

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
(Department) Tübingen  
Abteilung Innere Medizin V Sportmedizin  
(Schwerpunkte: Leistungsmedizin, spezielle Prävention,  
spezielle Rehabilitation)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr A. Niess

**Die differenzielle Expression der mRNA-Varianten  
Egr1-sv und Egr1-lv unter Ausdauerbelastung  
und normobarer Hypoxie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Annette Kristina Blösch  
aus  
Pforzheim

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A Nieß

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Meyermann

1 Einführung.....	3
1.1 Der Körper unter Belastung.....	3
1.1.1 Reaktion auf erschöpfende Belastung.....	3
1.1.2 Reaktion der Zelle auf Hypoxie.....	6
1.1.3 Der Einfluss körperlicher Belastung auf das Immunsystem.....	7
1.2 Immediate Early Gene.....	10
1.3 EGR1.....	10
1.3.1 Die Funktion der EGR-Proteine.....	10
1.3.2 Die Rolle von EGR1 bei der Immunantwort.....	11
1.3.3 EGR1 unter Hypoxie.....	12
1.4 Transkription.....	12
1.4.1 mRNA-Varianten.....	13
1.4.2 zytoplasmatische Polyadenylierung.....	14
1.4.3 Arbeitshypothesen.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Probandenauswahl.....	16
2.1.1 Erschöpfende Ausdauerbelastung.....	16
2.1.2 Mittellangfristige normobare Hypoxieexposition.....	17
2.1.3 Placebokontrollierte kurzfristige normobare Hypoxie-exposition unter Antioxidantienbehandlung.....	17
2.2 Gewinnung der Blutproben.....	18
2.2.1 PAXgene.....	18
2.3 Aufbereitung und Isolation der RNA.....	18
2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA und DNase-Verdau.....	18
2.3.2 Aufreinigung der Proben.....	19
2.3.3 Photometrie.....	19
2.3.4 Reverse Transkription und 3'RACE.....	19
2.4 Quantitative RT-PCR.....	20
2.4.1 Grundlagen.....	20
2.4.2 Primerdesign.....	21
2.4.3 Setting der PCR.....	24
2.4.4 Schmelzkurvenanalyse.....	24
2.5 Statistische Auswertung.....	26

2.5.1 Berechnung.....	26
3 Ergebnisse.....	27
3.1 Nachweis der mRNA-Varianten im peripheren Blut mittels 3'RACE.....	27
3.2 Primereffizienzen.....	28
3.3 Die differenzielle Expression der mRNA-Varianten Egr1-sv und Egr1-lv. 29	
3.3.1 Unter erschöpfender Ausdauerbelastung.....	29
3.3.1.1 Veränderung der Belastungsparameter Noradrenalin und CK-MBR im venösen Blut.....	30
3.3.2 Unter mittellangfristiger normobarer Hypoxieexposition.....	33
3.3.3 Unter placebokontrollierter kurzfristiger normobarer Hypoxieexposition unter Antioxidantienbehandlung.....	36
3.4 Veränderungen des Blutbilds.....	42
3.4.1 Unter erschöpfender Ausdauerbelastung.....	42
3.4.2 Unter placebokontrollierter kurzfristiger normobarer Hypoxieexposition unter Antioxidantienbehandlung.....	43
4 Diskussion.....	44
4.1 Überblick.....	44
4.2 Die Expression der mRNA-Varianten Egr1-sv und Egr1-lv.....	44
4.3 Erschöpfende Ausdauerbelastung.....	45
4.3.1 Veränderungen unter intensiver Ausdauerbelastung.....	45
4.4 Mittellangfristige normobare Hypoxieexposition.....	46
4.5 Placebokontrollierte kurzfristige normobare Hypoxieexposition unter Antioxidantienbehandlung.....	47
4.6 Peroxidkonzentration.....	48
4.7 Zellshifts.....	50
4.8 Vergleich zwischen Hypoxie und Ausdauerbelastung.....	51
4.9 Ausblick auf die Zukunft.....	52
5 Zusammenfassung.....	54
6 Literatur.....	55

# **1 Einführung**

## **1.1 *Der Körper unter Belastung***

Auf Belastung reagiert der Körper je nach Intensität, Dauer und individueller Veranlagung sehr unterschiedlich. Dasselbe gilt für den Aufenthalt unter extremen Umweltbedingungen wie Hitze, Kälte oder großen Höhen beziehungsweise Hypoxie, bevor eine Akklimatisation des Organismus stattgefunden hat. Die jeweiligen Belastungen spiegeln sich in verschiedenen metabolischen, respiratorischen und kardialen Prozessen wider, die wiederum leistungslimitierende Größen wie den Sauerstofftransport und die Sauerstoffausschöpfung in der Körperperipherie beeinflussen. Dabei finden sich unter anderem ein Anstieg der Hämoglobinkonzentration, erhöhte Pufferkapazität sowie strukturelle und biochemische Anpassungsvorgänge in der Skelettmuskulatur (Bailey et al., 1997). Sowohl bei Ausdauerbelastung als auch bei Hypoxieaufenthalten konnte zudem ein Anstieg der Katecholamine im peripheren Blut beobachtet werden (Greive et al., 1999; Calbet 2003).

### **1.1.1 Reaktion auf erschöpfende Belastung**

Mit Beginn körperlicher Belastung wird im Organismus durch periphere Signale aus dem arbeitenden Muskel sowie durch zentrale Impulse eine vielschichtige Reaktion ausgelöst. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit entsprechender Wirkung auf kardiovaskulärer, metabolischer und hormoneller Ebene. In Folge wird durch dieses System die muskuläre Leistung, die Thermoregulation sowie Wasser- und Elektrolythaushalt den Anforderungen gemäß verändert. Diese physiologischen Prozesse selbst regulieren wiederum über einen komplexen Feedback-Mechanismus den Aktivierungsgrad des sympathischen Systems (Christensen et al., 1983).

Frühere Studien konnten nachweisen, dass starke körperliche Belastung einen Anstieg der mononukleären Zellen im peripheren venösen Blut (PBMC) verursacht (Connolly et al., 2004). Die Lymphozyten sind unter Belastung ebenfalls erhöht, zeigen jedoch als einzige der Leukozytensubpopulationen mit Ende der Belastung ein Absinken der Konzentration unter den Ausgangswert (McCarthy et al., 1988).

Ein wichtiger Effekt körperlicher Belastung ist die erhöhte Produktion freier Sauerstoff- und Stickstoffradikale (ROS/RNS). Durch Vergleiche zwischen aerober und isometrischer Belastung ist bekannt, dass hierfür nicht ausschließlich die erhöhte Sauerstoffaufnahme verantwortlich sein kann (Alessio et al., 2000). Das Ausmaß des belastungsbedingten oxidativen Stress ist dabei nicht nur abhängig von Belastungsdauer und -intensität sondern auch von dem Trainingszustand des belasteten Organismus. Bei ausdauertrainierten Athleten konnte gezeigt werden, dass die ROS/RNS-Freisetzung durch Leukozyten in geringerem Umfang als bei einer untrainierten Kontrolle stattfindet, die antioxidative Kapazität hingegen erhöht ist. Dadurch wird der durch körperliche Belastung ausgelöste oxidative Stress reduziert (Niess et al., 1999). Dabei scheint der Belastungstyp mit ausschlaggebend zu sein. So wurde im Gegensatz zu dem Effekt des regelmäßigen Ausdauertrainings bei dynamischem Krafttraining kein Zusammenhang der Malondialdehydkonzentration, die als Marker für oxidativen Stress gemessen wurde, mit dem Trainingsstatus festgestellt (Viitala et al., 2004).

Freie Radikale werden ständig durch unvollständige Sauerstoffreduktion in der Atmungskette und verschiedenen Zellen gebildet. Aufgrund ihres freien Elektrons verhalten sie sich sehr aggressiv gegenüber zellulären Strukturen wie Proteinen, DNA oder Lipiden und können der Zelle so erheblichen Schaden zufügen. Niess und Mitarbeiter führten 1998 eine Studie durch, in der spezifisch für Leukozyten eine ROS-bedingte Schädigung der DNA unter erschöpfender Ausdauerbelastung nachgewiesen wurde (Niess et al., 1998). Dass über derartige Vorgänge das Immunsystem stimuliert und eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird, wird schon seit Langem diskutiert (McCord et al., 1969). Neuere Literatur zeigt, dass ROS diese proinflammatorische Funktion unter anderem durch Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität, verstärkte Lipidperoxidation, Bildung chemotaktischer Substanzen und die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten an Orte der Entzündung erfüllen (Cuzzocrea et al., 2001). Ausserdem wurde beobachtet, dass freie Sauerstoffradikale unabhängig von der Entzündungsreaktion Funktionen intrazellulärer Signalmoleküle übernehmen und dadurch entscheidend an Proliferation und Zelldifferenzierung beteiligt sind (Sauer et al., 2001).

In den letzten Jahren wurden verschiedene placebokontrollierte Studien durchgeführt, um zu prüfen, inwieweit sich die oxidative Reaktion auf körperliche

Belastung durch die Zufuhr von Antioxidantien beeinflussen lässt, die jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen führten. Dies kann durch die Verwendung verschiedener Studienprotokolle unter anderem bezüglich Behandlungsdauer, Belastungsmodus und -intensität sowie gewählter Antioxidantien erklärt werden. Die genaue Entwicklung der Wissenslage auf diesem Gebiet zu verfolgen, würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen. Insgesamt scheint sich aber herauszukristallisieren, dass Antioxidantien nur einen geringen Effekt auf die Entstehung und das Ausmaß oxidativen Stress während und nach körperlicher Belastung ausüben. Im Jahr 2000 wurde von Niess und Mitarbeitern gezeigt, dass RRR- $\alpha$ -Tocopherol die Expression von Hämoxxygenase (HO)-1 und inducible nitric oxide synthase (iNOS) bei Läufern unter erschöpfender Belastung nicht beeinflusst. Ebenfalls bei Läufern wurde beobachtet, dass die Gabe von Vitamin C keinen Effekt auf Veränderungen der Zytokine, Muskelenzyme oder Lymphozytenpopulation hat (Petersen et al., 2001). Allerdings wurde für mäßig trainierte Erwachsene bei einem Mangel an diesem Vitamin und an Vitamin E eine Beeinträchtigung der Ausdauerfähigkeit nachgewiesen. Im Umkehrschluss, also durch Substitution von Vitamin C und E, wurde jedoch weder eine Verbesserung der aeroben noch der maximalen Trainingskapazität mit noch unklarem Effekt auf die Ausdauer beobachtet (Witt et al., 1992). Unter Behandlung mit Vitamin C wurde zum Beispiel auch festgestellt, dass zwar die Proteinoxidation dosisabhängig abgeschwächt wird, sich aber weder die Lipidperoxidation noch der Glutathionhaushalt ändern (Goldfarb et al., 2005).

Dagegen wurde für ein antioxidatives Getränk aus blauen Trauben, Himbeeren und roten Johannisbeeren eine Gegenregulation des oxidativen Stress bei Untersuchung durchschnittlich trainierter Fahrradfahrer nachgewiesen (Morillas-Ruiz et al., 2005).

In letzter Zeit wurde eine Anzahl von Genen spezifiziert, die unter Halbmarathonwettkampfbelastung eine signifikante Veränderung der Expression zeigen. Einige davon kodieren für Proteine des Redox-Systems (Thioredoxin, GSTM 3, IL-1 Rezeptorantagonist), andere für interzelluläre Kontakte (CD 81), für Gene der Signaltransduktion oder der zellulären Protektion (mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 2: MAPKAP-K2) (Zieker et al., 2005). Diese Fülle an betroffenen zellulären Systemen macht die vielschichtigen Auswirkungen einer derartigen körperlichen Belastung deutlich.

### 1.1.2 Reaktion der Zelle auf Hypoxie

Es ist bekannt, dass die zelluläre Reaktion auf Hypoxie maßgeblich von der Expositionsdauer abhängt. So werden bei akuter Hypoxie sehr früh Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren aus dem Endothel freigesetzt, wohingegen erst bei längerdauernder Hypoxie die Expression der Gene hochreguliert wird, die für die benötigten Zytokine und Wachstumsfaktoren kodieren (Michiels et al., 2000).

Intrazellulär werden bei Sauerstoffmangel eine Reihe metabolischer und biosynthetischer Prozessen ausgelöst, die der Zelle eine Anpassung an die neuen hypoxischen Bedingungen ermöglichen. Dazu gehört z.B. die Expression des insulinunabhängigen Glukosetransporters GLUT1, verschiedener Schlüsselenzymen der Glykolyse, des Hormons Erythropoetin sowie des vaskulären endothelial growth factors (VEGF) (Semenza 1999). Diese Prozesse scheinen vor allem durch HIF (hypoxia inducible factor)-1 kontrolliert zu werden. Abgesehen davon existieren auch c-Fos- und c-Jun abhängige Regulationsmechanismen, die hypoxiebedingt vor allem das zelluläre Wachstum beeinflussen (Müller et al., 1997). Auch das Interleukin IL-6, das an der akuten Entzündungsreaktion mitwirkt, wird bei Sauerstoffmangel hochreguliert (Yan et al., 1997).

Bereits innerhalb weniger Minuten nach Beginn des hypoxischen Zustandes, wird auch der Transkriptionsfaktor EGR1 aktiviert, welcher einen gemeinsamen, von HIF-1 jedoch unabhängigen, Ursprung verschiedener zellulärer Reaktionen auf Sauerstoffmangel darstellt. Durch EGR1 werden IL-1- $\beta$ , der prokoagulatorische TF (tissue factor) (Yan et al., 1998), PAI-1 (plasminogen activator inhibitor), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) und VEGF während der frühen hypoxischen Phase induziert (Yan et al., 2000).

Wie schon für körperlichen Belastungssituationen beschrieben, findet auch unter Hypoxie ein Anstieg der ROS-Konzentration statt. Dies wurde unter anderem für zelluläre ROS im Endothel (Ali et al., 1999), für das ZNS bei hypoxisch-ischämischem Insult (Clarkson et al., 2005) sowie bei soliden Tumoren (Brown et al., 2001) beobachtet. Dieser hypoxiebedingte Anstieg der ROS wird durch proinflammatorische Zytokine vermittelt (Floyd 1999). Auch für diese Form des oxidativen Stress wurde der eventuelle Einfluss exogen zugeführter Antioxidantien

geprüft. Im Gegensatz zu den Versuchen bei körperlicher Belastung weist die Literatur für hypoxiebedingten oxidativen Stress eine große Übereinstimmung bezüglich der Wirkung exogener Antioxidanzienzufuhr auf. Obwohl auch hier sehr unterschiedliche Protokolle, Behandlungsmethoden, gemessene biochemische Marker und Formen der Hypoxieexposition angewandt wurden, konnte durchgehend ein protektiver Effekt festgestellt werden. Zum Beispiel besteht unter Gabe von Ascorbinsäure, dl- $\alpha$ -Tocopherolacetat und  $\alpha$ -Liponsäure ein milderer Verlauf der Höhenkrankheit als in der entsprechenden Placebokontrollgruppe (Bailey et al., 2001a). Auch der hypoxische Effekt eines Aufenthalts in großer Höhe gemessen an kälteinduzierter Vasodilatation wird durch die Vitamine C und E supprimiert (Purkayastha et al., 1999). Bei Gewebhypoxie können ebenfalls günstige Effekte der Antioxidanziengabe gezeigt werden. So schützen sowohl Vitamin C als auch N-Acetylcystein die Epithelzellen boviner Retina vor hypoxieinduzierter Apoptose (Castillo et al., 2002).

Bei der Kombination einer körperlichen Belastung unter Hypoxie scheint die Zufuhr von Antioxidanzien wie auch bei der körperlichen Belastung unter Normoxie wirkungslos zu sein (Subudhi et al., 2004).

### **1.1.3 Der Einfluss körperlicher Belastung auf das Immunsystem**

Es ist bekannt, dass Belastungen wie körperliche Aktivität, Temperaturextreme oder Hypoxie Einfluss auf die Immunantwort nehmen. Unter anderem verändern sich Zytokinsekretion und Lymphozytenproliferation, die Plasmaspiegel der Immunglobuline sowie die T-Zell-Konzentration. Unter körperlicher Belastung fällt unter den Zytokinen besonders der Entzündungsmediator IL-6 durch einen starken Konzentrationsanstieg nach Belastung auf, der sich in geringerem Ausmaß auch für andere Interleukine und den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) nachweisen lässt (Suzuki et al., 2002). Diese proinflammatorischen Vorgänge werden vom Organismus durch die Freisetzung anti-inflammatorischer Substanzen gegenreguliert. Dies sind zum Beispiel IL-1ra (IL-1 Rezeptorantagonist) und sTNF-r (löslicher TNF-Rezeptor) sowie das Interleukin IL-10. Daher findet trotz der Aktivierung der Akut-Phase-Antwort bei Belastung keine umfassende systemische Reaktion im Sinne einer Vasodilatation, Leukozytenaggregation oder beeinträchtigter Organfunktion statt (Ostrowski et al., 1999). Ob die pro- oder die anti-inflammatorische Komponente dieser Reaktion

überwiegt, hängt von Dauer und Intensität der Belastung sowie dem Belastungstyp ab. (King D et al., 2003).

Auf zellulärer Ebene wurde eine von Belastungsintensität und –dauer abhängige differenzielle Neutrophilenmigration nachgewiesen. Längerdauernde Belastung von geringerer Intensität scheint dabei vorteilhaft für die erworbene Immunabwehr zu sein (Wolach et al., 2000). Im Einzelnen ist diese differenzielle Regulation des Immunsystems in Belastungssituationen durch verschiedene Studien bezüglich der neutrophilen Granulozyten untersucht worden. In jedem Fall körperlicher Belastung wird eine periphere Neutrophilie ausgelöst, wobei sich die Intensität der Belastung auf die Funktion der Zellen auswirkt. Diese wird durch Extrembelastungen nachweisbar eingeschränkt (Chinda et al., 2003), während mäßige Belastung die Zellfunktionen zu unterstützen scheint (Peake, 2002).

Auch die Lymphozytenpopulation wird belastungsabhängig beeinflusst. Dabei findet zuerst ein Migration aus peripheren lymphatischen Organen wie Milz, Lymphknoten oder dem Gastrointestinaltrakt in den Blutkreislauf statt (Pedersen et al., 2000). Später nimmt die Lymphozytenzahl ab, wahrscheinlich bedingt durch eine Erschöpfung des verfügbaren Zellpools, einer Migration aus dem Kreislauf in verschiedene Organe sowie einer erhöhten Apoptoserate (Wang et al., 2005). Wiederum abhängig von Dauer und Intensität der Belastung kann dies zu einer Lymphopenie führen (Pedersen et al., 2000). Aufgrund vergleichender Studien zwischen unterschiedlichen Sportarten wird mittlerweile angenommen, dass die Immunmodulation abhängig von der ausgeübten Tätigkeit bei maximaler Intensität und vergleichbarem Trainingsstatus variiert (Espersen et al., 1996).

Für Höhengaufenthalte wurde während vieler Jahrzehnte, wenn nicht Jahrhunderte, ein anti-inflammatorischer Effekt vermutet. Betrachtet man die gegenwärtige Literatur, mehren sich in der Tat die Hinweise darauf, dass Hypoxie zumindest ab Unterschreitung einer gewissen Sauerstoffspannung immunsuppressive Wirkung aufweist (Meehan, 1987). Obwohl es viele Studien über die physiologischen Effekte einer Höhenexposition gibt, trat der immunologische Aspekt oftmals gegenüber den direkten Auswirkungen der Anpassungsvorgänge an große Höhen auf Leistung und Belastbarkeit zurück. Derzeit ist es daher auch noch nicht gelungen die genaueren immunologischen Abläufe bei Höhengaufenthalten nachzuvollziehen. Die Verknüpfung der Ergebnisse wird zudem dadurch erschwert, dass bei Höhengaufenthalten neben

der Hypoxie noch weitere potentiell immunmodulatorische Faktoren berücksichtigt werden müssen. Dies betrifft die erhöhte UV-Exposition, den erniedrigten Luftdruck und andere Parameter, die in großer Höhe physiologische Anpassungsvorgänge auslösen.

Im folgenden möchte ich einige Teilaspekte der hypoxischen Wirkung auf das Immunsystem vorstellen, die mir im Zusammenhang dieser Arbeit als besonders relevant erscheinen.

