

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Präventive Pädiatrie der Fakultät für Sport und Gesundheitsförderung
(Leitung: Univ.-Prof. Dr. R. M. Oberhoffer)

Genexpression von Inflammationsmarkern in peripheren mononukleären Zellen vor und nach zehnwöchigem aerobem Ausdauertraining sowie nach Absolvieren eines Marathonlaufs bei Personen unterschiedlicher körperlicher Konstitution.

Ines Marie Adomeit

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. M. Oberhoffer
2. Univ.-Prof. Dr. M. Halle

Die Dissertation wurde am 12.03.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 21.11.2012 angenommen.

Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung.....	1
1.1. Allgemeine Einleitung	1
1.2. Literaturübersicht der untersuchten Biomarker	2
1.2.1. Die Belastungsleukozytose.....	2
1.2.2. Interleukin 6, Tumornekrosefaktor α und C-reaktives Protein – die klassischen Inflammationsmarker	3
1.2.3. Weitere Zytokine	10
1.2.4. Die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2.....	13
1.2.5. <i>Toll-like</i> Rezeptoren	15
1.2.6. Stickstoffmonoxid-Metabolismus	17
1.2.6.1. Die Geschichte von Stickstoffmonoxid und seine Wirkung im Organismus..	17
1.2.6.2. Biosynthese von Stickstoffmonoxid.....	18
1.2.6.3. Beteiligung an Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen	22
1.3. Zielsetzungen der Studie	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Material	26
2.1.1. Untersuchungsmaterial und Studiendesign	26
2.1.2. Geräte	28
2.1.3. Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.4. Kits	29
2.1.5. Chemikalien, Lösungen, Puffer.....	30
2.1.6. Primer	31
2.1.7. Software.....	32
2.1.8. Bioinformatische Datenbanken	32

2.2. Methoden	33
2.2.1. RNA-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.....	33
2.2.1.1. Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion.....	33
2.2.1.2. Durchführung der Phenol-Chloroform-Extraktion.....	34
2.2.2. Quantifizierung, Qualitätskontrolle und Verdünnung der isolierten RNA	34
2.2.3. Aufreinigung der RNA mit dem NucleoSpin® RNA II Kit.....	35
2.2.4. Semiquantitative <i>one-step real-time</i> PCR	36
2.2.4.1. Prinzip der semiquantitativen <i>one-step real-time</i> PCR	36
2.2.4.2. Durchführung der <i>real-time</i> PCR	37
2.2.5. Design und Auswahl der Primer	40
2.2.6. Testen der Primer	41
2.2.6.1. Gradienten-PCR	41
2.2.6.2. Agarosegelelektrophorese	42
2.2.6.2.1. Prinzip der Gelelektrophorese	42
2.2.6.2.2. Durchführung der Gelelektrophorese	42
2.2.7. Messung der Gesamtstickoxide im Serum	42
2.2.7.1. Prinzip des <i>Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay</i>	42
2.2.7.2. Ultrazentrifugation	43
2.2.7.3. Durchführung des <i>Assay</i>	43
2.2.8. Statistische Analyse.....	44
2.2.8.1. Daten aus dem <i>Colorimetric Assay</i>	44
2.2.8.2. Daten aus der <i>real-time</i> PCR.....	45
2.2.8.3. Statistische Auswertung	46
3. Ergebnisse	48
3.1. Gehalt an Gesamt-RNA	48
3.2. Genexpression	49
3.2.1. <i>Housekeeping</i> Gene	49
3.2.2. Klassische Inflammationsmarker	49
3.2.3. Genexpression weiterer proinflammatorischer Zytokine	59

3.2.4. Antiinflammatorische Zytokine	63
3.2.5. Chemokinrezeptoren	66
3.2.6. <i>Toll-like</i> Rezeptoren	69
3.2.7. NO-Synthasen	73
3.3. Serumkonzentration von Stickstoffmonoxid.....	78
4. Diskussion.....	80
4.1. Methodenkritik	80
4.2. Auswirkungen des zehnwöchigen aeroben Ausdauertrainings auf Serumkonzentration und Genexpression verschiedener Inflammationsmarker	81
4.2.1. Proinflammatorische Prozesse	82
4.2.2. Antiinflammatorische Prozesse.....	87
4.2.3. Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel	88
4.3. Auswirkungen des Marathonlaufs auf Serumkonzentration und Genexpression verschiedener Inflammationsmarker	89
4.3.1. Proinflammatorische Prozesse	89
4.3.2. Antiinflammatorische Prozesse.....	96
4.3.3. Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel	97
4.4. Fazit und Ausblick.....	99
5. Zusammenfassung	101
6. Literaturverzeichnis	103
7. Anhang.....	140
7.1. Auflistung aller Messwerte	140
7.2. Publikationen im Rahmen der vorgelegten Promotionsarbeit.....	140
8. Danksagung	143

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** IL-6 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a)** alle Studienteilnehmer, sowie **b)** für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 51
- Abbildung 2:** TNF- α mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a)** alle Studienteilnehmer, sowie **b)** für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 54
- Abbildung 3:** CRP mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a)** alle Studienteilnehmer, sowie **b)** für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 57
- Abbildung 4:** IL-1B mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a)** alle Studienteilnehmer, sowie **b)** für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 60

- Abbildung 5:** IL-2 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a**) alle Studienteilnehmer, sowie **b**) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 62
- Abbildung 6:** IL-10 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a**) alle Studienteilnehmer, sowie **b**) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 65
- Abbildung 7:** CXCR1 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a**) alle Studienteilnehmer, sowie **b**) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 67
- Abbildung 8:** CXCR2 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a**) alle Studienteilnehmer, sowie **b**) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 68

- Abbildung 9:** TLR 2 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a)** alle Studienteilnehmer, sowie **b)** für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 70
- Abbildung 10:** TLR 4 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a)** alle Studienteilnehmer, sowie **b)** für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 72
- Abbildung 11:** eNOS mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a)** alle Studienteilnehmer, sowie **b)** für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 74
- Abbildung 12:** iNOS mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a)** alle Studienteilnehmer, sowie **b)** für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 77

Abbildung 13: NO-Plasmakonzentration vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für **a)** alle Studienteilnehmer, sowie **b)** für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Expressionsorte der drei Isoformen der NO-Synthase	20
Tabelle 2:	Stimulatoren der drei NOS Isoformen	21
Tabelle 3:	Inhibitoren der drei NOS Isoformen	22
Tabelle 4:	Ein- und Ausschlusskriterien der Studie	27
Tabelle 5:	Verwendete Geräte	28
Tabelle 6:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 7:	Verwendete Kits	29
Tabelle 8:	Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer	30
Tabelle 9:	Designte und verwendete Primer	31
Tabelle 10:	Zusammensetzung des Mastermixes eines RT-PCR-Laufs	38
Tabelle 11:	Temperaturprofil der PCR-Läufe	38
Tabelle 12:	Annealingtemperaturen und Temperaturen der Messzeitpunkte der einzelnen Primer	39
Tabelle 13:	Temperaturprofil der Gradienten-PCRs	41
Tabelle 14:	Zusammensetzung des Mastermixes der Gradienten-PCR	41
Tabelle 15:	Pipettieranleitung des Cayman <i>Colorimetric Assay</i>	44
Tabelle 16:	mRNA-Konzentration in PBMC in Abhängigkeit von Gruppe und Messzeitpunkt	48
Tabelle 17:	MW \pm SD der Serumkonzentrationswerte von IL-6. Signifikanzen bei $p < 0,05$: ^a Visite 1 vs. Visite 2. ^b Visite 1 vs. Visite 3. ^c Visite 1 vs. Visite 4. ^d Visite 2 vs. Visite 3. ^e Visite 2 vs. Visite 4. ^f Visite 3 vs. Visite 4. * Gruppe A vs. Gruppe L.	52
Tabelle 18:	MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von TNF- α .	53
Tabelle 19:	MW \pm SD der Serumkonzentrationswerte von TNF- α . Signifikanzen bei $p < 0,05$: ^a Visite 1 vs. Visite 4. ^b Visite 2 vs. Visite 4. ^c Visite 3 vs. Visite 4.	55
Tabelle 20:	Anzahl der Proben mit CRP-Werten unterhalb der Nachweisgrenze. In Klammern ihr prozentualer Anteil an der jeweiligen Fallzahl.	56
Tabelle 21:	MW \pm SD der Serumkonzentrationswerte von CRP. Signifikanzen bei $p < 0,05$: ^a Visite 1 vs. Visite 4. ^b Visite 2 vs. Visite 4. ^c Visite 3 vs. Visite 4. * Gruppe A vs. Gruppe L. ^o Gruppe F vs. Gruppe L.	58

Tabelle 22:	Anzahl der Proben mit IL-2-Werten unterhalb der Nachweisgrenze. In Klammern ihr prozentualer Anteil an der jeweiligen Fallzahl.	61
Tabelle 23:	MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von IL-10.	64
Tabelle 24:	Anzahl der Proben mit IL-10-Werten unterhalb der Nachweisgrenze. In Klammern ihr prozentualer Anteil an der jeweiligen Fallzahl.	64
Tabelle 25:	MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von TLR 2.	69
Tabelle 26:	MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von TLR 4.	71
Tabelle 27:	MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von eNOS.	73
Tabelle 28:	MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von iNOS.	76
Tabelle 29:	Anzahl der Proben mit iNOS-Werten unterhalb der Nachweisgrenze. In Klammern ihr prozentualer Anteil an der jeweiligen Fallzahl.	76
Tabelle 30:	MW \pm SD der Serumkonzentration von NOx.	78

Abkürzungsverzeichnis

A	Gruppe der (prä)adipösen Freizeitsportler
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl.: <i>antigen-presenting cell</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BU	Bauchumfang
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (engl.: <i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
cNOS	konstitutive NOS (engl.: <i>constitutive NOS</i>)
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>threshold cycle</i>
DDAH	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>
eNOS	endotheliale NOS
EtBr	Ethidiumbromid
F	Gruppe der normalgewichtigen Freizeitsportler
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GRO α	<i>Growth regulated oncogene α</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HKG	<i>housekeeping Gen</i>
hsCRP	<i>high-sensitivity CRP</i>
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G

IL-1	Interleukin 1
IL-1A	Interleukin 1 α
IL-1B	Interleukin 1 β
IL-1R	Interleukin 1-Rezeptor
IL-1RA	Interleukin 1-Rezeptor-Antagonist
IL-2	Interleukin 2
IL-2R	Interleukin 2-Rezeptor
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-8RA	Interleukin 8-Rezeptor α
IL-8RB	Interleukin 8-Rezeptor β
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-13	Interleukin 13
iNOS	induzierbare NOS
L	Gruppe der Leistungssportler
LDL	<i>low-density</i> Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LSG	Lehrstuhl für Sport und Gesundheitsförderung
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MDF	<i>Macrophage deactivating Factor</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MW	Mittelwert
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger</i> RNA)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NF κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nNOS	neuronale NOS
NO	Stickstoffmonoxid
NO _x	Gesamtstickoxide
NOS	NO-Synthase
PBMC	periphere mononukleäre Zellen (engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)

PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PRS	Institut für Präventive und Rehabilitative Sportmedizin
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>real-time PCR</i>
SD	Standardabweichung (engl.: <i>standard deviation</i>)
SELE	Selectin E
SERCA	<i>sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATP-ase</i>
sGC	lösliche Guanylatzyklase (engl.: <i>soluble guanylyle cyclase</i>)
sTNF-R	löslicher TNF-Rezeptor (engl.: <i>soluble TNF receptor</i>)
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TLR 2	<i>Toll-like</i> Rezeptor 2
TLR 3	<i>Toll-like</i> Rezeptor 3
TLR 4	<i>Toll-like</i> Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einleitung

Es ist weithin bekannt, dass körperliche Aktivität gesundheitsfördernde Effekte bewirkt, weshalb Sport, vor allem in Form von aerobem Ausdauertraining, sowohl aus medizinischer als auch aus psychologischer und sozialökonomischer Sicht zu empfehlen ist. So können neben einer Steigerung des allgemeinen Wohlbefindens auch eine Gewichtsreduktion und eine Verbesserung der kardiopulmonalen Fitness erzielt werden. Die stimmungsaufhellende bzw. -stabilisierende Wirkung von körperlicher Betätigung, vor allem im Freien, macht man sich in der Behandlung von Krankheitsbildern wie der Depression zu Nutze.

Regelmäßiges Training reduziert die Gesamtmortalität, was hauptsächlich auf einen Schutz vor Atherosklerose und Typ II Diabetes mellitus zurückzuführen ist (Blair et al., 1989; Engström, Hedblad, Janzen, 1999; Church et al., 2004; Kokkinos et al., 2009). Dieser Schutz wird, wie man heute weiß, hauptsächlich durch die positive Auswirkung von Ausdauertraining auf die komplexen Vorgänge des Immunsystems in Form einer Reduktion geringgradiger chronischer systemischer Entzündungsvorgänge gewährleistet (Geffken et al., 2001; Abramson, Vaccarino, 2002; Halle et al., 2004). In den letzten Jahren wurden diese als Hauptgrund und somit maßgeblicher Risikofaktor für das Auftreten degenerativer Gefäßveränderungen sowie von Insulinresistenz diskutiert und könnten in Zukunft einen wichtigen Angriffspunkt für präventive und therapeutische Maßnahmen gegen Atherosklerose bzw. Diabetes mellitus darstellen (Pradhan et al., 2001; Festa et al., 2002; Alexandraki et al., 2008; Tsiotra et al., 2008).

Dass auch das Auftreten von Akutereignissen wie Myokardinfarkt oder Apoplex mit Inflammationsgeschehen vergesellschaftet ist, konnten Smeeth et al. 2004 zeigen. In den ersten Tagen nach einem Atem- oder Harnwegsinfekt war das Risiko ein solches akutes Ereignis zu erleiden signifikant erhöht (Smeeth et al., 2004).

Da die Mediatoren dieser Inflammationsreaktion nicht nur von zirkulierenden Zellen des Immunsystems sezerniert werden, sondern, wie Studien gezeigt haben, auch von Adipozyten und von ins Fettgewebe eingewanderten Makrophagen, liegt die besondere Bedeutung für adipöse Patienten auf der Hand (Hotamisligil, Shargill, Spiegelman, 1993; Rotter, Nagaev, Smith, 2003; Weisberg et al., 2003; Fain et al., 2004). Hier gilt es zu zeigen, inwiefern sportliche Betätigung solche Inflammationsgeschehen beeinflussen kann

und somit insbesondere für übergewichtige Risikopatienten als nichtmedikamentöser präventiver und therapeutischer Angriffspunkt dienen kann.

Kontrovers diskutiert wird jedoch noch, in welchem Maße körperliche Aktivität als gesundheitsfördernd einzustufen ist. Nieman und seine Arbeitsgruppen beschrieben in den frühen neunziger Jahren eine durch intensive Belastung induzierte Immunsuppression, die in einer höheren Suszeptibilität für Infekte der oberen Atemwege resultierte, wohingegen moderates Training einen immunsupportiven Effekt hatte (Nieman et al., 1990a; Nieman et al., 1990b; Nieman et al., 1993). Andere Studien haben gezeigt, dass intensive körperliche Belastungen mit entscheidenden Alterationen des Immunsystems in Form von Entzündungsgeschehen einhergehen, die einer Akute-Phase-Reaktion bei einer Sepsis entsprechen oder zumindest mit einer solchen näherungsweise vergleichbar sind (Bosenberg et al., 1988; Ostrowski et al., 1998; Camus et al., 1998).

Das Bewältigen der Marathondistanz stellt als Königsdisziplin des Langstreckenlaufsportes eine der größtmöglichen Belastungen dar, bei der es neben den Risiken für Verletzungen und Überlastungen des Bewegungsapparates und einer starken Belastung des kardiovaskulären Systems auch die Auswirkungen auf das Inflammationsgeschehen zu untersuchen gilt.

Da sich sowohl das Ausdauerlaufen ohne Wettkampfziel als auch der Marathonlauf immer größerer Beliebtheit erfreuen und inzwischen als Volkssport gelten, sind nicht mehr nur gesunde, trainierte Personen auf den Straßen und in den Wäldern und Parks unterwegs, sondern auch solche mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil.

Herauszufinden, wie sich zehnwöchiges aerobes Ausdauertraining und ein Marathonlauf auf Inflammationsprozesse auswirken und inwiefern Körpermasse und Leistungsfähigkeit diese Veränderungen beeinflussen, ist Ziel dieser Arbeit.

1.2. Literaturübersicht der untersuchten Biomarker

1.2.1. Die Belastungsleukozytose

Typischerweise führt körperliche Aktivität zu einer biphasischen Leukozytose. Bereits kurz nach Beginn der Belastung kommt es zu einer ersten, katecholamininduzierten Leukozytose durch Rekrutierung nicht zirkulierender Leukozyten aus dem „marginalen Pool“ (Gabriel, Urhausen, Kindermann, 1992; Nieman et al., 1992; Gabriel et al., 2003). Sie betrifft alle Leukozytensubpopulationen, wobei jedoch bei den Natürlichen

Killer-Zellen (NK-Zellen), Monozyten und Lymphozyten, unter ihnen vor allem zytotoxische T-Zellen und T-Suppressorzellen, wegen ihrer im Vergleich zu Granulozyten höheren Katecholaminsensitivität ein prozentual höherer Anstieg bei steigender Belastungsintensität festzustellen ist (Nieman et al., 1991; Nieman et al., 1992; Gabriel et al., 1992; Gabriel, Urhausen, Kindermann, 1992; Gray et al., 1993; Gabriel et al., 2003; Dimitrov, Lange, Born, 2009). Diese sofortige Leukozytose stoppt in den ersten Minuten der Nachbelastungsphase und normalisierte Werte finden sich bereits nach einer halben Stunde (Nieman et al., 1992; Fry et al., 1992; Gabriel et al., 2003). Vor allem nach intensivem Training kommt es in der Nachbelastungsphase häufig zu einem Abfall der Leukozytenzahlen bis unter das Ausgangsniveau, was vor allem einer erniedrigten Anzahl natürlicher Killerzellen und zytotoxischer T-Zellen zuzuschreiben ist und in einem Zeitraum supprimierter Immunfunktion, dem sog. „*open window*“ resultiert. Dieses dauert bis zu 72 Stunden an und kann zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infekte führen (Pedersen et al., 1988; Nieman et al., 1992; Tvede et al., 1993; Gray et al., 1993; Gleeson, Bishop, 2005). In den ersten Nachbelastungsminuten kommt es zu einem zweiten, kortisolvermittelten Leukozytenanstieg, der nun hauptsächlich durch eine Neutrophilie gekennzeichnet ist und bis zu 24 Stunden anhält (Gabriel, Urhausen, Kindermann, 1992; Haq et al., 1993; Scharhag et al., 2002; Gabriel et al., 2003). Hatte die Belastungsdauer zwei Stunden überschritten, verstreichen die Grenzen der sofortigen und verzögerten Belastungsleukozytose und ein typischer biphasischer Verlauf ist nicht mehr zu erkennen. Dies ist dadurch zu erklären, dass schon während der Belastung die verzögerte Wirkung des Kortisols zum Tragen kommt und bereits bei Beendigung der Aktivität eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten vorliegt (Scharhag et al., 2002).

1.2.2. Interleukin 6, Tumornekrosefaktor α und C-reaktives Protein – die klassischen Inflammationsmarker

Interleukin 6

Interleukin 6 (IL-6) gilt als einer der bedeutendsten Mediatoren der Inflammationsreaktion, da es auf der einen Seite ein Bindeglied in den Regelkreisen von angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellt, auf der anderen Seite als Brücke zwischen Zellen des Immunsystems und den Effektororganen fungiert. Seine Transkription findet – konstitutiv oder nach Stimulation durch Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 1 (IL-1), oder

Interferon (IFN) (Kohase et al., 1986; Kohase et al., 1987) – in diversen Zelltypen statt. Zu ihnen zählen periphere mononukleäre Zellen (engl.: *peripheral blood mononuclear cells*; PBMC) (Hirano et al., 1986; Vaquero et al., 1986; Tosato et al., 1988), Fibroblasten (Weissenbach et al., 1980), Endothelzellen (May et al., 1989), Osteoblasten (Littlewood et al., 1991), Neuronen und Gliazellen (Yan et al., 1992; Benveniste et al., 1990), sowie neoplastische Zellen (Wong, Goeddel, 1986). Seine Multifunktionalität zeigt sich unter anderem in einer Steigerung der Lipolyse im Fettgewebe (Lyngsø, Simonsen, Bülow, 2002), in der Induktion der Knochenresorption (Kotake et al., 1996), und durch Effekte auf das hämatopoetische System (Ikebuchi et al., 1987), das zentrale Nervensystem (Tancredi et al., 2000; Vallières et al., 2002; Braida et al., 2004) sowie das Immunsystem. In Letzterem fungiert es durch unterschiedliche pro- und antiinflammatorische Effekte als wichtiger Immunmodulator und -regulator. So führt es zur Reifung von B-Zellen (Okada et al., 1983; Beutler, Falkoff, Fauci, 1984; Muraguchi et al., 1988), Differenzierung von T-Lymphozyten (Garman et al., 1987; Okada et al., 1988; Kawakami et al., 1989) und in der Leber zur Induktion der Expression von Akute-Phase-Proteinen wie dem C-reaktiven Protein (CRP) als Hauptvertreter (Gauldie et al., 1987; Andus et al., 1988; Castell et al., 1988). Es stimuliert jedoch auch die Synthese des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin 10 (IL-10) (Steensberg et al., 2003) und hemmt im Sinne einer negativen Rückkopplung die Produktion von TNF- α (Schindler et al., 1990).

Im Rahmen der Inflammationshypothese zur Ätiologie der Atherosklerose spielt IL-6 eine ambivalente Rolle. Einerseits scheint seine Plasmakonzentration ein potenter Risikofaktor und Indikator für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse zu sein (Cesari, 2003; Haddy et al., 2003). Es wird lokal in atherosklerotischen Plaques von Schaumzellen und glatten Muskelzellen der Gefäßwand produziert und führt zum Fortschreiten und zur Destabilisierung von Plaques (Schrader et al., 1991; Seino et al., 1994; Schieffer et al., 2000; Wang, Castresana, Newmann, 2001; Yamagami et al., 2004; Chen et al., 2009). Andererseits kommt es bei hypercholesterinämischen IL-6 *knockout* Mäusen zu einer Progression atherosklerotischer Plaques, was durch den Wegfall antiinflammatorischer Effekte von IL-6, wie der Stimulierung der IL-10-Sekretion, zu erklären ist (Schieffer et al., 2004). Die gesteigerte Bedeutung für adipöse Patientengruppen wird deutlich, wenn man die Tatsache betrachtet, dass IL-6 in relevanten Mengen auch von Adipozyten sezerniert wird. Mohamed-Ali et al. konnten zeigen, dass etwa ein Anteil von 30% des zirkulierenden IL-6 aus dem Fettgewebe stammt (Mohamed-Ali et al., 1997). Hierbei sind

vor allem Patienten mit zentraler Fettverteilung betroffen (Fried, Bunkin, Greenberg, 1998; Perry et al., 2008).

Wie mehrere Studien belegen konnten, kommt es während und auch noch kurze Zeit nach körperlicher Belastung zu einem bis zu 100-fachen Anstieg von zirkulierendem IL-6, bei Extrembelastungen wie einem Ultramarathonlauf bis auf das 8000-fache, was hauptsächlich durch eine Freisetzung aus Myozyten der Skelettmuskulatur zu erklären ist (Ostrowski et al., 1998; Steensberg et al., 2000; Keller et al., 2001; Margeli et al., 2005). Diese fungieren hierbei als endokrines Organ, welches Zytokine, die auch als Myokine bezeichnet werden, sezerniert. Durch die Induktion von Lipolyse und Gluconeogenese spielt IL-6 eine wichtige Rolle in der Adaptation des Metabolismus an den gesteigerten Energieumsatz (van Hall et al., 2003; Banzet et al., 2009). Da weniger die Art der Belastung, als ihre Dauer und Intensität von Bedeutung zu sein scheint, geht man inzwischen davon aus, dass eine Sekretion von IL-6 zum Zwecke der Reparatur von zugrunde gegangenen Myozyten nur eine untergeordnete Rolle spielt und nicht maßgeblich zu den enorm erhöhten Plasmaspiegeln beiträgt (Phillips et al., 1996; Nieman et al., 1998; Ostrowski, Schjerling, Pedersen, 2000). Kontrovers diskutiert wird jedoch der Effekt von Ausdauertraining auf den IL-6-Spiegel und somit die langfristige Beeinflussung von geringgradiger systemischer Inflammation. Mehrere Studien konnten eine Reduktion der basalen Serumkonzentrationen von IL-6 durch Ausdauertraining im Sinne einer Adaptation feststellen (Cesari et al., 2004; Panagiotakos et al., 2005; Arai, Duarte, Natale, 2006). In anderen Studien wiederum konnten keine Veränderungen der IL-6-Spiegel durch das Training festgestellt werden (Larsen et al., 2001; Bruunsgaard et al., 2004; Niessner et al., 2006). Insgesamt scheint der schmale Grad zwischen dem Überwiegen der pro- oder antiinflammatorischen bzw. der gesundheitsfördernden oder -schädlichen Effekte von IL-6 stark von seiner Konzentration abhängig und nur in Zusammenschau mit den anderen beteiligten Zytokinen zu beurteilen zu sein.

Tumornekrosefaktor α

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das in erster Linie von PBMC und Makrophagen sezerniert wird. Es bewirkt, wie auch IL-6, sowohl lokale als auch systemische Effekte (Mathews, 1978; Männel, Moore, Mergenhagen, 1980; Degliantoni et al., 1985; Pawelec et al., 1989). Seinen Namen verdankt es der Eigenschaft zytotoxisch auf malignes Zellwachstum zu wirken. Es ist bei der Immunantwort auf Infektionen das erste

ansteigende Zytokin, wobei seine Freisetzung z. B. durch Lipopolysaccharide (LPS) aus Bakterienwänden stimuliert wird, und leitet unter anderem die Akute-Phase-Reaktion ein (Carswell et al., 1975; Baumann et al., 1987; Mabika, Laburn, 1999). Neben der Stimulierung der CRP-Synthese in PBMC (Haider et al., 2006) führt es zu einer Aktivierung von Neutrophilen (Shalaby et al., 1985; Klebanoff, 1986) und Thrombozyten (Bevilacqua et al., 1986; Bussolino, Camussi, Baglioni, 1988), einer Aktivitätssteigerung von Makrophagen und NK-Zellen (Urban et al., 1986; Ostensen, Thiele, Lipsky, 1987), sowie der Sekretion weiterer Zytokine, unter ihnen auch IL-6 (Plomgaard et al., 2005). Letzteres wiederum hemmt die LPS-abhängige TNF-Synthese in PBMC im Sinne einer negativen Rückkopplung (Schindler, 1990). Als weitere natürliche Inhibitoren wirken der lösliche TNF-Rezeptor (engl.: *soluble TNF receptor*; sTNF-R) (Gatanaga et al., 1990; Loetscher et al., 1991) sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 (Chernoff et al., 1995). Neben der Antwort auf Infektionen mit Bakterien, Viren und Parasiten, die bis zur Sepsis reichen kann, ist TNF- α an vielen weiteren physiologischen und pathologischen Immunreaktionen beteiligt. So spielt es eine Schlüsselrolle im Pathomechanismus von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Spondylarthritis, Psoriasis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Tracey et al., 1987; Hopkins, Meager, 1988; Braun et al., 1995; Ettehad et al., 1994; Mackay et al., 1998).

Eine entscheidende Rolle wird ihm auch in der Entstehung von Insulinresistenz, Hypertonus und endothelialer Dysfunktion zugesprochen. Diese pathologischen Zustände führen im Verlauf zu Diabetes mellitus und Atherosklerose (Uysal et al., 1997; Lee, Kim, Moon, 2009; Bhagat, Vallance, 1997). Laut Cesari et al. ist TNF- α hinter IL-6 als zweitstärkster prädiktiver Marker für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse einzustufen, noch vor CRP (Cesari et al., 2003). Mehrere Studien konnten zeigen, dass als Quelle von erhöhtem TNF- α vor allem das Fettgewebe anzusehen ist und Übergewicht im Sinne vermehrten Fettgewebes zu erhöhten TNF- α -Spiegeln führen kann (Hotamisligil et al., 1995; Hotamisligil, Shargill, Spiegelmann, 1993; Kern et al., 1995). Dass es dennoch nicht immer zu erhöhten systemischen Werten kommt, erklärt sich dadurch, dass dort lokal TNF- α sezerniert wird, welches als Folge erhöhte Plasmakonzentrationen an CRP und IL-6 nach sich zieht, es selbst jedoch eine relativ geringe Halbwertszeit besitzt (Beutler, Milsark, Cerami, 1985).

Auch die Skelettmuskulatur konnte als Syntheseort von TNF- α beschrieben werden (Saghizadeh et al., 1996). Während nach akuter körperlicher Belastung IL-6 und

konsekutiv auch der Interleukin 1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA), IL-10 und sTNF-R ansteigen, bleibt jedoch der TNF- α -Spiegel relativ unbeeinflusst und nimmt höchstens leicht zu (Ostrowski et al., 1999; Starkie et al., 2001). Hier scheint ein wichtiger Unterschied der Inflammationsreaktion nach Belastung und der nach Trauma oder Infektion vorzuliegen, da bei Letzteren TNF- α die Schlüsselrolle zur Einleitung der Inflammationsantwort spielt. Interessanterweise sinkt die Plasmakonzentration von TNF- α sowohl bei chronisch Herzinsuffizienten (Larsen et al., 2001) als auch bei jungen gesunden Männern (Sloan et al., 2007) durch dreimonatiges Ausdauertraining. Gesteigerte körperliche Aktivität in der Freizeit steht in direktem Zusammenhang mit niedrigeren TNF- α -Werten, sowohl bei Gesunden, als auch bei Personen mit metabolischem Syndrom (Panagiotakos et al., 1995; Pitsavos et al., 2004; Colbert et al., 2004). Die Expression von TNF- α im Skelettmuskel, die bei Älteren im Vergleich zu Jüngeren gesteigert ist, konnte bei den Älteren durch regelmäßiges Krafttraining reduziert werden (Greiwe et al., 2001). Ähnliches konnten Gielen et al. bei Patienten mit Herzinsuffizienz zeigen, die ein sechsmonatiges Ausdauertraining absolvierten (Gielen et al., 2003). Auch bei Ratten kam es durch Ausdauertraining zu einer Reduktion der Expression von TNF- α im Skelettmuskel (Lira et al., 2009b). Als Ursache hierfür wird sowohl der inhibitorische Effekt von IL-6 diskutiert, als auch eine IL-6-unabhängige Suppression, bei der angenommen wird, dass Epinephrin eine Rolle spielt (Keller et al., 2004; Galbo, Holst, Christensen, 1975; van der Poll et al., 1996).

C-reaktives Protein

Das C-reaktive Protein ist heute der in der Klinik relevanteste und am häufigsten bestimmte Marker für unspezifische Inflammationsgeschehen. Er wird herangezogen, um Entzündungsvorgänge, wie sie durch Infektionen oder Traumata hervorgerufen werden, nachzuweisen und deren Verlauf zu kontrollieren. Das CRP wurde zum ersten Mal 1930 von Tillett und Francis beschrieben. Ihre Arbeit zeigte, dass im Serum von Patienten mit Lobärpneumonie, aber auch einigen anderen Infektionskrankheiten, während der Akutphase der Krankheit bei Zugabe des Zellwandbestandteiles C-Polysaccharid von *Pneumococcus* ein Präzipitat entsteht. Dieses Phänomen zu erklären war Ziel zahlreicher Folgestudien und so wusste man bald, dass die Ursache eine Reaktion des C-Polysaccharids mit einem endogenen Akute-Phase-Protein, dem C-reaktiven Protein, war (Tillett, Francis, 1930; Abernethy, Avery, 1941; MacLeod, Avery, 1941). In seiner

Funktion als Oponin bindet CRP an Polysaccharide von Bakterien und aktiviert zum einen das Komplementsystem, zum anderen leitet es über eine Bindung an den Fc γ -Rezeptor von Immunglobulin G (IgG) die zellvermittelte Komponente der Immunreaktion ein. (Siegel, Rent, Gewurz, 1974; Hundt, Zielinska-Skowronek, Schmidt, 2001; Mold, Gresham, DuClos, 2001; Mold, Baca, DuClos, 2002; Mold et al., 2002). In PBMC wird nach CRP-Kontakt die Expression der Zytokine IL-6, TNF- α und Interleukin 1 β (IL-1B) gesteigert (Ballou, Lozanski, 1992). Als Stimulus für die vornehmlich in der Leber stattfindende Synthese von CRP dient das proinflammatorische Zytokin IL-6, wobei seine Wirkung synergistisch durch IL-1B verstärkt wird (Kushner et al., 1995). Wie Haider et al. zeigen konnten, wird CRP auch konstitutiv in PBMC exprimiert. Dort wird seine Expression durch Stimulation mit dem Bakterienwandbestandteil LPS, sowie den Zytokinen Interleukin 1 α (IL-1A), TNF- α und IL-6 gesteigert, während IL-10 zu einem inversen Effekt führt und die CRP-Expression drosselt (Haider et al., 2006). Als weitere Syntheseorte gelten Neurone und atherosklerotische Plaques, aber einen entscheidenden Beitrag zum schnellen, bis zu 1000-fachen Anstieg der Plasmakonzentration bei Infektionen leistet die extrahepatische CRP-Synthese wohl nicht (Yasojima et al., 2000; Jabs et al., 2003; Calabró, Willerson, Yeh, 2003).

Während lange Zeit das Augenmerk auf den raschen, hohen Anstieg von CRP als Zeichen eines akuten Entzündungsgeschehens gerichtet war, ist in den letzten Jahren das Phänomen von chronisch leicht erhöhten CRP-Plasmawerten näher in den Fokus gerückt. Diese sind als Ausdruck eines geringgradigen chronischen systemischen Inflammationsgeschehens mit einem erhöhten Risiko für diverse Erkrankungen, so z. B. kardiovaskuläre Ereignisse, assoziiert. Da es sich im Gegensatz zur Akute-Phase-Reaktion, bei der die CRP-Konzentration auf mehrere Hundert mg/L ansteigen kann, hierbei um Konzentrationen im Bereich von wenigen mg/L handelt, werden zu seiner Erfassung sensible Methoden eingesetzt, die es ermöglichen, dieses *high-sensitivity* CRP (hsCRP) zu erfassen (Roberts et al., 2001; Ockene et al., 2001).

Es wird angenommen, dass CRP sowohl direkt als auch indirekt an der Pathophysiologie der Atherosklerose beteiligt ist, sprich sowohl zu ihrer Entstehung beitragen, als auch als Folgeerscheinung dieser auftreten soll. Das im Gegensatz zur gesunden Intima in atherosklerotischen Läsionen vermehrt vorkommende CRP übt dort proatherogene Effekte aus (Yasojima et al., 2001). Es induziert die Synthese von Adhäsionsmolekülen und fördert somit die Einwanderung von Blutmonozyten in die Gefäßwand (Pasceri, Willerson, Yeh, 2000), fördert die Aufnahme von *low-density* Lipoproteinen (LDL) durch Makrophagen

(Zwaka, Hombach, Torzewski, 2001), aktiviert das Komplementsystem (Torzewski et al., 1998) und drosselt die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) (Verma et al., 2002). Zusätzlich werden in den Plaques proinflammatorische Zytokine wie IL-6 ausgeschüttet, die für eine systemische inflammatorische Beteiligung sorgen, indem sie u. a. die Synthese von CRP stimulieren (Seino et al., 1994; Gaudie et al., 1987). Im Rahmen dieses Forschungsgebietes konnten zahlreiche Studien belegen, dass hsCRP ohne Berücksichtigung seines Wirkmechanismus und nach Korrektur für diverse Confounder einen starken unabhängigen Prädiktionswert für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse hat (Curb et al., 2003; Pai et al., 2004; Boekholdt et al., 2006). Ob es deshalb künftig standardmäßig im Rahmen von Screeningverfahren eingesetzt werden soll, wird im Moment dennoch kontrovers diskutiert. Es konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden, ob CRP direkt für die Entstehung von Atherosklerose ursächlich ist, oder ob es lediglich Indikator der bestehenden Krankheit ist. Des Weiteren besteht kein klarer Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von CRP im Blut und im Gewebe. Während man von einem geringen, mittleren oder hohen kardiovaskulären Risiko bei Patienten mit Plasma-CRP-Konzentrationen von <1 mg/L, $1-3$ mg/L bzw. >3 mg/L spricht, können in atherosklerotischen Plaques Konzentrationen bis zu 900 mg/L gemessen werden (Pearson et al., 2003).

Im Gegensatz zu Normalgewichtigen haben Übergewichtige und Adipöse signifikant höhere Plasma-CRP-Spiegel, was auf eine gesteigerte Zytokinproduktion in Adipozyten zurückzuführen ist und ihr erhöhtes kardiovaskuläres Risikoprofil erklärt (Visser et al., 1999). In diesem Rahmen konnten mehrere Studien zeigen, dass Ausdauertraining zwar zu einer Reduktion der CRP-Spiegel führen kann, jedoch hauptsächlich dann, wenn es mit einer signifikanten Gewichtsreduktion einhergeht (Dekker et al., 2007; Campbell et al., 2008; Wong et al., 2008; Church et al., 2009; Esposito et al., 2003a). Körperliche Aktivität per se stellt somit wohl keinen relevanten unabhängigen Faktor zur Senkung der CRP-Plasmakonzentration dar. Dennoch scheinen physisch Aktive niedrigere systemische CRP-Spiegel zu haben, als Inaktive (Timmerman et al., 2008).

1.2.3. Weitere Zytokine

Interleukin 1 β

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β gehört zusammen mit IL-1 α und dem IL-1RA zur IL-1-Genfamilie, wobei die ersten beiden als Agonisten, letzterer als Antagonist am Interleukin 1-Rezeptor (IL-1R) fungieren. Während IL-1 α hauptsächlich an lokalen Inflammationsgeschehen beteiligt ist, kann IL-1 β auch in größeren Mengen systemisch gefunden werden (Endres et al., 1989). Es wird vor allem von Monozyten und Makrophagen nach Stimulierung durch bakterielle Endotoxine sezerniert, jedoch auch in relevanten Mengen von Neutrophilen, Endothelzellen und diversen anderen Zelltypen (Endres et al., 1989; Lee, Wong, McIntyre, 1981; Miossec, Cavender, Ziff, 1986; Lord et al., 1991). Auch nicht-mikrobielle Agentien wie Komplementfaktoren, CRP, TNF- α und IL-1 selbst induzieren die Synthese von IL-1 β (Warner, Auger, Libby, 1987; Libby et al., 1986; Dinarello et al., 1987; Schindler, Gelfand, Dinarello, 1990; Ballou, Lozanski, 1992). Inhibitorisch auf seine Synthese hingegen wirken IL-6 und Interferon γ (IFN- γ) (Ghezzi, Dinarello, 1988; Schindler et al., 1990). In seinen Wirkungsweisen ist es denen von TNF- α sehr ähnlich. So stimuliert es zum Beispiel, ebenso wie TNF- α , die Synthese von IL-6, was seine pyrogene Wirkung erklärt (LeMay et al., 1990). Auch die Synthese von TNF- α in PBMC wird durch IL-1 β induziert (Ikejima et al., 1990). Erhöhte Plasmaspiegel von IL-1 β sind bei diversen Krankheitsbildern, v. a. aber beim septischen Schock zu sehen (Casey, Balk, Bone, 1993). Dass diese Werte jedoch weit unter denen von IL-6 oder TNF- α bleiben, liegt unter anderem daran, dass ein Teil des transkribierten IL-1 als Vorstufe in der Zelle zurückbleibt, ein anderer Teil zwar sezerniert wird, jedoch zum Großteil an Proteine gebunden vorkommt (Borth et al., 1990; Aznar, Fitting, Cavaillon, 1990; Higgins, Foster, Postlethwaite, 1994).

Bei der Entstehung der Atherosklerose wird auch diesem Zytokin eine Beteiligung zugesprochen. Es wird in Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäßwand exprimiert und führt hier zur Sekretion von Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Substanzen, weiteren Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, die eine Leukozyteninvasion in die Gefäßwand und somit einen lokalen Inflammationsprozess herbeiführen (Schmidt et al., 1982; Miossec, Cavender, Ziff, 1986; Moyer et al., 1991; Filonzi et al., 1993; Wang et al., 1995). Eine Reduktion des Fortschreitens atherosklerotischer Läsionen konnten sowohl Kirii et al. mit IL-1 β -defizienten ApoE $^{-/-}$ *knockout* Mäusen nachweisen, als auch Chi et

al. mit Mäusen, deren IL-1-Rezeptoren geblockt waren (Kirii et al., 2003; Chi et al., 2004). Merhi-Soussi et al. zeigten ähnliche Ergebnisse mit ApoE *-/- knockout* Mäusen, die den IL-1R-Antagonisten überexprimierten (Merhi-Soussi et al., 2005). Thomas et al. wiesen nach, dass oxidiertes LDL zu einer vermehrten Expression von IL-1B in PBMC führt (Thomas et al., 1994).

IL-1B wird unter Belastung im Skelettmuskel produziert und angereichert (Fielding et al., 1993). Wie mehrere Studien zeigen konnten, kommt es jedoch durch körperliche Aktivität, im Gegensatz zur akuten postinfektiösen oder posttraumatischen Inflammationsreaktion, zu keinem oder höchstens einem geringen nachweisbaren Anstieg der Plasma-IL-1B-Werte (Ullum, 1994; Ostrowski et al., 1998; Ostrowski et al., 1999; Nehlsen-Cannarella et al., 1997).

Interleukin 2

Auch Interleukin 2 (IL-2) zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen. Es wird in erster Linie von aktivierten T-Zellen (Gillis, Ferm, Smith, 1978), in geringeren Mengen auch von B-Zellen (Walker, Leemhuis, Roeder, 1988) und dendritischen Zellen (Granucci et al., 2001) sezerniert und gilt als autokrines und parakrines Wachstumshormon. IL-2 bewirkt über die Bindung an den Interleukin 2-Rezeptor (IL-2R), der nach Antigen-Kontakt auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Bonnard, Yasaka, Jacobson, 1979; Larsson 1981), die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von T-Zellen (Gillis et al., 1978; Smith, Gilbride, Favata, 1980), aber auch von B-Zellen (Blackman et al., 1986; Gaffen, Wang, Koshland, 1996) und NK-Zellen (DiSanto et al., 1995; Khatri et al., 1998).

Im Rahmen degenerativer Gefäßerkrankungen zählt IL-2 zu den atherogenen Zytokinen und spiegelt vor allem die Beteiligung des erworbenen Immunsystems wider, da die Population der T-Lymphozyten einen großen Anteil an Zellen in atherosklerotischen Plaques ausmacht. Simon et al. konnten zeigen, dass IL-2-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit stabiler Angina pectoris signifikant erhöht sind (Simon et al., 2001). Patienten mit instabiler Angina pectoris wiesen in verschiedenen Studien erhöhte oder unveränderte Werte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe in den Plasma-IL-2-Werten auf (Simon et al., 2001; Ozeren et al., 2003; Mazzone et al., 1999). Im Mausmodell mit ApoE *-/- knockout* Mäusen führte eine Zufuhr von IL-2 zu einer Zunahme atherosklerotischer Läsionen, während die Behandlung mit IL-2-Antikörpern eine Abnahme hervorrief (Upadhyaya et al., 2004). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass

IL-2 bei der Destruktion von B-Zellen im Pankreas und somit an der Entstehung von Diabetes mellitus beteiligt ist (Zhou, Zhang, Aune, 2003).

Mehrere Studien haben den Einfluss von körperlicher Belastung auf die Produktion von IL-2 untersucht. Während die einen Arbeitsgruppen keinen signifikanten Einfluss feststellen konnten (Prestes et al., 2008; Cox et al., 2007; Nieman et al., 2001; Zaldivar et al., 2006; Haahr et al., 1991), zeigte sich in den Versuchen der anderen ein Abfall der Plasma-IL-2-Werte nach körperlicher Aktivität, wobei deren Dauer und Intensität keine entscheidende Rolle zu spielen schien (Radom-Aizik et al., 2007; Gleeson, Bishop, 2005; Suzuki et al., 2000; Rhind et al., 1996; Bury et al., 1996; Lewicki et al., 1988). Castell et al. hingegen fanden 16 Stunden nach einem Marathonlauf erhöhte IL-2-Werte (Castell et al., 1997). Den Effekt von regelmäßiger körperlicher Betätigung untersuchten Navarro et al. und stellten einen Anstieg an zirkulierendem IL-2 fest (Navarro et al., 2010).

Interleukin 10

Als antiinflammatorisches Zytokin hat IL-10 im Inflammationsprozess einen großen Stellenwert, da es dafür sorgt, dass es zu keiner überschießenden und somit für den Organismus schädlichen Entzündungsreaktion kommt. Kühn et al. konnten beispielsweise nachweisen, dass IL-10 *knockout* Mäuse vermehrt entzündliche Darmerkrankungen entwickelten (Kühn et al., 1993). Während man früher davon ausging, dass IL-10 nur in Th2-Zellen exprimiert wird und durch Inhibition der Zytokinexpression in Th1-Zellen seinen antiinflammatorischen Effekt ausübt (Fiorentino, Bond, Mosmann, 1989), weiß man heute, dass die Aktivitäten und Wirkungsweisen von IL-10 um einiges komplexer sind. Als Syntheseort gelten inzwischen diverse Zellen aus der Familie der PBMC und man nimmt an, dass viele der Effekte auf T-Zellen indirekter Natur sind und durch direkte Effekte auf Monozyten bzw. Makrophagen vermittelt werden (de Waal Malefyt et al., 1991a; Fiorentino et al., 1991; Ding, Shevach, 1992). So inhibiert IL-10 deren Synthese von IL-1A, IL-1B, IL-6, Interleukin 8 (IL-8), IL-10 selbst, Interleukin 12 (IL-12), TNF- α , *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), stimuliert hingegen die Synthese des antiinflammatorischen IL-1RA (de Waal Manefyt et al., 1991b; Cassatella et al., 1994; Chernoff et al., 1995).

Die antiinflammatorische Wirkungsweise von IL-10 ist wichtiger Bestandteil des Schutzes vor degenerativen Gefäßerkrankungen. Hierbei spielt es eine entscheidende Rolle bei der Beeinflussung von und dem Zusammenspiel mit LDL. Zum einen verhindern erhöhte

Plasmakonzentrationen an IL-10 eine durch minimal modifizierte LDL induzierte Interaktion von Monozyten mit der Gefäßwand, welche einen frühen Schritt im Pathomechanismus der Entstehung atherosklerotischer Plaques darstellt (Pinderski Oslund et al., 1999). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass hochoxidiertes LDL, nicht aber minimal modifiziertes LDL, die Sekretion von IL-10 in Monozyten steigert (Uyemura et al., 1996). Im Mausmodell stellte sich heraus, dass IL-10 *knockout* Mäuse fortgeschrittenere atherosklerotische Plaques bilden als Wildtypen, diese jedoch wiederum ein höheres Risiko für den Krankheitsprogress haben als transgene Mäuse mit IL-10-Überproduktion (Pinderski Oslund et al., 1999). Bei adipösen Menschen sind die Mengen an zirkulierendem IL-10 erhöht (Esposito et al., 2003b). Auch wenn Fain et al. zeigen konnten, dass IL-10 von Adipozyten sezerniert wird, trägt dieses kaum zu den erhöhten Serumspiegeln bei (Fain et al., 2004). Vielmehr geht man davon aus, dass seine Expression hochreguliert wird, um erhöhten Werten an proinflammatorischen Zytokinen entgegenzuwirken. Es zeigte sich jedoch, dass bei Patienten mit metabolischem Syndrom, unabhängig vom Körpergewicht, die Serum-IL-10-Spiegel erniedrigt sind (Esposito et al., 2003b). Mehrere Studien, die die Auswirkung von Gewichtsreduktion auf die IL-10-Konzentration zeigen sollten, erzielten kontroverse Ergebnisse (Jung et al., 2008; Esposito et al., 2003b; Manigrasso et al., 2005).

Zu einem Anstieg der Plasmakonzentration an IL-10 kommt es nach akuter körperlicher Belastung, was wohl hauptsächlich auf eine Stimulation durch vermehrt gebildetes IL-6 zurückzuführen ist (Ostrowski et al., 1999). Ähnliches konnte für längerfristiges Training gezeigt werden. So führte achtwöchiges Ausdauertraining bei Ratten zu einem signifikanten Anstieg an zirkulierendem IL-10 (Lira et al., 2009).

1.2.4. Die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2

Chemokinrezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Ihre Liganden, die Chemokine, werden entsprechend ihrer Cysteinreste am aminoterminalen Ende in vier Gruppen eingeteilt, den CXC, C, CC und CX3C Chemokinen. Analog dieser Einteilung erfolgt diejenige ihrer Rezeptoren in die vier Gruppen CXCR, CCR, XCR und CX3CR (Holmes et al., 1991; Bacon et al., 2002). Chemokine und ihre Rezeptoren sind an verschiedensten physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt, unter ihnen die Migration von Leukozyten (Constantin et al., 2000), die Angiogenese (Strieter et al., 1995), die Infektion mit dem HI-Virus

(Oberlin et al., 1996) und die Hämatopoese (Keller et al., 1994). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 werden hauptsächlich auf Neutrophilen exprimiert, sind aber auch auf Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten zu finden. Bonecchi et al. konnten jedoch zeigen, dass relevante Mengen auf Letzteren erst nach Stimulation durch Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) zu messen sind (Chuntharapai et al., 1994; Bonecchi et al., 2000). In Neutrophilen wirken LPS, TNF- α und IFN- γ inhibitorisch auf ihre Expression (Lloyd et al., 1995). Während CXCR1 hauptsächlich chemotaktische Effekte induziert, ist CXCR2 an der angiogenetischen Aktivität von Chemokinen beteiligt (Hammond et al., 1995; Addison et al., 2000). An CXCR1 und CXCR2 binden die überwiegend proinflammatorischen Chemokine CXCL1 (CXCR1, CXCR2), CXCL2 (CXCR2), CXCL3 (CXCR2), CXCL5 (CXCR2), CXCL6 (CXCR1, CXCR2), CXCL7 (CXCR2) und CXCL8 (CXCR1, CXCR2) (Lee et al., 1992; Ahuja, Murphy, 1996; Bacon et al., 2002). Letzteres war früher besser unter dem Namen IL-8 bekannt und stellt einen Liganden dar, der mit etwa gleicher Affinität an beide Rezeptoren bindet, und die veralteten Synonyme Interleukin 8-Rezeptor α (IL-8RA) und Interleukin 8-Rezeptor β (IL-8RB) für CXCR1 bzw. CXCR2 erklärt (Lee et al., 1992).

