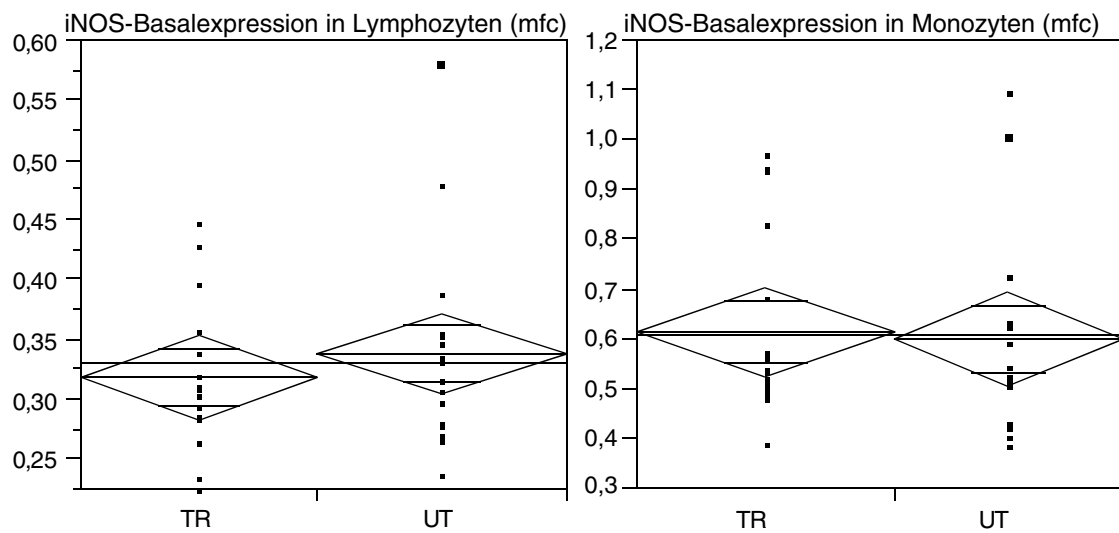


Abbildung 4.16: Basalexpression der iNOS bei Trainierten (TR=22) und Untrainierten (UT=20). Die Abszisse enthält die beiden Gruppen TR und UT. Die Ordinate zeigt die Expression der iNOS gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc) im Durchflußzytometer.

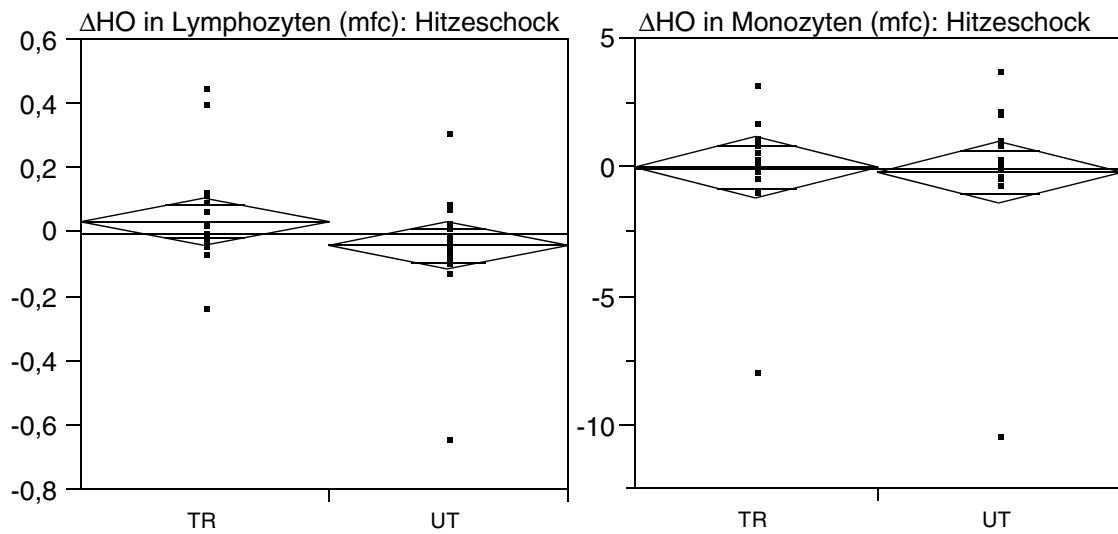


Abbildung 4.17: Expression von HO-1 bei Trainierten (TR) und Untrainierten (UT) im Vergleich. Dabei stellen sich die beiden Gruppen (TR/UT) auf der Abszisse dar. Die Ordinate stellt die Expression von HO-1 (gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc)) als Differenz von durch Hitzeschockstimulation resultierenden Signalintensitäten und den dazugehörigen Nativwerten (siehe Basalexpression) dar. Die Punkte sind die Einzelwerte der Probanden, die Rauten (Diamonds) wie in den obigen Abbildungen die 95% Konfidenzintervalle.

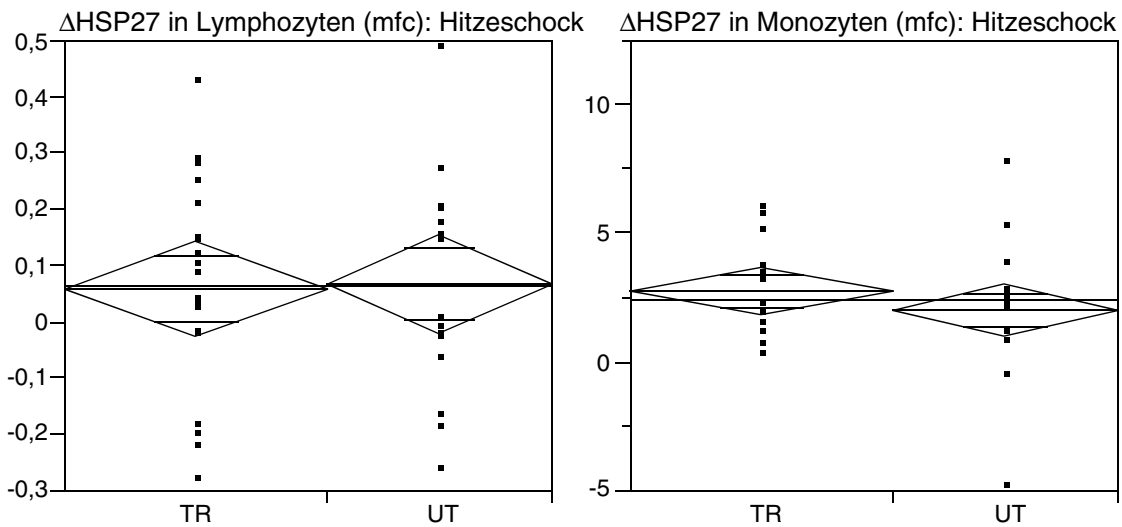


Abbildung 4.18: Expression von HSP27 bei Trainierten (TR) und Untrainierten (UT) im Vergleich. Dabei stellen sich die beiden Gruppen (TR/UT) auf der Abszisse dar. Die Ordinate stellt die Expression von HSP27 (gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc)) als Differenz von durch Hitzeschockstimulation resultierenden Signalintensitäten und den dazugehörigen Nativwerten (siehe Basalexpression) dar. Die Punkte sind die Einzelwerte der Probanden, die Rauten (Diamonds) wie in den obigen Abbildungen die 95% Konfidenzintervalle.

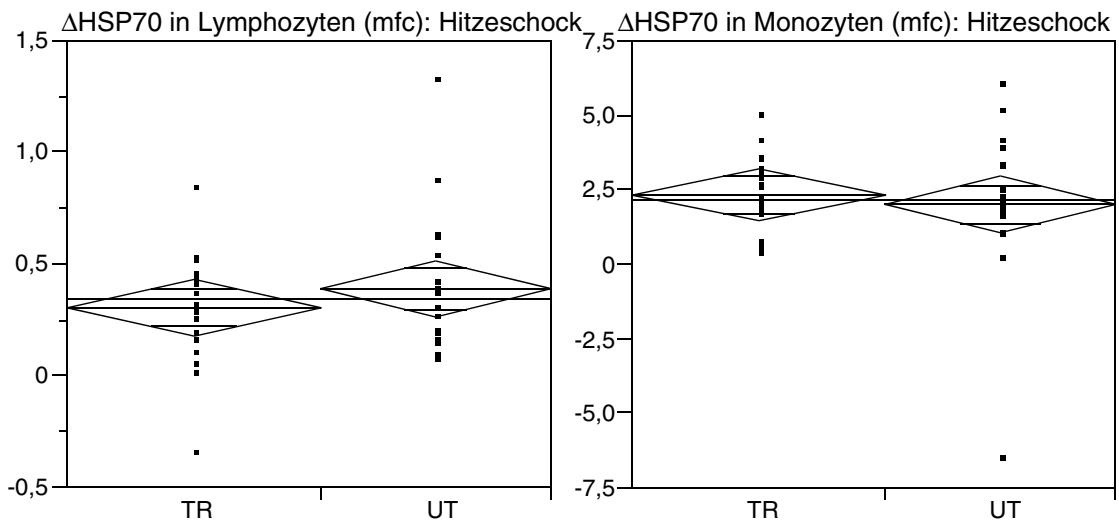


Abbildung 4.19: Expression von HSP70 bei Trainierten (TR) und Untrainierten (UT) im Vergleich. Dabei stellen sich die beiden Gruppen (TR/UT) auf der Abszisse dar. Die Ordinate stellt die Expression von HSP70 (gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc)) als Differenz von durch Hitzeschockstimulation resultierenden Signalintensitäten und den dazugehörigen Nativwerten (siehe Basalexpression) dar. Die Punkte sind die Einzelwerte der Probanden, die Rauten (Diamonds) wie in den obigen Abbildungen die 95% Konfidenzintervalle.

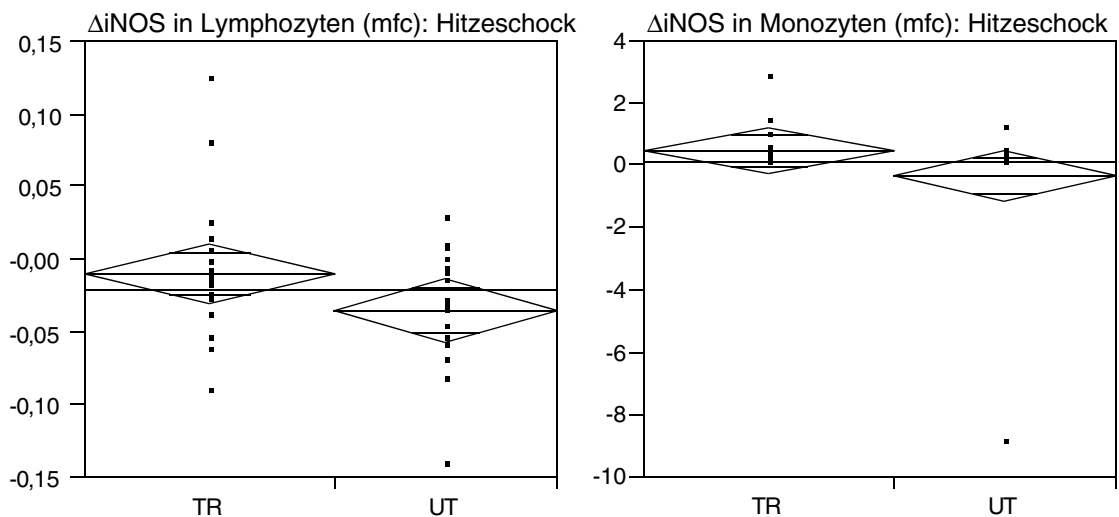


Abbildung 4.20: Expression von iNOS bei Trainierten (TR) und Untrainierten (UT) im Vergleich. Dabei stellen sich die beiden Gruppen (TR/UT) auf der Abszisse dar. Die Ordinate stellt die Expression der iNOS (gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc)) als Differenz von durch Hitzeschockstimulation resultierenden Signalintensitäten und den dazugehörigen Nativwerten (siehe Basalexpression) dar. Die Punkte sind die Einzelwerte der Probanden, die Rauten (Diamonds) wie in den obigen Abbildungen die 95% Konfidenzintervalle.

