

Aus dem Institut für Physiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

# Freisetzung von frei zirkulierender DNA unter einer Fahrradergometrie bei Straßenradfahrern

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin

der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
vorgelegt von

Matthias H. N. Mehdorn  
aus Essen

Mainz, 2013

Tag der Promotion:

22.07.2014

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturdiskussion.....</b>	<b>2</b>
2.1. Freie DNA.....	2
2.1.1. Freie DNA im Plasma bei Neoplasien .....	2
2.1.2. Zellfreie DNA bei entzündlichen Prozessen.....	4
2.1.3. cfDNA und Lupus Erythematoses.....	6
2.1.4. cfDNA im Sport.....	7
2.2. Lymphozyten und DNA-Freisetzung.....	8
2.3. Neutrophil extracellular traps .....	11
2.3.1. NETose: Was passiert genau? .....	12
2.3.2. NETose induzierende Stimulantien.....	16
2.3.3. NETs im klinischen Kontext.....	17
2.3.4. NET-analoge Strukturen .....	20
2.4. Immunsystem und Sport.....	21
2.4.1. Leukozytose bei Belastung.....	21
2.4.2. Herkunft der Leukozyten.....	24
2.4.3. Lymphozyten unter Belastung .....	26
2.4.4. Zytokine in der Belastungsimmunologie .....	27
2.4.5. Neutrophile Aktivität durch Belastung.....	29
2.5. Zusammenfassung der Literatur und Fragestellung.....	31
<b>3. Materialien und Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.1. Probandenkollektiv .....	33
3.1.1. Rekrutierungsmethode, Ein- und Ausschlusskriterien .....	33
3.1.2. Abbruchkriterien.....	34
3.2. Materialien und Geräte .....	34
3.3. Chemikalien .....	36
3.4. Testaufbau.....	36
3.4.1. Spiroergometrie.....	36
3.4.2. Probengewinnung.....	37
3.5. Datenauswertung der Spiroergometrie .....	38
3.5.1. Bestimmung der aerob-anaeroben Schwelle .....	38
3.6. Differentialblutbild .....	38
3.7. DNA-Messung.....	39
3.7.1. DNA-Isolation aus Blutplasma.....	39

3.8.	DNA-Quantifizierung mittels RT-PCR.....	39
3.8.1.	Real-time PCR aus verdünntem Plasma .....	40
3.8.2.	Real-time PCR aus aufgereinigtem Plasma .....	41
3.9.	Enzymmessungen .....	42
3.9.1.	ELISA für Myeloperoxidase.....	42
3.9.2.	PMN-Elastase .....	43
3.10.	Datenerfassung und statistische Auswertung .....	43
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
4.1.	Deskriptive Statistiken und Wilcoxon-Test .....	45
4.1.1.	Leistungsphysiologie .....	45
4.1.2.	Leukozyten.....	46
4.1.3.	DNA-Messungen .....	47
4.1.4.	Elastase und Myeloperoxidase .....	48
4.2.	Korrelationen der Zeitpunktmessungen.....	49
4.2.1.	DNA-Messungen .....	49
4.2.2.	DNA-Messungen und Zellen .....	49
4.2.3.	Neutrophile und Enzyme .....	50
4.2.4.	DNA-Messungen und neutrophilenspezifische Enzyme .....	50
4.2.5.	DNA und Leistungsphysiologie .....	51
4.3.	Korrelationen der Veränderungen zwischen den Zeitpunkten .....	52
4.3.1.	DNA-Messungen .....	52
4.3.2.	DNA-Spiegel und Zellen.....	52
4.3.3.	Neutrophile und Enzyme .....	53
4.3.4.	DNA-Messungen und neutrophilenspezifische Enzyme .....	53
4.3.5.	DNA und Leistungsphysiologie .....	53
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>55</b>
5.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	55
5.1.1.	Deskriptive Statistiken.....	55
5.1.2.	Korrelationen der Zeitpunktwerte .....	56
5.1.3.	Korrelationen der Veränderungen in den Testintervallen .....	58
5.2.	Ergebnisinterpretation .....	59
5.2.1.	Leistungsphysiologische Bewertung des Probandenkollektivs.....	59
5.2.2.	DNA-Messung und -Methodik.....	59
5.2.3.	Zelluläre Immunantwort auf Belastung .....	61
5.2.4.	Sind NETs für den DNA Anstieg unter Belastung verantwortlich?.....	64
5.2.5.	DNA als leistungsphysiologischer Parameter .....	68
5.3.	Kritische Überlegungen .....	72