Im Rahmen der Entstehung von Atherosklerose spielen aus dem Blut in die Gefäßwand eingewanderte Makrophagen eine entscheidende Rolle. Um eine solche Diapedese möglich zu machen, bedarf es der Adhäsion von Monozyten am Endothel, wobei die Interaktion von Chemokinen und ihren Rezeptoren von großer Bedeutung ist. Interessanterweise spielt hierbei nicht nur das für Monozyten chemotaktische *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) eine Rolle, sondern wie Gerszten et al. zeigen konnten auch die eigentlich vornehmlich an der Chemotaxis von Neutrophilen beteiligten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 und deren Liganden IL-8 und *growth regulated oncogene α* (GRO α) (Gerszten et al., 1999; Breland et al., 2008). Einen Erklärungsansatz hierfür lieferte die Arbeitsgruppe um Nabah, die zeigen konnte, dass die Bindung von CXCLs an ihre Rezeptoren zu einer Induktion der Freisetzung von CC-Chemokinen wie MCP-1 führt (Nabah et al., 2007). Im Mausmodell kommt es bei atherosklerose-suszeptiblen Mäusen mit Deletion im CXCR2-Gen, sowie auch mit *knockout* für den Liganden zu einer verringerten Makrophageninvasion in den Subendothelialraum und zu einer reduzierten Anzahl an Gefäßläsionen (Boisvert et al., 1998).

Nachdem Akerstrom et al. gezeigt hatten, dass nach konzentrischer körperlicher Belastung zwar die Menge der Boten-RNA (engl.: *messenger RNA*; mRNA) von IL-8 im

Skelettmuskel zunimmt, jedoch nicht die Menge an zirkulierendem Protein, postulierten sie einen lokalen angiogenetischen Effekt von IL-8 im Muskel. Frydelund-Larsen et al. bekräftigten diese Annahme durch den Nachweis von CXCR2-Expression im vaskulären Endothel und in den Muskelfibrillen im Skelettmuskel und deren Steigerung nach dreistündigem Training auf dem Ergometer (Akerstrom et al., 2005; Frydelund-Larsen et al., 2007). Andere Studien konnten jedoch zeigen, dass auch die Plasmakonzentrationen von IL-8 durch körperliche Aktivität beeinflusst werden können. Während sie nach akuter exzentrischer Belastung signifikant ansteigen (Nieman et al., 2001; Peake et al., 2008), ist nach mehrwöchigem Ausdauertraining ein Absinken der IL-8-Plasmaspiegel zu verzeichnen (Trøseid et al., 2004; Spruit et al., 2005).

1.2.5. *Toll-like* Rezeptoren

Die elf bis dato bekannten humanen *Toll-like* Rezeptoren (TLR) sind eine Familie hoch konservierter Proteine, die auf und in Zellen des Immunsystems, sowie in Zellen, die eine wichtige Barrierefunktion für Pathogene ausüben, exprimiert werden (Rock et al., 1998; Takeuchi et al., 1999a; Chuang, Ulevitch, 2000; Chuang, Ulevitch, 2001; Zhang et al., 2004; Abreu et al., 2001). Ihren Namen verdanken sie ihrer Homologie zum Toll-Protein der Spezies *Drosophila*, das ursprünglich als Regulationsprotein der embryonalen Entwicklung entdeckt worden war. 1996 konnten Lemaitre et al. jedoch seine Bedeutung für die Wirtsabwehr von *Drosophila*, welche nur ein angeborenes Immunsystem besitzt, zeigen (Lemaitre et al., 1996). Nur ein Jahr später fanden Medzhitov und seine Arbeitsgruppe ein entsprechendes Protein in Säugern, das sie hToll nannten und das heute unter dem Namen *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR 4) bekannt ist (Medzhitov, Presten-Hurlburt, Janeway, 1997). TLRs spielen als *pattern recognition* Rezeptoren bei der Erkennung körperfremder Stoffe in Form mikrobieller Bestandteile wie z. B. LPS (TLR 4) (Hoshino et al., 1999), doppelsträngiger Ribonukleinsäure (engl.: *ribonucleic acid*; RNA) (*Toll-like* Rezeptor 3 (TLR 3)) (Alexopoulou et al., 2001), Lipoproteinen (Aliprantis et al., 1999) und Lipopeptiden (*Toll-Like* Rezeptor 2 (TLR 2)) (Ozinsky et al., 2000) eine entscheidende Rolle und leiten die Infektabwehr ein. Bemerkenswert ist hierbei, dass an den einzelnen Rezeptor unterschiedlichste Liganden binden, die untereinander keinerlei strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. Die Expression der verschiedenen TLR-Subtypen auf diversen Zelltypen und die Vielzahl derer Liganden gewährleistet somit die flächendeckende Erkennung und Bekämpfung diverser Bakterien, Viren, Pilze und

Protozoen (Takeuchi et al., 1999b; Tabeta et al., 2004; Heil et al., 2004; Meier et al., 2003; Campos et al., 2001). Über unterschiedliche Signaltransduktionswege kommt es nach Bindung des Liganden letztlich zu einer intrazellulären Erhöhung des Transkriptionsfaktors *Nuclear Factor Kappa B* (NFκB), was zu einer Aktivierung sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems führt (Medzhitov et al., 1998; Keating et al., 2007). Bindet ein Ligand an den TLR einer antigenpräsentierenden Zelle (APC), kommt es zur Aktivierung dieser. Dies führt zu einer Sekretion von Stickstoffmonoxid und diverser Zytokine, sowie zur gesteigerten Expression von Oberflächenmolekülen, die kostimulatorisch auf Zellen des erworbenen Immunsystems wirken. So werden einerseits die Erreger direkt abgetötet, andererseits wird die Reifung weiterer APC angeregt und die sezernierten Zytokine aktivieren T-Lymphozyten und induzieren deren Differenzierung zu Th1- oder Th2-Zellen (Medzhitov, Presten-Hurlburt, Janeway, 1997; Michelsen et al., 2001; Agrawal et al., 2003; Barr et al. 2007).

Doch auch endogene Liganden binden an TLRs und setzen ähnliche Signaltransduktionswege in Gang wie im Zuge einer Infektion. Diese Liganden können Desoxyribonukleinsäure (engl.: *deoxyribonucleic acid*; DNA) (Means et al., 2005), Fibrinogen (Smiley, King, Hancock, 2001) oder Hitzeschockproteine (Vabulas et al., 2001) sein, die bei sterilen Infektionen von geschädigtem Gewebe freigesetzt werden und im Rahmen von Autoimmunerkrankungen auftreten. Auch minimal modifiziertes LDL und oxidiertes LDL binden an TLRs (Miller et al., 2003; Xu et al., 2001) und liefern einen Erklärungsansatz für die Beteiligung dieser an degenerativen Gefäßerkrankungen, wobei hierfür vor allem die im Rahmen dieser Arbeit unersuchten TLR 2 und TLR 4 von Bedeutung zu sein scheinen. TLRs werden in atherosklerotischen Plaques auf Makrophagen, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten der Adventitia exprimiert (Xu et al., 2001; Edfeldt et al., 2002; Vink et al., 2002) und induzieren die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, die Aktivierung von Zellen des adaptiven Immunsystems, einen Expressionsanstieg von Adhäsionsmolekülen und somit eine gesteigerte Leukozytenadhäsion, sowie die Proliferation glatter Muskelzellen (Sasu et al., 2001; Vink et al., 2002; Nakamura et al., 2007; Heo et al., 2008). Monaco et al. konnten zeigen, dass in kultivierten Zellen atheromatöser Plaques die Expression von Zytokinen durch eine antikörper-induzierte Blockade des TLR 2 reduziert wird (Monaco et al., 2009). Diverse Studien am Mausmodell belegten die Beteiligung von TLRs an Entstehung und Fortschreiten von Atherosklerose. So entwickelten Atherosklerose-gefährdete ApoE *-/- knockout* Mäuse mit zusätzlicher Deletion im

TLR 4-Gen weniger Läsionen als Mäuse der Kontrollgruppe (Michelsen et al., 2004). Ein ähnliches Ergebnis erbrachte eine TLR 2 *knockout* Mutation im Modell mit LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen (Mullick, Tobias, Curtiss, 2005). Auf PBMC ist die Expression von TLR 2 und TLR 4 bei akutem Koronarsyndrom, nicht aber bei stabiler Angina pectoris erhöht (Ashida et al., 2004; Methe et al., 2005). Offen ist noch die Frage, inwiefern Pathogene direkt an der Progression atherosklerotischer Läsionen beteiligt sind. Cao et al. konnten zeigen, dass *Chlamydia pneumoniae*, von denen nachgewiesen worden war, dass sie die Bildung von Schaumzellen induzieren, über den TLR 2 agieren (Kalayoglu, Byrne, 1998; Cao et al., 2007).

1.2.6. Stickstoffmonoxid-Metabolismus

1.2.6.1. Die Geschichte von Stickstoffmonoxid und seine Wirkung im Organismus

1980 konnten Furchgott und Zawadzki nachweisen, dass vom Endothel eine Substanz freigesetzt wird, unter deren Einwirkung die Gefäßmuskulatur erschlafft und die seine Arbeitsgruppe im Verlauf als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) bezeichnete (Furchgott, Zawadzki, 1980). In den späteren 1980er Jahren zeigte das Team von Furchgott zeitgleich mit dem von Ignarro, dass es sich bei EDRF um NO handelt, was von Folgestudien bestätigt werden konnte (Ignarro et al., 1987; Palmer, Ferrige, Moncada, 1987). Man weiß heute, dass NO an diversen physiologischen und pathologischen Prozessen im Organismus beteiligt ist. Neben der oben beschriebenen Vasodilatation behindert NO die Thrombozytenaggregation und -adhäsion (Mellion et al., 1981; Radomski, Palmer, Moncada, 1987) und übt somit großen Einfluss auf die Homöostase im vaskulären System aus. Sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem dient es nitrinergen Neuronen als Neurotransmitter und ist dort unter anderem an Lernprozessen und Gedächtnisfunktion sowie der Reproduktionsregulation beteiligt (Susswein et al., 2004; Rettori et al., 1992; Rettori, Kamat, McCann, 1994). Als dritter großer Bereich des Wirkspektrums von NO ist das Immunsystem anzusehen. Durch die Interaktion mit zahlreichen mikrobiellen Angriffsstellen nimmt NO direkten Einfluss auf die Wirtsabwehr und unterbindet durch Hemmung der Ribonukleotidreduktase das Wachstum von Tumoren (Stuehr, Nathan, 1989; Kwon, Stuehr, Nathan, 1991).

Stickstoffmonoxid ist ein leicht diffusibles Gas, das die Zellmembran überwinden kann und als freies Radikal eine für diese hochreaktive Molekülgruppe relativ lange Halbwertszeit von gut elf Sekunden hat (Hakim et al., 1996). Dies ermöglicht es ihm, nicht

nur seine Funktion als intra- sondern auch interzellulärer Botenstoff auszuüben, bevor es zu Nitrat und Nitrit oxidiert (Stuehr, Marletta, 1987a; Hibbs et al., 1988). Wird NO freigesetzt, diffundiert es zu seiner Zielzelle und aktiviert dort die lösliche Guanylatzyklase (engl.: *soluble guanylyl cyclase*; sGC) (Ignarro et al., 1986), ein zytosolisches Enzym, das, wie man heute weiß, einem Plasmamembran-assoziierten Rezeptor entspricht (Russwurm, Wittau, Koesling, 2001; Zabel et al., 2002). Obwohl mehrere Studien andere Wirkmechanismen von NO zeigen konnten, gilt die Rezeptorbindung an die sGC als der einzige bisher sicher belegte und am besten untersuchte Weg (Weisbrod et al., 1998; Trottier et al., 1998; Miller et al., 2004; Yuill et al., 2010). Bindet NO an das Häm-Eisen der sGC, führt dies zu einer Bildung des *second messengers* zyklisches Guanosinmonophosphat (engl.: *cyclic guanosine monophosphate*; cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). cGMP bewirkt über verschiedene Mechanismen ein Absinken der intrazellulären Calciumkonzentration und somit in den glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasodilatation (Stone, Marletta, 1994). Es werden auch cGMP-unabhängige Effekte von NO diskutiert, wie die Aktivierung der *sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATP-ase* (SERCA), die die Aufnahme von Calcium ins sarko- bzw. endoplasmatische Reticulum bewirkt (Cohen et al., 1999). Auch im zentralen Nervensystem wirkt NO als Neurotransmitter sowohl über cGMP-abhängige als auch -unabhängige Wege (Arancio et al., 2001; Oh et al., 1999). Dagegen sind die Effekte von NO im Immunsystem größtenteils cGMP-unabhängig und hauptsächlich auf seine direkte Interaktion mit mikrobiellen Bestandteilen und die daraus resultierende Zytotoxizität zurückzuführen (s. oben).

1.2.6.2. Biosynthese von Stickstoffmonoxid

Die Biosynthese von NO erfolgt zum größten Teil durch das Enzym NO-Synthase (NOS), welches die O₂-abhängige 5-Elektronen-Oxidation von L-Arginin zu Citrullin und NO katalysiert, wobei Wasser als Coprodukt entsteht (Palmer, Moncada, 1989; Palmer, Ashton, Moncada, 1988). Für diese Reaktion werden Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat (NADPH), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), Tetrahydrobiopterin (BH₄), Protoporphyrin IX (Häm) und Calmodulin als Cofaktoren benötigt (Stuehr et al., 1991; Bredt, Snyder, 1990; Mayer, John, Böhme, 1990; Klatt, Schmidt, Mayer, 1992; McMillan et al., 1992). Die NOS liegt im aktiven Zustand als Homodimer zweier NOS-Monomere vor (Schmidt et al., 1991; Stuehr et al., 1991). Man kennt heute drei Isoformen des Enzyms, die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS

(eNOS) und die induzierbare NOS (iNOS). nNOS und eNOS sind nach dem Gewebe benannt, aus dem sie zuerst isoliert wurden (Bredt, Snyder, 1990; Janssens et al., 1992), heute weiß man jedoch, dass sie in diversen Zelltypen vorkommen (Tab. 1). Da sie konstitutiv exprimiert werden, fasst man sie auch unter dem Namen konstitutive NOS (engl.: *constitutive* NOS; cNOS) zusammen. Ihre NO-Synthese wird hauptsächlich durch ihre Aktivität reguliert, welche von an das Enzym gebundenen Calcium/Calmodulin-Komplexen abhängig ist. Steigt durch einen Stimulus (Tab. 2) die intrazelluläre Calciumkonzentration, kommt es vermehrt zur Bildung solcher Komplexe. Diese führen nach ihrer Bindung zur Dimerisierung der NOS und somit zur Überführung in ihre aktive Form. Es kommt zu einem sofortigen, wenige Sekunden anhaltenden Anstieg der NO-Konzentration im picomolaren Bereich (Bredt, Snyder, 1990; Schmidt et al., 1991). Neben den konstitutiv exprimierten NO-Synthasen existiert auch eine durch verschiedene Stimuli (Tab. 2) induzierbare Isoform, die als erstes aus murinen Makrophagen isoliert wurde, von der man aber heute weiß, dass auch sie in zahlreichen Zelltypen exprimiert wird (Tab. 1). Sie arbeitet, anders als die cNOS, calciumunabhängig und ihre NO-Produktion wird auf transkriptioneller Ebene reguliert. Deshalb kommt es im Gegensatz zum schnellen, kurzfristigen NO-Anstieg durch die cNOS erst nach Stunden zu erhöhten NO-Spiegeln, die jedoch Stunden bis Tage anhalten können und außerdem, im nanomolaren Bereich liegend, tausendfach höher sind (Stuehr et al., 1991; Xie et al., 1992; Stuehr, Marletta, 1987b; Lamas et al., 1991). Dieser Unterschied in der Regulation der NO-Synthese liegt darin begründet, dass die iNOS Calmodulin irreversibel und unabhängig von Calcium bindet und somit dauerhaft als aktives Homodimer vorliegt (Cho et al., 1992).

Tab. 1: Expressionsorte der drei Isoformen der NO-Synthase

nNOS	iNOS	eNOS
Neurone (v. a. Kleinhirn, Hippocampus, Hypothalamus) (Bredt, Snyder, 1989; Bredt, Hwang, Snyder, 1990)	Makrophagen (Stuehr et al., 1991)	Endothelzellen (Janssens et al., 1992)
Gliazellen (Schmidt et al., 1992b)	T-Lymphozyten (Kirk, Regan, Barbul, 1990)	Kardiomyozyten (Schwarz et al., 1995)
Niere (Macula densa) (Schmidt et al., 1992b; Tojo et al., 1994)	NK-Zellen (Cifone et al., 1999)	Thrombozyten (Mehta et al., 1995; Wallerath et al., 1997)
Lungenepithelien (Schmidt et al., 1992b)	Neutrophile Granulozyten (Saini et al., 2006)	Megakaryozyten (Wallerath et al., 1997)
Epithelzellen des Magens (Schmidt et al., 1992b)	Eosinophile Granulozyten (Wallerath et al., 1997)	Fibroblasten (Wang et al., 1996)
Epithelzellen des Uterus (Schmidt et al., 1992b)	Thrombozyten (Mehta et al., 1995; Wallerath et al., 1997)	Keratinocyten (Shimizu et al., 1997)
Pankreatische B-Zellen (Schmidt et al., 1992a; Schmidt et al., 1992b)	Megakaryozyten (Wallerath et al., 1997)	
Skelettmuskulatur (Kobzik et al., 1994; Nakane et al., 1993)	Endothelzellen (Kilbourne, Belloni, 1990)	
Kardiomyozyten (Schwarz et al., 1995)	Kardiomyozyten (Schulz, Nava, Moncada, 1992)	
Neutrophile Granulozyten (Wallerath et al., 1997; Saini et al., 2006)	Vaskuläre glatte Muskelzellen (Busse, Mülsch, 1990; Rees et al., 1990)	
	Glomeruläre Mesangiumzellen (Jansen et al., 1994; Mohaupt et al., 1994)	
	Astrozyten/Mikroglia (Galea, Feinstein, Reis, 1992)	
	Hepatozyten/Kupferzellen (Billiar et al., 1990)	
	Pankreatische B-Zellen (Alm et al., 1999)	
	Fibroblasten (Wang et al., 1996)	
	Keratinocyten (Shimizu et al., 1997)	
	Tumorzellen (Cui et al., 1994; Zhao et al., 1998; Cianchi et al., 2004; Chen et al., 2006)	

Tab. 2: Stimulatoren der drei NOS Isoformen

	nNOS	iNOS	eNOS
Stimulatoren	L-Glutamat (Bredt, Snyder, 1989)	LPS (über Aktivierung des TLR-Signalwegs) (Stuehr, Marletta, 1987a; He et al., 2006; Heo et al., 2008)	Acetylcholin (Furchgott, Zawadzki, 1980; Griffith et al., 1984)
	Östrogen (Weiner et al., 1994)	IFN-γ (Ding, Nathan, Stuehr, 1988; Stuehr, Marletta, 1987a; MacNaul, Hutchinson, 1993)	Adenosindiphosphat (ADP)/Adenosintri-phosphat (ATP) (De Mey, Claeys, Vanhoutte, 1982; Houston, Shepherd, Vanhoutte, 1985)
	Mangel an neurotrophen Faktoren (Wu et al., 1994; Zhang et al., 1994)	TNF-α (Ding, Nathan, Stuehr, 1988; MacNaul, Hutchinson, 1993)	Bradykinin (Chand, Altura, 1981)
		IL-1B (MacNaul, Hutchinson, 1993; Kunz et al., 1994)	Histamin (van de Voorde, Leusen, 1983)
		IL-2 (Jyothi, Khar, 2000)	Serotonin (Cocks, Angus, 1983; Houston, Shepherd, Vanhoutte, 1985)
		Niedrige NO-Konzentrationen (Umansky et al., 1998)	Substanz P (Wallerstedt, Bodelsson, 1992)
			Thrombin (De Mey, Claeys, Vanhoutte, 1982)
			Insulin (Steinberg et al., 1994)
			Östrogen (Weiner et al., 1994)

Tab. 3: Inhibitoren der drei NOS Isoformen

	nNOS	iNOS	eNOS
Inhibitoren	7-Nitro-Indazol (Moore et al., 1993)	Transforming Growth Factor β (TGF-β) (Ding et al., 1990; Schini et al., 1992; Oswald et al., 1992)	TNF-α (MacNaul, Hutchinson, 1993; Goodwin et al., 2007)
		IL-4 (Al-Ramadi et al., 1992; Oswald et al., 1992; Bogdan et al., 1994)	LPS (MacNaul, Hutchinson, 1993)
		IL-8 (McCall, Palmer, Moncada, 1992)	IFN-γ (MacNaul, Hutchinson, 1993)
		IL-10 (Oswald et al., 1992; Cunha, Moncada, Liew, 1992)	IL-1B (MacNaul, Hutchinson, 1993)
		MCP-1 (Rojas et al., 1993)	CRP (Venugopal et al., 2002)
		Macrophage deactivating Factor (MDF) (Ding et al., 1990)	
		Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Schini et al., 1992)	
		Glucocorticoide (Di Rosa et al., 1990)	
		Hohe NO-Konzentrationen (Umansky et al., 1998)	
	Methylierte Arginin-Analoga (L-NMMA, ADMA) (McCall et al., 1989; Knowles et al., 1990; Palmer et al., 1988; Vallance et al., 1992)		

1.2.6.3. Beteiligung an Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen

Mehrere Studien am Mausmodell konnten zeigen, dass die NO-Produktion durch die NOS Einfluss auf die Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen nimmt. So führten Deletionen im eNOS-Gen und im nNOS-Gen zu einer Zunahme neointimaler Läsionen bei Atherosklerose-empfindlichen ApoE *-/- knockout* Mäusen (Moroi et al., 1998; Morishita et al., 2002; Kuhlencordt et al., 2001a). Umgekehrt verbesserte sich die Gefäßsituation von solchen Mäusen, sobald die NOS-Aktivität gesteigert wurde (Kawashima et al., 2001; van Haperen et al., 2002). Die Untersuchung der Rolle der iNOS

brachte im Mausmodell bisher ambivalente Ergebnisse. Während Kuhlencordt et al. zeigen konnten, dass eine Deletion im iNOS-Gen bei ApoE *-/- knockout* Mäusen in einer Reduktion atherosklerotischer Formationen resultierte (Kuhlencordt et al., 2001b), führte in einer Studie von Koglin et al. das Ausschalten der iNOS zur Exazerbation pathologischer Gefäßveränderungen in Herztransplantaten (Koglin et al., 1998). Während bei gesunden Mäusen das Ausschalten einer Isoform alleine keine signifikanten Ergebnisse erbrachte, hatten gleichzeitige Deletionen in allen drei NOS-Genen die spontane Entwicklung neointimaler Läsionen, einer verdickten Media, perivaskulärer Fibrosen und daraus resultierende Myokardinfarkte zur Folge (Nakata et al., 2008). Die Bedeutung der Verfügbarkeit von NO erklärt sich durch seine zahlreichen antiproliferativen und antioxidativen Effekte, wie die Hemmung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion (Mellion et al., 1981; Radomski, Palmer, Moncada, 1987) sowie der Leukozytenadhäsion und -diapedese (Provost et al., 1994).

Adipositas und das mit ihm assoziierte metabolische Syndrom führen oft zu Atherosklerose. Wie man heute weiß, ist dies unter anderem auf Pathomechanismen zurückzuführen, die in einer verschlechterten Bioverfügbarkeit von NO resultieren. Hierzu zählen ein verringerter Insulin-induzierter NO-Output durch Diabetes mellitus (Johnstone et al., 1993; Williams et al., 1996) und bei endothelialer Dysfunktion eine paradoxe Vasokonstriktion (Ludmer et al., 1986) sowie erhöhter oxidativer Stress durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die mit NO zum schädlichen Peroxynitrit reagieren (White et al., 1996; Ohara, Peterson, Harrision, 1993). Außerdem weist geschädigtes Endothel eine verringerte Verfügbarkeit des NOS-Cofaktors BH₄ (Stroes et al., 1997; Pieper, 1997) sowie eine gesteigerte Produktion von NOS-Inhibitoren wie Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) auf (Böger et al., 1997). Dies eröffnete in den letzten Jahren ein neues Forschungsgebiet um ADMA als kardiovaskulären Risikomarker und die für seine Hydrolyse verantwortlichen Isoenzyme der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) (Tran, Leiper, Vallance, 2003; Fiedler, Wojciak-Stothard, 2009).

Wenngleich Niebauer et al. zeigen konnten, dass in ApoE *-/- knockout* Mäusen eine durch NOS-Inhibition getriggerte Vergrößerung atherosklerotischer Läsionen durch körperliche Aktivität reversibel war (Niebauer et al., 2003), konnten Studien über den Einfluss von körperlicher Aktivität auf die NO-Synthese am Menschen und im Tiermodell bisher keine eindeutigen Ergebnisse liefern. Es scheinen hier starke Unterschiede zu herrschen bezüglich des untersuchten Gewebes, der Intensität und der Dauer der Belastung. Tendenziell ist jedoch festzustellen, dass Ausdauertraining zu erhöhten Plasmawerten von

NO durch vermehrte NO-Freisetzung aus Endothelzellen führt (Tordi et al., 2006; Poveda et al., 1997; Maeda et al., 2001). Der Hauptgrund hierfür dürfte eine längere Aktivierung der eNOS sein (Sessa et al., 1994; Yang et al., 2002; Tanabe et al., 2003; Graham, Rush, 2004; Sun et al., 2008; Musicki et al., 2008). Die Expressionsrate der iNOS scheint von der Intensität der Belastung abhängig zu sein und kann nach moderatem Ausdauertraining in Endothelzellen leicht herunterreguliert sein oder keine Alterationen zeigen, jedoch eine Steigerung aufweisen, wenn die Belastung intensiviert wurde (Yang, Chen, 2003; Sun et al., 2008; Yang et al., 2002). Auch im Skelettmuskel steigt durch Training die Aktivität von eNOS und nNOS, während die Expression der iNOS sinkt oder nicht beeinflusst wird (Song et al., 2009; Gielen et al., 2005; Vassilakopoulos et al., 2003). Bei Untersuchungen der Änderungen der NO-Plasmakonzentration nach einem einmaligen akuten Belastungsereignis zeigte sich meist ein deutlicher Anstieg (Suzuki et al., 2000; Sureda et al., 2006; Silveira et al., 2007). Lediglich die Arbeitsgruppe von Poveda konnte keine signifikanten Unterschiede nach maximaler Laufbandbelastung feststellen (Poveda et al., 1997). Studien konnten zeigen, dass kurzfristige Belastungen die Expression aller drei Isoformen im Muskel ansteigen lassen (Lima et al., 2010; Roberts et al., 1999), während die Aktivität der eNOS sowohl in Erythrozyten als auch in Kardiomyozyten herunterreguliert wird (Suhr et al., 2009; Iemitsu et al., 2000).

1.3. Zielsetzungen der Studie

Studien der letzten Jahre führten zu der Erkenntnis, dass degenerative Prozesse in Gefäßen mit einer Inflammationsreaktion einhergehen, die bei adipösen Patienten gesteigert zu sein scheint und durch körperliche Aktivität beeinflusst werden kann. Die Münchner Marathon Studie war die erste ihrer Art, welche umfangreiche kardiovaskuläre Parameter bei Teilnehmern unterschiedlichen Fitnessniveaus und unterschiedlicher, z. T. als pathologisch anzusehender Körpermasse, nach Absolvieren eines zehnwöchigen Ausdauertrainings, sowie dem darauffolgenden Zurücklegen der Marathondistanz, maß. Die in dieser Arbeit aufbereitete Teilstudie befasst sich speziell mit der Expression verschiedenster Inflammationsmarker in PBMC, sowie der Serumkonzentration von NO und der Expression ihrer Synthesenzyme in PBMC. In Zusammenschau mit anderen aus der Studie generierten Daten soll gezeigt werden,

- ob die Expression klassischer und moderner Biomarker der Inflammation in PBMC durch Ausdauertraining/körperliche Extrembelastung beeinflusst wird,
- ob es diesbezüglich Diskrepanzen bei Patienten unterschiedlichen Fitnessniveaus gibt, sprich
- ob die Inflammationsreaktion durch Belastung bei Adipösen stärker ausgeprägt ist und
- ob Ausdauertraining die Inflammationsmarker bei Adipösen stärker senken kann,
- ob eine Änderung der Serumwerte der Inflammationsmarker auf eine geänderte Genexpression in PBMC zurückzuführen ist,
- ob eine Belastungsleukozytose auf mRNA-Ebene in PBMC zu erkennen ist und ob es Unterschiede bezüglich Fitnessgrad und Körpermasse gibt,
- ob die verbesserte Gefäßfunktion nach aerobem Ausdauertraining mit einer Erhöhung der Gesamtstickoxide (NOx) im Serum zu erklären ist

und wenn ja,

- ob diese Produkt einer Entzündungsreaktion ist.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Untersuchungsmaterial und Studiendesign

Als Untersuchungsmaterial dienten Serumproben sowie die RNA mononukleärer Zellen, die aus heparinisierten Vollblutproben der Teilnehmer der Münchner Marathon-Studie (vollständiger Titel: Untersuchung myokardialer Verletzungen, ventrikulärer Funktion und kardiovaskulärer Risikofaktoren in Abhängigkeit vom Trainingszustand bei Marathonläufern) gewonnen worden waren. Diese war im Sommer/Herbst 2007 vom Institut für Präventive und Rehabilitative Sportmedizin (PRS) unter Leitung von Dr. med. Henner Hanssen durchgeführt worden. Ihr Ziel war es, anthropometrische, leistungsphysiologische, immunologische und metabolische Effekte von aerobem Ausdauertraining sowie dem Zurücklegen der Marathondistanz bei Läufern unterschiedlicher Leistungsklassen und mit unterschiedlichem kardiovaskulärem Risikoprofil aufzuzeigen.

Im Rahmen dieser Studie waren verschiedenste kardiovaskuläre, leistungsdiagnostische und anthropometrische Parameter bestimmt worden, die sich bei (Prä-)Adipösen, Freizeitsportlern und Leistungssportlern durch aerobes Ausdauertraining als Vorbereitung auf einen Marathonlauf, sowie durch den Lauf des Marathons selbst, veränderten. Hierfür waren vier Visiten angesetzt worden, wobei der erste Termin elf Wochen, der zweite vier bis sechs Tage vor dem Wettkampf waren und diese somit den Zeitraum der zehnwöchigen Trainingsphase einrahmten. Die Visiten drei und vier sollten die metabolischen und immunologischen Veränderungen durch den Marathonlauf aufzeigen und wurden unmittelbar nach dem erfolgreich absolvierten Lauf bzw. am Folgetag festgesetzt. Die Untersuchungen fanden am PRS, sowie im Klinikum Rechts der Isar, München statt.

Nach der Genehmigung durch die zuständige Ethikkommission der TU München war die Rekrutierung der Probanden vom PRS vorgenommen worden, wobei zum einen Teilnehmer aus dem eigenen Patientenstamm ausgewählt wurden. Den anderen Teil bildeten Interessierte, die über Annoncen in geläufigen Münchner Printmedien oder über Flyer, die an Sportvereine und Lauftreffs verteilt worden waren, auf die Studie aufmerksam geworden waren.

Über die Aufnahme in die Studie entschied die Projektleitung gemäß der Richtlinien, die Tabelle 4 zu entnehmen sind.

Tab. 4: Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
männliches Geschlecht	manifeste Herzerkrankungen, Angina pectoris
Alter: 30 - 60 Jahre	medikamentöse Mehrfachtherapie eines Diabetes mellitus Typ II oder einer Hypertonie
mindestens ein erfolgreich absolvierter Halbmarathon	Niereninsuffizienz (Kreatinin > 1,5 mg/dL)
Risikopatient: <i>Body Mass Index</i> (BMI) 27-35 kg/m ² oder Bauchumfang (BU) ≥ 102 cm	muskuloskelettale Erkrankungen
schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme	psychiatrische Erkrankungen oder Klaustrophobie
	Metallimplantate

Daraus ergab sich eine anfängliche Teilnehmerzahl von 61 Probanden, von denen 45 zu allen festgesetzten Terminen erschienen sind, den Marathon erfolgreich beendet haben, und deren Messwerte somit zur Akquirierung der Daten herangezogen wurden.

Die Zahl der Probanden, die für die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Teilstudie berücksichtigt wurden, setzte sich wie folgt zusammen:

14 adipöse bzw. präadipöse Freizeitsportler (Gruppe A)

(Laufumfang ≤ 40 km/Woche und zusätzlich BMI ≥ 27 kg/m² oder BU ≥ 102 cm)

16 normalgewichtige Freizeitsportler (Gruppe F)

(Laufumfang ≤ 40 km/Woche und zusätzlich BMI < 27 kg/m²)

15 Amateurleistungssportler (Gruppe L)

(Laufumfang ≥ 70 km/Woche und zusätzlich BMI < 27 kg/m²)

Von der Auswertung der Daten ausgeschlossen wurden Proben, die nicht in den entsprechenden Heparinröhrchen abgenommen worden waren, sowie Proben, die aufgrund von Fehlern in der Aufreinigung und Bearbeitung starke Einbußen an Qualität erfahren hatten. Dabei handelte es sich im Konkreten um vier Proben vierer verschiedener Teilnehmer (unter ihnen zwei Freizeitsportler, ein Proband der Gruppe der (Prä-)Adipösen und ein Leistungssportler).

2.1.2. Geräte

Tab. 5: Verwendete Geräte

Name	Firma	Sitz
Autoklav (Systec V-95)	Systec	Wettenberg, Deutschland
Electrophoresis Power Supply E835	Consort	Turnhout, Belgien
Eppendorfszentrifuge Typ 5415 D	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorfszentrifuge Typ 5417 D	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Flockeneisautomat AF 80	Scotsman	IL, USA
Infinity Videodokumentationssystem 3000	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Mastercycler gradient LIZ	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Mikrowelle NN-E 202	Panasonic	Osaka, Japan
Minishaker MS2	IKA	Staufen, Deutschland
Multipipette pro	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
NanoDrop ND-1000	Thermo	Karlsruhe, Deutschland
PerfectBlue Breitformat Gelsystem	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipetus Akku	Hirschmann	Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage CP 4201	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Realtime Thermocycler Rotor-Gene RG 6000	Corbett Research	Sydney, Australien
Reinwasseranlage Rios TM 16	Millipore	Billerica, USA
Sunrise absorbance reader	Tecan	Männedorf, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Galaxy mini	VWR	PA, USA

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Tab. 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Firma	Sitz
Handschuhe, Latex	Anthos	Wals-Siezenheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten (5 cm ³ , 10 cm ³ , 25 cm ³)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
STRIP Tubes (0,1 mL)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Vivaspin 500, PES-Membran, 10 kDa	Sartorius	Göttingen, Deutschland

2.1.4. Kits

Tab. 7: Verwendete Kits

Name	Firma	Sitz
Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, 192 wells	Biozol	Eching, Deutschland
NucleoSpin RNA Clean-up XS	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (200)	Qiagen	Hilden, Deutschland
Thermoprime Plus DNA Polymerase	Agbene	Epsom, UK

2.1.5. Chemikalien, Lösungen, Puffer

Tab. 8: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer

Name	Firma	Sitz
Brain, Human, Total RNA	Stratagene	Heidelberg, Deutschland
Chloroform	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas	Leon-Roth, Deutschland
Ethanol, absolut	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth	Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas	Leon-Roth, Deutschland
Isopropanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Abgene	Epsom, Großbritannien
PCR Wasser (PCR-H ₂ O)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
peqGOLD TriFast	Peqlab	Erlangen, Deutschland
peqGOLD Universal-Agarose	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Reaction Buffer M	Abgene	Epsom, Großbritannien
Universal Human Reference RNA	Stratagene	Heidelberg, Deutschland
100 bp DNA Ladder ready-to-use	Bioscience	Jena, Deutschland
50 bp DNA Ladder	New England Biolab	Ipswich, MA, USA
50x Tris-Azetat-EDTA-Puffer	Labor PHR München	München, Deutschland
6x Loading Solution Dye	Fermentas	Leon-Roth, Deutschland

2.1.6. Primer

Tab. 9: Designte und verwendete Primer

Zielgen	Sequenzen Forward-Primer/ Reverse-Primer	Produktlänge	Quelle	Ref-Sequenz NCBI
β-Aktin	CCAAGGCCAACCGTGAGAAGAT/ CCACGTTCCGTGAGGATCTTCA	255 bp	manuell	NM_001101
CRP	TCGTATGCCACCAAGAGACAA/ ACACTTCGCCTTGCCTTCAT	453 bp	manuell	NM_000567.2
DDAH 1	GCAGCACCAGCTCTACGTG/ AGCACCTCGTTGATTTGTCC	319 bp	Primer3	NM_012137.2
DDAH 2	ACGTTCTCTTACCGGCC/ GAGAGCTTCTGCAGTGCCTC	376 bp	manuell	NM_013974.1
eNOS	AAGGCGACAATCCTGTATGG / TGGGTCTGAGCAGGAGATG	309 bp	HUSAR	NM_000603
GAPDH	TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC/ ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	189 bp	manuell	NM_002046
IL-10	CACTGCTCTGTTGCCTGGT/ GGCCTTGCTCTTGTTCAC	401 bp	Primer3	NM_000572.2
IL-1B	AGCTGATGGCCCTAAACAGA/ TCCATATCCTGTCCCTGGAG	384 bp	Primer3	NM_000576.2
IL-2	AACTCCTGTCTTGCATTGCA/ GTGTTGAGATGATGCTTTGAC	442 bp	UniSTS	NM_000586.3
IL-6	TACCCCCAGGAGAAGATTCC/ TTTCAGCCATCTTTGGAAGG	204 bp	Primer3	NM_000600.2
CXCR1	CGAAGCACCATCATTCCC/ GGGAACATGTGTTTCCAGCT	348 bp	UniSTS	NM_000634.2
CXCR2	CGCTCCGTCCTGATGTCTA/ TTGTTGCCCATGTCCTCATA	371 bp	Primer3	NM_001557.2
iNOS	ACAAGCCTACCCCTCCAGAT/ CGATGCACAGCTGAGTGAAT	483 bp	Primer3	NM_000625.5
nNOS	TCTCCTCCTACTCTGACTCC/ TTGTGGACATTGGATAGACC	424 bp	1)	NM_000620.1
SELE	AGCCAGAGCCTTCAGTGTA/ CCTTTGGATCCCTCAACA	388 bp	Primer3	NM_000450.1
TLR 2	GTCCAGGAGCTGGAGAACT/ GGAACCTAGGACTTTATCGCA	383 bp	UniSTS	NM_003264.3
TLR 4	TGCGGGTTCTACATCAA/ CCATCCGAAATTATAAGAAAAGTC	413 bp	UniSTS	NM_138554.2
TNF-α	AGCCATGTTGTAGCAAACC/ AGACTCGCAAAGTCGAGAT	403 bp	Primer3	NM_000594.2

1) Modifiziert nach Muscari et al., 2007

2.1.7. Software

Zur Analyse der gemessenen Daten, deren statistischer Auswertung und graphischer Darstellung, sowie zur Verfassung der Dissertationsschrift wurden folgende Programme verwendet:

Adobe Photoshop CS4 Extended 11.0.1

Infinity Capt V14.2

Microsoft Office 2008

N. D. 3.7

PASW Statistics 17

Rotor-Gene RG-6000 1.7

Sigmaplot 10.01

Tecan Magellan Standard 5.01

2.1.8. Bioinformatische Datenbanken

NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>): BLAST, PubMed, UniSTS

Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)

HUSAR (<http://genome.dkfz-heidelberg.de/>)

2.2. Methoden

2.2.1. RNA-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Als Arbeitsmedium dienten mononukleäre Zellen, die im Vorfeld dieser Arbeit von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Sport und Gesundheitsförderung (LSG) mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisierten Vollblutproben gewonnen worden waren. Die Dichtegradientenzentrifugation macht sich die unterschiedliche Dichte der verschiedenen im Blut enthaltenen Zellen zu Nutze und trennt diese nach Zugabe eines Lösungsmittels durch Zentrifugation. Zur Gewinnung von PBMC eignet sich als Medium Ficoll, ein Polysaccharid, das eine größere Dichte hat als die mononukleären Zellen, jedoch eine niedrigere als Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten. Es wird im gleichen Verhältnis zu der heparinisierten Blutprobe gegeben. Durch die Zentrifugation setzen sich Thrombozyten, Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Gefäßes ab. Darüber befindet sich die Ficoll-Phase, das Plasma schwimmt oben auf. Zwischen Ficoll und Plasma befindet sich der sog. Lymphozytenring, der die gewünschten PBMC enthält. Dieser wird abpipettiert und gewaschen.

Der erste Arbeitsschritt der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Tätigkeiten bestand in der RNA-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.

2.2.1.1. Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion ermöglicht die Trennung von RNA, DNA und Proteinen durch deren unterschiedliche Löslichkeit in der zweiphasigen Emulsion aus Phenol und Chloroform. Bei diesem fünfschrittigen Verfahren erfolgt als erstes die Homogenisierung des Zellmaterials durch die Zugabe von TriFastTM, einem Reagenz, das Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung enthält. Guanidinisothiocyanat führt hierbei zur Zellyse und durch seine denaturierenden Eigenschaften auch zur Inaktivierung von RNasen. Durch die anschließende Zugabe von Chloroform kommt es im zweiten Schritt zur Phasenauftrennung, wobei sich Proteine in der organischen, RNA in der wässrigen und DNA größtenteils in der Interphase wiederfinden. Gibt man im nächsten Schritt Isopropanol zur davor abgenommenen wässrigen Phase, präzipitiert die in ihr enthaltene RNA. Diese kann in den Schritten vier und fünf mit Ethanol gewaschen und in RNase-freiem Wasser gelöst werden.

2.2.1.2. Durchführung der Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur RNA-Isolierung wurden alle PBMC einer Probe mit 500 μL PeqGOLD TriFast™ resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Bei Bedarf wurden die Proben bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und wie folgt weiterverarbeitet.

Nach der Zugabe von 100 μL Chloroform pro Probe und kräftigem Schütteln für 15 Sekunden, wurden die Proben für fünf Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur Phasenauftrennung für fünf Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Die wässrige oberste Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zur Präzipitation der RNA mit 250 μL Isopropanol vermischt und kräftig geschüttelt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben weitere zehn Minuten bei 12.000 x g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das hierdurch entstandene Pellet wurde nach Abnehmen des Isopropanolüberstandes zweimal mit 1 mL 75%igem Ethanol durch Vortexen und anschließendes Zentrifugieren (10 Minuten, 12.000 x g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) gewaschen. Nach 15-minütigem Trocknen an der Luft konnte das RNA-Pellet in 20 μL RNase-freiem Wasser gelöst und für fünf Minuten bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert werden.

2.2.2. Quantifizierung, Qualitätskontrolle und Verdünnung der isolierten RNA

Nach der Extraktion der RNA wurden deren Konzentration und Qualität am NanoDrop® ND-1000 bestimmt. Hierfür wurde die Absorption der RNA in einem Probenvolumen von 1,5 μL bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, das Absorptionsspektrum zwischen 220 und 350 nm graphisch dargestellt und die Absorptionsquotienten A260/A280 und A260/A230 berechnet. Diese dienen als Qualitätskontrolle und weisen auf eventuelle Verunreinigungen, sei es durch DNA, Proteine oder auch Phenolrückstände aus der Aufreinigung, hin. Der Absorptionsquotient A260/A230 sollte $>1,5$ sein, der Absorptionsquotient A260/A280 idealerweise zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Die 176 gemessenen Proben befanden sich bis auf drei Ausnahmen in diesem Range. Besagte Ausnahmen bewegten sich in einem Rahmen von 1,79 bis 2,27, was immer noch auf eine gute Reinheit der isolierten RNA schließen lässt. Des Weiteren wurden zufällig ausgewählte Stichproben an den Lehrstuhl für Physiologie des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der TU München übermittelt, um dort eine weitere Qualitätskontrolle mit dem Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) durchführen zu lassen. Mit diesem wurde die RNA *Integrity Number*

(RIN) bestimmt, welche der untersuchten RNA eine Integrität von 1 (komplett degradiert) bis 10 (ohne Degradation) zuweist und auf dem Verhältnis der ribosomalen Untereinheiten 18S und 28S basiert. Alle Proben, bis auf eine, deren RIN wegen zu niedriger RNA Konzentration nicht festgestellt werden konnte, wurden mit RINs zwischen 9,6 und 9,9 charakterisiert, was auf eine hohe Integrität schließen lässt. Die RNA-Proben wurden nach abgeschlossener Qualitätskontrolle nach folgenden Formeln auf eine Konzentration von 15 ng/ μ L eingestellt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert:

$$V_{\text{Probe}} = (c_{\text{gewünscht}} \times V_{\text{gewünscht}}) / c_{\text{Probe}}$$

$$V_{\text{PCR H}_2\text{O}} = 30\mu\text{L} - V_{\text{Probe}}$$

2.2.3. Aufreinigung der RNA mit dem NucleoSpin[®] RNA II Kit

Erste Testläufe mit der isolierten RNA brachten keine verwertbaren Ergebnisse, woraufhin eine weitere Aufreinigung der Proben mittels einer Silica-Membran durchgeführt wurde, um mögliche Heparinreste, die bei der Phenol-Chloroform-Methode zurückbleiben können, zu eliminieren (Glaum et al., 2001). Das Polysaccharid Heparin, ein unspezifischer RNase-Inhibitor, hemmt schon in geringer Konzentration die Aktivität der Reversen Transkriptase bei der *real-time* PCR (RT-PCR) (Willems et al., 1993; Bai et al., 2000; del Prete et al., 2007). Es kann davon ausgegangen werden, dass in den Proben unterschiedliche Heparinkonzentrationen zurückgeblieben waren, weshalb keine verlässlichen Ergebnisse erzielt werden konnten.

Die bereits isolierte und in RNase-freiem Wasser gelöste RNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit dem NucleoSpin[®] RNA Clean-up XS Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Hierfür wurden die Proben in gleichem Verhältnis mit dem Reinigungspuffer (Buffer RCU) gemischt, zwei mal fünf Sekunden gevortext und für eine Sekunde bei 1.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Proben-Buffer-Mix auf die NucleoSpin[®] Säulen geladen, wo die RNA-Bindung an der Silica-Membran unter 30-sekündigem Zentrifugieren bei 11.000 x g erfolgte. Durch zweimaliges Zugabe von 400 μ L des Waschpuffers (Buffer RA3) und anschließendem Zentrifugieren (30 Sekunden bzw. 2 Minuten bei 11.000 x g) wurde die Membran gewaschen. Der letzte Schritt beinhaltete die Lösung der RNA in 15 μ L RNase-freiem Wasser (Zentrifugation für 30 Sekunden bei 11.000 x g).

2.2.4. Semiquantitative *one-step real-time* PCR

2.2.4.1. Prinzip der semiquantitativen *one-step real-time* PCR

Bei der *real-time* PCR handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht vollautomatisch in einem Schritt eine gesuchte DNA-Sequenz zu amplifizieren.

Ihr Prinzip basiert auf dem der 1987 von K. B. Mullis entwickelten Polymerase Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*; PCR). Das Schlüsselenzym dieser Reaktion ist eine thermostabile Polymerase (Taq Polymerase), die zu einer einzelsträngig vorliegenden DNA-Sequenz den komplementären Strang synthetisieren kann. Um den DNA-Doppelstrang aufzutrennen, wird dieser im Reaktionsreagenz auf die Denaturierungstemperatur erhitzt. Für die Synthese der komplementären Stränge benötigt die Taq Polymerase sogenannte Primer, etwa 20 Basenpaare lange Oligonukleotide, die den gesuchten DNA-Abschnitt flankieren, bei der sogenannten Annealingtemperatur an ihre komplementäre Sequenz binden und als Startsequenzen für die Polymerase dienen. Diese baut an die Primer die dem Reaktionsreagenz zugegebenen Nukleotide in 5'-3'-Richtung an (Elongation). So wird durch zyklisches Wiederholen der Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation der gesuchte DNA-Abschnitt, das PCR-Produkt, amplifiziert und kann nach Anfärben mit einem Fluoreszenzfarbstoff und gelelektrophoretischer Auftrennung sichtbar gemacht werden.

Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR erfolgt bei der *real-time* PCR die Quantifizierung der amplifizierten Sequenz bereits während des Laufes. Dies wird dadurch ermöglicht, dass im Reaktionsgemisch ein Fluoreszenzfarbstoff enthalten ist, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert und einen charakteristisch fluoreszierenden Komplex bildet. Im Falle des hier verwendeten QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (200) handelt es sich bei besagtem Farbstoff um SYBR Green I, einem asymmetrischen Cyanin-Farbstoff. Die Fluoreszenzmessungen erfolgen während eines jeden Zyklus bei festgelegten Messtemperaturen. Zur Auswertung der Analyse wird der sogenannte *threshold cycle* (Ct) Wert herangezogen, welcher der Zyklenzahl entspricht, bei der ein vorgegebenes Fluoreszenzniveau erstmals überschritten wird. So lässt sich ein hoher Ct-Wert auf eine geringe Genexpression zurückführen und umgekehrt. Da das Verhältnis der Mengen an RNA, PCR-Produkten und den im Reaktionsgemisch enthaltenen Reagentien weder am Anfang noch am Ende eines PCR-Laufs optimal ist, sondern nur während seiner exponentiellen Phase, ist es wichtig, dass der Ct-Wert während selbiger bestimmt wird.

Aufgrund einer unspezifischen, sprich von der Größe des entstandenen Produktes unabhängigen Bindung des Farbstoffes, hat man im Gegensatz zu einem elektrophoretischen Nachweis mit dieser Methode keine Kontrolle, ob allein die gesuchte Sequenz amplifiziert wurde. Dieses Problem wird dadurch umgangen, dass am Ende eines jeden PCR-Laufs eine Schmelzkurve erstellt wird, die die Fluoreszenzintensität als Funktion der Temperatur darstellt. Ein eindeutiger Peak der Schmelzkurve auf Höhe der spezifischen Schmelztemperatur des gewünschten PCR-Produktes impliziert so ein einziges amplifiziertes PCR-Produkt.

Des Weiteren ermöglicht der QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit den Einsatz von RNA als Probenmaterial, da in einem ersten Schritt, noch vor Beginn des ersten Zyklus, jedoch im selben Reaktionsreagenz, die im Kit enthaltene Reverse Transkriptase *complementary* DNA (cDNA) aus der eingesetzten RNA synthetisiert. Diese Form der RT-PCR wird deshalb als one-step RT-PCR bezeichnet.

2.2.4.2. Durchführung der *real-time* PCR

Zur Durchführung der RT-PCR wurde der QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (200) verwendet. Dieser enthält 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix (HotStarTaq[®] DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green RT-PCR Buffer, dNTP Mix, SYBR Green I, ROX (Referenzfarbstoff), 5 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂)) und QuantiTect RT Mix (Omniscript[®] Reverse Transkriptase für RNA-Mengen über und Sensiscript[®] für RNA-Mengen unter 50 ng).