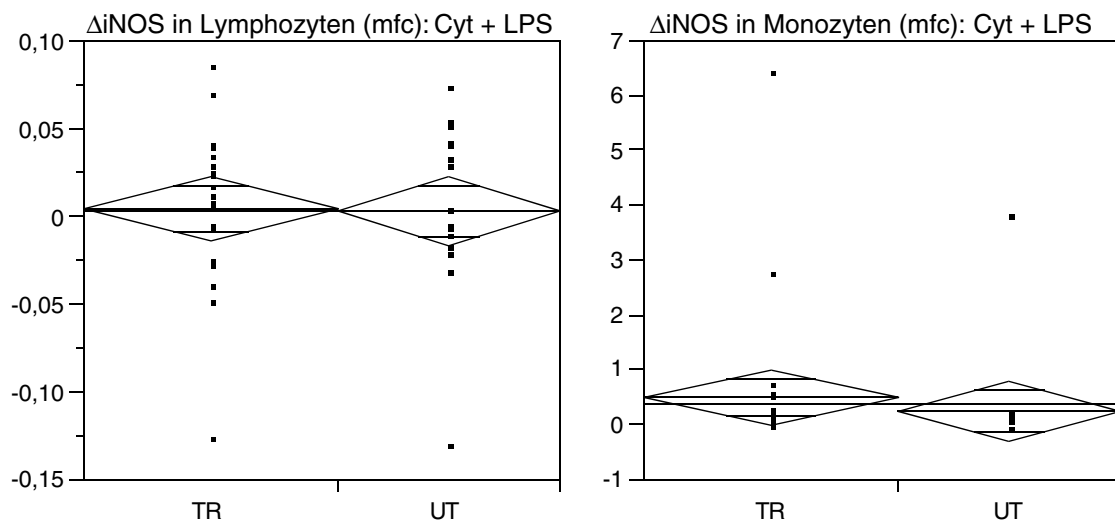


Abbildung 4.21: Expression von iNOS bei Trainierten (TR) und Untrainierten (UT) im Vergleich (Abszisse). Die Ordinate stellt die Expression der iNOS als Differenz von Cytokin- plus LPS-Stimulation und Negativkontrolle (δ) dar, gemessen als Fluoreszenzintensität (mfc).

Kapitel 5

Diskussion

Sinn und Zweck dieser Studie war es, die Effekte in Leukozyten hinsichtlich Adaptation an Training zu erfassen. Unser Interesse galt insbesondere den möglichen adaptiven Mechanismen der Zellen, wie wir sie als Langzeiteffekte auf Ausdauertraining vermuten würden. Wir untersuchten dazu die Zellen von Sportlern in der Ruhephase ihres Ausdauertrainings nicht unmittelbar nach den akuten Belastungsphasen. Als Parameter wählten wir zum einen vier Streßproteine (HO-1, HSP27, HSP70, iNOS), die in Leukozyten exprimiert werden. Zum anderen dienten uns als Stimulatoren bzw. Stressoren für diese Proteine Hitzeschock, LPS, IFN γ und TNF α .

5.1 Diskussion der Vorversuche

Im Rahmen der Vorversuche dieser Studie ging es zunächst um die Etablierung der besten Bedingungen für die Stimulation der gewählten Parameter (HO-1, HSP27, HSP70, iNOS) mit LPS und Cytokinen (IFN γ und TNF α). Den Schwerpunkt setzten wir dabei hauptsächlich auf die Bestimmung der Stimulierbarkeit der iNOS, da LPS, IFN γ und TNF α als klassische Induktoren der iNOS zumindest in Nagetierzellen angesehen werden. Die Methode hierzu soll an dieser Stelle kurz diskutiert werden.

5.1.1 Stimulation mit LPS und Cytokinen

Die verwendeten Stimulationskonzentrationen von LPS betrugten 0, 1, 10 und 100 ng/ml, die Inkubationszeiten dieser Konzentrationen im Vollblut waren mit 3,

6, 12 und 24 Stunden angesetzt. Dabei orientierten wir uns an ähnlich angelegten Zeit-Konzentrationsreihen der LPS-Stimulation wie sie durch Schroeder *et al.* (1999) in einer *in vitro*-Studie beschrieben wurden, welche das Verhalten der HSP70-Expression in mononukleären Zellen bei Patienten mit schwerer Sepsis untersuchte. In dieser Studie wurde eine Vollblutstimulation durchgeführt und anschließend PBMC isoliert und mittels ELISA die Proteinexpression bestimmt (siehe Materiel und Methoden). Schroeder *et al.* (1999) konnten mit dieser Methode eine Verminderung der HSP70-Expression in PBMC in Abhängigkeit von Inkubationszeit und LPS-Konzentration sowohl bei den Patienten mit schwerer Sepsis als auch bei der Kontrollgruppe bestehend aus gesunden Probanden feststellen. Interessanterweise zeigen dabei geringe Dosen an LPS im Vergleich zu der nicht stimulierten Probe eine Expressionszunahme von HSP70, wohingegen höhere LPS-Konzentrationen (größer 10 ng/ml) und auch längere Inkubationszeiten (größer 12 Stunden) eine Abnahme der HSP70-Expression aufwiesen. Wir folgten den Methoden von Schroeder *et al.* (1999), allerdings gelang es nicht, bei den untersuchten Stressproteinen signifikante Expressionsveränderungen zu erzielen, die in einem Abhängigkeitsverhältnis zu Inkubationszeit und LPS-Konzentration stehen. Gerade bei HSP70 läßt sich nämlich in unseren Ergebnissen eher bei längeren Inkubationszeiten eine ansteigende Expressionstendenz erkennen (Abb. 4.1). Beinahe übereinstimmend mit den Ergebnissen von Schroeder *et al.* (1999) fanden wir dennoch eine tendenzielle, jedoch keine signifikante Abnahme der Expression von HSP70 mit steigender LPS-Konzentration (siehe Abb. 4.1). Ebenso konnten wir auch HSP70-Expressionen bei PBMC entdecken, die nicht mit LPS stimuliert wurden, was in Abbildung 4.1 deutlich wird und wofür Fincato *et al.* (1991) eine gewisse Adhärenz der PBMC auf plastikhaltige Zellkulturgefäße verantwortlich machen. Auch waren es Fincato *et al.* (1991), die 1991 erhöhte HSP70-mRNA in Monozyten und Granulozyten und in sehr spärlichen Mengen auch in Lymphozyten nach LPS-Stimulation entdeckten, was wir in unseren Vorversuchen auf Proteinebene nur in geringem Maße nachvollziehen konnten. Auch konnten wir die Stimulationskonzentration von LPS, die Fincato *et al.* (1991) bei 10 µg/ml ansetzten nicht nachvollziehen, da unter dieser Konzentration unsere Zellen deutlich vermindert und beschädigt waren, so daß sie in der durchflußzytometrischen Auswertung schlecht bzw. nicht mehr registriert werden konnten. Auch eine Konzentration von 1 µg/ml LPS, wie sie von Oliveira *et al.* (1999) zur Stimulation von PBMC verwendet wurde, beeinträchtigten unsere Zellen zu stark.

Ebenso untersuchten wir die Expressionen von HSP27 und HO-1 nach LPS-

Stimulation, wobei sich ein sehr heterogenes Bild ergab, welches die Festlegung auf bestimmte LPS-Konzentrationen oder -Inkubationszeiten nicht erlaubte. Aufgrund dessen haben wir uns entschieden, HSP70, HSP27 und HO-1, zur Durchführung unserer Studie mit Hitzeschock zu stimulieren, was eine etablierte Methode darstellt (FEHRENBACH *et al.*, 2001), (FEHRENBACH *et al.*, 2000a).

Auch der Stimulierbarkeit der iNOS-Expression durch LPS galt unser Interesse, da LPS wie schon erwähnt bei der iNOS einen potentiellen Induktor darstellt (NUSSLER und BILLIAR, 1993). Die Abbildung 4.2 zeigt die Expression der iNOS nach LPS-Stimulation im Vollblut. Nach oben beschriebenen Vorbild wurden auch hier unterschiedliche LPS-Konzentrationen und Inkubationszeiten eingesetzt. Allerdings sind auch hier nur schwache Veränderungen erkennbar, die auf einen Anstieg der iNOS-Expression mit zunehmender Inkubationszeit hindeuten. Daß jedoch eine Aktivierung der Zellen durch LPS-Stimulation erfolgte beweist die Bestimmung der NF κ B-Expression. Wie schon im Ergebnisteil erwähnt ist NF κ -B ein Transkriptionsfaktor, dessen LPS-bedingte Regulation der Veränderung auf Proteinebene vorangeht und in die iNOS-Regulation involviert ist (BAEUERLE und HENKEL, 1994). Deshalb dient er als Kontrolle für eine erfolgte Beeinflussung der Zellen durch LPS. Abbildung 4.6 zeigt dazu signifikante Anstiege von NF κ -B vor allem bei den Monozyten. Wir dürfen also davon ausgehen, daß die Stimulierfähigkeit unserer Zellen in Ordnung war. Daß die Ergebnisse der LPS-induzierten iNOS-Expression jedoch nicht signifikant und auch nicht zeit-konzentrations-abhängig waren läßt vermuten, daß entweder die LPS-Stimulation im Vollblut nicht effektiv genug ist, oder daß LPS als Stimulator alleine gerade bei der iNOS-Expression in humanen mononukleären Zellen nicht ausreicht. In diesem Zusammenhang untersuchten mehrere Studien das Verhalten der iNOS in mononukleären Zellen unter Stimulation mit LPS und Cytokinen wie IFN γ und TNF α als Zusatz (Konur *et al.* (1996), Weinberg *et al.* (1995), Hirvonen *et al.* (1996), Schneemann *et al.* (1993)) und fanden widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Stimulierbarkeit der iNOS.

Die Abbildungen 4.3–4.5 beschreiben dazu unsere Vorversuche zur Etablierung der Cytokinstimulation zunächst IFN γ und TNF α gemeinsam und dann dieselben in Kombination mit LPS. Dabei berücksichtigten wir zunächst, daß die Stimulation von LPS im Vollblut nach obigem Beispiel wenig Erfolge im Hinblick auf die iNOS-Expression gezeigt hat und führten aus diesem Grund einen Versuch durch, bei dem die mononukleären Zellen auf zwei verschiedene Arten stimuliert werden, was Abbildung 4.3 zeigt. Die Abbildung verdeutlicht, daß mehr Effekte bei isolierten

PBMC als im Vollblut zu finden sind, ebenso wie die Kombination von Cytokinen und LPS deutlichere Anstiege der iNOS-Expression zeigt als die Cytokinstimulation alleine. Bei der Konzentration von LPS lehnten wir uns an Konur *et al.* (1996) sowie Zhang *et al.* (1996) an, die in ihren Studien 100 ng/ml LPS einsetzten. Die Konzentrationen der einzelnen Cytokine bestimmten wir in mehreren Versuchen unterschiedlicher Konzentrationen, von denen die beiden übrigblieben, die in Abbildung 4.5 dargestellt sind. Da die deutlichsten Effekte bei Cytokinkonzentrationen von jeweils 50 ng/ml (Abb. 4.5) und einer Inkubationszeit von 3 Stunden (Abb. 4.4) lagen, entschieden wir uns für diese.

5.2 Diskussion der ermittelten Ergebnisse

Als Antwort auf körperliche Belastung wurden im Laufe der Zeit die meisten Versuche im Hinblick auf zelluläre und intrazelluläre Veränderungen durchgeführt. In dieser Studie galt unser Interesse der Bestimmung von bestimmten Stressproteinen und ihrer Expression in mononukleären Zellen von ausdauertrainierten und untrainierten Probanden im Ruhezustand. Untersucht wurden die Hitzeschockproteine HSP27 und HSP 70 (induzierbare Form), die im Hinblick auf regelmäßiges sportliches Training eine Art Chaperone-Funktion ausüben und damit gewisse schützende Begleitfunktionen für die Zellen darstellen (LEHMANN *et al.*, 1997), ebenso wie das Hitzeschockprotein HO-1, dessen antioxidative Schutzfunktion als Antwort auf sportliche Belastung zum Tragen kommt (ESSIG *et al.*, 1997). Auch die iNOS, die als Katalysator der $\cdot\text{NO}$ -Reaktion gilt, kann man in gewisser Weise als Stressprotein bezeichnen, da sie zunächst eine zellschützende Wirkung gegen die unter körperlicher Belastung gebildeten freien Radikale hat. Es sollte untersucht werden, ob Adaptation der Zellen an regelmäßigen sportlichen Stress *in vivo*, einen Einfluß auf die Stressantwort *in vitro* hat, demnach auf die Stimulierbarkeit der Zellen. Dazu wurde für jeden zu untersuchenden Parameter der geeignete Stimulator bzw. Stressor gesucht und dementsprechend getestet. Deshalb wurde die iNOS-Expression in dieser Studie im Hinblick auf Induktoren wie Cytokine, LPS und Hitzeschock, die zumindest in Makrophagen von Nagern deutliche $\cdot\text{NO}$ -Anstiege hervorrufen (KROENCKE *et al.*, 1995), (NUSSLER und BILLIAR, 1993), bei TR und UT im Vergleich untersucht. Die Ergebnisse zu diesen intrazellulären Veränderungen werden im Folgenden diskutiert.