Bei längerdauernder hypobarer Hypoxie konnten Zytokinveränderungen festgestellt werden, die denen unter Ausdauerbelastung sehr ähnlich sind. Davon betroffen sind unter anderem das antiinflammatorische Moleküle IL-1ra, das als Entzündungsmarker bekannte CRP (C-reactive Protein) sowie das proinflammatorische IL-6 (Hartmann et al., 2000). Inwieweit sich diese Ergebnisse jedoch auf normobare Hypoxie übertragen lassen, muss noch überprüft werden.

Unabhängig von der Belastungsintensität verändert sich bei Höhengaufenthalt das Verhältnis der Typ1 zu den Typ 2 Zellen der T-Helferzellpopulation, wodurch längerfristig ein negativer Effekt auf die Infektneigung vermutet wird (Facco et al., 2005).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass erschöpfende körperliche Belastung beziehungsweise ausgeprägt ungünstige Umweltbedingungen die Immunparameter supprimieren. Für die Kombination von körperlicher Belastung und ungünstiger Umweltparameter, wie sie zum Beispiel bei Höhenttraining vorliegt, wurde ein additiver supprimierender Effekt beobachtet (Shephard, 1998). Jedoch war es bisher nicht möglich selbst signifikante Veränderungen der Immunparameter in einen verlässlichen Zusammenhang mit einer entsprechend erhöhten Infektionsrate zu bringen (Malm, 2004). So konnte die „Open-Window“-Theorie, die eine Immunsuppression für 3 bis 72 Stunden nach starker Ausdauerbelastung postuliert, noch nicht zufriedenstellend bewiesen werden (Nieman et al., 1999).

Bei Training in Hypoxie konnte ein stärkerer Anstieg der ROS als bei normoxischem Training festgestellt werden. Es findet sich aber auch in Hypoxie ein Trainingseffekt durch Mobilisierung körpereigener antioxidativer Systeme (Bailey et al., 2001b), der für Ausdauerbelastung unter Normbedingungen schon vorgestellt wurde (Niess et al., 1999).

## **1.2 Immediate Early Gene**

Die Immediate Early (IE)-Gene werden bei Stimulation der ruhenden Zelle innerhalb weniger Minuten sehr rasch aktiviert. Sie zeichnen sich durch eine schnelle von der de-novo Proteinsynthese unabhängige Induktion der Transkription aus. Unter anderem kodieren Immediate Early Gene für induzierbare Transkriptionsfaktoren zu denen als bekannte Gruppe die early-growth-response (EGR)-Proteine gehören. Diese Proteinfamilie wird dadurch definiert, dass alle vier Vertreter eine charakteristische DNA-bindende Domäne bestehend aus drei aufeinander folgenden Zinkfinger-Motiven besitzen. Die dafür kodierende Genregion ist zwischen den Mitgliedern der Early-Growth-Response-Gruppe hochhomolog und auch phylogenetisch auffallend konstant. Dies gilt nicht nur für Mensch und Nager, sondern ist auch für Drosophila und sogar Hefen nachweisbar (Changelian 1989). EGR1 erkennt über seine 3 Zinkfinger das DNA-Konsensusmotiv GCG(G/T)GGGCG, das auch als GSG-Motiv oder EBS bezeichnet wird (Christy and Nathans, 1989; Lemaire, 1990).

## **1.3 EGR1**

### **1.3.1 Die Funktion der EGR-Proteine**

Der Transkriptionsfaktor EGR1 wurde 1987 das erste Mal von Milbrandt und Mitarbeitern als NGFI-A (nerve growth factor inducible gene) aus Rattenzellen isoliert und beschrieben. Er ist homolog zu KROX-24 (Lemaire et al., 1988), den murinen Proteinen TIS8 (Lim et al., 1987) und ZIF 268 (Christy et al., 1988), ausserdem zu dem in Vögeln beschriebenen ZENK-Protein (Nastiuk et al., 1994). Sukhatme et al. beschrieben 1988 als erste den humanen „early growth response factor 1“. Das dafür kodierende Gen ist auf Chromosom 5q31 lokalisiert.

Die Transkription von EGR1 ist abhängig von intrazellulären Second-messenger-Kaskaden. In der *EGR1*-Promotorregion liegen für diese Interaktion sechs sogenannte Serum-Response-Elements (SRE) mit der Sequenz CC(A/T)<sub>6</sub>GG vor. Bestrahlungsversuche in vitro konnten zeigen, dass biologisch aktive Sauerstoffspezies (ROS) durch Bindung an ein solches SRE eine vermehrte EGR1-Expression induzieren. Dabei besteht bereits nach 15 Minuten ein nachweisbarer Anstieg der mRNA-Konzentration mit einem Maximum nach drei Stunden. Nach acht

Stunden sinken die Expressionswerte dann wieder ab. Dieser Effekt der ROS ist durch das Antioxidans N-acetyl-L-Cystein blockierbar (Datta et al., 1993). Auf diesem Weg bewirkt oxidativer Stress eine direkte Hochregulierung des EGR1.

Bei Untersuchung des myokardialen EGR1 unter hypertropher Stimulation durch Noradrenalin, Angiotensin II und Endothelin 1 wurde gezeigt, dass auch diese Substanzen sowohl die Egr1-mRNA als auch das Protein EGR1 induzieren (Shamim et al., 1999). Wie bei allen Transkriptionsfaktoren wird die Aktivität durch posttranskriptionelle Modifikation reguliert (Hunter and Karin 1992). Bei EGR1 steht die rasche Aktivierung unter dem Einfluss extrazellulärer Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, sowie Belastungen des Organismus unter Hypoxie oder bei Gefäßverletzung (Khachigian, 1996). Aber auch psychischer Stress kann eine Aktivierung von EGR1 auslösen (Wong 2004).

Über die Veränderung der Genexpression übt EGR1 als Transkriptionsfaktor Einfluss auf verschiedene inter- und intrazelluläre Prozesse aus. So beeinflusst er unter anderem intrazellulär die Entwicklung und das Wachstum der Zelle (Sukhatme 1988). Außerdem nimmt EGR1 eine Schlüsselstellung im Prozess der Apoptose ein, indem es Gene wie TNF $\alpha$  oder p53 reguliert (Ahmed, 2004). Ein Beispiel für interzelluläre Aufgaben des EGR1 ist die Veränderung der synaptischen Plastizität (Wei et al., 2000; Richter 2001), wodurch unter anderem die Ausbildung des Kurz- und Langzeit- sowie des Schmerzgedächtnisses beeinflusst wird. Besonders im Zusammenhang der Hypoxieexposition ist ausserdem interessant, dass EGR1 über die Kontrolle verschiedener Gene wie zum Beispiel den Matrix-Metalloproteinasen entscheidend an der Gefäßneubildung beteiligt ist (Fahmy 2003).

### **1.3.2 Die Rolle von EGR1 bei der Immunantwort**

EGR1 ist über mehrere Reaktionswege mit dem Immunsystem verbunden. So aktiviert es in T-Zellen Gene des Interleukin-2-Rezeptors  $\beta$  (IL-2-R $\beta$ ), des Fas-Liganden und des NF $\kappa$ B-1 (nukleärer Faktor). Interessanterweise wurde ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der intrazellulären Konzentration an ROS und einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität des NF $\kappa$ B mit Einfluss auf die entzündliche Reaktion nachgewiesen (Giordano 2005). Ob dieser Zusammenhang

durch EGR1 vermittelt wird, ist jedoch noch unklar.

In B-Lymphozyten wird innerhalb von 30 Minuten nach Stimulation des B-Zell-Rezeptors (BCR) EGR1 induziert, welches wiederum CD-44 induziert. Es wird vermutet, dass dieses Glykoprotein an der Migration der B-Lymphozyten in das periphere lymphatische Gewebe beteiligt ist (Maltzman et al., 1996b). Auch das Protein ICAM-1 (CD-54), das eine wichtige Position im Prozess der T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung sowie der Antigenpräsentation auf B-Lymphozyten einnimmt, wird bei BCR-Stimulation durch EGR1 rasch hochreguliert (Maltzman et al., 1996a). Wie auch CD-44 übernimmt das Adhäsionsmolekül ICAM-1 eine wichtige Funktion in der Leukozytenmigration. Diese wird unter anderem durch körperliche Belastung ausgelöst, wobei gleichzeitig der Anteil an ICAM-1 (CD-54)-exprimierenden Lymphozyten steigt (Goebel et al., 2000).

EGR1 wirkt allerdings nicht ausschließlich genaktivierend. So werden in B-Lymphozyten unter anderem CD23 und Fas von EGR1 supprimiert, was die Zelle wahrscheinlich vor Fas-induzierter Apoptose schützt (Dinkel et al., 1997). Umgekehrt wird die Promotorregion des *EGR1*-Gens selbst durch verschiedene biochemische Signale reguliert, die durch Antigene und Zytokine in Immunzellen ausgelöst werden (McMahon et al., 1996).

### **1.3.3 EGR1 unter Hypoxie**

Yan et. al. konnten 1999 zeigen, dass EGR1 in Monozytenkultur unter Hypoxie hochreguliert wird. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass ausgelöst durch die Aktivierung der Proteinkinase C $\beta$ II ein aktivierter Ets (E26 transformation specific transcription)-Faktor in einem Komplex mit dem Serum-response Faktor die Transkription des *EGR1* initiiert. Dieser Prozess läuft unabhängig von HIF-1 (Hypoxia-inducible factor) ab und wurde in ähnlicher Form auch in anderen Zelllinien nachgewiesen.

Wie bereits besprochen entstehen bei Hypoxie vermehrt ROS. Datta und Mitarbeiter haben 1993 *in vitro* einen Zusammenhang dieses zellulären Reduktions-Oxidations-System mit EGR1 festgestellt.

## **1.4 Transkription**

Mit Transkription wird der Umschrieb der dsDNA (doppelsträngigen

Desoxyribonukleinsäure) zur einsträngigen mRNA (messenger Ribonukleinsäure) beschrieben. Dieser läuft in drei Schritten ab: Zunächst erfolgt die Initiation an sogenannten Promotorregionen durch Anlagerung der RNA-Polymerase II. Neben der Initiationsstelle für dieses Enzym gibt es in den Promotorregionen auch regulierende Sequenzen wie z.B. die TATA-Box oder die GC-Box, die meist upstream, also in Richtung des 5'-Endes, liegen. An die TATA-Box, an welcher sich aufgrund der schwächeren Wasserstoffbrückenbindung die Doppelstrang-DNA relativ einfacher spalten lässt, bindet der Initiationskomplex bestehend aus RNA-Polymerase II und Transkriptionsfaktoren. Letztere sind Proteinkomplexe mit mehreren Untereinheiten, die sich entweder wie oben beschrieben als Holoenzym an die TATA-Box anlagern oder auch weiter upstream an den DNA-Strang binden können. Mit Dissoziation des Initiationskomplexes und der ATP-abhängigen Phosphorylierung der RNA-Polymerase II beginnt dann die zweite Phase, die Elongation. Durch lokale Entspiralisierung entsteht die sogenannte Transkriptionsblase, in der die mRNA in 5'-3'-Richtung am Matrizenstrang synthetisiert wird. Durch Anlagerung von Ribonukleosidtriphosphaten bildet sich eine RNA-DNA-Hybridhelix. Durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren, des RNA-Polymerase-Komplexes sowie verschiedener Aktivator- beziehungsweise Repressorproteine wird dieser Vorgang reguliert.

Werden im Verlauf der Elongation bestimmte Stoppsignale erreicht, erfolgt die von diversen Proteinfaktoren abhängige Termination.

Durch den hier beschriebenen Prozess entsteht hnRNA (heterogen-nukleäre RNA) oder prä-mRNA, die verschiedene Gene, eventuell sogar aus unterschiedlichen Chromosomen, enthalten kann. Deshalb findet, noch im Zellkern, das sogenannte Processing oder Spleißen statt, bei dem an das 5'-Ende ein N<sup>7</sup>-methyliertes GTP (5'-Cap) und an das 3'-Ende ein Polyadenylatrest angelagert werden. Ausserdem werden dabei die nicht-kodierenden Introns entfernt und die kodierenden Exons verbunden.

### **1.4.1 mRNA-Varianten**

2004 gelang Simon und Mitarbeitern der Nachweis zweier m-RNA Varianten des Egr1 in muriner Retina. Die kürzere Variante, hier als Egr1-sv (short variant) bezeichnet, ist in der Gendatenbank GenBank mit AK\_040925 kodiert, der längeren

Variante Egr1 long variant (Egr1-lv) entspricht der Code NM\_007913. Diese unterscheiden sich dadurch voneinander, dass Egr1-lv in der 3' untranslated region (3'-UTR) 293 zusätzliche Basenpaare (bp) im Vergleich zu Egr1-sv aufweist (Abb. 1). Um diese Varianten zu differenzieren, wurde eine 3' Rapid Amplifikation of cDNA Ends (3'RACE) mittels eines Ankerprimers PA (5'-GCG AGC TCC GCG GCC GCG-T<sub>12</sub>-3') durchgeführt. Dafür wurde die mRNA ausgehend von PA revers transkribiert. Die entstandene cDNA wurde in einer PCR mit den Primern Egr1-sv for und PA amplifiziert. Die daran anschließende Gelelektrophorese und Sequenzierung bestätigte die Existenz zweier unterschiedlichen Varianten. Das Expressionsverhältnis dieser Varianten war hierbei abhängig von der Lichtexposition (Simon et al., 2004).

Interessant ist, dass sich bei Vergleich der Sequenzen dieses zusätzlichen Abschnittes zwischen unterschiedlichsten Spezies eine höhere phylogenetische Konservierung nachweisen lässt als innerhalb der für die Zinkfinger kodierenden Region des Exons 2. Dies deutet auf eine große funktionelle Relevanz dieses Abschnittes hin (Long and Salbaum, 1998).

Die oben genannte Arbeit von Simon und Kollegen lässt ausserdem vermuten, dass die Entstehung der Varianten auf differenzieller zytoplasmatischer Polyadenylierung beruht. Dadurch könnte unter anderem die rasche Hochregulierung des EGR1-Proteins innerhalb weniger Minuten nach zellulärer Stimulation erklärt werden (Wei et al., 2000).

### **1.4.2 zytoplasmatische Polyadenylierung**

Beide mRNA-Varianten des Egr1 weisen einen Polyadenylatrest am 3'-Ende auf. Wie bereits beschrieben besteht der einzige Unterschied in einem Einschub aus 293 zusätzlichen Basenpaaren nahe der 3'UTR bei der Variante Egr1-lv. Man geht davon aus, dass die meisten eukaryoten Gene am 3'-Ende ein einziges Polyadenylierungssignal besitzen. Allerdings wurden einige Ausnahmen beschrieben, die nahe des 3'-Endes mehrere Polyadenylierungssignale innerhalb eines zusammenhängenden Exons aufweisen, was als Tandem-Poly(A)-Arrangement bezeichnet wird (Edwards-Gilbert et al., 1997). Diese Situation findet sich auch bei Egr1, wo nach dem Polyadenylierungssignal für die Variante Egr1-sv noch zwei zytoplasmatische Polyadenylierungselemente (CPEs) - CPE1 mit der

Sequenz UUUUUGU und CPE2 mit der Sequenz UUUUUACUUU- und im Anschluß noch ein zweites Polyadenylierungssignal AATAAA folgt (Abb. 1).

Dieses Tandem-Poly(A)-Arrangement bedingt im Zellkern den korrekten Abschluss der Translation durch RNA-Polymerase II sowie das anschließende Splicing und den Transport der mRNA in das Zytoplasma. Im Zytoplasma erhöhen die CPEs der mRNA die Stabilität (Sachs et al., 1993; Miyamoto et al., 1996), vermutlich durch den Schutz vor Anlagerung abbauender Enzyme in Folge einer gesteigerten Polyadenylierung. Ausserdem wurde von Salles und Mitarbeitern 1992 ein Einfluss der CPEs auf die Effizienz der Translation der mRNA zum Protein beobachtet. Diese Funktion wurde zunächst noch auf der Basis einer Studie bezweifelt, die besagte, dass nicht polyadenylierte mRNA *in vitro* genausogut translatiert werde wie polyadenylierte mRNA (Brawerman, 1981). Doch basierend auf weiteren diesbezüglichen Untersuchungen wird derzeit angenommen, dass Polyadenylierung die Translationseffizienz der mRNA erhöht (Ranganathan et al., 1995).

Aufgrund der genannten Effekte nimmt die zytoplasmatische Polyadenylierung entscheidenden Einfluss auf die Effizienz zellulärer Reaktionen auf verschiedene Stimuli. Die bereits erwähnte hohe phylogenetische Konservierung der relevanten Region ist typisch für nicht-kodierende Regulationsorte der posttranskriptionellen und posttranslationellen Modifikation und werden besonders am 3'-Ende beobachtet (Miziara et al., 2004).

### **1.4.3 Arbeitshypothesen**

Auf der Basis des derzeitigen Wissensstandes läßt sich eine zentrale Stellung von EGR1 in der Modulation der Immunantwort ableiten. Ferner zeigt sich eine überwiegend *in vitro* charakterisierte Induzierbarkeit dieses Transkriptionsfaktor durch Hypoxie und Radikale. Die vorliegende Arbeit überprüft erstmalig in einem *in vivo* Versuch die differentielle Expression von Egr1 unter erschöpfender Ausdauerbelastung und normobarer Hypoxie in den Blutzellen des Menschen. Dabei wird ferner der Frage nachgegangen, ob sich die bislang nur in muriner Retina beobachtete differentielle Regulierung der auf alternativer Polyadenylierung

basierenden mRNA-Varianten Egr1-sv und Egr1-lv auch in Blutzellen des Menschen finden läßt.

Des Weiteren soll der Zusammenhang der Expression des Transkriptionsfaktors EGR1 mit anderen unter den genannten Belastungen alterierten Faktoren untersucht werden. Für Ausdauerbelastungen wurde etabliert, dass die Lymphozytenzahl im peripheren Blut sinkt. Durch die Untersuchung der Egr1 mRNA-Expressionen, des Blutbildes und der Belastungsparameter Noradrenalin und CKMB (Creatinkinase, Subtyp MB) bei Teilnehmern eines Halbmarathonwettkampfes soll ein möglicher Zusammenhang dieser Werte untereinander geprüft werden.

Auch Ausmaß und Qualität der durch Hypoxie induzierten Immunmodulation werden seit längerem kontrovers in der Literatur diskutiert.

Zuerst haben wir Freiwillige vor, während und nach 23stündiger Hypoxieexposition untersucht. Da hierbei zum zweiten Untersuchungszeitpunkt nach 7 Stunden schon eine signifikante Veränderung in Relation zum Ausgangswert stattgefunden hatte, wurde eine weitere Probandengruppe während einer vierstündigen Hypoxieexposition beobachtet. Dies fand in Form einer Crossoverstudie mit placebokontrollierter Antioxidantienbehandlung statt. Zielsetzung war hierbei Veränderungen der Egr1 Expression vor dem Hintergrund der externen Modifikation der ROS näher zu untersuchen. Ausserdem sollen eventuelle Unterschiede zwischen kurz- und mittellangfristiger Hypoxieexposition nachgewiesen werden, was für das Design neuer Trainingsmethoden im Sinne des „Sleep high – Train low“ - Prinzips von Interesse ist.

## **2 Material und Methoden**

### ***2.1 Probandenauswahl***

#### **2.1.1 Erschöpfende Ausdauerbelastung**

Sieben ausdauertrainierten und marathonsportlerfähigen Probanden mit dem Durchschnittsalter von 32 Jahren (Standardfehler 2,8 Jahre) wurde nach Aufklärung über die Risiken der Blutabnahme 10 Minuten vor Start und direkt nach Vollendung eines Halbmarathonwettkampfes jeweils 10ml venöses Vollblut entnommen.

Die durchschnittliche Endzeit betrug 112 Minuten (Standardfehler 3,3 Minuten).

### **2.1.2 Mittellangfristige normobare Hypoxieexposition**

Sieben nicht höhenangepasste männliche Probanden mit einem durchschnittlichen Alter von 22,6 Jahren (21,4 – 23,8) verbrachten 23 Stunden in einer Hypoxiekammer mit normobarer Hypoxie ( $\text{FiO}_2$ : 13,8%), was einem Höhengedächte von 3300m üNN entspricht. Den Probanden wurde bei Versuchsbeginn, nach 7 Stunden, bei Versuchsende sowie jeweils drei und acht Stunden nach Versuchsende je 10ml venöses Vollblut abgenommen. Während des Aufenthalts in der Hypoxiekammer wurde die Sauerstoffsättigung kontinuierlich pulsoxymetrisch gemessen.