Für jede Probe wurde in einem 0,1 mL STRIP Tube ein Gesamtvolumen von 10 µL angesetzt, welches sich aus 9 µL eines Mastermixes (vgl. Tabelle 10) und 1 µL der zu untersuchenden Probe zusammensetzte. Dies entspricht einem Einsatz von 15 ng RNA pro untersuchter Probe pro Lauf.

Das Temperaturprofil für die PCR-Läufe ist Tabelle 11 zu entnehmen, wobei für die jeweiligen Primer sowohl die Annealingtemperatur als auch die Temperatur des dritten und des optionalen vierten Messpunktes spezifisch festgelegt wurde. Diese sind gesondert in Tabelle 12 aufgeführt, wie auch die Temperatur des Messpunktes, dessen Ct-Wert zur Analyse herangezogen wurde. Letzterer wurde abhängig von der Schmelztemperatur des PCR-Produktes (T_m) gewählt. Der *threshold* wurde für jeden Lauf bei 0,03 festgelegt. Als Negativkontrolle diente PCR-H₂O, außerdem wurde bei Genen, die erwartungsgemäß nicht im untersuchten Gewebe exprimiert wurden, die entsprechende Referenz-RNA als Positivkontrolle eingesetzt. Hierbei handelte es sich im Konkreten um die Gene Selectin E

(SELE), DDAH 1 (Universal Human Reference RNA) und nNOS (Brain, Human, Total RNA).

Tab. 10: Zusammensetzung des Mastermixes eines RT-PCR-Laufs

Reagenz	Konzentration der Stocklösung	Volumen/Reaktion	Konzentration der Arbeitslösung
2x QuantiTect RT-PCR Master Mix	2x	5 µL	1x
Forward-Primer	20 pmol/µL	0,4 µL	0,8 pmol/µL
Reverse-Primer	20 pmol/µL	0,4 µL	0,8 pmol/µL
QuantiTect RT Mix		0,1 µL	
PCR-H ₂ O		3,1 µL	

Tab. 11: Temperaturprofil der PCR-Läufe

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl	Kommentar
Reverse Transkription	30 min	50 °C	1	cDNA-Synthese, Taq Polymerase inaktiv
Initiierung der PCR	15 min	95 °C	1	Taq Polymerase aktiv, Reverse Transkriptase inaktiv
Denaturierung	15 sec	94 °C	40	Denaturierung der cDNA
Annealing	30 sec	x °C		Anlagerung der Primer Ct-Wert-Messung
Elongation	30 sec	72 °C		Synthese der komplementären Stränge
Fluoreszenzmessung	15 sec	x °C		Ct-Wert-Messung
Fluoreszenzmessung	15 sec	x °C		Ct-Wert-Messung (optional)
Denaturierung	30 sec	95 °C		1

Tab. 12: Annealingtemperaturen und Temperaturen der Messzeitpunkte der einzelnen Primer

Zielgen des Primers	Annealing-temperatur [°C]	Temperatur 3. Messpunkt [°C]	Temperatur 4. Messpunkt [°C] (optional)	Temperatur des zur Analyse verwendeten Messpunktes [°C]
β-Aktin	62	80	-	80
CRP	62	80	-	80
DDAH 1	62	80	88,5	80
DDAH 2	64	80	83,5	83,5
eNOS	62	80	82	82
GAPDH	60	80	-	80
IL-10	62	80	-	80
IL-1B	62	80	-	80
IL-2	62	75	-	75
IL-6	62	78	-	78
CXCR1	62	80	-	80
CXCR2	62	80	-	80
iNOS	62	80	82,7	82,7
nNOS	62	80	-	80
SELE	62	80	-	80
TLR 2	62	80	-	72
TLR 4	62	80	-	72
TNF-α	62	80	83	83

2.2.5. Design und Auswahl der Primer

Primer wurden, sofern sie nicht schon am Lehrstuhl vorhanden und etabliert waren (β -Aktin, Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH), IL-2, IL-6, IL-10, TFN- α) von der UniSTS Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>) übernommen (CXCR1, TLR 2, TLR 4), von Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) oder HUSAR (<http://genome.dkfz-heidelberg.de/>) kreiert (DDAH 1, eNOS, IL-1B, CXCR2, iNOS, SELE), als modifizierter Literaturprimer verwendet (nNOS) oder manuell designt (CRP, DDAH 2). In letzterem Fall wurden die Primer auf Basis der von der UniSTS Homepage entnommenen genetischen Information nach folgenden Kriterien gelegt:

- Primerlänge: 20 bp \pm 2 bp
- Ähnliche Schmelztemperaturen T_m von Forward- und Reverse-Primer ($\Delta T_m \leq 1$ °C)
- Überhang von 3 bp am Exonende (Ausschluss der Amplifikation von genomischer DNA)
- Ausschluss der Bildung von Primer-Dimeren
- Möglichst ausgeglichenes Verhältnis aller vier Nukleotide

Nachdem die Spezifität der Primer über BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sichergestellt worden war, wurden sämtliche Primer von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) in einer Konzentration von 200 pmol/ μ L hergestellt und als Stocklösung (20 pmol/ μ L) bei -20 °C gelagert.

2.2.6. Testen der Primer

Mittels Gradienten-PCR und Gelelektrophorese wurde die ideale Annealingtemperatur ermittelt, sowie die Größe und Spezifität der entstandenen PCR-Produkte verifiziert.

2.2.6.1. Gradienten-PCR

Das Prinzip der PCR ist dem Punkt 2.2.4.1 zu entnehmen.

Zur Durchführung der Gradienten-PCR wurden cDNA Pools aus von früheren Studien vorhandenen Proben erstellt, die bezüglich Gewebeart und Konzentration mit dem zu untersuchenden Probenmaterial vergleichbar waren. Als Negativkontrolle diente auch hier PCR-H₂O. Der Temperaturgradient wurde so gewählt, dass die Annealingtemperaturen bei 55 °C, 57 °C, 60 °C, 62,5 °C und 65 °C lagen. In 0,5 mL Reaktionsgefäßen wurde ein Gesamtvolumen von 25 µL angesetzt, das sich aus 2,5 µL der jeweiligen cDNA-Probe (bzw. PCR-H₂O für die Negativkontrollen) und 22,5 µL eines Mastermixes ergab. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist Tabelle 14 zu entnehmen.

Das Temperaturprofil des Gradienten-PCR Programms zeigt Tabelle 13:

Tab. 13: Temperaturprofil der Gradienten-PCRs

Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
2 min	94 °C	1
45 sec	94 °C	40
45 sec	x °C	
150 sec	72 °C	
3 min	72 °C	1
∞	4 °C	

Tab. 14: Zusammensetzung des Mastermixes der Gradienten-PCR

Reagenz	Konzentration der Stocklösung	Volumen/Reaktion	Konzentration der Arbeitslösung
Reaction Buffer M	10x	2,5 µL	1x
MgCl ₂	25 mmol/L	2,5 µL	2,5 mmol/L
dNTPs	10 mmol/L	1 µL	0,4 mmol/L
Forward-Primer	20 pmol/µL	1 µL	0,8 pmol/µL
Reverse-Primer	20 pmol/µL	1 µL	0,8 pmol/µL
Taq Polymerase	5 U/µL	0,1 µL	0,02 U/µL
PCR-H ₂ O		14,4 µL	

2.2.6.2. Agarosegelelektrophorese

2.2.6.2.1. Prinzip der Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Man macht sich die negative Ladung der DNA zu Nutze, um diese in einem elektrischen Feld, das in einem Agarosegel angelegt wird, zur Anode wandern zu lassen. Dabei ist die Geschwindigkeit, mit der diese Moleküle wandern, direkt proportional zum Logarithmus ihrer Größe. Das heißt, je kleiner ein Molekül ist, desto schneller und auch weiter wandert es im Gel. Fügt man dem Gel beim Gießen Ethidiumbromid (EtBr) hinzu, so kann man das Ergebnis unter UV-Licht sichtbar machen. EtBr ist ein roter Phenanthridin Farbstoff, der mit Nukleinsäuren interkaliert und dabei sein Absorptionsspektrum verändert. Die veränderte Fluoreszenz von an die DNA gebundenem EtBr gegenüber freiem EtBr im Gel, lässt die im Gel gewanderten DNA-Moleküle im UV-Licht als hellere Banden leuchten.

2.2.6.2.2. Durchführung der Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde 1,5% Agarosegel angefertigt. Hierfür wurden 1,5 mg Agarose und 100 mL 1x Tris-Acetat EDTA Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, 3,5 µL EtBr hinzugegeben und in einen Gelhalter gegossen. Bei RT erfolgte die Polymerisierung des Gels. Anschließend wurden 5 µL der Proben zu jeweils 2 µL 6x Loading Solution Dye pipettiert, vermischt und in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard wurden 6 µL der Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus der Firma Fermentas bzw. der 100 bp DNA Ladder von Bioscience oder gegebenenfalls einer 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs) verwendet. Die Banden wurden bei einer angelegten Spannung von 70V und einer Laufzeit von 60-75 Minuten aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte unter der UV-Licht Kamera.

2.2.7. Messung der Gesamtstickoxide im Serum

2.2.7.1. Prinzip des *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay*

Das Prinzip von kolorimetrischen Verfahren beruht auf dem Beer'schen Gesetz, das besagt, dass der Lichtabsorptionskoeffizient einer farbigen Lösung proportional der Konzentration der im farblosen Lösemittel gelösten Substanz ist. Da die gesuchte Substanz oft selbst kein Licht absorbiert, werden Indikatorstoffe verwendet, die proportional zur

Konzentration der gesuchten Substanz farbige Komponenten produzieren. Da der photometrisch gemessene Wert der optischen Dichte noch keinen Aufschluss über die tatsächliche Konzentration gibt, müssen zusätzlich Standards mitgemessen werden. Anhand der Standardkurve können die gesuchten Konzentrationen berechnet werden.

Mit dem Cayman's *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay* kann sowohl die Konzentration von Nitrit, als auch die der Gesamtstickoxide in Serumproben nachgewiesen werden und durch Subtraktion beider Werte näherungsweise auch die Konzentration von Nitrat ermittelt werden. Um das in den Proben enthaltene Nitrit sichtbar zu machen, wird Griess Reagenz verwendet, welches Nitrit in eine tief rosa Azoverbindung überführt, die ihr Absorptionsmaximum bei 540 nm hat und photometrisch quantifiziert werden kann.

Für die Bestimmung der Nitratkonzentration muss dieses zuerst mit Hilfe des Enzyms Nitrat Reduktase komplett in Nitrit umgewandelt werden. Die so entstandene Nitritmenge, welche der Menge der Gesamtstickoxide der Probe entspricht, wird wiederum mittels Griess Reagenz sichtbar gemacht und am Photometer gemessen.

2.2.7.2. Ultrazentrifugation

Um die Serumproben für die Messung mit dem *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay* vorzubereiten, mussten diese vorerst durch Ultrazentrifugation von Teilen >10 kDa, wie z. B. Hämoglobin, befreit werden. Hierfür wurden die Filtrationseinheiten 500, PES-Membran, 10 kDa der Firma Vivaspin verwendet.

Für den ersten Schritt des *pre-rinsing* der Membranen wurden 300 µL destilliertes Wasser auf die Membranen geladen und nach kurzem Zentrifugieren sowohl Konzentrat als auch Filtrat verworfen. Auf die immer noch angefeuchteten Filtrationseinheiten wurden nun 450 µL der jeweiligen Serumprobe geladen und diese für 30 Minuten bei 2500 x g zentrifugiert. Das so erhaltene Filtrat wurde zur weiteren Analyse verwendet.

2.2.7.3. Durchführung des Assay

Es wurden für alle Proben sowohl die Nitritkonzentration als auch, nach Umwandlung allen vorhandenen Nitrats zu Nitrit, die Konzentration der Gesamtstickoxide bestimmt. Die Reagenzien wurden nach den Angaben des Herstellers vorbereitet, eine Reihe von acht Standardlösungen in ansteigender Konzentration (0 µM bis 35 µM) erstellt und die *Wells* für die jeweiligen Proben entsprechend Tabelle 15 befüllt.

Tab. 15: Pipettieranleitung des Cayman *Colorimetric Assay*

NO_x	Standard	Proben	Negativkontrolle
	80 µL der entsprechenden Standardlösung	40 µL der entsprechenden Ultrafiltratprobe	200 µL Assay Buffer
	10 µL Enzyme Cofactor mixture	60 µL Assay Buffer	
	10 µL Nitrate Reductase mixture	10 µL Enzyme Cofactor mixture	
		10 µL Nitrate Reductase mixture	
Nitrit	Standard	Proben	Negativkontrolle
	100 µL der entsprechenden Standardlösung	40 µL der entsprechenden Ultrafiltratprobe	200 µL Assay Buffer
		60 µL Assay Buffer	

In die *Wells* wurden, für die Gesamtstickoxidbestimmung nach dreistündiger Inkubation bei RT, für die Nitritbestimmung sofort, erst 50 µL des Griess Reagent R1, danach 50 µL des Griess Reagent R2, zugegeben. Nach Inkubation für weitere 10 Minuten bei RT wurde die Absorption bei 540 nm am Plattenphotometer gemessen.

2.2.8. Statistische Analyse

2.2.8.1. Daten aus dem *Colorimetric Assay*

Jede Probe wurde doppelt gemessen und der Mittelwert beider Messdaten gebildet. So ergab sich aus dem Mittelwert der Negativkontrollen der Leerwert, der von jeder der anderen Probe subtrahiert wurde und aus den Mittelwerten der jeweiligen Standardlösungen die Standardkurve. Die Konzentrationen der Stickoxide ergaben sich gemäß folgender Gleichungen:

$$c_{\text{NO}_x} = [(A_{540} - y\text{-Wert}) / \text{Steigung}] \times [200 \mu\text{L} / V_{\text{Probe}}] \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{M}]$$

$$c_{\text{NO}_2^-} = [(A_{540} - y\text{-Wert}) / \text{Steigung}] \times [200 \mu\text{L} / V_{\text{Probe}}] \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{M}]$$

$$c_{\text{NO}_3^-} = c_{\text{NO}_x} - c_{\text{NO}_2^-}$$

2.2.8.2. Daten aus der *real-time* PCR

Aufgrund der hohen Anzahl der zu untersuchenden Proben mussten für jedes Gen drei bzw. vier PCR-Läufe durchgeführt werden. Um die Varianz zwischen den einzelnen Läufen auszugleichen, wurde in jedem Lauf ein Kalibrator im Sinne eines externen Standards als Doppelbestimmung mitgemessen, der sich aus einem PBMC-RNA-Pool aus von einer anderen Studie vorhandenen Proben zusammensetzte. Dieser Kalibrator wurde in den Verdünnungsstufen 40 ng/μL, 20 ng/μL, 10 ng/μL und 5 ng/μL eingesetzt und die Ct-Werte der untersuchten Proben mittels der Ct-Werte der 20 ng/μL-Verdünnung nach folgender Formel modifiziert:

$$Ct_{\text{kalibriert}} = Ct_{\text{Rohwert}} + (Ct_{\text{Kal_MW}} - Ct_{\text{Kal_Lauf}})$$

$Ct_{\text{Kal_MW}}$ = Mittelwert der Kalibrator-Ct-Werte aller Läufe für einen Marker

$Ct_{\text{Kal_Lauf}}$ = Mittelwert der Kalibrator-Ct-Werte eines Laufes

Als interner Standard wurde das *housekeeping* Gen (HKG) β -Aktin verwendet. HKGs sind konstitutiv exprimierte Gene, das heißt sie werden unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und Wachstumsbedingungen dauerhaft exprimiert. Normalisiert man den Ct-Wert einer gemessenen Probe für ein bestimmtes Gen mit dem korrespondierenden Ct-Wert des HKGs, setzt also ihre Expressionsniveaus in Relation zueinander, können Fehler in der Datenauswertung, die durch Schwankungen in den Konzentrationen der Proben vorhanden sein können, minimiert werden. Die Formel zur Normalisierung lautet:

$$Ct_{\text{normalisiert}} = Ct_{\text{kalibriert}} + (Ct_{\text{MW_HKG}} - Ct_{\text{HKG}})$$

$Ct_{\text{MW_HKG}}$ = Mittelwert der HKG-Ct-Werte aller gemessenen Proben

Ct_{HKG} = HKG-Ct-Wert einer Probe

Die durch diese Vorgänge korrigierten Werte wurden zur statistischen Analyse herangezogen.

2.2.8.3. Statistische Auswertung

Sämtliche Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Programm SigmaPlot 10.01 anhand des Verfahrens nach Pearson (Pearson Product Moment Correlation). Ebenfalls mit diesem Programm wurden mittels *Two way* ANOVA die Gruppen- und Zeiteffekte der Expressionswerte der HKGs und der Menge an extrahierter RNA bestimmt. Zur statistischen Signifikanzprüfung der Expressionswerte der untersuchten Gene sowie der Serumkonzentration von NO_x wurde das Programm PASW[®] Statistics 17 verwendet. Alle Graphen wurden mit PASW[®] Statistics 17 erstellt und mit Adobe[®] Photoshop[®] CS4 Extended 11.0.1 bearbeitet und vervollständigt.

Bei allen Daten wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung angegeben. Des Weiteren wurden der Median, der maximale und der minimale Wert sowie die 25%- und die 75%-Perzentile bestimmt.

Diverse Proben hatten aufgrund eines zu geringen Genexpressionsniveaus nach den vorgegebenen 40 PCR-Zyklen den Fluoreszenzschwellenwert nicht überschritten und somit keinen zuordenbaren Ct-Wert erhalten. Bei diesen wurde nachträglich, zur Ermöglichung der Einbeziehung in die statistische Auswertung, der Ct-Wert 40, im Sinne des maximal zu erreichenden Ct-Wertes, festgelegt. Um durch das häufige Erscheinen des gleichen Wertes die Varianz der Daten nicht künstlich herabzusetzen, wurden zusätzlich alle so definierten Werte mit einem Zufallsfehler zwischen 0,010 und 0,020 versehen, so dass sich für die fehlenden Messwerte generierte Werte zwischen 39,990 und 40,010 ergaben.

Die Signifikanzprüfung erfolgte wegen nicht normalverteilter Daten mittels nicht-parametrischer Tests. Für den Gruppeneffekt wurde der Kruskal-Wallis-Test für nicht verbundene, für den Zeiteffekt der Friedman-Test für verbundene Stichproben verwendet.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bzw. den Zeitpunkten bezüglich eines gemessenen Parameters wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% lag ($p < 0,05$). Falls dieses Signifikanzniveau erreicht wurde, wurden zusätzlich die einzelnen Zeitpunkte paarweise mit dem Wilcoxon-Test verglichen. Da dieses Vorgehen der Nachtestung zu einer Alphafehlerkumulierung führt, wurde zur Alphafehleradjustierung anschließend das Signifikanzniveau der Nachtests nach der Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert.

Die Bonferroni-Holm-Prozedur stellt die Weiterentwicklung der Bonferroni-Methode dar, bei der sich das lokale Signifikanzniveau α' aus dem Quotienten des globalen Alphafehlers α und der Anzahl k der Nachtests berechnet:

$$\alpha' = \alpha/k$$

Dies führt dazu, dass ein Ergebnis einen sehr geringen p-Wert aufweisen muss, um als statistisch signifikant zu gelten. Die Bonferroni-Holm-Prozedur versucht durch ein schrittweises Vorgehen dieses Problem zu umgehen. Es werden alle p-Werte der k Nachtests der Größe nach geordnet und für die erste Analyse der kleinste herangezogen. Ist dieser nach der Bonferroni-Methode signifikant, gilt dieses Testproblem als erledigt, es bleiben $k-1$ Testprobleme zu analysieren. Wird nun der zweitkleinste p-Wert betrachtet, geht man deshalb davon aus, dass für diesen der globale Alphafehler lediglich um $k-1$ korrigiert werden muss. Gilt nach dieser Korrektur auch der zweitkleinste p-Wert als signifikant, wird mit dem drittkleinsten p-Wert fortgefahren und dieser mit einem lokalen Signifikanzniveau verglichen, das sich aus dem Quotienten des globalen Alphafehlers und der Differenz aus Nachtestanzahl und drei berechnet. Gemäß dieser Vorgehensweise wird solange fortgefahren, bis ein berechneter p-Wert über dem korrigierten Signifikanzniveau liegt. Dann wird das Verfahren abgebrochen und alle weiteren p-Werte werden, ohne sie betrachtet zu haben, als nicht signifikant eingestuft (Bühner, Ziegler, 2009).

Da im konkreten Fall je sechs Nachtests durchgeführt wurden und ein globales Signifikanzniveau von 5% festgelegt worden war, berechneten sich die lokalen Alphafehler wie folgt:

$$\alpha_1 = 0,05/ 6$$

$$\alpha_2 = 0,05/ 5$$

$$\alpha_3 = 0,05/ 4$$

$$\alpha_4 = 0,05/ 3$$

$$\alpha_5 = 0,05/ 2$$

$$\alpha_6 = 0,05$$

3. Ergebnisse

3.1. Gehalt an Gesamt-RNA

Die untersuchten Proben hatten nach der RNA-Extraktion mittels der Phenol-Chloroform-Methode einen mittleren Gesamt-RNA-Gehalt von $350,230 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 219,067 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Durch die Aufreinigung mit den NucleoSpin[®] Säulen, wurde dieser Wert auf $201,516 \pm 110,249 \text{ ng}/\mu\text{L}$ reduziert. Dies entspricht einem Verlust von 42,46%.

Die Unterschiede der mRNA-Konzentrationen zwischen Visite 1 ($196,365 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 111,761 \text{ ng}/\mu\text{L}$), Visite 2 ($189,142 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 91,372 \text{ ng}/\mu\text{L}$), Visite 3 ($213,389 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 120,563 \text{ ng}/\mu\text{L}$) und Visite 4 ($207,588 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 117,694 \text{ ng}/\mu\text{L}$) zeigten keine signifikanten Unterschiede ($p\text{-Wert} = 0,732$). Gleiches gilt für die Betrachtung der Einzelgruppen, sowohl über alle Zeitpunkte gemittelt (A: $228,475 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 132,156 \text{ ng}/\mu\text{L}$; F: $179,159 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 87,977 \text{ ng}/\mu\text{L}$; L: $200,237 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 105,343 \text{ ng}/\mu\text{L}$), als auch bei Auswertung der einzelnen Visiten (Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD) s. Tab. 16). Interessanterweise kam es allein in der Gruppe der (Prä-)Adipösen zu einer – wenn auch nicht signifikanten – Reduktion der Konzentration an Gesamt-RNA nach zehnwöchigem Ausdauertraining. Tendenziell ist außerdem ein Anstieg des mRNA-Gehalts nach Marathonlauf bezüglich der Vormessung in allen drei Gruppen festzustellen, wobei dieser in der Gruppe der (Prä-)Adipösen am ausgeprägtesten und bei den Leistungssportlern am wenigsten deutlich zu sein scheint. Insgesamt hatte die im Rahmen dieser Studie von Weber festgestellte belastungsinduzierte Leukozytose (Weber, 2008) jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Menge an aus PBMC isolierter mRNA.

Tab 16: mRNA-Konzentration in PBMC in Abhängigkeit von Gruppe und Messzeitpunkt

Visite	Gruppe	MW [$\text{ng}/\mu\text{L}$]	SD [$\text{ng}/\mu\text{L}$]
1	(Prä-)Adipöse	249,258	146,685
	Freizeitsportler	156,671	71,401
	Leistungssportler	188,837	94,352
2	(Prä-)Adipöse	183,970	76,910
	Freizeitsportler	172,297	90,272
	Leistungssportler	211,939	105,391
3	(Prä-)Adipöse	221,990	141,883
	Freizeitsportler	207,754	109,449
	Leistungssportler	211,945	120,199
4	(Prä-)Adipöse	258,218	151,461
	Freizeitsportler	179,965	75,376
	Leistungssportler	188,553	107,590

3.2. Genexpression

3.2.1. *Housekeeping* Gene

Für den internen Standard wurden als Referenzgene β -Aktin und GAPDH ausgewählt und deren Expression gemessen. Die Ct-Werte von β -Aktin ($18,646 \pm 1,001$) und GAPDH ($16,240 \pm 0,914$) zeigten lediglich eine mittlere positive Korrelation bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,604 und einem p-Wert von $<0,001$. Der daraus resultierende Verdacht darauf, dass zumindest eines der beiden Gene trotz seiner Funktion als *Housekeeping* Gen reguliert sein könnte, wurde durch *Two Way* ANOVAs, die Gruppen- und Zeiteffekte aufzeigen sollten, erhärtet. Für beide Gene wurde mit diesem Verfahren getestet, ob Unterschiede in der Genexpression eventuellen Regelmäßigkeiten wie Gruppen- oder Zeiteffekten unterlagen. Hier zeigte sich für das *Housekeeping* Gen GAPDH ein Zeiteffekt bezüglich der Visiten 2 vs. 3 und 3 vs. 4. Da die Expressionswerte von β -Aktin keine Abhängigkeiten bezüglich der getesteten Parameter aufwiesen, wurde dieses als Referenzgen zur Normalisierung aller weiterer Ct-Werte herangezogen.

3.2.2. Klassische Inflammationsmarker

Die Genexpression von IL-6, TNF- α und CRP als klassische Indikatoren einer Inflammationsreaktion war gemessen worden, um zu zeigen, inwiefern die sportliche Intervention zu Veränderungen auf RNA-Ebene geführt hatte und ob diese mit den vom PRS gemessenen Änderungen der Serumwerte korrelieren.

Interleukin 6 - Genexpression

Nach der Phase des Ausdauertrainings kam es zu einem Anstieg der Ct-Werte von $27,527 \pm 2,438$ auf $27,807 \pm 1,260$. Dies entspricht einer Reduktion der IL-6-Expression um 18%. Der Marathonlauf hingegen führte zu einem Abfall der Ct-Werte auf $26,722 \pm 0,938$, also zu einer signifikanten Expressionssteigerung auf das 2,1-fache bezüglich des vorangegangenen Messzeitpunktes bzw. auf das 1,7-fache bezüglich der Basismessung. Bei der Messung einen Tag nach dem Marathon (Ct-Wert $27,853 \pm 2,585$) konnte bereits wieder ein signifikanter Abfall der Genexpression von IL-6 um 54% im Vergleich zur Vortagesmessung festgestellt werden (Abb. 1 a).

Betrachtete man alle drei Gruppen gesondert, konnten in der Gruppe der (Prä-)Adipösen keinerlei signifikante Unterschiede festgestellt werden. Sowohl bei den Freizeit- als auch bei den Leistungssportlern war ein signifikanter 2,1-facher Anstieg der IL-6-Expression durch den Marathonlauf festzustellen (F: Abfall der Ct-Werte von $27,931 \pm 1,234$ auf $26,831 \pm 0,838$; L: Abfall der Ct-Werte von $27,352 \pm 1,226$ auf $26,304 \pm 1,079$). Obwohl es in allen Gruppen zu rückläufigen Werten der IL-6-Expression nach 24 Stunden kam, ist allein die 62%ige Reduktion in der Gruppe der Leistungssportler (Ct-Wert $27,693 \pm 1,093$) als signifikant einzustufen (Abb. 1 b).

Das Expressionsniveau von IL-6 unterschied sich zu keinem Messzeitpunkt signifikant zwischen den einzelnen Gruppen.

Abbildung 1: IL-6 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * p<0,05, **p<0,01, *p<0,001.**

Abb. 1 a)

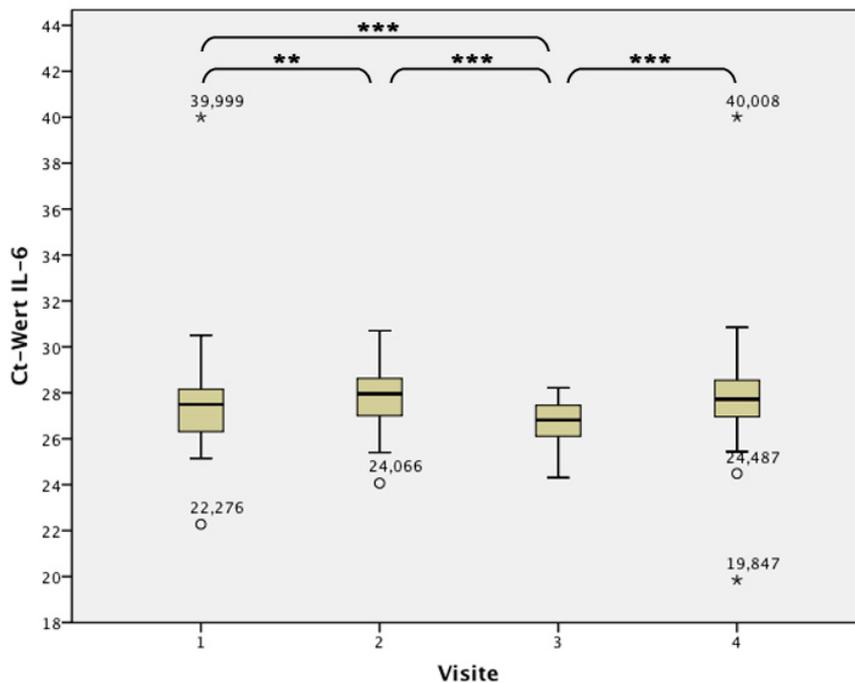
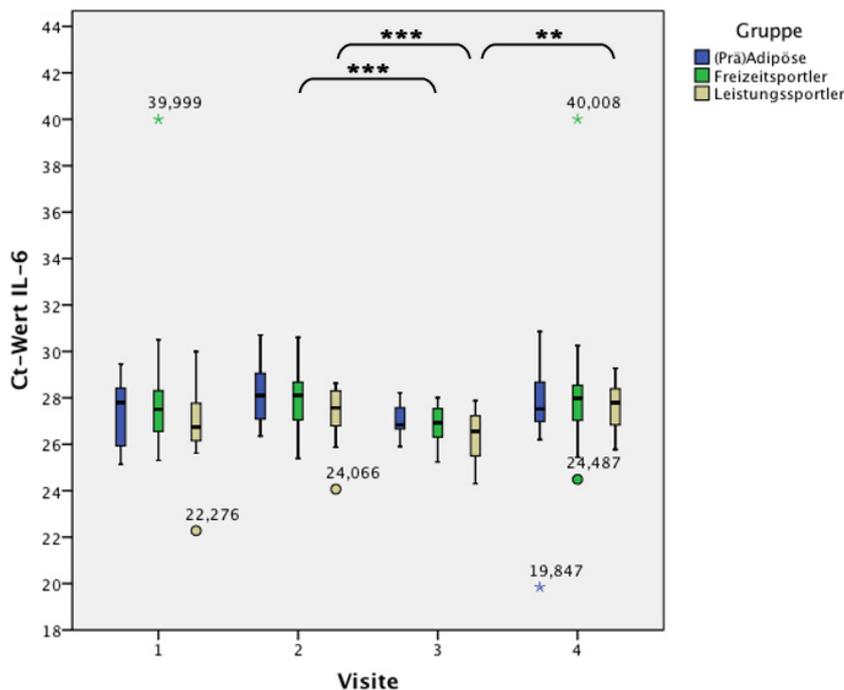


Abb. 1 b)



Interleukin 6 - Serumkonzentration

Die im Serum im Rahmen der Gesamtstudie vom PRS gemessenen IL-6-Konzentrationen wurden lediglich in der Gruppe der Leistungssportler maßgeblich durch das zehnwöchige Ausdauertraining beeinflusst. Es kam zu einer Reduktion der Konzentration um 24%. Durch den Marathonlauf kam es im Gesamtkollektiv zu einem 11,7-fachen (A: 8,8-fachen; F: 17,6-fachen; L: 19,2-fachen) Anstieg von zirkulierendem IL-6 bezüglich der Startmessung bzw. einem 10,8-fachen (A: 7,5-fachen; F: 17,3-fachen; L: 25,3-fachen) Anstieg bezüglich der Messung der Vorwoche. Nach 24 Stunden war bereits wieder ein 76%iger (A: 70%iger; F: 75%iger; L: 83%iger) Abfall der Konzentrationen zu verzeichnen. Die Werte lagen jedoch noch signifikant über denen vor Marathonlauf (2,8-facher (A: 2,6-facher; F: 4,4-facher; L: 3,2-facher) Wert bezüglich der Ausgangsmessung bzw. 2,6-facher (A: 2,2-facher; F: 4,3-facher; L: 4,2-facher) Wert bezüglich der Messung nach der Trainingsphase).

Unabhängig vom Messzeitpunkt lagen die Serumkonzentrationen für IL-6 bei den Leistungssportlern signifikant unter den Werten der (Prä-)Adipösen. Die Werte der Freizeitsportler wiederum lagen im Mittel zwischen denen der (Prä-)Adipösen und der Leistungssportler, in der statistischen Auswertung konnte hierfür jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden. Wurden die einzelnen Messzeitpunkte gesondert betrachtet, war dieser Gruppeneffekt nur bei den Visiten zwei und vier signifikant.

Alle Konzentrationswerte sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tab. 17: MW \pm SD der Serumkonzentrationswerte von IL-6. Signifikanzen bei $p < 0,05$: ^a Visite 1 vs. Visite 2. ^b Visite 1 vs. Visite 3. ^c Visite 1 vs. Visite 4. ^d Visite 2 vs. Visite 3. ^e Visite 2 vs. Visite 4. ^f Visite 3 vs. Visite 4. * Gruppe A vs. Gruppe L.

Gruppe	Serumkonzentration von IL-6 [pg/mL]			
	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	1,127 \pm 1,448 ^{bc}	1,216 \pm 1,762 ^{de}	13,145 \pm 0,431 ^{bdf}	3,162 \pm 1,964 ^{cef}
(Prä-)Adipöse	1,515 \pm 1,554 ^{bc}	1,770 \pm 1,472 ^{de} *	13,267 \pm 0,331 ^{bdf}	3,921 \pm 2,036 ^{cef} *
Freizeitsportler	0,751 \pm 0,444 ^{bc}	0,765 \pm 0,490 ^{de}	13,239 \pm 0,386 ^{bdf}	3,267 \pm 1,917 ^{cef}
Leistungssportler	0,676 \pm 0,555 ^{abc}	0,512 \pm 0,483 ^{ade} *	12,964 \pm 0,510 ^{bdf}	2,175 \pm 1,426 ^{cef} *

Tumornekrosefaktor α - Genexpression

Im Gesamtkollektiv kam es durch die Trainingsphase zu einer signifikanten Reduktion der Expressionswerte von TNF- α um 50%. Die zum dritten Messzeitpunkt ermittelten Werte zeigten einen weiteren signifikanten Abfall um 30% bezüglich der Messung eine Woche vor Marathonlauf bzw. auf ein Drittel des Basiswertes. Bei der Messung 24 Stunden nach Beendigung des Marathonlaufs war eine Steigerung der TNF-Expression auf das 1,7-fache bezüglich der Vortagesmessung zu verzeichnen. Dieser Wert war um 34% und damit signifikant niedriger als der Basiswert (Tab. 18; Abb. 2 a).

Während ein Abfall der Expressionswerte durch zehnwöchiges Ausdauertraining in allen Gruppen nachgewiesen werden konnte (A: 49%ige, F: 50%ige, L: 53%ige Reduktion), zeigte sich in keiner der Einzelgruppen ein signifikanter Unterschied der Werte zwischen zweiter und dritter Visite. Die Messwerte letzterer unterschieden sich wiederum in allen Gruppen signifikant vom Basiswert (A: 43% des Basiswertes; F: 34% des Basiswertes; L: 29% des Basiswertes). Der im Gesamtkollektiv gemessene Anstieg der Expression einen Tag nach der Extrembelastung, konnte in den Einzelgruppen nur unter den Freizeitsportlern verifiziert werden (1,6-facher Anstieg). Während bei den normalgewichtigen Sportlern die TNF-Expression am letzten Messtag noch signifikant niedriger war als zu Beginn der Studie (F: 46%; L: 51%), war der Unterschied zwischen erstem und viertem Messwert in der Gruppe der (Prä-)Adipösen nicht groß genug, um einen Zufall ausschließen zu können (Abb. 2 b).

Das Expressionsniveau von TNF- α unterschied sich zu keinem Messzeitpunkt signifikant zwischen den einzelnen Gruppen. Es fällt jedoch auf, dass mit steigendem Leistungsniveau die Expressionswerte von TNF- α durch das Ausdauertraining stärker gesunken sind.

Die Ct-Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Tab. 18: MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von TNF- α .

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	21,789 \pm 0,681	22,812 \pm 0,545	23,322 \pm 0,924	22,597 \pm 0,717
(Prä-)Adipöse	21,764 \pm 0,825	22,746 \pm 0,562	22,984 \pm 0,579	22,280 \pm 0,939
Freizeitsportler	21,865 \pm 0,698	22,863 \pm 0,577	23,411 \pm 0,968	22,745 \pm 0,591
Leistungssportler	21,725 \pm 0,527	22,819 \pm 0,525	23,520 \pm 1,084	22,757 \pm 0,492

Abbildung 2: TNF- α mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

Abb. 2 a)

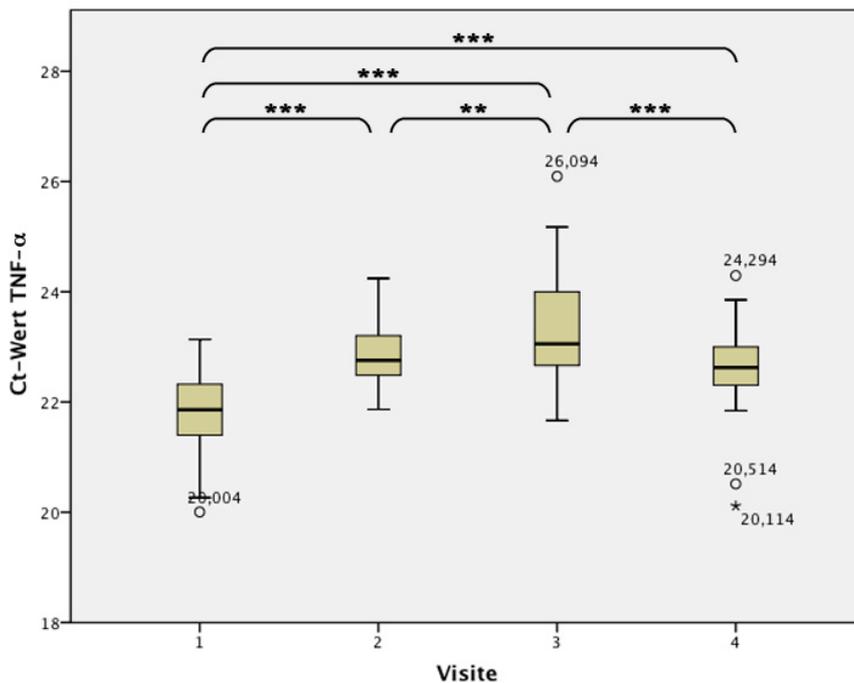
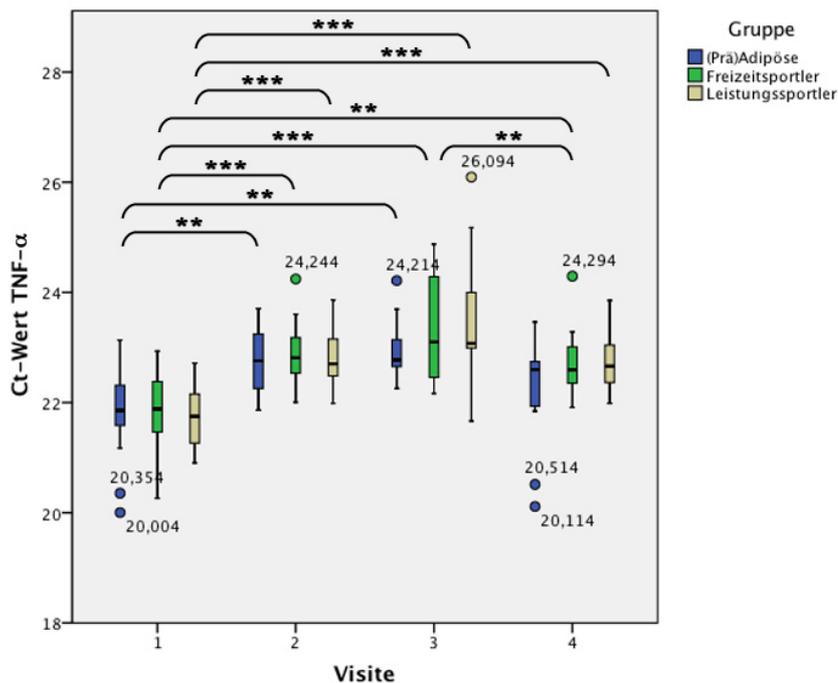


Abb. 2 b)



Tumornekrosefaktor α - Serumkonzentration

Durch das aerobe Ausdauertraining kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der Serumkonzentration von TNF- α , der seinen niedrigsten Punkt bei der Messung unmittelbar nach Marathonlauf erreicht hatte. Während sich jedoch die Serumkonzentrationen von TNF- α zu den ersten drei Messzeitpunkten nicht signifikant voneinander unterschieden, kam es einen Tag nach Marathonlauf zu einem signifikanten Anstieg auf das 9,5-fache der Werte der Vormessung, das 5,8-fache bezüglich Visite 2 und das 1,9-fache bezüglich der Werte der Ausgangsmessung.

In der Gruppe der (Prä-)Adipösen erwies sich der Werteanstieg 24 Stunden nach Ende des Wettkampfes lediglich als signifikant gegenüber der Messung unmittelbar nach Marathonlauf (5,8-facher Anstieg). Bei den normalgewichtigen Sportlern waren die Werte der Abschlussmessung sowohl gegenüber der Vortagesmessung signifikant erhöht (F: 24,2-facher Wert; L: 20,5-facher Wert), als auch gegenüber der Messung nach der zehnwöchigen Trainingsphase (F: 11,9-facher Anstieg; L: 1842-facher Anstieg).

Zu keinem der Messzeitpunkte unterschieden sich die Messwerte der einzelnen Gruppen signifikant voneinander. Es ist jedoch auffällig, dass es bei den normalgewichtigen Sportlern im Vergleich zu den übergewichtigen zu einem stärkeren Anstieg der systemischen TNF- α -Werte am Tag nach Marathonlauf kam. Dies ist auf einen stärkeren Werteabfall durch die Trainingsphase zurückzuführen.

Die zugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen der TNF- α -Konzentration sind Tabelle 19 zu entnehmen.

Tab. 19: MW \pm SD der Serumkonzentrationswerte von TNF- α . Signifikanzen bei $p < 0,05$: ^a Visite 1 vs. Visite 4. ^b Visite 2 vs. Visite 4. ^c Visite 3 vs. Visite 4.

Gruppe	Serumkonzentration von TNF- α [pg/mL]			
	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	1,967 \pm 4,605 ^a	0,643 \pm 1,853 ^b	0,389 \pm 0,918 ^c	3,711 \pm 2,164 ^{abc}
(Prä-)Adipöse	1,737 \pm 3,178	1,197 \pm 2,404	0,663 \pm 1,218 ^c	3,839 \pm 2,443 ^c
Freizeitsportler	2,417 \pm 6,617	0,282 \pm 1,092 ^b	0,138 \pm 0,465 ^c	3,346 \pm 1,748 ^{bc}
Leistungssportler	2,267 \pm 4,951	0,002 \pm 0,009 ^b	0,180 \pm 0,461 ^c	3,684 \pm 2,075 ^{bc}

C-reaktives Protein - Genexpression

Die Messungen der Genexpression von CRP zeigten weder bezüglich der Messzeitpunkte noch der Gruppenzugehörigkeit der Teilnehmer signifikante Unterschiede (Abb. 3 a; Abb. 3 b). Die gemessenen Ct-Werte unterlagen insgesamt einer großen Streubreite. Zusätzlich gab es einen nicht vernachlässigbaren Anteil an Proben, deren Expressionswerte unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Die Tatsache, dass für diese Proben Ct-Werte von $40 \pm$ Zufallsfehler festgelegt wurden (s. 2.2.8.3) trug zu einer weiteren Erhöhung der ohnehin gewaltigen Streubreite bei. Es ließen sich bei Betrachtung der einzelnen Ct-Werte keine interindividuellen Unterschiede bezüglich der Höhe der Genexpression feststellen. Jedoch zeigte sich, dass nach dem Trainingsprogramm die Anzahl der Proben, die Werte unterhalb der Nachweisgrenze aufwiesen, in den Gruppen der (Prä-)Adipösen und Leistungssportler abgesunken war, während sie bei den Freizeitsportlern angestiegen war. 24 Stunden nach Marathonende gab es tendenziell die meisten Proben mit messbarer CRP-Expression (Tab. 20).

Tab. 20: Anzahl der Proben mit CRP-Werten unterhalb der Nachweisgrenze. In Klammern ihr prozentualer Anteil an der jeweiligen Fallzahl.

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	11 (25%)	9 (20%)	10 (22,72%)	6 (13,95%)
(Prä-)Adipöse	5 (35,71%)	2 (14,29%)	2 (15,38%)	2 (14,29%)
Freizeitsportler	1 (6,25%)	3 (18,75%)	5 (31,25%)	2 (13,33%)
Leistungssportler	5 (35,71%)	4 (26,67%)	3 (20%)	2 (14,29%)

Abbildung 3: CRP mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abb. 3 a)

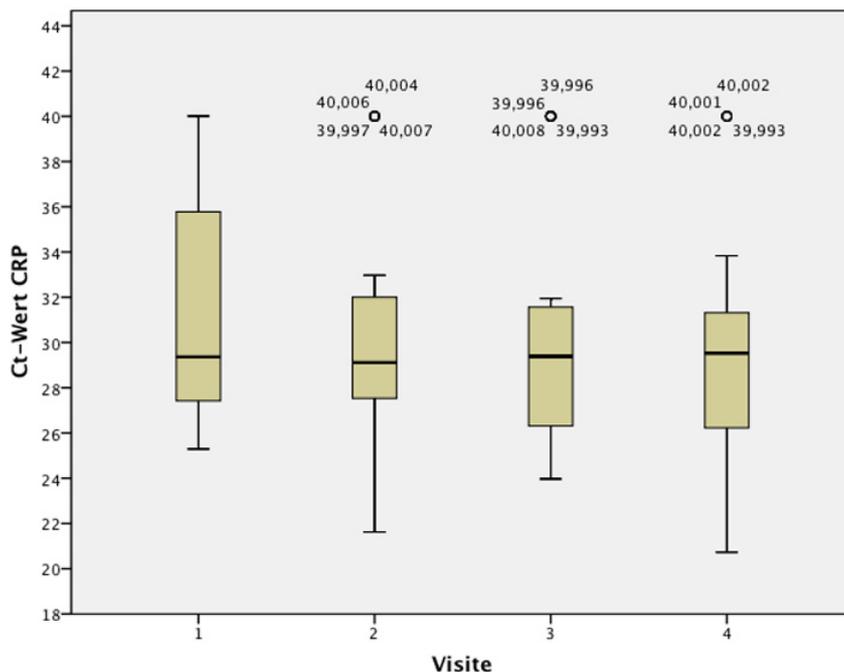
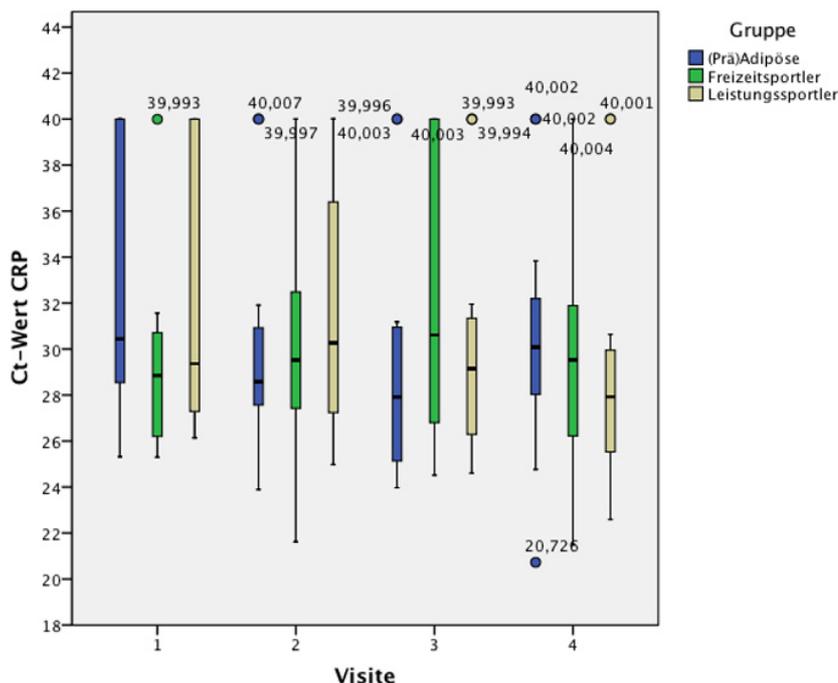


Abb. 3 b)



C-reaktives Protein - Serumkonzentration

Das Ausdauertraining zog keine signifikanten Änderungen der systemischen CRP-Spiegel nach sich. Auch bei der Messung unmittelbar nach dem Marathonlauf waren keine signifikanten Veränderungen ermittelt worden. Dahingegen war am Tag nach der Extrembelastung ein signifikanter Anstieg der Serumkonzentration von CRP zu verzeichnen. So lagen die Werte der Abschlussmessung 6-fach (A: 6,2-fach; F: 7,7-fach; L: 4,3-fach) über denen der Ausgangsmessung, 6,3-fach (A: 9,4-fach; F: 6,2-fach; L: 3,9-fach) über den Werten nach der Trainingsphase und 7,5-fach (A: 10,2-fach; F: 7,8-fach; L: 4,7-fach) über den Werten unmittelbar nach Wettkampfe.

Während zu den ersten drei Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der drei Einzelgruppen festgestellt werden konnten, lagen zur vierten Visite die Messwerte in der Gruppe der Leistungssportler signifikant unter denen der anderen beiden Gruppen. Interessant ist zudem, dass es allein in der Untergruppe der (Prä-)Adipösen zu einem, wenn auch nicht signifikanten, Abfall der systemischen Werte an CRP durch das Training gekommen war.

Die gemessenen Konzentrationen sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tab. 21: MW \pm SD der Serumkonzentrationswerte von CRP. Signifikanzen bei $p < 0,05$: ^a Visite 1 vs. Visite 4. ^b Visite 2 vs. Visite 4. ^c Visite 3 vs. Visite 4. * Gruppe A vs. Gruppe L. ° Gruppe F vs. Gruppe L.