Zu den zellulären Veränderungen läßt sich sagen, daß sich im Hinblick auf die

Zahl der Leukozyten sowie deren Subpopulationen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen TR und UT feststellen ließen (Tabelle 3.1). Dies entspricht im Wesentlichen den Erfahrungen von Nieman *et al.* (1995a) in einer Studie, welche Leukozytenzahl von Athleten und Nicht-Athleten vergleicht. Allerdings berichten Nieman *et al.* (1995b) an anderer Stelle auch über eine eher verminderte Zahl der neutrophilen Granulozyten bei Marathonläufern im Vergleich zu Nicht-Sportlern. Physische Stressmomente wie z. B. Infektionen, Traumata oder ungewohnt hohe Trainingsbelastungen kurze Zeit vor dem Versuchstag konnten anamnestisch und laborchemisch ausgeschlossen werden. Die Plasmaspiegel von Kreatinkinase, Cortisol, C-reaktivem Protein und Harnstoff lagen bei beiden Gruppen durchgehend im Normbereich. Es zeigten sich diesbezüglich bei TR und UT keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 3.2) .

5.2.1 Expression von HSP27 und HSP70 auf Hitzeschockstimulation, Vergleich TR/UT

Zweistündige Hitzeexposition führte zu der erwarteten Expressionszunahme der Hitzeschockproteine HSP27 und HSP70 (Abbildungen 4.9 und 4.10) sowohl in Lymphozyten als auch in Monozyten. Signifikante Unterschiede im Vergleich trainierter und untrainierter Probanden (Abbildung 4.18 und Abbildung 4.19) dazu ergaben sich allerdings keine. Auch was die Basalexpression der Proteine (Abbildung 4.14 und Abbildung 4.15) betrifft blieben signifikante Unterschiede bei Trainierten und Untrainierten im Vergleich aus.

Die experimentellen Hitzeschockbedingungen von 41,8°C im Wasserbad waren so gewählt, daß eine intensive Stressantwort erzielt werden konnte, die ohne Beschädigung der Zellen stattfand (RYAN *et al.*, 1991), (MARINI *et al.*, 1996), (FLANAGAN *et al.*, 1995). Hitzeschock *in vitro* erhöht die HSP-Expression sowohl in TR als auch in UT, was in früheren Studien in Gesamtleukozyten beobachtet werden konnte (FEHRENBACH *et al.*, 2001), (FEHRENBACH *et al.*, 2000a) und stellt somit einen adequate Stressreiz dar.

Was den Vergleich von TR und UT anbelangt, so war in unserer Studie von besonderem Interesse, ob regelmäßiges Ausdauertraining Langzeiteffekte im Hinblick auf mögliche adaptive Mechanismen auslösen kann. Aus diesem Grund schlossen wir in unserem Studienprotokoll akute Belastungssituationen aus, indem wir eine Zeitspanne von mindestens 24 Stunden zwischen der letzten Trainingsphase und

der Blutentnahme festsetzten und den Studienteilnehmern der TR-Gruppe nur moderate Trainingseinheiten 3 Tage vor Blutentnahme gestatteten.

Zusätzlich zu den in dieser Studie ermittelten Ergebnissen auf Proteinebene, die keine Unterschiede hinsichtlich der beiden Gruppen TR/UT ergaben, wurde eine Parallelstudie mit den gleichen Probanden und Stimulationsbedingungen auch auf Transkriptionsebene durchgeführt (VOGEL, in Vorbereitung). Dabei zeigen sich deutliche Unterschiede nach Hitzeschockstimulation im Vergleich TR/UT. Beide HSPs sind auch auf Transkriptionsebene durch Hitzeschock induzierbar, allerdings ist ihre Expressionszunahme im Vergleich TR/UT in den Zellen der Trainierten signifikant vermindert. Die Basalexpression bei TR/UT zeigt wie auf Proteinebene jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse der Basalexpression, wie sie hier präsentiert sind, widerlegen die Ergebnisse anderer Studien. So konnten zum Beispiel Shastry *et al.* (2002) auf Translationsebene in Gesamtleukozyten eine verminderte Basalexpression für HSP70 in einer Gruppe von TR im Vergleich zu UT feststellen, was sie als chronisch adaptive Mechanismen in Bezug auf Training deuteten. Auch Fehrenbach *et al.* (2000b) konnten eine verminderte Prozentzahl HSP27- und HSP70-positiver Zellen (Gesamtleukozyten) auf Proteinebene bei einer Gruppe von Halbmarathonläufern (TR) im Vergleich zu UT beobachten. In einer ähnlichen Studie (FEHRENBACH *et al.*, 2000a) auf Transkriptionsebene ist zumindest für HSP27 mRNA ebenfalls eine verminderte Basalexpression in den Leukozyten von Athleten festgestellt worden.

Die Ergebnisse auf Transkriptionsebene (Parallelstudie (VOGEL, in Vorbereitung)), die nach Hitzeschockstimulation signifikant verminderten HSP-Expressionen der TR zeigen, dürfen als adaptive Mechanismen oder auch im Rahmen des Begriffs der Thermotoleranz als Antwort auf intensives Ausdauertraining gedeutet werden ((MIZZEN und WELCH, 1988), (MOSELEY, 1997)). Eine trainingsbedingte adaptive HSP-Antwort wurde auch schon im Muskelsystem des Menschen (LIU *et al.*, 1999), (LOCKE und NOBLE, 1995), (THOMPSON *et al.*, 2002), in Leukozyten (FEHRENBACH *et al.*, 2001) und im Herzmuskel von Ratten (DEMIREL *et al.*, 2001), (HARRIS und STARNES, 2001), (POWERS *et al.*, 2001) beschrieben. Gerade Fehrenbach *et al.* (2001) konnten in Monozyten und Granulozyten von Sportlern nach zwei aufeinanderfolgenden Ausdauerläufen demonstrieren, daß nach dem zweiten Lauf eine verminderte HSP-Antwort auf *in vitro* Hitzeschock stattfindet, was für einen neu erworbenen thermotoleranten Zustand der HSPs spricht. Diese Studien zeigen, daß den HSPs neben anderen Systemen eine bedeu-

tende Rolle hinsichtlich Anpassung und Schutz des zellulären Gleichgewichts auf sich ständig wiederholende Streßsituationen zukommt, wie sie durch regelmäßiges intensives Ausdauertraining hervorgerufen werden können. Allerdings beobachteten diese oben beschriebenen Studien nicht den Langzeiteffekt, den intensives Ausdauertraining auf die Hitzeschockantwort von mononukleären Zellen *in vitro* haben kann.

Warum sich nun auf Proteinebene im Gegensatz zur Transkriptionsebene in keinem der hier durchgeführten Versuche signifikante, trainingsbedingte Effekte als Antwort auf Hitzeschock (Abbildung 4.18 und Abbildung 4.19) zeigten, mag verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann von einem verbesserten Translationsystem in Trainierten die Rede sein, andererseits kann es sich auch um ein Zeitproblem handeln zwischen Stimulation und Expression der mRNA und Proteine. Auf Translationsebene weisen zumindest die Monozyten der TR tendenziell verminderte HSP27- und HSP70-Expressionen auf, was ungefähr den Ergebnissen auf Transkriptionsebene entspricht, und auch denen von Fehrenbach *et al.* (2000b). Möglicherweise wurde auf Translationsebene durch zu kurze Inkubationszeiten die eigentlichen Effekte der HSP-Expression der TR nach Hitzeschock nicht mehr erfaßt. Demgegenüber stehen wiederum die Aussagen von Boshoff *et al.* (2000), die die Induzierbarkeit von HSP70 als abhängig von der Basalexpression beschreiben. DiDomenico *et al.* (1982) fanden außerdem Hinweise darauf, daß die Hitzeschockantwort sich sowohl auf Transkriptionsebene als auch posttranskriptionell selbst reguliert und somit die HSP mRNA in Abhängigkeit von der HSP-Expression im Zytoplasma (Proteinebene) über Feed-back-Mechanismen möglicherweise herunterreguliert wird. Vielleicht tritt durch Ausdauertraining auch eine gewisse Ökonomisierung auf Translationsebene ein, so daß geringere Mengen an mRNA eine größere Menge an Proteinen synthetisieren können, was eine verbesserte Translationsleistung bedeuten würde. Diese Hypothese können wir jedoch durch die hier durchgeführten Experimente nicht beweisen.

Weiterhin könnte der Grad an Stress auf Proteinebene, mit dem HSP70 korrelieren soll (DIDOMENICO *et al.*, 1982), durch Hitzeschock nicht ausreichend wirksam auf die beiden zu unterscheidenden Gruppen TR/UT sein, bzw. ein unter Umständen trainingsbedingt geringerer oxidativer Stress (BENONI *et al.*, 1995) für die trainingsunabhängige HSP-Antwort auf Proteinebene verantwortlich sein. In diesem Zusammenhang fanden Essig *et al.* (1997) Hinweise darauf, daß, sobald ROS schädigende Wirkung auf Proteine ausübt, was während aufeinanderfolgenden Muskelkontraktionen der Fall sein kann, zusätzlich zu den ohnehin schon exi-

stierenden antioxidativen Schutzsystemen die Synthese von Hitzestressproteinen (HSPs) angeregt werden kann. ROS selbst soll in diesem Fall durch eine gesteigerte mitochondriale Atmung gebildet worden sein. Essig *et al.* (1997) setzten demnach voraus, daß ein gewisses oxidatives Potential, also eine gewisse Menge an ROS bestehen muß, damit die Hitzeschockproteine produziert werden können, um dann den antioxidativen Systemen hinsichtlich Schutz der Proteine vor Denaturierung entgegenkommen zu können. Übertragen auf unsere Studie könnte demnach das oxidative Potential zu gering gewesen sein, so daß die HSPs infolge des Hitzeschocks zwar produziert wurden, jedoch aufgrund des Ruhezustands der Trainierten den HSPs im Gegensatz zu den bestehenden antioxidativen Schutzsystemen keine weitere Rolle hinsichtlich Proteinmanagement zukam.

Eine trainingsbedingt verminderte ROS-Produktion wurde schon in anderen Studien beschrieben. Sowohl Pyne *et al.* (1995) als auch Smith *et al.* (1990) berichten über trainingsabhängig verminderte oxidative Aktivitäten in neutrophilen Granulozyten.

Wahrscheinlich ist auch, daß antioxidative und protektive Schutzsysteme in TR zusätzlich aktiviert werden. In diesem Zusammenhang beschreiben Mena *et al.* (1991), Criswell *et al.* (1993) sowie Powers *et al.* (1999) erhöhte Werte von Superoxiddismutase (SOD), Gluthationperoxidase und Catalase in Abhängigkeit von regelmäßigem Training.

Zuo *et al.* (2000) vermuten außerdem, daß Hitzestress neben der Beteiligung an erhöhter ROS/RNS -Bildung (FEHRENBACH und NORTHOFF, 2001) auch der Stimulator ist, der sowohl extra- als auch intrazellulär für die Produktion der antioxidativ wirkenden Superoxiddismutase (SOD) verantwortlich sein kann. Dies deutet darauf hin, daß die HSPs in ihrer physiologischen Antwort auf Training in Zusammenhang mit Hitzeschock offensichtlich durch andere Schutzsysteme unterstützt werden können, was eine weitere Erklärung für die trainingsunabhängige Antwort auf Proteinebene bedeuten kann. Die Frage stellt sich, bis zu welchem Ausmaß an Stress diese möglicherweise stattfindende Zusammenarbeit bestehen kann. In einer Studie wurden promonozytische Zellen einem letalen Hitzestreß ausgesetzt. Durch Zugabe von Antioxidantien konnte die hitzebedingt induzierte Apoptose jedoch nicht mehr vermindert werden (GALAN *et al.*, 2001).