<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>74</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>82</b>
8.1. Tabellen der deskriptiven Statistiken .....	82
8.2. Graphiken der deskriptiven Statistiken .....	84
8.3. Beispielhafte Streudiagramme der Korrelationen.....	85
8.4. Tabellen über Vervielfachungen in den Intervallen und deren Wilcoxon-Tests.....	93
8.4.1. Änderungen der leistungsphysiologischen Parameter.....	93
8.4.2. Zellzahländerungen.....	94
8.4.3. DNA-Veränderungen .....	94
8.4.4. Enzymänderungen.....	95
8.5. Korrelationstabellen .....	95
8.5.1. NET-Korrelationen .....	95
8.5.2. Leistungsphysiologie .....	96
8.6. Korrelation der Zeitpunktveränderunge .....	97
8.6.1. NETs-Korrelationen .....	97
8.6.2. Leistungsphysiologie .....	98

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Leistung im Testverlauf	84
Abbildung 2: Verlauf Herzfrequenz und Ventilation	84
Abbildung 3: Zellen pro nl im Testverlauf	46
Abbildung 4: Verlauf der DNA-Spiegel der Einzelmessungen	47
Abbildung 5: DNA-Integrität im Testverlauf	85
Abbildung 6: Verlauf der neutrophilen-spezifischen Enzyme	48
Abbildung 7: Korrelation der DNA-Messungen des L1PA2-Primers zum Zeitpunkt T2	85
Abbildung 8: Korrelation der Leukozyten T2 mit dem langen LTR5 T2	86
Abbildung 9: Korrelation der Neutrophilen und des langen LTR5 T2	86
Abbildung 10: Korrelation der Basophilen und des kurzen L1PA2 Zeitpunkt übergreifend	87
Abbildung 11: Korrelation der Neutrophilen und der Plasma-Elastase T3	87
Abbildung 12: Korrelation der Elastase und dem kurzen LTR5 Zeitpunkt übergreifend	88
Abbildung 13: Korrelation der Ventilation an der Schwelle und des langen LTR5 T2	88
Abbildung 14: Korrelation des RQs bei maximaler Last und des langen LTR5 T2	89
Abbildung 15: Korrelation der Leistung an der Schwelle und des kurzen LTR5 T2	89
Abbildung 16: Korrelation der maximalen Leistung und des kurzen LTR5 T2	90
Abbildung 17: Korrelation der Veränderungen der Monozyten und des kurzen L1PA2	90
Abbildung 18: Korrelation der Veränderung der Neutrophilen und der MPO	91
Abbildung 19: Korrelation der Veränderung der MPO und des kurzen L1PA2	91
Abbildung 20: Korrelation der Veränderung der Herzfrequenz und des kurzen L1PA2	92

## Abkürzungsverzeichnis

BDR	Bund Deutscher Radfahrer
BMI	<i>body-mass-index</i>
Bp	Base pairs (Anzahl an Nukleinsäurepaaren bzw. Länge eines DNA-Fragments)
CD	Cluster of differentiation
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CRP	C-reaktives Protein
C1q	Untereinheit q der Komplementkomponente C1
C5a	Aktivierter Teil der Komplementkomponente C5
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxi-Nukleinsäure Triphosphat
DOSB	Deutscher Olympischer Sportbund
dsDNA	Doppelstrang-DNA
cfDNA	zellfreie DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Letztes Protein der Wachstumsrezeptorsignalkaskade, nach MEK
FEV <sub>1</sub>	Forciertes Expiratorisches Volumen der ersten Sekunde
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorsäure

H1, H2A,	Isoformen des Histonproteins
H2B, H3, H4	
IL-{Zahl}	Interleukin Nummer {X}
IL-1Ra	Interleukin 1 Rezeptorantagonist
IOC	International Olympic Committee
K-Ras	Mitglied der Ras-Protoonkogen Familie
LPS	Bakterielles Lipopolysaccharid
LTR5	Long term repeat 5
L1PA2	Long interspersed element 1 Untergruppe 2
MEK	Proteinkinase der Wachstumsrezeptorkaskade, nach Raf
MPO	Myeloperoxidase
MT-NETose	NETose mit mitochondrialer DNA
MVV	<i>Maximal voluntary ventilation</i>
NADA	Nationale Antidoping Agentur
NADPH	Nicotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NE	Neutrophilenspezifische Elastase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NETose	Bildung von NETs mit Zelltod
NK-Zelle	Natural-killer-Zelle
NRas	Mitglied der Ras-Protoonkogen Familie
PAD4	Peptidylarginin Deiminase Isoform 4
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-Myristyl-Acetat
R	Korrelationskoeffizient