Gruppe	Serumkonzentration von CRP [mg/dL]			
	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	0,256 \pm 0,267 ^a	0,242 \pm 0,101 ^b	0,205 \pm 0,035 ^c	1,529 \pm 0,862 ^{abc}
(Prä-)Adipöse	0,356 \pm 0,450 ^a	0,234 \pm 0,099 ^b	0,216 \pm 0,061 ^c	2,210 \pm 0,951 ^{abc *}
Freizeitsportler	0,201 \pm 0,110 ^a	0,252 \pm 0,136 ^b	0,200 \pm 0,000 ^c	1,557 \pm 0,651 ^{abc °}
Leistungssportler	0,221 \pm 0,905 ^a	0,239 \pm 0,055 ^b	0,200 \pm 0,000 ^c	0,940 \pm 0,437 ^{abc *°}

3.2.3. Genexpression weiterer proinflammatorischer Zytokine

Interleukin 1 β

Bei Betrachtung der Genexpression von IL-1B zeigten sich im Gesamtkollektiv bei der Basismessung signifikant höhere Ct-Werte (Ct-Wert $21,924 \pm 1,126$) als zum zweiten (Ct-Wert $22,982 \pm 0,892$; 52), dritten (Ct-Wert $23,051 \pm 1,166$) und vierten Messzeitpunkt (Ct-Wert $22,708 \pm 1,143$). Dies entspricht einem Expressionsabfall von 52% bzw. 54% respektive 42%. Die niedrigsten Expressionswerte wurden im Mittel bei der Messung unmittelbar nach dem Marathonlauf ermittelt, am Folgetag lagen die Werte tendenziell auf einem höheren Niveau, wenn auch statistisch nicht signifikant (Abb. 4 a).

Während sich in den einzelnen Gruppen Basismesswert und Messwert direkt nach dem Marathon sowohl bei den (Prä-)Adipösen (Ct-Werte $22,011 \pm 1,282$ bzw. $23,223 \pm 1,283$, entspricht 0,4-facher Expression), als auch bei den Freizeitsportlern (Ct-Werte $21,977 \pm 0,954$ bzw. $23,235 \pm 1,287$; 0,4-fache Expression) und den Leistungssportlern (Ct-Werte $21,777 \pm 1,211$ bzw. $22,706 \pm 0,894$; 0,5-fache Genexpression) signifikant unterschieden, konnte die im Gesamtkollektiv festgestellte signifikante Reduktion der IL-1B-Expression nach zehnwöchigem Ausdauertraining nur bei den Teilnehmern aus den Gruppen F (Ct-Wert $22,893 \pm 1,114$; 47%iger Abfall) und L (Ct-Wert $23,054 \pm 0,916$; 59%iger Abfall) bestätigt werden, nicht jedoch in der Gruppe der (Prä-)Adipösen (Ct-Wert $23,006 \pm 0,580$).

Wie auch im Gesamtkollektiv kam es in den Einzelgruppen zu einem Anstieg der Expressionswerte 24 Stunden nach Beendigung des Laufes, der jedoch keine statistische Signifikanz aufwies. In den Gruppen der (Prä-)Adipösen (Ct-Wert $22,384 \pm 1,408$) sowie der Leistungssportler (Ct-Wert $22,681 \pm 0,841$) jedoch hatten die Messwerte zu Visite 4 ein Niveau erreicht, das sich im Gegensatz zum Gesamtkollektiv (s. oben) und der Gruppe der Freizeitsportler (Ct-Wert $23,037 \pm 1,095$; entspricht 48% des Expressionswerts von Visite 1) nicht mehr signifikant vom Ausgangswert unterschied.

Die Werte der einzelnen Gruppen wichen zu keinem der Messzeitpunkte signifikant voneinander ab. Dennoch ist festzustellen, dass das zehnwöchige Ausdauertraining nur bei den normalgewichtigen Sportlern zu einem signifikanten Abfall der IL-1B-Expression führte und hier bei den Leistungssportlern zu einer höheren Reduktion im Vergleich zu den Freizeitsportlern (Abb. 4 b).

Abbildung 4: IL-1B mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abb. 4 a)

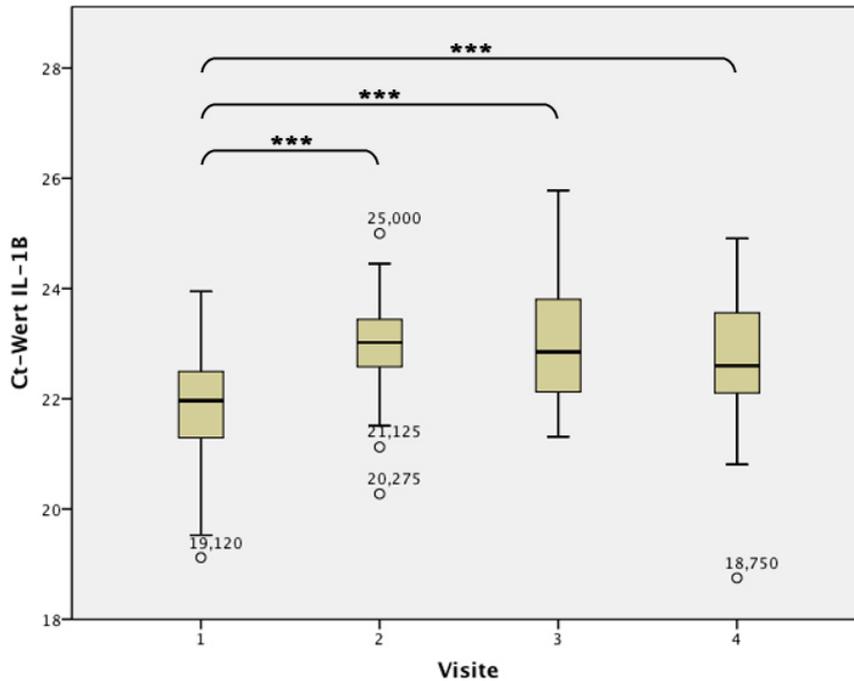
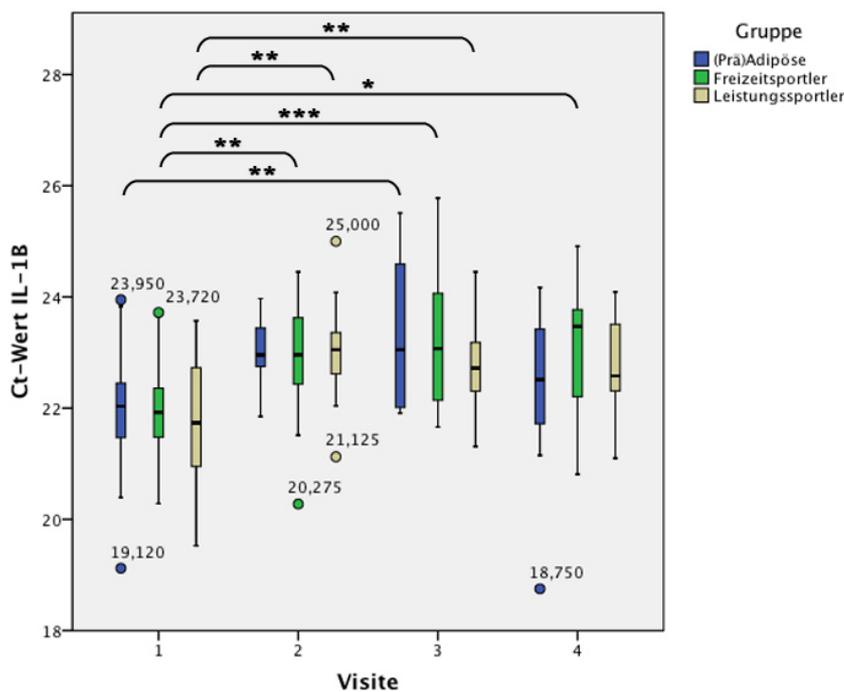


Abb. 4 b)



Interleukin 2

Bei den Messwerten der Genexpression von IL-2 konnten weder signifikante Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten noch bezüglich der Gruppenzugehörigkeit festgestellt werden (Abb. 5 a; Abb. 5 b). Ein großer Anteil der Proben wies so geringe mRNA-Mengen auf, dass nach 40 PCR-Zyklen die amplifizierte Menge unterhalb der Nachweisgrenze blieb. Für diese Proben wurde ein Ct-Wert von $40 \pm$ Zufallsfehler definiert (s. 2.2.8.3). Wie auch bei CRP lag bei IL-2 insgesamt die Streubreite relativ hoch. Jedoch konnten hier durchaus interindividuelle Unterschiede bezüglich des Expressionsniveaus von IL-2 festgestellt werden. Vor allem Läufer aus der Gruppe der Leistungssportler hatten auffallend häufig Expressionswerte unterhalb der Nachweisgrenze. Durch das Ausdauertraining kam es zu einer Abnahme der Proben unterhalb des Detektionslimits, wiederum waren die Leistungssportler am stärksten betroffen. Direkt nach Marathonlauf konnte eine kleine Zunahme, 24 Stunden später wieder ein kleiner Rücklauf solcher Proben festgestellt werden (Tab. 22).

Tab. 22: Anzahl der Proben mit IL-2-Werten unterhalb der Nachweisgrenze. In Klammern ihr prozentualer Anteil an der jeweiligen Fallzahl.

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	15 (34,09%)	12 (26,67%)	15 (34,09%)	12 (27,91%)
(Prä-)Adipöse	4 (28,57%)	5 (35,71%)	5 (38,46%)	4 (28,57%)
Freizeitsportler	4 (25%)	3 (18,75%)	4 (25%)	3 (20%)
Leistungssportler	7 (50%)	4 (26,67%)	6 (40%)	5 (35,71%)

Abbildung 5: IL-2 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * p<0,05, **p<0,01, *p<0,001.**

Abb. 5 a)

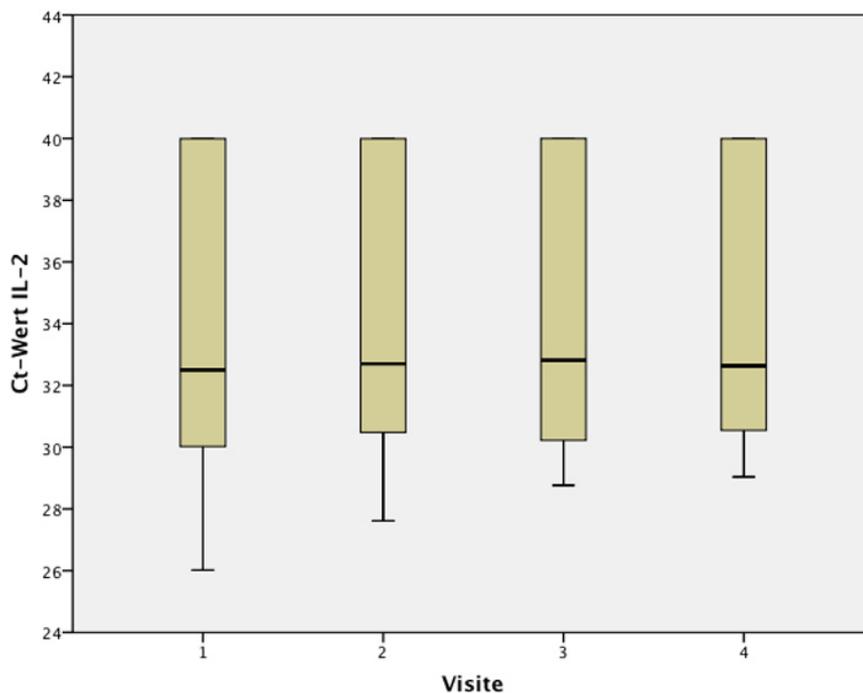
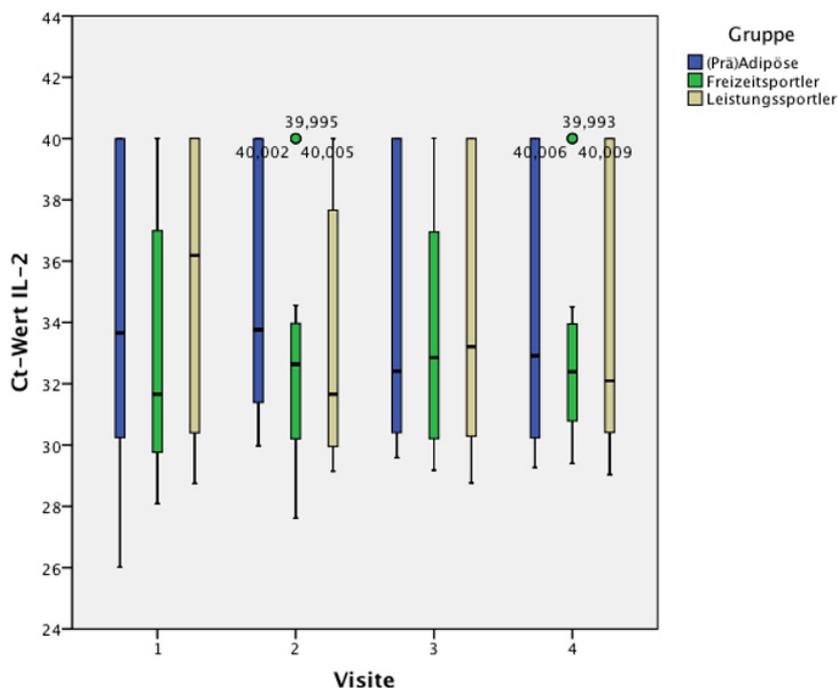


Abb. 5 b)



3.2.4. Antiinflammatorische Zytokine

Der Einfluss von aerobem Ausdauersport sowie der Extremlastung eines Marathonlaufs auf die Genexpression antiinflammatorischer Zytokine sollte anhand des Verlaufs der IL-10-Expression gezeigt werden.

Nach zehnwöchigem Ausdauertraining sank die Menge an IL-10-mRNA signifikant um 61%. Durch den Marathonlauf hingegen kam es zu einem Ansteigen auf einen 28,7-fachen Wert bezüglich der Vormessung bzw. einen 11,1-fachen Wert bezüglich der Ausgangsmessung. Nach 24 Stunden waren bereits wieder rückläufige Werte (Abfall um 90%) zu verzeichnen, so dass ein Niveau erreicht war, das sich weder signifikant von der Basismessung, noch von der Messung nach der Trainingsphase unterschied (Abb. 6 a).

Wurden die Werte nach Gruppenzugehörigkeit getrennt betrachtet, konnte der Abfall der IL-10-Expressionswerte durch das Ausdauertraining nicht mehr mit statistischer Signifikanz belegt werden. Der Anstieg nach dem Marathonlauf war jedoch in allen drei Einzelgruppen sowohl gegenüber der Vormessung als auch der Startmessung signifikant. So kam es in der Gruppe der (Prä-)Adipösen zu einem 9,8-fachen (8,7-fachen bezüglich Visite 1), bei den Freizeitsportlern zu einem 21,1-fachen (18,2-fachen) und bei den Leistungssportlern zu einem 108,2-fachen (7,9-fachen) Anstieg. Ebenso war in allen drei Gruppen ein signifikanter Werteabfall nach 24 Stunden zu sehen (A: 89%; F: 93%; L: 84%).

Auch für diesen Inflammationsmarker waren zu keinem Messzeitpunkt signifikante Gruppeneffekte feststellbar. Der enorme Anstieg der Genexpression nach Marathonlauf in der Gruppe der Leistungssportler ist auf im Vergleich zu den anderen Gruppen extrem niedrige Expressionswerte nach der Trainingsphase zurückzuführen. Diese Messwertdifferenzen konnten jedoch mit keiner statistischen Signifikanz belegt werden (Abb. 6 b). Die Ct-Mittelwerte samt Standardabweichung sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Bei der Messung von IL-10 fielen außerdem einige Proben auf, deren mRNA-Menge unterhalb der Nachweisgrenze lag. Diese wurden, wie oben beschrieben auf einen Ct-Wert von $40 \pm$ Zufallsfehler gesetzt. Wenngleich diese Werte in der statistischen Auswertung nur als Ausreißer auftauchen, liefert die Betrachtung der Anteile an Proben mit geringer Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten in den einzelnen Gruppen interessante Ergebnisse. Zu Beginn der Studie lieferten die Leistungssportler deutlich weniger Proben mit nicht nachweisbarer IL-10-Expression. Während es durch das Training zu einem Anstieg dieser Proben in der Gruppe der Leistungssportler kam, kam es in den anderen

beiden Gruppen zu einem Abfall. In allen Gruppen fiel die Anzahl an Proben mit Expression unterhalb der Detektionsgrenze unmittelbar nach Marathonlauf auf 0 ab. Bereits einen Tag nach Zieleinlauf waren wieder Proben mit nicht messbarer IL-10-mRNA zu verzeichnen (Tab. 24).

Tab. 23: MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von IL-10.

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	30,004 \pm 4,143	31,377 \pm 4,497	26,532 \pm 0,920	29,802 \pm 3,858
(Prä-)Adipöse	29,791 \pm 4,495	29,960 \pm 2,980	26,663 \pm 0,858	29,832 \pm 4,391
Freizeitsportler	30,585 \pm 4,713	30,796 \pm 3,888	26,397 \pm 0,915	30,316 \pm 4,079
Leistungssportler	29,552 \pm 3,201	33,320 \pm 5,716	26,563 \pm 1,017	29,222 \pm 3,196

Tab. 24: Anzahl der Proben mit IL-10-Werten unterhalb der Nachweisgrenze. In Klammern ihr prozentualer Anteil an der jeweiligen Fallzahl.

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	6 (13,64%)	9 (20%)	0 (0%)	5 (11,63%)
(Prä-)Adipöse	2 (14,29%)	1 (7,14%)	0 (0%)	2 (14,29%)
Freizeitsportler	3 (18,75%)	2 (12,5%)	0 (0%)	2 (13,33%)
Leistungssportler	1 (7,14%)	6 (40%)	0 (0%)	1 (7,14%)

Abbildung 6: IL-10 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Abb. 6 a)

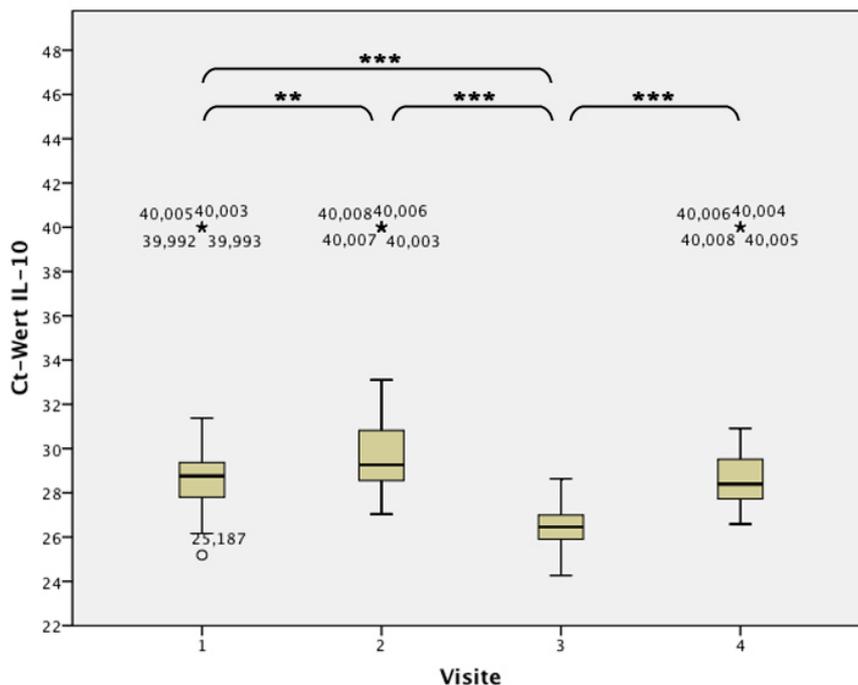
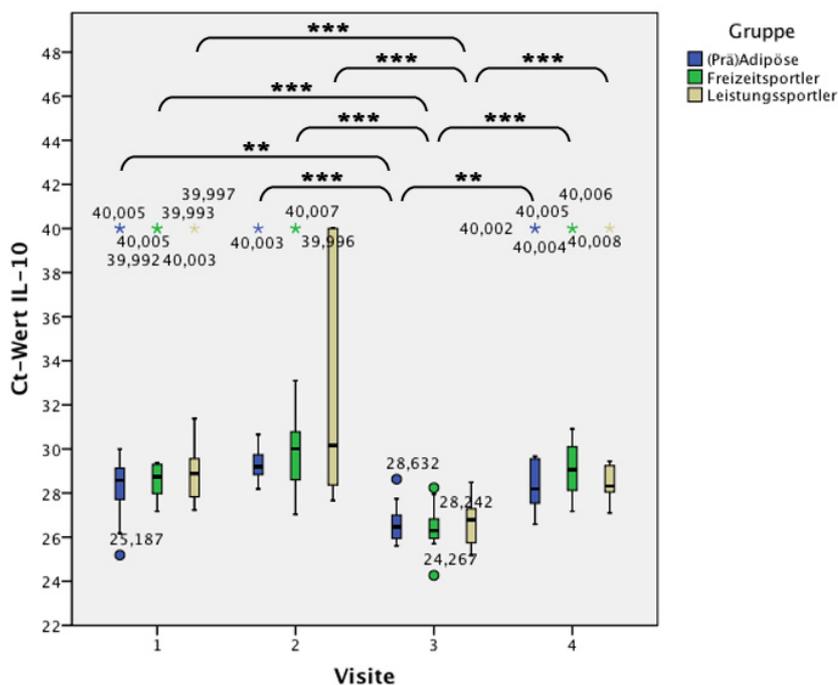


Abb. 6 b)



3.2.5. Chemokinrezeptoren

Interleukin 8-Rezeptor α (CXCR1)

Das aerobe Ausdauertraining führte bei den Teilnehmern zu einem signifikanten Anstieg der Ct-Werte von $24,327 \pm 1,365$ auf $24,823 \pm 1,160$, was einer Reduktion der Genexpression auf das 0,7-fache entspricht. Die gemessenen Werte nach dem Marathonlauf (Ct-Wert $23,665 \pm 1,003$) zeigten sowohl gegenüber dem Ausgangswert als auch gegenüber dem Messwert nach Absolvieren des Trainings signifikante Unterschiede, die eine Steigerung der Genexpression um 123% zur Vormessung bzw. 58% zum Basiswert widerspiegeln. Die Messwerte am auf den Marathon folgenden Tag (Ct-Wert $24,421 \pm 1,536$) waren im Vergleich zu denen vom Vortag signifikant erhöht, es ließ sich eine Senkung der Genexpression um 41% errechnen (Abb. 7 a).

Außer einer signifikanten 2,3-fachen Steigerung der CXCR1-Expression von vor (Ct-Wert $24,738 \pm 0,933$) auf nach (Ct-Wert $23,528 \pm 0,773$) dem Marathonlauf in der Gruppe der Leistungssportler, konnte bei der Auswertung in den Einzelgruppen kein signifikanter Einfluss des Messzeitpunktes auf die Messwerte festgestellt werden.

Die einzelnen Gruppen unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander, es ist jedoch zu vermerken, dass die (Prä-)Adipösen zu jedem Messzeitpunkt das niedrigste Expressionsniveau von CXCR1 hatten, die Leistungssportler tendenziell das höchste (Abb. 7 b).

Interleukin 8-Rezeptor β (CXCR2)

Das zehnwöchige Ausdauertraining führte zu keiner signifikanten Änderung der CXCR2-Expression. Durch den Marathonlauf jedoch kam es zu einem 1,6-fachen Expressionsanstieg (Ct-Wert Visite 2: $24,231 \pm 0,922$; Ct-Wert Visite 3: $23,514 \pm 0,868$). Auch die Expressionswerte 24 Stunden nach Marathonlauf (Ct-Wert $23,653 \pm 1,300$) lagen noch signifikant über denen von Visite 2 (49%). Wurden die Einzelgruppen gesondert betrachtet, konnten fast keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden. Lediglich in der Gruppe A kam es durch den Marathonlauf zu einem 2,0-fachen Anstieg der Genexpression von CXCR2 (Ct-Werte von $24,387 \pm 0,843$ auf $23,358 \pm 1,142$) (Abb. 8 a; Abb. 8 b).

Zwischen den Gruppen unterschied sich das Expressionsniveau zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Abbildung 7: CXCR1 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abb. 7 a)

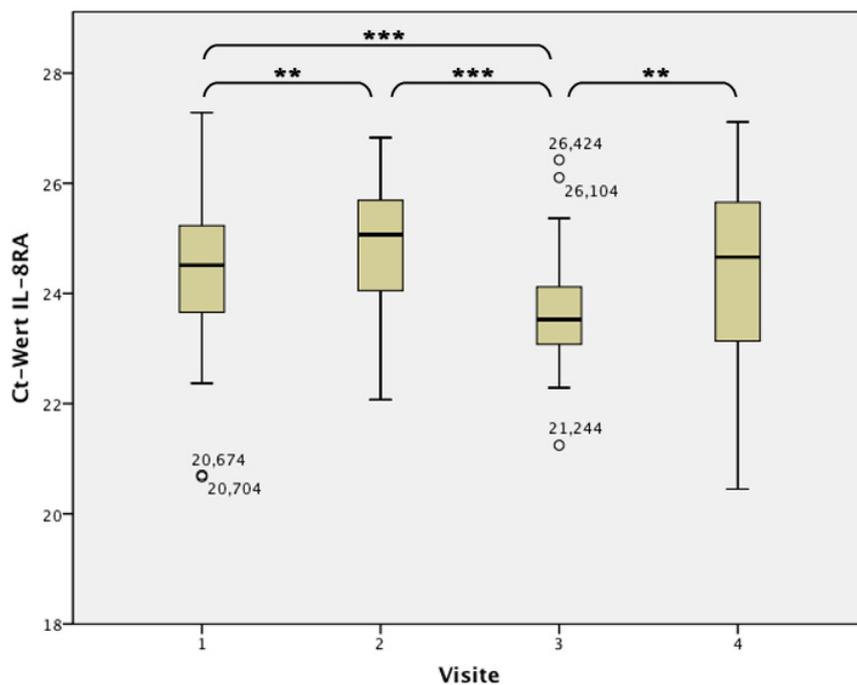


Abb. 7 b)

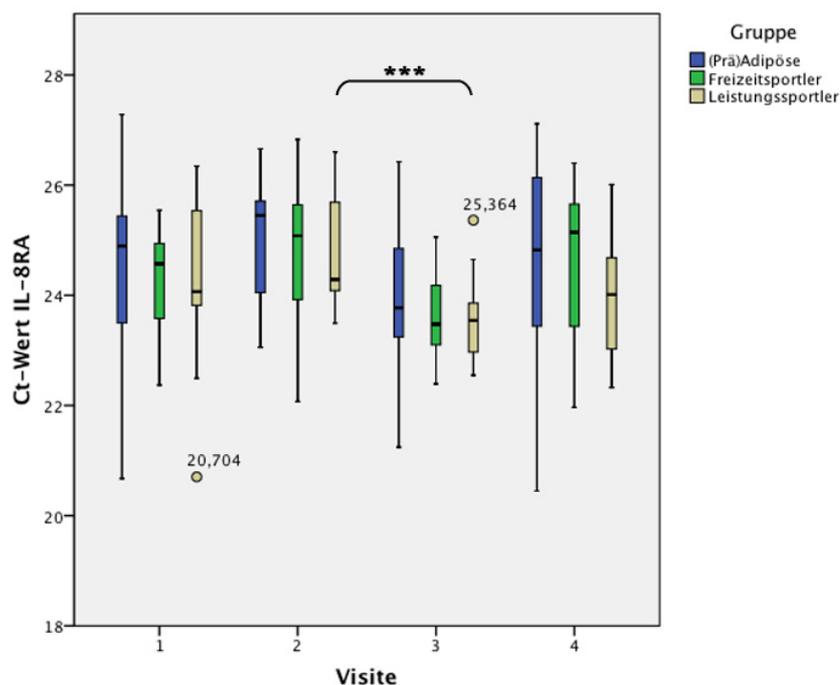


Abbildung 8: CXCR2 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abb. 8 a)

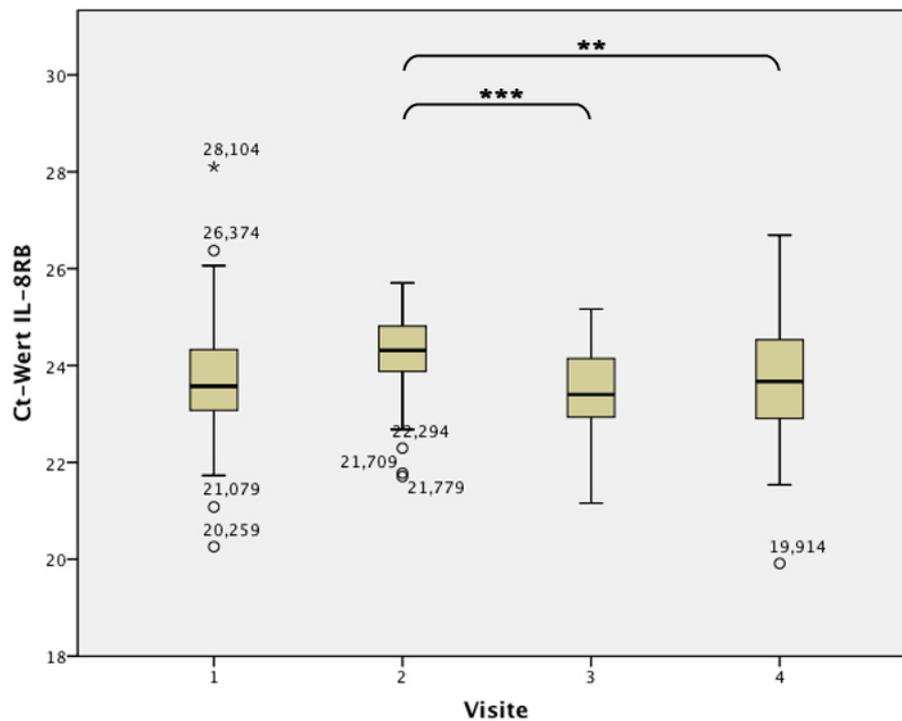
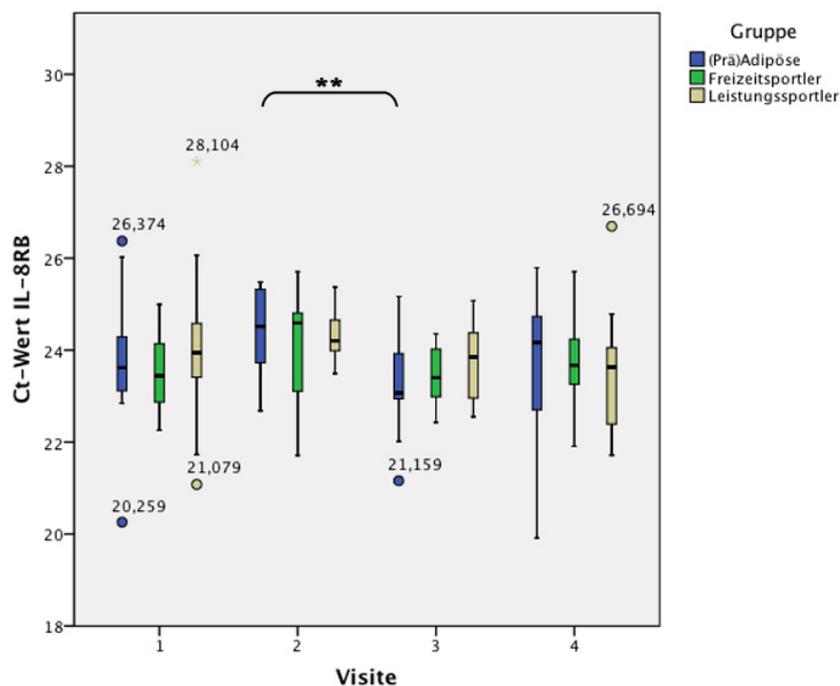


Abb. 8 b)



3.2.6. Toll-like Rezeptoren

Die Genexpression von TLR 2 und TLR 4 vor und nach Intervention wurde repräsentativ für die *Toll-like* Rezeptor-Familie, welche in den letzten Jahren an Bedeutung als Inflammationsmarker gewonnen hat, gemessen.

Toll-like Rezeptor 2

Nach der Phase des aeroben Trainings war eine signifikant erniedrigte TLR 2-Expression (61% des Basismesswertes) zu verzeichnen. Ein signifikanter Anstieg im Expressionsprofil konnte nach der Extrembelastung durch den Langstreckenlauf festgestellt werden. Der gemessene Wert lag 2,3-fach höher als bei der Vormessung und 1,8-fach höher als zu Beginn der Studie. Bei der Messung am Tag nach dem Wettkampf war bereits wieder ein signifikanter Rückgang der Werte um 58% zu verzeichnen. Dennoch hatten die Messwerte erst 79% des Wertes vor Marathonlauf erreicht und wiesen somit einen signifikanten Unterschied auf (Abb. 9 a).

In allen Untergruppen kam es nach der Trainingsphase zu einem Expressionsabfall, jedoch ohne statistische Signifikanz. Der stärkste Abfall war bei der Gruppe der (Prä-)Adipösen zu verzeichnen. Durch den Marathonlauf erhöhte sich die TLR 2-Expression in der Gruppe A auf das 2,8-fache, in der Gruppe F auf das 3,3-fache und in der Gruppe L auf das 2,8-fache. Lediglich die Freizeitsportler hatten Ausgangswerte, die mit 45% bezogen auf die Messung nach Marathonlauf signifikant unter dieser lagen. 24 Stunden nach Beendigung des Wettkampfes waren die Werte in allen Einzelgruppen signifikant abgefallen, bei den (Prä-)Adipösen um 58%, den Freizeitsportlern um 63% und den Leistungssportlern um 50%. In keiner der drei Gruppen unterschieden sich die Werte der Endmessung signifikant von den Messungen vor dem Marathonlauf.

Die Unterschiede zwischen den Messwerten der drei Gruppen waren zu keinem Zeitpunkt groß genug, um statistische Signifikanz aufzuweisen (Abb. 9 b).

Alle relevanten Messwerte sind als MW \pm SD in Tabelle 25 aufgeführt.

Tab. 25: MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von TLR 2.

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	17,706 \pm 1,094	18,416 \pm 0,937	16,833 \pm 0,782	18,073 \pm 0,870
(Prä-)Adipöse	17,675 \pm 1,465	18,508 \pm 0,504	17,002 \pm 0,958	18,267 \pm 0,973
Freizeitsportler	17,835 \pm 0,766	18,402 \pm 1,132	16,677 \pm 0,647	18,105 \pm 0,742
Leistungssportler	17,590 \pm 1,051	18,346 \pm 1,066	16,853 \pm 0,768	17,848 \pm 0,899

Abbildung 9: TLR 2 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abb. 9 a)

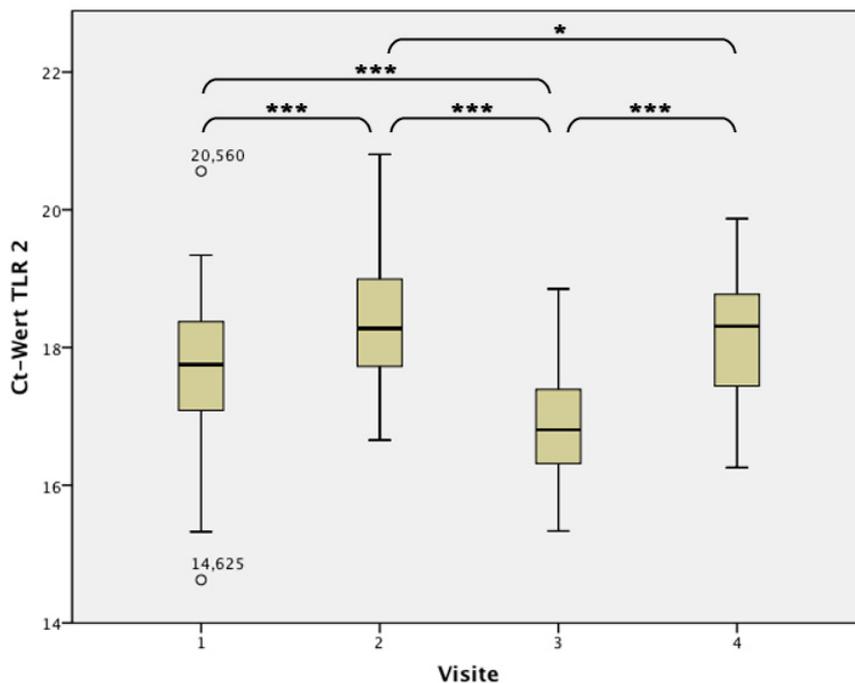
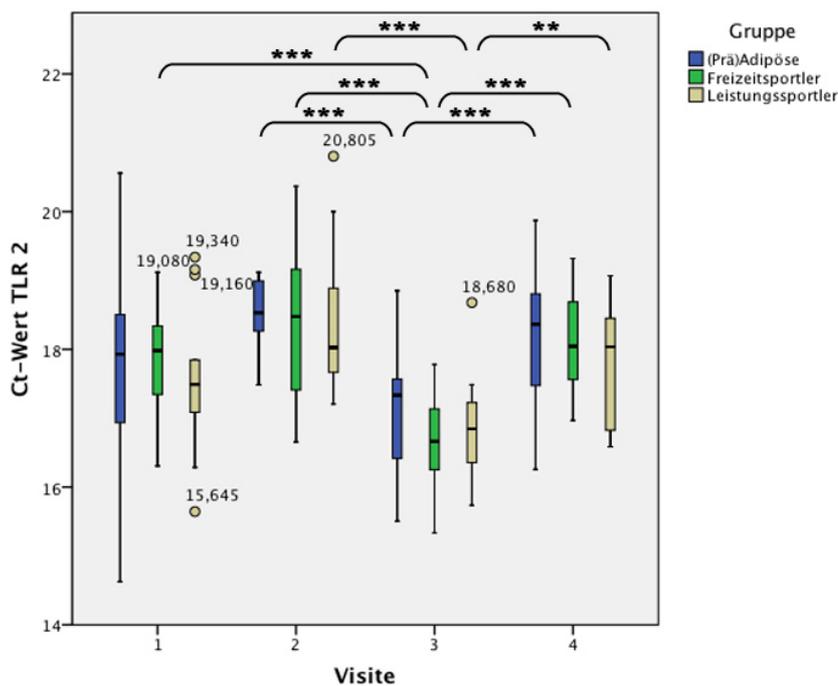


Abb. 9 b)



Toll-like Rezeptor 4

Wie auch bei TLR 2 führte das aerobe Ausdauertraining beim zweiten Vertreter der *Toll-like* Rezeptor-Familie nur für alle Läufer gruppenunabhängig gemessen zu einem signifikanten Abfall der Genexpression um 34%.

Der Effekt durch den Marathonlauf hingegen erbrachte sowohl im Gesamtkollektiv als auch bei den Messungen in den Einzelgruppen Messwerte, die sich von den Messwerten zu allen anderen Messzeitpunkten signifikant unterschieden. So kam es im Gesamtkollektiv zu einem 4,4-fachen (A: 3,9-fachen; F: 4,2-fachen; L: 5,0-fachen) Anstieg der TLR 4-Expression bezüglich der Vormessung und zu einem 2,9-fachen (A: 2,2-fachen; F: 3,4-fachen; L: 3,0-fachen) Anstieg bezogen auf die Ausgangswerte. Einen Tag nach dem Marathonlauf konnten bereits signifikant rückläufige Werte gemessen werden, im Gesamtkollektiv um 73%, bei den (Prä-)Adipösen um 74%, bei den Freizeitsportlern um 74% und den Leistungssportlern um 69%. In keiner Gruppe unterschieden sich die Werte bei Visite 4 signifikant von einer der Messungen vor dem Wettkampf (Tab. 26).

Wie auch bei allen anderen Inflammationsmarkern kam es bei TLR 4 zu keinem signifikanten Unterschied der Expressionsniveaus zwischen den einzelnen Gruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb. 10 a; Abb. 10 b).

Tab. 26: MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von TLR 4.

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	31,123 \pm 1,780	31,726 \pm 1,849	29,594 \pm 1,501	31,475 \pm 2,498
(Prä-)Adipöse	31,113 \pm 2,467	31,911 \pm 2,065	29,950 \pm 1,826	31,903 \pm 2,882
Freizeitsportler	31,415 \pm 1,600	31,744 \pm 2,105	29,670 \pm 1,417	31,632 \pm 2,667
Leistungssportler	30,798 \pm 1,195	31,535 \pm 1,405	29,206 \pm 1,273	30,879 \pm 1,895

Abbildung 10: TLR 4 mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abb. 10 a)

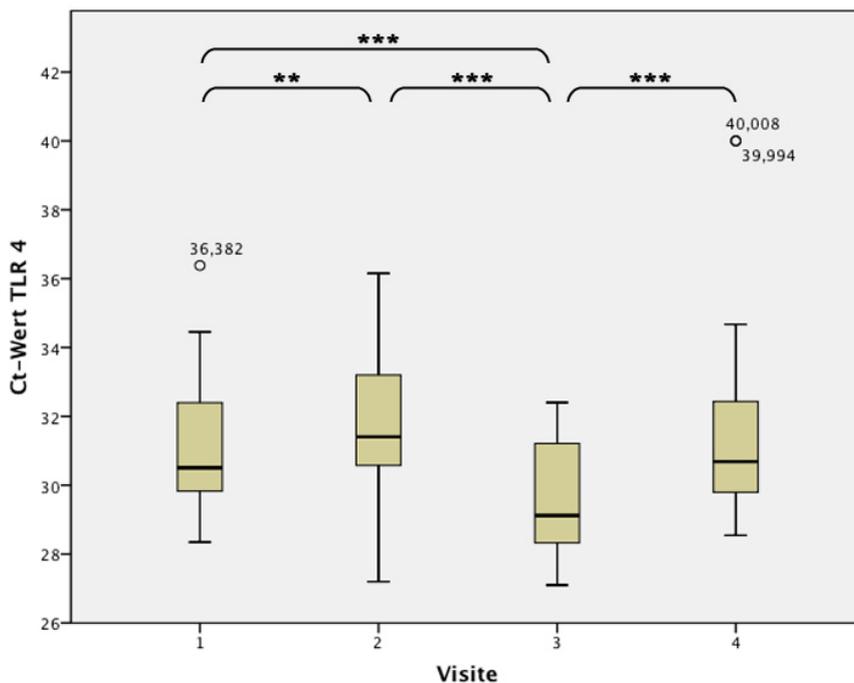
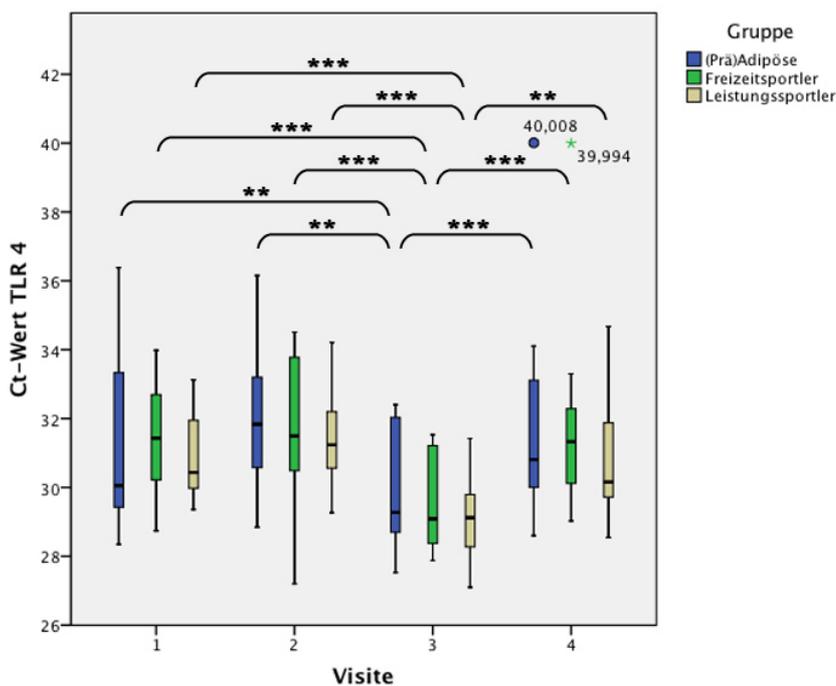


Abb. 10 b)



3.2.7. NO-Synthasen

Um die Rolle von NO, das als Bindeglied zwischen Inflammationsgeschehen und kardiovaskulärem System fungiert, bei Veränderungen, die durch körperliche Aktivität unterschiedlicher Intensität hervorgerufen werden, zu ermitteln, wurde das Genexpressionsprofil seiner Synthesenzyme gemessen. Der Vollständigkeit halber wurden alle drei Isoformen der NO-Synthase berücksichtigt, wobei, wie zu erwarten, die Genexpressions-Analyse der nNOS keine Expressionswerte lieferte, da diese vornehmlich in neuronalem Gewebe exprimiert wird.

Endotheliale NO-Synthase

Signifikante Änderungen in der Genexpression der eNOS konnten bei der Messung nach Marathon festgestellt werden. Sie fiel auf 60% des Basismesswertes bzw. 59% des Messwertes eine Woche vor dem Wettkampf ab. Am auf den Marathonlauf folgenden Tag war bereits wieder ein signifikanter Anstieg der Genexpression auf das 1,6-fache, und somit einem zu den ersten beiden Messungen nicht mehr signifikant niedrigeren Wert, zu verzeichnen (Abb. 11 a).

Weder das zehnwöchige Ausdauertraining noch der Marathonlauf resultierten in der Gruppe der (Prä-)Adipösen in einer signifikanten Änderung der Messwerte. Während bei den Leistungssportlern lediglich ein signifikanter Abfall der eNOS-Expression nach Marathonlauf auf 57% der Vormessung festzustellen war, kam es bei den Freizeitsportlern durch den Wettkampf zu Werten, die sowohl gegenüber der Basismessung als auch der Messung nach der Trainingsphase signifikant um 50% niedriger waren. Zusätzlich konnte in dieser Untergruppe ein signifikanter 1,8-facher Expressionsanstieg nach 24 Stunden verzeichnet werden. Die Messwerte der drei Gruppen unterschieden sich bei keiner der vier Visiten signifikant voneinander (Tab. 27; Abb. 11 b).

Tab. 27: MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von eNOS.

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	26,107 \pm 1,640	26,087 \pm 1,331	26,839 \pm 1,371	26,124 \pm 1,565
(Prä-)Adipöse	26,120 \pm 1,770	26,082 \pm 0,933	26,453 \pm 1,153	26,035 \pm 1,553
Freizeitsportler	26,284 \pm 1,754	26,254 \pm 1,618	27,266 \pm 1,319	26,453 \pm 1,452
Leistungssportler	25,847 \pm 1,520	25,896 \pm 1,394	26,718 \pm 1,551	26,219 \pm 1,126

Abbildung 11: eNOS mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

Abb. 11 a)

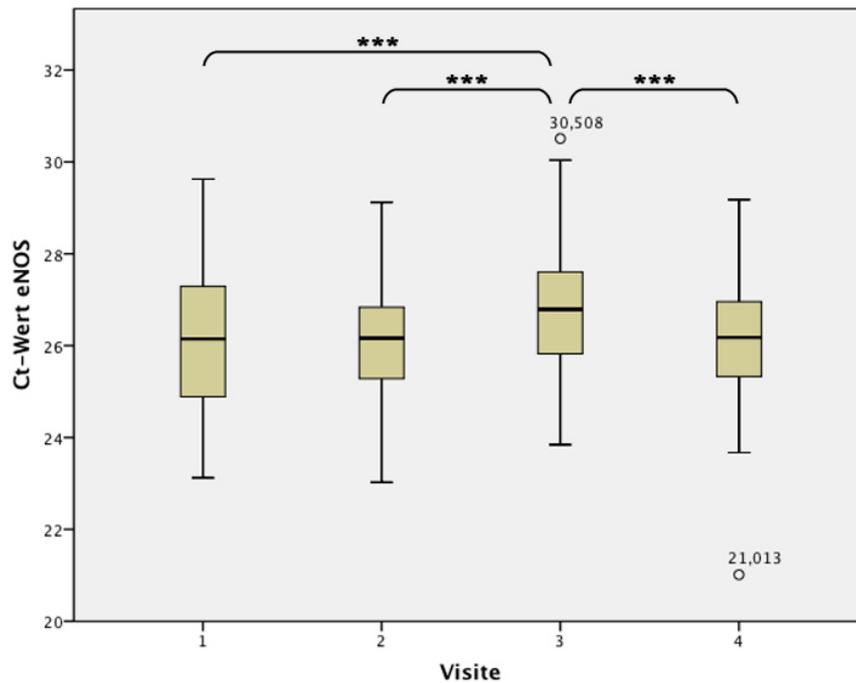
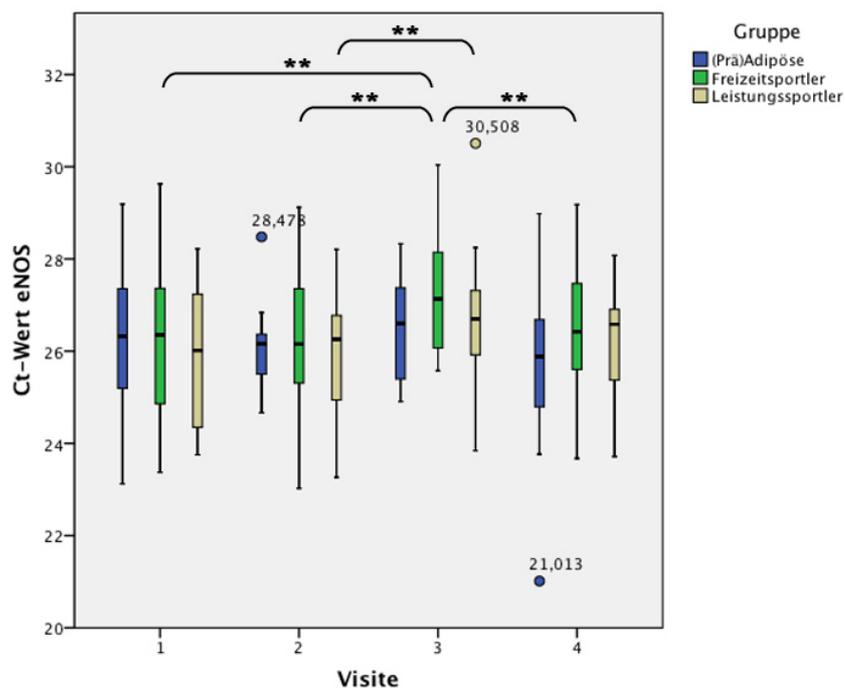


Abb. 11 b)



Induzierbare NO-Synthase

Wie bei der eNOS unterschieden sich auch bei der iNOS im Gesamtkollektiv die Messwerte nach dem Marathonlauf signifikant von denen der anderen drei Messzeitpunkte. Nach dem Wettkampf kam es zu einem Abfall der Genexpressionswerte auf einen 0,2-fachen Wert bezogen auf die Vormessung und einen 0,1-fachen Wert bezogen auf die Startmessung. Nach einem Tag stiegen die iNOS-Expressionswerte um 451% an und hatten somit wieder ein Level erreicht, das sich nicht mehr signifikant von den Messungen vor Marathon unterschied.