Schließlich können auch methodische Unterschiede eine Rolle spielen. Zum einen wurden in früheren Studien die Basalexpression der Zellen unmittelbar nach Blutentnahme untersucht. In unserem Fall wurden die unstimulierten Proben, die

als Negativkontrolle zu den mit Hitzeschock stimulierten Proben verwendet wurden, parallel zur 3-stündigen Hitzeschockstimulation im Brutschrank bei 37°C in 50 ml Plastikröhrchen gelagert. Wie Fincato *et al.* (1991) berichten, gibt es Hinweise auf HSP-Expression, zumindest bei HSP70, die aufgrund von Adhärenz der Zellen an Plastikgefäße zustandekommt. Demnach wäre natürlich eine signifikante Unterscheidbarkeit der Basalexpression von TR und UT nicht mehr gewährleistet. Auch das Prozedere zur Gewinnung der PBMC aus Vollblut kann als Einflußfaktor nicht ausgeschlossen werden und die Differenzierung geringer Unterschiede verdecken.

Von großer Bedeutung ist auch die Tatsache, daß die beiden Gruppen TR/UT ihrem Alter nach entsprechend verglichen wurden, da es Hinweise darauf gibt, daß mit zunehmendem Alter auch die HSP-Expression steigt, sowie die Antwort auf externen Hitzeschock mit steigendem Alter reduziert wird ((HALL *et al.*, 2000), (MCARDLE *et al.*, 2002), (VASILAKI *et al.*, 2002)). In einer früheren Studie (FEHRENBACH *et al.*, 2000b) hatte der Altersunterschied zwar keinen signifikanten Einfluß, könnte aber zu den Unterschieden TR/UT beigetragen haben.

Weiterhin dürfte auch Intensität und Trainingsdauer eine Rolle spielen. In unserer Studie betrieben die Athleten mehr und intensiveres Ausdauertraining als in früher untersuchten Studien. Möglicherweise sind die TR mit intensiveren Trainingsphasen so gut adaptiert, daß Unterschiede zwischen TR und UT zumindest auf Proteinebene nicht mehr auffallen. Diese vorliegende Studie zeigt, daß auf Proteinebene die HSP-Funktion hinsichtlich Ausdauertraining offensichtlich keine so starke Beeinträchtigung in ihrer Expression erfährt, als daß sie sich im Vergleich zu Nicht-Ausdauertrainierten unterscheiden läßt.

5.2.2 Expressionsverhalten der HO-1 auf Hitzeschockstimulation, Vergleich TR/UT

Sowohl in Lymphozyten als auch in Monozyten sind so gut wie keine Unterschiede der HO-1-Expression vor und nach der Stimulation mit Hitzeschock erkennbar. Die HO-1 läßt sich durch Hitzeschock demnach nicht stimulieren (Abbildung 4.8). Diese Tatsache deckt sich mit Beobachtungen, wie sie zum Beispiel Shibahara *et al.* (1989) und Okinaga *et al.* (1996) gemacht haben, nämlich daß es zwar ein Hitzeschockelement im menschlichen HO-Gen gibt, jedoch vermutet wird, daß dieses Hitzeschockelement entweder beim Menschen nicht funktionsfähig ist (SHIBARA

et al., 1989) oder potentiell funktioniert, allerdings in vivo unterdrückt wird (OKINAGA *et al.*, 1996). In Zellen von Ratten jedoch gelang Shibahara *et al.* (1987) schon 1989 der signifikante Nachweis der HO-1-Expression als Antwort auf Hitzeschock.

Aber nicht nur die Funktion der HO-1 in seiner zellschützenden Wirkung als Antwort auf Wärmestreß, sondern vor allem seine Wirkung als antioxidatives Stressprotein, was bei höherem Anfall von ROS, sprich oxidativem Stress, zum Einsatz kommt, ist von großer Bedeutung, wie Studien an Tiermodellen zeigten (STOCKER, 1990), (VOGT *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang ist die Fragestellung, wie die HO-1 auf körperliche Belastung reagiert, natürlich interessant.

Sowohl bei der Basalexpression der HO-1 (Abbildung 4.13), sprich HO-1-Expression im unstimulierten Zustand, als auch bei der HO-1-Expression nach 2 Stunden Hitzeschockstimulation (Abbildung 4.17), zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen TR und UT. Bei beiden ist die Expression in den Lymphozyten der Trainierten geringer als bei den Untrainierten, jedoch nicht signifikant unterscheidbar. Die Monozyten weisen keine Unterschiede auf.

Diese Ergebnisse stimmen nicht mit denen überein, die Niess *et al.* (1999) in einer ähnlichen Studie ermittelten. Das Studiendesign bestand dabei ebenfalls aus einer Gruppe von trainierten Probanden im Vergleich mit einer untrainierten Kontrollgruppe. Es zeigte sich in dieser Studie eine verminderte Basalexpression der HO-1 bei den Trainierten, wofür Niess *et al.* (1999) adaptive Mechanismen verantwortlich machten. Auf der anderen Seite konnten sie eine deutliche HO-1-Expressions-Zunahme in der Trainierten-Gruppe nach einem absolvierten Halbmarathon ausmachen. Wahrscheinlich bedarf es dieser längeren Stimulationsphase (Halbmarathon), damit die HO-1 induziert werden kann, was auch Fehrenbach *et al.* (2003) beobachteten, die in der Gegenüberstellung verschiedener Belastungsprotokolle herausfanden, daß nach absolviertem Halbmarathon eine signifikante HO-1-Expression zu erwarten ist, was sich nach Kurzzeitbelastung unabhängig davon, wie erschöpfend die Belastung war, nur geringgradig einstellt.

Offensichtlich war also in unserer Studie Hitzeschock nicht der richtige Stimulator zur Induktion der HO-1. Jedoch haben wir ähnliche Ergebnisse wie Niess *et al.* (1999) erwartet, was die Basalexpression der HO-1 betrifft. Möglicherweise sind für diese nicht identischen Ergebnisse verschiedene methodische Bearbeitungsschritte verantwortlich. Niess *et al.* (1999) bestimmten die Basalexpression unmittelbar nach Blutabnahme im Vollblut, bestimmten demnach die eigentlichen Nativwerte,

wohingegen unsere unstimulierten Proben als Negativkontrolle zu den parallel mit Hitzeschock stimulierten Proben zunächst 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubierten, bevor sie gemessen wurden.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen auf Proteinebene jedoch konnten in einer Parallelstudie auf Transkriptionsebene (VOGEL, in Vorbereitung) signifikante Anstiege der HO-1-mRNA durch Hitzeschockstimulation festgestellt werden. In diesem Zusammenhang könnten bislang noch nicht identifizierte supprimierende Effekte der Hitzeschockstimulation auf Proteinebene eine Rolle spielen.

Außerdem scheint die HO-1 auf Proteinebene von Ausdauertrainierten hauptsächlich als Antwort auf belastungsinduzierten oxidativen Stress exprimiert zu werden, worauf Niess *et al.* (1999) letztendlich ihre Ergebnisse zurückführten. Dies deutet darauf hin, daß zumindest auf Proteinebene von Ausdauersportlern der HO-1 in ihrer Wirkung als antioxidativem Schutzfaktor größere Bedeutung zukommt als in ihrer Funktion als Hitzeschockprotein.

5.2.3 Expression der iNOS auf Hitzeschockstimulation, sowie auf Stimulation mit LPS und Cytokinen, Vergleich TR/UT

Hinsichtlich Hitzeschockstimulation konnten wir keine Induzierbarkeit der iNOS feststellen (Abb. 4.11). Im Vergleich TR/UT ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.20), auch wenn die thermoneutrale iNOS-Expression der TR tendenziell geringer ist gegenüber den UT. Kroencke *et al.* (1995) berichten schon über eine Induzierbarkeit der iNOS durch Hitzeschock und auch Goldring *et al.* (2000) berichten, daß Hitzeschock in Makrophagen von Mäusen eine vermehrte Transkription des iNOS-Gens hervorruft. Allerdings fanden Goldring *et al.* (2000) zusätzlich heraus, daß auch LPS im Hinblick auf die iNOS-Expression vor allem in Kombination mit Hitzeschock eine bedeutende Funktion einnehmen kann. Diese beiden potentiellen Induktoren wurden in unserer Studie jedoch getrennt voneinander betrachtet. Wong *et al.* (1997) hingegen geben Hinweise darauf, daß die iNOS-Gen-Expression durch Hitzeschockstimulation aufgrund transkriptionaler Mechanismen, in denen auch der Transkriptionsfaktor NF κ -B involviert ist, unterdrückt wird. Sie untersuchten dazu Cytokin-vermittelte (Interleukin-1 β) iNOS-Expressionen an glatten Muskelzellen von Ratten. Ähnliche Ergebnisse werden von Inoue *et al.* (2000) berichtet, die auch eine verminderte iNOS-Expression unter Hit-

zestress zumindest auf Transkriptionsebene aufzeigen. Daß sich auf Translations-ebene in unseren Ergebnissen keine Induktion der iNOS durch in vitro Hitzeschock nachweisen läßt, stimmt mit den Ergebnissen von Niess (2001) überein, der ebenfalls auf Proteinebene von humanen Gesamtleukozyten für keine der untersuchten Zellpopulationen einen Anstieg des iNOS-Proteins unter Hitzestress vermerken konnte. Möglicherweise hängt dies mit strengeren regulatorischen Mechanismen der iNOS zusammen, wie sie auf Translationsebene in menschlichen Makrophagen im Gegensatz zu Nagetieren, von Kroencke *et al.* (1995) vermutet werden. Oder anderen Induktoren der iNOS wie LPS und Cytokinen, die schon in der Diskussion der Vorversuche erwähnt wurden, kommt gegenüber Hitzestress größere Bedeutung zu.

Letzteres läßt sich zumindest auf Transkriptionsebene in einer Parallelstudie zu dieser Arbeit bestätigen (VOGEL, in Vorbereitung). Deren Ergebnisse zeigen im Vergleich TR/UT nach Stimulation mit Cytokinen und LPS eine Expressionszunahme der iNOS in der Gruppe der TR. Auf Translationsebene allerdings, so zeigt Abbildung 4.12 läßt sich die iNOS nur in den Monozyten vereinzelt durch LPS und Cytokine stimulieren. Im Vergleich TR/UT (Abb. 4.21) fällt dies jedoch nicht ins Gewicht. Interessant ist jedoch, daß diejenigen Probanden, deren iNOS-Expression unter Stimulation mit Cytokinen und LPS zunahm (Abb. 4.12), Trainierte waren, die sich in einem sehr hohen Trainingszustand (60-80 km/Woche) befanden. Dies entspricht in Ansätzen den Ergebnissen der iNOS-mRNA, deren Produktion mit zunehmendem Trainingszustand anstieg. Möglicherweise könnte auch hier die Bearbeitungszeit eine Rolle spielen, so daß auf Proteinebene die Beobachtung der iNOS-Expression zu späteren Zeitpunkten interessant wäre. Für den untrainierten Probanden (Abb. 4.12), der ebenfalls sehr stark auf die Stimulation reagiert hat, konnten wir im Nachhinein ermitteln, daß auch dieser bis vor einem halben Jahr noch regelmäßiges Ausdauertraining betrieben hat, demnach vielleicht zu früh zur Kategorie der UT gezählt wurde.

Aber wie auch in der Diskussion der Vorversuche deutlich wird, handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein Zeitproblem alleine, sondern eher um ein Stimulations- oder Expressionsproblem der iNOS in humanen mononukleären Zellen auf Proteinebene. In diesem Zusammenhang stellen mehrere Studien die Induzierbarkeit der iNOS zur Generierung von $\cdot\text{NO}$ in menschlichen Monozyten/Makrophagen in Frage. Weinberg *et al.* (1995) zeigen auf, daß die klassischen iNOS-Induktoren ($\text{IFN } \gamma$, $\text{TNF } \alpha$, LPS) in Makrophagen von Nagern einen deutlichen $\cdot\text{NO}$ -Anstieg hervorrufen, in humanen Makrophagen jedoch eher geringe iNOS- bzw. $\cdot\text{NO}$ -Expressionen

zu beobachten sind. Ebenso konnte demonstriert werden, daß humane mononukleäre Phagozyten sowohl iNOS-mRNA als auch iNOS-Protein bilden können, ihre Fähigkeit zur $\cdot\text{NO}$ -Generierung jedoch sehr gering ausgeprägt ist (LIEW, 1994). Auch Oliveira *et al.* (1999), die insbesondere die Stimulierbarkeit von LPS in PBMC beobachteten, geben Hinweise darauf, daß LPS, was von Chen *et al.* (1996) als Prototyp der Makrophagenaktivierung angesehen wird, in menschlichen Zellen doch andere Wege zur $\cdot\text{NO}$ -Generierung geht. Unter anderem vermuten sie, daß eine Korrelation von LPS und NO-Inhibitoren wie L-N-Argininmethylester besteht, welche durch Hemmung von $\cdot\text{NO}$ zu vermehrter iNOS-Expression führen kann. Außerdem soll die Anwesenheit bestimmter Serumfaktoren, die in vitro möglicherweise nicht mehr miterfaßt werden, einen positiven Einfluß auf die Induktion der iNOS durch LPS ausüben (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Dies allerdings würde wiederum für eine Vollblutstimulation sprechen, die wir im Rahmen der Vorversuche (Abb. 4.3) ausgeschlossen haben.