### **2.1.3 Placebokontrollierte kurzfristige normobare Hypoxieexposition unter Antioxidantienbehandlung**

An dieser Studie nahmen 6 männliche Probanden mit einem durchschnittlichen Alter von 26,2 Jahren (22,1 - 30,2) teil. Keiner der Teilnehmer rauchte oder nahm Medikamente, Vitamine oder Nahrungsergänzungstoffe ein. Ausserdem fand sich bei keinem der Probanden eine positive Anamnese im Blick auf hämatologische, kardiale, respiratorische oder renale Erkrankungen. Die Probanden hielten sich im Abstand von sechs Wochen zweimal für je 4 Stunden in normobarer Hypoxie ( $\text{FiO}_2$ : 12,5%) auf. Dabei wurde doppelt verblindet einmal ein Antioxidans und einmal ein Placebo verabreicht. Die Behandlung bestand aus einer Kapsel mit 400mg all-rac- $\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha$ -Toc) (Woelm Pharma, Bad Honneff) und einer Kapsel mit 600mg  $\alpha$ -Liponsäure ( $\alpha$ -LA) (ASTA Medica, Frankfurt) beziehungsweise entsprechenden Placebokapseln. Die Probanden wurden angewiesen, diese vor Versuchsbeginn über 2 ( $\alpha$ -LA) bzw. 3 ( $\alpha$ -Toc) Wochen hinweg täglich einzunehmen. Zu Untersuchungsbeginn, nach zwei Stunden, am Ende der Hypoxieexposition und je eine und vier Stunden danach wurde jedem Probanden 10ml venöses Vollblut entnommen. In den entnommenen Blutproben wurde photometrisch (PerOx Kit, Immundiagnostik, Bensheim) zu Expositionsbeginn und –ende sowie eine und vier Stunden danach die Peroxidkonzentration bestimmt. Ausserdem wurde aus jeder entnommenen Probe ein Blutbild erstellt. Während der Hypoxiedauer wurde die periphere Sauerstoffsättigung kontinuierlich pulsoxymetrisch (monitor SC 6000, Siemens, Erlangen) gemessen.

## **2.2 Gewinnung der Blutproben**

### **2.2.1 PAXgene**

Um aus den gewonnenen Blutproben die zelluläre RNA zu isolieren, wurde das PAXgene™ Blood RNA Kit (PreAnalytiX, Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Nach Inkubation der Proben für zwei Stunden bei Raumtemperatur wurden sie für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und jedem Pellet 5ml RNase-freies Wasser zugefügt. Das Pellet wurde durch vortexen wieder aufgelöst (REAXtop, Heidolph), 10 Minuten bei 4000g zentrifugiert und wiederum der gesamte Überstand verworfen. Das Pellet wurde danach in 360µl Pufferlösung BR1 gelöst. Der Probe wurden dann 300µl Puffer BR2 und 40µl Proteinase K zugegeben und bei 55°C für 10 Minuten inkubiert. Nach drei Minuten Zentrifugation wurde die untere Phase verworfen. Dem Überstand wurden 350µl Ethanol zugegeben und anschließend 700µl der Probe auf einer PAXgene-Säule für eine Minute bei 8000g zentrifugiert. Nachdem die Säule in ein neues Cup gesetzt wurde, wurde der Rest der Probe daraufgegeben und wiederum eine Minute bei 8000g zentrifugiert. Erneut wurde das Cup mit den ausgelösten Rückständen ausgetauscht. Der gleiche Prozess wurde jeweils mit 700µl Pufferlösung BR3 und 500µl Pufferlösung BR4 wiederholt. Nachdem noch einmal 500µl Pufferlösung BR4 zugegeben wurden, folgten drei Minuten Zentrifugation bei 8000g. Zum Auslösen wurden 40µl Pufferlösung BR5 direkt auf die Säulenmembran pipettiert und eine Minute bei 8000g zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde einmal wiederholt. Die Lösung wurde dann für fünf Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelagert.

Das beschriebene Vorgehen entspricht den Empfehlungen des Herstellers.

## **2.3 Aufbereitung und Isolation der RNA**

### **2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA und DNase-Verdau**

Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des Standardprotokolls des RNeasy Midi-Kits (Qiagen GmbH, Hilden) isoliert und die Proben wurden anschließend in je 88µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Auf je 88µl Probe wurden 2µl DNase (RNase-Free DNase-Set, Qiagen GmbH, Hilden) und 10µl 10fach DNase Puffer bestehend aus 1M Natriumacetat und 50mM MgSO<sub>4</sub> mit HCl auf pH5 titriert, zugegeben. Bei 25°C fand innerhalb einer Stunde der enzymatische Verdau der in der Probe

enthaltenen DNA statt. Um die DNase zu inaktivieren, wurden die Proben anschließend in einem Hitzeblock (Digital Dry Block Heater, PMC) für 10 Minuten bei 65°C erwärmt.

### **2.3.2 Aufreinigung der Proben**

Um die RNA weiterhin von anderen Stoffen in den Proben zu trennen, folgten weitere Reinigungsschritte. Zuerst wurde jede Probe mit 400µl Phenol/Chloroform (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) als Lösungsmittel 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert (EBA 12R, Hettich). Dabei bildeten sich zwei Phasen, von denen die untere mit den gelösten Bestandteilen verworfen wurde. Das verbleibende Gemisch wurde anschließend mit je 400µl Chloroform/Isoamylalkohol (Sigma-Aldrich GmbH, München) wiederum bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und wiederum die untere Phase verworfen. Die RNA-haltigen Proben wurden mit je 10µl Natriumacetat (Merck, Darmstadt) zur Ausfällung der RNA und 250µl 100%igem EtOH (Merck, Darmstadt) für 30 Minuten bei -70°C inkubiert. Anschließend wurden sie 15 Minuten bei 4°C mit 14 000 rpm zentrifugiert, damit die RNA sich am Boden der Cups absetzte. Nachdem das Ethanol dekantiert wurde, wurde der letzte Schritt mit 70%igem EtOH zweimal wiederholt. Dadurch entstand ein RNA-haltiges Pellet, das nach Lufttrocknung in je 20µl 10mM Tris-Puffer bei pH8 gelöst wurde.

### **2.3.3 Photometrie**

Die Photometrie (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) diente der Konzentrations- und Reihnheitsbestimmung der RNA in den einzelnen Proben. Um Konzentrationsunterschiede vor der folgenden reversen Transkription auszugleichen stellten wir jede Probe durch Zugabe von Reinstwasser (Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg) auf eine RNA-Konzentration von 50ng/µl ein.

### **2.3.4 Reverse Transkription und 3'RACE**

Je 250ng aufgereinigter Gesamt-RNA wurden mittels Reverser Transkriptase enzymatisch in cDNA (complimentary DNA) umgewandelt. Dazu haben wir je 5µl der Probe mit 1µl (100mM) Random Hexamer (Mischung aus gleichen Teilen von dATP, dGTP, dCTP und dTTP) für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, anschließend auf 4°C

gekühlt. Zu jeder Probe kamen dann 14µl der RT-Reagenz, das sich aus 10mM Tris-Puffer pH 8,3, 5mM MgCl<sub>2</sub>, je 1mM dNTP, 50U RNase Inhibitor und 50 U MuLV Reverse Transkriptase (M-MLV RT, Promega, Mannheim) zusammensetzte.

Um eine Negativkontrolle zu erhalten, wurde zusätzlich ein Ansatz ohne Enzym aber mit RNA-Probe hergestellt (no-RT-control). Das fehlende Volumen wurde dabei durch reines Wasser ersetzt. Die no-RT-control diente somit auch zur weiteren Kontrolle einer möglichen Verunreinigung der Probe durch genomische DNA.

Damit die Durchführung einer 3'RACE (3' rapid amplifikation of cDNA-ends) möglich war, wurden die Proben wie oben beschrieben umgeschrieben. Mit dem Unterschied, dass statt der Random-Hexamere für den Umschrieb in gleicher Konzentration der in Tabelle 1 aufgelistete Ankerprimer verwendet wurde. Hierdurch wurde sichergestellt, dass die synthetisierten cDNAs an ihrem äußersten 3'-Ende alle die gleiche Sequenz – nämlich die des mittels Umschrieb angehängten Ankerprimers – aufweisen. In nachfolgenden PCRs konnte unter Verwendung eines Gen-spezifischen Senseprimers und des Ankerprimers als Antisenseprimer eine bis an das 3' Ende einer zugrundeliegenden mRNA reichende Amplifikation durchgeführt werden. Auf diese Weise können die unterschiedlichen Längen der mRNAs egr1-sv und -lv spezifisch nachgewiesen werden.

Für den Umschrieb verwendeten wir folgendes Protokoll: 10 Minuten bei 21°C, 20 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 99°C und anschließend Abkühlung auf 4°C. Die gewonnenen cDNA-Proben lagerten bei -20°C.

## **2.4 Quantitative RT-PCR**

### **2.4.1 Grundlagen**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, die mittels bakterieller hitzestabiler DNA-Polymerase eine in-vitro-Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte ermöglicht. Eingeführt wurde die PCR 1986 durch K.Mullis. Eine spezifische Amplifikation wird dadurch erreicht, dass Oligonukleotide als Primer gewählt werden, die jeweils komplementär zu einer Region vor und einer Region hinter der gewünschten Zielsequenz sind. Dadurch, dass jeder Primer an nur einen der DNA-Stränge bindet, können beide Stränge als Vorlage (Template) dienen, wodurch sich theoretisch pro Zyklus eine Verdoppelung der Zielsequenz erreichen lässt. Da in exponentiellen Systemen auch kleinste Abweichungen spürbare Veränderungen der

Ergebnisse bewirken können, lässt sich die vollständige Verdopplung der DNA-Menge in der Praxis nur annähernd erreichen.

Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten: Zuerst die Denaturierung der dsDNA, danach die Anlagerung der Primer (Annealing) und schließlich die Synthese des jeweiligen Komplementärstrangs. Durch mehrfache Wiederholung dieser Zyklen wird eine nahezu exponentielle Amplifikation der ursprünglichen Nukleinsäuresequenz erreicht.

Durch die Methode der Echtzeit- oder real-time (RT-) PCR gibt es die Möglichkeit Amplifikation und Nachweis der Produkte simultan im gleichen Reaktionsgefäß durchzuführen. Dabei wird der Reaktion eine fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonde oder ein für DNA-Nachweise geeigneter Fluoreszenzfarbstoff beigegeben. Bei beiden Verfahren kann nach jedem Zyklus die steigende Konzentration des PCR-Produkts anhand der stärker werdenden Fluoreszenz festgestellt werden. Wir haben in unserem Verfahren den DNA-Fluoreszenzmarker Sybr-Green (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Als Fluoreszenzfarbstoff zur Eichung des Fluoreszenzdetektors durch Ermittlung einer einheitlichen Basisfluoreszenz haben wir FITC in einer Konzentration von 10nM verwendet.

### **2.4.2 Primerdesign**

Für die PCR-Amplifizierung werden synthetische Basen-Sequenzen mit bestimmter Anzahl an Nukleotiden, sogenannte Primer, benutzt. Diese Primer sind so gewählt, dass sie antiparallel zueinander an den mRNA-Strang binden. Die optimale Primerlänge sollte 20-24 bp mit einem ungefähren GC-Gehalt von 45-63% betragen, um die spezifische Anlagerung und eine günstige Annealingtemperatur von 62-63°C zu erreichen. Für die Produktlänge wurden ungefähr 60-140 bp angestrebt.

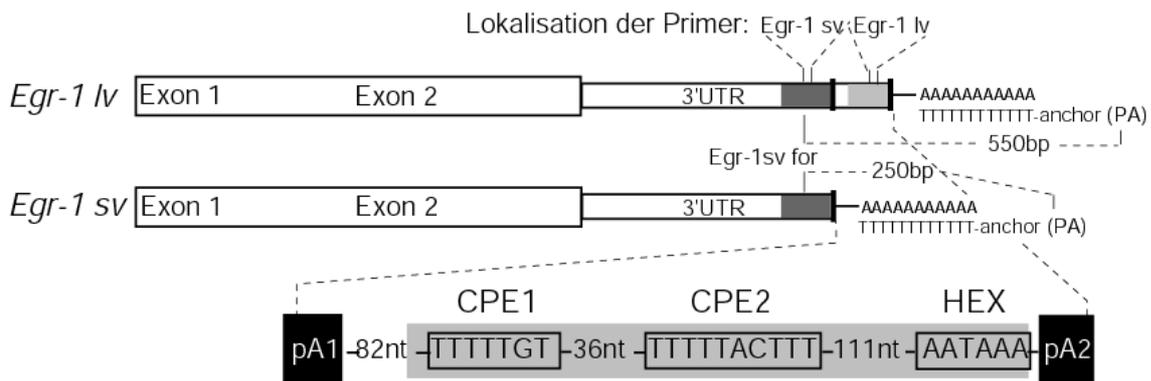
In dieser Arbeit wurden Primer für die mRNA-Varianten Egr1-sv und Egr1-lv des Immediate Early Gens *EGR1* verwendet. Wir wählten unsere Primer mit Hilfe der Programme Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) und Primer Premier 5 (Premier, Biosoft International) aus. Die Spezifität der gewählten Primerpaare im zu untersuchenden Genom wurde mittels der Datenbank GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi)) geprüft.

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tab. 1:** Nukleinsäuresequenz, Produktlänge und Mischungsverhältniss des Primeransatzes der verwendete Primer. Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) produziert.

Gen	Sense-Primer (forward)	Antisense-Primer (reverse)	Produktlänge
<b>Egr1-lv</b>	5'-GGC TTA TAA ACA CAT TGA ATG CG-3'	5'-ACA CCA CAT ATC CCA TGG GC-3'	49 bp
<b>Egr1-sv</b>	5'-AAA GTT TCA CGT CTT GGT GCC-3'	5'-GCT CAG CTC AGC CCT CTT CC-3'	158 bp
<b>gapdh</b>	5'-GCC TGG AGA AAC CTG CCA AG-3'	5'-TGG TCC TCA GTG TAG CCC AAG-3'	96 bp
Anker-primer für 3'RACE	Egr1-sv Sense-Primer	5'-GCG AGC TCC GCG GCC GCG-T <sub>12</sub> -3'	Ca. 550 und 250

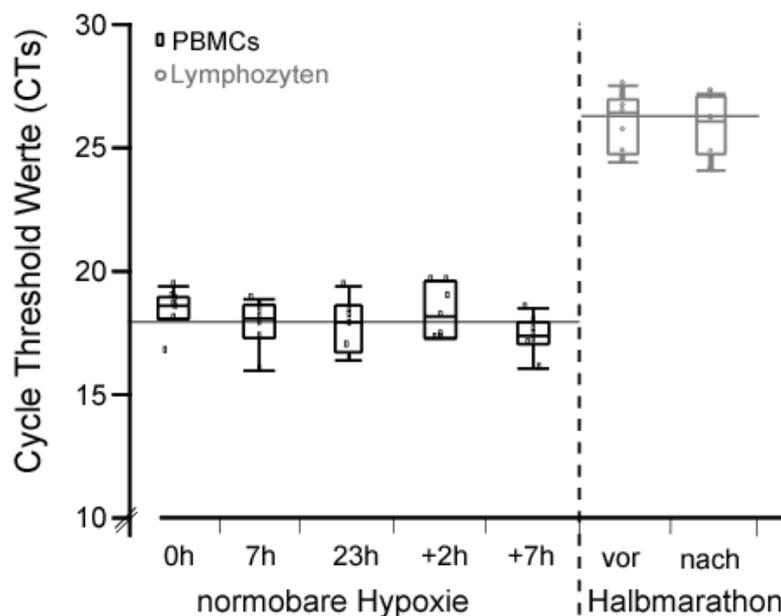
Der Primer für Egr1-sv bindet sowohl an die kurze als auch an die lange mRNA-Variante (Abb. 1), wohingegen die Bindungsstelle des Primers für Egr1-lv ausschließlich auf der langen mRNA-Variante existiert. Dadurch, dass die mRNA-Variante Egr1-lv sich von der Variante Egr1-sv einzig durch 293 zusätzliche Basenpaare in der 3'UTR unterscheidet, ansonsten aber eine identische Nukleinsäuresequenz aufweist, lässt sich eine Unspezifität der Primer für Egr1-sv nicht vermeiden.



**Abb. 1:** Schema der mRNA-Varianten Egr1-sv und Egr1-lv mit der Lokalisation der in dieser Studie verwendeten Primer sowie des Anker-Primers PA der 3'RACE (s.1.4.1).

Ausserdem wurde ein Primerpaar für die Amplifikation eines Abschnittes der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (gapdh) verwendet. Dieses Gen haben

wir als Housekeeping-Gen gewählt, da sich in Vorversuchen, in denen die Expression von *gapdh* mit der des ribosomalen 18s unter verschiedenen Untersuchungsbedingungen verglichen wurde, eine stabile Expression der *gapdh* zeigte (Abb. 2). Housekeeping-Gene dienen als interne Kontrolle und als Bezugspunkt, zu dem die Expressionswerte der untersuchten PCR-Produkte, also in unserem Fall der beiden *Egr1* mRNA-Varianten, in Relation gesetzt werden (Simon et al. 2004). Dieses Vorgehen ermöglicht den Vergleich sowohl verschiedener Amplikons als auch unterschiedlicher PCR-Durchläufe.



**Abb. 2:** Expressionswerte des Housekeeping-Gens *gapdh*. Es zeigt sich die hohe Konstanz sowohl unter Hypoxie als auch unter Ausdauerbelastung.

Bevor wir die eigentliche Untersuchung der Proben begannen, ermittelten wir mittels Standardkurven die Primer-Effizienzen, die bei der späteren Berechnung der PCR-

Resultate Berücksichtigung fanden. Dazu wurden 6stufige exponentielle Verdünnungsreihen erstellt. Um möglichst hohe Effizienzen zu erlangen, verglichen wir die PCR-Ergebnisse dieser Verdünnungsreihen unter verschiedenen Bedingungen. So wurde die Dauer der Polymeraseaktivierung sowie die Annealing-Temperatur während der Hauptzyklen variiert. Ausserdem erprobten wir in einigen Vorversuchen eigene Mastermixvarianten mit verändertem DMSO- oder MgCl<sub>2</sub>-Gehalt. Die höchste Effizienz und Reliabilität wurde mit dem im folgenden Abschnitt beschriebenen Protokoll erlangt.

Die optimale Primer-Effizienz läge wie unter 2.4.1 beschrieben bei 2,0, ist in der Praxis aber quasi nicht erreichbar. In der vorliegenden Arbeit errechneten wir die Primer-Effizienzen ( $E$ ) aus den CT-values der jeweiligen Verdünnungsstufen mit Hilfe des Software-Programmes REST<sup>®</sup>.