Wurden die Einzelgruppen gesondert betrachtet, waren die Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten allein in der Gruppe der Leistungssportler groß genug, um einen Zufall ausschließen zu können. Durch den Marathon kam es zu einem Abfall der Genexpression um 92% (um 89% bezüglich des Basismesswertes). Einen Tag nach dem Marathon waren die Messwerte noch immer auf einem Niveau, das sich nicht signifikant vom Vortag unterschied. Sie lagen 82% unter dem Wert der Startmessung und 91% unter dem von Visite 2 (Abb. 12 a).

Die Expressionsrate der iNOS war insgesamt eher gering. Wie schon für CRP, IL-2 und IL-10 beschrieben mussten einige Werte aufgrund zu geringer mRNA-Mengen auf den Ct-Wert $40 \pm$ Zufallsfehler gesetzt werden. Durch den enormen Anstieg an Proben mit Werten unterhalb der Nachweisgrenze nach dem Wettkampf, erbrachten – anders als bei CRP und IL-2 – die Mittelwertvergleiche signifikante Unterschiede. Die Anzahl der Proben mit Werten unterhalb der Nachweisgrenze bzw. ihr prozentualer Anteil sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Es konnten keine Gruppeneffekte für das iNOS-Expressionsniveau festgestellt werden. Auffällig ist jedoch, dass es einzig in der Gruppe der Leistungssportler zu keinem Anstieg der Genexpressionswerte 24 Stunden nach Beendigung des Marathonlaufs gekommen war (Abb. 12 b). Außerdem sprechen die Mittelwerte dafür, dass es in der Gruppe der Leistungssportler eher zu einem Anstieg der iNOS-Expression nach der Trainingsphase gekommen war, bei den (Prä-)Adipösen zu einem Abfall. Dies bekräftigt auch die Anzahl an Proben ober- bzw. unterhalb der Nachweisgrenze. Des Weiteren ist festzustellen, dass vor allem in der Gruppe der Leistungssportler eine enorme Zunahme an Proben unterhalb der Nachweisgrenze nach Marathonlauf zu verzeichnen war (Tab. 29).

Die Ct-Mittelwerte samt Standardabweichungen sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tab. 28: MW \pm SD der Ct-Werte gemessen für die Expression von iNOS.

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	34,148 \pm 3,896	34,951 \pm 4,148	37,265 \pm 3,783	35,092 \pm 3,995
(Prä-)Adipöse	33,525 \pm 3,171	34,207 \pm 4,204	37,046 \pm 3,484	33,314 \pm 4,108
Freizeitsportler	34,653 \pm 4,082	36,915 \pm 4,011	37,846 \pm 3,792	34,334 \pm 3,298
Leistungssportler	34,120 \pm 4,217	33,650 \pm 3,538	37,278 \pm 4,020	37,206 \pm 3,712

Tab. 29: Anzahl der Proben mit iNOS-Werten unterhalb der Nachweisgrenze. In Klammern ihr prozentualer Anteil an der jeweiligen Fallzahl.

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	12 (27,27%)	17 (37,78%)	28 (63,64%)	15 (34,88%)
(Prä-)Adipöse	3 (21,43%)	5 (35,71%)	7 (53,85%)	4 (28,57%)
Freizeitsportler	5 (31,25%)	9 (56,25%)	11 (68,75%)	3 (20%)
Leistungssportler	4 (28,57%)	3 (20%)	10 (66,67%)	8 (57,14%)

Abbildung 12: iNOS mRNA-Expression in PBMC vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abb. 12 a)

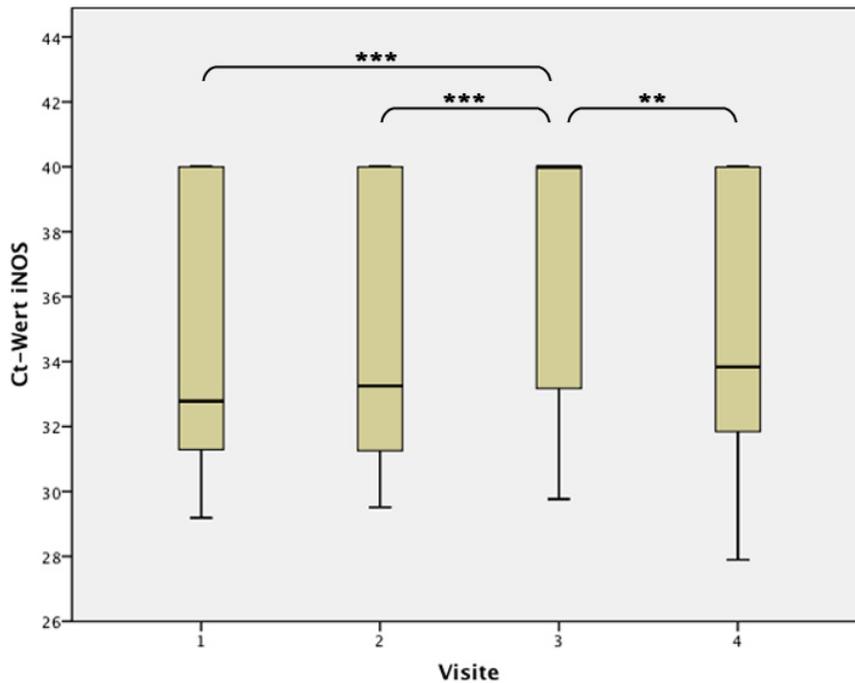
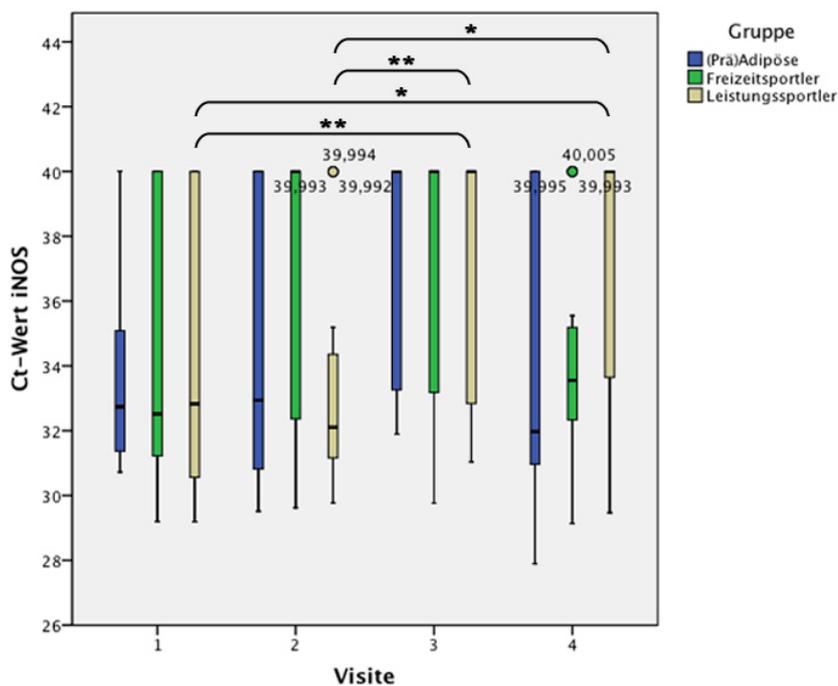


Abb. 12 b)



3.3. Serumkonzentration von Stickstoffmonoxid

Die Serumkonzentrationen von NO bzw. dessen Abbauprodukte Nitrat und Nitrit wurden photometrisch bestimmt, um systemische Änderungen durch Training und Wettkampf sehen und diese mit eventuellen Veränderungen der NO-Syntheseenzyme auf RNA-Ebene vergleichen zu können. In keiner Probe konnten relevante Mengen an Nitrit festgestellt werden, so dass die gemessene Gesamtstickoxidkonzentration in etwa der Serumkonzentration an Nitrat entsprach.

Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Serumkonzentration von NO_x nach dem Lauftraining festgestellt werden. Während die absoluten Werte jedoch bei den (Prä-)Adipösen fielen, stiegen sie bei den Leistungssportlern an. Durch den Marathon kam es zu einem signifikanten Anstieg auf das 1,7-fache der Werte der Vormessung und das 1,8-fache der Werte der Ausgangsmessung. Nach 24 Stunden war bereits ein signifikanter Rückgang der NO-Konzentration um 30% zu verzeichnen. Dieser Wert lag jedoch noch 22% über dem Messwert zu Studienbeginn (Abb. 13 a).

Auch wenn alle Einzelgruppen getrennt ausgewertet wurden, konnte nach dem Marathonlauf ein signifikanter Anstieg der NO-Konzentration verzeichnet werden. Während sich in der Gruppe F der Messwert sowohl signifikant von der Basismessung (1,8-facher Anstieg) als auch von der Messung eine Woche vor Wettkampf (1,7-facher Anstieg) unterschied, war in der Gruppe A der Wert nach dem Marathonlauf nur bezüglich der Messung sieben Tage zuvor signifikant erhöht (92%), bei den Leistungssportlern nur bezüglich der Basismessung (77%). Die Messung einen Tag nach Beendigung des Marathons zeigte in allen Gruppen signifikant rückläufige Werte ((Prä-)Adipöse um 40%, Freizeitsportler um 23%, Leistungssportler um 27%). Doch nur in der Gruppe der Freizeitsportler hatten die Werte der Abschlussmessung noch nicht das Ausgangsniveau wieder erreicht und lagen mit 36% noch signifikant über diesem (Tab. 30; Abb. 13 b).

Tab. 30: MW ± SD der Serumkonzentration von NO_x.

Gruppe	Serumkonzentration von NO _x [µM]			
	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Gesamtkollektiv	35,434 ± 16,828	37,140 ± 21,207	62,049 ± 17,963	43,294 ± 12,618
(Prä-)Adipöse	37,825 ± 23,121	33,883 ± 17,472	64,948 ± 22,732	38,728 ± 12,999
Freizeitsportler	32,423 ± 8,752	34,763 ± 17,210	57,509 ± 16,290	44,120 ± 8,316
Leistungssportler	36,270 ± 16,748	42,555 ± 27,452	64,076 ± 15,013	47,035 ± 15,025

Abbildung 13: NO-Serumkonzentration vor (1) und nach (2) zehnwöchigem Ausdauertraining, sowie unmittelbar nach (3) und einen Tag nach (4) Absolvieren eines Marathonlaufs; dargestellt für a) alle Studienteilnehmer, sowie b) für die Gruppen der (Prä-)Adipösen, der Freizeitsportler und der Leistungssportler gesondert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test für die Zeiteffekte und mittels Kruskal-Wallis-Test für die Gruppeneffekte. Dargestellt sind Median, Quartile und Extremwerte der Ct-Werte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

Abb. 13 a)

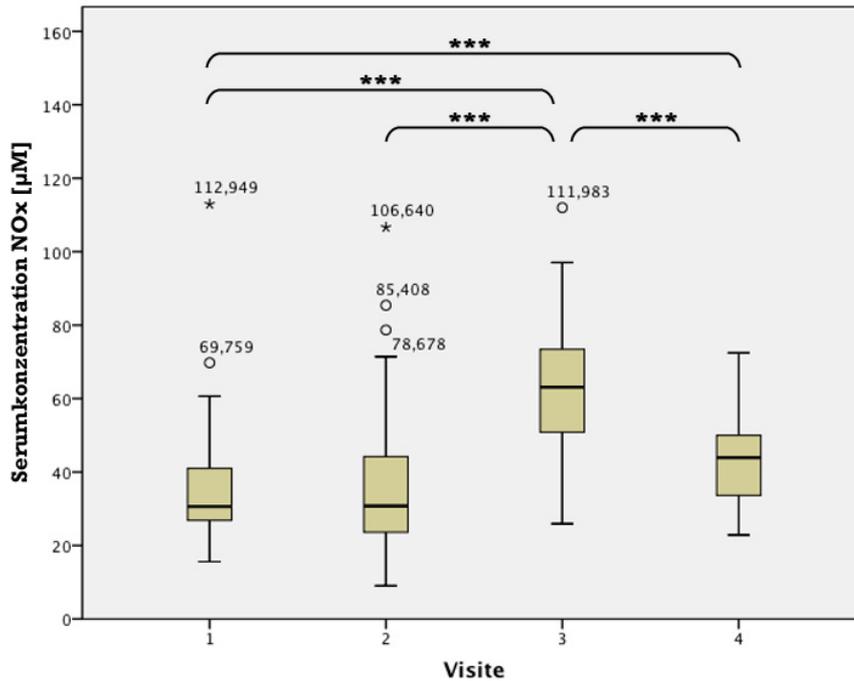
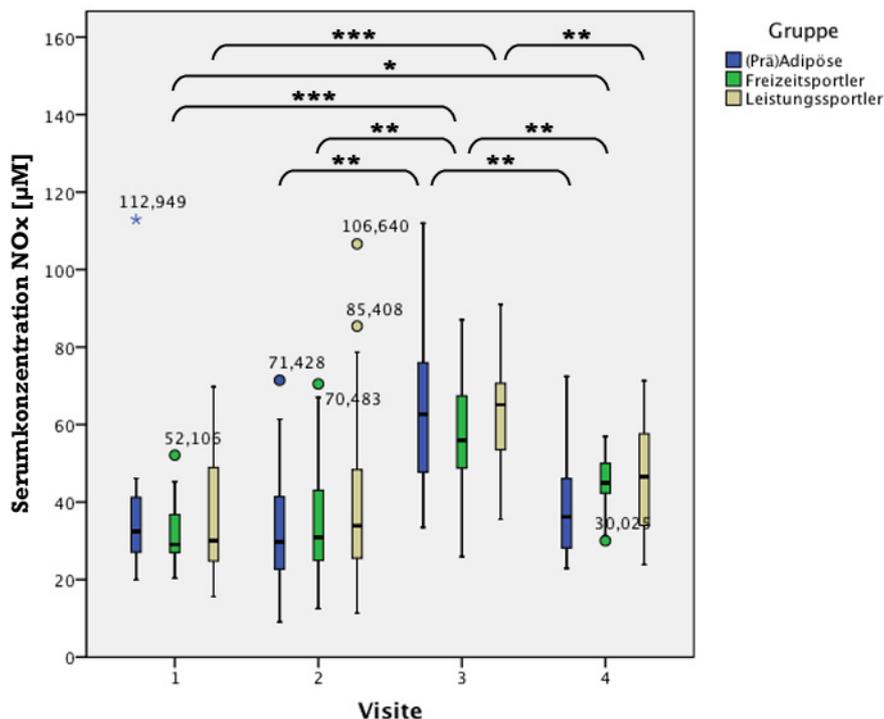


Abb. 13 b)



4. Diskussion

4.1. Methodenkritik

Obwohl es bis dato keine Studien gab, die mit vergleichbarem Aufwand und vergleichbarer Teilnehmerzahl verschiedenste trainingswissenschaftliche, kardiovaskuläre und inflammatorische Parameter nach Marathontraining und nach Marathonlauf erhoben haben, unterlag die Münchner Marathon Studie gewissen Limitationen, unter Berücksichtigung derer die gewonnenen Ergebnisse zu betrachten sind.

Ogleich mit 61 Teilnehmern eine bemerkenswerte Fallzahl geschaffen worden war, führte zum einen die Tatsache, dass einige Sportler während der Studie ausschieden, zum anderen die Unterteilung in drei Untergruppen zu einer letztlich eher geringen Fallzahl in den einzelnen Gruppen.

Da aus organisatorischen Gründen nicht alle Teilnehmer an einem einzigen Lauf teilnehmen konnten, mussten insgesamt vier Marathonläufe organisiert werden. Dies führte zwangsläufig zu Schwankungen der äußeren Bedingungen wie den klimatischen Verhältnissen. Des Weiteren mussten die Sportler nach dem Zieleinlauf schnell mit dem Auto ins Labor zur Blutentnahme transportiert werden. Wenngleich bei den drei organisierten Wissenschaftsmarathonläufen, bei denen lediglich Studienteilnehmer liefen, die Probanden gemäß ihrer zu erwartenden Laufzeit zeitlich so versetzt starteten, dass es nach dem Zieleinlauf zu keinen Wartezeiten bei der Blutabnahme kam, war dies für den München Marathon nicht möglich. Hier kam es trotz größter Bemühungen zwangsläufig zu zeitlichen Verzögerungen.

Diverse Einflüsse wie Trainingsrückstände durch Krankheit oder mangelnde Compliance und unterschiedlichste Ausgangslagen in Bezug auf die Fitness – objektiviert durch die individuelle anaerobe Schwelle – und auf die Körpermasse, führten zu erschwerten Bedingungen bei der Einteilung der Sportler in die vorgegebenen Untergruppen und zu einer Unschärfe der Gruppengrenzen. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass durch eine bereits ausgeprägte Grundlage an kardiopulmonaler Fitness bei den Teilnehmern eventuell weniger deutliche Veränderungen durch das Ausdauertraining zu verzeichnen waren als in früheren Studien. Diese Tatsachen mögen dazu beigetragen haben, dass im Gesamtkollektiv gemessene Signifikanzen in den Untergruppen oft nicht mehr nachgewiesen werden konnten, bzw. so gut wie keine signifikanten Unterschiede zwischen

den Werten der einzelnen Gruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten festgestellt werden konnten.

Als Probenmaterial dienten PBMC, die jedoch nicht für jeden gemessenen Marker als ideales Medium anzusehen sind. Denn einige der untersuchten Gene werden nur in geringen Mengen oder gar nicht von ihnen exprimiert. Andere Marker wiederum werden zwar in relevanten Mengen von mononukleären Zellen exprimiert, jedoch nicht abhängig von sportlichen Reizen, so dass systemische Veränderungen auf eine veränderte Genexpression in anderen Geweben zurückzuführen sind.

Zuletzt muss erwähnt werden, dass es durch die zweimalige Aufreinigung der mRNA zu größeren Einbußen in der Gesamt-RNA-Menge gekommen war, weshalb man sich im Vorfeld primär für eine Aufreinigung mittels NucleoSpin[®]-Säulen hätte entscheiden sollen.

4.2. Auswirkungen des zehnwöchigen aeroben Ausdauertrainings auf Serumkonzentration und Genexpression verschiedener Inflammationsmarker

Als Vorbereitung auf den Marathonlauf durchliefen alle Probanden ein zehnwöchiges Lauftraining, das bezüglich seiner Intensität an den Leistungsstand der einzelnen Sportler angepasst war und für die Gruppen A und F auf einem Trainingsprotokoll basierte, das speziell für diese Studie entwickelt worden war. Den Leistungssportlern war es freigestellt ihre persönlichen Trainingsgewohnheiten weiterzuführen. Um die Überlastungsgefahr für die Teilnehmer zu minimieren, wurde bei der Rekrutierung der Sportler eine gewisse Erfahrung im Laufsport vorausgesetzt, so dass jeder der Probanden in das zehnwöchige Ausdauertraining mit einem Grundstock an kardiopulmonaler Fitness startete.

Die Blutabnahmen erfolgten vor und nach der Trainingsphase zu Visite 1 und Visite 2, wobei Letztere eine Woche vor Marathonlauf angesetzt war und die Veränderungen widerspiegeln sollte, die durch das zehnwöchige, teils durch Trainingspläne standardisierte, aerobe Lauftraining bedingt waren. Während für alle untersuchten Inflammationsmarker die Genexpression in PBMC untersucht wurde, wurden in dieser Teilstudie zusätzlich zum Vergleich mit systemischen Veränderungen die Ergebnisse der Serumkonzentrationsmessungen für CRP, IL-6 und TNF- α , die vom PRS im Zuge der Rahmenstudie bestimmt worden waren, statistisch ausgewertet.

4.2.1. Proinflammatorische Prozesse

Serumkonzentrationen proinflammatorischer Parameter

Im Vergleich zur Ausgangsmessung waren minimale bis gar keine Veränderungen der Serumkonzentration proinflammatorischer Marker zu verzeichnen. Während die CRP-Konzentration nach dem Training nur in der Gruppe der (Prä-)Adipösen zu einer leichten, nichtsignifikanten Abnahme führte, kam es bei den TNF- α -Konzentrationen zu einem Abfall in allen Gruppen, welcher jedoch statistisch auch nicht als signifikant eingestuft werden konnte. Auch für die systemischen Werte von IL-6 konnte lediglich in der Gruppe der Leistungssportler eine Reduktion vermerkt werden. Die Leistungssportler hatten zudem nach dem Training signifikant niedrigere systemische Konzentrationen an IL-6 als die (prä)adipösen Läufer. Einer Arbeitsgruppe von Nickel stand Material aus derselben Studie zur Verfügung. Auch sie untersuchte die Serumkonzentration von IL-6 und TNF- α . Wie in der vorliegenden Arbeit kamen Nickel et al. zu dem Ergebnis, dass die Trainingsphase zu einem nichtsignifikanten Abfall von TNF- α führte. Sie stellten ebenso einen Abfall der IL-6-Konzentration in der Gruppe der Leistungssportler fest, jedoch einen leichten Anstieg in den anderen beiden Gruppen, wobei keine dieser Änderungen Signifikanz aufwies (Nickel et al., 2011a). Diverse Studien haben sich in der Vergangenheit mit den Auswirkungen von Ausdauertraining auf die systemischen Konzentrationen von Inflammationsmarkern befasst. Wie bereits weiter oben beschrieben, sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen weitestgehend mit den in dieser Arbeit generierten Daten vereinbar. Während viele Arbeitsgruppen zu dem Schluss kamen, dass die CRP-Konzentration nur durch Ausdauertraining in Kombination mit Gewichtsverlust beeinflussbar zu sein scheint (s. Einleitung), zeigten Tomaszewski et al., dass regelmäßiges intensives Training unabhängig von Markern des Ernährungszustandes zu einer Reduktion der systemischen CRP-Konzentration führt (Tomaszewski et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit führte das Ausdauertraining in allen Gruppen zu einer Gewichtsreduktion in Form einer Abnahme von BMI und prozentualem Körperfettanteil. Diese war in der Gruppe der (Prä-)Adipösen am deutlichsten ausgeprägt (Weber, 2008). Passend dazu kam es allein in dieser Gruppe zu einer Abnahme der systemischen CRP-Konzentration.

In mehreren Studien konnten durch Training die systemischen Werte an TNF- α sowohl bei gesunden Männern, als auch bei Probanden mit kardiovaskulärem Risikoprofil gesenkt werden (s. Einleitung). Welchen Einfluss Ausdauersport auf die Plasmakonzentration von

IL-6 hat, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden (s. Einleitung), es kommt wohl jedoch zu einer Reduktion der Expression von IL-6 im Skelettmuskel (Lira et al., 2009b). Tomaszewski et al. zeigten, dass sich die Plasma-IL-6-Konzentration von Ultramarathonläufern nicht signifikant von denen untrainierter Vergleichspersonen unterscheidet (Tomaszewski et al., 2003).

Genexpression proinflammatorischer Parameter

Betrachtet man die CRP-Expression in PBMC vor und nach zehnwöchigem Ausdauertraining, so ist, wie zu erwarten, keine signifikante Veränderung festzustellen. Die Expressionsrate von CRP ist in der untersuchten Zelllinie generell eher gering, was sich in einem hohen Anteil an Proben mit mRNA-Werten unterhalb der Nachweisgrenze niederschlug. Wenngleich es durch die Trainingsphase zu keiner signifikanten Änderung der Expressionswerte kam, ist nach dem Training eine Zunahme von Proben mit CRP-mRNA-Mengen im messbaren Bereich festzustellen. Dies gilt jedoch nur für die Gruppen der (Prä-)Adipösen und Leistungssportler. In der Gruppe der Freizeitsportler hingegen kam es zu einem Anstieg der Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Insgesamt scheinen Änderungen der CRP-Expression in PBMC also eher nicht die Ursache für veränderte systemische Konzentrationen zu sein.

Anders als bei den systemischen Werten von IL-6 war durch das Trainingsprogramm beim Gesamtkollektiv der Teilnehmer eine Reduktion der Genexpression in PBMC um fast ein Fünftel zu verzeichnen. Hier scheint der Ausdauersport also einen immunmodulatorischen Effekt gehabt zu haben. Die Tatsache, dass dieses Ergebnis in keiner der drei Einzelgruppen bestätigt werden konnte, mag daran liegen, dass die jeweilige Fallzahl in den einzelnen Gruppen zu gering war um signifikante Ergebnisse zu liefern. Nur wenige Studien haben in der Vergangenheit die Genexpression von IL-6 in PBMC nach einer Trainingsphase untersucht. Flynn et al. konnten im Vergleich einer Gruppe trainierter Frauen mit einer Gruppe untrainierter Frauen keine Unterschiede in der Genexpression von IL-6 in Leukozyten nachweisen (Flynn et al., 2003; McFarlin et al., 2004). Anders als in der vorliegenden Studie handelte es sich jedoch nicht um Ausdauertraining, sondern um Krafttraining. Colahan et al. haben die Genexpression von IL-6 in peripheren Leukozyten nach Ausdauertraining im Tierversuch mit Pferden untersucht, konnten jedoch keine signifikanten Ergebnisse ermitteln (Colahan et al., 2002).

Durch das zehnwöchige Ausdauertraining kam es bei den Läufern zu einer deutlichen Reduktion der Expression von TNF- α in PBMC, wobei der Abfall mit steigendem Leistungsniveau zunahm. Diese Zunahme konnte jedoch nicht mit statistischer Signifikanz belegt werden. Die Reduktion auf transkriptioneller Ebene ist bei Betrachtung der systemischen Werte von TNF- α zumindest tendenziell, wenn auch nicht signifikant, reproduzierbar. Vergleichbare Ergebnisse konnten Smith et al. erzielen, als sie die TNF- α -Expression in mononukleären Zellen vor und nach sechsmonatigem Trainingsprogramm bei Menschen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko ermittelten. Es kam zu einer Abnahme der Expression, wobei Teilnehmer mit Übergewicht keine signifikant abweichenden Ergebnisse aufwiesen (Smith et al., 1999). Timmerman und seine Arbeitsgruppe zeigten, dass die TNF- α -Produktion bei älteren inaktiven Probanden durch zwölfwöchiges Training gesenkt werden konnte. Eine Vergleichsgruppe mit körperlich aktiven Teilnehmern hatte bei der Ausgangsmessung signifikant niedrigere TNF- α -Werte, diese konnten durch die Weiterführung ihres bisherigen aktiven Lebensstils jedoch nicht weiter reduziert werden (Timmerman et al., 2008). Flynn et al. zeigten, dass die TNF- α -Expression bei einer untrainierten Kontrollgruppe signifikant höher war, als bei trainierten Frauen (Flynn et al., 2003; McFarlin et al., 2004). Mehrwöchiges Training führte in einer Studie von Colahan et al. zu einer Zunahme der TNF- α -Expression bei Pferden (Colahan et al., 2002). Im Unterschied zur vorliegenden Studie handelte es sich bei der Pferdestudie jedoch um Ausdauertraining mit wöchentlich steigender Intensität, das in einer Phase intensivster Belastung gipfelte. Diese Daten sind deshalb wohl eher als Resultat mehrerer aufeinander folgender Akutbelastungen anzusehen.

Auch bezüglich der Genexpression von IL-1B führte das Ausdauertraining zu einer Reduktion sowohl im Gesamtkollektiv als auch in den einzelnen Untergruppen. Während jedoch diese Reduktion in der Gruppe der (Prä-)Adipösen nicht signifikant war, kam es bei den Freizeitsportlern zu einer signifikanten 47%igen, bei den Leistungssportlern gar zu einer 59%igen Reduktion. Die oben bereits mehrfach genannten Arbeitsgruppen von Flynn sowie die von Colahan sind die einzigen, die sich bisher mit der Genexpression von IL-1B in peripheren mononukleären Zellen bei unterschiedlich gut trainierten Individuen befasst haben. Während kein Unterschied in der Genexpression von IL-1B zwischen trainierten und untrainierten älteren Frauen festzustellen war (Flynn et al., 2003; McFarlin et al., 2004), führte ein intensiviertes Training bei Pferden, ähnlich wie für die TNF- α -Expression, zu einer Steigerung der Expression von IL-1B (Colahan et al., 2002).

Die im Vergleich zur Flynn-Studie deutliche Reduktion in der vorliegenden Arbeit könnte darin begründet sein, dass die Probandinnen in besagter Studie, in welcher es sich um Krafttraining handelte, ein geringeres Maß an kardiopulmonaler Fitness aufwiesen. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass es bei den Teilnehmern der aktuellen Studie abhängig vom Fitnesszustand zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Reduktion kam.

Das zehnwöchige Lauftraining führte weder im Gesamtkollektiv noch in den einzelnen Gruppen zu signifikanten Änderungen der IL-2-Expression in PBMC. Bei einem Großteil der gemessenen Proben war die basale Expressionsrate so niedrig, dass sie nicht quantifiziert werden konnte. Dies war auffällig häufig in der Gruppe der Leistungssportler der Fall. Nach der Phase des Trainings sank die Anzahl der Proben mit Expression unterhalb der Nachweisgrenze ab. Auch hier ist der deutlichste Effekt in der Gruppe der Leistungssportler zu verzeichnen. Tendenziell scheint also das Training zu einer Steigerung der IL-2-Expression geführt zu haben, vor allem bei den Teilnehmern mit dem intensivsten Trainingsplan. Auch mit dieser Thematik haben sich bisher nur wenige Studien befasst. Weibliche Athletinnen, die sich gerade auf dem Höhepunkt einer für den Wettkampf vorbereitenden Trainingsphase befanden, hatten mehr IL-2-produzierende Zellen als untrainierte Vergleichspersonen (Beshgetoor, Arrues, McGuire, 2004). Ähnliche Ergebnisse erzielten Ogawa et al. im Vergleich älterer trainierter mit älteren untrainierten Probanden (Ogawa et al., 2003). Auch die systemischen Werte an IL-2 sind nach mehrwöchigem Ausdauertraining erhöht (Navarro et al., 2010). Im Tierversuch der Arbeitsgruppe Colahan führte intensives Training bei Pferden zu keiner Veränderung der Expression von IL-2 (Colahan et al., 2002). Interessanterweise scheint also regelmäßig betriebener Sport anders als bei den meisten proinflammatorischen Zytokinen eher zu einer Erhöhung von IL-2 zu führen.

Durch die Trainingsphase kam es sowohl im Gesamtkollektiv als auch in den Untergruppen zu einer Expressionsabnahme von CXCR1 und CXCR2. Mit statistischer Signifikanz konnte jedoch nur der Unterschied zwischen den Werten von CXCR1 im Gesamtkollektiv belegt werden. Noch keine Studie hat bisher die Auswirkung von Ausdauertraining auf die Genexpression von Chemokinrezeptoren untersucht. Wie bereits weiter oben beschrieben, ist lediglich bekannt, dass es nach Ausdauertraining zu einem Abfall an zirkulierendem IL-8, dem Liganden der untersuchten Chemokinrezeptoren, kommt (Trøseid et al., 2004; Spruit et al., 2005).

Die Genexpression der *Toll-like* Rezeptoren 2 und 4 in mononukleären Zellen wurde durch das Ausdauertraining bei den Teilnehmern gesenkt. Wenngleich aufgrund der niedrigen Fallzahlen in den Untergruppen nur die Reduktion im Gesamtkollektiv als statistisch signifikant anzusehen ist, ist dennoch in allen Gruppen eine Abnahme der Genexpression beider Rezeptortypen zu verzeichnen. Den stärksten Effekt scheint hierbei das Training auf die Gruppe der (Prä-)Adipösen gehabt zu haben. Die oben bereits genannte Arbeitsgruppe von Nickel hat ebenso die Genexpression von TLR 2 und 4 mittels RT-PCR und Western-Blot in Proben aus dieser Studie untersucht und konnte außer einem signifikanten Anstieg der Genexpression in der Gruppe der Freizeitsportler keine signifikanten Ergebnisse für TLR 2 ermitteln. Die Untersuchung von TLR 4 zeigte, anders als in der vorliegenden Studie, in allen drei Einzelgruppen einen signifikanten Anstieg der Genexpression. Interessant wäre hier ein Vergleich der im Gesamtkollektiv ermittelten Ergebnisse gewesen, welche jedoch von dieser Arbeitsgruppe nicht publiziert wurde (Nickel et al., 2011a). Mehrere Studien konnten in der Vergangenheit zeigen, dass untrainierte Probanden eine höhere basale Expression von TLR 4 auf Monozyten haben, als trainierte Vergleichspersonen (Flynn et al., 2003; McFarlin et al., 2004; Timmerman et al., 2008). In einer Studie von Stewart et al. führte zwölfwöchiges Training zu keiner Reduktion der Expression von TLR 2 auf der Zelloberfläche CD14 positiver Zellen. Die Expression von TLR 4 wurde nur in einer Gruppe Untrainierter signifikant gesenkt, nicht jedoch in einer trainierten Kontrollgruppe (Stewart et al., 2005). Diese Ergebnisse sind zumindest ansatzweise mit denen dieser Arbeit vereinbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das zehnwöchige Ausdauertraining zu einer Reduktion der Genexpression von IL-6, TNF- α , IL-1B, TLR 2, TLR 4, CXCR1 und CXCR2 geführt hatte, wenn auch bei Letzterem nicht mit statistischer Signifikanz. Die Expression von CRP und IL-2 in PBMC blieb durch das Training weitgehend unbeeinflusst. Signifikante Unterschiede bezüglich der Gruppenzugehörigkeit konnten nicht ermittelt werden. Dies mag an den jeweils eher niedrigen Fallzahlen in den einzelnen Gruppen liegen. Es ist jedoch ein Trend dahingehend zu erkennen, dass die Reduktion der Zytokinexpression durch das Ausdauertraining mit zunehmendem Leistungsniveau der Sportler stieg. Der deutlichste Effekt bezüglich der Abnahme der *Toll-like* Rezeptor-Expression war hingegen in der Gruppe der (Prä-)Adipösen zu verzeichnen.

4.2.2. Antiinflammatorische Prozesse

Es ist festzustellen, dass nach zehnwöchigem Ausdauertraining die Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Gesamtkollektiv signifikant gesunken ist. In keiner der Einzelgruppen konnte ein signifikanter Unterschied der Expressionswerte verifiziert werden, dennoch ist auffällig, dass während es in den Gruppen der (Prä-)Adipösen und der Freizeitsportler zu einer minimalen Abnahme der Expressionswerte kam, diese in der Gruppe der Leistungssportler enorm scheint. Da auch für diesen Inflammationsmarker viele der Proben Werte unterhalb der Nachweisgrenze aufwiesen, macht es Sinn, die prozentualen Anteile dieser in den einzelnen Gruppen vor und nach der Trainingsphase zu betrachten. Bei der Ausgangsmessung waren die wenigsten nicht nachweisbaren Proben bei den Leistungssportlern zu verzeichnen, was auf den antiinflammatorischen Effekt ihres regelmäßigen körperlichen Trainings bereits vor Studienbeginn hinweisen mag. Über alle Probanden gemittelt kam es nach den zehn Wochen Lauftraining zu einem Anstieg des Anteils an Proben unterhalb der Nachweisgrenze, also eher zu einer Abnahme des antiinflammatorischen Effekts. Es sind hier jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Untergruppen zu verzeichnen. In den Gruppen A und F kam es durch die Trainingsphase zu einer Zunahme der Proben, in denen die Expression von IL-10 nachgewiesen werden konnte. Bei den Leistungssportlern hingegen kam es zu einer deutlichen Abnahme von 92,86% auf 60%. Eine mögliche Erklärung dafür bietet die Tatsache, dass IL-6 zu einer Induktion der IL-10-Expression führt. Da in der Gruppe der Leistungssportler eine besonders hohe Reduktion an IL-6 zu verzeichnen war, könnte hieraus auch die starke Abnahme von IL-10 resultieren. Unterschiede zu den anderen zwei Gruppen könnten sich auch daraus ergeben haben, dass diese nach einem festgesetzten Protokoll trainiert hatten, während die Leistungssportler ihr Training individuell gestalten konnten. Smith et al. konnten passend hierzu zeigen, dass bei Probanden mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko sechsmonatiges Training zu einem Anstieg der IL-10-Expression in mononukleären Zellen führte (Smith et al., 1999). Im Tierversuch von Colahan et al. hingegen kam es nach intensivem Training zu keiner Veränderung der IL-10-Expression bei Pferden (Colahan et al., 2002). Im Vergleich gesunder mit krankheitsanfälligen Personen waren die mittleren IL-10-Konzentrationen in der zweiten Gruppe bei einer Untersuchung von Cox et al. signifikant niedriger (Cox et al., 2007), was wiederum gut mit den Ergebnissen zu Studienbeginn vereinbar ist.

4.2.3. Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel

Das zehnwöchige Lauftraining führte in keiner der Gruppen zu relevanten Auswirkungen auf den NO-Stoffwechsel. Sowohl die Serumkonzentrationen an NO als auch die Expressionsraten von iNOS und eNOS in PBMC blieben unbeeinflusst. Interessanterweise ist jedoch eine Tendenz dahingehend festzustellen, dass die Leistungssportler eher einen Anstieg an zirkulierendem NO sowie der Expressionswerte von iNOS zu verzeichnen hatten, während in der Gruppe der (Prä-)Adipösen ein Abfall beider gemessener Parameter festzustellen war. In früheren Studien am Mausmodell resultierte Training in keiner Erhöhung der spontanen NO-Produktion in peritonealen Makrophagen (Sugiura et al., 2002). Im Vergleich von älteren mit jüngeren Mäusen kam es nur bei den jüngeren zu einem Anstieg der NO-Metabolite sowie der iNOS-mRNA (Lu et al., 1999). Sieht man die jüngeren Mäuse im Vergleich zu den älteren als die gesünderen und leistungsstärkeren an, so lassen sich die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Lu gut auf die hier ermittelten projizieren. Erzurum et al. konnten zeigen, dass Tibetaner, die in großen Höhenzügen beheimatet sind, im Vergleich zu US-Bürgern zehnfach höhere NO-Konzentrationen aufweisen (Erzurum et al., 2007). Auch in Studien von Tordi et al. und Poveda et al. führte Ausdauertraining zu einer Erhöhung der zirkulierenden Metabolite von NO (Tordi et al., 2006; Poveda et al., 1997). In einer Studie von Niess et al. hatten jedoch Probanden, die regelmäßig moderates Ausdauertraining betrieben, niedrigere iNOS-Expressionsraten in Leukozyten als Probanden einer untrainierten Vergleichsgruppe (Niess et al., 2002). Dies ist wohl als Zeichen einer reduzierten Inflammationsreaktion zu verstehen. Auswirkungen von Ausdauertraining auf die eNOS-Expression in PBMC sind in der Literatur nicht beschrieben. Vielmehr kommt es durch regelmäßige körperliche Aktivität zu einem Anstieg der Expression in Endothelzellen (Sessa et al., 1994; Shimada et al., 2007; Indolfi et al., 2002; Yang et al., 2001; Yang et al., 2002; Sun et al., 2008; Musicki et al., 2008; McAllister, Price, 2010) und Herzmuskelzellen (Grijalva et al., 2008; Kojda et al., 2001).

4.3. Auswirkungen des Marathonlaufs auf Serumkonzentration und Genexpression verschiedener Inflammationsmarker

Nach etwa elf Wochen Training absolvierten die Probanden an vier festgesetzten Terminen jeweils einen Marathonlauf. Unmittelbar nach Zieleinlauf wurden die Läufer zur Blutabnahme ins Labor gefahren. 24 Stunden nach Beendigung des Wettkampfes erfolgte eine erneute Blutentnahme. Wie auch zu den ersten zwei Messzeitpunkten wurde die mRNA-Menge diverser immunmodulatorischer Genmarker, sowie die Serumkonzentration der klassischen Entzündungsparameter CRP, IL-6 und TNF- α ermittelt.

4.3.1. Proinflammatorische Prozesse

Unmittelbar nach dem Marathonlauf war ein Anstieg an zirkulierendem IL-6 auf ein Vielfaches des Ausgangswertes zu verzeichnen. Dieser Anstieg konnte in allen Einzelgruppen bestätigt werden, wobei er bei den Leistungssportlern deutlicher als bei den Freizeitsportlern und bei diesen höher als bei den (Prä-)Adipösen war. 24 Stunden nach Beendigung des Marathonlaufs war bereits ein Rücklauf der IL-6-Konzentrationen auf beinahe Ausgangsniveau festzustellen. Auch hier zeigten die Sportler mit besserer kardiopulmonaler Fitness einen schnelleren Rückgang. Die bereits mehrfach erwähnte Arbeitsgruppe von Nickel berichtet von vergleichbaren Ergebnissen (Nickel et al., 2011b). Diverse Studien konnten in der Vergangenheit zeigen, dass nach extremer körperlicher Belastung die systemischen Werte an IL-6 auf das Zifache ansteigen (Camus et al., 1997; Suzuki et al., 2000; Nieman et al., 2001; Suzuki et al., 2003; Neubauer, König, Wagner, 2008; Donnikov et al., 2009). Auch eine Studie von Gokhale, Chandrashekala und Vasanthakumar konnte zeigen, dass es nach einer anstrengenden Trainingseinheit zu einem Anstieg von IL-6 im Plasma kommt. Anders als in der vorliegenden Studie jedoch, wurde damals festgestellt, dass dieser Anstieg bei Athleten im Vergleich zu Untrainierten weniger deutlich ausfällt (Gokhale, Chandrashekala, Vasanthakumar, 2007). Auch in einer anderen Studie hatten krankheitsanfällige Läufer im Vergleich zu gesunden Läufern einen höheren IL-6-Anstieg (Cox et al., 2007). In der Cox-Studie konnte jedoch, ähnlich wie in der vorliegenden, gezeigt werden, dass der Abfall der IL-6-Konzentration 24 Stunden nach Beendigung der Belastung bei den Gesunden größer war (Cox et al., 2007). Auch Rosa et al. zeigten, dass die mittleren IL-6-Konzentrationen bei übergewichtigen Kindern sowohl vor als auch nach einer Trainingseinheit höher lagen als bei einer gesunden Kontrollgruppe (Rosa et al., 2011)

Parallel zu den steigenden systemischen Werten an IL-6 war auch die Genexpression in PBMC durch den Marathonlauf angestiegen. Dieser Anstieg war jedoch zum einen quantitativ bei weitem nicht so ausgeprägt wie der des zirkulierenden Zytokins, zum anderen war der Effekt bei Betrachtung der Untergruppen nur bei den Leistungssportlern und Freizeitsportlern, nicht jedoch bei den (Prä-)Adipösen, signifikant.

Einige Studien haben bereits die Veränderungen der Genexpression von IL-6 in Leukozyten nach körperlicher Betätigung untersucht. Sowohl die Arbeitsgruppe von McFarlin als auch die von Natelson konnten keine Änderung der IL-6-Expression nach einem Belastungsereignis feststellen (McFarlin et al., 2004; Natelson et al., 1996), und auch in einer Studie von Nieman et al. kam es nach körperlicher Belastung auf dem Ergometer zu keinem signifikanten Anstieg der Expression dieses Zytokins (Nieman et al., 2006). Die Belastungsereignisse der genannten Studien sind allerdings an Intensität wohl nicht mit einem Marathonlauf vergleichbar. Zaldivar et al. maßen die Änderung der intrazellulären IL-6-Konzentration in T-Helfer-Lymphozyten nach Belastung auf dem Fahrrad und konnten eine Zunahme feststellen (Zaldivar et al., 2006).

Der Hauptanteil des erhöhten IL-6 im Serum stammt jedoch wohl eher aus dem Skelettmuskel (Ostrowski et al., 1998; Starkie et al., 2001; Buford, Cooke, Willoughby, 2009), was die Unterschiede zwischen der deutlichen Zunahme an zirkulierendem IL-6 und der mäßigen Zunahme der IL-6-Expression in PBMC auch in dieser Arbeit erklären dürfte.

Wie auch für die systemischen Werte beschrieben, kam es nach einem Tag bereits wieder zu einer weitestgehenden Normalisierung der Expressionsrate auf Werte vergleichbar mit dem Ausgangsniveau.

Bei Betrachtung der Menge an zirkulierendem TNF- α ist festzustellen, dass direkt nach Beendigung des Marathons noch kein Anstieg zu verzeichnen war. Vielmehr war die Serumkonzentration bezüglich der Vormessungen noch einmal, wenn auch nicht auf signifikantem Niveau, weiter abgesunken. Einen Tag nach Beendigung des Wettkampfes war jedoch in allen Gruppen ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen. Dies lässt auf eine verzögerte Antwort auf die Extrembelastung schließen. Wiederum stimmen hier die Ergebnisse mit denen von Nickel et al. überein (Nickel et al., 2011b). Andere Studien, die in der Vergangenheit die Antwort des systemischen TNF- α -Spiegels auf ein akutes Belastungsereignis untersucht hatten, konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielen. Wurden die Werte unmittelbar nach Beendigung eines Marathonlaufs oder eines anderen

anstrengenden Belastungsereignisses gemessen, kam es meistens zu keinen signifikanten Änderungen (Castell et al., 1997; Kim, Lee, Kim, 2007; Suzuki et al., 2000; Suzuki et al., 2003; McFarlin et al., 2004; Ng et al., 2008; Ostrowski et al., 1998). Ähnlich wie bei der vorliegenden Arbeit maß auch die Arbeitsgruppe von Gokhale einen Abfall unmittelbar nach einem akuten Belastungsereignis (Gokhale, Chandrashekala, Vasanthakumar, 2007). Lediglich in Studien von Camus et al. und Nieman et al. kam es nach Beendigung eines Marathonlaufs zu einem geringen Anstieg der Plasmakonzentrationen von TNF- α (Camus et al., 1997; Nieman et al., 2001). Interessanterweise konnten sowohl McFarlin et al. als auch Ostrowski et al. nachweisen, dass es nach einem Akutereignis mit zeitlicher Verzögerung zu einem Anstieg an zirkulierendem TNF- α kommt. Während die Arbeitsgruppe von Ostrowski jedoch Höchstwerte nach einer Stunde maß, kam es bei McFarlin zu einem Gipfel nach sechs Stunden, welcher sich jedoch nur nach Stimulation mit LPS zeigte (McFarlin et al., 2004; Ostrowski et al., 1999).

Die Genexpression von TNF- α in PBMC wurde durch den Marathonlauf ebenso mit einer zeitlichen Verzögerung beeinflusst. Während kurz nach Zieleinlauf die Werte noch eine abfallende Tendenz zeigten, war 24 Stunden danach ein Anstieg der Expression zu verzeichnen. Die geringere Fallzahl in den Untergruppen ist wohl auch hier als ursächlich dafür anzusehen, dass sich bei deren Betrachtung weniger signifikante Veränderungen zeigten. Vergleicht man jedoch die absoluten Werte, bestätigen sich in allen drei Gruppen die Ergebnisse des Gesamtkollektivs. Ähnlich wie bei den Serumwerten konnten auch Studien, die sich mit der Genexpression von TNF- α nach akuter körperlicher Belastung beschäftigt hatten, keine übereinstimmenden Ergebnisse erzielen. Während es in einer Studie von Natelson et al. zu einem Expressionsabfall von TNF- α nach maximaler Anstrengung auf dem Laufband kam (Natelson et al., 1996), konnten andere Arbeiten keine signifikanten Auswirkungen von akuter körperlicher Belastung auf die Genexpression in Leukozyten feststellen (McFarlin et al., 2004; Ostrowski et al., 1998; Romeo et al., 2008). In einer Arbeit von Senchina et al. wurden nach 90-minütigem Radfahren höhere TNF- α -Mengen in PBMC gemessen als vor der Belastung (Senchina et al., 2009). Ebenfalls nach Belastung auf dem Ergometer zeigten Probanden einer Studie von Zaldivar et al. einen Anstieg der TNF- α -Produktion in T-Helfer-Zellen (Zaldivar et al., 2006).

Ähnlich wie bei IL-6, jedoch nicht in demselben Maße, wird auch bei TNF- α der Skelettmuskel als wahrscheinlichste Hauptquelle für möglicherweise nach dem Sport

ansteigende zirkulierende TNF- α -Mengen diskutiert (Starkie et al., 2001; Nieman et al., 2007).

Bei der Messung unmittelbar nach Zieleinlauf zeigten sich noch keine Veränderungen bezüglich der Serumkonzentration von CRP. Am Folgetag jedoch stieg diese signifikant an. Den stärksten Anstieg zeigten hierbei die (prä)adipösen Sportler, den schwächsten die Leistungssportler. Die Werte Letzterer lagen signifikant unter denen der anderen beiden Gruppen. Diverse Studien haben gezeigt, dass Veränderungen der systemischen CRP-Werte abhängig von Dauer und Intensität der körperlichen Belastung sind. Während eine relativ kurze Trainingseinheit auf dem Laufband zu keinen signifikanten Änderungen führte (Romeo et al., 2008; Cox et al., 2009), waren solche nach Extrembelastungen eindeutig festzustellen. Doch auch hier scheinen Abstufungen erkennbar. In Studien mit Marathonläufern kam es unmittelbar nach Zieleinlauf zu keinem Anstieg an zirkulierendem CRP, jedoch nach etwa einem Tag (Castell et al., 1997; Kim, Lee, Kim, 2009; Weight, Alexander, Jacobs, 1991). Einen geringen Anstieg konnten Siegel et al. und Tomaszewski et al. bereits vier Stunden nach Beendigung eines Marathonlaufs messen (Siegel et al., 2001; Tomaszewski et al., 2003). Wurden die CRP-Konzentrationen bei noch größeren Belastungen wie einem Ultramarathon oder einem Ironman Triathlon gemessen, waren bereits während des Wettkampfes erhöhte Werte zu verzeichnen (Kim, Lee, Kim, 2007; Kim, Lee, Kim, 2009; Neubauer, König, Wanger, 2008), welche zusätzlich im Vergleich zum Marathonlauf über einen längeren Zeitraum erhöht blieben (Kim, Lee, Kim, 2009). Man geht davon aus, dass die zeitliche Verzögerung des CRP-Anstiegs darauf zurückzuführen ist, dass dieser durch eine IL-6-vermittelte Syntheseinduktion hervorgerufen wird (Castell et al., 1997). Cox et al. untersuchten zusätzlich den Einfluss des Gesundheitszustandes auf die Veränderungen der CRP-Konzentrationen nach Marathonlauf und konnten keine Unterschiede zwischen gesunden und krankheitsanfälligen Läufern finden (Cox et al., 2009). Auch die von Nickel et al. untersuchten Proben aus dieser Marathonstudie lieferten ein mit den vorliegenden Ergebnissen übereinstimmendes Bild (Nickel et al., 2011b).

Die Genexpression von CRP in PBMC zeigte sich weder direkt nach Marathonlauf noch einen Tag später von der Extrembelastung beeinflusst. Dies gilt sowohl für das Gesamtkollektiv als auch für die drei Untergruppen. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz dahingehend, dass von allen Messzeitpunkten beim letzten die wenigsten Sportler eine CRP-Expression unterhalb der Nachweisgrenze aufwiesen. Dies lässt zumindest

ansatzweise darauf schließen, dass auch die Genexpression von CRP in PBMC 24 Stunden nach Beendigung der Akutbelastung eher angestiegen ist. Den Anstieg der zirkulierenden Menge des Akute-Phase-Proteins erklärt dies jedoch nicht. Hier ist davon auszugehen, dass der Hauptanteil durch Synthese in der Leber entstanden ist und die Expression in PBMC keinen relevanten Anteil beigesteuert hatte.