Oliveira *et al.* (1999) berichten auch, daß eine kombinierte Stimulation (LPS und Cytokine) die wahrscheinlich beste Makrophagenaktivierung induziert, was auch Lorsbach *et al.* (1993) demonstrierten und wir in unserer Studie umsetzten. Jedoch kann auch bei kombinierter Stimulation der $\cdot\text{NO}$ -Effekt bzw. die iNOS-Expression sehr gering bleiben (SCHNEEMANN *et al.*, 1993).

Eine weitere Erklärung für die geringen Effekte der iNOS-Expression in humanen mononukleären Zellen unter Stimulation mit Cytokinen und LPS wird von Reiling *et al.* (1994) geliefert. Letztere entdeckten, daß humane Monozyten/Makrophagen neben der iNOS auch die Isoform cNOS (c-konstitutiv) exprimieren können. Frühere Studien berichten außerdem, daß die Induktion der iNOS möglicherweise durch eine von cNOS-Enzymen produzierte Menge an NO unterdrückt wird (COLASANTI *et al.*, 1997). Endogene NO-Konzentrationen, die von cNOS gebildet werden, könnten also durch Unterdrückung der iNOS-Induzierbarkeit für die geringe NO-Freisetzung aus menschlichen Zellen wie PBMC verantwortlich sein, zumal cNOS zumindest nicht durch Cytokine induzierbar ist.

Daß die mononukleären Zellen durch die von uns verwendeten Stimulantien überhaupt aktiviert wurden, konnten wir durch einen parallelen Anstieg von NF κ B in diesen Zellen im Rahmen der Vorversuche (Abb. 4.6) nachweisen. Wie schon erwähnt können zu hohe ROS/RNS-Konzentrationen (ARRIGO, 1999) als auch eine übersteigerte NO-Produktion (CONNELLY *et al.*, 2001) die Funktion von NF κ -B hemmen und damit zu einer Drosselung der iNOS-Transkription führen (FEHRENBACH und NORTHOFF, 2001), was im Hinblick auf die Vorversuche jedoch in

unserer Studie eher nicht der Fall zu sein scheint, denn NF κ B zeigt eine sehr deutliche Expression wie Abbildung 4.6 bestätigt. Es gibt auch Hinweise darauf, daß in Makrophagen von Mäusen die iNOS-Expression über basale Promotoren und Verstärkerelemente gesteuert wird, welche sensibel auf LPS und INF γ reagieren ((XIE *et al.*, 1993), (LOWENSTEIN *et al.*, 1993), (ALLEY *et al.*, 1995)). Laut Zhang *et al.* (1996) sind besagte Verstärkerelemente und iNOS-Promotoren möglicherweise in menschlichen Makrophagen inaktiviert im Gegensatz zu Mäusezellen, ebenso wie in menschlichen Zellen gewisse komplexe Funktionen von Transkriptionsfaktoren wie NF κ -B hinsichtlich LPS induzierter iNOS-Expression möglicherweise nicht vorhanden sind. Eine These, die die geringe iNOS-Expression dieser Studie sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptionsebene erklären könnte.

Im Vergleich TR/UT allerdings zeigen sich auf Transkriptionsebene (VOGEL, in Vorbereitung) dennoch Unterschiede. Die iNOS-Expression der TR-Gruppe läßt sich durch Stimulation mit Cytokinen und LPS im Vergleich zu UT durchaus anregen, was den Beobachtungen von Woods *et al.* (2000), nämlich einer gesteigerten Makrophagenreagibilität von ausdauertrainierten Nagern durch Cytokin- und LPS-Stimulation, entspricht.

Obwohl Kroencke *et al.* (1995) die Regulation der iNOS in menschlichen Makrophagen schwerpunktmäßig auf Transkriptionsebene vermuten, konnten Niess *et al.* (2000) hingegen erhöhte iNOS-Expressionen auf Proteinebene in Gesamtleukozyten nachweisen, die als Antwort auf intensive körperliche Belastung gebildet wurden. Parallel wurden auch erhöhte Cytokinwerte (Interleukin-8, TNF α) beobachtet, was für eine inflammatorische Antwort auf körperliche Belastung spricht und was ebenso eine belastungsinduzierte Produktion von endogenem \cdot NO erwarten läßt. Möglicherweise wurde durch unsere Stimulantien eine zu geringe inflammatorische Reaktion simuliert, als daß auf Proteinebene signifikante iNOS-Expressionen hätten sichtbar werden können. Aber wie schon in der Diskussion der Vorversuche demonstriert, wirkten sich höhere Cytokin- und LPS-Konzentrationen als die von uns verwendeten auf unsere Zellen sehr schädlich aus, was die Auswertung (mit Hilfe des Durchflußzytometers) deutlich beeinträchtigte. Da der Grad zwischen schützender und schädigender Wirkung von \cdot NO sehr gering sein kann, ist seine Auswirkung auf körperliche Belastung und Ausdauertraining auch im Hinblick auf krankheitsspezifische inflammatorisch ablaufende Prozesse natürlich interessant.

Um mögliche Langzeiteffekte von Ausdauertrainierten hinsichtlich der iNOS-Expression zu erfahren, bestimmten wir auch die Basalexpression der iNOS bei TR und UT im unstimulierten Zustand. Diese zeigte keine signifikanten Unter-

schiede, was sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptionsebene (VOGEL, in Vorbereitung) gleichermaßen der Fall war. Im Gegensatz dazu konnten Niess *et al.* (2002) auf Transkriptionsebene bei einer Gruppe von TR verminderte iNOS mRNA-Expressionen im Vergleich zu einer Gruppe von UT nachweisen. Allerdings wurde in dieser Studie (NIESS *et al.*, 2002) die iNOS-Expression in den Gesamtleukozyten betrachtet und nicht in den Subpopulationen (PBMC). Womöglich sind die Effekte auf Ausdauertraining in den neutrophilen Granulozyten ausgeprägter als in mononukleären Zellen. Ebenso scheint körperliches Training die iNOS-Expression in der Aortawand von Kaninchen zu vermindern, was mit einer Verbesserung der vaskulären Funktion bei Atherosklerose einhergeht (YANG und CHEN, 2003). Demgegenüber berichten Yang *et al.* (2002) in einer anderen Studie über eine trainingsbedingt erhöhte iNOS-Expression in Endothelzellen, die aus Rattenaorta isoliert wurden. Neben der Expressionszunahme der iNOS konnten Yang *et al.* (2002) allerdings auch erhöhte Expressionswerte für die eNOS im Endothel finden. Möglicherweise kommt hinsichtlich Ausdauertraining den beiden anderen NOS-Isoformen doch mehr Bedeutung zu. Vassilakopoulos *et al.* (2003) entdeckten in Skelettmuskelzellen und Muskelzellen des Zwerchfells trainierter Ratten erhöhte Werte der konstitutiven NOS-Formen (eNOS und nNOS = cNOS), jedoch keine Expression des iNOS-Proteins. Ebenso konnten im Fettgewebe von Ratten trainingsbedingt erhöhte Basalexpressionen der eNOS, nicht aber der iNOS festgestellt werden (KAWANAMI *et al.*, 2002).

Hinsichtlich der Funktionen von $\cdot\text{NO}$ sind destruirende Effekte, die sich bei der Abwehr von Tumorzellen und Mikroorganismen günstig auswirken (LINCOLN *et al.*, 1997), aber auch negative Einflüsse, die sich bei Erkrankungen des rheumatischen und autoimmunen Formenkreises sowie bei Asthma bronchiale entfalten (GROSS, 1995), (LINCOLN *et al.*, 1997), als auch zellschützende Wirkungen (KROENCKE *et al.*, 1995) bekannt.

Im Bezug auf Ausdauertraining und mögliche adaptive Mechanismen kann über die Auswirkung von $\cdot\text{NO}$ anhand der iNOS-Expression in unserer *in vitro* Studie nur spekuliert werden. Jedoch können in dieser Studie auf Proteinebene bei Ausdauertrainierten im Vergleich zu Nicht-Trainierten trainingspezifische Effekte auf die iNOS-Expression wahrscheinlich ausgeschlossen werden. In Bezug auf das Immunsystem bleibt demnach auch die Frage offen, in wieweit trainingsabhängige relevante Effekte der durch die iNOS eingeleiteten $\cdot\text{NO}$ -Bildung in mononukleären Zellen eine Rolle spielen.

5.3 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, auf Proteinebene mögliche durch Ausdauertraining bedingte Langzeiteffekte mittels Beobachtung der Expression von Stressproteinen in Leukozyten bzw. PBMC des peripheren Blutes zu erfassen. Anders als in früheren Studien befanden sich die Trainierten dabei im Ruhezustand, um jegliche Einflüsse durch akute Streßsituationen auszuschalten. Strenge Auswahlkriterien sicherten die Zuordnung der Probanden in etrennte Gruppen (TR/UT). Besonderer Wert wurde auf möglichst gleiches Alter der Gruppen gelegt. Die intrazelluläre Expression der Stressproteine (HSP27, HSP70, HO-1, iNOS) wurde mittels Durchflußzytometrie analysiert.

Auf Proteinebene zeigen periphere mononukleäre Zellen männlicher Ausdauertrainierter keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu untrainierten Probanden gleichen Alters. Dies gilt sowohl hinsichtlich der Basalexpression der Stressproteine, also der Expression der Zellen im unstimulierten Zustand als auch der Expression nach Stimulation der Zellen *in vitro*.

Trainingsbedingt beobachtete Effekte der Basalexpression scheinen sich bei Betrachtung anderer Studien mehr in neutrophilen Granulozyten als in mononukleären Zellen zu entfalten.

Hitzeschockproteine wie HSP27 und HSP70 werden unter *in vitro* Hitzeschockstimulation verstärkt exprimiert, jedoch erweist sich die Hitzeschockantwort der PBMC als trainingsunabhängig, was aufgrund zusätzlich aktivierter protektiver Systeme oder eines zu geringen oxidativen Potentials der Fall sein kann. Außerdem scheint Hitzeschock zur Expression von HO-1 im Humansystem nicht der geeignete Stimulator zu sein.

Im Hinblick auf die Expression des iNOS-Proteins in PBMC sind tendentielle Stimulationsanstiege unter Cytokin- und LPS-Stimulation erkennbar, signifikante Unterschiede im Vergleich TR/UT bleiben jedoch sowohl nach Stimulation mit Hitzeschock als auch mit Cytokinen und LPS aus. Ursächlich muß in diesem Fall an eine verminderte iNOS-Stimulierbarkeit beim Menschen im Vergleich zu Nagierzellen gedacht werden, was auch andere Arbeitsgruppen beobachteten.

Zusammenfassend kann bei allen vier Stressproteinen ein Zeitproblem in der Bearbeitung und möglicherweise zu frühen Auswertung der Proteinexpression der Zellen eine Rolle spielen. Ebenso kann es durch Plastikadhärenz zu unspezifischen Stimulierungen während der neutralen Inkubationsphase gekommen sein. Da in

einer Parallelstudie zu dieser Arbeit Hinweise auf trainingsbedingte adaptive Mechanismen auf Transkriptionsebene gefunden wurden, kann außerdem vermutet werden, daß auf Translationsebene in menschlichen Zellen strengere regulative Mechanismen ablaufen als es offensichtlich auf Transkriptionsebene ebenso wie in Tiermodellen der Fall zu sein scheint. Möglicherweise laufen auf Translations-ebene Mechanismen ab, die eine $\cdot\text{NO}$ -Generierung hinsichtlich Kumulation und damit Gewebe- und Zellschädigung in stärkerem Maße verhindern wollen als auf Transkriptionsebene.