### **2.4.3 Setting der PCR**

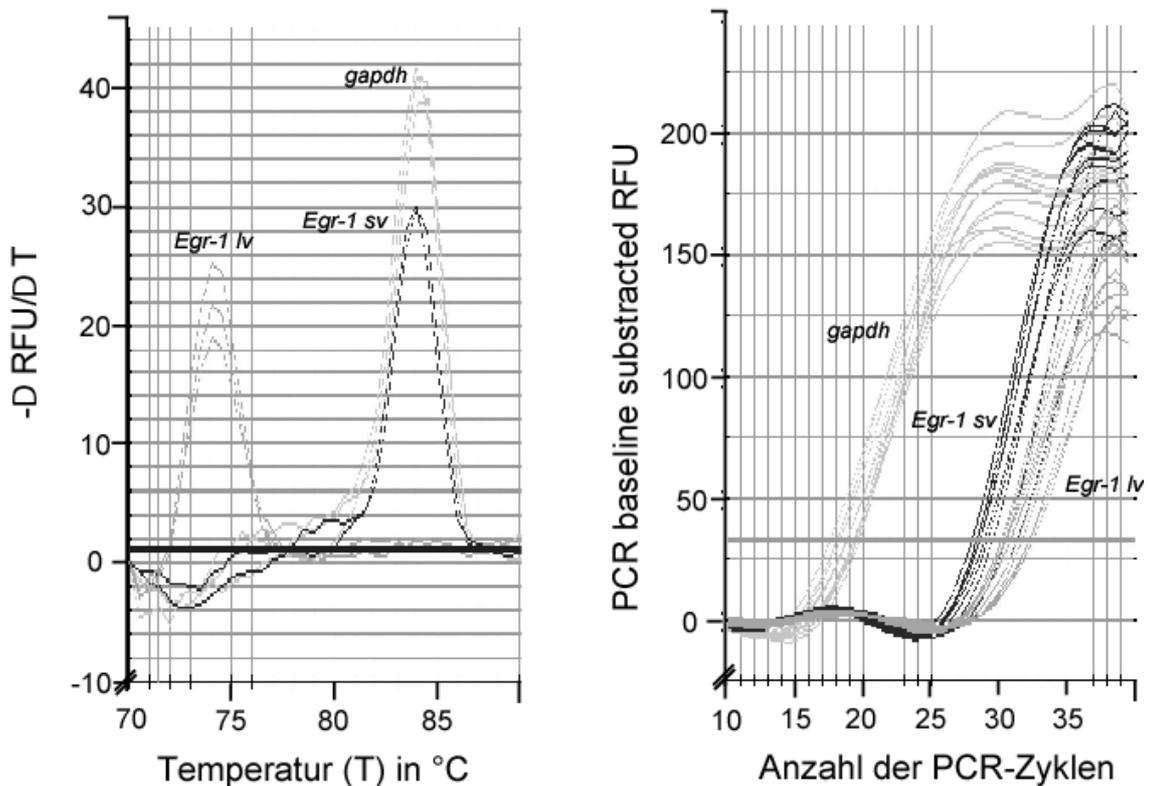
Die RT-PCR wurde in dem iCycler von Biorad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen hatten ein Endvolumen von 15µl bestehend aus 7,5µl QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) inklusive 0,015µl (10nM) FITC zusätzlich je 1,25 µl Sense- und Antisenseprimer entsprechend einer Endkonzentration von je 0,3 µM und 5µl cDNA und wurden auf Platten mit 96 Wells (Thermo-Fast® 96, Semi-Skirted, natural, Cat# AB-0900, ABgene, Epsom, U.K.) pipettiert. Um der jeder PCR-Reaktion intrinsischen Variabilität Rechnung zu tragen, wurden dabei je drei Wells mit der gleichen Probe besetzt. Die Platte wurde anschließend mit Folie (Clear Seal Strong, Cat# AB-0685 ABgene, Epsom, U.K.) im Combi Thermo-Sealer (Model-No. 0384/240, ABgene, Epsom, U.K.) luftdicht verschweißt.

Die PCR lief unter folgenden Parametern: zu Beginn die Polymeraseaktivierung für 15 Minuten bei 95°C, dann 40 Zyklen von je 15 Sekunden bei 60°C. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 70°C.

### **2.4.4 Schmelzkurvenanalyse**

Bei schrittweiser Temperaturerhöhung um je 0,5°C für 10 Sekunden wurden von 70-95°C die Schmelzkurven gemessen, um das Amplifikationsprodukt zu identifizieren

und eine eventuelle Verunreinigung durch unspezifisch vervielfältigte Produkte auszuschließen (Abb. 3). Dieses Verfahren beruht auf der Tatsache, dass jeder DNA-Doppelstrang abhängig vom jeweiligen GC-Gehalt einen spezifischen Schmelzpunkt aufweist, an welchem definitionsgemäß 50% der DNA-Stränge aufgetrennt sind.



**Abb. 3:** Schmelz- (links) und Amplifikationskurven (rechts) der in dieser Studie verwendeten Primer. (RFU: relative fluorescent unit)

## 2.5 Statistische Auswertung

Vor der eigentlichen Auswertung mit Hilfe der Software JMP IN 5.1 (SAS Institute Inc., NC, USA) wurden die Amplifikations- und Schmelzkurven der untereinander identisch angesetzten Triplets verglichen, um stark aberrante Proben identifizieren und von der Statistik ausschließen zu können. Anschließend floss der Durchschnitt der Replikationsergebnisse eines Triplets in die Auswertung ein.

### 2.5.1 Berechnung

Der „Cycle Threshold Value“ (CT-Wert) bezeichnet den Zyklus der PCR-Reaktion, bei dem die Fluoreszenz-Intensität des Amplifikationsproduktes einen festgelegten Schwellenwert (Threshold) überschreitet. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser bei 25 gewählt, was ungefähr 10% der mittleren maximalen Fluoreszenz entspricht. Aus den CT-Werten der Amplikons wurde der Mean Normalized Expression Value (MNE) berechnet, der entsprechend folgender Formel die Expression des untersuchten Amplikons im Vergleich zu der des Houskeeping-Gens *gapdh* ausdrückt (Simon 2003):

$$MNE = \frac{\left(E_{reference}\right)^{CT_{reference,mean}}}{\left(E_{target}\right)^{CT_{target,mean}}}$$

Da die MNE-Werte in den jeweiligen Behandlungsgruppen nach Durchführung eines Shapiro-Wilk-W-Tests Zeichen einer Nicht-Normalverteilung aufwiesen, wurden die Daten vor der Auswertung logarithmiert. Eine Überprüfung mittels Box-Cox-Transformation ergab, dass eine Logarithmierung der Daten (Log-Normalisierung) am geeignetsten war um eine Normalverteilung der Daten in den Gruppen zu erreichen. Anschließend wurden mittels einer oneway-ANOVA (analysis of variance, Varianzanalyse bezüglich eines Merkmals) die Ergebnisse der verschiedenen Gruppen auf signifikante Einflüsse untersucht.

Da die Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle wurden zur besseren graphischen Darstellbarkeit zum Teil in die nicht-logarithmierte Form rücktransformiert.

Zur Überprüfung der Veränderungen in den Blutbildern wurden die jeweiligen Zellkonzentrationen nach Behandlungsgruppen unterteilt und der Mittelwert sowie die

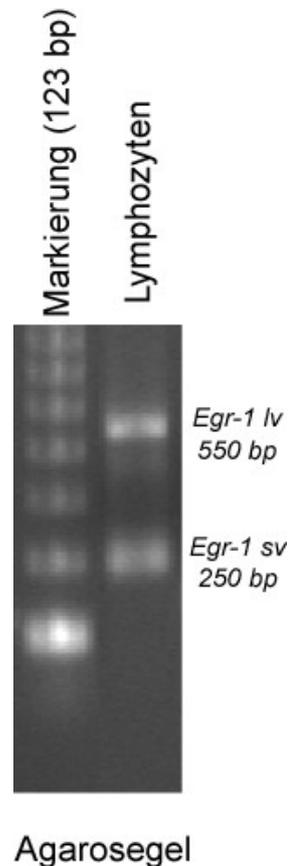
Konfidenzintervalle berechnet. Zeigte sich eine Signifikanz, so wurde der errechnete p-Wert nach Bonferroni entsprechend der Anzahl der Gruppenvergleiche bereinigt. Dabei wurde für die Ausdauerbelastung ein Vergleich der Werte vor und nach dem Halbmarathon durchgeführt. Bei der Studie des mittellangfristigen Hypoxieaufenthalts wurden alle Zeitpunkte mit dem Wert vor Beginn der Hypoxie sowie jeweils mit den beiden benachbarten Werten verglichen. Bei der kurzfristigen Hypoxieexposition lagen mit der Dauer der Hypoxie und der Placebo oder Verumbehandlung zwei Einflussgrößen vor. Wir haben deshalb in einer *Repeated Measures ANOVA* (MANOVA) zunächst getestet, ob eine Überführung der multivariaten Fragestellung in eine univariate Fragestellung zulässig ist, indem wir den *Sphericity-Test* durchgeführt haben. Hierbei ergab sich für unsere Daten, dass die M-transformierten Zielgrößen nicht korreliert waren und dieselbe Varianz aufwiesen. Deshalb haben wir eine multifaktorielle *LSMeans-Varianzanalyse* durchgeführt. Eine signifikante *LSMeans-Varianzanalyse* wurde gefolgt von einem gepaarten t-Test als post-hoc Test. Bei Mehrfachvergleichen wurden die p-Werte nach Bonferroni-Holm korrigiert.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Nachweis der mRNA-Varianten im peripheren Blut mittels 3'RACE**

Nachdem die cDNA aus der 3'RACE in einer PCR amplifiziert wurde, führten wir eine Gelelektrophorese durch, in der die gewonnene cDNA mit einer DANN-Leiter bekannter Größe verglichen wurden. Auf der rechten Seite der Abbildung 4 sieht man die beiden Banden der unterschiedlichen mRNA-Varianten *egr1-sv* und *egr1-lv*. Es bestätigten sich unsere Erwartungen bezüglich der Größe der beiden Amplikons von 550bp für *Egr1-lv* und 250bp für *Egr1-sv* (s. Tab. 1).

Die Sequenz der cDNA der *Egr1-sv* findet sich in der Datenbank GenBank unter der Kodierung BQ\_181084.



**Abb. 4:** Gelelektrophorese der 3'RACE aus Lymphozyten. Man erkennt die Banden der RT-PCR Produkte der beiden mRNA-Varianten erwarteter Größe (s. Tab. 1).

### 3.2 Primereffizienzen

Um die Effizienz der verwendeten Primer berechnen zu können, wurden in einem Schaubild die CT-Werte der Gene gegen den Logarithmus der jeweiligen cDNA-Konzentration aufgetragen (Abb.5). Die Steigung der dadurch entstandenen Gerade (f) wird, wie die folgende Formel zeigt, zur Berechnung der Primereffizienz benötigt:

$$E = 10^{-1/f}$$

Für jedes der Primerpaare für Egr1-sv, Egr1-lv und gapdh ergab sich mit 1,98 eine hohe Effizienz.

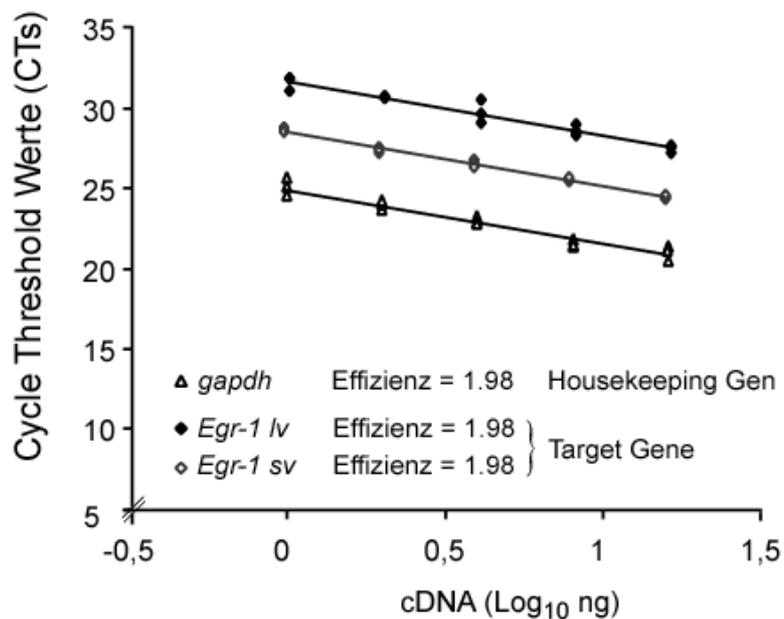


Abb. 5: Standardkurven und daraus berechnete Effizienzen der einzelnen Primer.

### 3.3 Die differenzielle Expression der mRNA-Varianten *Egr1-sv* und *Egr1-lv*

#### 3.3.1 Unter erschöpfender Ausdauerbelastung

Bei der Halbmarathon-Wettkampfbelastung zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Reaktion der beiden *Egr1* mRNA-Varianten. Die kürzere Variante *Egr1-sv* steigt bei den sieben Probanden auf das 1,8-fache (CI: 1,1 - 2,9;  $p < 0,05$ ). Die längere Variante *Egr1-lv* zeigt im Vergleich zum Ausgangswert hingegen keinen signifikanten Unterschied der Expression nach Ende des Halbmarathons (Abb. 6a, b).

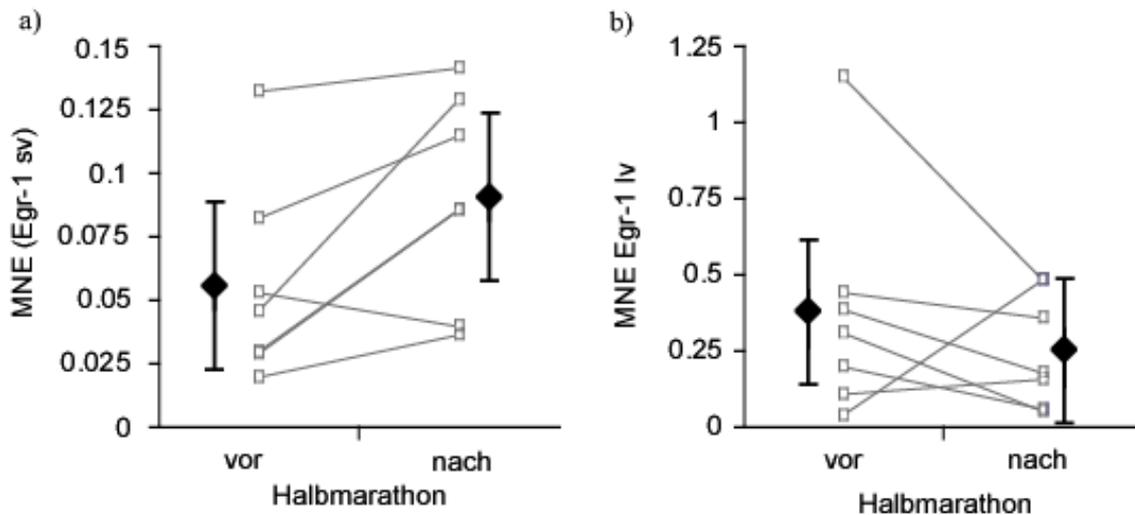
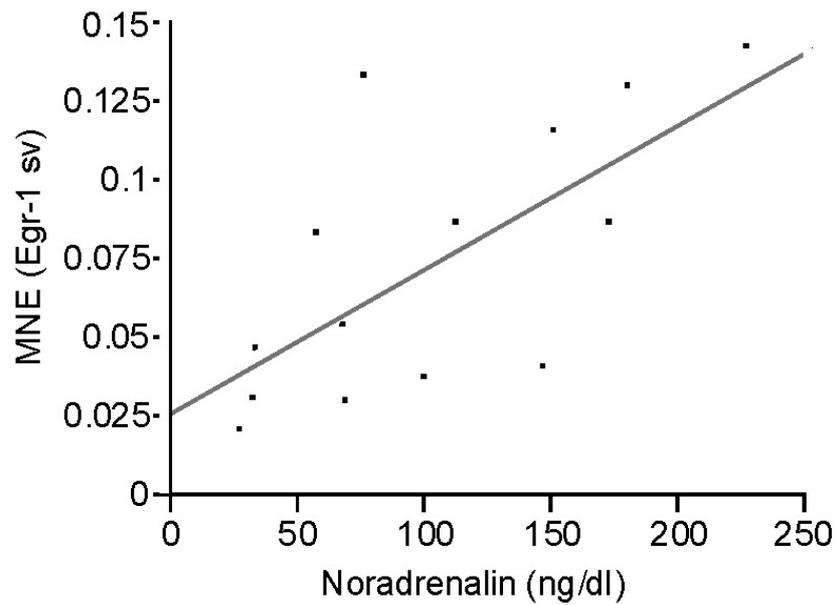


Abb. 6: a) Expression von Egr1-sv unter Ausdauerbelastung. Während dieser Ausdauerbelastung findet ein deutlicher Anstieg der Expression statt. b): Expression von Egr1-lv unter Ausdauerbelastung. Die Diagramme sind jeweils patientenbezogen mit Darstellung des Mittelwerts und der 95%-Konfidenzintervalle in schwarz.

### 3.3.1.1 Veränderung der Belastungsparameter Noradrenalin und CK-MBR im venösen Blut

Unter Ausdauerbelastung fand ein signifikanter Anstieg der NoradrenalinKonzentration im venösen Blut von einem ursprünglichen Mittelwert von 53,43 ng/dl (CI:13,7 - 93,16;  $p < 0,05$ ) um 104 ng/dl (CI: 73,98 – 134,01;  $p < 0,05$ ) statt.

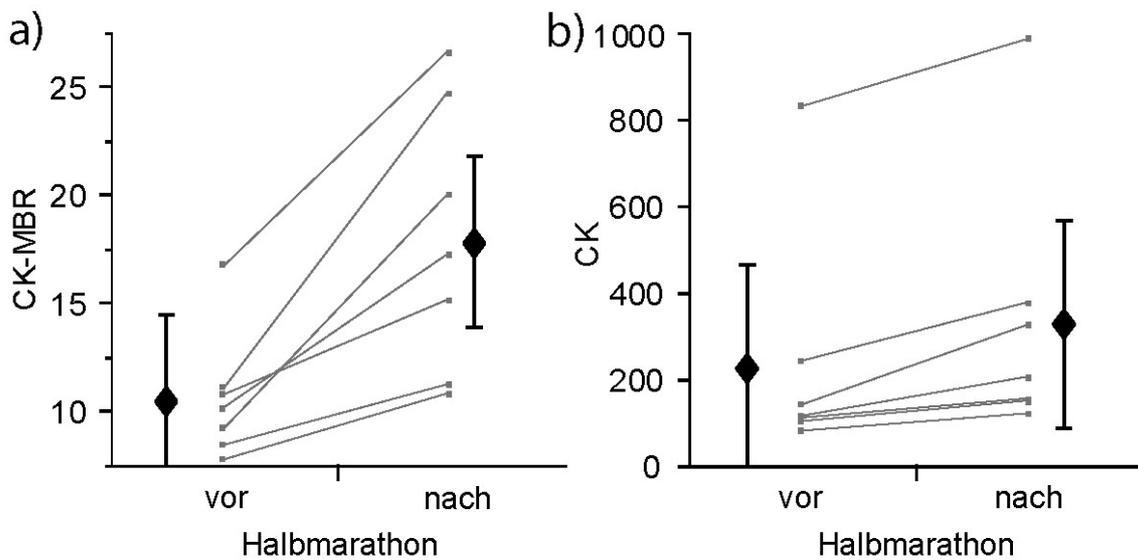
Dabei kann eine signifikante positive Korrelation der NoradrenalinKonzentrationen mit den Expressionswerten von Egr1-sv festgestellt werden (Abb. 7). Der nach Pearson berechnete Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) des Deltawertes beträgt 0,68, was ein Bestimmtheitsmaß von 46% ergibt ( $p = 0,0074$ ).



**Abb. 7:** Darstellung der Korrelation zwischen den MNE-Werten von Egr1-sv und der venösen NoradrenalinKonzentration unter Halbmarathonwettkampfbelastung.

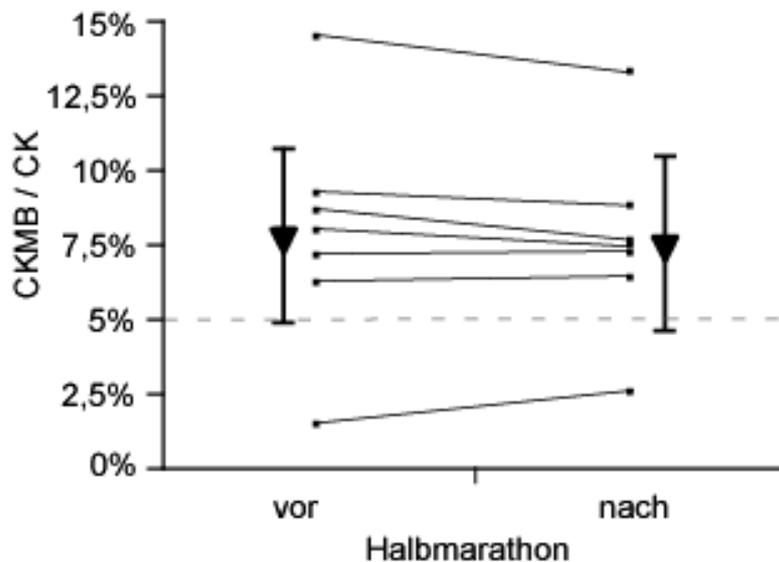
CKMB dient als Marker für die Abschätzung der kardialen Belastung.