Der Marathonlauf führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Genexpression von IL-1B in PBMC. Es ist tendenziell jedoch festzustellen, dass, während sich unmittelbar nach Marathonlauf die Expression eher noch abfallend darstellte, einen Tag nach dem Wettkampf höhere IL-1B-Expressionswerte festzustellen waren. Dieser Anstieg führte sowohl in der Gruppe der (Prä-)Adipösen als auch in der der Leistungssportler zu Messwerten, die sich nicht mehr signifikant vom Ausgangsniveau unterschieden. Ob dieser Tatsache größere Bedeutung beizumessen ist, ist jedoch fraglich. Diese Ergebnisse sind gut mit denen aus früheren Studien vereinbar. In den meisten Fällen resultierten anstrengende Trainingseinheiten oder gar der Lauf eines Marathons in keinen Änderungen der Plasmakonzentrationen an IL-1B (Nehlsen-Cannarella et al., 1997; Ng et al., 2008; Suzuki et al., 2000; Suzuki et al., 2003; Ostrowski et al., 1998b). Die Arbeitsgruppe von Ostrowski konnte jedoch im Rahmen einer anderen Studie einen leichten Anstieg an zirkulierendem IL-1B feststellen (Ostrowski et al., 1998; Ostrowski et al., 1999). Dahingegen kam es in einer Studie von Nieman et al. nach einem Marathonlauf zu einem geringen Abfall (Nieman et al., 2001). Auch wenn die Genexpression in PBMC gemessen wurde konnten entweder keine signifikanten Veränderungen (Natelson et al., 1996; McFarlin et al., 2004) oder eine Steigerung (Ostrowski et al., 1998; Senchina et al., 2009) nach dem Belastungsereignis festgestellt werden. Einzig Studien, die die IL-1B-Expression im Skelettmuskel nach sportlicher Betätigung untersucht hatten, konnten alle einen Anstieg messen (Ostrowski et al., 1998; Nieman et al., 2007; Buford, Cooke, Willoughby, 2009).

Durch die akute Belastung des Marathonlaufs konnten weder signifikante Ergebnisse bezüglich der IL-2-Expression in mononukleären Zellen eruiert werden, noch konnten beim Vergleich der Messwerte Tendenzen in eine bestimmte Richtung festgestellt werden. Lediglich die Betrachtung der Proben mit Werten unterhalb der Nachweisgrenze lieferte richtungsweisende Ergebnisse. Im Vergleich zur Vormessung war unmittelbar nach dem Marathonlauf ein Anstieg an Proben festzustellen, deren Expressionswerte unter der Nachweisgrenze lagen. 24 Stunden nach Zieleinlauf jedoch sank die Anzahl, es stieg also tendenziell wieder die IL-2-Expressionsrate an.

Diese Ergebnisse sind vereinbar mit denen anderer Studien, in denen durch extreme körperliche Belastung keine Beeinflussung der Expression von IL-2 in mononukleären Zellen zu erzielen war (Ibfelet et al., 2002; Natelson et al., 1996; Romeo et al., 2008). Studien, die die systemische Konzentration von IL-2 nach körperlicher Belastung gemessen hatten, konnten keine eindeutigen und übereinstimmenden Ergebnisse ermitteln (s. Einleitung).

Durch den Marathonlauf kam es zu einem Anstieg der Genexpression beider Chemokinrezeptoren, wobei dieser bei CXCR1 stärker war als bei CXCR2. Nach 24 Stunden sanken die Expressionsraten beider Rezeptoren bereits wieder. Während sie bei CXCR1 schon wieder ein Niveau erreicht hatte, das sich nicht mehr signifikant von dem vor Marathonlauf unterschied, war für CXCR2 Gegenteiliges der Fall. Wurden die Messergebnisse nach Gruppenzugehörigkeit statistisch ausgewertet, konnten diese Ergebnisse nicht mehr in dem Maße bestätigt werden. Die absoluten Werte zeigten jedoch auch in den Untergruppen diese Tendenzen. Interessant ist zudem, dass zu allen Messzeitpunkten die Expressionsrate von CXCR1 bei den (Prä-)Adipösen am niedrigsten, bei den Leistungssportlern am höchsten war. Nur wenige Studien haben sich bisher mit den Auswirkungen von akuter körperlicher Belastung auf Chemokinrezeptoren befasst. Frydelund-Larsen et al. konnten zeigen, dass nach dreistündiger Belastung auf dem Ergometer die Genexpression von CXCR2 im Skelettmuskel anstieg (Frydelund-Larsen et al., 2007). In einer Studie von Hong und Mills kam es nach 20-minütigem Laufbandlaufen zu einer Abnahme der Expression von CXCR2 auf Monozyten (Hong, Mills, 2008). Da Intensität und Dauer dieser Belastung jedoch kaum mit denen eines Marathonlaufs vergleichbar sind, gibt es für die abweichenden Ergebnisse wohl diverse Erklärungen. So könnte es zum Beispiel sein, dass es nach einem initialen Absinken zu einem konsekutiven Anstieg der CXCR-Expression nach Belastung kommt. Mehrere Studien haben die Veränderungen von IL-8, dem Liganden von CXCR1 und 2, nach körperlicher Aktivität untersucht. Hierbei zeigte sich, dass parallel zu dem in dieser Arbeit gezeigten Anstieg des Rezeptors auch ein Anstieg sowohl der Plasmakonzentration seines Liganden (Niess et al., 2000; Nieman et al., 2001; Nieman et al., 2007; Ostrowski et al., 2001; Suzuki et al., 2000; Suzuki et al., 2003), als auch seiner Expression in Leukozyten (Nieman et al., 2006; Nieman et al., 2007) zu verzeichnen war.

Sowohl im Gesamtkollektiv als auch in allen drei Einzelgruppen war unmittelbar nach Marathonlauf ein Anstieg der Genexpression der *Toll-like* Rezeptoren 2 und 4 zu messen. Nach 24 Stunden waren bereits wieder rückläufige Werte zu verzeichnen. Während sich die TLR 2-Werte jedoch im Gesamtkollektiv noch signifikant von denen vor Marathon unterschieden, waren sie in den Untergruppen wieder auf Ausgangsniveau gesunken. Sowohl im Gesamtkollektiv als auch in den einzelnen Gruppen waren die TLR 4-Expressionswerte einen Tag nach Marathon wieder auf dem Niveau vor Marathonlauf. Lediglich eine Studie von Booth et al. ermittelte ebenso einen Expressionsanstieg von TLR 2 und TLR 4 nach körperlicher Belastung (Booth et al., 2010). Andere Studien zeigten, dass die Genexpression der zwei untersuchten TLRs nach einem akuten Belastungsereignis sanken (Lancaster et al., 2005; Simpson et al., 2009; Oliveira, Gleeson, 2010), bzw. die von TLR 2 unbeeinflusst blieb (Oliveira, Gleeson, 2010). Weder Art, Intensität oder Dauer der Betätigung, noch die Wahl der Messzeitpunkte erklären diese divergierenden Ergebnisse. Nickel et al., die nur die Änderungen der TLR-Expression in den einzelnen Untergruppen untersucht hatten, kamen zu abweichenden Ergebnissen. Unmittelbar nach dem Marathon waren außer einem Abfall der TLR 4-Expression bei den Freizeitsportlern keine signifikanten Ergebnisse zu erzielen. Bei der Messung nach 24 Stunden stellten Nickel et al. jedoch einen Anstieg der TLR 4-Expression in allen drei Gruppen fest (Nickel et al., 2011b), während in der Auswertung der vorliegenden Arbeit ein Anstieg schon unmittelbar nach Zieleinlauf festgestellt wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es durch den Marathonlauf prinzipiell zu einem Anstieg der Genexpression proinflammatorischer Marker in PBMC gekommen war. Dieser Anstieg war für einige Parameter bereits unmittelbar nach Marathon feststellbar, nach 24 Stunden kam es bereits wieder zum Abklingen (IL-6, TLRs, CXCRs). Andere Marker blieben direkt nach dem Wettkampf noch unbeeinflusst oder sind leicht gesunken und zeigten einen Anstieg erst einen Tag nach dem Marathonlauf (TNF- α , IL-1B). Wiederum andere Entzündungsparameter änderten ihr Expressionsverhalten in PBMC kaum bis gar nicht (CRP, IL-2). Insgesamt waren im Vergleich zu den nach körperlicher Aktivität deutlich erhöhten zirkulierenden Werten die Veränderungen der Genexpression oft nur gering oder zumindest nicht in vergleichbarem Maße erkennbar.

4.3.2. Antiinflammatorische Prozesse

Der Marathonlauf führte sowohl im Gesamtkollektiv als auch in den Untergruppen zu einem signifikanten Anstieg der IL-10-Expression in mononukleären Zellen. Wenngleich sich die Mittelwerte in der statistischen Auswertung nicht signifikant voneinander unterschieden, so ist doch ein deutlicher Gruppeneffekt dahingehend erkennbar, dass dieser Anstieg mit steigendem Leistungsniveau zunahm. Während es bei den (prä)adipösen Sportlern zu einer 9,8-fachen Zunahme kam, waren die Werte der Freizeitsportler 21,2 mal, bei den Leistungssportlern gar 108,2 mal höher als bei der Vormessung. Da die Mittelwerte der einzelnen Gruppen nach Marathonlauf jedoch auf einem ähnlichen Niveau lagen, resultiert diese enorme Differenz aus den starken Unterschieden der Mittelwerte, die sich nach der Trainingsphase ergeben hatten. Das heißt, der enorme Anstieg der IL-10-Expression bei den Leistungssportlern war nur deshalb so groß, weil es durch die Trainingsphase zu einem überdurchschnittlich hohen Abfall der Expression gekommen war. Bei der Messung am Folgetag des Marathonlaufs hatten sich in allen Gruppen die Werte wieder auf Ausgangsniveau normalisiert. Auch für dieses Gen gab es einige Proben, bei denen die Expression unterhalb der Nachweisgrenze lag. Passend zu den absoluten Werten der Expressionsuntersuchung kam es durch den Marathonlauf zu einem Anstieg der Proben mit Werten oberhalb der Nachweisgrenze auf 100%, 24 Stunden später hatte nur noch ein Anteil von 88,37% der Proben eine messbare IL-10-Expression.

Die deutliche Zunahme der IL-10-Expression lässt sich wohl am ehesten dadurch erklären, dass es nach der akuten Extrembelastung zu einem enormen Anstieg an immunmodulatorisch wirksamem IL-6 gekommen war, welches die Synthese des antiinflammatorischen IL-10 induzierte.

Zahlreiche Studien haben die Auswirkungen von sportlicher Betätigung auf die systemischen Werte von IL-10 untersucht. Alle konnten zeigen, dass es unmittelbar nach einem Belastungsereignis zu einem Anstieg an zirkulierendem IL-10 kommt (Ostrowski et al., 1999; Suzuki et al., 2000; Suzuki et al., 2003; Nieman et al., 2001; Nieman et al., 2006; Nieman et al., 2007; Zaldivar et al., 2006; Cox et al., 2007; Neubauer, König, Wagner, 2008; Ng et al., 2008). Während Cox et al. bereits nach 24 Stunden eine Normalisierung der Plasmawerte feststellten (Cox et al., 2007), waren die Werte in der Arbeitsgruppe von Neubauer nach einem Tag noch erhöht (Neubauer, König, Wagner, 2008). Bei Untersuchungen der Expression von IL-10 in PBMC nach einem Belastungsereignis zeigten sich hingegen keine eindeutigen Ergebnisse. Wie auch in der vorliegenden Arbeit

konnten Studien der Arbeitsgruppe von Nieman eine Erhöhung der IL-10-Expression nach Belastungen auf dem Ergometer feststellen (Nieman et al., 2006; Nieman et al., 2007). Auch eine Studie von Zaldivar et al. zeigte, dass in bestimmten Lymphozytensubtypen die intrazelluläre Konzentration an IL-10 nach 30-minütiger Belastung auf dem Ergometer anstieg (Zaldivar et al., 2006). Die Arbeitsgruppe von Senchina indes, zeigte ein Absinken der Expression nach 90-minütigem Radfahren (Senchina et al., 2009). Sowohl Untersuchungen von Natelson et al. als auch von Romeo et al. ergaben keine relevanten Veränderungen der IL-10-Expression nach Sportereignissen (Natelson et al., 1996; Romeo et al., 2008). Es kann diskutiert werden, ob die Belastungen in den Studien von Nieman et al. intensiver waren als die in den anderen genannten Studien und es somit durch eine etwaige größere Zunahme an zirkulierendem IL-6 zu einer stärkeren Induktion der IL-10-Synthese gekommen war. Der Anstieg der Genexpression nach dem Marathon in der vorliegenden Arbeit wäre mit dieser Hypothese gut vereinbar.

4.3.3. Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel

In allen Gruppen kam es durch den Lauf des Marathons zu einem Anstieg der Serum-NO-Konzentration auf etwa den doppelten Wert. Nach 24 Stunden zeigten sich die Werte schon wieder deutlich rückläufig, hatten jedoch das Ausgangsniveau noch nicht wieder erreicht. Interessanterweise kam es nach dem Marathonlauf zu einem Absinken der mRNA-Menge sowohl von iNOS als auch von eNOS in den mononukleären Zellen. Während die eNOS-Expression auf etwa 60% abfiel, sank die iNOS-Expression gar auf 20% der Werte der Vormessungen. Dies könnte auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus hinweisen. Für beide Gene stiegen die Expressionswerte bereits nach 24 Stunden wieder auf Ausgangsniveau an. Signifikante Ergebnisse waren generell in den Untergruppen schwieriger zu ermitteln. Dennoch sind einige gruppenspezifische Effekte zu vermerken. Weder für die Expression von iNOS noch für die von eNOS konnten in der Gruppe der (Prä-)Adipösen signifikante Ergebnisse erzielt werden. Tendenziell ist trotzdem ein Abfall der Expression nach Zieleinlauf sowie ein Anstieg 24 Stunden später zu erkennen. Bezüglich der eNOS-Expression kam es in den beiden Gruppen normalgewichtiger Sportler zu einem signifikanten Expressionsabfall durch den Marathon, dieser war bei den Leistungssportlern deutlicher ausgeprägt. Außerdem blieb bei Letzteren im Gegensatz zu den Freizeitsportlern die Expression auch einen Tag nach Marathon noch erhöht. Bezüglich der iNOS-Expression konnten sogar nur

in der Gruppe der Leistungssportler signifikante Ergebnisse ermittelt werden. Doch auch in den anderen Gruppen ist die Tendenz zum Expressionsabfall nach Marathonlauf und einem konsekutiven Anstieg nach 24 Stunden zu erkennen. Dieser Anstieg blieb jedoch bei den Leistungssportlern weitestgehend aus. Auch ein überproportional großer Anstieg an Proben mit iNOS-Werten unterhalb der Nachweisgrenze nach dem Marathonlauf spricht für eine besondere Rolle der Leistungssportler. Nur wenige Studien haben bisher die Auswirkungen von akuter körperlicher Belastung auf den NO-Stoffwechsel untersucht. In allen kam es relativ deutlich zu einem Anstieg der NO-Produktion gemessen als dessen Abbauprodukte Nitrat und Nitrit (s. Einleitung). Anders als in der vorliegenden Arbeit kam es durch akute körperliche Belastung in den bisherigen Untersuchungen eher zu einer Steigerung der iNOS-Expression (Niess et al., 2000; Silveira et al., 2007; Marfe et al., 2010), sowohl bei Trainierten als auch bei Untrainierten (Niess et al., 2000). In einer Studie von Sureda et al. kam es zu einer Expressionssteigerung in Lymphozyten, jedoch zu einem Abfall in Neutrophilen (Sureda et al., 2006). Schwimmen als Belastungsereignis führte zu keiner Veränderung der eNOS-Expression in Monozyten bei Ratten (Silveira et al., 2007).

Es ist anzunehmen, dass die massiv erhöhten zirkulierenden Werte an NO nach dem Marathonlauf hauptsächlich auf eine gesteigerte Produktion in Endothelzellen zurückzuführen sind. Doch die bisherige Studienlage spricht ebenso für eine erhöhte NO-Produktion in immunkompetenten Zellen. Der Grund dafür, dass in dieser Studie die Expression der NO-Syntheseenzyme in PBMC jedoch nach Marathonlauf erniedrigt war, ist unklar. Einleuchtend scheint ein negativer Rückkopplungsmechanismus, ausgelöst durch erhöhtes zirkulierendes NO, das wohl am ehesten aus Endothelzellen freigesetzt worden war. Es ist jedoch auch möglich, dass es nach einem initialem Abfall zu einer kontinuierlichen Steigerung im Verlauf gekommen war und die Werte am Tag nach Marathon nicht einer Normalisierung der am Vortag erniedrigten Werte entsprach, sondern einem verzögerten Anstieg als Antwort auf die akute Belastung, der seine Spitze noch nicht erreicht hatte.

4.4. Fazit und Ausblick

Die Münchner Marathon Studie war die erste ihrer Art, die in solch umfangreichem Maße kardiovaskuläre und inflammatorische Auswirkungen von Ausdauer- und Hochleistungssport auf Personen unterschiedlicher körperlicher Konstitution untersucht hat. Mit den in dieser Teilstudie untersuchten Genen wurde ein Überblick über die Beeinflussung altbekannter sowie moderner Inflammationsmarker gegeben.

Nach zehnwöchigem Ausdauertraining zeigte sich eine Reduktion der Expression diverser proinflammatorischer Parameter (IL-6, TNF- α , IL-1B, TLR 2, TLR 4 und CXCR1) in mononukleären Zellen. Auf systemischer Ebene waren hingegen nur geringe Änderungen festzustellen. Einzig in der Gruppe der Leistungssportler kam es zu einem signifikanten Rückgang an systemischem IL-6. Es ist wohl davon auszugehen, dass die Reduktion der Genexpression in immunmodulatorischen Zellen zu keinem relevanten systemischen Effekten geführt hat oder dieser erst mit einer zeitlichen Verzögerung auftrat, so dass er möglicherweise von den Messungen nicht erfasst wurde. Inwiefern die Expression des antiinflammatorischen IL-10 durch die Trainingsphase beeinflusst wurde, konnte in dieser Studie letztlich nicht eindeutig geklärt werden, tendenziell scheint jedoch das Ausdauertraining zu einer Abnahme der IL-10-Expression geführt zu haben.

Der Marathonlauf führte zu einer deutlichen inflammatorischen Stoffwechsellage. Während die Expression einiger Marker bereits unmittelbar nach Zieleinlauf anstieg (IL-6, IL-10, TLRs, CXCRs), kam es bei TNF- α zu einer verzögerten Zunahme 24 Stunden nach Beendigung des Wettkampfes. Bei der ersten Gruppe von Genen konnten einen Tag nach der Belastung bereits wieder rückläufige bzw. normalisierte Werte gemessen werden. Wurden zusätzlich zur Genexpression auch die systemischen Werte bestimmt, zeigte sich ein übereinstimmendes Bild, was Zeitpunkt und Richtung der Änderung angeht, die systemischen Effekte waren jedoch bezüglich ihrer Intensität noch deutlicher verglichen mit den Expressionswerten.

Die Expression von CRP zeigte sich sowohl vom Ausdauertraining als auch vom Marathonlauf weitestgehend unbeeinflusst, was daran liegen mag, dass PBMC nicht als sein Hauptsyntheseort anzusehen sind. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Expression von IL-2, wobei auffällig ist, dass sowohl vor als auch nach Intervention die Expressionswerte sehr niedrig und oft nicht detektierbar waren.

Als Brücke zwischen Inflammationsgeschehen und endothelialen Prozessen war zusätzlich ein besonderes Augenmerk auf den NO-Stoffwechsel gelegt worden. Das zehnwöchige

Training führte weder zu signifikanten Änderungen der Abbauprodukte von NO im Serum, noch der Expression der Synthesenzyme iNOS und eNOS in mononukleären Zellen. Lediglich in der Gruppe der Leistungssportler, die wohl die intensivste Trainingsphase absolviert hatte, konnte eine Tendenz zur Verbesserung der NO-Verfügbarkeit in Form von erhöhten systemischen NO-Werten und gesteigerter iNOS-Synthese festgestellt werden. Durch den Marathonlauf hingegen kam es in allen Gruppen zu einem Anstieg an zirkulierendem NO, jedoch zu einem Abfall der mRNA seiner Synthesenzyme in PBMC. Es muss also davon ausgegangen werden, dass andere Gewebe die Syntheseorte des vermehrt bereitgestellten NO waren, wobei Endothelzellen als am wahrscheinlichsten gelten.

Hier könnten in Zukunft weitere Studien ansetzen, die z. B. die Genexpression von iNOS und eNOS in Endothelzellen untersuchen. Dies wäre allerdings mit einer enormen Steigerung der Invasivität bei der Materialgewinnung verbunden. Die in dieser Arbeit bereits generierten Primer für den NOS-Inhibitor DDAH könnten als Grundlage dafür dienen, die Stoffwechselwege des Stickstoffmonoxids noch genauer zu beleuchten. Ähnlich interessant ist die Expression des in der Plasmamembran von Endothelzellen exprimierten Adhäsionsmoleküls E-Selectin, für welches ebenso im Rahmen dieser Arbeit bereits Primer designt wurden.

Nach dem Training und einen Tag nach dem Marathon hatten die Leistungssportler signifikant geringere IL-6-Serumkonzentrationen als die (Prä-)Adipösen. Außerdem lagen ihre CRP-Spiegel einen Tag nach Marathonlauf unter denen der anderen zwei Gruppen. In der Genexpression konnten zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Tendenz zu einer stärkeren Reduktion der Zytokinexpression mit steigendem Leistungsniveau war jedoch zu erkennen. Hier könnten in eventuellen Folgestudien Gruppenunterschiede durch Änderungen im Studiendesign noch deutlicher herausgearbeitet werden. Hilfreich wären dabei eine Erhöhung der Fallzahl in den Einzelgruppen, sowie schärfere Gruppengrenzen. Durch engmaschigere Messungen nach oder gar während des Wettkampfes wäre es möglich den exakten zeitlichen Verlauf des Inflammationsgeschehens bei Marathonläufern widerzuspiegeln.

Neben PBMC und den bereits erwähnten Endothelzellen könnten ebenso polymorphnukleäre Zellen, Skelettmuskelzellen oder glatte Muskelzellen als Medien gewonnen werden, um Veränderungen auf systemischer Ebene genauer denen auf transkriptioneller Ebene zuordnen zu können.

5. Zusammenfassung

Geringgradige chronische Entzündungsvorgänge werden seit längerer Zeit als pathogenetisch für diverse Krankheitszustände, unter ihnen degenerative Gefäßerkrankungen, angesehen. Man weiß, dass bei Adipösen vermehrt zirkulierende Inflammationsparameter gemessen werden können. Ebenso ist bekannt, dass durch körperliche Aktivität Einfluss auf das Inflammationsgeschehen genommen werden kann. Herauszufinden, inwiefern Ausdauertraining sowie sportliche Extremlastungen zu Änderungen inflammatorischer Prozesse bei Menschen unterschiedlicher körperlicher Konstitution führen können, war Ziel dieser Studie. Hierfür durchliefen 45 männliche Teilnehmer, unter ihnen 14 (prä)adipöse Freizeitsportler (A), 16 normalgewichtige Freizeitsportler (F) und 15 Leistungssportler (L) ein zehnwöchiges aerobes Ausdauertraining, um im Anschluss einen Marathonlauf zu absolvieren. Vor und nach der Trainingsphase, unmittelbar nach Marathonende und einen Tag nach Zieleinlauf wurden Blutproben entnommen und die Genexpression von Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor α (TNF- α), C-reaktivem Protein (CRP), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 8-Rezeptor α (CXCR1), Interleukin 8-Rezeptor β (CXCR2), *Toll-like* Rezeptor 2 (TLR 2), *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR 4), induzierbarer NO-Synthase (iNOS) und endothelialer NO-Synthase (eNOS) in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) mittels *real-time* PCR gemessen. Des Weiteren wurden die Plasmakonzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO) photometrisch ermittelt und bereits vorhandene Daten zu den systemischen IL-6-, TNF- α - und CRP-Werten statistisch ausgewertet. Das Ausdauertraining führte bis auf eine 24%ige Reduktion der IL-6-Konzentration in Gruppe L zu keinen signifikanten Änderungen der zirkulierenden Inflammationsmarker. In PBMC kam es nach dem Lauftraining zu einer Reduktion der Expression von IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, CXCR1, TLR 2 und TLR 4, die Expressionsraten von CRP, IL-2, CXCR2, eNOS und iNOS wurden hingegen nicht signifikant beeinflusst. Unmittelbar nach dem Marathonlauf wurden im Vergleich zur Vormessung signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-6 und NO gemessen, während die von TNF- α und CRP erst 24 Stunden nach Marathonende erhöht waren. Auch die Expression von IL-6, IL-10, CXCR1, CXCR2, TLR 2 und TLR 4 stieg sofort nach dem Lauf an, diejenige von TNF- α jedoch erst nach 24 Stunden. Die Expressionswerte von eNOS und iNOS hingegen sanken durch das Belastungsereignis, während die von CRP, IL-1 β und IL-2 keine signifikanten Ergebnisse lieferten. Wurden die Werte zwischen den

drei Gruppen verglichen, so konnten nur bei den Plasmakonzentrationen wenige signifikante Unterschiede ermittelt werden, nicht jedoch bei den Expressionswerten. So war in Gruppe L nach der Trainingsphase und einen Tag nach Marathonlauf IL-6 signifikant niedriger als in Gruppe A und beim letzten Messzeitpunkt CRP signifikant niedriger als in den anderen beiden Gruppen.

Insgesamt erzielte also das Ausdauertraining durch eine Reduktion der Expression proinflammatorischer Parameter einen antiinflammatorischen Effekt. Durch die sportliche Extremlastung hingegen kam es zu einem Anstieg an zirkulierenden Entzündungsparametern sowie zu deren vermehrter Synthese in PBMC. Signifikante Unterschiede, die sich auf Körpermasse und Trainingszustand der Teilnehmer zurückführen ließen, konnten nicht ermittelt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abernethy, T.J., Avery, O.T. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with c polysaccharide of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 73 (1941) 173-182
- Abramson, J.L., Vaccarino, V. Relationship Between Physical Activity and Inflammation Among Apparently Healthy Middle-aged and Older US Adults. *Arch. Intern. Med.* 162 (2002) 1286-1292
- Abreu, M.T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L.S., Arnold, E.T., Arditi, M. Decreased Expression of Toll-Like Receptor-4 and MD-2 Correlates with Intestinal Epithelial Cell Protection Against Dysregulated Proinflammatory Gene Expression in Response to Bacterial Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 167 (2001) 1609-1616
- Addison, C.L., Daniel, T.O., Burdick, M.D., Liu, H., Ehlert, J.E., Xue, Y.Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., Strieter, R.M. The CXC Chemokine Receptor 2, CXCR2, Is the Putative Receptor for ELR+ CXC Chemokine-Induced Angiogenic Activity. *J. Immunol.* 165 (2000) 5269-5277
- Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., van Dyke, T., Pulendran, B. Cutting Edge: Different Toll-Like Receptor Agonists Instruct Dendritic Cells to Induce Distinct Th Responses via Differential Modulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Fos. *J. Immunol.* 171 (2003) 4984-4989
- Ahuja, S.K., Murphy, P.M. The CXC Chemokines Growth-regulated Oncogene (GRO) α , GRO β , GRO γ , Neutrophil-activating Peptide-2, and Epithelial Cell-derived Neutrophil-activating Peptide-78 Are Potent Agonists for the Type B, but Not the Type A, Human Interleukin-8 Receptor. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 20545-20550
- Akerstrom, T., Steensberg, A., Keller, P., Keller, C., Penkowa, M., Pedersen, B.K. Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 563 (2005) 507-516
- Alexandraki, K.I., Piperi, C., Ziakas, P.D., Apostolopoulos, N.V., Makrilakis, K., Syriou, V., Diamanti-Kandarakis, E., Kaltsas, G., Kalofoutis, A. Cytokine Secretion in Long-standing Diabetes Mellitus Type 1 and 2: Associations with Low-grade Systemic Inflammation. *J. Clin. Immunol.* 28 (2008) 314-321
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF κ B by Toll-like receptor 3. *Nature.* 413 (2001) 732-738
- Aliprantis, A.O., Yang, R.-B., Mark, M.R., Sugget, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., Zychlinsky, A. Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins Through Toll-like Receptor-2. *Science.* 285 (1999) 736-739
- Alm, P., Ekström, P., Henningson, R., Lundquist, I. Morphological evidence for the existence of nitric oxide and carbon monoxide pathways in the rat islets of Langerhans: An immunocytochemical and confocal microscopical study. *Diabetologia.* 42 (1999) 978-986

- Al-Ramadi, B.K., Meissler, J.J., Huang, D., Eisenstein, T.K. Immunosuppression induced by nitric oxide and its inhibition by interleukin-4. *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 2249-2254
- Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Tran-Thi, T.-A., Decker, K., Heinrich, P.C. Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) in hepatocyte primary cultures. *Eur. J. Biochem.* 173 (1988) 287-293
- Arai, M.H., Duarte, A.J.S., Natale, V.M. The effects of long-term endurance training on the immune and endocrine systems of elderly men: the role of cytokines and anabolic hormones. *Immun. Ageing.* 3 (2006)
- Arancio, O., Antonova, I., Gambaryan, S., Lohmann, S.M., Wood, J.S., Lawrence, D.S., Hawkins, R.D. Presynaptic Role of cGMP-Dependent Protein Kinase during Long-Lasting Potentiation. *J. Neurosci.* 21 (2001) 143-149
- Ashida, K., Miyazaki, K., Takayama, E., Tsujimoto, H., Ayaori, M., Yakushiji, T., Iwamoto, N., Yonemura, A., Isoda, K., Mochizuki, H., Hiraide, H., Kusuhara, M., Ohsuzu, F. Characterization of the Expression of TLR2 (Toll-like Receptor 2) and TLR4 on Circulating Monocytes in Coronary Artery Disease. *J. Atheroscler. Thromb.* 12 (2005) 53-60
- Aznar, C., Fitting, C., Cavaillon, J.-M. Lipopolysaccharide-induced production of cytokines by bone marrow-derived macrophages: dissociation between intracellular interleukin 1 production and interleukin 1 release. *Cytokine.* 2 (1990) 259-265
- Bacon, K., Baggiolini, M., Broxmeyer, H., Horuk, R., Lindley, I., Mantovani, A., Matsushima, K., Murphy, P., Nomiyama, H., Oppenheim, J., Rot, A., Schall, T., Tsang, M., Thorpe, R., van Damme, J., Wadhwa, M., Yoshie, O., Zlotnik, A., Zoon, K. (IUIS/WHO Subcommittee on chemokine nomenclature). Chemokine/Chemokine Receptor Nomenclature. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 22 (2002) 1067-1068
- Bai, X.-H., Fischer, S., Keshavjee, S., Liu, M. Heparin interference with reverse transcriptase polymerase chain reaction of RNA extracted from lungs after ischemia-reperfusion. *Transplant. Int.* 13 (2000) 146-150
- Ballou, S.P., Lozanski, G., Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine.* 4 (1992) 361-368
- Banzet, S., Koulmann, N., Simler, N., Sacher, H., Chapot, R., Serrurier, B., Peinnequin, A., Bigard, X. Control of gluconeogenic genes during intense/prolonged exercise: hormone-independent effect of muscle-derived IL-6 on hepatic tissue and PEPCK mRNA. *J. Appl. Physiol.* 107 (2009) 1830-1839
- Barr, T.A., Brown, S., Ryan, G., Zhao, J., Gray, D. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 3040-3053
- Baumann, H., Onorato, V., Gauldie, J., Jahreis, G.P. Distinct Sets of Acute Phase Plasma Proteins Are Stimulated by Separate Human Hepatocyte-stimulating Factors and Rat Hepatoma Cells. *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9756-9768

- Benveniste, E.N., Sparacio, S.M., Norris, J.G., Grenett, H.E., Fuller, G.M. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 30 (1990) 201-212
- Beshgetoor, D., Arrues, S., McGuire, K. Effect of competitive training on T-cell mediated immune function in Master's female athletes. *Int. J. Sports. Med.* 25 (2004) 553-558
- Beutler, J.L., Falkoff, R.J.M., Fauci, A.S. Development of a human T-cell hybridoma secreting separate B-cell growth and differentiation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81 (1984) 2475-2478
- Beutler, B.A., Milsark, I.W., Cerami, A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J. Immunol.* 135 (1985) 3972-3977
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R., Fiers, W., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 (1986) 4533-4537
- Bhagat, K., Vallance, P. Inflammatory Cytokines Impair Endothelium-Dependent Dilatation in Human Veins In Vivo. 96 (1997) 3042-3047
- Billiar, T.R., Curran, R.D., Ferrari, F.K., Williams, D.L., Simmons, R.L. Kupffer Cell: Hepatocyte Cocultures Release Nitric Oxide in Response to Bacterial Endotoxin. *J. Surg. Res.* 48 (1990) 349-353
- Blackman, M.A., Tigges, M.A., Minie, M.E., Koshland, M.E. A Model System for Peptide Hormone Action in Differentiation: Interleukin 2 Induces a B Lymphoma to Transcribe the J Chain Gene. *Cell.* 47 (1986) 609-617
- Blair, S.N., Kohl, H.W., Paffenbarger, R.S., Clark, D.G., Cooper, K.H., Gibbons, L.W. Physical Fitness and All-Cause Mortality (A Prospective Study of Healthy Men and Women). *JAMA.* 262 (1989) 2395-2401
- Boekholdt, S.M., Hack, C.E., Sandhu, M.S., Luben, R., Bingham, S.A., Wareham, N.J., Peters, R.J.G., Jukema, W., Day, N.E., Kastelein, J.J.P., Khaw, K.-T. C-reactive protein levels and coronary artery disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: The EPIC-Norfolk prospective population study 1993-2003. *Atherosclerosis.* 187 (2006) 415-422
- Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Brandes, R.P., Phivthong-ngam, L., Böhme, M., Nafe, R., Mügge, A., Fröhlich, J.C. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation.* 96 (1997) 1282-1290
- Bogdan, C., Vodovotz, Y., Paik, J., Xie, Q.-W., Nathan, C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 55 (1994) 227-233
- Boisvert, W.A., Santiago, R., Curtiss, L.K., Terkeltaub, R.A. A Leukocyte Homologue of the IL-8 Receptor CXCR-2 Mediates the Accumulation of Macrophages in Atherosclerotic Lesions of LDL Receptor-deficient Mice. *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 353-363
- Bonecchi, R., Facchetti, F., Dusi, S., Luini, W., Lissandrini, D., Simmelink, M., Locati, M., Bernasconi, S., Allavena, P., Brandt, E., Rossi, F., Mantovani, A., Sozzani, S.

- Induction of Functional IL-8 Receptors by IL-4 and IL-13 in Human Monocytes. *J. Immunol.* 164 (2000) 3862-3869
- Bonnard, G.D., Yasaka, K., Jacobson, D. Ligand-Activated T Cell Growth Factor-Induced Proliferation: Absorption of T Cell Growth Factor by Activated T Cells. *J. Immunol.* 123 (1979) 2704-2708
- Booth, S., Florida-James, G.D., McFarlin, B.K., Spielmann, G., O'Connor, D.P., Simpson, R.J. The impact of acute strenuous exercise on TLR2, TLR4 and HLA.DR expression in human blood monocytes induces by autologous serum. *Eur. J. Appl. Physiol.* 110 (2010) 1259-1268
- Borth, W., Urbanski, A., Prohaska, R., Susani, M., Luger, T.A. Binding of Recombinant Interleukin-1 β to the Third Complement Component and α_2 -Macroglobulin After Activation of Serum by Immune Complexes. *Blood.* 75 (1990) 2388-2395
- Bosenberg, A.T., Brock-Utne, J.G., Gaffin, S.L., Wells, M.T.B., Blake, G.T.W. Strenuous exercise causes systemic endotoxemia. *J. Appl. Physiol.* 65 (1988) 106-108
- Braida, D., Sacerdote, P., Panerai, A.E., Bianchi, M., Aloisi, A.M., Iosue, S., Sala, M. Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice. *Behav. Brain. Res.* 153 (2004) 423-429
- Braun, J., Bollow, M., Neure, L., Seipelt E., Seyrekbasan, F., Herbst, H., Eggens, U., Distler, A., Sieper, J. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis. Rheum.* 38 (1995) 499-505
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Snyder, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 347 (1990) 768-770
- Bredt, D.S., Snyder, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 (1989) 9030-9033
- Bredt, D.S., Snyder, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 (1990) 682-685
- Breland, U.M., Halvorsen, B., Hol, J., Øie, E., Paulsson-Berne, G., Yndestad, A., Smith, C., Otterdal, K., Hedin, U., Wæhre, T., Sandberg, W.J., Frøland, S.S., Haraldsen, G., Gullestad, L., Damås, J.K., Hansson, G.K., Aukrust, P. A Potential Role of the CXC Chemokine GRO α in Atherosclerosis and Plaque Destabilization (Downregulatory Effects of Statins). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 1005-1011
- Bruunsgaard, H., Bjerregaard, E., Schroll, M., Pedersen, B.K. Muscle Strength After Resistance Training Is Inversely Correlated With Baseline Levels of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors in the Oldest Old. *J. Am. Geriatr. Soc.* 52 (2004) 237-241
- Buford, T.W., Cooke, M.B., Willoughby, D.S. Resistance exercise-induced changes of inflammatory gene expression within human skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 107 (2009) 463-471
- Bühner, M., Ziegler, M. „Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler“, Post-hoc-Test, Pearson Studium, München, 2009, 545-559

- Bury, T.B., Louis, R., Radermecker, M.F., Pirnay, F. Blood mononuclear cells mobilization and cytokines secretion during prolonged exercises. *Int. J. Sports. Med.* 17 (1996) 156-160
- Busse, R., Mülsch, A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS. Lett.* 275 (1990) 87-90
- Bussolino, F., Camussi, G., Baglioni, C. Synthesis and Release of Platelet-activating Factor by Human Vascular Endothelial Cells Treated with Tumor Necrosis Factor or Interleukin 1 α . *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 11856-11861
- Calabró, P., Willerson, J.T., Yeh, E.T.H. Inflammatory Cytokines Stimulated C-Reactive Protein Production by Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation.* 108 (2003) 1930-1932
- Campbell, K.L., Campbell, P.T., Ulrich, C.M., Wener, M., Alfano, C.M., Foster-Schubert, K., Rudolph, R.E., Potter, J.D., McTiernan, A. No Reduction in C-Reactive Protein following a 12-Month Randomized Controlled Trial of Exercise in Men and Women. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 17 (2008) 1714-1718
- Campos, M.A.S., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procópio, D.O., Travassos, L.R., Smith, J.A., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T. Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. *J. Immunol.* 167 (2001) 416-423
- Camus, G., Nys, M., Poortmans, J.-R., Venneman, I., Monfils, T., Deby-Dupont, G., Juchmès-Ferir, A., Deby, C., Lamy, M., Duchateau, J. Endotoxaemia, production of tumor necrosis factor α and polymorphonuclear neutrophil activation following strenuous exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 79 (1998) 62-68
- Camus, G., Poortmans, J.-R., Nys, M., Deby-Dupont, G., Duchateau, J., Deby, C., Lamy M. Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. *Clin. Sci. (Lond).* 92 (1997) 415-422
- Cao, F., Castrillo, A., Tontonoz, P., Re, F., Byrne, G.I. *Chlamydia pneumoniae*-Induced Macrophage Foam Cell Formation Is Mediated by Toll-Like Receptor 2. *Infect. Immun.* 75 (2007) 253-259
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72 (1975) 3666-3670
- Casey, L.C., Balk, R.A., Bone, R.C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann. Intern. Med.* 119 (1993) 771-778
- Cassatella, M.A., Meda, L., Gasperini, S., Calzetti, F., Bonora, S. Interleukin 10 (IL-10) Upregulates IL-1 Receptor Antagonist Production from Lipopolysaccharide-stimulated Human Polymorphonuclear Leukocytes by Delaying mRNA Degradation. *J. Exp. Med.* 179 (1994) 1695-1699
- Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., David, M., Hirano, T., Kishimoto, T., Heinrich, P.C. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 232 (1988) 347-350

- Castell, L.M., Poortmans, J.R., Leclercq, R., Brasseur, M., Duchateau, J., Newsholme, E.A. Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 75 (1997) 47-53
- Cesari, M., Penninx, B.W.J.H., Newman, A.B., Kritchevsky, S.B., Nicklas, B.J., Sutton-Tyrrel, K., Rubin, S.M., Ding, J., Simonsick, E.M., Harris, T.B., Pahor, M. Inflammatory Markers and Onset of Cardiovascular Events. Results From the Health ABC Study. *Circulation.* 108 (2003) 2317-2322
- Cesari, M., Penninx, B.W.J.H., Pahor, M., Lauretani, F., Corsi, A.M., Williams, G.R., Guralnik, J.M., Ferrucci, L. Inflammatory Markers and Physical Performance in Older Persons: The InCHIANTI Study. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 59 (2004) 242-248
- Chand, N., Altura, B.M. Acetylcholine and Bradykinin Relax Intrapulmonary Arteries by Acting on Endothelial Cells: Role in Lung Vascular Diseases. *Science.* 213 (1981) 1376-1379
- Chen, C.-N., Hsieh, F.-J., Cheng, Y.-M., Chang, K.-J., Lee, P.-H. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in Angiogenesis and Clinical Outcome of Human Gastric Cancer. *J. Surg. Oncol.* 94 (2006) 226-233
- Chen, L., Frister, A., Wang, S., Ludwig, A., Behr, H., Pippig, S., Li, B., Simm, A., Hofmann, B., Pilowski, C., Koch, S., Buerke, M., Rose-John, S., Werdan, K., Loppnow, H. Interaction of vascular smooth muscle cells and monocytes by soluble factors synergistically enhances IL-6 and MCP-1 production. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 296 (2009) H987-H996
- Chernoff, A.E., Granowitz, E.V., Shapiro, L., Vannier, E., Lonnemann, G., Angel, J.B., Kennedy, J.S., Rabson, A.R., Wolff, S.M., Dinarello, C.A. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J. Immunol.* 154 (1995) 5492-5499
- Chi, H., Messas, E., Levine, R.A., Graves, D.T., Amar, S. Interleukin-1 Receptor Signaling Mediates Atherosclerosis Associated With Bacterial Exposure and/or High-Fat Diet in a Murine Apolipoprotein E Heterozygote Model: Pharmacotherapeutic Implications. *Circulation.* 110 (2004) 1678-1685
- Cho, H.J., Xie, Q.-W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.L., Nathan, C. Calmodulin Is a Subunit of Nitric Oxide Synthase from Macrophages. *J. Exp. Med.* 176 (1992) 599-604
- Chuang, T.H., Ulevitch, R.J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur. Cytokine. Netw.* 11 (2000) 372-378
- Chuang, T.H., Ulevitch, R.J. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1518 (2001) 157-161
- Chuntharapai, A., Lee, J., Hébert, C.A., Kim, K.J. Monoclonal Antibodies Detect Different Distribution Patterns of IL-8 Receptor A and IL-8 Receptor B on Human Peripheral Blood Leukocytes. *J. Immunol.* 153 (1994) 5682-5688
- Church, T.S., Cheng, Y.J., Earnest, C.P., Barlow, C.E., Gibbons, L.W., Priest, E.L., Blair, S.N. Exercise Capacity and Body Composition as Predictors of Mortality Among Men With Diabetes. *Diabetes Care.* 27 (2004) 83-88

- Church, T.S., Earnest, C.P., Thompson, A.M., Priest, E., Rodante, R.Q., Saunders, T., Ross, R., Blair, S.N. Exercise without Weight Loss Does Not Reduce C-Reactive Protein: The INFLAME Study. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 42 (2010) 708-716
- Cianchi, F., Cortesini, C., Fantappiè, O., Messerini, L., Sardi, I., Lasagna, N., Perna, F., Fabbroni, V., Di Felice, A., Perigli, G., Mazzanti, R., Masini, E. Cyclooxygenase-2 Activation Mediates the Proangiogenic Effect of Nitric Oxide in Colorectal Cancer. *Clin. Cancer. Res.* 10 (2004) 2694-2704
- Cifone, M.G., D'Alò, S., Parroni, R., Millimaggi, D., Biordi, L., Martinotti, S., Santoni, A. Interleukin-2-Activated Rat Natural Killer Cells Express Inducible Nitric Oxide Synthase That Contributes to Cytotoxic Function and Interferon-gamma Production. *Blood.* 93 (1999) 3876-3884
- Cocks, T.M., Angus, J.A. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature.* 305 (1983) 627-630
- Cohen, R.A., Weisbrod, R.M., Gericke, M., Yaghoubi, M., Bierl, C., Bolotina, V.M. Mechanism of Nitric Oxide-Induced Vasodilatation: Refilling of Intracellular Stores by Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase and Inhibition of Store-Operated Ca^{2+} Influx. *Circ. Res.* 84 (1999) 210-219
- Colahan, P.T., Kollias-Bakert, C., Leutenegger, C.M., Jones, J.H. Does Training effect mRNA Transcription for Cytokine Production in Circulating Leucocytes? *Equine. Vet. J. Suppl.* 34 (2002) 154-158
- Colbert, L.H., Visser, M., Simonsick, E.M., Tracy, R.P., Newman, A.B., Kritchevsky, S.B., Pahor, M., Taaffe, D.R., Brach, J., Rubin, S., Harris, T.B. Physical Activity, Exercise, and Inflammatory Markers in Older Adults: Findings from the Health, Aging and Body Composition Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 52 (2004) 1098-1104
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J.Y., Butcher, E.C., Laudanna, C. Chemokines Trigger Immediate $\beta 2$ Integrin Affinity and Mobility Changes: Differential Regulation and Roles in Lymphocyte Arrest under Flow. *Immunity.* 13 (2000) 759-769
- Cox, A.J., Pyne, D.B., Saunders, P.U., Callister, R., Gleeson, M. Cytokine responses to treadmill running in healthy and illness-prone athletes. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 39 (2007) 1918-1926
- Cui, S., Reichner, J.S., Mateo, R.B., Albina, J.E. Activated Murine Macrophages Induce Apoptosis in Tumor Cells Through Nitric Oxide-dependent or -independent Mechanisms. *Cancer. Res.* 54 (1994) 2462-2467
- Cunha, F.Q., Moncada, S., Liew, F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- γ in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182 (1992) 1155-1159
- Curb, J.D., Abbott, R.D., Rodriguez, B.L., Sakkinen, P., Popper, J.S., Yano, K., Tracy, R.P. C-Reactive Protein and the Future Risk of Thromboembolic Stroke in Healthy Men. *Circulation.* 107 (2003) 2016-2020
- Degliantoni, G., Murphy, M., Kobayashi, M., Francis, M.K., Perussia, B., Trinchieri, G. Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic

- factor (Relationship with Tumor Necrosis Factor and synergism with Immune Interferon). *J. Exp. Med.* 16 (1985) 1512-1530
- Dekker, M.J., Lee, S., Hudson, R., Kilpatrick, K., Graham, T.E., Ross, R., Robinson, L.E. An exercise intervention without weight loss decreases circulating interleukin-6 in lean and obese men with and without type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 56 (2007) 332-338
- De Mey, J.G., Claeys, M., Vanhoutte, P.M. Endothelium-Dependent Inhibitory Effects of Acetylcholin, Adenosine Triphosphate, Thrombin and Arachidonic Acid in the Canine Femoral Artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222 (1982) 166-173
- Dimitrov, S., Lange, T., Born, J. Selective Mobilization of Cytotoxic Leukocytes by Epinephrine. *J. Immunol.* 184 (2010) 503-511
- Dinarello, C.A., Ikejima, T., Warner, S.J., Orencole, S.F., Lonnemann, G., Cannon, J.G., Libby, P. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol.* 139 (1987) 1902-1910
- Ding, A.H., Nathan, C.F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J., Srimal, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors $-\beta 1$ $-\beta 2$ and $-\beta 3$ inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . *J. Immunol.* 145 (1990) 940-944
- Ding, A.H., Nathan, C.F., Stuehr, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141 (1988) 2407-2412
- Ding, L., Shevach, E.M. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J. Immunol.* 148 (1992) 3133-3139
- Di Rosa, M., Radomski, M., Carnuccio, R., Moncada, S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 (1990) 1246-1252
- DiSanto, J.P., Müller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., Rajewsky, K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor γ chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (1995) 377-381
- Donnikov, A.E., Shkurnikov, M.Y., Akimov, E.B., Grebenyuk, E.S., Khaustova, S.A., Shahmatova, E.M., Tonevitsky, A.G. Effect of a Six-Hour Marathon Ultra-Race on the Levels of IL-6, LIF, and SCF. *Bull. Exp. Biol. Med.* 148 (2009) 819-821
- Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G.K., Yan, Z.-Q. Expression of Toll-Like Receptors in Human Atherosclerotic Lesions. A Possible Pathway for Plaque Activation. *Circulation.* 105 (2002) 1158-1161
- Endres, S., Cannon, J.G., Ghorbani, R., Dempsey, R.A., Sisson, S.D., Lonnemann, G., Van der Meer, J.W.M., Wolff, S.M., Dinarello, C.A. *In vitro* production of IL1 β , IL1 α , TNF and IL2 in healthy subjects: distribution, effect of cyclooxygenase inhibition and evidence of independent gene regulation. *Eur. J. Immunol.* 19 (1989) 2327-2333
- Engström, G., Hedblad, B., Janzon, L. Hypertensive men who exercise regularly have lower rate of cardiovascular mortality. *J. Hypertens.* 17 (1999) 737-742