Raf	Proteinkinase der Wachstumsrezeptorkaskade, nach Ras, aktiviert MEK
Rcf	<i>Relative centrifugal force</i> (Relative Zentripetalbeschleunigung)
ROS	<i>reactive oxigen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RQ	Respiratorischer Quotient
RT-PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythemathodes
SNEC	<i>Secondarily nectrotic cell-derived material</i>
TNFalpha	Tumornekrosefaktor alpha
TLR	Toll-like-receptor
VCO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> Abgabe
VO <sub>2</sub> max	maximale Sauerstoffaufnahme in ml/min x kg Körpergewicht
WADA	World Anti Doping Agency
W/kg KG	Watt pro Kilogramm Körpergewicht (Einheit der Leistung)

## 1. Einleitung

Es ist bekannt, dass sich je nach physiologischem oder pathologischem Zustand des Körpers die Eigenschaften des Blutes, beziehungsweise die dort vorkommenden Proteine und Zellen nachhaltig unterscheiden können; auf dieser Grundlage beruht die alltägliche Diagnostik des klinisch tätigen Arztes. Mit pathologischem Zustand ist beispielsweise eine entzündliche Reaktion des Organismus, mit physiologischem Zustand unter anderem die Situation während des Sporttreibens gemeint. Während einerseits jeder Sportler die Veränderungen seines Körpers durch die sportliche Betätigung im Großen nachvollziehen kann, ist es auf der anderen Seite bis hin zur Molekularbiologie möglich, Veränderungen auf jeder Ebene des Körpers festzustellen (serologisch, zellulär oder molekularbiologisch). So ist bereits vielfach in der Literatur beschrieben, dass es zu einer Veränderung der Zellzusammensetzung der einzelnen leukozytären Zellpopulationen im Blut während der Belastung kommt. Damit einher gehen Veränderungen der Zytokinspiegel, sowohl proinflammatorisch wie antiinflammatorisch. Mit einigen proinflammatorischen Zytokinen ist es möglich, neutrophile Granulozyten zu aktivieren und sie zur Freisetzung ihrer eigenen DNA zu bewegen, welche dann am Ort der Entzündung nachweisbar ist. Nicht nur lokalisiert sondern auch systemisch konnten gesteigerte Spiegel an zellfreier DNA im Plasma nach Belastung und bei systemischer Entzündung gefunden werden. Folglich liegt eine Leukozytose mit leukozytärer Aktivierung vor und durch ihre bekannte Fähigkeit der DNA-Freisetzung wären die Neutrophilen eine naheliegende Quelle dieser zellfreien DNA unter Belastung. Für das Wissen über die freie DNA unter Belastung ist die Herkunft nur ein Baustein im Verständnis dieses physiologischen Prozesses. Da sie aber noch sehr wenig erforscht ist, gibt es durchaus andere Felder in diesem Kontext, über die es interessant wäre, mehr zu erfahren. In unterschiedlichen Bereichen wurde die DNA bereits als prognostischer Krankheitsmarker validiert; kann die DNA vielleicht auch ein Marker für die Belastungs- oder Leistungsfähigkeit einer Person sein?

Bereits aus diesem kurzen Abriss über das Thema wird deutlich, dass ganz unterschiedliche Bereiche die Grundlage für die vorliegende Studie bilden. Im Folgenden sollen die einzelnen Bereiche freie DNA, die Freisetzung von DNA aus neutrophilen Granulozyten und die immunologischen Veränderungen des Körpers unter Belastung dargestellt werden.