Die Ausdauerbelastung des Halbmarathonwettkampfs löst ausgehend von einem Mittelwert von 10,50 (CI: 7,75 - 13,25;  $p < 0,05$ ) einen Anstieg dieses Markers um 7,33 (CI: 1,44 – 13,21,  $p < 0,01$ ) auf 17,83 (CI: 12,13 – 23,52;  $p < 0,05$ ) aus (Abb. 8). Während des Wettkampfes findet somit ein signifikanter Anstieg der CKMB-Konzentration statt ( $p < 0,01$ ), wohingegen die CK keine feststellbare Veränderung aufweist (Abb. 8).



**Abb. 8:** Vergleich der Konzentrationsänderungen von CKMB und CK während des Halbmarathonwettkampfes. CKMB steigt während der Belastung signifikant an ( $p < 0,01$ ).

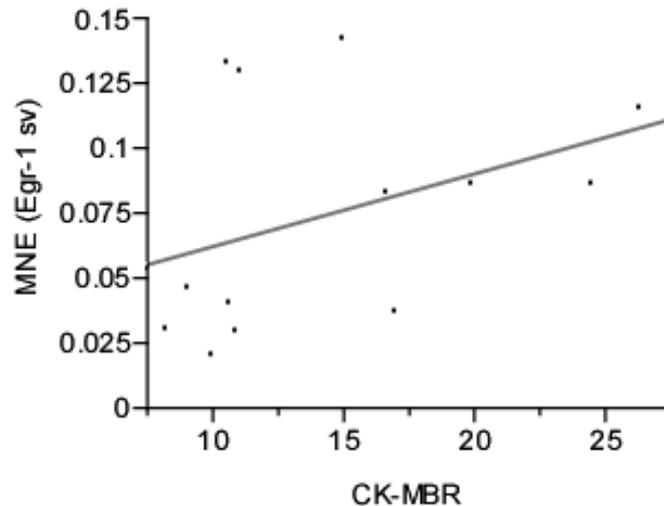
Der Quotient aus CKMB und CK beträgt vor dem Halbmarathon 7,78% (CI: 4,18 – 11,38%;  $p = 0,05$ ) und danach 7,53% (CI: 4,60 – 10,47;  $p = 0,05$ ). Während des Laufs findet keine signifikante Veränderung dieses Verhältnisses statt (Abb. 9).



**Abb. 9:** Der Quotient aus CKMB und CK bei Halbmarathonwettkampfbelastung weist keine Veränderung auf, liegt im Mittel aber konstant oberhalb der pathologischen Grenze von 5% (unterbrochene Linie).

Im Gegensatz zu Noradrenalin findet sich für CKMB allerdings keine eindeutige Korrelation der Konzentration zu der Egr1-sv- Expression (Abb. 10). In diesem Fall betrug der Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,39, was einem Bestimmtheitsmaß von lediglich 15% entspricht ( $p = 0,16$ ).

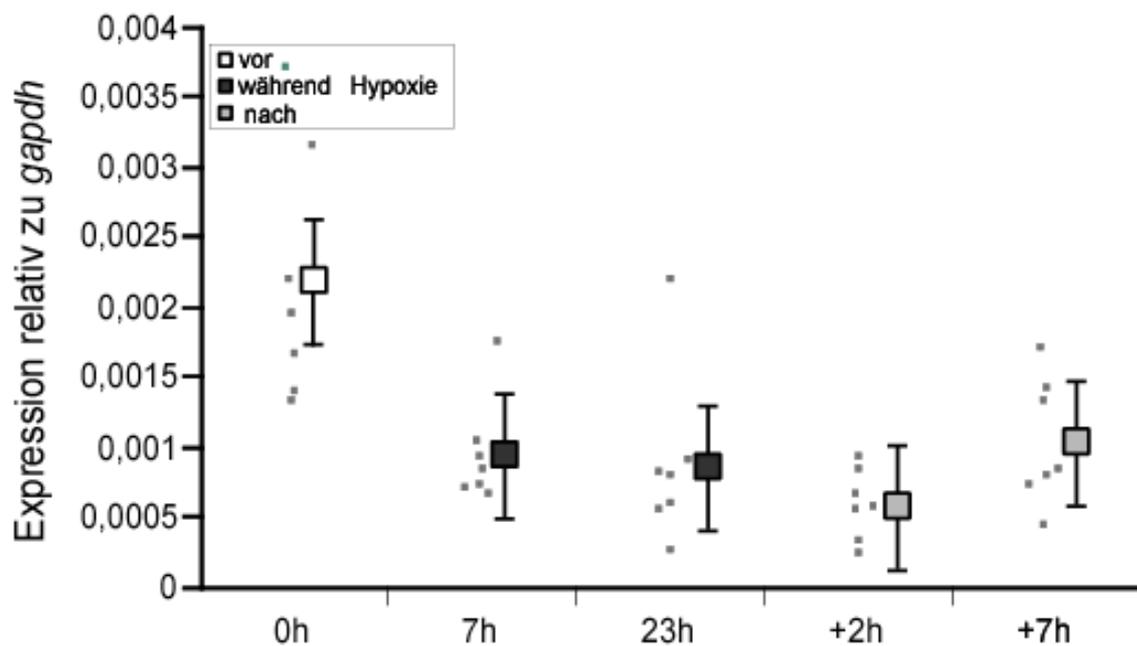
**Abb. 10:** Darstellung der Korrelation zwischen den MEN-Werten von Egr1-sv und der venösen CK-



*MBR-Konzentration unter Halbmarathonwettkampfbelastung.*

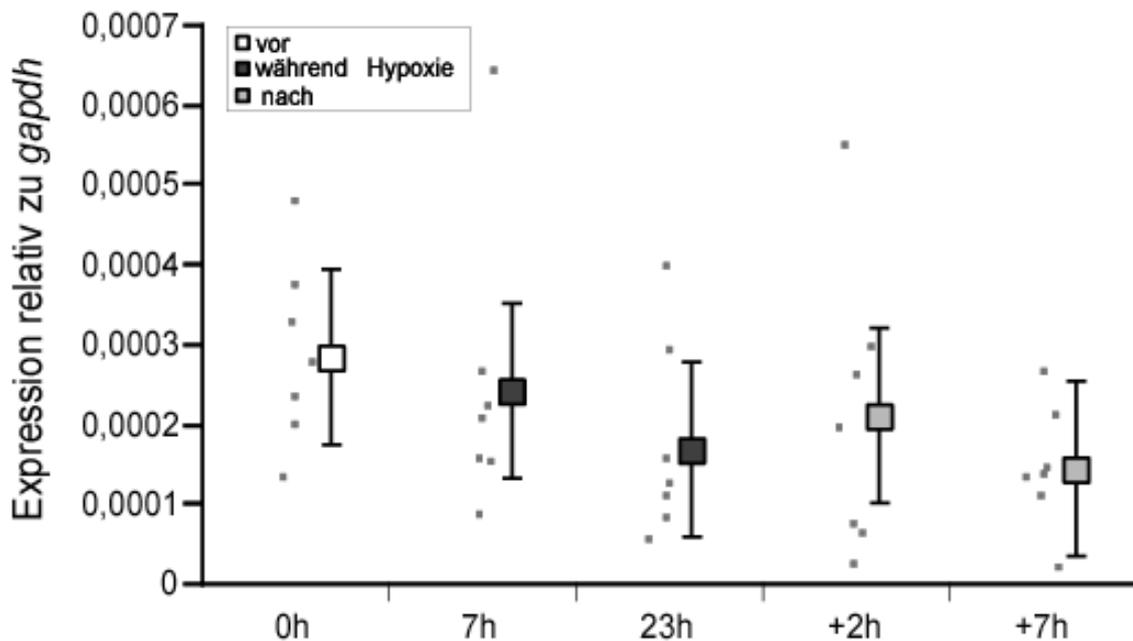
### 3.3.2 Unter mittellangfristiger normobarer Hypoxieexposition

Im Gegensatz zu dem Expressionsanstieg von Egr1-sv unter Ausdauerbelastung, besteht bei Hypoxie eine Verminderung der Egr1-sv-Expression. Bei diesem 23stündigem Aufenthalt in normobarer Hypoxie zeigt sich, dass die mRNA-Variante Egr1-sv nach 7h 2,3fach (CI: 1,4-3,7;  $p < 0,01$ ) und nach 23h 2,8fach (CI: 1,3-6,4;  $p < 0,05$ ) erniedrigt ist. Diese Tendenz hält auch nach Beendigung des Aufenthalts an. So ist zwei Stunden nach Abschluss der Hypoxieexposition der Wert 3,9fach (CI: 2,0 – 7,4;  $p < 0,01$ ) erniedrigt. Wiederum 5h später ist die Expression wieder angestiegen und liegt im Vergleich zur ursprünglichen Konzentration nur noch 2,2-fach (CI: 1,2-3,9;  $p < 0,05$ ) erniedrigt (Abb. 11).



**Abb. 11:** Expression von Egr1-sv unter normobarer Hypoxie. Es zeigt sich ein deutlicher initial stärkerer Abfall mit einem Wiederanstieg zwischen 2 und 7 Stunden nach Expositionsende. Dargestellt sind die Rohdaten und die Mittelwerte der Gruppen (Kästchen) mit den 95% Konfidenzintervallen der ANOVA.

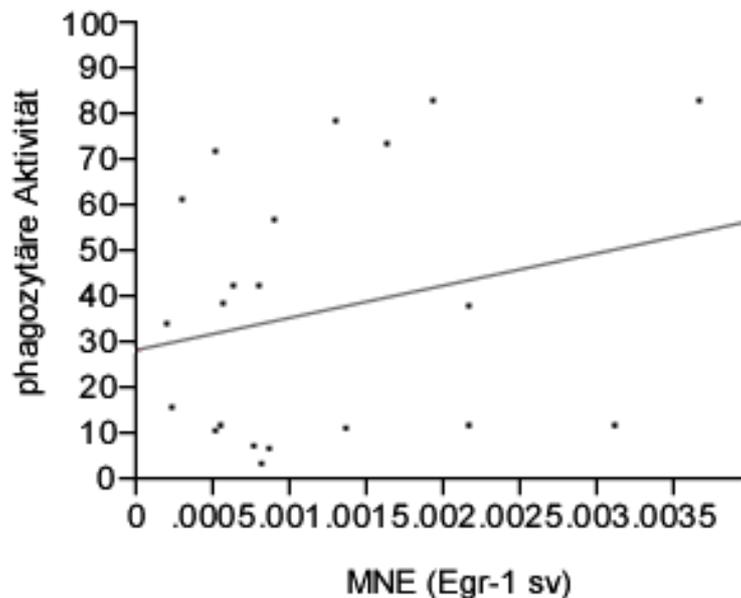
Im Gegensatz zu den deutlichen Veränderungen der Expression der kürzeren mRNA-Variante (Abb. 11), bleibt die längere mRNA Egr1-lv wie auch bei der Ausdauerbelastung über die untersuchte Gesamtdauer hinweg relativ konstant (Abb. 12).



**Abb. 12:** Expression von *Egr1-lv* unter normobarer Hypoxie. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung. Dargestellt sind die Rohdaten und die Mittelwerte der Gruppen (Kästchen) mit den 95% Konfidenzintervallen der ANOVA, die keine Signifikanz erkennen lässt.

Für die Blutproben des 23stündigen Hypoxieauenthalts liegen uns ferner die in der Arbeit von Niess und Kollegen von 2003 bestimmten Daten zur phagozytären Aktivität vor. Wir vergleichen diese mit der Expression der mRNA-Variante *Egr1-sv*. Dabei findet sich in einer multifaktoriellen Varianzanalyse mit der phagozytären Aktivität als Zielgröße und der *Egr1-sv*-Expression sowie dem Zeitpunkt als Einflussgrößen kein signifikanter Zusammenhang.

Es findet sich auch keine signifikante Korrelation zwischen der *Egr1-sv*-Expression und der phagozytären Aktivität über alle Gruppen hinweg (Bestimmtheitsmaß: 5,6%) (Abb. 13).

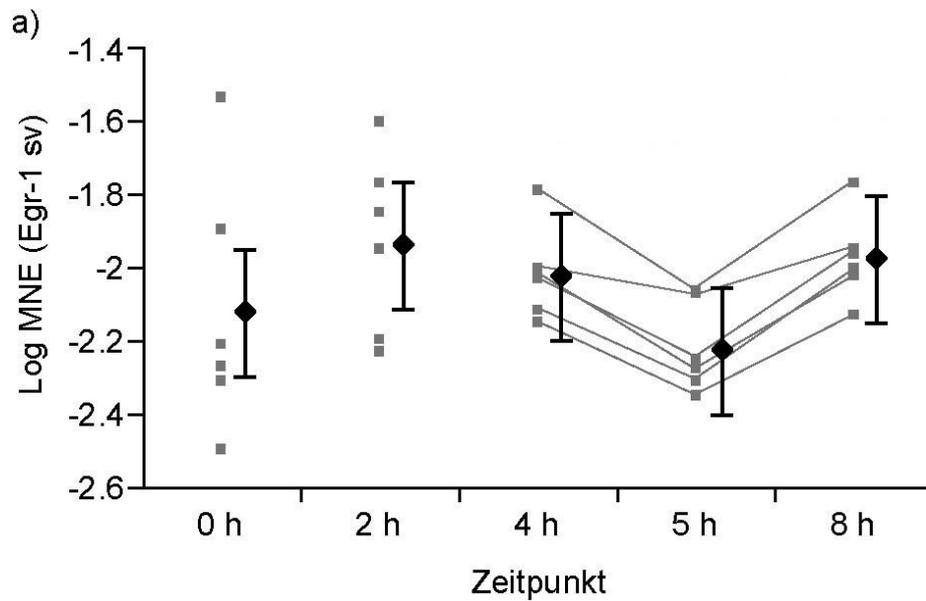


**Abb.13:** Korrelation der phagozytären Monozytenaktivität mit den Expressionswerten des Egr1-sv. Dargestellt sind die Rohdatenwerte und eine Ausgleichsgerade über alle Abnahmezeitpunkte hinweg.

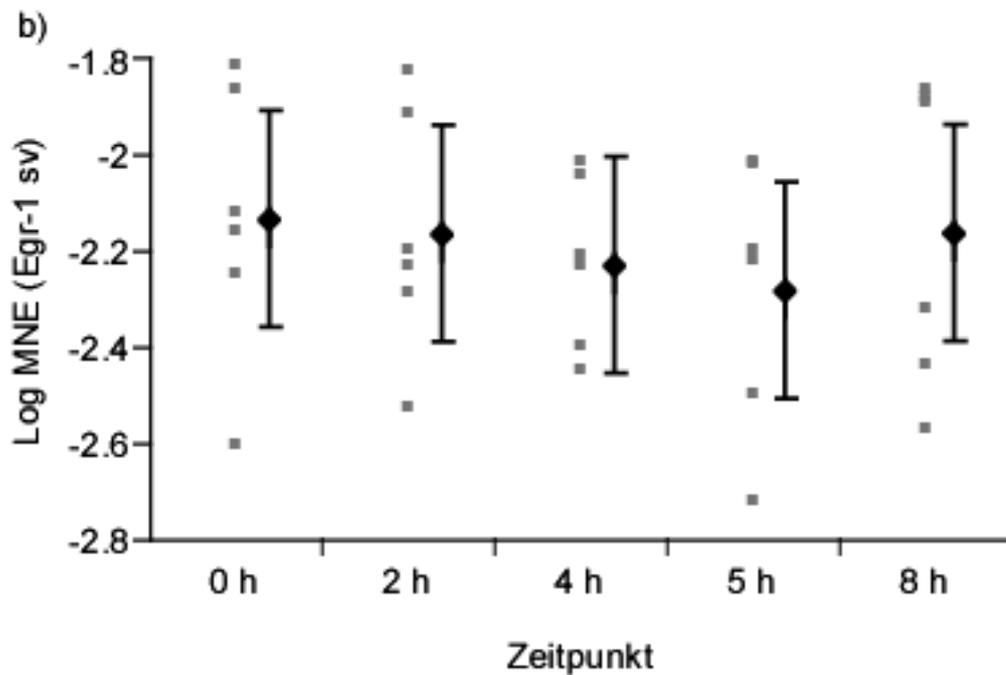
### 3.3.3 Unter placebokontrollierter kurzfristiger normobarer Hypoxieexposition unter Antioxidantienbehandlung

Bei vierstündigem Aufenthalt in normobarer Hypoxie wurde in einer Crossover-Studie ein Vergleich zwischen einer Verumgruppe, die mit Antioxidantien behandelt wurde, und einer entsprechender Placebokontrollgruppe durchgeführt. Dabei zeigt sich in einer Multifaktoriellen Varianzanalyse mit der logarithmierten Egr1-sv-Expression als Zielgröße und dem Zeitpunkt sowie der Behandlung als Einflussgröße lediglich ein signifikanter Einfluss der Behandlung. Durch die Gabe der Antioxidantien sank die Egr1-sv-Expression auf 73% der Placebogruppenwerte ab (CI 54% - 97%;  $p=0,033$ ). In der Kontrollgruppe besteht eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Veränderung der Egr1-sv-Expression, die in der Verumgruppe jedoch nicht nachweisbar ist. Ohne Antioxidantienbehandlung steigt die Expression von Egr1-sv

innerhalb der ersten zwei Stunden der Hypoxie, sinkt dann über die restlichen 2 Stunden während der Exposition ab. Zwischen den Messzeitpunkten nach 4 und 5 Stunden lässt sich dann ein Trend zum Expressionsabfall feststellen, wohingegen die Expression zwischen den Messungen nach 5 und 8 Stunden über den Ursprungswert hinaus ansteigt. (Abb. 14a).



**Abb. 14a:** Expression von Egr1-sv bei vierstündiger normobarer Hypoxie ohne Behandlung mit Antioxidantien.



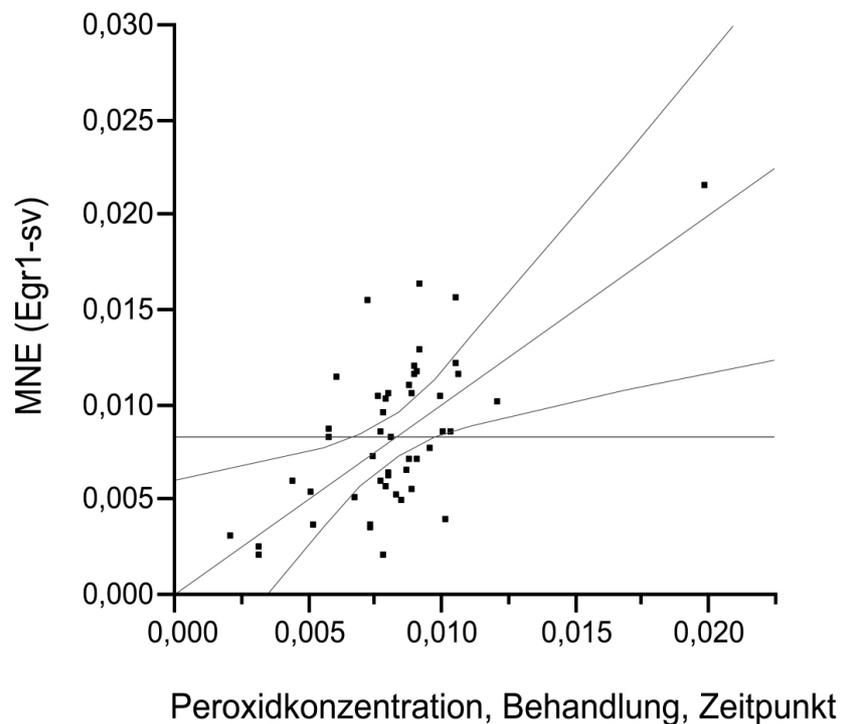
**Abb. 14b:** Expression von *Egr1-sv* bei vierstündigem Aufenthalt in normobarer Hypoxie unter Behandlung mit Antioxidantien. Der in Abb.6a gezeigte Effekt der Hypoxie besteht hier nicht.

Bei direktem Vergleich der beiden Gruppen zeigt sich, dass bei Behandlung mit Antioxidantien keine signifikante Veränderung der Expression von *Egr1-sv* während der Hypoxie oder der Reoxygenierung besteht, und dass die Expressionswerte insgesamt etwas niedriger liegen als in der Placebogruppe (Abb. 14a, b).