Abbildungsverzeichnis

3.1	Streulicht histogramm von Leukozyten und Häufigkeitshistogramm der Fluoreszenzintensität	32
3.2	Legende der Rautensymbole	33
4.1	HSP70-Expression nach LPS-Stimulation	35
4.2	iNOS-Expression nach LPS-Stimulation	35
4.3	iNOS-Expression in Vollblut und PBMC	37
4.4	iNOS-Expression bei unterschiedlichen Inkubationszeiten	38
4.5	iNOS-Expression bei unterschiedlichen Cytokinkonzentrationen	39
4.6	NF κ -B-Expression nach Cytokin- und LPS-Stimulation	40
4.7	Doppelmarkierung	44
4.8	HO-Expression nach Hitzeschock	45
4.9	HSP27-Expression nach Hitzeschock	45
4.10	HSP70-Expression nach Hitzeschock	46
4.11	iNOS-Expression nach Hitzeschock	46
4.12	iNOS-Expression nach Cytokin (LPS)-Stimulation	47
4.13	HO-Basalexpression	48
4.14	HSP27-Basalexpression	48
4.15	HSP70-Basalexpression	49
4.16	iNOS-Basalexpression	49
4.17	HO-Expression von Trainierten TR/UT	50
4.18	HSP27-Expression im Vergleich TR/UT	50
4.19	HSP70-Expression im Vergleich TR/UT	51

4.20 iNOS-Expression im Vergleich TR/UT (Hitze)	51
4.21 iNOS-Expression im Vergleich TR/UT (CYT/LPS)	52

Tabellenverzeichnis

2.1	Stimulatoren	22
2.2	Antikörper	22
2.3	Chemikalien	23
2.4	Pufferlösungen und Medien	23
2.5	Geräte	23
2.6	Labormaterialien	23
3.1	Leukozyten-Subpopulationen der Probanden	24
3.2	Anthropometrische Daten und Laborwerte der Probanden	25

Literaturverzeichnis

- ABRAHAM, N. G., DRUMMOND, G. S., LUTTON, J. D., KAPPAS, A. (1996): The biological significance and physiological role of heme oxygenase. *Cell. Physiol. Biochem.* **32**: 129–168.
- ALLEY, E. W., MURPHY, W. J., RUSSELL, S. W. (1995): A classical enhancer element responsive to both lipopolysaccharide and interferon-gamma, but not interferon-beta, augments induction of the iNOS gene in mouse macrophages. *Gene* **158**: 247–251.
- APPLEGATE, L. A., LUSCHER, P., TYRRELL, R. M. (1991): Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* **51**: 974–978.
- ARRIGO, A. P. (1999): Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 936–944.
- ARRIGO, A. P., WELCH, W. J. (1987): Characterization and purification of the small 28 000-dalton mammalian heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **262**: 15359–15369.
- ARUOMA, O. I. (1994): Free radicals and antioxidan strategies in sports. *J. Nutr. Biochem.* **5**: 370–381.
- 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**: 435–442.
- BAEUERLE, P. A., HENKEL, T. (1994): Function and activation of NF-kappaB. *Annu Rev Immunol* **12**: 141–179.
- BAJ, Z., KANTORSKI, J., ETAL, E. M. . (1994): Immunological status of competitive cyclists before and after the training season. *Int. J. Sports Med.* **15**: 319–324.
- BARBE, M. F., TYTELL, M., GOWER, D. J., WELCH, W. J. (1988): Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* **24**: 1817–1820.

- BARNES, P. J., LIEW, F. Y. (1993): Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol. Today* **16**: 128–130.
- BECKMANN, R. P., L. A. MIZZEN, WELCH, W. J. (1990): Interaction of hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* **248**: 850–854.
- BENONI, G., BELLAVITE, P., 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. Occup. Physiol.* **70**(2): 187–191.
- BERG, A., NORTRHOFF, H., KEUL, J. (1992): Immunologie und Sport. *Internist* **33**: 169–178.
- BIRKS, E. J., YACOB, M. H. (1997): The role of nitric oxide and cytokines in heart failure. *Cor Heart Disease* **8**: 389–401.
- 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.
- BOSHOF, T., LOMBARD, F., EISELEN, R., BORNMAN, J. J., BACHELET, M., POLLA, B. S., BORNMAN, L. (2000): Differential basal synthesis of Hsp70/Hsc70 contributes to interindividual variation in Hsp70/Hsc70 inducibility. *Cell Mol. Life Sci.* **57**(8–9): 1317–1325.
- BRINES, R., HOFFMAN-GOETZ, L., PEDERSEN, B. K. (1996): Can you exercise to make your immune system fitter? *Immunol Today* **17**: 252–254.
- BROUWER, D. E., SCHNIEDERS, C. G., PETERS, H. P. F., NIEUWENHUIJS, V. B., VAN DER MEER, R., AKKERMANS, L. M. A. (1997): Endogenous nitric oxide production after exercise (Abstr.). *Med. Sci. Sports Exerc.* **29**: 72.
- BROWN, C. R., MARTIN, R. L., HANSEN, W. J., BECKMANN, R. P., WELCH, W. J. (1993): The constitutive and stress inducible form of hsp 70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP dependent fashion. *J. Cell. Biol.* **120**: 1101–1112.
- BRUNSGAARD, H., GALBO, H., HALKJAER-KRISTENSEN, J., JO-HANSEN, T. L., MACLEAN, D. A., PEDERSEN, B. K. (1997): Exercise induced increase in interleukin-6 is related to muscle damage. *J. Physiol. (Lond.)* **499**: 833–841.
- CABLE, E. E., PEPE, J. A., KARAMITSIOS, N. C., ET AL. (1994): Differential effects of metalloporphyrins on messenger RNA levels of delta-aminolevulinate synthase and heme oxygenase. Studies in cultured chick embryo liver cells. *J. Clin. Invest.* **94**: 649–654.

- CAMHI, S. L., ALAM, J., OTTERBEIN, L., ET AL. (1995a): Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **13**: 387–398.
- CAMHI, S. L., LEE, P., CHOI, A. M. K. (1995b): The oxidative stress response. *New Horizons* **3**: 170–182.
- CANNON, J. G. (1993): Exercise and resistance to infection. *J. Appl. Physiol* **74**: 973–981.
- CHEMNETIUS, J. M., MANGLITZ, T., KLOEPEL, T., DOENST, T., SCHWARTZ, P., KREUZER, H., ZECH, R. (1993): Rypid preparation of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial subpopulations from cardiac muscle. *Int. J. Biochem.* **25**: 589–596.
- CHEN, L., PACE, J. L., RUSSEL, S. W., MORRISON, D. C. (1996): Altered regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages from senescent mice. *Infection and Immunity* **64**: 4288–4298.
- CHIRICO, W. J., WATERS, M. G., BLOBEL, G. (1988): 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**: 805–810.
- CIOCCA, D. R., OESTERREICH, S., CHAMNESS, G. C., MCGUIRE, W. L., FUQUA, S. A. W. (1993): Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst* **85**: 1558–1570.
- CLARK, J. E., FORESTI, R., GREEN, C. J., MOTTERLINI, R. (2000): haem oxygenase-1-derived bilirubin and cytoprotection. *Biochem. J.* : 615–619.
- COLASANTI, M., CAVALIERI, E., PERSICHINI, T., MOLLACE, V., MARIOTTO, S., SUZUKI, H., LAURO, G. M. (1997): Bacterial lipopolysaccharide plus interferon-gamma elicit a very fast inhibition of a Ca²⁺- dependent nitric oxide synthase activity in human astrocytoma cells. *J. of Biol. Chem.* **272**: 7582–7585.
- CONNELLY, L., PALACIOS-CALENDER, M., AMEIXA, C., MONCADA, S., HOBBS, A. J. (2001): Biphasic regulation of NF- κ B-Aktivität underlies the pro- and antiinflammatory actions of nitric oxide. *J. Immunol.* **166**: 3873–3881.
- CRAIG, E. A. (1985): The heat shock response. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **18**: 239–280.
- CRAIG, E. A., WEISSMAN, J. S., HORWICH, A. L. (1994): Heat shock proteins and molecular chaperons: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* **78**: 365–372.

- CRISWELL, D., POWERS, S., DODD, S., LAWLER, J., EDWARDS, W., REHSLER, K., GRINTON, S. (1993): High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**(10): 1135–1140.
- DANNER, R. L., COBB, J. P., VANDERVORT, A. L. (1995): Nitric oxide as a mediator of hypotension and inflammation in sepsis. In: J. L. VINCENT (Hrsg.): *Role of nitric oxide in Sepsis and ARDS*, Springer, Berlin, New York, 155–162.
- DEMIREL, H. A., POWERS, S. K., ZERGEROGLU, M. A., SHANELY, R. A., HAMILTON, K., COOMBES, J., NAITO, H. (2001): Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J. Appl. Physiol.* **91**: 2205–2212.
- DI DOMENICO, B. J., BUGAISKY, G. E., LINDQUIST, S. (1982): The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell* **31**(3–2): 593–603.
- DÖLL, M. (1994): Sport-ein zusätzlicher Risikofaktor für Gesundheitsschäden durch Freie Radikale? Welchen Schutz bieten Antioxidantien. *Dt. Z. f. Sportmed.* **45**: 404–412.
- DOMANICO, S. Z., DENAGEL, D. C., GREEN, J. M., PIERCE, S. K. (1993): Cloning of the gene encoding peptide-binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3598–3610.
- DUFAUX, B., ORDER, U. (1989): Plasma elastase-alpha 1-antitrypsin, neopterin, tumor necrosis factor, and soluble interleukin-2 receptor after prolonged exercise. *In. J. Sports Med.* **10**: 434–438.
- ELBIRT, K. K., BONKOVSKY, H. L. (1999): Heme Oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc. Ass. Am. Phys.* **111**: 438–447.
- ESSIG, D. A., BORGER, D. R., JACKSON, D. A. (1997): Induction of heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA in skeletal muscle following contraction. *Am. J. Physiol.* **272**: 59–67.
- 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**(5): 409–428.
- FEHRENBACH, E., NIESS, A. M., PASSEK, F., SORICHTER, S., SCHWIRTZ, A., BERG, A., DICKHUTH, H. H., NORTHOFF, H. (2003): Influence of different types of exercise on the expression of haem oxygenase-1 in leucocytes. *J. Sports Sci.* **21**: 383–389.

- FEHRENBACH, E., NIESS, A. M., SCHLOTZ, E., PASSEK, F., DICKHUTH, H. H., NORTHOFF, H. (2000a): Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leucocytes of endurance runners. *J. Appl. Physiol.* **89**: 704–710.
- FEHRENBACH, E., NIESS, A. M., VEITH, R., DICKHUTH, H. H., NORTHOFF, H. (2001): Changes of HSP72-expression in leucocytes are associated with adaptation to exercise under conditions of high environmental temperature. *J. Leukoc. Biol.* **69**(5): 747–754.
- FEHRENBACH, E., NORTHOFF, H. (2001): Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc. Immunol. Rev.* **7**: 66–89.
- FEHRENBACH, E., PASSEK, F., NIESS, A. M., POHLA, H., WEINSTOCK, C., DICKHUTH, H. H., NORTHOFF, H. (2000b): HSP expression in human leucocytes is modulated by endurance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**(3): 592–600.
- FENTON, H. J. H. (1894): Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc.* **65**: 899–910.
- FIELD, C. J., GOUGEON, R., MARLISS, E. B. (1991): Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery. *J. Appl. Physiol.* **71**: 1089–1097.
- FINCATO, G., POLENTARUTTI, N., SICA, A., MANTOVANI, A., COLOTTA, F. (1991): Expression of a heat-inducible gene of the hsp70 family in human myelomonocytic cells: regulation by bacterial products and cytokines. *Blood* **77**: 579–586.
- FLANAGAN, S. W., RYAN, A. J., GISOLFI, C. V., MOSELEY, P. L. (1995): Tissue specific HSP70 response in animals undergoing heat stress. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **268**: R58–R32.
- FRIMAN, G., ILBACK, N. G. (1992): Exercise and infection: interaction, risks and benefits. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2**: 177–189.
- FUKUDA, Y., SASSA, S. (1993): Effect of interleukin-11 on the levels of mRNAs encoding heme oxygenase and haptoglobin in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 297–302.
- FULLER, K. J., ISSELS, R. D., SLOSMAN, D. O., GUILLET, J.-G., SOUSSI, T., POLLA, B. S. (1994): Cancer and the heat shock response. *European J. of Cancer* **30**: 1884–1891.
- GABIS, K. K., GILDEMEISTER, O. S., PEPE, J. A., ET AL. (1996): Induction of heme oxygenase-1 in LMH cells. Comparison of LMH cells to primary cultures of chick embryo liver cells. *Biochem. Biophys. Acta* **1290**: 113–120.