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1. Freie DNA

#### 2.1.1. Freie DNA im Plasma bei Neoplasien

Die ersten Forscher, die zell-freie DNA (cfDNA) im menschlichen Blut beschrieben, waren im Jahre 1948 die beiden Franzosen Mandel und Métais in ihrem Artikel „Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme“ (Mandel and Métais 1948). Dieser Entdeckung wurde allerdings nicht viel Aufmerksamkeit geschenkt, bis in den sechziger Jahren postuliert wurde, dass freie DNA im Serum von Patienten mit Lupus Erythematodes als antigene Struktur auftaucht (Tan, Schur et al. 1966). Knapp zehn Jahre später stellten Leon et al. (Leon, Shapiro et al. 1977) fest, dass Gruppen von Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten wie beispielsweise Lymphomen, Lungen-, Mamma- oder Kolorektalkarzinomen gegenüber einem gesunden Referenzkollektiv gesteigerte DNA-Mengen im Blutplasma aufwiesen und sich diese auch noch von metastasierten zu nichtmetastasierten Stadien unterschieden. Allerdings gelang keine Festlegung der als „gesund“ zu deklarierenden zellfreien DNA (cfDNA) Mengen, da hochdifferenzierte, kleine Tumore ähnliche Spiegel erreichten, wie gesunde Patienten mit hohen Werten. Allerdings konnte der *cut-off*-Wert für den Normalbereich bei 50ng/ml gesetzt werden, da 93% der gesunden Referenzproben 0-50 ng/ml Plasma-DNA mit einem Mittelwert von 13ng/ml aufwiesen, bei Tumorpatienten lag dieser dagegen bei mehr als dem Zehnfachen mit 180 ng/ml. Des Weiteren war es bei fortgeschrittenem Tumorleiden möglich, den Erfolg der Therapie anhand der Plasma-DNA zu verfolgen. So sank bei Patienten nach erfolgreicher Bestrahlung oder Chemotherapie parallel zu den tumorbedingten Schmerzen oder der Tumorgröße auch der DNA-Spiegel signifikant. Die Autoren gingen davon aus, dass die mangelnde statistische Signifikanz von der Inhomogenität des Patientenkollektivs herrührte und führten eine weitere Studie durch, in der sie maligne mit benignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes (GIT) verglichen (Shapiro 1983). Dabei zeigte sich, dass Patienten mit entzündlichen Erkrankungen des GIT (Pankreatitis, Cholezystitis, Hepatitis, etc.) ebenfalls erhöhte DNA-Werte gegenüber dem gesunden Kontrollkollektiv (14 ng/ml) aufwiesen, die aber mit 118 ng/ml wesentlich geringer waren als die der malignen Neoplasien (412 ng/ml). Dabei ist es möglich, von der Quantifizierung der Plasma-DNA auf den Verlauf des Tumorverlaufs (Sozzi, Conte et al. 2003) oder die Überlebensprognose zu schließen

(Fournie, Courtin et al. 1995), da Kaplan-Meier-Kurven von Patienten mit Bronchialkarzinomen unterschiedlicher Histologie nach DNA größer bzw. kleiner 100 ng/ml unterschiedliche Überlebensraten anzeigten. Der prädiktive Charakter der DNA-Spiegel in Bezug auf das Vorliegen von Fernmetastasen wurde auch für das Ösophaguskarzinom bewiesen (Tomochika, Iizuka et al. 2010). Von einer reinen Quantifizierung hin zur qualitativen Analyse brachten es Anker und Kollegen (Vasioukhin, Anker et al. 1994; Anker, Lefort et al. 1997), die in der Plasma-DNA von Kolorektalkarzinompatienten die ebenfalls im Tumor nachgewiesene Mutation des Protoonkogens KRas fanden. Da die KRas Mutation nicht die einzige war, die auch im Plasma zu finden war, sondern auch NRas (Vasioukhin, Anker et al. 1994) oder IgG-*rearrangement* (Frickhofen, Muller et al. 1997) im Zusammenhang mit B-Zell-Pathologien, lag der Schluss nahe, dass die Analyse der Plasma-DNA ein einfaches, nicht-invasives Diagnostikum darstellen kann, wenn ausreichend sensitive und gut praktikable Methoden zur Verfügung stehen (Anker, Mulcahy et al. 1999; Anker, Mulcahy et al. 2003). Zusätzlich zu den oben beschriebenen Mutationen ist auch bekannt, dass sich im Plasma befindliche DNA in ihrer Strang- (Stroun, Anker et al. 1989) oder Mikrosatellitenstabilität genauso verhält wie die DNA des Primärtumors, in diesem Falle z.B. Bronchial- (Chen, Stroun et al. 1996; Nawroz, Koch et al. 1996) und Mammakarzinom (Shaw, Smith et al. 2000).