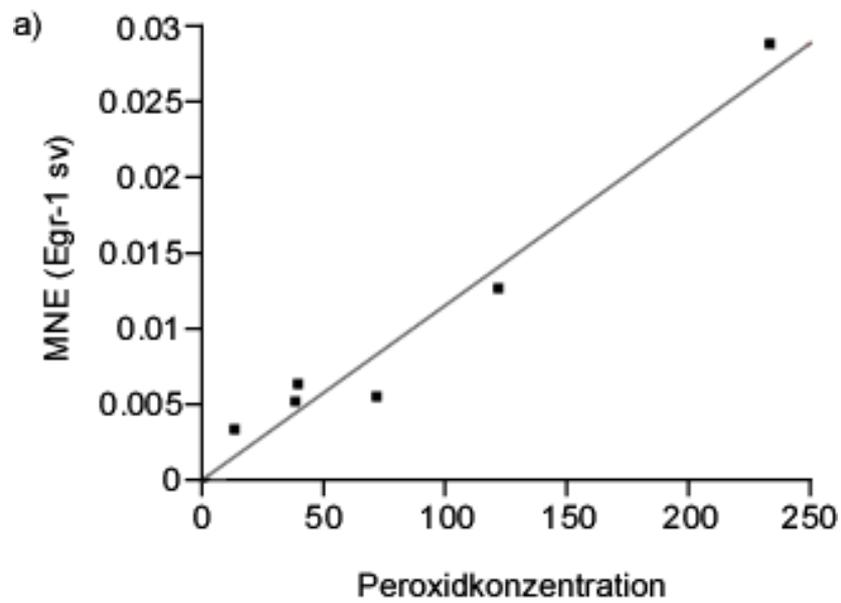
Eine Verfälschung dieser Ergebnisse durch tageszeitliche Schwankungen wurde ausgeschlossen, indem die Hypoxieexposition der Placebo- und der Verumgruppe jeweils zur gleichen Tageszeit stattfand.

Wie in der Einleitung diskutiert, ist beim derzeitigen Wissenschaftlichen Stand von einer Korrelation der Peroxidkonzentration und der *Egr1-sv*-Expression auszugehen. Bei der Peroxidkonzentration ist von einer Interaktion mit dem Faktor Hypoxie und auch mit dem Faktor Antioxidantiengabe auszugehen. Wir haben deshalb in einer Multifaktoriellen Varianzanalyse mit einem Interaktionsterm aus Peroxidkonzentration, Behandlungsmodus und Zeitpunkt die Korrelation zur *Egr1-sv*-Expression bestimmt (Abb. 15). Dabei zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang. Eine detailliertere Betrachtung der Korrelation der Peroxidkonzentration mit der *Egr1-sv*-Expression erbrachte lediglich in der Placebokontrollgruppe vor Beginn der Exposition einen hochsignifikanten

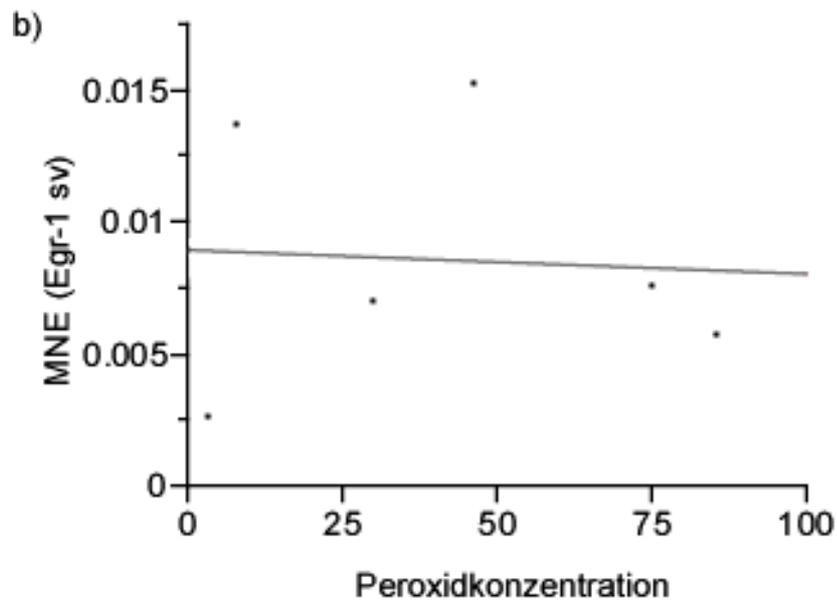
Zusammenhang (Abb. 16a). Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,98 mit einem Bestimmtheitsmaß von 96% ( $p = 0,0007$ ). Diese Korrelation besteht weder zu einem anderen in der Studie untersuchten Zeitpunkt noch bei der Verumgruppe unter Antioxidantienbehandlung (Abb. 16b, 16c). So beträgt der Korrelationskoeffizient für die Verumgruppe vor Beginn der Hypoxie 0,06 und für die Placebogruppe nach vierständiger Hypoxie 0,14. Die entsprechenden Bestimmtheitsmaße betragen 0,3% respektive 2%.



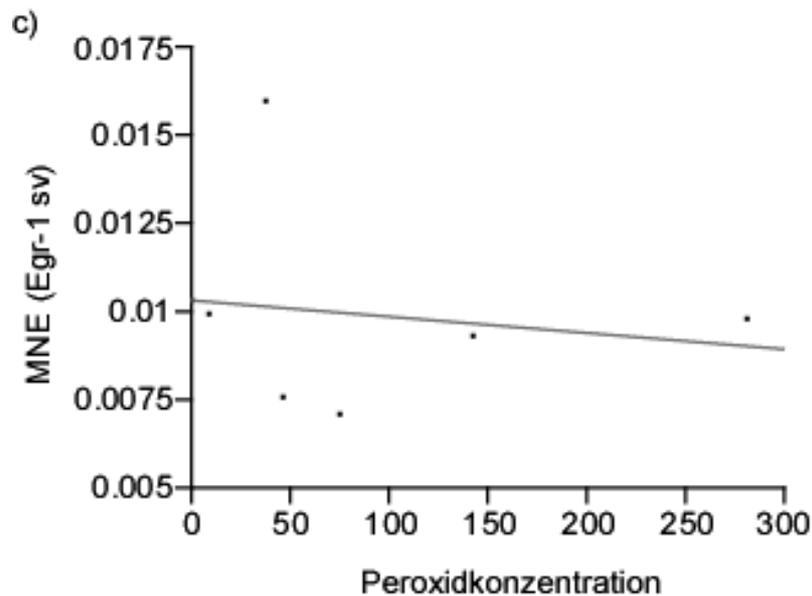
**Abb. 15:** Darstellung der Korrelation nach einer multifaktoriellen Analyse mit der Egr1-sv-Expression als Zielwert und der Peroxidkonzentration, der Behandlung sowie dem Zeitpunkt als Hilfswerte.  $p = 0,0003$



**Abb. 16a:** Zu Beginn der Hypoxie besteht in der Placebogruppe eine signifikante Korrelation der Egr1-sv-Expression und der peripheren Peroxidkonzentration.



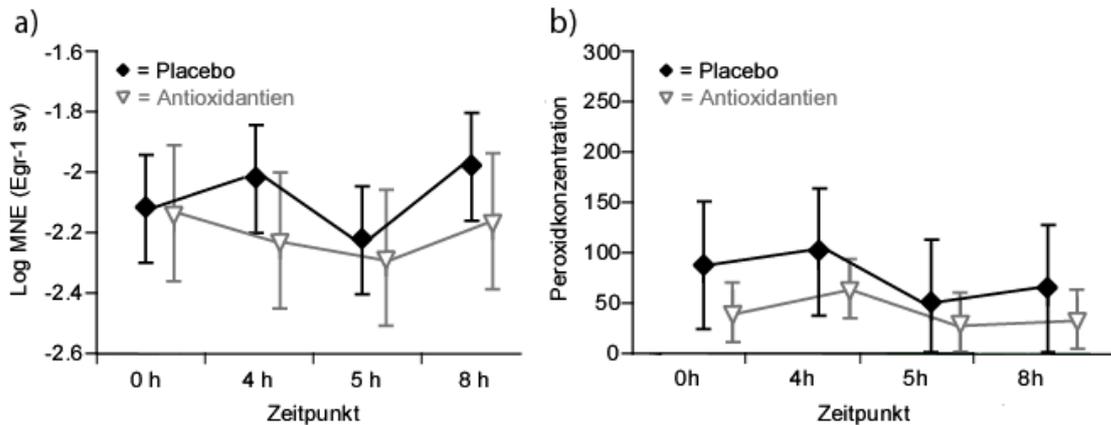
**Abb. 16b:** Unter Behandlung mit Antioxidantien ist keine Korrelation zwischen der Expression von Egr1-sv und der Peroxidkonzentration nachweisbar.



**Abb. 16c:** Nach 4 Stunden unter Hypoxiebedingungen ist auch in der Placebogruppe keine Korrelation zwischen der Egr1-sv-Expression und der Peroxidkonzentration mehr feststellbar.

Bei Vergleich der Peroxidkonzentrationen zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe findet sich innerhalb letztgenannter zu allen untersuchten Zeitpunkten eine höhere Konzentration als in der mit Antioxidantien behandelten Gruppe (Abb. 17b).

Dabei zeigt sich in einer Multifaktoriellen Varianzanalyse mit der Peroxidkonzentration als Zielgröße und dem Zeitpunkt sowie der Behandlung als Einflussgröße ein signifikanter Einfluss der Behandlung. Durch die Gabe der Antioxidantien sank die Peroxidkonzentration um 32  $\mu\text{mol/l}$  signifikant ab (CI: 2,3 – 62  $\mu\text{mol/l}$ ;  $p=0,035$ ).



**Abb. 17:** a) Unter Behandlung mit Antioxidantien (Dreieck, grau) wird Egr1-sv schwächer exprimiert als in der Placebogruppe (Raute, schwarz) (s. Abb.14a). b) Vergleich der peripheren Peroxidkonzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$  mit (Dreieck, grau) und ohne (Raute, schwarz) Antioxidantienbehandlung.

### 3.4 Veränderungen des Blutbilds

#### 3.4.1 Unter erschöpfender Ausdauerbelastung

Unter Ausdauerbelastung steigt die Gesamtleukozytenkonzentration sowie die Konzentration der neutrophilen Granulozyten signifikant an. Einen leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg findet man auch bei Mono- und Erythrozyten. Die basophilen Granulozyten zeigen keine feststellbare Konzentrationsänderung nach Ausdauerbelastung. Einen Abfall beobachtet man bei eosinophilen Granulozyten und bei Lymphozyten.

Bei Durchführung eines gepaarten t-Tests finden sich für Lymphozyten und Monozyten signifikante Veränderungen der Zellzahlen ( $p < 0,05$ ).

**Tab. 2a:** Veränderungen des Blutbilds unter Ausdauerbelastung. Alle Werte  $\times 10^3/\mu\text{l}$ . In Klammern sind die 95%-Konfidenzintervalle der Mittelwerte angegeben. Signifikante Veränderungen sind kursiv hervorgehoben.

	<b>Leukozyten</b>	<b>Neutrophile</b>	<b>Monozyten</b>	<b>Erythrozyten</b>
<b>vorher</b>	6,25 (5,32–7,18)	3,31 (2,69–3,92)	0,39 (0,29–0,48)	4957 (4662–5251)
<b>nachher</b>	12,38 (8,57–16,11)	9,51 (5,95–13,08)	0,67 (0,41–0,92)	5047 (4718–5376)

	<b>Eosinophile</b>	<b>Lymphozyten</b>	<b>Basophile</b>
<b>vorher</b>	0,20 (0,11–0,29)	2,14 (1,74 – 2,54)	0,05 (0,03 – 0,06)
<b>nachher</b>	0,08 (0,04–0,12)	1,79 (1,42 – 2,16)	0,05 (0,03 – 0,06)

**Tab. 2b:** Ergebnisse eines gepaarten t-Tests für die Lymphozyten- und Monozytenpopulationen.

	<b>Mittelwert der Differenz</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>Konfidenzintervall</b>
<b>Lymphozyten</b>	0,35	0,26	0,16 – 0,54
<b>Monozyten</b>	0,28	0,21	0,12 – 0,44

Von uns untersucht wurde nur die mRNA isolierter PBMCs, somit können sich nur relative Verschiebungen der Lymphozytenpopulation zu der Monozytenpopulation, welche beide zusammen die Gruppe der PBMCs bilden, auf unsere Messergebnisse auswirken. Aufgrund der in Tabelle 2a dargestellten Mittelwertsveränderungen ist von einem Absinken der Lymphozytenpopulation relativ zur Monozytenpopulation durch die Belastung auszugehen. Statistisch zeigte sich dabei nur ein 11,6%iges relatives Absinken (CI: 5,6% – 17,6%;  $p=0,003$ ).

### **3.4.2 Unter placebokontrollierter kurzfristiger normobarer Hypoxieexposition unter Antioxidantienbehandlung**

Bei der Untersuchung peripheren Blutzellkonzentrationen der Probanden vor, während und nach dem vierstündigen Aufenthalt in normobarer Hypoxie können weder unter Antioxidantienbehandlung noch in der Placebogruppe signifikante Veränderungen nachgewiesen werden.

Prüft man jedoch die Korrelation der Egr1-sv-Expression zu der Lymphozytenzahl, findet sich ein schwacher, jedoch signifikanter Zusammenhang (Bestimmtheitsmaß: 8,93%,  $p = 0,02$ ). Differenziert man zwischen Behandlungs- und Placebogruppe, so findet sich ein deutlicher Unterschied. Die Placebogruppe erreicht ein Bestimmtheitsmaß von 19,60% mit  $p = 0,01$  (adjustiert nach Bonferroni  $p = 0,02$ ), während die Behandlungsgruppe keine Signifikanz aufweist. Am deutlichsten ist die Korrelation in der Placebogruppe eine Stunde nach Hypoxieende mit einem Bestimmtheitsmaß von 85,81% und  $p = 0,01$  (bereinigtes  $p = 0,07$ ). Im Gegensatz dazu läßt sich zu keinem Zeitpunkt in einer der beiden Gruppen oder der Gesamtpopulation eine signifikante Korrelation zwischen der Egr1-sv-Expression und der Monozytenzahl beobachten. Tendenziell besteht aber zu der Monozytenzahl eine eher negative Korrelation.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Überblick**

Nachdem Nachweis die unterschiedlichen mRNA-Varianten Egr1-sv und egr1-lv in Mäuseretina nachgewiesen hatten (Simon et al., 2004), konnte in dieser Arbeit die Existenz beider Varianten auch in peripheren mononukleären Blutzellen des Menschen nachgewiesen werden. Unter Hypoxie und Ausdauerbelastung zeigt diese Studie *in vivo* eine differentielle Regulation von Egr1, die interessanterweise ausschließlich die kürzere Variante Egr1-sv betrifft und für diese bei den verschiedenen Belastungstypen gegensinnig ausfällt.

Bezüglich der Beeinflussung des Egr1 durch den Belastungsparameter Noradrenalin sowie durch Veränderung der Konzentration an ROS deuten die Ergebnisse dieser Studie auf die Existenz interessanter Zusammenhänge hin. So besteht eine positive Korrelation zwischen der Noradrenalinkonzentration und der Expression der mRNA-Variante Egr1-sv. Ausserdem zeigte sich eine gleichsinnige Reaktion der Egr1-sv-Expression und der freien Radikale auf exogene Antioxidantienzufuhr.

### **4.2 Die Expression der mRNA-Varianten Egr1-sv und Egr1-lv**

Ein Hauptaspekt der durchgeführten Versuche galt der Differenzierung zwischen der mRNA-Variante Egr1-sv und der längeren mRNA Egr1-lv. Diese unterscheiden sich wie unter 1.4.1. beschrieben durch 293 zusätzliche Basenpaare nahe der 3'-UTR des Egr1-lv (Abb. 1). Die Arbeit von Simon und Mitarbeitern (Simon et al., 2004) über Egr1 in muriner Retina legt nahe, dass die längere Variante Egr1-lv durch den posttranskriptionellen Mechanismus der Polyadenylierung reguliert wird, während die Kontrolle über die kürzere Egr1-sv wahrscheinlich auf transkriptioneller Ebene stattfindet. In der vorliegenden Studie konnte weder unter Hypoxie noch unter Ausdauerbelastung eine Veränderung der Egr1-lv-Expression gefunden werden (Abb. 6b, Abb.12). Die Hypothese, dass unter den genannten Belastungen eine posttranskriptionelle Regulation durch Polyadenylierung der mRNA stattfindet, konnte somit nicht bestätigt werden. Da die prädominierende Variante Egr1-sv hingegen deutlich auf die Hypoxieexposition reagiert, vermuten wir wichtige transkriptionelle Steuerungsprozesse der Zelle ausgelöst durch Hypoxie beziehungsweise erschöpfende Belastung. Bei dem Immediate Early Gen Egr1 wäre eigentlich eine

rasche Veränderung der Expression innerhalb der ersten Minuten zu erwarten gewesen. Doch auch die engmaschigere Untersuchung im Rahmen der vierstündigen Hypoxie weist erst nach einigen Stunden eine signifikante Veränderung der Egr1-sv-Expression nach. Dies lässt vermuten, dass bei Hypoxie der Auslösende Faktor für die Regulation von Egr1-sv nicht unmittelbar mit Belastungsbeginn alteriert wird.

Aufgrund des Studienaufbaus ist eine kurzfristige frühe Expressionsveränderung des Egr1-lv allerdings nicht endgültig auszuschließen, da sie zum zweiten Untersuchungszeitpunkt 7 Stunden nach Hypoxiebeginn beziehungsweise nach Abschluss des Halbmarathonwettkampfes bereits wieder in die Nähe des Ursprungswert zurückgekehrt sein könnte. Eine derart rasche Reaktion wäre bei der für Egr1-lv vermuteten, sehr raschen Regulation durch postranskriptionelle Polyadenylierung durchaus möglich. Aus diesem Grund wären frühere Untersuchungszeitpunkte der Expression der beiden Egr1 mRNA-Varianten innerhalb der ersten Minuten sowohl eines Hypoxieaufenthaltes als auch einer Ausdauerbelastung interessant.

### **4.3 Erschöpfende Ausdauerbelastung**

Bei den Probanden dieses Versuchs fand sich eine signifikant erhöhte Expression der mRNA-Variante Egr1-sv nach dem Halbmarathon. Vor kurzem hat sich gezeigt, dass HSP-72 durch Ausdauerbelastung entsprechend der jeweiligen Dauer und Intensität hochreguliert wird (Fehrenbach et al., 2005). Die Konzentration des HSP-72 wird aber zudem durch einen Anstieg der Körperkerntemperatur erhöht (DeMaio et al., 1993). Dass die Egr1-sv-Expression durch Ausdauerbelastung nun ähnlich stark induziert wird wie die Expression des HSP-72, könnte auf eine relativ starke Stimulation beziehungsweise die Existenz mehrerer additiver Stimuli der Expression durch den Halbmarathonwettkampf hinweisen.

#### **4.3.1 Veränderungen unter intensiver Ausdauerbelastung**

Schon seit drei Jahrzehnten wird die sympathische Reaktion des Körpers auf physische Belastung untersucht. Der bei unseren Athleten beobachtete signifikante Anstieg des Noradrenalins im peripheren Blut entspricht den Ergebnissen früherer Studien, die unter Belastung eine erhöhte Katecholaminausschüttung sowie eine

gleichzeitig leicht verminderte Noradrenalinclearance nachweisen konnten (Kjaer et al., 1987). Wir konnten ausserdem eine enge positive Korrelation der Noradrenalkonzentration zu der Expression der mRNA-Variante Egr1-sv nachweisen (Abb. 7). Für kardiale Myozyten wurde beschrieben, dass Noradrenalin die EGR1-Expression induziert (Shamim et al., 1999). Die von uns beobachtete Korrelation könnte der Effekt einer ähnlichen Interaktion in peripheren mononukleären Blutzellen unter Ausdauerbelastung sein. Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass andere Regulationsmechanismen, wie zum Beispiel der Einfluss der ROS, zu den geprüften Zeitpunkten ebenfalls wirken.

Entsprechend der Ergebnisse früherer Beobachtungen steigt CKMB bei unseren Probanden während des Halbmarathonwettkampfes ebenfalls signifikant an (Abb. 8a). Wie die parallele Untersuchung der herzspezifischen Troponine und des CKMB unter Belastung gezeigt hat, ist dabei nur ein geringer Anteil dieses Enzyms kardialen Ursprungs (Shave et al., 2003).