- GABRIEL, H., KINDERMANN, W. (1997): The acute immune response to exercise: What does it mean? *Int. J. Sports Med.* **18**: 28–45.
- GALAN, A., GARCIA-BERMEJO, L., TROYANO, A., VILABOA, N. E., FERNANDEZ, C., DE BLAS, E., ALLER, P. (2001): The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays). *Eur. J. Cell Biol.* **80**(4): 312–320.
- GARDNER, M. J., ALTMAN, D. G. (1986): Confidence intervals rather than P values: estimation rather than hypothesis testing. *Br. Med. J. (Clin. Es. Ed.)* **292**: 746–750.
- GOLDRING, C. E., REVENEAU, S., CHANTOME, A., PANCE, A., FLEURY, C., HUME, D. A., MIGNOTTE, B., JEANNIN, J. F. (2000): Heat shock enhances transcriptional activation of the murine-inducible nitric oxide synthase gene. *FASEB J.* **14**(15): 2393–2395.
- GOUGEROT-PODICALO, M. A., ELBIM, C., CHOLLET-MARTIN, S. (1996): Modulation of the oxidative burst of human neutrophils by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Pathol. Biol. Paris* **44**: 36–41.
- GROSS, S. S. (1995): Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 737–769.
- GUESDON, F., FRESHNEY, N., WALLER, R. J., RAWLINSON, L., SAKLATVALA, J. (1993): Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate two novel protein kinases that phosphorylate the heat shock protein HSP27 and bety-casein. *J. Biol. Chem.* **268**: 4236–4243.
- HACK, V., STROBEL, G., WEISS, M., WEICKER, H. (1994): PMN cell counts and phagocytic activity of highly trained athletes depend on training period. *J. Appl. Physiol.* **77**: 1731–1735.
- HALL, D. M., XU, L., DRAKE, V. J., OBERLEY, L. W., MOSELEY, P. L., KREGEL, K. C. (2000): Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver after heat stress. *J. Appl. Physiol.* **89**: 749–759.
- HALL, T. J. (1994): Role of HSP70 in cytokine production. *Experientia* **50**: 1048–1053.
- HALLIWELL, B. (1998): Free radicals and oxidative damage in biology and medicine: An introduction. In: R. E. A. (Hrsg.): *Oxidative stress in skeletal muscle*, Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland.
- HARRIS, M. B., STARNES, J. W. (2001): Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: H2271–H2280.

- HARTL, F. U., HLODAN, R., LANGER, T. (1994): Molecular chaperons in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 20–25.
- HEINE, O., DUFAUX, B., KOTHE, A., PRINZ, U., ROST, R. (1995): Bildung reaktiver Sauerstoffderivate und antioxidativer Schutz unter körperlicher Belastung: Übersicht. *Dt. Z. f. Sportmed.* **46**: 482–493.
- 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.
- HOFFMAN-GOETZ, L. (1996): Exercise, immunity, and colon cancer. In: L. HOFFMAN-GOETZ, J. HUSTED (Hrsg.): *Exercise and Immune Function*, CRC, Boca Raton, 179–198.
- HOFFMAN-GOETZ, L., PEDERSEN, B. K. (1994): Exercise and the immune system: a model of the stress response? *Immunol Today* **15**: 382–387.
- HOLBROOK, N. J., UDELSMANN, R. (1994): Heat shock protein gene expression in response to physiologic stress and aging. In: T. R. MORIMOTO, A. TISSIERES, G. GEORGOPOULOS (Hrsg.): *The biology of heat shock proteins and molecular chaperons*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 577–593.
- INOUE, T., KWON, A. H., ODA, M., KAIBORI, M., KAMIYAMA, Y., NISHIZAWA, M., ITO, S., OKUMURA, T. (2000): Hypoxia and heat inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression by different mechanisms in rat hepatocytes. *Hepatology* **32**(5): 1037–1044.
- JÄÄTTELÄ, M. (1993): Overexpression of major heat shock protein HSP70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A₂. *J. Immunol.* **151**: 4286–4294.
- KASHEM, A. M., ENDHO, N., YANO, F., YAMAUCHI, Y., SAKAI, H. (1996): Expression of inducible NOS in human glomerulonephritis: The possible source is infiltrating monocytes/macrophages. *Kidney* **50**: 392–399.
- KAWANAMI, H., NOMURA, S., SAKURAI, T., SAKURAI, T., YAMAGISHI, H., KOMABAYASHI, T., IZAWA, T. (2002): Possible role of nitric oxide on adipocyte lipolysis in exercise-trained rats. *Jpn. J. Physiol.* **52**(4): 343–352.
- KEAST, D., CAMERON, K., MORTON, A. R. (1988): Exercise and the immune response. *Sports Med* **5**: 248–276.
- KEYSE, S. M., TYRRELL, R. M. (1989): Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 99–103.

- KLOSTERGAARD, J., BARTA, M., TOMASOVIC, S. P. (1989): Hyperthermic modulation of tumor necrosis factor-dependent monocyte/macrophage tumor cytotoxicity in vitro. *J. Biol. Response Mod.* **8**: 262–277.
- KONUR, A., KRAUSE, S. W., REHLI, M., KREUTZ, M., ANDREESSEN, R. (1996): Human monocytes induce a carcinoma cell line to secrete high amounts of nitric oxide. *J. Immunol.* **157**: 2109–2115.
- 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.
- LANDRY, J., CHRETIEN, P., LAMBERT, H., HICKEY, E., WEBER, L. (1989): Heat shock resistance conferred by expression of human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell Biol.* **109**: 7–15.
- LEHMANN, M. J., LORMES, W., OPITZ-GRESS, A., STEINACKER, N., FOSTER, C., GASTMANN, U. (1997): Training and overtraining: an overview and experimental results in endurance sport. *J. Sports Med. Phys. Fitness* **37**: 7–17.
- LEVINE, R. L. (1983): Oxidative modification of glutamine synthetase. Characterization of ascorbate model system. *J. Biol. Chem.* **258**: 11828–11833.
- LI, G. C. (1985): Elevated levels of 70,000 dalton heat shock protein in transiently thermotolerant Chinese hamster fibroblasts and in their stable heat resistant variants. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **11**: 165–177.
- LIEW, F. Y. (1994): Regulation of nitric oxide synthesis in infections and autoimmune diseases. *Immunol. Letters* **43**: 95–98.
- LINCOLN, B. C., HEALEY, J. F., BONKOVSKY, H. L. (1988): Regulation of hepatic haem metabolism. Disparate mechanisms of induction of haem oxygenase by drugs and metals. *Biochem. Journal* **250**: 189–196.
- LINCOLN, J., HOYLE, C. H. V., BURNSTOCK, G. (1997): *Nitric oxide in Health and Disease*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 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.
- LOCKE, M., NOBLE, E. G. (1995): Stress proteins: the exercise response. *Can. J. Appl. Physiol.* **20**: 155–167.
- LOCKE, M., NOBLE, E. G., ATKINSON, B. G. (1990): Exercise mammals synthesize stress proteins. *Am. J. Physiol.* **258**: 723–729.

- LORSBACH, R. B., MURPHY, W. J., LOWENSTEIN, C. J., SNYDER, S. H., RUSSEL, S. W. (1993): Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon- γ and lipopolysaccharide. *J. of Biol. Chem.* **268**: 1908–1913.
- LOWENSTEIN, C. J., ALLEY, E. W., RAVAL, P., AN S. H. SNYDER, A. M. S., RUSSELL, S. W., MURPHY, W. J. (1993): Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 9730–9734.
- MAINES, M. D. (1988): Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms and clinical applications. *FASEB J.* **2**: 2557–2568.
- MAINES, M. D. (1997): The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* : 517–554.
- MALECH, H. L., GALLIN, J. I. (1987): Neutrophils in human disease. *New Engl. J. Med.* **317**: 687–694.
- MARBER, M. S., MESTRIL, R., CHI, S.-H., SAYEN, R., YELLON, Y. M., DILLMAN, W. H. (1995): Overexpression of the rat-inducible 70-kDa heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest.* **95**: 1446–1456.
- MARINI, M., FABRETTI, 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.
- MCARDLE, A., VASILAKI, A., JACKSON, M. (2002): Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. *Ageing Res. Rev.* **1**: 79–93.
- MCCARTHY, D. A., DALE, M. M. (1988): The leucocytosis of exercise. *sports Med.* **6**: 333–363.
- MEHLEN, P., KRETZ-REMY, C., BRIOLAY, J., FOSTAN, P., MIRALT, M.-E., ARRIGO, A.-P. (1995): Intracellular reactive oxygen species as apparent modulators of heat-shock protein 27 (hsp27) structural organization and phosphorylation in basal and tumor necrosis factor α -treated T47D human carcinoma cells. *Biochem. J.* **312**: 367–375.
- MELILLO, G., MUSSO, T., SICA, A., TAYLOR, L. S., COX, G. W., VARESI, L. (1995): A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **182**: 1683–1693.
- MENA, P., MAYNAR, M., GUTIERREZ, J. M., MAYNAR, J., 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.

- MIZZEN, L. A., WELCH, W. J. (1988): Charakterization of the thermotolerant cell. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J. Cell Biol.* **106**: 1105–1116.
- MOSELEY, P. L. (1997): Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J. Appl. Physiol.* **83**(5): 1413–1417.
- NIEMAN, D. C. (2000): Exercise effects on systemic immunity. *Immunology and Cell Biology* **78**: 496–501.
- NIEMAN, D. C., BRENDLE, D., HENSON, D. A., SUTTLES, J., COOK, V. D., WARREN, B. J., BUTTERWORTH, D. E., FAGOAGA, O. R., NEHLSSEN-CANARELLA, S. L. (1995a): Immune function in athletes versus nonathletes. *Int. J. Sports Med.* **16**(5): 329–333.
- NIEMAN, D. C., BUCKLEY, K. S., HENSON, D. A., WARREN, B. J., SUTTLES, J., AHLE, J. C., SIMANDLE, S., FAGOAGA, O. R., NEHLSSEN-CANARELLA, S. L. (1995b): Immune function in marathon runners versus sedentary controls. *Med. Sci. Sports Exerc.* **27**(7): 986–992.
- NIEMAN, D. C., PEDERSEN, B. K. (1999): Exercise and immune function: recent development. *Sports Med.* **27**: 73–80.
- NIESS, A. M. (2001): Zur Bedeutung der körperlichen Belastung bei der Induktion von oxidativem Stress und assoziierten Mechanismen in immunkompetenten Zellen. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- NIESS, A. M., FEHRENBACH, E., SCHLOTZ, E., NORTHOFF, H., DICKHUTH, H. H. (2002): Basal expression of leukocyte iNOS-mRNA is attenuated in moderately endurance-trained subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* **87**: 93–95.
- NIESS, A. M., FEHRENBACH, E., VOGEL, M., WALDVOGEL, I., NORTHOFF, H., DICKHUTH, H. H. (2003): Endurance training primes human peripheral blood mononuclear cells for expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Appl. Physiol.* .
- NIESS, A. M., PASSEK, F., LORENZ, I., SCHNEIDER, E. M., DICKHUTH, H. H., NORTHOFF, H., FEHRENBACH, E. (1999): Expression of the antioxidant stress protein heme oxygenase-1 (HO-1) in human leucocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **26**(1–2): 184–192.
- NIESS, A. M., SOMMER, M., SCHLOTZ, E., NORTHOFF, H., DICKHUTH, H. H., FEHRENBACH, E. (2000): Expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human leukocytes: response to running exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**: 1220–1225.
- NORTHOFF, H., BERG, A. (1991): Immunologic mediators as parameters of reaction to strenuous exercise. *Int. J. Sports Med.* **12**: 9–15.