Insgesamt werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die der DNA-Freisetzung zugrunde liegen. In diese Überlegungen spielt auch herein, dass sich Studien in Bezug auf die Menge an aus dem Tumor stammender DNA unterscheiden und von 10-90% der cfDNA aus dem Tumor stammen sollen (Jahr, Hentze et al. 2001; Diehl, Li et al. 2005). Als Freisetzungsmechanismus wird in diesem Zusammenhang die bei aggressiv wachsenden Neoplasien zentral vorkommende Nekrose oder aber auch eine hypoxieinduzierte Apoptose diskutiert, beides jeweils aufgrund einer mangelnden Revaskularisation des zentralen Tumoranteils. Für die Nekrose spricht das gehäufte Vorkommen sehr langer Nukleinsäuresequenzen (Wang, Huang et al. 2003) bei Tumorpatienten im Vergleich zur gesunden Population, dagegen, dass nach Radiatio die DNA-Spiegel fallen, obwohl die Strahlung Nekrose induziert (Leon, Shapiro et al. 1977). Dagegen könnte ebenfalls auch die Entdeckungen von Choi et al (Choi, Reich et al. 2004) sprechen, die herausfanden, dass nekrotische Leukämiezellen in vitro keine DNA freisetzen, apoptotische hingegen doch. Zudem schlossen sie daraus, dass der Plasmaspiegel beim Gesunden auf leukozytärer

Apoptose beruhe. Für die Apoptose spricht zudem, dass in der Plasma-DNA für Apoptose typische Leiter-Muster in der DNA-Gelelektrophorese gefunden wurden (Jahr, Hentze et al. 2001). Mikrometastasen, darunter versteht man einzelne Zellen oder kleinere Zellhaufen, die sich vom Primärtumor ablösen, werden auch als Ursprung der DNA in Betracht gezogen. Grundlage für diese Gedanken ist die gebräuchliche Aufreinigungspraxis von DNA aus Plasma. Dabei verwendet man Detergenzien und Proteasen, die dafür sorgen, dass alle nicht-DNA-Strukturen aufgelöst werden und so die spätere DNA-Messung nicht mehr stören können. Allerdings werden auch ganze Zellen auf ihre DNA reduziert und man kann später nicht mehr unterscheiden, ob es DNA aus dem Plasma oder aus zerstörten Zellen ist. Eine weitere interessante Theorie der Gruppe um Anker und Stroun ist, dass Zellen DNA freisetzen und diese zirkulierende DNA von eukaryotischen Zellen, analog zur Transfezierung bei Bakterien, endozytiert und transkribiert werden kann, um sinnvollen Gene zu verbreiten. Dieser Mechanismus könnte auch ein Weg der Metastasierung sein, indem fern liegende, gesunde Zellen die Tumor-DNA aufnehmen und sich auf diese Art Mutationen aneignen können (Stroun and Anker 2005; Anker and Stroun 2012).

### **2.1.2. Zellfreie DNA bei entzündlichen Prozessen**

Ein weiteres Feld neben den malignen Neoplasien, in dem man einen cfDNA-Anstieg im Plasma feststellen konnte, ist die Entzündung. Im Rahmen dessen ist auch der Ansatz zu sehen, den klinischen Wert der DNA-Quantifizierung für die Risikostratifizierung von Polytraumapatienten zu verwenden (Lo, Rainer et al. 2000; Lam, Rainer et al. 2003). So kann man je nach Schwere des Traumas unterschiedlich hohe Spiegel DNA messen. Dabei ist der Anstieg der Plasmaspiegel unabhängig von der Schwere des Traumas nach wenigen Minuten messbar, jedoch normalisieren sich bei leichter Verletzten die Werte innerhalb von Stunden. Dagegen sind bei Patienten, die einen protrahierten Verlauf mit Komplikationen wie Multiorganversagen, Sepsis oder Schocklunge erleiden, die cfDNA-Spiegel noch nach Tagen erhöht. Versucht man den DNA-Verlauf in Zusammenhang zu bisher etablierten klinischen Scoring-Skalen zu bringen, konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem schwerwiegenden Verlauf zu Beginn bereits viel höhere cfDNA-Werte haben und ihr Verlauf in Einklang mit den numerischen Werten der Scores zu bringen ist. Auf diese Weise bietet die DNA eine Möglichkeit der Risikoeinschätzung in Bezug auf den späteren Verlauf. In diesem Punkt zeigte sie sich außerdem hilfreicher als das standardmäßig als

Entzündungsparameter verwendete C-reaktive Protein (CRP), da dessen Plasmawert erst nach einer verzögerten Zeit ansteigt (Margraf, Logters et al. 2008). Ein anderer, dem CRP wegen seines früheren Ansteigens und seiner höheren Sensitivität als überlegen angesehener Entzündungsparameter, das Prokalzitonin, verfügt in etwa über die gleiche Kinetik wie die cfDNA im Rahmen eines febrilen Zustandes bis hin zum Vollbild der Sepsis (Moreira, Prieto et al. 2010).