Auffallend ist, dass der Quotient aus CKMB und CK schon vor Beginn der Belastung die 5% überschreitet. Während des Wettkampfes ändert sich dieses Verhältnis nicht merklich. Im klinischen Alltag gilt ein CKMB-Anteil an der Gesamt-CK-Aktivität über 5% als pathologisch. In manchen Quellen liegt diese Grenze sogar bei 2,5%. Ein solches Ergebnis gilt zwar nicht als diagnostisch, wird aber als deutlicher Hinweis auf einen kardialen Ursprung der erhöhten Enzymaktivität interpretiert (Kasper et al., 2005). Es ist jedoch bekannt, dass schwere körperliche Belastung diesen Quotienten in ähnlicher Art wie ein Herzinfarkt beeinflusst (Apple et al., 1984). Sowohl für Marathonläufer als auch für Infarktpatienten wurden Werte um 7% gemessen, was unseren Ergebnissen sehr nahe kommt. Die gleiche Arbeitsgruppe stellte ausserdem eine deutliche Erhöhung der CKMB-Aktivität durch Training fest, was eine mögliche Erklärung für die hohen Ergebnisse unserer Probanden vor Beginn des Halbmarathons wäre (Apple et al., 1985).

#### ***4.4 Mittellangfristige normobare Hypoxieexposition***

Betrachtet man die Ergebnisse der 23stündigen Hypoxieexposition, so fällt vor allem der deutliche Expressionsabfall der Egr1-sv-mRNA innerhalb der ersten sieben Stunden auf. Studien weisen EGR1 eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation zu, die durch chronische Hypoxie ausgelöst wird (Semenza, 2000). Bisherige Studien

zur Expression von EGR1 unter Hypoxie befassen sich vorrangig mit der zellulären Reaktion auf lokale Hypoxie zum Beispiel in Lungengewebe bei pulmonalen Erkrankungen (Yan et al., 1998; Yan et al., 2000). Dabei wurde ein Anstieg der Expression dieses Transkriptionsfaktors beobachtet. Wie der von uns gezeigte Abfall des Egr1 in peripheren mononukleären Blutzellen unter normobarer Hypoxie einzuordnen ist, und ob sich die Expressionswerte bei längerem Aufenthalt in Hypoxie dann doch erhöhen, sind interessante Fragestellungen, die jedoch erst durch zusätzliche Studien beantwortet werden können.

Die in den erwähnten Studien beobachtete durch Gewebshypoxie ausgelöste Hochregulation des EGR1 fand vor allem in mononukleären Phagozyten statt (Yan et al., 1998). Um einen eventuellen funktionellen Zusammenhang aufzuzeigen, überprüften wir die Korrelation zwischen der Egr1-sv-Expression und der phagozytären Aktivität der Monozyten. Diese war jedoch in der vorliegenden Untersuchung zwischen der Egr1-sv-Expression und der phagozytären Aktivität der Monozyten nicht signifikant. Demnach scheint EGR1 im Zusammenhang mit einer normobaren Hypoxieexposition bei gesunden Probanden nicht direkt an der Regulation der Phagozytotischen Aktivität der Monozyten des peripheren Blutes beteiligt zu sein.

#### ***4.5 Placebokontrollierte kurzfristige normobare Hypoxieexposition unter Antioxidantienbehandlung***

Bei diesem Versuchsaufbau lässt sich zwischen der Placebo- und der Behandlungsgruppe ein Expressionsunterschied für Egr1-sv feststellen, wobei die Egr1-sv-Expression während des eigentlichen Hypoxieaufenthaltes bei Antioxidantienbehandlung unverändert bleibt, in der Placebogruppe hingegen ansteigt. Bei genauerer Betrachtung der Expressionswerte innerhalb der Placebogruppe zu den untersuchten Zeitpunkten zeigen sich zwei signifikante Veränderungen (Abb.14a). Zuerst findet ein signifikanter Expressionsabfall innerhalb der ersten Stunde nach Hypoxieende statt. Für diesen ist nicht eindeutig festzulegen, wodurch er verursacht wird. Bei der längerdauernden, 23stündigen Hypoxieexposition findet sich innerhalb der ersten sieben Stunden unter Hypoxie sowie innerhalb der ersten zwei Stunden nach Ende des Hypoxieaufenthalts ebenfalls ein Abfall der Egr1-sv-Expression (Abb. 11). Somit könnten für den

signifikanten Expressionsabfall nach der vierstündigen Hypoxie zwei Umstände verantwortlich sein: entweder ist er direkte Folge des Aufenthalts unter Hypoxie oder bereits ein Zeichen der Anpassung an das wieder normalisierte Sauerstoffangebot. Selbstverständlich ist auch ein Zusammenspiel der beiden Effekte nicht auszuschließen. Die zweite der angesprochenen signifikanten Veränderungen findet zwischen einer und vier Stunden nach Ende des Hypoxieaufenthalts statt. Nach dem direkt an die Hypoxie anschließenden Expressionsrückgang ist innerhalb dieses Zeitintervalls ein deutlicher Anstieg der Egr1-sv-Expression zu beobachten, der sogar über den Ausgangswert hinausgeht. Wiederum läßt sich bei der längeren Hypoxieexposition eine vergleichbare, ansteigende Tendenz zwischen der zweiten und der siebten Stunde nach Ende des Hypoxieaufenthalts beobachten. Allerdings ist letztere weniger ausgeprägt und endet weit unter dem ursprünglichen Expressionswert. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Zeitraum, in dem eine geringere Expression der Egr1-sv-mRNA stattfindet, sich mit der Dauer der vorangegangenen Hypoxie verlängert. Dies würde implizieren, dass die Regeneration umso langsamer stattfindet je länger die vorausgegangene Hypoxieexposition andauert.

Dass die Dauer des Hypoxieaufenthalts auch die Qualität der Wirkung auf die Leistungsfähigkeit beeinflussen kann, ist bekannt (Bailey et al., 1997; Hoppeler et al., 2001). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde das Prinzip des ‚Sleep high- Train low‘ entwickelt, welches derzeit im Fokus des sportmedizinischen Interesses steht. Dabei trainieren Athleten auf Meereshöhe, sind aber während der Ruhezeiten einer Hypoxie ausgesetzt, die Höhen zwischen 2000 und 3000m üNN simuliert.

#### **4.6 Peroxidkonzentration**

Die Peroxidkonzentration im Blut der Probanden der vierstündigen placebokontrollierten Hypoxieexposition mit Antioxidantienbehandlung liegt während und nach dem Hypoxieaufenthalt in der Placebogruppe über der in der Verumgruppe gemessenen Konzentration. Die Gabe relativ hoher Dosen an Antioxidantien soll die eventuelle Wirkung freier Radikale blockieren und dadurch helfen den Zusammenhang zwischen diesen und Egr1 zu klären. Die Peroxidkonzentration liegt in der Placebogruppe konstant höher als in der Behandlungsgruppe. Dies deutet auf eine erfolgreiche Blockade des oxidativen Stress durch die Antioxidantiengabe hin.

Da auch die Egr1-sv-Expression in der Placebogruppe konstant über derjenigen der Verumgruppe liegt, ist ein direkter Zusammenhang der beiden Parameter *in vivo* wahrscheinlich, zumal er *in vitro* bereits beschrieben ist (Datta et al., 1993). Für einen Zusammenhang zwischen Peroxidkonzentration und Egr1-sv Expression spricht auch die Tatsache, dass die Gabe von Antioxidantien signifikante Effekte, die in der Placebogruppe zu finden waren, attenuieren konnte.

In der vorliegenden Studie findet sich bei Vergleich der Egr1-sv-Expression mit der Peroxidkonzentration ein auffallend ähnlicher Kurvenverlauf: Die Werte beider Gruppen driften während der Hypoxieexposition zuerst auseinander, bevor sie sich eine Stunde nach Hypoxieende einander annähern, um sich letztendlich erneut voneinander zu entfernen. Diese Gemeinsamkeiten stützen die von Datta 1993 *in vitro* aufgestellte Hypothese, dass EGR1 und das Reduktions-Oxidations-System der Zelle in engem regulatorischem Zusammenhang stehen. Vor Hypoxiebeginn findet sich in der Placebogruppe zudem eine signifikante Korrelation der Peroxidkonzentration zur Egr1-sv-Expression. Entgegen der Erwartungen geht diese jedoch im Verlauf der Hypoxie verloren und ist auch zum letzten unserer Messzeitpunkte vier Stunden nach Hypoxieende noch nicht nachweisbar. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ein oder mehrere hypoxiebedingte, ROS-unabhängige, starke zelluläre Stimuli der Egr1-Expression, was jedoch höchstwahrscheinlich deutlichere Veränderungen der Expressionswerte auslösen würde. Auf Grund des ähnlichen Kurvenverlaufs der Egr1-sv-Expression und der Peroxidkonzentration prüften wir die Korrelation der jeweiligen Veränderung zwischen zwei Messzeitpunkten. Erstaunlicherweise stellt sich auch hier keine signifikante Korrelation dar.

Möglich wäre auch ein gewisser Anpassungseffekt zu Beginn der Hypoxie, wenn die Expressionswerte beider Gruppen praktisch identisch sind, und später während der Annäherung der Werte kurz nach Hypoxieende als der Organismus besser auf den Sauerstoffmangel eingestellt war. Ein solcher Vorgang ließe sich durch die ROS-abhängige Regulation des EGR1 erklären: In der Literatur wird für Höhenadaptierte eine größere intrinsische antioxidative Kapazität als für Tieflandbewohner beschrieben (Gelfi et al., 2004). Eine erhöhte intrinsische Aktivität macht die externe Antioxidantienzufuhr überflüssig. In Placebo- und Verumgruppe existiert dann eine vergleichbare Konzentration freier Radikale mit entsprechend ähnlichem Einfluss auf

die EGR1-Expression.

#### **4.7 Zellshifts**

Die in der vorliegenden Studie gemessenen Veränderungen des Blutbilds unter der Ausdauerbelastung eines Halbmarathonwettkampfes entsprechen den in der Literatur bekannten Tendenzen (Pedersen et al., 2000). Es findet sich sowohl der dort beschriebene deutliche Anstieg der neutrophilen Granulozyten als auch die nach Ende des Wettkampfes abgesunkene Lymphozytenzahl. Die beschriebene Lymphopenie nach Ausdauerbelastung wird vor allem durch Migration und zum Teil auch durch Apoptose verursacht (Wang et al., 2005). Für beide Prozesse wird ein direkter Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor EGR1 postuliert, vermittelt durch bestimmte Zytokine wie ICAM, TNF $\alpha$  oder p53 (Maltzman et al., 1996b; Ahmed, 2004). Die in dieser Arbeit beobachtete Steigerung der Egr1-sv-Expression in peripheren mononukleären Blutzellen bei Ausdauerbelastung stützt diese Hypothesen und ist ein weiterer Hinweis auf die wichtige Funktion des EGR1 bei der belastungsinduzierten Immunmodulation. Dass die Lymphozytenzahl in der vorliegenden Studie nicht signifikant absinkt, ist wahrscheinlich auf den relativ frühen Zeitpunkt der Blutentnahme direkt nach Ende des Wettkampfes also durchschnittlich weniger als 2 Stunden nach Beginn der Belastung zurückzuführen. Die reaktive Lymphozytenmigration wird EGR1-abhängig durch ICAM gesteuert und der maximale Effekt ist erst einige Stunden nach Belastungsbeginn zu erwarten.

Die reaktive Lymphozytenmigration wird EGR1-abhängig durch ICAM gesteuert und der maximale Effekt ist erst einige Stunden nach Belastungsbeginn zu erwarten. In dieser Studie fand die Blutentnahme direkt nach Ende des Wettkampfes also durchschnittlich weniger als 2 Stunden nach Beginn der Belastung statt. Daher darf vermutet werden, dass das Minimum der Lymphozytenzahl noch nicht erreicht war und die Veränderung zu einem späteren Zeitpunkt noch deutlicher ausfallen würde.

Obwohl sich bei erschöpfender Ausdauerbelastung die erwähnten signifikante Veränderungen der Zellzahlen finden, ist es für die Interpretation der im Rahmen dieser Studie gewonnenen Werte wichtig zu bedenken, dass ausschliesslich mRNA aus PBMCs betrachtet wurde. Absolut fällt die Lymphozytenzahl während des Wettkampfes um 16,35%, während die Monozytenzahl um 41,79% ansteigt. Der für uns relevante relative Unterschied bei ausschließlicher Berücksichtigung der PBMCs

beträgt nur noch jeweils 11,6% Abfall der Lymphozyten beziehungsweise Anstieg der Monozyten. Derart geringe Veränderungen können im Rahmen der Interpretation unserer Werte vernachlässigt werden. Eine neuere Genexpressionsstudie an isolierten Lymphozyten und Monozyten ergab, dass die Expression von Egr1 in Monozyten den circa 1,4fachen Wert im Vergleich zu Lymphozyten erreicht. Bei dem von uns beobachteten Zellshift ergibt sich also lediglich eine dadurch bedingte Steigerung der Egr1-Expression von nicht einmal 6%.

Die Wirkung, die Hypoxie auf die Leukozytenpopulation ausübt, wurde bisher vorrangig für lokale Gewebshypoxie untersucht, wie sie zum Beispiel in Tumoren oder bei nekrotischen Prozessen entsteht. Dabei wurde eine hypoxiebedingte Inhibition der Makrophagenmigration beobachtet (Turner et al., 1999). Bezüglich der Leukozytenpopulation im peripheren Blut lassen in vitro Studien eine transendotheliale Migration der Monozyten unter Hypoxie erwarten (Kalra et al., 1996). Eine in vivo Untersuchung wies bei Probanden, die vier Stunden in hypokapnischer Hypoxie verbrachten, ähnliche Veränderungen des Blutbilds nach, wie sie von der körperlicher Belastung her bekannt sind. Im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe fand sich bei den exponierten Probanden eine Lymphopenie mit gleichzeitiger Neutrophilie (Thake et al., 2004). Die von uns untersuchten Probanden zeigten weder bei der Konzentration der Gesamtleukozyten noch in einer Subpopulation signifikante Veränderungen. Es ist jedoch möglich, dass zwar eine Migration der Leukozyten stattgefunden hat, in der von uns beobachteten Gruppe von 6 Probanden jedoch keine statistisch nachweisbare Veränderung verursachte.

Die bei vierstündigem Hypoxieaufenthalt beobachtete positive Korrelation der Egr1-sv-Expression zu der Lymphozytenzahl deutet, vor allem im Zusammenhang mit der Tendenz zur negativen Korrelation mit der Monozytenkonzentration, darauf hin, dass der größere Teil der mRNA-Variante Egr1-sv in der Lymphozytenpopulation gebildet wird.

#### ***4.8 Vergleich zwischen Hypoxie und Ausdauerbelastung***

Bisherige Studien legten für Ausdauerbelastungen und Höhengaufenthalte eine gleichgerichtete Immunmodulation nahe, die zunächst stimulierend, bei stärkerer Belastung jedoch immunsupprimierend wirkt (Shephard, 1998; Hartmann et al.,

2000; Bailey et al., 2001b). Umso erstaunlicher ist der deutliche Unterschied zwischen der Egr1-sv-Expression unter Hypoxie und Ausdauerbelastung, der in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Soweit uns bekannt ist, stellt EGR1 den ersten Transkriptionsfaktor dar, bei dem eine differenzielle Regulation unter Hypoxie und Ausdauerbelastung nachgewiesen werden konnte. Es kann eingewandt werden, dass bei dem Vergleich von körperlicher Belastung und Belastung durch Umweltfaktoren die potentiell sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Eigenschaften beider Stimuli bedacht werden müssen, was sich durch Intensität der Belastung und Adaptation des Organismus entscheidet (Malm et al., 2005). Auch aufgrund der Unkenntnis des genauen Schwellenwertes für die veränderte Wirkung, der zudem höchstwahrscheinlich individuell stark variiert, können erhebliche Schwankungen zwischen verschiedenen Studien nicht ausgeschlossen werden. Allerdings kann man vermuten, dass die hier beobachtete differenzielle Expression der mRNA-Variante Egr1-sv mit signifikanter gegensinnigen Veränderung unter Ausdauerbelastung und Hypoxie tatsächlich besteht, da bei der längeren Variante Egr1-lv keine Veränderung feststellbar ist. Läge die Ursache der gegensinnigen Regulation des Egr1-sv im Studienaufbau oder der individuellen Reaktion der Probanden, wäre auch bei der längeren Variante ein entsprechender Effekt zu erwarten.

#### **4.9 Ausblick auf die Zukunft**

An diese Arbeit anschliessend wäre es interessant mittels eines kombinierten Versuchsablaufs zu prüfen, wie sich die Expression des Egr1-sv bei Ausdauerbelastung unter Hypoxie verhält. In Anbetracht der zentralen Position, die für EGR1 innerhalb immunmodulatorischer Prozesse postuliert wird, hätten die daraus resultierenden Erkenntnisse gerade für das Prinzip des Höhentrainings große Relevanz. Dabei wären auch immunmodulatorische Langzeiteffekte und entsprechende klinische Konsequenzen von Interesse.

Ausserdem wäre die vergleichende Untersuchung trainierter und untrainierter Individuen bezüglich der Expression der Egr1 mRNA-Varianten unter akuter Belastung interessant. Es wurde nämlich sowohl für belastungsinduzierte Konzentrationsänderungen des Noradrenalins als auch der ROS eine Abhängigkeit vom Trainingszustand gezeigt (Peronnet et al., 1981; Niess et al., 1999). Da

ebenfalls beide Substanzen die Fähigkeit besitzen EGR1 zu induzieren, ist es möglich, dass ein Zusammenhang zwischen Trainingsstatus und EGR1-Expression besteht. Es wurde zudem eine Korrelation der Noradrenalin- mit der körpereigenen Antioxidantienkonzentration nach physischer Belastung beobachtet. Ob diese jedoch einen ursächlichen Zusammenhang wiedergibt, ist noch nicht sicher nachgewiesen (Ramel et al., 2004).

Würde man die Korrelation der Egr1-sv-Expression mit der NoradrenalinKonzentration unter Hypoxie untersuchen, fände sich vielleicht eine Antwort darauf, ob andere Mechanismen die Regulation der EGR1-Expression zu dem Zeitpunkt übernehmen, ab welchem wir in der vorliegenden Studie keine Korrelation mit der Peroxidkonzentration mehr feststellen konnten. Entsprechend würde auch eine Korrelationsüberprüfung der Peroxide mit der Egr1-sv-Expression bei Ausdauerbelastung weiterhelfen, die kausalen Zusammenhänge der durch Ausdauerbelastung ausgelösten Immunmodulation besser nachvollziehen zu können. Zudem könnten nähere Information über das jeweilige Ausmaß der durch unterschiedliche Stressoren ausgelösten Noradrenalinausschüttung eventuell eine Quantifizierung und damit eine Vergleichbarkeit der Belastungsintensitäten ermöglichen.

In unserer Arbeitsgruppe wurden ausser Egr1 weitere Parameter untersucht, für deren Regulation in der Literatur ein Zusammenhang mit Hypoxie und Ausdauerbelastung beschrieben ist. Die Ergebnisse dieser Studien werden dazu beitragen die Vorgänge und Zusammenhänge der Reaktionskaskaden ausgehend von diesen externen Stimuli genauer darzustellen.

Die bisherige Situation vermittelt einen Eindruck davon, wie differenziert unser Organismus auf verschiedene Belastungssituationen zu reagieren vermag. So finden sich schon bei der relativ geringen Probandenzahl unserer Versuche eindeutige Unterschiede im Verhalten unter Hypoxie beziehungsweise bei Ausdauerbelastung. Zudem sind bei längerem Aufenthalt in Hypoxie und stärkerer körperlicher Belastung größere Abweichungen gegenüber dem Ausgangswert wahrscheinlich. All dies lässt für die Zukunft noch interessante Ergebnisse auf diesem komplexen Gebiet erwarten.