- Erzurum, S.C., Ghosh, S., Janocha, A.J., Xu, W., Bauer, S., Bryan, N.S., Tejero, J., Hemann, C., Hille, R., Stuehr, D.J., Feelisch, M., Beall, C.M. Higher blood flow and circulating NO products offset high-altitude hypoxia among Tibetans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 17593-17598
- Esposito, K., Pontillo, A., Di Palo, C., Giugliano, G., Masella, M., Marfella, R., Giugliano, D. Effect of Weight Loss and Lifestyle Changes on Vascular Inflammatory Markers in Obese Women. A Randomized Trial. *JAMA.* 289 (2003a) 1799-1804
- Esposito, K., Pontillo, A., Giugliano, F., Giugliano, G., Marfella, R., Nicoletti, G., Giugliano, D. Association of Low Interleukin-10 Levels with the Metabolic Syndrome in Obese Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003b) 1055-1058
- Ettehadi, P., Greaves, M.W., Wallach, D., Aderka, D., Camp, R.D.R. Elevated tumour necrosis factor alpha (TNF- α) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin. Exp. Immunol.* 96 (1994) 146-151
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., Bahouth, S.W. Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues in Obese Humans. *Endocrinology.* 145 (2004) 2273-2283
- Festa, A., D'Agostino, R., Tracy, R.P., Haffner, S.M. Elevated Levels of Acute-Phase Proteins and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Predict the Development of Type 2 Diabetes (The Insulin Resistance Atherosclerosis Study). *Diabetes.* 51 (2002) 1131-1137
- Fiedler, L.R., Bojciak-Stothard, B. The DDAH/ADMA pathway in the control of endothelial cell migration and angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 37 (2009) 1243-1247
- Fielding, R.A., Manfredi, T.J., Ding, W., Fiatarone, M.A., Evans, W.J., Cannon, J.G. Acute phase response in exercise III. Neutrophil and IL-1 β accumulation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative. Comp. Physiol.* 265 (1993) R166-R172
- Filonzi, E.L., Zoellner, H., Stanton, H., Hamilton, J.A. Cytokine regulation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor production in human arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 99 (1993) 241-252
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W., Mosmann, T.R. Two types of mouse T helper cell (IV. Th2 Clones Secrete a Factor that Inhibits Cytokine Production by Th1 Clones). *J. Exp. Med.* 170 (1989) 2081-2095
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., O'Garra, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146 (1991) 3444-3451
- Flynn, M.G., McFarlin, B.K., Phillips, M.D., Stewart, L.K., Timmerman, K.L. Toll-like receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-trained elderly women. *J. Appl. Physiol.* 95 (2003) 1833-1842
- Fried, S.K., Bunkin, D.A., Greenberg, A.S. Omental and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 847-850

- Fry, R.W., Morton, A.R., Crawford, G.P., Keast, D. Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 64 (1992) 218-227
- Frydelund-Larsen, L., Penkowa, M., Akerstrom, T., Zankari, A., Nielsen, S., Pedersen, B.K. Exercise induces interleukin-8 receptor (CXCR2) expression in human skeletal muscle. *Exp. Physiol.* 92 (2007) 233-240
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288 (1980) 373-376
- Gabriel, H.H.W., Scharhag, J., Rätz, M., Kindermann, W. Charakterisierung der sofortigen Leukozytose nach anaerober Belastung (Characterization of the immediate leukocytosis after anaerobic exercise). *Dtsch. Z. Sportmed.* 54 (2003) 274-280
- Gabriel, H.H.W., Schwarz, L., Born, P., Kindermann, W. Differential mobilization of leucocyte and lymphocyte subpopulations into the circulation during endurance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 65 (1992) 529-534
- Gabriel, H.H.W., Urhausen, A., Kindermann, W. Mobilization of circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations during and after short, anaerobic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 65 (1992) 164-170
- Gaffen, S.L., Wang, S., Koshland, M.E. Expression of the immunoglobulin J chain in a murine B lymphoma is driven by autocrine production of interleukin 2. *Cytokine.* 8 (1996) 513-524
- Galbo, H., Holst, J.J., Christensen, N.J. Glucagon and plasma catecholamin responses to graded and prolonged exercise in man. *J. Appl. Physiol.* 38 (1975) 70-76
- Galea, E., Feinstein, D.L., Reis, D.J. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 (1992) 10945-10949
- Garman, R.D., Jacobs, K.A., Clark, S.C., Raulet, D.H. B-cell-stimulatory factor 2 (β_2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 (1987) 7629-7633
- Gatanaga, T., Hwang, C., Kohr, W., Cappuccini, F., Lucci, J.A., Jeffers, E.W.B., Lentz, R., Tomich, J., Yamamoto, R.S., Granger, G.A. Purification and characterization of an inhibitor (soluble tumor necrosis factor receptor) for tumor necrosis factor and lymphotoxin obtained from the serum ultrafiltrates of human cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 (1990) 8781-8784
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., Baumann, H. Interferon β_2 / B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 (1987) 7251-7255
- Geffken, D.F., Cushman, M., Burke, G.L., Polak, J.F., Sakkinen, P.A., Tracy, R.P. Association between Physical Activity and Markers of Inflammation in a Healthy Elderly Population. *Am. J. Epidemiol.* 153 (2001) 242-250

- Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone, M.A., Luster, A.D., Luscinskas, F.W., Rosenzweig, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 398 (1999) 718-723
- Ghezzi, P., Dinarello, C.A. IL-1 induces IL-1. III. Specific inhibition of IL-1 production by IFN- γ . *J. Immunol.* 140 (1988) 4238-4244
- Gielen, S., Adams, V., Linke, A., Erbs, S., Möbius-Winkler, S., Schubert, A., Schuler, G., Hambrecht, R. Exercise training in chronic heart failure: correlation between reduced local inflammation and improved oxidative capacity in the skeletal muscle. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 12 (2005) 393-400
- Gielen, S., Adams, V., Möbius-Winkler, S., Linke, A., Erbs, S., Yu, J., Kempf, W., Schubert, A., Schuler, G., Hambrecht, R. Anti-Inflammatory Effects of Exercise Training in the Skeletal Muscle of Patients With Chronic Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42 (2003) 861-868
- Gillis, S., Baker, P.E., Ruscetti, F.W., Smith, K.A. Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J. Exp. Med.* 148 (1978) 1093-1098
- Gillis, S., Ferm, M.M., Ou, W., Smith, K.A. T Cell Growth Factor: Parameters of Production and a Quantitative Microassay for Activity. *J. Immunol.* 120 (1978) 2027-2032
- Glaum, M.C., Wang, Y., Raible, G., Schulman, E.S. Degranulation influences heparin-associated inhibition of RT-PCR in human lung mast cells. *Clin. Exp. Allergy.* 31 (2001) 1631-1635
- Gleeson, M., Bishop, N.C. The T Cell and NK Cell Immune Response to Exercise. *Ann. Transplant.* 10 (2005) 43-48
- Goodwin, B.L., Pendleton, L.C., Levy, M.M., Solomonson, L.P., Eichler, D.C. Tumor necrosis factor- α reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 293 (2007) H1115-H1121
- Gokhale, R., Chandrashekar, S., Vasanthakumar, K.C. Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes- an adaptive response. *Cytokine.* 40 (2007) 123-127
- Graham, D. A., Rush, J.W.E. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneous hypertensive rats. *J. Appl. Physiol.* 96 (2004) 2088-2096
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moto, G., Ricciardi-Castagnoli, P. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* 2 (2001) 882-888
- Gray, A.B., Teleford, R.D., Collins, M., Weidemann, M.J. The response of leukocyte subsets and plasma hormones to interval exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 25 (1993) 1252-1258
- Greiwe, J.S., Cheng, B., Rubin, D.C., Yarasheski, E., Semenkovich, C.F. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor α in frail elderly humans. *FASEB J.* 15 (2001) 475-482

- Griffith, T.M., Edwards, D.H., Lewis, M.J., Newby, A.C., Henderson, A.H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*. 308 (1984) 645-647
- Grijalva, J., Hicks, S., Zhao, X., Medikayala, S., Kaminski, P.M., Wolin, M.S., Edwards, J.G. Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Cardiovasc. Diabetol.* 7 (2008) 34
- Haahr, P.M., Pedersen, B.K., Fomsgaard, A., Tvede, N., Diamant, M., Klarlund, K., Halkjaer-Kristensen, J., Bendtzen, K. Effect of physical exercise on in vitro production of interleukin 1, interleukin 6, tumour necrosis factor-alpha, interleukin-2 and interferon-gamma. *Int. J. Sports. Med.* 12 (1991) 223-227
- Haddy, N., Sass, C., Drosch, S., Zaiou, M., Siest, G., Ponthieux, A., Lambert, D., Visvikis, S. IL-6, TNF- α and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population: the STANISLAS cohort. *Atherosclerosis*. 170 (2003) 277-283
- Haider, D.G., Leuchten, N., Schaller G., Gouya, G., Kolodjaschna, J., Schmetterer, L., Kapiotis, S., Wolzt, M. C-reactive protein is expressed and secreted by peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.* 146 (2006) 533-539
- Hakim, T.S., Sugimori, K., Camporesi, E.M., Andersen, G. Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiol. Meas.* 17 (1996) 267-277
- van Hall, G., Steensberg, A., Sacchetti, M., Fischer, C., Keller, C., Schjerling, P., Hiscock, N., Møller, K., Saltin, B., Febbraio, M.A., Pedersen, B.K. Interleukin-6 Stimulates Lipolysis and Fat Oxidation in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 3005-3010
- Halle, M., Korsten-Reck, U., Wolfarth, B., Berg, A. Low-grade systemic inflammation in overweight children: impact of physical fitness. *Exerc. Immunol. Rev.* 10 (2004) 66-74
- Hammond, M.E., Lapointe, G.R., Feucht, P.H., Hilt, S., Gallegos, C.A., Gordon, C.A., Giedlin, M.A., Mullenbach, G., Tekamp-Olsen, P. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J. Immunol.* 155 (1995) 1428-1433
- van Haperen, R., de Waard, M., van Deel, E., Mees, B., Kutryk, M., van Aken, T., Hamming, J., Grosveld, F., Dunckers, D.J., de Crom, R. Reduction of Blood Pressure, Plasma Cholesterol, and Atherosclerosis by Elevated Endothelial Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 48803-48807
- Haq, A., Al-Hussein, K., Lee, J., Al-Sedairy, S. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets associated with marathon running. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 25 (1993) 186-190
- He, H., Genovese, K.J., Nisbert, D.J., Kogut, M.H. Profile of Toll-like receptor expressions and induction of nitric oxide synthesis by Toll-like receptor agonists in chicken monocytes. *Mol. Immunol.* 43 (2006) 783-789
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science*. 303 (2004) 1526-1529
- Heo, S.-K., Yun, H.-J., Noh, E.-K., Park, W.-H., Park, S.-D. LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production. *Immunol. Lett.* 120 (2008) 57-64

- Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M. Nitric Oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157 (1988) 87-94
- Higgins, G.C., Foster, J.L., Postlethwaite, A.E. Interleukin 1 β Propeptide Is Detected Intracellularly and Extracellularly When Human Monocytes Are Stimulated with LPS In Vitro. *J. Exp. Med.* 180 (1994) 607-614
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T., Kishimoto, T. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 324 (1986) 73-76
- Holmes, W.E., Lee, L., Kuang, W.-J., Rice, G.C., Wood, W.I. Structure and Functional Expression of a Human Interleukin-8 Receptor. *Science.* 253 (1991) 1278-1280
- Hong, S., Mills, P.J. Effects of an Exercise Challenge on Mobilization and Surface Marker Expression of Monocyte Subsets in Individuals with Normal vs. Elevated Blood Pressure. *Brain. Behav. Immun.* 22 (2008) 590-599
- Hopkins, S.J., Meager, A. Cytokines in synovial fluid: II. The presence of tumor necrosis factor and interferon. *Clin. Exp. Immunol.* 73 (1988) 88-92
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. Cutting Edge: Toll-like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *J. Immunol.* 162 (1999) 3749-3752
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., Spiegelman, B.M. Increased Adipose Tissue Expression of Tumor Necrosis Factor- α in Human Obesity and Insulin Resistance. *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 2409-2415
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science.* 259 (1993) 87-91
- Houston, D.S., Shepherd, J.T., Vanhoutte, P.M. Adenine nucleotides, serotonin, and endothelium-dependent relaxations to platelets. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 248 (1985) H389-H395
- Hundt, M., Zielinska-Skowronek, M., Schmidt, R.E. Lack of specific receptors of C-reactive protein on white blood cells. *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 3475-3483
- Ibfeft, T., Petersen, E.W., Bruunsgaard, H., Sandmand, M., Pedersen B.K. Exercise-induced change in type 1 cytokine-producing CD8⁺ T cells is related to a decrease in memory T cells. *J. Appl. Physiol.* 93 (2002) 645-648
- Iemitsu, M., Miyauchi, T., Maeda, S., Yuki, K., Kobayashi, T., Kumagai, Y., Shimojo, N., Yamaguchi, I., Matsuda, M. Intense exercise causes decrease in expression of both endothelial NO synthase and tissue NO_x level in hearts. *Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative. Comp. Physiol.* 179 (2000) R951-R959

- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 (1987) 9265-9269
- Ignarro, L.J., Harbison, R.G., Wood, K.S., Kadowitz, P.J. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237 (1986) 893-900
- Ikebuchi, K., Wong, G.G., Clark, S.C., Ihle, J.N., Hirai, Y., Ogawa, M. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 (1987) 9035-9039
- Ikejima, T., Okusawa, S., Ghezzi, P., van der Meer, J.W., Dinarello, C.A. Interleukin-1 induces tumor necrosis factor (TNF) in human peripheral blood mononuclear cells in vitro and a circulating TNF-like activity in rabbits. *J. Infect. Dis.* 162 (1990) 215-223
- Indolfi, C., Torella, D., Coppola, C., Curcio, A., Rodriguez, F., Bilancio, A., Leccia, A., Arcucci, O., Falco, M., Leosco, D., Chiariello, M. Physical Training Increases eNOS Vascular Expression and Activity and Reduces Restenosis After Balloon Angioplasty or Arterial Stenting in Rats. *Circ. Res.* 91 (2002) 1190-1197
- Jabs, W.J., Theissing, E., Nitschke, M., Bechtel J.F.M., Duchrow, M., Mohamed, S., Jahrbeck, B., Sievers, H.H., Steinhoff, J., Bartels, C. Local Generation of C-Reactive Protein in Diseased Coronary Artery Venous Bypass Grafts and Normal Vascular Tissue. *Circulation.* 108 (2003) 1428-1431
- Jansen, A., Cook, T., Taylor, G.M., Largen, P., Riveros-Moreno, V., Moncada, S., Cattell, V. Induction of nitric oxide synthase in rat immune complex glomerulonephritis. *Kidney. Int.* 45 (1994) 1215-1219
- Janssens, S.P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D.B., Bloch, K.D. Cloning and Expression of a cDNA Encoding Human Endothelium-derived Relaxing Factor/Nitric Oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 14519-14522
- Johnstone, M.T., Creager, S.J., Scales, K.M., Cusco, J.A., Lee, B.K., Creager, M.A. Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients With Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Circulation.* 88 (1993) 2510-2516
- Jung, S.H., Park, H.S., Kim, K.-S., Choi, W.H., Ahn, C.W., Kim, B.T., Kim, S.M., Lee, S.Y., Ahn, S.M., Kim, Y.K., Kim, H.J., Kim, D.J., Lee, K.-W. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J. Nutr. Biochem.* 19 (2008) 371-375
- Jyothi, M.D., Khar, A. Interleukin-2-Induced Nitric Oxide Synthase and Nuclear Factor- κ B Activity in Activated Natural Killer Cells and the Production of Interferon- γ . *Scand. J. Immunol.* 52 (2000) 148-155
- Kalayoglu, M.V., Byrne, G.I. Induction of Macrophage Foam Cell Formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 177 (1998) 725-729
- Kawakami, K., Kakimoto, K., Shinbori, T., Onoue, K. Signal delivery by physical interaction and soluble factors from accessory cells in the induction of receptor-mediated

- T-cell proliferation. Synergistic effect of BSF-2/IL-6 and IL-1. *Immunology*. 67 (1989) 324-320
- Kawashima, S., Yamashita, T., Ozaki, M., Ohashi, Y., Azumi, H., Inoue, N., Hirata, K.-I., Hayashi, Y., Itoh, H., Yokoyama, M. Endothelial NO Synthase Overexpression Inhibits Lesion Formation in Mouse Model of Vascular Remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 201-207
- Keating, S.E., Maloney, G.M., Moran, E.M., Bowie, A.G. IRAK-2 Participates in Multiple Toll-like Receptor Signaling Pathways to NF κ B via Activation of TRAF6 Ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 33435-33443
- Keller, C., Keller, P., Giralt, M., Hidalgo, J., Pedersen, B.K. Exercise normalises overexpression of TNF- α in knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321 (2004) 179-182
- Keller, C., Steensberg, A., Pilegaard, H., Osada, T., Saltin, B., Pedersen, B.K., Neuffer, D. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J.* 15 (2001) 2748-2750
- Keller, J.R., Bartelmez, S.H., Sitnicka, E., Ruscetti, F.W., Ortiz, M., Gooya, J.M., Jacobsen, S.E.W. Distinct and Overlapping Direct Effects of Macrophage Inflammatory Protein-1 α and Transforming Growth Factor β on Hematopoietic Progenitor/Stem Cell Growth. *Blood*, 84 (1994) 2175-2181
- Kern, P.A., Saghizadeh, M., Ong, J.M., Bosch, R.J., Deem, R., Simsolo, R.B. The Expression of Tumor Necrosis Factor in Human Adipose Tissue (Regulation by Obesity, Weight Loss, and Relationship to Lipoprotein Lipase). *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 2111-2119
- Khatri, V.P., Fehniger, T.A., Baiocchi, R.A., Yu, F., Shah, M.H., Schiller, D.S., Gould, M., Gazzinelli, R.T., Bernstein, Z.P., Caligiuri, M.A. Ultra Low Dose Interleukin-2 Therapy Promotes a Type 1 Cytokine Profile In Vivo in Patients with AIDS and AIDS-associated Malignancies. *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 1373-1378
- Kilbourne, R.G., Belloni, P. Endothelial Cell Production of Nitrogen Oxides in Response to Interferon γ in Combination With Tumor Necrosis Factor, Interleukin-1, or Endotoxin. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82 (1990) 772-776
- Kim, H.J., Lee, Y.H., Kim, C.K. Biomarkers of muscle and cartilage damage and inflammation during a 200 km run. *Eur. J. Appl. Physiol.* 99 (2007) 443-447
- Kim, H.J., Lee, Y.H., Kim, C.K. Changes in serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP), plasma CPK and plasma hs-CRP in relation to running distance in a marathon (42.195 km) and an ultra-marathon (200 km) race. *Eur. J. Appl. Physiol.* 105 (2009) 765-770
- Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., Seishima, M. Lack of Interleukin-1 β Decreases the Severity of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 656-660

- Kirk, S.L., Regan, M.C., Barbul, A. Cloned murine T lymphocytes synthesize a molecule with the biological characteristics of nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (1990) 660-665
- Klatt, P., Schmidt, K., Mayer, B. Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *Biochem. J.* 288 (1992) 15-17
- Klefanoff, S.J., Vadas, M.A., Harlan, J.M., Sparks, L.H., Gamble, J.R., Agosti, J.M., Waltersdorff, A.M. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol.* 136 (1986) 4220-4225
- Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M.J., Moncada, S. Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem. J.* 269 (1990) 207-210
- Kobzik, L., Reid, M.B., Bredt, D.S., Stamler, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 372 (1994) 546-548
- Koglin, J., Glysing-Jensen, T., Mudgett, J.S., Russell, M.E. Exacerbated Transplant Arteriosclerosis in Inducible Nitric Oxide-Deficient Mice. *Circulation.* 97 (1998) 2059-2065
- Kohase, M., Henriksen-DeStefano, D., May, L.T., Vilcek, J., Sehgal, P.B. Induction of β_2 -Interferon by Tumor Necrosis Factor: A Homeostatic Mechanism in the Control of Cell Proliferation. *Cell.* 45 (1986) 659-666
- Kojda, G., Cheng, Y.C., Burchfield, J., Harrison, D.G. Dysfunctional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Expression in Response to Exercise in Mice Lacking One eNOS Gene. *Circulation.* 103 (2001) 2839-2844
- Kohase, M., May, L.T., Tamm, I., Vilcek, J., Sehgal, P.B. Cytokine Network in Human Diploid Fibroblasts: Interactions of β -Interferons, Tumor Necrosis Factor, Platelet-Derived Growth Factor, and Interleukin-1. *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 273-280
- Kokkinos, P., Myers, J., Nysten, E., Panagiotakos, D.B., Manolis, A., Pittaras, A., Blackman, M.R., Jacob-Issac, R., Faselis, C., Abella, J., Singh, S. Exercise Capacity and All-Cause Mortality in African American and Caucasian Men With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 32 (2009) 623-628
- Kotake, S., Sato, K., Kim, K.J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., Yamaguchi, A., Kishimoto, T., Suda, T., Kashiwazaki, S. Interleukin-6 and Soluble Interleukin-6 Receptors in the Synovial Fluids from Rheumatoid Arthritis Patients Are Responsible for Osteoclast-like Cell Formation. *J. Bone. Miner. Res.* 11 (1996) 88-95
- Kuhlencordt, P.J., Chen, J., Han, F., Astern, J., Huang, P.L. Genetic Deficiency of Inducible Nitric Oxide Synthase Reduces Atherosclerosis and Lowers Plasma Lipid Peroxides in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *Circulation.* 103 (2001b) 3099-3104
- Kuhlencordt, P.J., Gyurko, R., Han, F., Scherrer-Crosbie, M., Aretz, T.A., Hajjar, R., Picard, M.H., Huang, P.L. Accelerated Atherosclerosis, Aortic Aneurysm Formation, and Ischemic Heart Disease in Apolipoprotein E/Endothelial Nitric Oxide Synthase Double-Knockout Mice. *Circulation.* 104 (2001a) 448-454
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Müller, W. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell.* 75 (1993) 263-274

- Kunz, D., Mühl, H., Walker, G., Pfeilschifter, J. Two distinct signaling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (1994) 5387-5391
- Kushner, I., Jiang, S.-L., Zhang, D., Lozanski, G., Samols, D. Do Post-transcriptional Mechanisms Participate in Induction of C-reactive Protein and Serum Amyloid A by IL-6 and IL-1? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 762 (1995) 102-107
- Kwon, N.S., Stuehr, D.J., Nathan, C.F. Inhibition of Tumor Cell Ribonucleotide Reductase by Macrophage-derived Nitric Oxide. *J. Exp. Med.* 174 (1991) 761-767
- Lamas, S., Michel, T., Brenner, B.M., Marsden, P.A. Nitric oxide synthesis in endothelial cells: evidence for a pathway inducible by TNF- α . *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 261 (1991) C634-C641
- Lancaster, G.I., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A.E., Drayson, M.T., Gleeson, M. The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J. Physiol.* 563 (2005) 945-955
- Larsen, A.I., Aukrust, P., Aarsland, T., Dickstein, K. Effect of Aerobic Exercise Training on Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor Alpha in Patients With Heart Failure. *Am. J. Cardiol.* 88 (2001) 805-808
- Larsson, E.L. Mechanism of T cell activation. II. Antigen- and lectin-dependent acquisition of responsiveness to TCGF is a nonmitogenic, active response of resting T cells. *J. Immunol.* 126 (1981) 1323-1326
- Lee, J., Horuk, R., Rice, G.C., Bennett, G.L., Camerato, T., Wood, W.I. Characterization of Two High Affinity Human Interleukin-8 Receptors. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 16283-16287
- Lee, K.C., Wong, M., McIntyre, D. Characterization of macrophage subpopulations responsive to activation by endotoxin and lymphokines. *J. Immunol.* 126 (1981) 2474-2479
- Lee, S.-J., Kim, W.-J., Moon, S.-K. TNF- α regulates vascular smooth muscle cell responses in genetic hypertension. *Int. Immunopharmacol.* 9 (2009) 837-843
- LeMay, L.G., Otterness, I.G., Vander, A.J., Kluger, M.J. In vivo evidence that the rise in plasma IL 6 following injection of a fever-inducing dose of LPS is mediated by IL 1 β . *Cytokine.* 2 (1990) 199-204
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J.A. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell.* 86 (1996) 973-983
- Lewicki, R., Tchórzewski, H., Majewska, E., Nowak, Z., Baj, Z. Effect of maximal physical exercise in T-lymphocyte subpopulations and on interleukin 1 (IL 1) and interleukin 2 (IL 2) production in vitro. *Int. J. Sports. Med.* 9 (1988) 114-117
- Libby, P., Ordovas, J.M., Auger, K.R., Robbins, A.H., Birinyi, L.K., Dinarello, C.A. Endotoxin and Tumor Necrosis Factor Induce Interleukin-1 Gene Expression in Adult Human Vascular Endothelial Cells. *Am. J. Pathol.* 124 (1986) 179-185

- Lima, E., Cuevas, M.J., Garatachea, N., Baldini, M., Almar, M. Gonzalez-Gallego, J. Eccentric exercise induces nitric oxide synthase expression through nuclear factor kappaB modulation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 108 (2010) 575-583
- Lira, F.S., Koyama, C.H., Yamashita, A.S., Rosa, J.C., Zanchi, N.E., Batista, M.L., Seelaender, M., C. Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. *Cell. Biochem. Funct.* 27 (2009b) 458-461
- Lira, F.S., Rosa, J.C., Yamashita, A.S., Koyama, C.H., Batista M.L., Seelaender, M. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF- α ratio in rat adipose tissue. *Cytokine.* 45 (2009) 80-85
- Littlewood, A.J., Russell, J., Harvey, G.R., Hughes, D.E., Russell, R.G., Gowen, M. The modulation of the expression of IL-6 and its receptors in human osteoblasts in vitro. *Endocrinology.* 129 (1991) 1513-1520
- Lloyd, A.R., Biragyn, A., Johnston, J.A., Taub, D.D., Xu, L., Michiel, D., Sprenger, H., Oppenheim, J.J., Kelvin, D.J. Granulocyte-Colony Stimulating Factor and Lipopolysaccharide Regulate the Expression of Interleukin 8 Receptors on Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 28188-28192
- Loetscher, H., Gentz, R., Zulauf, M., Lustig, A., Tabuchi, H., Schlaeger, E.-J., Brockhaust, M., Gallati, H., Manneberg, M., Lesslauer, W. Recombinant 55-kDa Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor (Stoichiometry of binding to TNF α and TNF β and inhibition of TNF activity). *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 18324-18329
- Lord, P.C.W., Wilmoth, L.M.G., Mizel, S.B., McCall, C.E. Expression of Interleukin-1 α and β Genes by Human Blood Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 1312-1321
- Lu, Q., Ceddia, M.A., Price, E.A., Ye, S.-M., Woods, J.A. Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytolysis in young and old mice. *Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative. Comp. Physiol.* 276 (1999) R482-R489
- Ludmer, P.L., Selwyn, A.P., Shook, T.L., Wayne, R.R., Mudge, G.H., Alexander, R.W., Ganz, P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 315 (1986) 1046-1051
- Lyngsø, D., Simonsen, L., Bülow, J. Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue. *J. Physiol.* 543 (2002) 379-386
- Mabika, M., Laburn, H. The role of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) in fever and the acute phase reaction in rabbits. *Pflugers. Arch.* 438 (1999) 218-223
- Mackay, F., Browning, F.L., Lawton, P., Shah, S.A., Comiskey, M., Bhan, A.K., Mizoguchi, E., Terhorst, C., Simpson, S.J. Both the Lymphotoxin and Tumor Necrosis Factor Pathways Are Involved in Experimental Murine Models of Colitis. *Gastroenterology.* 115 (1998) 1464-1475
- MacLeod, C.M., Avery, O.T. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. II. Isolation and properties of the reactive protein. *J Exp. Med.* 73 (1941) 183-190

- MacNaul, K.L., Hutchinson, N.I. Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 1330-1334
- Maeda, S., Miyauchi, T., Kakiyama, T., Sugawara, J., Iemitsu, M., Irukayama-Tomobe, Y., Murakami, H., Kumagai, Y., Kuno, S., Matsuda, M. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. *Life. Sci.* 69 (2001) 1005-1016
- Manigrasso, M.R., Ferroni, P., Santhilli, F., Taraborelli, T., Guagnano, M.T., Michetti, N., Davì, G. Association between Circulating Adiponectin and Interleukin-10 Levels in Android Obesity: Effect of Weight Loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 5876-5879
- Männel, D.N., Moore, R.N., Mergenhagen, S.E. Macrophages as a Source of Tumoricidal Activity (Tumor Necrotizing Factor). *Infect. Immun.* 30 (1980) 523-530
- Marfe, G., Tafani, M., Pucci, B., Di Stefano, C., Indelicato, M., Andreoli, A., Russo, M.A., Sinibaldi-Salimei, P., Manzi, V. The effect of marathon on mRNA expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins and sirtuins family in male recreational long-distance runners. *BMC. Physiol.* 10 (2010) 7
- Margeli, A., Skenderi, K., Tsironi, M., Hantzi, E., Matalas, A.-L., Vrettou, C., Kanavakis, E., Chrousos, G., Papassotiropoulos, I. Dramatic Elevation of Interleukin-6 and Acute-Phase Reactants in Athletes Participating in the Ultradistance Foot Race Spartathlon: Severe Systemic Inflammation and Lipid and Lipoprotein Changes in Prolonged Exercise. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 3914-3918
- Matthwes, N. Tumor-necrosis factor from the rabbit. II. Production by monocytes. *Br. J. Cancer.* 38 (1978) 310-315
- May, L.T., Torcia, G., Cozzolino, F., Ray, A., Tatter, S.B., Santhanam, U., Sehgal, P.B., Stern, D. Interleukin-6 gene expression in human endothelial cells: RNA start sites, multiple IL-6 proteins and inhibition of proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 (1989) 991-998
- Mayer, B., John, M., Böhme, E. Purification of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum: Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS. Lett.* 277 (1990) 215-219
- Mazzone, A., De Servi, S., Vezzoli, M., Fossati, G., Mazzucchelli, I., Gritti, D., Ottini, E., Mussini, A., Specchia, G. Plasma levels of interleukin 2, 6, 10 and phenotypic characterization of circulating T lymphocytes in ischemic heart disease. *Atherosclerosis.* 145 (1999) 369-374
- McAllister, R.M., Price, E.M. Effects of exercise training on vasodilatory protein expression and activity in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 110 (2010) 1019-1027
- McCall, T.B., Boughton-Smith, N.K., Palmer, R.M.J., Whittle, J.R., Moncada, S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. *Biochem. J.* 261 (1989) 293-296
- McCall, T.B., Palmer, R.M.J., Moncada, S. Interleukin-8 inhibits the induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186 (1992) 680-685

- McFarlin, B.K., Flynn, M.G., Campbell, W.W., Stewart, L.K., Timmerman, K.L. TLR4 Is Lower in Resistance-Trained Older Women and Related to Inflammatory Cytokines. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 36 (2004) 1876-1883
- McMillan, K., Brecht, D.S., Hirsch, D.J., Snyder, S.H., Clark, J.E., Masters, B.S.S. Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 (1992) 11141-11145
- Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, MR., Logenbock, D.T., Luster, A.D. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 407-417
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388 (1997) 394-397
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., Janeway, C.A. MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. *Mol. Cell.* 2 (1998) 253-258
- Mehta, J.L., Chen, L.Y., Kone, B.C., Mehta, P., Turner, P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 125 (1995) 370-377
- Meier, A., Kirschning, C.J., Nikolaus, T., Wagner, H., Heesemann, J., Ebel, F. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell. Microbiol.* 5 (2003) 561-570
- Mellion, B.T., Ignarro, L.J., Ohlstein, E.H., Pontecorvo, E.G., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J. Evidence for the Inhibitory Role of Guanosine 3',5'-Monophosphate in ADP-Induced Human Platelet Aggregation in the Presence of Nitric Oxide and Related Vasodilators. *Blood.* 57 (1981) 946-955
- Merhi-Soussi, F., Kwak, B.R., Magne, D., Chadjichristos, C., Berti, M., Pelli, G., James, R.W., Mach, F., Gabay, C. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc. Res.* 66 (2005) 583-593
- Methe, H., Kim, J.-O., Kofler, S., Weis, M., Nabauer, M., Koglin, J. Expansion of Circulating Toll-Like Receptor 4-Positive Monocytes in Patients With Acute Coronary Syndrome. *Circulation.* 111 (2005) 2654-2661
- Michelsen, K.S., Aicher, A., Mohaupt, M., Hartung, T., Dimmeler, S., Kirschning, C.J., Schumann, R.R. The Role of Toll-like Receptors (TLRs) in Bacteria-induced Maturation of Murine Dendritic Cells (DCs) (Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2). *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 25680-25686
- Michelsen, K.S., Wong, M.H., Shah, P.K., Zhang, W., Yano, J., Doherty, T.M., Akira, S., Rajavashisth, T.B., Arditi, M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (2004) 10679-10684
- Miller, M.R., Okubo, K., Roseberry, M.J., Webb, D.J., Megson, I.L. Extracellular Nitric Oxide Release Mediates Soluble Guanylate Cyclase-Independent Vasodilator Action of

- Spermine NONOate: Comparison with Other Nitric Oxide Donors in Isolated Rat Femoral Arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 43 (2004) 440-451
- Miller, Y.I., Viriyakosol, S., Binder, C.J., Feramisco, J.R., Kirkland, T.N., Witztum, J.L. Minimally Modified LDL Binds to CD14, Induces Macrophage Spreading via TLR4/MD-2, and Inhibits Phagocytosis of Apoptotic Cells. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 1561-1568
- Miossec, P., Cavender, D., Ziff, M. Production of interleukin 1 by human endothelial cells. *J. Immunol.* 136 (1986) 2486-2491
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D.R., Miles, J.M., Yudkin, J.S., Klein, S., Coppel, S.W. Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- α , *in Vivo*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 4196-4200
- Mohaupt, M.G., Elzie, J.L., Ahn, K.Y., Clapp, W.L., Wilcox, C.S., Kone, B.C. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney. Int.* 46 (1994) 653-665
- Mold, C., Baca, R., Du Clos, T.W. Serum Amyloid P Component and C-Reactive Protein Opsonize Apoptotic Cells for Phagocytosis through Fc γ Receptors. *J. Autoimmun.* 19 (2002) 147-154
- Mold, C., Gresham, H.D., Du Clos, T.W. Serum Amyloid P Component and C-Reactive Protein Mediate Phagocytosis Through Murine Fc γ Rs. *J. Immunol.* 166 (2001) 1200-1205
- Mold, C., Rodriguez, W., Rodic-Polic, B., Du Clos, T.W. C-Reactive Protein Mediates Protection from Lipopolysaccharide Through Interaction With Fc γ R. *J. Immunol.* 169 (2002) 7019-7025
- Monaco, C., Gregan, S.M., Navin, T.J., Foxwell, B.M.J., Davies, A.H., Feldmann, M. Toll-Like Receptor-2 Mediates Inflammation and Matrix Degradation in Human Atherosclerosis. *Circulation.* 120 (2009) 2462-2469
- Moore, P.K., Wallace, P., Gaffen, Z., Hart, S.L., Babbedge, R.C. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br. J. Pharmacol.* 110 (1993) 219-224
- Morishita, T., Tsutsui, M., Shimokawa, H., Horiuchi, M., Tanimoto, A., Suda, O., Tasaki, H., Huang, P.L., Sasaguri, Y., Yanagihara, N., Nakashima, Y. Vasculoprotective roles of neuronal nitric oxide synthase. *FASEB. J.* 16 (2002) 1994-1996
- Moroi, M., Zhang, L., Yasuda, T., Virmani, R., Gold, H.K., Fishman, M.C., Huang, P.L. Interaction of Genetic Deficiency of Endothelial Nitric Oxide, Gender, and Pregnancy in Vascular Response to Injury in Mice. *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 1225-1232
- Moyer, C.F., Sajuthi, D., Tulli, H., Williams, J.K. Synthesis of IL-1 Alpha and IL-1 Beta by Arterial Cells in Atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 138 (1991) 951-960
- Mullick, A.E., Tobias, P.S., Curtiss, L.K. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptors 2. *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3149-3156
- Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K., Kishimoto, T. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* 167 (1988) 332-344

- Muscari, C., Gamberini, C., Carboni, M., Basile, I., Farruggia, G., Bonafè, F., Giordano, E., Caldarera, C.M., Guarnieri, C. Different Expression of NOS Isoforms in Early Endothelial Progenitor Cells Derived From Peripheral and Cord Blood. *J. Cell. Biochem.* 102 (2007) 992-1001
- Musicki, B., Liu, T., Strong, T., Jin, L., Laughlin, M.H., Turk, J.R., Burnett, A.L. Low-Fat Diet and Exercise Preserve eNOS Regulation and Endothelial Function in the Penis of Early Atherosclerotic Pigs: A Molecular Analysis. *J. Sex. Med.* 5 (2008) 552-561
- Nabah, Y.N.A., Losada, M., Estellés, R., Mateo, T., Company, C., Piqueras, L., Lopez-Gines, C., Sarau, H., Cortijo, J., Morcillo, E.J., Jose, P.J., Sanz, M.-J. CXCR2 Blockade Impairs Angiotensin II Induced CC Chemokine Synthesis and Mononuclear Leukocyte Infiltration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 2370-2376
- Nakamura, N., Yoshida, M., Umeda, M., Huang, Y., Kitajima, S., Inoue, Y., Ishikawa, I., Iwai, T. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from *Porphyroma gingivalis* facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism. *Atherosclerosis.* 196 (2008) 59-67
- Nakane, M., Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Förstermann, U., Murad, F. Cloned brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS. Lett.* 316 (1993) 175-180
- Nakata, S., Tsutsui, M., Shimokawa, H., Suda, O., Morishita, T., Shibata, K., Yatera, Y., Sabanai, K., Tanimoto, A., Nagasaki, M., Tasaki, H., Sasaguri, Y., Nakashima, Y., Otsuji, Y., Yanagihara, N. Spontaneous Myocardial Infarction in Mice Lacking All Nitric Oxide Synthase Isoforms. *Circulation.* 117 (2008) 2211-2223
- Natelson, B.H., Zhou, X., Ottenweller, J.E., Bergen, M.T., Sisto, S.A., Drastal, S., Tapp, W.N., Gause, W.L. Effect of acute exhausting exercise on cytokine gene expression in men. *Int. J. Sports. Med.* 17 (1996) 299-302
- Navarro, F., Bacurau, A.V.N., Almeida, S.S., Barros, C.C., Moraes, M.R., Pesquero, J.L., Ribeiro, S.M.L., Araújo, R.C., Costa Rosa, L.F.B.P., Bacurau, R.F.P. Exercise prevents the effects of experimental arthritis on the metabolism an function of immune cells. *Cell. Biochem. Funct.* 28 (2010) 266-273
- Nehlsen-Cannarella, S.L., Fagoaga, O.R., Nieman, D.C., Henson, D.A., Butterworth, D.E., Schmitt, R.L., Bailey, E.M., Warren, B.J., Utter, A., Davis, J.M. Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *J. Appl. Physiol.* 82 (1997) 1662-1667
- Neubauer, O., König, D., Wagner, K.-H. Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. *Eur. J. Appl. Physiol.* 104 (2008) 417-426
- Ng, Q.Y., Lee, K.W., Byrne, C., Ho, T.F., Lim, C.L. Plasma Endotoxin and Immune Response During a 21-km Road Race Under a Warm and Humid Environment. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 37 (2008) 307-314
- Nickel, T., Emslander, I., Sisic, Z., David, R., Schmaderer, C., Marx, N., Schmidt-Trucksäss, A., Hoster, E., Halle, M., Weis, M., Hanssen, H. Modulation of dendritic cells and toll-like receptors by marathon running. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1. September 2011 (2011b) (DOI 10.1007/s00421-011-2140-8)

- Nickel, T., Hanssen, H., Emslander, I., Drexel, V., Hertel, G., Schmidt-Trucksäss, A., Summo, C., Susic, Z., Lambert, M., Hoster, E., Halle, M., Weis, M. Immunomodulatory Effects of Aerobic Training in Obesity. *Mediators. Inflamm.* 2011 (2011a) Article ID 308965
- Niebauer, J., Maxwell, A.J., Lin, P.S., Wang, D., Tsao, P.S., Cooke, J.P. NOS inhibition accelerates atherogenesis: reversal by exercise. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 285 (2003) H535-H540
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Davis, J.M., Dumke, C.L., Utter, A.C., Murphy, E.A., Pearce, S., Gojanovich, G., McAnulty, S.R., McAnulty, L.S. Blood leukocyte mRNA expression for IL-10, IL-1Ra, and IL-8, but not IL-6, increases after exercise. *J. Interferon, Cytokine. Res.* 26 (2006) 668-674
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Davis, J.M., Murphy, E.A., Jenkins, D.P., Gross, S.J., Carmichael, M.D., Quindry, J.C., Dumke, C.L., Utter, A.C., McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Triplett, N.T., Mayer, E.P. Quercetin's influence on exercise-induced changes in plasma cytokines and muscle and leukocyte cytokines mRNA. *J. Appl. Physiol.* 103 (2007) 1728-1735
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Gusewitch, G., Warren, B.J., Dotson, R.C., Butterworth, D.E., Nehlsen-Cannarella, S.L. Physical activity and immune function in elderly women. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 25 (1993) 823-831
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Johnson, R., Lebeck, L., Davis, J.M., Nehlsen-Cannarella, S.L. Effects of brief, heavy exertion on circulating lymphocyte subpopulations and proliferative response. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 24 (1992) 1339-1345
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Smith, L.L., Utter, A.C., Vinci, D.M., Davis, J.M., Kaminsky, D.E., Shute, M. Cytokine changes after a marathon race. *J. Appl. Physiol.* 91 (2001) 109-114
- Nieman, D.C., Johannsen, L.M., Lee, J.W., Arabatzis, K. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 30 (1990a) 316-328
- Nieman, D.C., Nehlsen-Cannarella, S.L., Donohue, K.M., Chritton, D.B.W., Haddock, B.L., Stout, R.W., Lee, J.W. The effects of acute moderate exercise on leukocyte and lymphocyte subpopulations. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 23 (1991) 578-585
- Nieman, D.C., Nehlsen-Cannarella, S.L., Fagoaga, O.R., Henson, D.A., Utter, A., Davis, J.M., Williams, F., Butterworth, D.E. Influence of mode and carbohydrate on the cytokine response to heavy exertion. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 30 (1998) 671-678
- Nieman, D.C., Nehlsen-Cannarella, S.L., Markoff, P.A., Balk-Lamerton, A.J., Yang, H., Chritton, D.B., Lee, J.W., Arabatzis, K. The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. *Int. J. Sports Med.* 11 (1990b) 467-473
- Niess, A.M., Fehrenbach, E., Schlotz, E., Northoff, H., Dickhuth, H.-H. Basal expression of leukocyte iNOS-mRNA is attenuated in moderately endurance-trained subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 87 (2002) 93-95

- Niess, A.M., Sommer, M., Schlotz, E., Northoff, H., Dickhutz, H.-H., Fehrenbach, E., Expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human leukocytes: response to running exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 32 (2000) 1220-1225
- Niessner, A., Richter, B., Penka, M., Steiner, S., Strasser, B., Ziegler, S., Heeb-Elze, E., Zorn, G., Leitner-Heinschink, A., Niessner, C., Wojta, J., Huber, K. Endurance training reduces circulating inflammatory markers in persons at risk of coronary events: Impact on plaque stabilization? *Atherosclerosis*. 186 (2006) 160-165
- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.-M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., Loetscher, M., Baggiolini, M., Moser, B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 382 (1996) 833-835
- Ockene, I.S., Matthews, C.E., Rifai, N., Ridker, P.M., Reed, G., Stanek, E. Variability and Classification Accuracy of Serial High-Sensitivity C-Reactive Protein Measurements in Healthy Adults. *Clin. Chem.* 47 (2001) 444-450
- Ogawa, K., Oka, J., Yamakawa, J., Higuchi, M. Habitual exercise did not affect the balance of type 1 and type 2 cytokines in elderly people. *Mech. Ageing. Dev.* 124 (2003) 951-956
- Oh, S., Yun, B.S., Ryoo, I.J., McCaslin, P.P., Yoo, I.D. Nitric oxide synthase inhibitor decreases NMDA-induced elevations of extracellular glutamate and intracellular Ca^{2+} levels via cGMP-independent mechanism in cerebellar granule neurons. *Arch. Pharm. Res.* 22 (1999) 48-54
- Ohara, Y., Peterson, T.E., Harrison, D.G. Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 2546-2551
- Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 141 (1988) 1543-1549
- Okada, M., Sakaguchi, N., Yoshimura, N., Hara, H., Shimizu, K., Yoshida, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, S., Yamamura, Y., Kishimoto, T. B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J. Exp. Med.* 157 (1983) 583-590
- Oliveira, M., Gleeson, M. The influence of prolonged cycling on monocyte Toll-like receptor 2 and 4 expression in healthy men. *Eur. J. Appl. Physiol.* 109 (2010) 251-257
- Ostensen, M.E., Thiele, D.L., Lipsky, P.E. Tumor necrosis factor-alpha enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* 138 (1987) 4185-4191
- Ostrowski, K., Hermann, C., Bangash, A., Schjerling, P., Nielsen, J.N., Pedersen, B.K. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J. Physiol.* 513 (1998b) 889-894
- Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., Pedersen, B.K. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J. Physiol.* 515 (1999) 287-291

- Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S., Pedersen, B.K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J. Physiol.* 508 (1998) 949-953
- Ostrowski, K., Schjerling, P., Pedersen, B.K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans- effect of intensity of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 83 (2000) 512-515
- Oswald, I.P., Gazzinelli, R.T., Sher, A., James, S.L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J. Immunol.* 148 (1992) 3578-3582
- Ozeren, A., Aydin, M., Tokac, M., Demicran, N., Unalacak, M., Gurel, A., Yazici, M. Levels of serum IL-1 β , IL-2, IL-8 and tumor necrosis factor- α in patients with unstable angina pectoris. *Mediators. Inflamm.* 12 (2003) 361-365
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., Aderem, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (2000) 13766-13771
- Pai, J.K., Pischon, T., Ma, J., Manson, J.E., Hankinson, S.E., Joshipura, K., Curhan, G.C., Rifai, N., Cannuscio, C.C., Stampfer, M.J., Rimm, E.B. Inflammatory Markers and the Risk of Coronary Heart Disease in Men and Women. *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 2599-2610
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333 (1988) 664-666
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327 (1987) 524-526
- Palmer, R.M.J., Moncada, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158 (1989) 348-352
- Palmer, R.M.J., Rees, D.D., Ashton, D.S., Moncada, S. L-Arginin is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153 (1988) 1251-1256
- Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Kavouras, S., Stefanadis, C. The association between leisure-time physical activity and inflammatory markers related to cardiovascular disease: the ATTICA Study. *Prev. Med.* 40 (2005) 432-437
- Pasceri, V., Willerson, J.T., Yeh, E.T.H. Direct Proinflammatory Effect of C-Reactive Protein on Human Endothelial Cells. *Circulation.* 102 (2000) 2165-2168
- Pawelec, G., Schaudt, K., Rehbein, A., Busch, F.W. Differential secretion of tumor necrosis factor- α and granulocyte/macrophage colony-stimulating factors but not interferon- γ from CD4⁺ compared to CD8⁺ human T cell clones. *Eur. J. Immunol.* 19 (1989) 197-200
- Peake, J., Peiffer, J.J., Abbiss, C.R., Nosaka, K., Okutsu, M., Laursen, P.B., Suzuki, K. Body temperature and its effect on leukocyte mobilization, cytokines and markers of neutrophil activation during and after exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 102 (2008) 391-401

- Pearson, T.A., Mensah, G.A., Alexander, R.W., Anderson, J.L., Cannon, R.O., Criqui, M., Fadl, Y.Y., Fortmann, S.P., Hong, Y., Myers, G.L., Rifai, N., Smith, S.C., Taubert, K., Tracy, R.P., Vinicor, F. Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 107 (2003) 499-511
- Pedersen, B.K., Tvede, N., Hansen, F.R., Andersen, V., Bendix, T., Bendtzen, K., Galbo, H., Haahr, P.M., Halkjær-Kristensen, J. Modulation of Natural Killer Cell Activity in Peripheral Blood by Physical Exercise. *Scand. J. Immunol.* 27 (1988) 673-678
- Perry, C.D., Alekel, D.L., Ritland, L.M., Bhupathiraju, S.N., Stewart, J.W., Hanson, L.N., Matvienko, O.A., Kohut, M.L., Reddy, M.B., Van Loan, M.D., Genschel, U. Centrally located body fat is related to inflammatory markers in healthy postmenopausal women. *Menopause*. 15 (2008) 619-627
- Phillips, S.M., Green, H.J., Tarnopolsky, M.A., Heigenhauser, G.J.F., Hill, R.E., Grant, S.M. Effects of training duration on substrate turnover and oxidation during exercise. *J. Appl. Physiol.* 81 (1996) 2182-2191
- Pieper, G.M. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor tetrahydrobiopterin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 29 (1997) 8-15
- Pinderski Oslund, L.J., Hedrick, C., Olvera, T., Hagenbaugh, A., Territo, M., Berliner, J.A., Fyfe, A.I. Interleukin-10 Blocks Atherosclerotic Events In Vitro and In Vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 2847-2853
- Pitsavos, C., Panagiotakos, D.B., Chrysohoou, C., Kavouras, S., Stefanadis, C. The association between physical activity, inflammation, and coagulation markers, in people with metabolic syndrome: the ATTICA study. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 12 (2005) 151-158
- Plomgaard, P., Bouzakri, K., Krogh-Madsen, R., Mittendorfer, B., Pedersen, B.K. Tumor Necrosis Factor- α Induces Skeletal Muscle Insulin Resistance in Healthy Human Subjects via Inhibition of Akt Substrate 160 Phosphorylation. *Diabetes*. 54 (2005) 2939-2945
- van der Poll, T., Coyle, S.M., Barbosa, K., Braxton, C.C., Lowry, S.F. Epinephrine Inhibits Tumor Necrosis Factor- α and Potentiates Interleukin 10 Production during Human Endotoxemia. *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 713-719
- Poveda, J.J., Riestra, A., Salas, E., Cagigas, M.L., López-Somoza, C., Amado, J.A., Berrazueta, J.R. Contribution of nitric oxide to exercise-induced changes in healthy volunteers: effects of acute exercise and long-term physical training. *Eur. J. Clin. Invest.* 27 (1997) 967-971
- Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E., Ridker, P.M. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA*. 286 (2001) 327-334
- Prestes, J., de Ferreira, C.K., Dias, R., Frollini, A.B., Donatto, F.F., Cury-Boaventura, M.F., Guereschi, M.G., Pithon-Curi, T.C., Verlengia, R., Palanch, A.C., Curi, R.,