- NUSSLER, A. K., BILLIAR, T. R. (1993): Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.* **54**: 171–178.
- OKINAGA, S., TAKAHASHI, K., TAKEDA, K., YOSHIZAWA, M., FUJITA, H., SASAKI, H., SHIBAHARA, S. (1996): Regulation of human heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress. *Blood* **87**(12): 5074–5084.
- OLIVEIRA, D. M., SILVA-TEIXEIRA, D. N., ARAUJO-FILHO, R., GOES, A. M. (1999): Antigenic stimulation is more efficient than LPS in inducing nitric oxide production by human mononuclear cells on the in vitro granuloma reaction in schistosomiasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**: 1437–1445.
- ORTEGA, E., COLLAZOS, M. E., MAYNAR, M., BARRIGA, C., FUENTE, M. D. L. (1993): Stimulation of the phagocytic function of neutrophils in sedentary men after acute moderate exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **66**: 60–64.
- OSTROWSKI, K., HERMANN, C., BANGASH, A., SCHJERLING, P., NIELSEN, J. N., PEDERSEN, B. K. (1998): A trauma-like elevation in plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J. Physiol. (London)* **508**: 949–953.
- OSTROWSKI, K., RHODE, T., ASP, S., SCHJERLING, P., PEDERSEN, B. K. (1999): The cytokine balance and strenuous exercise: TNF-alpha, IL-2beta, IL-1ra, sTNF-r1, sTNF-r2, and IL-10. *J. Physiol. (Lond.)* **515**: 287–291.
- PASSEK, F. (2000): *Einfluß von Ausdauersport auf die Hämoxxygenase-Expression peripherer Leukozyten*. Dissertation, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- PEDERSEN, B. K. (1991): Influence of physical activity on the cellular immune system: a review and model. *Int. J. Sports Med.* **1**: 23–29.
- PEDERSEN, B. K., HOFFMAN-GOETZ, L. (2000): Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiol. Rev.* **80**: 1055–1081.
- PEDERSEN, B. K., KLOKKER, M., KAPPEL, M. (1997): Possible Role of Hyperthermia and Hypoxia in Exercised-Induced Immunomodulation. In: B. K. PEDERSEN (Hrsg.): *Exercise Immunology*, Landes Company, 61–73 R.
- PEDERSEN, B. K., OSTROWSKI, K., RHODE, T., BRUUNSGAARD, H. (1998): The cytokine response to strenuous exercise. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**: 505–511.
- POWERS, S. K., JI, L. L., LEEUWENBURGH, C. (1999): Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* **31**(7): 987–997.
- POWERS, S. K., LOCKE, A. M., DEMIREL, H. A. (2001): Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* **33**: 386–392.

- PYNE, D. B. (1994): Regulation of Neutrophil function during exercise. *Sports Med.* **17**(4): 245–258.
- 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**(4): 536–542.
- REILING, N., ULMER, A. J., DUCHROW, M., ERNST, M., FLAD, H.-D., HAUSCHILDT, S. (1994): Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1941–1944.
- RITOSSA, F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **13**: 571–573.
- ROEBUCK, K. A. (1999): Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: Differential activation and binding of transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Int. J. Mol. Med.* **4**: 223–230.
- ROSSI, A., SANTORO, M. G. (1995): Induction by prostaglandin A1 of haem oxygenase in myoblastic cells: an effect independent of expression of the 70 kDa heat shock protein. *Biochem. J.* **308**: 455–463.
- RYAN, A. J., GISOLFI, C. V., MOSELEY, P. L. (1991): Synthesis of 70K stress protein by human leukocytes: effect of exercise in the heat. *J. Appl. Physiol.* **70**: 466–471.
- SCHNEEMANN, M., SCHOEDON, C., HOFER, S., BLAU, N., GUERRERO, L., SCHAFFNER, A. (1993): Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J. Infect. Dis.* **167**: 1358–1363.
- SHASTRY, S., TOFT, D. O., JOYNER, M. J. (2002): HSP70 and HSP90 expression in leucocytes after exercise in moderately trained humans. *Acta Physiol. Scand.* **175**: 139–146.
- SHEFFLER, L. A., WINK, D. A., MELILLO, G., COX, G. W. (1995): Exogenous nitric oxide regulates IFN-gamma plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase rpression in mouse macrophages. *J. Immunol.* **155**: 886–894.
- SHEPHARD, R. J., SHEK, P. N. (1998): Acute and chronic over-exertion: do do depressed immune responses provide useful makers? *Int. J. Sports. Med.* **19**: 159–171.
- SHIBARA, S., MULLER, R. M., TAGUCHI, H. (1987): Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J. Biol. Chem.* **262**: 12889–12892.
- SHIBARA, 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.

- SIMIC, M. G. (1992): Urinary biomarker and the rate of DNA damage in carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Mut. Res.* **267**: 277–290.
- SJÖDIN, B., HELLSTEN-WESTING, Y., APPLE, F. S. (1990): Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* **10**: 236–254.
- SMITH, J. A., MCKENZIE, S. J., TELFORD, R. D., WEIDEMANN, M. J. (1992): Why does moderate exercise enhance, but intense exercise depress immunity? In: A. J. HUSBAND (Hrsg.): *Behaviour and Immunity*, CRC Press, Boca Raton.
- SMITH, J. A., TELFORD, R. D., MASON, I. B., WEIDEMANN, M. J. (1990): Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. *Int. J. Sports Med.* **11**(3): 179–187.
- SPRENGER, H., JACOBS, C., NAIN, M., GRESSNER, A. M., PRINZ, H., WESE-MANN, W., GEMSA, D. (1992): Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **63**: 188–195.
- S.SCHROEDER, BISCHOFF, J., LEHMANN, L. E., HERING, R., VON SPIEGEL, T., PUTENSEN, C., HOEFT, A., STÜBER, F. (1999): Endotoxin inhibits heat shock protein 70 (HSP70) expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* **25**: 52–57.
- STOCKER, R. (1990): Induction of heme oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radical Res. Commun.* **9**: 101–112.
- STRYER, L. (1996): Biosynthese der Aminosäuren und des Häms. In: D. G. STOLL, D. B. PFEIFFER, P. D. J. GUGLIELMI (Hrsg.): *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 773–775.
- SUMIDA, S., TANAKA, K., KITAO, H., NAKADOMO, F. (1989): Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *Int. J. Biochem.* **21**: 835–838.
- TAKAHASHI, T., SUZUKI, T., YAMASAKI, A., TSUKIJI, T., HIRAKAWA, M., AKAGI, R. (1999): Heat shock response in a rat model of septic multiple organ dysfunction syndrome. *Nippon-Yakurigaku-Zasshi* **114**: 295–302.
- THOMPSON, H. S., CLARKSON, P. M., SCORDILIS, S. P. (2002): The repeated bout effect and heat shock proteins: intramuscular HSP27 and HSP70 expression following two bouts of eccentric exercise in humans. *Acta Physiol. Scand.* **174**: 47–56.
- TIIDUS, P. M., HOUSTON, M. E. (1995): Vitamin E status and response to exercise training. *Sports Med.* **20**: 12–23.

- TVEDE, N., HEILMANN, C., KRISTENSEN, J. H., ET AL (1989): Mechanisms of B-lymphocyte suppression induced by acute physical exercise. *J. Clin. Lab. Immunol.* **30**: 169–173.
- TVEDE, N., KAPPEL, M., KRISTENSEN, J. H. (1993): The effect of light, moderate and severe exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin 2 production. *Int. J. Sports. Med.* **14**: 275–282.
- VANTITIS, L. J., GRAAFSMA, S. J. (1991): Stress influences CD4+ lymphocyte counts. *Immunol. Lett.* **30**: 141–142.
- VASILAKI, A., JACKSON, M. J., MCARDLE, A. (2002): Attenuated HSP70 response in skeletal muscle of aged rats following contractile activity. *Acta Physiol. Scan.* **25**: 902–905.
- VASSILAKOPOULOS, T., DECKMAN, G., KEBBEWAR, M., RALLIS, G., HARFOUCHE, R., HUSSAIN, S. N. (2003): Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **284**(3): L452–L457.
- VILE, G. F., BASU-MODAK, S., WALTNER, C., TYRRELL, R. M. (1994): Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2607–2610.
- VOGEL, M. (in Vorbereitung): ??? Dissertation, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- VOGT, B. A., ALAM, J., CROATT, A. J., VERCELLOTTI, G. M., NATH, K. A. (1995): Acquired resistance to acute oxidative stress-possible role of heme oxygenase and ferritin. *Lab. Invest.* **72**: 474–483.
- WALLERATH, T., GATH, I., AULITZKY, W. E., POLLOCK, J. S., KLEINERT, H., FÖRSTERMANN, U. (1997): Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb. Haemost.* **77**: 163–167.
- WEINBERG, J. B., MISUKONIS, M. A., SHAMI, P. J., MASON, S. N., SAULS, D. L., DITTMAN, W. A., WOOD, E. R., SMITH, G. K., McDONALD, B., BACHUS, K. E., HANLEY, 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.
- WELCH, W. J. (1992): Mammalian stress response: cellphysiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* **72**: 1063–1081.

- WELCH, W. J., FERAMISCO, J. R. (1985): Rapid purification of mammalian 70.000-dalton stress proteins:affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1229–1237.
- WILLIS, D., MOORE, A. R., FREDERICK, R., WILLOUGHBY, D. A. (1996): Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat. Med.* **2**: 87–90.
- WINNEFELD, K. (1996): Antioxidantien und Radikale: Analytik und klinische Bedeutung. *J. Lab. Med.* **20**: 199–204.
- WONG, H. R., RYAN, M., WISPE, J. R. (1997): The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I kappa-B degradation and NF-kappa B nuclear translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**(2): 257–263.
- WOODS, J. A., LU, Q., CEDDIA, M. A., LOWDER, T. (2000): Exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunol. Cell Biol.* **87**: 545–553.
- XIE, Q. W., WHISNANT, R., NATHAN, C. (1993): Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **177**: 1779–1784.
- YANG, A. L., CHEN, H. I. (2003): Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis* **169**(1): 11–17.
- YANG, A. L., TSAI, S. J., JIANG, M. J., JEN, C. J., CHEN, H. I. (2002): Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. *J. Biomed. Sci.* **9**(2): 149–155.
- ZHANG, X., LAUBACH, V. E., ALLEY, E. W., EDWARDS, K. A., SHERMAN, P. A., RUSSELL, S. W., MURPHY, W. J. (1996): Transcriptional basis for hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene to lipopolysaccharide/interferon- γ . *J. Leukoc. Biol.* **59**: 575–585.
- ZUO, L., CHRISTOFI, F. L., WRIGHT, V. P., LIU, C. Y., MEROLA, A. J., BERLINER, L. J., CLANTON, T. L. (2000): Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen species produced during heat stress in diaphragm muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**(4): 1058–1066.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Northoff und Frau Dr. E. Fehrenbach im Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin und unter der Leitung von Prof. Dr. A. Nieß in der Abteilung Sportmedizin der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt.

Bedanken möchte ich mich bei all denen, die diese Arbeit ermöglicht und begleitet haben.

Frau Dr. Fehrenbach danke ich für die gute und freundschaftliche Betreuung, für ihre ausdauernde Hilfsbereitschaft und ihren sofortigen Einsatz bei ungelösten Fragen.

Herrn Prof. Northoff danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die großzügigen Freiräume bei der Durchführung dieser Arbeit im Institut für Transfusionsmedizin.

Herrn Prof. Nieß danke ich für die Mitbetreuung dieser Arbeit sowie für den Kontaktaufbau zu den ausdauertrainierten Sportlern in der Abteilung Sportmedizin. Außerdem danke ich allen Probanden, die sich bereit erklärt haben, an dieser Studie teilzunehmen.

Bei allen, die im Labor der Transfusionsmedizin während des experimentellen Teils meiner Arbeit tätig waren, bedanke ich mich herzlich für das angenehme Arbeitsklima.

Monika Vogel danke ich für die effektive und humorvolle Zusammenarbeit.

Ganz besonders danke ich Albrecht für seine Motivation und Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit.

Schließlich danke ich meinen Eltern Winfried und Ulrike, die mir dieses Studium ermöglicht haben, für ihr Vertrauen, ihr Verständnis und ihre Unterstützung in jeder Hinsicht.

Lebenslauf

Ines Tanja Waldvogel
geboren am 02.10.1976
in Villingen-Schwenningen

Ausbildungszeit

1983–1996	Schulzeit, 1996 Abitur am Fürstenberg-Gymnasium in Donaueschingen
1996–1997	Freiwilliges Soziales Jahr am Universitätsklinikum Tübingen
04/1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
04/1999	Ärztliche Vorprüfung
04/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002–2003	Praktisches Jahr in der Universitäts-Hautklinik in Tübingen und im Klinikum am Steinenberg in Reutlingen
13.05.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

01/2004–10/2004	Ärztin im Praktikum im Kreiskrankenhaus Herrenberg in der Abteilung Innere Medizin
seit 10/2004	Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Herrenberg in der Abteilung Innere Medizin

Promotion

2002–2005	Medizinische Dissertation in der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit der Abteilung Sportmedizin über das Thema <i>Intraleukozytäre Stressantwort in ausdauertrainierten und untrainierten Probanden im Vergleich</i>
-----------	---