## 5 Zusammenfassung

Sowohl für körperliche Belastung als auch für Umwelteinflüsse wie zum Beispiel Hypoxie ist ein Einfluss auf das Immunsystem bekannt. So wird die körperliche Belastung schon seit längerer Zeit als Modell zur Untersuchung der entzündlichen Reaktion verwendet (Shek et al., 1998). In dieser Studie führen wir einen Vergleich der Immunmodulation bei Ausdauerbelastung einerseits und Hypoxie andererseits durch. Frühere Untersuchungen intrazellulärer Prozesse, die diese bedingen, zeigten, dass der Transkriptionsfaktor EGR1 auf verschiedenen Wegen das Immunsystem beeinflusst. Auch der durch freie Radikale bedingte oxidative Stress scheint in diesem Zusammenhang eine große Rolle zu spielen. Da diese Radikale wiederum die Expression von EGR1 induzieren, liegt die Vermutung einer Assoziation beider Faktoren auch *in vivo* nahe. Ein erst seit kurzem bekannter Aspekt des Transkriptionsfaktors EGR1 ist die Existenz zweier mRNA-Varianten: Egr1-sv und Egr1-lv. Wir überprüfen, ob im peripheren Blut unter Belastung eine differenzielle Regulation dieser Varianten stattfindet, ob ein Unterschied zwischen der Egr1-Expression bei Ausdauerbelastung und Hypoxieexposition besteht und ob Antioxidantien über eine Reduktion freier Radikale die Reaktion auf Hypoxie beeinflussen. Dafür untersuchen wir drei Probandengruppen. Sieben trainierte Ausdauerathleten bei einem Halbmarathonwettkampf, sieben nicht höhenangepasste Freiwillige, die 23 Stunden in einer normobaren Hypoxiekammer verbrachten, und sechs Probanden, die sich im Rahmen einer Cross-over-Studie mit placebokontrollierter Antioxidantienbehandlung vier Stunden unter normobarer Hypoxie aufhielten.

Bei diesen Gruppen zeigen sich deutliche Unterschiede in der Reaktion der beiden mRNA-Varianten. Während Egr1-lv sich praktisch nicht verändert, wird für Egr1-sv als erstem Transkriptionsfaktor eine differenzielle Regulation durch Hypoxie und Ausdauerbelastung beobachtet. Bei den Teilnehmern des Halbmarathons wurden ausser Egr1 noch verschiedene Belastungsparameter bestimmt. Sowohl der Anstieg von Noradrenalin und CKMB als auch der definitionsgemäß pathologisch erhöhte Quotient aus CKMB und CK stehen im Einklang mit der bekannten Literatur. Es besteht eine signifikante Korrelation von Noradrenalin und der Expression von Egr1 sv, während CKMB und Egr1-sv nicht korrelieren. Die beobachtete Verschiebungen des Blutbilds zu Neutrophilie und Leukopenie durch eine Halbmarathonbelastung

stimmt ebenfalls mit der aktuellen Literatur überein. Für die Probanden der Cross-Over-Studie zeigt sich sowohl für die Peroxidkonzentration als auch für die Egr1-Expression ein signifikantes Absinken der Werte in der Placebogruppe im Vergleich zur Verumgruppe, was auf einen direkten Zusammenhang zwischen dem zellulären Reduktions-Oxidations-System und EGR1 hindeutet.

Die vorliegende Arbeit bestätigt manche Vermutungen bezüglich der Reaktion des Organismus und speziell des Immunsystems auf Belastung. Für die Zukunft ergeben sich aus den gewonnenen Erkenntnissen interessante Fragen, deren Beantwortung zum besseren Verständnis der immunologischen Reaktion auf verschiedene Belastungsarten führen und die Rolle des EGR1 bei diesen Prozessen weiter aufklären wird. Auf den klinischen Alltag angewandt könnte dieses Wissen neue Impulse geben für die Behandlung der akuten Höhenkrankheit, immunologischer Erkrankungen sowie die Entwicklung neuer Trainingskonzepte in Kombination mit zeitlich begrenzten Höhenexpositionen.

## **6 Literatur**

Ahmed MM, 2004, Regulation of radiation-induced apoptosis by early growth response-1 gene in solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 4(1): 43-52

Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL, 2000, Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 32(9): 1576-81

Ali MH, Schlidt SA, Chandel NS, Hynes KL, Schumacker PT, Gewertz BL, 1999, Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. *Am J Physiol* 277(5 Pt1): L1057-65

Apple FS, Rogers MA, Sherman WM, Ivy JL, 1984, Comparison of serum creatine kinase and creatine kinase MB activities post marathon race versus post myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 138(1): 111-8

Apple FS, Rogers MA, Casal DC, Sherman WM, Ivy JL, 1985, Creatine kinase-MB isoenzyme adaptations in stressed human skeletal muscle of marathon runners. *J Appl Physiol* 59(1): 149-53

Bailey DM, Davies B, 1997, Physiological implications of altitude training for endurance performance at sea level: a review. *Br J Sports Med* 31(3): 183-90

Bailey DM, Davies B, 2001a, Acute mountain sickness; prophylactic benefits of antioxidant vitamin supplementation at high altitude. *High Alt Med Biol* 2(1): 21-9

Bailey DM, Davies B, Young IS, 2001b, Intermittent hypoxic training: implications for lipid peroxidation induced by acute normoxic exercise in active men. *Clin Sci (Lond)* 101(5): 465-75

Brawerman G, 1981, The role of the poly(A) sequence in mammalian messenger RNA. *CRC Crit Rev Biochem* 10(1): 1-38

Brown NS, Bicknell R, 2001, Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 3(5): 323-7

Calbet JA, 2003, Chronic hypoxia increases blood pressure and noradrenaline spillover in healthy humans. *J Physiol* 551(Pt 1): 379-86

Castillo M, Bellot JL, Garcia-Cabanes C, Miquel J, Orts A, Palmero M, 2002, Effects of hypoxia on retinal pigmented epithelium cells: protection by antioxidants. *Ophthalmic Res* 34(6): 338-42

Changelian PS, Feng P, King TC, Milbrandt J, 1989, Structure of the NGFI-A gene and detection of upstream sequences responsible for its transcriptional induction by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 377-81

Chinda D, Nakaji S, Umada T, Shimoyama T, Kurakake S, Okamura N, Kumae T, Sugawara K, 2003, A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. *Luminescence* 18(6):324-9

Christensen NJ, Galbo H, 1983, Sympathetic nervous activity during exercise. *Annu Rev Physiol* 45: 139-53

Christy B, Nathans D, 1989, DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7857-61

Clarkson AN, Sutherland BA, Appleton I, 2005, The biology and pathology of hypoxia-ischemia: an update. *Arch Immunol Ther Exp* 53: 213-25

Connolly PH, Caiozzo VJ, Zaldivar F, Nemet D, Larson J, Hung S, Hec JD, Hatfield GW, Cooper DM, 2004, Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* 97(4): 1461-9

Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D, 2001, Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53: 135-59

Datta R, Taneja N, Sukhatme VP, Qureshi SA, Weichselbaum R, Kufe DW, 1993, Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)<sub>6</sub>GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc*

Natl Acad Sci 90: 2419-22

DeMaio A, Beck SC, Buchman TG, 1993, Induction of translational thermotolerance in liver of thermally stressed rats. *Eur J Biochem* 218(2): 413-20

Dinkel A, Aicher WK, Haas C, Zipfel PF, Peter HH, Eibel H, 1997, Transcription factor Egr1 activity down-regulates Fas and CD23 expression in B cells. *J Immunol* 159(6): 2678-84

Edwards-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C, 1997, Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Research* 25(13): 2547-61

Espersen GT, Elbaek A, Schmidt-Olsen S, Ejlersen E, Varming K, Grunnet N, 1996, Short-term changes in the immune system of elite swimmers under competition conditions. Different immunomodulation induced by various types of sport. *Scand J Med Sci Sports* 6(3): 156-63

Facco M, Zilli C, Siviero M, Ermolao A, Travain G, Baesso I, Bonamico S, Cabrelle A, Zaccaria M, Agostini C, 2005, Modulation of immune response by the acute and chronic exposure to high altitude. *Med Sci Sports Exerc* 37(5): 768-74

Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, Chesterman CN, Khachigian LM, 2003, Transcription factor Egr1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nature Medicine* 9(8): 1026-32

Fehrenbach E, Niess AM, Voelker K, Northoff H, Mooren FC, 2005, Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72. *Int J Sports Med* 26(7): 552-7

Floyd RA, 1999, Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med* 26 (9-10): 1346-55

Gashler A, Sukhatme V, 1995, Early growth response protein 1 (Egr1): prototype of a zinc-finger family of transcript factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50: 191-224

Gelfi C, DePalma S, Ripamoni M, Wait R, Eberini I, Bajracharya A, Marocni C, Schneider A, Hoppeler H, Cerretelli P, 2004, New aspects of altitude adaptation in Tibetans: a proteomic approach. *FASEB J* 18(3): 612-4

Giordano FJ, 2005, Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115(3): 500-8

Goebel MU, Mills PJ, 2000, Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. *Psychosom Med* 62(5): 664-70

Goldfarb AH, Patrick SW, Bryer S, You T, 2005, Vitamin C supplementation affects

oxidative-stress blood markers in response to a 30-minute run at 75% VO<sub>2</sub>max. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 15(3): 279-90

Greiwe JS, Hickner RC, Shah SD, Cryer PE, Holloszy JO, 1999, Norepinephrine response to exercise at the same relative intensity before and after endurance exercise training. *J Appl Physiol* 86(2): 531-5

Hartmann G, Tschop M, Fischer R, Bidlingmaier C, Riepl R, Tschop K, Hautmann H, Endres S, Toepfer M, 2000, High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. *Cytokine* 12(3): 246-52

Hoppeler H, Vogt M, 2001, Hypoxia training for sea-level performance. Training high-living low. *Adv Exp Med Biol* 502: 61-73

Hunter T, Karin M, The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70(3): 375-87

Kalra VK, Shen Y, Sultana C, Rattan V, 1996, Hypoxia induces PECAM-2 phosphorylation and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol* 271(5 Pt2): H2025-34

Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, 2005, ST-segment elevation myocardial infarction. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, Chapter 228:

Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T., 1996, Egr1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* 271: 1427-31

King DE, Carek P, Mainous AG 3rd, Pearson WS, 2003 Inflammatory markers and exercise: differences related to exercise type. *Med Sci Sports Exerc* 35(4):575-81

Kjaer M, Secher NH, Galbo H, 1987, Physical stress and catecholamine release. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1(2): 279-98

Lemaire P, Revelant O, Bravo R, Charnay P, 1988, Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci* 85: 4691-5

Lemaire P, Vesque C, Schmitt J, Stunnenberg H, Frank R, Charnay P, 1990, The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol. Cell Biol.* 10: 3456-67

Long KD, Salbaum MJ, 1998, Evolutionary conservation of the immediate-early gene ZENK. *Mol Biol Evol* 15(3): 284-92

Malm C, Celsing F, Friman G, 2005, Immune defense is both stimulated and inhibited by physical activity. *Lakartidningen* 102(11): 867-8, 870, 873

Malm C, 2004, Exercise immunology: the current state of man and mouse. *Sports*

Med 34(9): 555-66

Maltzman JS, Carman JA, Monroe JG, 1996a, Transcriptional regulation of the Icam-1 gene in antigen receptor-and phorbol ester-stimulated B lymphocytes: role for transcription factor Egr1. *J Exp Med* 183(4): 1747-59

Maltzman JS, Carman JA, Monroe JG, 1996b, Role of Egr1 in regulation of stimulus-dependent CD44 transcription in B lymphocytes. *Molecular and Cellular Biology* 16(5): 2283-94

McCarthy DA, Dale MM, 1988, The leukocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med* 6: 333-63

McCord JM, Fridovich I, 1969, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049

McMahon SB, Monroe JG, 1996, The role of early growth response gene 1 (egr1) in regulation of the immune response. *J Leukoc Biol* 60(2): 159-66

Meehan RT, 1987, Immune suppression at high altitude. *Ann Emerg Med* 16(9): 974-9

Michiels C, Anould T, Remacle J, 2000, Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta* 1497(1): 1-10

Milbrandt, J., 1987, A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 238: 797-799

Miyamoto S, Chiorini JA, Urcelay E, Safer B, 1996, Regulation of gene expression for translation initiation factor eIF-2 $\alpha$ : importance of the 3' untranslated region. *Biochem J* 315: 791-8

Miziara MN, Riggs PK, Amaral ME, 2004, Comparative analysis of noncoding sequences of orthologous bovine and human gene pairs. *Genet Mol Res* 3(4): 465-73

Morillas-Ruiz J, Zafrilla P, Almar M, Cuevas MJ, Lopez FJ, Abellan P, Villegas JA Gonzalez-Gallego J, 2005, The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-controlled double-blind study in cyclists. *Eur J Appl Physiol*: Epub ahead of print

Müller J, Krauss B, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Rupec RA, 1997, Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 272(37):23435-9

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H, 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51(1): 263-73

Nieman DC, Pedersen BK, 1999, Exercise and immune function. Recent developments. *Sports Med* 27(2): 73-80

Niess AM, Baumann M, Roecker K, Horstmann T, Mayer F, Dickhuth HH, 1998, Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. *J Sports Med Phys Fitness* 38(2): 111-5

Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E, 1999, Free radicals and oxidative stress in exercise – immunological aspects. *Exerc Immunol Rev* 5: 22-56

Niess AM, Sommer M, Schneider M, Angres C, Tschositsch K, Golly IC, Battenfeld N, Northoff H, Biesalski HK, Dickhuth HH, Fehrenbach E, 2000, Physical exercise-induced expression of inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in human leukocytes: effects of RRR-alpha-tocopherol supplementation. *Antioxid Redox Signal* 2(1): 113-26

Niess AM, El-Feituri M, Isbary G, Schlick S, Northoff H, Dickhuth H, Fehrenbach E, 2001, Effekte normobarer Hypoxie auf Phagozytoseaktivität und oxidativen Burst in humanen Monozyten und Granulozyten. *Sportmedizinische Trainingssteuerung* 4: 50-65

Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK, 1999, Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *Journal of Physiology* 515(1): 287-91

Peake JM, 2002, Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc Immunol Rev* 8:49-100

Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, 2000, Exercise and the immune system: Regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews* 80(3): 1056-81

Peronnet F, Cléroux J, Perrault H, Cousineau D, DeChamplain J, Nadeau R, 1981, Plasma norepineprine response to exercise before and after training in humans. *J Appl Physiol* 51(4): 812-5

Petersen EW, Ostrowski K, Ibfelt T, Richelle M, Offord E, Hakjær-Kristensen J, Pedersen BK, 2001, Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1570-5

Purkayastha SS, Sharma RP, Ilavazhagan G, Sridharan K, Ranganathan S, Selvamurthy W, 1999, Effect of vitamin C and E in modulating peripheral vascular response to local cold stimulus in man at high altitude. *Jpn J Physiol* 49(2): 159-67

Ramel A, Wagner KH, Elmadfa I, 2004, Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men. *Br J Sports Med* 38(5): E22

Ranganathan G, Ong JM, Yukht A, Saghizadeh M, Simsolo RB, Pauer A, Kern PA,

1995, Tissue-specific expression of human lipoprotein lipase. Effect of the 3'-untranslated region on translation. *J Biol Chem* 270(13): 7149-55

Richter JD, 2001, Think globally, translate locally: What mitotic spindles and neuronal synapses have in common, *PNAS* 98(13); 7069-71

Sachs A, Wahle, E, 1993, Poly(A) tail metabolism and function in eucaryotes. *J Biol Chem* 268(31): 22955-8

Salles FJ, Darrow AL, O'Connell ML, Strickland S, 1992, Isolation of novel murine maternal mRNAs regulated by cytoplasmic polyadenylation. *Genes Dev* 6(7): 1202-12

Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J, 2001, Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11(4): 173-86

Semenza GL., 1999, Perspectives on oxygen sensing. *Cell* 98(3): 281-4

Semenza GL, 2000, Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res* 1(3): 159-62

Shamim A, Pelzer T, Grohe C, Neyses L, 1999, Induction of Egr1 mRNA and protein by endothelin 1, angiotensin II, and norepinephrine in neonatal cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem.* 195(1-2): 11-7

Shave RE, Dawson E, Whyte PG, George K, Ball D, Gaze CD, Collinson P, 2003 Cardiac troponin T in female athletes during a two-day mountain marathon. *Scott Med J* 48(2): 41-2

Shek PN, Shephard RJ, 1998, Physical exercise as a human model of limited inflammatory response. *Can J Physiol Pharmacol* 76(5): 589-97

Shephard RJ, 1998, Immune changes induced by exercise in an adverse environment. *Can J Physiol Pharmacol* 76(5): 539-46

Simon P, 2003, Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19(11): 1439-40

Simon P, Schott K, Williams RW, Schaeffel F, 2004, Posttranscriptional regulation of the immediate early gene EGR1 by light in the mouse retina. *EJN* 20: 3371-7

Subudhi AW, Jacobs KA, Hagobian TA, Fattor JA, Fulco CS, Muza SR, Rock PB, Hoffman AR, Cymerman A, Friedlander AL, 2004, Antioxidant supplementation does not attenuate oxidative stress at high altitude. *Aviat Space Environ Med* 75(10): 881-8

Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T, et al., 1988, A zinc finger-encoding

gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53(1): 37-43

Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, Sugawara K, 2002, Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Cytokine kinetics. Exerc Immunol Rev* 8: 6-48

Thake CD, Mian T, Garnham AW, Mian R, 2004, Leukocyte counts and neutrophil activity during 4 h of hypocapnic hypoxia equivalent to 4000 m. *Aviat Space Environ Med* 75(9): 811-7

Turner L, Scotton C, Negus R, Balkwill F, 1999, Hypoxia inhibits macrophage migration. *Eur J Immunol* 29(7): 2280-7

Viitala PE, Newhouse IJ, LaVoie N, Gottardo C, 2004 The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. *Lipids Health Dis* 3: 14

Wang JS, Huang YH, 2005, Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *Eur J Appl Physiol* :Epub ahead of print

Wei F, Xu ZC, Qu Z, Milbrandt J, Zhuo M, 2000, Role of EGR1 in hippocampal synaptic enhancement induced by tetanic stimulation and amputation. *J. Cell Biol.* 149(7): 1325-1334.

Witt EH, Reznick AZ, Viguie CA, Starke-Reed P, Packer L, 1992, Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J Nutr* 122(3 Suppl): 766-73

Wolach B, Falk B, Gavrieli R, Kodesh E, Eliakim A, 2000, Neutrophil function response to aerobic and anaerobic exercise I female judoka and untrained subjects. *Br J Sports Med* 34(1): 23-8

Wong, DL, Tai TC, Wong-Faull DC, Claycomb R, Kvetnansky R, 2004, Genetic mechanisms for adrenergic control during stress. *Ann NY Acad Sci* 1018: 387-97

Yan SF, Fujita T, Lu J, Odada K, Zou YS, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM, 2000, Egr1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nature Medicine* 6(12): 1355-61

Yan SF, Lu J, Zou YS, Soh-Won J, Cohen DM, Buttrick PM, Cooper DR, Steinberg SF, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM, 1999, Hypoxia-associated Induction of Early Growth Response-1 Gene Expression. *J Biol Chem* 274(21): 15030-40

Yan SF, 1998, Tissue factor transcription driven by Egr1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8298-8303

Yan SF, Zou YS, Mendelsohn M, Gao Y, Naka Y, Yan SD, Pinsky D, Stern D, 1997, Nuclear factor interleukin 6 motifs mediate tissue-specific gene transcription in

hypoxia. J Biol Chem 272(7): 4287-94

Zieker D, Fehrenbach E, Dietzsch J, Fliegner J, Waidmann M, Nieselt K, Gebicke-Haerter P, Spanagel R, Simon P, Niess AM, Northoff H, 2005, cDNA-microarray analysis reveals novel candidate genes expressed in peripheral blood following exhaustive exercise. *Physiol Genomics*



## Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf vielfältige Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

Hier ist zuerst Herr Professor Dr.med. A. Nieß zu nennen, der mir das interessante Thema überlassen hat.

Mein besonderer Dank gilt Dr.med. Dr.rer.nat. Perikles Simon für die fachliche Betreuung und Beratung sowie für die Unterstützung bei der Strukturierung und Fertigstellung der Arbeit.

Ganz herzlich danke ich meinen Mitdoktoranden Tabea Hochstedter, David Callau und Alex Böhringer für ihre Hilfe und ihr Engagement.

Ohne die Unterstützung der medizinisch-technischen Assistentinnen an der Sportmedizin in Tübingen, insbesondere Lenka Stockinger, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank.

Ein großes Dankeschön an alle Probanden und Athleten, die an den Untersuchungen in der Hypoxiekammer und an dem Halbmarathon teilgenommen haben.

Auch Dr.rer.nat. E. Fehrenbach und ihrer Arbeitsgruppe möchte ich meinen Dank für die freundliche Bereitstellung von Blutproben aussprechen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mir während dieser Dissertation und meiner gesamten Ausbildung immer zur Seite standen. Dieser Dank geht insbesondere an meine Mutter, Erika Blösch, meine Brüder Thomas und Oliver Freymark und meinen Patenonkel Diethelm Gauß.