- Cavaglieri, C.R. Lymphocyte and cytokines after short periods of exercise. *Int. J. Sports. Med.* 29 (2008) 1010-1014
- del Prete, M.J., Vernal, R., Dolzing, H., Müllner, E.W., Garcia-Sanz, J.A. Isolation of polysome-bound mRNA from solid tissues amenable for RT-PCR and profiling experiments. *RNA*. 13 (2007) 414-421
- Provost, P., Lam, J.Y., Lacoste, L., Merhi, Y., Waters, D. Endothelium-derived nitric oxide attenuates neutrophil adhesion to endothelium under arterial flow conditions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 14 (1994) 331-335
- Radom-Aizik, S., Leu, S.-Y., Cooper, D.M., Zaldivar, F. Serum from Exercising Humans Suppresses T-Cell Cytokine Production. *Cytokine*. 40 (2007) 75-81
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 2 (1987) 1057-1058
- Rees, D.D., Cellek, S., Palmer, R.M.J., Moncada, S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (1990) 541-547
- Rettori, V., Gimeno, M., Lyson, K., McCann, S.M. Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E₂ release from the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89 (1992) 11543-11546
- Rettori, V., Kamat, A., McCann, S.M. Nitric Oxide Mediates the Stimulation of Luteinizing-hormone Releasing Hormone Release Induced by Glutamic Acid In Vitro. *Brain. Res. Bull.* 33 (1994) 501-503
- Rhind, S.G., Shek, P.N., Shinkai, S., Shephard, R.J. Effects of moderate endurance exercise and training on in vitro lymphocyte proliferation, interleukin-2 (IL-2) production, and IL-2 receptor expression. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 74 (1996) 348-360
- Roberts, C.K., Barnard, R.J., Jasman, A., Balon, T.W. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 277 (1999) E390-E394
- Roberts, W.L., Moulton, L., Law, T.C., Farrow, G., Cooper-Anderson, M., Savory, J., Rifai, N. Evaluation of Nine Automated High-Sensitivity C-Reactive Protein Methods: Implications for Clinical and Epidemiological Applications. Part 2. *Clin. Chem.* 47 (2001) 418-425
- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., Bazan, J.F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95 (1998) 588-593
- Rojas, A., Delgado, R., Glaría, L., Palacios, M. Monocyte chemotactic protein-1 inhibits the induction of nitric oxide synthase in J774 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 274-279
- Romeo, J., Jiménez-Pavón, D., Cervantes-Borunda, M., Wärnberg, J., Gómez-Martínez, S., Castillo, M.J., Marcos, A. Immunological changes after a single bout of moderate-intensity exercise in a hot environment. *J. Physiol. Biochem.* 64 (2008) 197-204

- Rosa, J.S., Heydari, S., Oliver, S.R., Flores, R.L., Pontello, A.M., Ibardolaza, M., Galassetti, P.R. Inflammatory Cytokine Profiles During Exercise in Obese, Diabetic, and Healthy Children. *J. Clin. Res. Ped. Endo.* 3 (2011) 115-121
- Rotter, V., Nagaev, I., Smith, U. Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- α , Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 45777-45784
- Russwurm, M., Wittau, N., Koesling, D. Guanylyl Cyclase/PSD-95 Interactions (Targeting of the nitric oxide-sensitive $\alpha_2\beta_1$ guanylyl cyclase to synaptic membranes). *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 44647-44652
- Saghizadeh, M., Ong, J.M., Garvey, W.T., Henry, R.R., Kern, P.A. The Expression of TNF α by Human Muscle. *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1111-1116
- Saini, R., Patel, S., Saluja, R., Sahasrabudde, A.A., Singh, M.P., Habib, S., Bajpai, V.K., Dikshit, M. Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies. *J. Leukoc. Biol.* 79 (2006) 519-528
- Sasu, S., LaVerda, D., Qureshi, N., Golenbock, D.T., Beasley, D. Chlamydia pneumoniae and Chlamydial Heat Shock Protein 60 Stimulate Proliferation of Human Vascular Smooth Muscle Cells via Toll-Like Receptor 4 and p44/p42 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Circ. Res.* 89 (2001) 244-250
- Scharhag, J., Meyer, T., Gabriel, H.H.W., Auracher, M., Kindermann, W. Mobilization and oxidative burst of neutrophils are influenced by carbohydrate supplementation during prolonged cycling in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 87 (2002) 584-587
- Schieffer, B., Schieffer, E., Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Kovanen, P.T., Kaartinen, M., Nussberger, J., Harringer, W., Drexler, H. Expression of Angiotensin II and Interleukin 6 in Human Coronary Atherosclerotic Plaques: Potential Implications for Inflammation and Plaque Instability. *Circulation.* 101 (2000) 1372-1378
- Schieffer, B., Selle, T., Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Grote, K., Tietge, U.J.F., Trautwein, C., Luchtefeld, M., Schmittkamp, C., Heeneman, S., Daemen, M.J.A.P., Drexler, H. Impact of Interleukin-6 on Plaque Development and Morphology in Experimental Atherosclerosis. *Circulation* 110 (2004) 3493-3500
- Schindler, R., Gelfand, J.A., Dinarello, C.A. Recombinant C5a Stimulates Transcription Rather Than Translation of Interleukin-1 (IL-1) and Tumor Necrosis Factor: Translational Signal Provided by Lipopolysaccharide or IL-1 Itself. *Blood.* 76 (1990) 1631-1638
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S.C., Dinarello, C.A. Correlations and Interactions in the Production of Interleukin-6 (IL-6), IL-1, and Tumor Necrosis Factor (TNF) in Human Blood Mononuclear Cells: IL-6 Suppresses IL-1 and TNF. *Blood.* 75 (1990) 40-47
- Schini, V.B., Durante, W., Elizondo, E., Scott-Burden, T., Junquero, D.C., Schafer, A.I., Vanhoutte, P.M. The induction of nitric oxide synthase activity is inhibited by TGF- β_1 , PDGF_{AB} and PDGF_{BB} in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 216 (1991) 379-383

- Schmidt, H.H.H.W., Gagne, G.D., Nakane, M., Pollock, J.S., Miller, M.F., Murad, F. Mapping of Neural Nitric Oxide Synthase in the Rat Suggests Frequent Co-localization with NADPH Diaphorase but Not with Soluble Guanylyl Cyclase, and Novel Paraneural Functions for Nitrinergic Signal Transduction. *J. Histochem. Cytochem.* 40 (1992) 1439-1456
- Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Nakane, M., Gorsky, L.D., Förstermann, U., Murad, F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 (1991) 365-369
- Schmidt, H.H.H.W., Warner, T.D., Ishii, K., Sheng, H., Ferid, M. Insulin Secretion from Pancreatic B Cells Caused by L-Arginine-Derived Nitrogen Oxides. *Science.* 255 (1992) 721-723
- Schmidt, J.A., Mizel, S.B., Cohen, D., Green, I. Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J. Immunol.* 128 (1982) 2177-2182
- Schrader, J.W., Moyer, C., Ziltener, H.J., Reinisch, C.L. Release of the cytokines colony-stimulating factor-1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and IL-6 by cloned murine vascular smooth muscle cells. *J. Immunol.* 146 (1991) 3799-3808
- Schulz, R., Nava, E., Moncada, S. Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br. J. Pharmacol.* 105 (1992) 575-580
- Schwarz, P., Diem, R., Dun, N.J., Förstermann, U. Endogenous and Exogenous Nitric Oxide Inhibits Norepinephrine Release From Rat Heart Sympathetic Nerves. *Circ. Res.* 77 (1995) 841-848
- Seino, Y., Ikeda, U., Ikeda, M., Yamamoto, K., Misawa, Y., Hasegawa, T., Kano, S., Shimada, K. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine.* 6 (1994) 87-91
- Senchina, D.S., Hallam, J.E., Dias, A.S., Perera, M.A. Human blood mononuclear cell *in vitro* cytokine response before and after two different strenuous exercise bouts in the presence of bloodroot and Echinacea extracts. *Blood. Cells. Mol. Dis.* 43 (2009) 298-303
- Sessa, W.C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J., Hintze, T.H. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ. Res.* 74 (1994) 349-353
- Shalaby, M.R., Aggarwal, B.B., Rinderknecht, E., Svedersky, L.P., Finkle, B.S., Palladino, M.A. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J. Immunol.* 135 (1985) 2069-2073
- Shimada, K., Kishimoto, C., Okabe, T.-a., Hattori, M., Murayama, T., Yokode, M., Kita, T. Exercise Training Reduces Severity of Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice via Nitric Oxide. *Circ. J.* 71 (2007) 1147-1151
- Shimizu, Y., Sakai, M., Umemura, Y., Ueda, H. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes. *J. Dermatol.* 24 (1997) 80-87

- Siegel, A.J., Stec, J.J., Lipinska, I., Van Cott, E.M., Lewandrowski, K.B., Ridker, P.M., Tofler, G.H. Effect of Marathon Running on Inflammatory and Hemostatic Markers. *Am. J. Cardiol.* 88 (2001) 918-920
- Siegel, J., Rent, R., Gewurz, H. Interactions of C-reactive protein with the complement system. I. Protamin-induced consumption of complement in acute phase sera. *J. Exp. Med.* 140 (1974) 631-647
- Silveira, E.M., Rodrigues, M.F., Krause, M.S., Vianna, D.R., Almeida, B.S., Rossato, J.S., Oliveira, L.P., Curi, R., de Bittencourt, P.I. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways. *Cell. Biochem. Funct.* 25 (2007) 63-73
- Simon, A.D., Yazdani, S., Wang, W., Schwartz, A., Rabbani, L.E. Elevated Plasma Levels of Interleukin-2 and Soluble IL-2 Receptor in Ischemic Heart Disease. *Clin. Cardiol.* 24 (2001) 253-256
- Simpson, R.J., McFarlin, B.K., McSporran, C., Spielmann, G., ó Hartaigh, B., Guy, K. Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. *Brain. Behav. Immun.* 23 (2009) 232-239
- Sloan, R.P., Shapiro, P.A., DeMeersman, R.E., McKinley, P.S., Tracey, K.J., Slavov, I., Fang, Y., Flood, P.D. Aerobic exercise attenuates inducible TNF production in humans. *J. Appl. Physiol.* 103 (2007) 1007-1011
- Smeeth, L., Thomas, S.L., Hall, A.J., Hubbard, R., Farrington, P., Vallance, P. Risk of Myocardial Infarction and Stroke after Acute Infection or Vaccination. *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 2611-2618
- Smiley, S.T., King, J.A., Hancock, W.W. Fibrinogen Stimulates Macrophage Chemokine Secretion Through Toll-Like Receptor 4. *J. Immunol.* 167 (2001) 2887-2894
- Smith, J.K., Dykes, R., Douglas, J.E., Krishnaswamy, G., Berk, S. Long-term Exercise and Atherogenic Activity of Blood Mononuclear Cells in Persons at Risk of Developing Ischemic Heart Disease. *JAMA.* 281 (1999) 1722-1727
- Smith, K.A., Gilbride, K.J., Favata, M.F. Lymphocyte activating factor promotes T-cell growth factor production by cloned murine lymphoma cells. *Nature.* 287 (1980) 853-855
- Song, W., Kwak, H.B., Kim, J.-H., Lawler, J.M. Exercise Training Modulates the Nitric Oxide Synthase Profile in Skeletal Muscle From Old Rats. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 64 (2009) 540-549
- Spruit, M.A., Gosselink, R., Troosters, T., Kasran, A., Van Vliet, M., Decramer, M. Low-Grade Systemic Inflammation and the Response to Exercise Training in Patients With Advanced COPD. *CHEST.* 128 (2005) 3183-3190
- Starkie, R.L., Rolland, J., Angus, D.J., Anderson, M.J., Febbraio, M.A. Circulating monocytes are not the source of elevation in plasma IL-6 and TNF- α levels after prolonged running. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280 (2001) C769-C774
- Steensberg, A., Fischer, C.P., Keller, C., Møller, K., Pedersen, B.K. IL-6 enhances plasma IL1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285 (2003) E433-E437

- Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., Pedersen, B.K. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J. Physiol.* 529 (2000) 237-242
- Steinberg, H.O., Brechtel, G., Johnson, A., Fineberg, N., Baron, A.D. Insulin-mediated Skeletal Muscle Vasodilation Is Nitric Oxide Dependent: A Novel Action of Insulin to Increase Nitric Oxide Release. *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 1172-1179
- Stewart, L.K., Flynn, M.G., Campbell, W.W., Craig, B.A., Robinson, J. P., McFarlin, B.K., Timmerman, K.L., Coen, P.M., Felker, J., Talbert, E. Influence of exercise training and age on CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. *Brain. Behav. Immun.* 19 (2005) 389-397
- Stone, J.R., Marletta, M.A. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry.* 33 (1994) 5636-5640
- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., Chan, S.-Y., Roczniak, S., Shanafelt, A.B. The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 27348-27357
- Stroes, E., Kastelein, J., Cosentino, F., Erkelens, W., Wever, R., Koomans, H., Lüscher, T., Rabelink, T. Tetrahydrobiopterin Restores Endothelial Function in Hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 41-46
- Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F., Nathan, C.F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 (1991) 7773-7777
- Stuehr, D.J., Marletta, M.A. Synthesis of Nitrite and Nitrate in Murine Macrophage Cell Lines. *Cancer. Res.* 47 (1987a) 5590-5594
- Stuehr, D.J., Marletta, M.A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon- γ . *J. Immunol.* 139 (1987b) 518-525
- Stuehr, D.J., Nathan, C.F. Nitric Oxide (A Macrophage Product Responsible for Cytostasis and Respiratory Inhibition in Tumor Target Cells). *J. Exp. Med.* 169 (1989) 1543-1555
- Sugiura, H., Nishida, H., Sugiura, H., Mirbod, S. Immunomodulatory action of chronic exercise on macrophage and lymphocyte cytokine production in mice. *Acta. Physiol. Scand.* 174 (2002) 247-256
- Suhr, F., Porten, S., Hertrich, T., Brixius, K., Schmidt, A., Platen, P., Bloch, W. Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes. *Nitric. Oxide.* 20 (2009) 95-103
- Sun, M.W., Zhong, M.F., Gu, J., Qian, F.L., Gu, J.Z., Chen, H. Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens. Res.* 31 (2008) 805-816
- Sureda, A., Tauler, P., Aguiló, A., Fuentespina, E., Córdova, A., Tur, J.A., Pons, A. Blood cell NO synthesis in response to exercise. *Nitric Oxide.* 15 (2006) 5-12

- Susswein, A.J., Katzoff, A., Miller, N., Hurwitz, I. Nitric Oxide and Memory. *Neuroscientist*. 10 (2004) 153-162
- Suzuki, K., Nakaji, S., Yamada, M., Liu, Q., Kurakake, S., Okamura, N., Kumae, T., Umeda, T., Sugawara, K. Impact of a Competitive Marathon Race on Systemic Cytokine and Neutrophil Responses. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 35 (2003) 348-355
- Suzuki, K., Yamada, M., Kurakake, S., Okamura, N., Yamaya, K., Liu, Q., Kudoh, S., Kowatari, K., Nakaji, S., Sugawara, K. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 81 (2000) 281-287
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Beutler, B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101 (2004) 3516-3521
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takeda, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity*. 11 (1999b) 443-451
- Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Takeda, K., Akira, S. TLR6: A novel member of an expanding Toll-like receptor family. *Gene*. 231 (1999a) 59-65
- Tanabe, T., Maeda, S., Miyauchi, T., Iemitsu, M., Takanashi, M., Irukayama-Tomobe, Y., Yokota, T., Ohmori, H., Matsuda, M. Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta. *Acta. Physiol. Scand.* 178 (2003) 3-10
- Tancredi, V., D'Antuono, M., Cafè, C., Giovedì, S., Bue, M.C., D'Arcangelo, G., Onofri, F., Benfenati, F. The Inhibitory Effects of Interleukin-6 on Synaptic Plasticity in Rat Hippocampus Are Associated with an Inhibition of Mitogen-Activated Protein Kinase ERK. *J. Neurochem.* 75 (2000) 634-643
- Thomas, C.E., Jackson, R.L., Ohlweiler, D.F., Ku, G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J. Lipid. Res.* 35 (1994) 417-427
- Tillett, W.S., Francis, T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 52 (1930) 561-571
- Timmerman, K.L., Flynn, M.G., Coen, P.M., Markofski, M.M., Pence, B.D. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J. Leukoc. Biol.* 84 (2008) 1271-1278
- Tojo, A., Gross, S.S., Zhang, L., Tisher, C.C., Schmidt, H.H.H.W., Wilcox, C.S., Madsen, K.M. Immunocytochemical Localization of Distinct Isoforms of Nitric Oxide Synthase in the Juxtaglomerular Apparatus of Normal Rat Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4 (1994) 1438-1447
- Tomaszewski, M., Charchar, F.J., Przybycin, M., Crawford, L., Wallace, A.M., Gosek, K., Lowe, G.D., Zukowska-Szzechowska, E., Grzeszczak, W., Sattar, N., Dominiczak, A.F. Strikingly Low Circulation CRP Concentrations in Ultramarathon Runners Independent of

- Markers of Adiposity. How Low Can You Go? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1640-1644
- Tordi, N., Colin, E., Mourot, L., Bouhaddi, M., Regnard, J., Laurant, P. Effects of resuming endurance training on arterial stiffness and nitric oxide production during exercise in elite cyclists. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 31 (2006) 244-249
- Torzewski, J., Torzewski, M., Bowyer, D.E., Fröhlich, M., Koenig, W., Fitzsimmons, C., Hombach, V. C-Reactive Protein Frequently Colocalizes With the Terminal Complement Complex in the Intima of Early Atherosclerotic Lesions of Human Coronary Arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 1386-1392
- Tosato, G., Seamon, K.B., Goldman, N.D., Sehlfal, P.B., May, L.T., Washington, G.C., Jones, K.D., Pike, S.E. Monocyte-Derived Human B-Cell Growth Factor Identified as Interferon- β_2 (BSF-2, IL-6). *Science* 239 (1988) 502-504
- Tracey, K.J., Fong, Y., Hesse, D.G., Manogue, K.R., Lee, A.T., Kuo, G.C., Lowry, S.F., Cerami, A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature.* 330 (1087) 662-664
- Tran, C.T.L., Leiper, J.M., Vallance, P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler. Suppl.* 4 (2003) 33-40
- Trøseid, M., Lappegård, K.T., Claudi, T., Damås, J.K., Mørkrid, L., Brendberg, R., Mollnes, T.E. Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *Eur. Heart. J.* 25 (2004) 349-355
- Trottier, G., Triggle, C.R., O'Neill, S.K., Loutzenhiser, R. Cyclic GMP-dependent and cyclic GMP-independent actions of nitric oxide on the renal afferent arteriole. *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 563-569
- Tsiotra, P.C., Tsigos, C., Anastasiou, E., Yfanti, E., Boutati, E., Souvatzoglou, E., Ioannis, K., Raptis, S.A. Peripheral Mononuclear Cell Resistin mRNA Expression Is Increased in Type 2 Diabetic Women. *Mediators. Inflamm.* 2008 (2008) Article ID 892864, 8 pages
- Tvede, N., Kappel, M., Halkjær-Kristensen, J., Galbo, H., Pedersen, B.K. The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin 2 production. *Int. J. Sports. Med.* 14 (1993) 275-282
- Ullum, H., Haahr, P.M., Diamant, M., Palmo, J., Halkjaer-Kristensen, J., Pedersen, B.K. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in PBMC. *J. Appl. Physiol.* 77 (1994) 93-97
- Umansky, V., Hehner, S.P., Dumont, A., Hofmann, T.G., Schirmacher, V., Dröge, W., Schmitz, M.L. Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF- κ B implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 2276-2282
- Upadhyya, S., Mooteri, S., Peckham, N., Pai, R.G. Linda, L. Atherogenic Effect of Interleukin-2 and Antiatherogenic Effect of Interleukin-2 Antibody in Apo-E-Deficient Mice. *Angiology.* 55 (2004) 289-294

- Urban, J.L., Shepard, H.M., Rothstein, J.L., Sugarman, B.J., Schreiber, H. Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 (1986) 5233-5237
- Uyemura, K., Demer, L.L., Castle, S.C., Jullien, D., Berliner, J.A., Gately, M.K., Warrier, R.R., Pham, N., Fogelman, A.M., Modlin, R.L. Cross-regulatory Roles of Interleukin (IL)-12 and IL-10 in Atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 2130-2138
- Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., Hotamisligil, G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature.* 389 (1997) 610-614
- Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Häcker, H., Wagner, H. Endocytosed HSP60s Use Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 to Activate the Toll/Interleukin-1 Receptor Signaling Pathway in Innate Immune Cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31332-31339
- Valières, L., Campbell, I.L., Gage, F.H., Sawchenko, P.E. Reduced Hippocampal Neurogenesis in Adult Transgenic Mice with Chronic Astrocytic Production of Interleukin-6. *J. Neurosci.* 22 (2002) 486-492
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 339 (1992) 572-575
- Vaquero, C., Sanceau, J., Weissenbach, J., Beranger, F., Falcoff, R. Regulation of Human Gamma-Interferon and Beta-Interferon Gene Expression in PHA-Activated Lymphocytes. *J. Interferon. Res.* 6 (1986) 161-170
- Vassilakopoulos, T., Deckman, G., Kebbewar, M., Rallis, G., Harfouche, R., Hussain, S.N.A. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 284 (2003) L452-L457
- Venugopal, S.K., Devaraj, S., Yuhanna, I., Shaul, P., Jialal, I. Demonstration That C-Reactive Protein Decreases eNOS Expression and Bioactivity in Human Aortic Endothelial Cells. *Circulation.* 106 (2002) 1439-1441
- Verma, S., Wang, C.-H., Li, S.-H., Dumont, A.S., Fedak, P.W.M., Badiwala, M.V., Dhillon, B., Weisel, R.D., Li, R.-K., Mickle, D.A.G., Stewart, D.J. A Self-Fulfilling Prophecy: C-Reactive Protein Attenuates Nitric Oxide Production and Inhibits Angiogenesis. *Circulation.* 106 (2002) 913-919
- Vink, A., Schoneveld, A.H., van der Meer, J.J., van Middelaar, B.J., Sluijter, J.P.G., Smeets, M.B., Quax, P.H.A., Lim, S.K., Borst, C., Pasterkamp, G., Kleijn, D.P.V. In Vivo Evidence for a Role of Toll-Like Receptor 4 in the Development of Intimal Lesions. *Circulation.* 106 (2002) 1985-1990
- Visser, M., Bouter, L.M., McQuillan, G.M., Wener, M.H., Harris, T.B. Elevated C-Reactive Protein Levels in Overweight and Obese Adults. *JAMA* 282 (1999) 2131-2135
- van de Voorde, J., Leusen, I. Role of the endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. *Eur. J. Pharmacol.* 87 (1983) 113-120

- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., de Vries, J.E. Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J. Exp. Med.* 174 (1991b) 1209-1220
- de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.-G., te Velde, A., Figdor, C.G., Johnson, K., Kastlein, R., Yssel, H., de Vries, J.E. Interleukin 10 (IL-10) and Viral IL-10 Strongly Reduce Antigen-specific Human T Cell Proliferation by Diminishing the Antigen-presenting Capacity of Monocytes via Downregulation of Class II Major Histocompatibility Complex Expression. *J. Exp. Med.* 174 (1991a) 915-924
- Walker, E., Leemhuis, T., Roeder, W. Murine B lymphoma cell lines release functionally active interleukin 2 after stimulation with *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 140 (1988) 859-865
- Wallerath, T., Gath, I., Aulitzky, W.E., Pollock, J.S., Kleinert, H., Förstermann, U. Identification of the NO synthase isoform expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes, and platelets. *Thromb. Haemost.* 77 (1997) 163-167
- Wallerstedt, S.M., Bodelsson, M. Endothelium-dependent relaxation by substance P in human isolated omental arteries and veins: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Br. J. Pharmacol.* 120 (1997) 25-30
- Wang, R., Ghahary, A., Shen, Y.J., Scott, P.G., Tredget, E.E. Human Dermal Fibroblasts Produce Nitric Oxide and Express Both Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthase Isoforms. *J. Invest. Dermatol.* 106 (1996) 419-427
- Wang, X., Feuerstein, G.Z., Gu, J.-L., Lysko, P.G., Yue, T.-L. Interleukin-1 β induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 115 (1995) 89-98
- Wang, Z., Castresana, M.R., Newman, W.H. Reactive Oxygen and NF- κ B in VEGF-Induces Migration of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 669-674
- Warner, S.J., Auger, K.R., Libby, P. Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 139 (1987) 1911-1917
- Weber, D. Trainingswissenschaftliche und sportmedizinische Analyse eines zehnwöchigen Marathonlauftrainings und einer akuten Marathonbelastung. Diplomarbeit. München, 2008
- Weight, L.M., Alexander, D., Jacobs, P. Strenuous exercise: analogous to the acute-phase response? *Clin. Sci. (Lond).* 81 (1991) 677-683
- Weiner, C.P., Lizasoain, I., Baylis, S.A., Knowles, R.G., Charles, I.G., Moncada, S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (1994) 5212-5216
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1796-1808
- Weisbrod, R.M., Griswold, M.C., Yaghoubi, M., Komalavilas, P., Lincoln, T.M., Cohen, R.A. Evidence that additional mechanisms to cyclic GMP mediates the decrease in

intracellular calcium and relaxation of rabbit aortic smooth muscle to nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 1695-1707

Weissenbach, J., Chernajovsky, Y., Zeevi, M., Shulman, L., Soreo, H., Nir, U., Wallach, D., Perricaudet, M., Tiollais, P., Revel, M. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: *In vitro* translation and *Escherichia coli* cloning studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 (1980) 7152-7156

White, C.R., Darley-USmar, V., Berrington, W.R., McAdams, M., Gore, J.Z., Thompson, J.A., Parks, D.A., Tarpey, M.M., Freeman, B.A. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 (1996) 8745-8749

Willems, M., Moshage, H., Nevens, F., Fevery, J., Yap, S.H. Plasma collected from heparinized blood is not suitable for HCV-RNA detection by conventional RT-PCR assay. *J. Virol. Methods.* 42 (1993) 127-130

Williams, S.B., Cusco, J.A., Roddy, M.-A., Johnstone, M.T., Creager, M.A. Impaired Nitric Oxide-Mediated Vasodilation in Patients With Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27 (1996) 567-574

Wong, G.H.W., Goeddel, D.V. Tumor necrosis factors α and β inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature.* 323 (1986) 819-822

Wong, P.C.H., Chia, M.Y.H., Tsou, I.Y.Y., Wansaicheong, G.K.L., Tan, B., Wang, J.C.K., Tan, J., Kim, C.G., Boh, G., Lim, D. Effects of a 12-week Exercise Training Programme on Aerobic Fitness, Body Composition, Blood Lipids and C-Reactive Protein in Adolescents with Obesity. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 37 (2008) 286-293

Wu, W., Liuzzi, F.J., Schinco, F.P., Depto, A.S., Li, Y., Mong, J.A., Dawson, T.M., Snyder, S.H. Neuronal nitric oxide synthase is induced in spinal neurons by traumatic injury. *Neuroscience.* 61 (1994) 719-726

Xie, Q.-W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T., Nathan, C. Cloning and Characterization of Inducible Nitric Oxide Synthase from Mouse Macrophages. *Science.* 256 (1992) 225-228

Xu, X.H., Shah, P.K., Faure, E., Equils, O., Thomas, L., Fishbein, M.C., Luthringer, D., Xu, X.-P., Rajavashisth, T.P., Yano, J., Kaul, S., Arditi, M. Toll-Like Receptor-4 is Expressed by Macrophages in Murine and Human Lipid-Rich Atherosclerotic Plaques and Upregulated by Oxidized LDL. *Circulation.* 104 (2001) 3103-3108

Yamagami, H., Kitagawa, K., Nagai, Y., Hougaku, H., Sakaguchi, M., Kuwabara, K., Kondo, K., Masuyama, T., Matsumoto, M., Hori, M. Higher Levels of Interleukin-6 Are Associated With Lower Echogenicity of Carotid Artery Plaques. *Stroke.* 35 (2004) 677-681

Yan, H.Q., Banos, M.A., Herregodts, P., Hooghe, R., Hooghe-Peters, E.L. Expression of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 2963-2971

- Yang, A.-L., Chen, H.-I. Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis*. 169 (2003) 11-17
- Yang, A.-L., Tsai, S.-J., Jiang, M.J., Jen, C.J., Chen, H.-I. Chronic Exercise Increases Both Inducible and Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Endothelial Cells of Rat Aorta. *J. Biomed. Sci.* 9 (2002) 149-155
- Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E.G., McGeer, P.L. Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain. Res.* 887 (2000) 80-89
- Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E.G., McGeer, P.L. Generation of C-Reactive Protein and Complement Components in Atherosclerotic Plaques. *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 1039-1051
- Yuill, K.H., McNeish, A.J., Kansui, Y., Garland, C.J. Dora, K.A. Nitric Oxide Suppresses Cerebral Vasomotion by sGC-Independent Effects on Ryanodine Receptors and Voltage-Gated Calcium Channels. *J. Vasc. Res.* 47 (2010) 93-107
- Zabel, U., Kleinschnitz, C., Oh, P., Nedvetsky, P., Smolenski, A., Müller, H., Kronich, P., Kugler, P., Walter, U., Schnitzer, J.E., Schmidt, H.H.H.W. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat. Cell. Biol.* 4 (2002) 307-311
- Zaldivar, F., Wang-Rodriguez, J., Nemet, D., Schwindt, C., Galassetti, P., Mills, P.J., Wilson, L.D., Cooper, D.M. Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. *J. Appl. Physiol.* 100 (2006) 1124-1133
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., Ghosh, S. A Toll-like Receptor That Prevents Infection by Uropathogenic Bacteria. *Science*. 303 (2004) 1522-1526
- Zhang, Z.G., Choop, M., Gautam, S., Zaloga, C., Zhang, R.L., Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Förstermann, U. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain. Res.* 654 (1994) 85-95
- Zhao, H., Dugas, N., Mathiot, C., Delmer, A., Dugas, B., Sigaux, F., Kolb, J.-P. B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Express a Functional Inducible Nitric Oxide Synthase Displaying Anti-Apoptotic Activity. *Blood*. 92 (1998) 1031-1043
- Zhou, W., Zhang, F., Aune, T.M. Either IL-2 or IL-12 Is Sufficient to Direct Th1 Differentiation by Nonobese Diabetic T Cells. *J. Immunol.* 170 (2003) 735-740
- Zwaka, T.P., Hombach, V., Torzewski, J. C-Reactive Protein-Mediated Low Density Lipoprotein Uptake by Macrophages: Implications for Atherosclerosis. *Circulation*. 103 (2001) 1194-1197

7. Anhang

7.1. Auflistung aller Messwerte

Sämtliche ermittelten Messwerte und die daraus errechneten Werte, die in die statistische Auswertung eingeflossen sind, sind dem beiliegenden digitalen Anhang zu entnehmen. Im Einzelnen sind dies:

- die RNA-Konzentrationen der Proben nach Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (RNA-Konzentration.xlsx)
- die RNA-Konzentrationen der Proben nach Aufreinigung mit NucleoSpin® (RNA-Konzentration.xlsx)
- die Ct-Werte der HKG (Ct-Werte_housekeeper.xlsx)
- die Ct-Werte aller untersuchter Genmarker (Daten_PCR.xlsx), sowie deren Werte nach Kalibrierung (Kalibration.xlsx) und Normalisierung (Normalisierung.xlsx)
- die OD-Werte von Nitrit und NOx (Colorimetric_Assay.xlsx), sowie die daraus errechneten Werte der Serumkonzentrationen von NOx (Serumkonzentration_NOx.xlsx)
- die Werte der Serumkonzentrationen für CRP, IL-6 und TNF- α (ELISA.xlsx)

7.2. Publikationen im Rahmen der vorgelegten Promotionsarbeit

Teile dieser Arbeit wurden am 08.10.2011 auf dem 42. Deutschen Sportärztekongress vorgestellt. Die Veröffentlichung fand in Form eines Postervortrags unter dem Titel „Expression inflammatorischer Marker bei chronischer und akuter Ausdauerbelastung“ (Autoren: M. Schönfelder, I. Adomeit, H. Hofmann, R. Oberhoffer, H. Hanssen) statt. Im Folgenden der Kongressbericht sowie das Poster der Präsentation.

Referat Nr. 342 (Postervortrag (5 min)), Sitzung PO-11 (08.10.2011, 10:20 Uhr):

Expression inflammatorischer Marker bei chronischer und akuter Ausdauerbelastung

Schönfelder M¹, Adomeit I¹, Hofmann H¹, Oberhoffer R¹, Hanssen H²

¹Lehrstuhl für Sport und Gesundheitsförderung, Technische Universität München,

²Institute of Exercise and Health Sciences, University of Basel

Geringgradige chronische Entzündungsvorgänge werden als pathogenetisch für diverse Krankheitszustände wie degenerative Gefäßerkrankungen angesehen, die aber durch körperliche Aktivität beeinflusst werden können. Das Ziel der Studie war es zu zeigen, wie sich chronisches Ausdauertraining und akute Extremlastungen auf inflammatorische Parameter bei Personen unterschiedlicher Konstitution und Leistungsfähigkeit auswirken. Hierfür absolvierten 14 (prä)adipöse Freizeitsportler (A), 16 normalgewichtige Freizeitsportler (F) und 15 Leistungssportler (L) ein zehnwöchiges Ausdauertraining und einen abschließenden Marathonlauf. Vor und nach der Trainingsphase, unmittelbar und einen Tag nach Zieleinlauf wurden bei den Probanden Blutproben entnommen. Mittels PCR wurde die mRNA folgende Gene aus peripheren mononukleären Zellen (PBMC) quantifiziert: IL-6, TNF- α , CRP, IL-1 β , IL-2, IL-10, CXCR1, CXCR2, TLR 2, TLR 4, iNOS und eNOS. Ergänzend wurden die Plasmakonzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO), IL-6, TNF- α und CRP ermittelt. Das zehnwöchige Ausdauertraining führte bis auf eine Reduktion von IL-6 in der Gruppe L um 24% zu keinen signifikanten Änderungen der Plasmakonzentration der gemessenen Genmarker. In PBMC reduzierte sich nach dem Lauftraining die Expression von IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, CXCR1, TLR 2 und TLR 4. Hingegen waren die Expressionsraten von CRP, IL-2, CXCR2, eNOS und iNOS nicht signifikant beeinflusst. Unmittelbar nach dem Marathonlauf waren signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-6 und NO zu messen. Die zirkulierenden TNF- und CRP-Werte waren erst 24 h nach Zieleinlauf erhöht. Ebenso war eine erhöhte mRNA-Expression von IL-6, IL-10, CXCR1, CXCR2, TLR 2 und TLR 4 nach Marathonende zu messen. Die TNF- α Expression zeigte erst 24 h nach Zieleinlauf erhöhte Werte. Durch das akute Belastungsereignis kam es zu einer Reduktion der Expressionswerte von eNOS und iNOS, wobei CRP, IL-1 β und IL-2 unverändert waren. Im Gruppenvergleich konnten nur wenige Unterschiede gezeigt werden. Lediglich die Gruppe L zeigte reduzierte Plasmawerte von IL-6 und CRP, die sich aber in der Genexpression nicht widerspiegeln. Insgesamt zeigte das Ausdauertraining einen antiinflammatorischen Effekt, der sich in einer reduzierten Expression proinflammatorischer Parameter in PBMC äußerte. Durch die Marathonbelastung kam es zu einem Anstieg der zirkulierenden Entzündungsparameter, die sich auch in der Expression der PBMC widerspiegelte. Signifikante Unterschiede, die sich auf Körpermasse und Trainingszustand der Teilnehmer zurückführen ließen, konnten nicht ermittelt werden.



Expression inflammatorischer Marker bei chronischer und akuter Ausdauerbelastung (Münchner Marathon Studie)



Martin Schönfelder¹, Ines Adomeit¹, Hande Hofmann¹, Renate Oberhoffer¹, Henner Hanssen²

¹Lehrstuhl für Präventive Pädiatrie, Fakultät für Sport und Gesundheitswissenschaft, Technische Universität München; ²Institute of Exercise and Health Science, University of Basel

Hintergrund

Geringgradige chronische Entzündungsvorgänge werden seit längerer Zeit als pathogenetisch für diverse Krankheitszustände (wie bspw. degenerative Gefäßerkrankungen) angesehen. Man weiß, dass bei adipösen Menschen erhöhte systemische Werte an Inflammationsparametern gemessen werden können. Ebenso ist bekannt, dass durch chronische als auch akute körperliche Aktivität Einfluss auf das Inflammationsgeschehen genommen werden kann.

Ziel

Das Hauptaugenmerk in der folgenden Studie lag darin herauszufinden, inwiefern ein mehrwöchiges Ausdauertraining, sowie eine akute körperliche Extrembelastungen zu Änderungen inflammatorischer Parameter bei Menschen unterschiedlicher körperlicher Konstitution und Fitness führen kann.

Methodik

Studiendesign und Probanden

Die Münchner Marathon-Studie untersuchte die physiologischen Effekte eines zehnwöchigen Ausdauertrainingsprogramms und einer akuten Marathonbelastung bei Läufern mit unterschiedlichem Fitnessgrad. Aus ca. 300 männlichen Bewerbern (30-60 Jahre alt) konnten 15 Amateurlaifleistungssportler (L; 76,49±4,79 kg; BMI 23,39±0,94), 17 Freizeitsportler (F; 81,28±9,12 kg; BMI 24,63±1,90) und 15 präadipöse Hobbysportler (A; 99,84±11,81 kg; BMI 29,97±2,36) rekrutiert werden, die sich einer zehnwöchigen Trainingsintervention und einer Marathonbelastung unterzogen haben. Aus der Gruppe F und A absolvierte jeweils ein Proband die Studie nicht. Im Rahmen dieser Interventionsstudie erschienen alle Probanden zu vier Visiten (V1-4): V1 = vor Aufnahme des Trainings, V2 = nach 10 Wochen Training (vor dem Marathon); V3 = direkt nach dem Marathon, V4 = 24 Stunden nach dem Zieleinlauf.

Genexpressions- und Blutparameter

Zu allen Visiten 1-4 erfolgte eine intravenöse Blutabnahme. Aus Heparinblut wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) isoliert. Die anschließende RNA-Isolation erfolgte mittels peqGOLD TriFast (PeqLab Erlangen, GER) und NucleoSpin RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel, Düren, GER). Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels One-Step-RT-PCR (QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit; Qiagen Hilden, GER) am Rotor-Gene 6000 (Corbett Research; Sydney, AUS). Alle Genexpressionsdaten wurden gegen eine externe Probe kalibriert und zu beta-Aktin (als Housekeeping Gen) normalisiert. Als potentielle Kandidatengene wurden die folgenden Gene quantifiziert: Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor α (TNF- α), C-Reaktiv Protein (CRP), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 8-Rezeptor alpha (CXCR1), Interleukin 8-Rezeptor beta (CXCR2), Toll-like Rezeptor 2 (TLR 2), Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4), induzierbarer NO-Synthase (iNOS) und endothelialer NO-Synthase (eNOS).

Die Stickoxidquantifizierung erfolgte kolorimetrisch mittels Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Biozol; Eching, GER) aus den entsprechenden Serumproben der Probanden. Die Bestimmung von IL-6, TNF- α und CRP Blutplasma erfolgte im Routinelabor (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München).

Statistik

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe SigmaPlot 10.01: Korrelationsanalysen wurden mittels Pearson Product Moment Correlation und Zeit- und Gruppeneffekte mittels Two way ANOVA bestimmt.

Ergebnisse 1

Nachdem chronischem Ausdauertraining über 10 Wochen

Das Ausdauertraining führte bis auf eine Reduktion der IL-6-Konzentration in der Gruppe L um 24 % bei V2 zu keinen signifikanten Änderungen der Plasmakonzentration der gemessenen Marker (Tab. 1a-d). In den PBMC kam es nach dem Lauftraining (V2) zu einer Reduktion der Inflammationsmarker IL-6 (Abb. 1a), TNF- α (Abb. 1b), IL-1 β , IL-10, CXCR1, TLR 2 und TLR 4. Die Expressionsraten von CRP, IL-2, CXCR2, eNOS und iNOS wurden hierbei nicht signifikant beeinflusst.

Akut nach der Marathonbelastung

Unmittelbar nach dem Marathonzielauf waren im Vergleich zur Vormessung signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-6 (Tab. 1a) und NO (Tab. 1d) zu messen. Die zirkulierenden TNF- α und CRP-Werte waren jedoch erst zeitverzögert, 24 Stunden nach Beendigung des Marathons, signifikant erhöht (Tab. 1b+c). Auch die Genexpression von IL-6 (Abb. 1a), IL-10, CXCR1, CXCR2, TLR 2 und TLR 4 stiegen direkt nach Marathonende an. Während die Messung unmittelbar nach Zieleinlauf für die Genexpression von TNF- α noch keine signifikanten Änderungen zeigte, war sie 24 Stunden nach Zieleinlauf erhöht (Abb. 1b). Durch das Belastungsereignis kam es zu einer Reduktion der Expressionswerte von eNOS und iNOS. Keine signifikanten Ergebnisse ergaben die Expressionsmessungen in den PBMC von CRP, IL-1 β und IL-2.

Zwischen den Interventionsgruppen

Zwischen den drei Interventionsgruppen konnten nur wenige signifikante Unterschiede in den Messparametern festgestellt werden. Die systemischen Werte von IL-6 in der Gruppe L lagen nach der Trainingsphase (V2) und einen Tag nach Marathonlauf (V3) signifikant unterhalb denen der Gruppe A (Tab. 1a). 24 Stunden nach der Marathonbelastung (V4) lagen außerdem die Plasmakonzentrationswerte von CRP in der Gruppe L signifikant unter denen der anderen zwei Gruppen (Tab. 1c). Bei der Messung der Genexpressionen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden.

Literatur

Flynn, M.G., McFarlin, B.K., Phillips, M.D., Stewart, L.K., Timmerman, K.L. J Appl. Physiol. 95 (2003) 1833-18
Smith, J.K., Dhoke, R., Douglas, J.E., Krishnaswamy, G., Berk, S., JAMA. 281 (1999) 1722-1727
Tomaszewski, M., Charchar, F.J., Przybycin, M., Crawford, L., Walkowiak, A.M., Ceska, K., Lowe, G.D., Zukowska-Szczepiowska, E., Goronczak, W., Sattar, N., Dominiczak, A.F. *Strategies Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1940-1944.
Tord, N., Coiro, E., Mourid, L., Bourinad, M., Rogrand, J., Laurent, P. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 31 (2006) 244-249
Poveda, J.J., Reira, A., Salas, E., Gaggas, M.L., Lopez-Somocsa, C., Arriado, J.A., Borrazueta, J.R. *Eur. J. Clin. Invest.* 27 (1997) 967-971

Ergebnisse

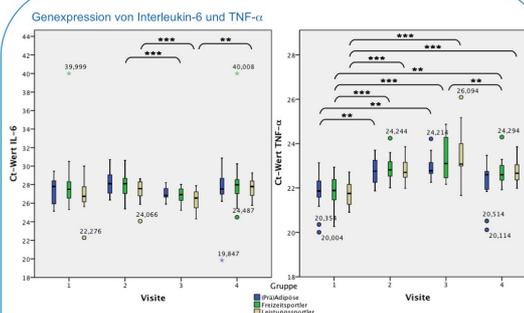


Abb. 1: a) Genexpression von Interleukin-6 und b) von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α); p > 0.05 0 *; p > 0.01 **; p > 0.001 ***; ziert mit *. Je höher der Ct (Threshold cycle), desto geringer die mRNA-Expression

Plasma-/Serumkonzentrationen ausgewählter Parameter: IL-6, TNF- α ; CRP und NOx

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
a) Plasmakonzentration von IL-6 [pg/ml]				
Gesamtkollektiv	1,127 ± 1,448 *	1,216 ± 1,762 *	13,145 ± 0,431*	3,162 ± 1,964 *
Adipöse	1,515 ± 1,554 *	1,770 ± 1,472 *	13,267 ± 0,331*	3,821 ± 2,036 *
Freizeitsportler	0,751 ± 0,444 *	0,765 ± 0,450 *	13,298 ± 0,398*	3,297 ± 1,917 *
Leistungssportler	0,676 ± 0,555 *	0,512 ± 0,483**	12,984 ± 0,510 *	2,175 ± 1,426 **
b) Plasmakonzentration von TNF-α [pg/ml]				
Gesamtkollektiv	1,967 ± 4,605 *	0,643 ± 1,853 *	0,389 ± 0,918 *	3,711 ± 2,184 **
Adipöse	1,737 ± 3,173 **	1,197 ± 2,404 **	0,683 ± 1,218 *	3,839 ± 2,443 *
Freizeitsportler	2,417 ± 6,617 *	0,282 ± 1,092 *	0,138 ± 0,465 *	3,346 ± 1,748 *
Leistungssportler	2,267 ± 4,951 *	0,002 ± 0,009 *	0,180 ± 0,461 *	3,684 ± 2,075 **
c) Plasmakonzentration von CRP [mg/dl]				
Gesamtkollektiv	0,75 ± 0,267 *	0,242 ± 0,161 *	0,205 ± 0,035 *	1,529 ± 0,892 **
Adipöse	0,356 ± 0,450 *	0,234 ± 0,099 *	0,216 ± 0,061 *	2,210 ± 0,951 **
Freizeitsportler	0,201 ± 0,110 *	0,252 ± 0,136 *	0,200 ± 0,000 *	1,557 ± 0,651 **
Leistungssportler	0,221 ± 0,905 *	0,239 ± 0,055 *	0,200 ± 0,000 *	0,940 ± 0,437 **
d) Stickstoffkonzentration von NOx [µM]				
Gesamtkollektiv	35,434 ± 16,828 *	37,140 ± 21,207 **	62,049 ± 17,963*	43,294 ± 12,618 *
Adipöse	37,825 ± 23,121 *	33,883 ± 17,472 *	64,948 ± 22,732*	38,728 ± 12,999 *
Freizeitsportler	32,423 ± 8,752 *	34,763 ± 17,210 **	57,509 ± 16,280*	44,120 ± 6,316 *
Leistungssportler	36,270 ± 15,745 *	42,555 ± 27,452*	64,075 ± 15,013*	47,035 ± 15,025 *

Tab. 1: Plasmakonzentrationen von IL-6, TNF- α und CRP und Serumkonzentrationen von Stickoxid (NOx); Signifikanz bei p < 0,05 innerhalb eines Kollektivs indiziert durch Buchstaben zwischen den Kollektiven indiziert mit *.

Diskussion & Ausblick

Die Münchner Marathon Studie war die erste ihrer Art, die in diesem Umfang kardiovaskuläre und inflammatorische Auswirkungen von Ausdauertraining auf Personen unterschiedlicher körperlicher Konstitution untersucht hat. Mit den in dieser Teilstudie untersuchten Genmarkern wurde ein Überblick über die Veränderungen auf allbekannte sowie moderne inflammatorische Marker gegeben. Es zeigte sich eine Reduktion der Expression proinflammatorischer Genmarker (IL-6, TNF- α , IL-1 β , TLRs, CXCRs) in den immunkompetenten Zellen nach zehnwöchigem Ausdauertraining (vgl. Smith et al., 1999). Auf systemischer Ebene zeigten sich hier nur marginale Änderungen. Inwiefern die Expression des anti-inflammatorischen IL-10 durch die Trainingsphase beeinflusst wurde ist nicht ganz klar. Durch den Marathonlauf kam es zu einer deutlichen proinflammatorischen Lage. Während die Expressionsraten einiger Marker bereits unmittelbar nach Zieleinlauf anstiegen (IL-6, TLRs, CXCRs), kam es bei anderen zu einer verzögerten Zunahme, die 24 Stunden nach Beendigung des Wettkampfes zu messen war (TNF- α , IL-1 β). Bei der ersten Gruppe von Genen konnte einen Tag nach der Belastung bereits wieder rückläufige bzw. normalisierte Werte gemessen werden. Analog zu den Genexpressionsdaten wurden entsprechend auch die im Blut zirkulierenden Proteine (IL-6, TNF α , CRP) quantifiziert. Es zeigte sich ein übereinstimmendes Bild, was Zeitpunkt und Richtung der Änderung angeht. Die Genexpression von IL-2 und CRP zeigte sich sowohl vom Ausdauertraining als auch vom Marathonlauf weitestgehend unbeeinflusst (vgl. Tomaszewski et al., 2003). Dies mag zumindest für CRP daran liegen, dass die PBMC nicht als hauptsächlich Synthesort anzusehen sind. Als Brücke zwischen Inflammationsgeschehen und endothelialen Prozessen war auch ein besonderes Augenmerk auf den Stoffwechsel von NO gelegt worden. Das zehnwöchige Training führte zu keinen signifikanten Änderungen im NO-Stoffwechsel, gemessen als die Abbauprodukte von NO im Plasma und die Expression der Synthesenzyme iNOS und eNOS in PBMC. Lediglich in der Gruppe der Leistungssportler, die wohl die intensivste Trainingsphase absolvierte, konnte eine Tendenz zur Verbesserung der NO-Verfügbarkeit festgestellt werden (vgl. Tordi et al., 2006; Poveda et al., 1997). Durch den Marathonlauf hingegen kam es in allen Gruppen zu einem Anstieg an zirkulierendem NO, jedoch zu einem Abfall der mRNA seiner Synthesenzyme in PBMC.

Zusammenfassend ist anzumerken, dass in vielen Bereichen der Inflammationsmarker die Genexpression parallel zur Proteinexpression verläuft. Darüber hinaus zeigte sich eine deutliche Reduktion der IL-6-Konzentrationen bei den Leistungssportlern gegenüber den (Prä)Adipösen nach der zehnwöchigen Trainingsphase und zudem deutlich geringere CRP-Werte in der Nachbelastungsphase (24 Std. nach Zieleinlauf).

8. Danksagung

Als erstes möchte ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Oberhoffer, für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und die Möglichkeit meine Arbeit am Lehrstuhl für Präventive Pädiatrie durchzuführen danken.

Großer Dank gilt auch Herrn Dr. Martin Schönfelder sowie Frau Dr. Hande Hoffmann für die hervorragende Betreuung meiner Promotionsarbeit und ihr offenes Ohr für sämtliche Fragen und Probleme, die es während der langen Zusammenarbeit zu bewältigen galt. Außerdem danke ich Herrn Dr. Schönfelder für die konstruktive Kritik beim Korrekturlesen der Arbeit.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. Henner Hanssen danken, der mich als Initiator und Betreuer der Marathonstudie an das Thema herangeführt hat, den Kontakt zum LSG hergestellt hat und mir auch nach seinem Wegzug aus München weiterhin betreuend zur Seite stand.

Vielen Dank an alle wissenschaftlichen Mitarbeiter und technischen Assistenten des Lehrstuhls für Sport und Gesundheitsförderung. Ein besonders großes Dankeschön gilt Herrn Holger Meixner und vor allem Frau Christel Barta. Sie hat mir bei allen technischen und organisatorischen Fragestellungen geduldig geholfen und war für mich stets ein Sonnenschein im Laboralltag.

Ein großes Dankeschön an alle Studienteilnehmer, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren danke ich meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist. Sie haben mir durch ihre Unterstützung meine schulische und universitäre Ausbildung ermöglicht.

Als nächstes möchte ich meinem Freund Toni danken, der mir nicht nur bei allen EDV-Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern auch über die vielen arbeitsreichen Monate hinweg ein Fels in der Brandung war.

Vielen Dank, Barbara, für die spontane Bereitschaft meine Arbeit Korrektur zu lesen und die große Gewissenhaftigkeit, mit der du dies getan hast.

Zuletzt danke ich noch allen Freunden, die mich auf meinem Weg zum Dokortitel begleitet haben. Dies sind im Besonderen Raphaela, Jojo, die Mädels, Jakob, Vreni, Fabi und meine Schwester Steffi. Danke für eure Geduld und Unterstützung!