Ebenfalls in den Kontext der Risikostratifizierung passen die Ergebnisse von Rainer und Kollegen (Rainer, Wong et al. 2003), die für den Schlaganfall zeigen konnten, dass zellfreie DNA ein sehr guter prädiktiver Parameter sein kann. Nachdem sich diverse andere Parameter als nicht sensitiv genug erwiesen, war es möglich, im Hinblick auf das *outcome* (Tot und verbleibende Morbidität) mittels der Plasma-DNA-Anstiege das Risiko der Patienten (mit Werten für Sensitivität von 100% und Spezifität von 74%, bei einem negativen prädiktiven Wert von 100% bei einem geeigneten *cut-off* Wert der DNA-Plasmakonzentration) zu bestimmen.

Zurückkehrend auf das Feld der Entzündung ist durchaus interessant, was Fatouros und Kollegen beschrieben (Fatouros, Destouni et al. 2006). Bei ihrer Studie handelte es sich um einen viergeteilten Zyklus von Krafttraining mit unterschiedlich anstrengenden Abschnitten, wovon zwei darauf abzielten, Übertraining auszulösen. Beim Übertraining kommt es durch die Überanstrengung und somit Schädigung der Muskulatur zu einer geringfügigen, systemischen Entzündungsreaktion. Bisher war bekannt, dass man diese anhand der etablierten Entzündungsmarker diagnostizieren kann. Diese Reaktion ist durch eine gesteigerte Schädigung von Muskeln zu erklären. Wiederum neu war an dieser Studie, dass zusätzlich zu den Entzündungsparametern auch die cfDNA anstieg je mehr sich die Probanden ins Übertraining begaben.

Vasavda et al. (Vasavda, Ulug et al. 2007) postulierten gesteigerte cfDNA Mengen in Sichelzellanämie Patienten, die einen akuten Hämolyseanfall hatten, der in der Regel auch mit erhöhten Entzündungsparametern und thrombotischen Ereignissen einhergeht. Dabei ließen sich im anfallsfreien Intervall die cfDNA Spiegel mit der Leukozytenzahl und dem CRP korrelieren, im Anfall war dies jedoch nicht mehr möglich. Die Autoren der Studie führen die Unterschiede der cfDNA zwischen Symptomfreiheit und akutem Anfall auf Gefäßokklusion zurück, die im poststenotischen Gebiet Gewebeschädigung und entzündliche Prozesse nach sich zieht.

Alle diese Studien zeigen eine Assoziation der cfDNA-Spiegel zu dem herkömmlich als Entzündungsmarker dienenden CRP, was somit nahelegt, dass es eine Verknüpfung von Entzündung und DNA-Freisetzung gibt.

### **2.1.3. cfDNA und Lupus Erythematodes**

Eine weitere Krankheit, bei der es logischerweise geradezu einen cfDNA-Anstieg geben muss, da für sie Anti-doppelstrang-DNA-Antikörper pathognomonisch sind, ist der Systemische Lupus Erythematodes (SLE). In diesem Zusammenhang war die bereits oben zitierte Arbeit von Tan (Tan, Schur et al. 1966) der erste Wegweiser in Richtung des Verständnisses der Pathogenese dieser Erkrankung. Die Vermutung eines Autoimmunprozesses erhärtete sich in den 1980er Jahren, als klar wurde, dass es sich auch wirklich um menschliche, genomische DNA und nicht um bakterielle handelt (Steinman 1984). So ist es von großer Wichtigkeit, dass der Körper in der Lage ist, diese DNA, die mit ihren assoziierten Proteinen im Blut vorliegt, möglichst schnell zu beseitigen, da sie sonst durch die körpereigenen Immunzellen als potentiell fremdes Material angesehen wird und eine Autoimmunreaktion provoziert. Ein wesentliches Enzym bei der Degradation ist die plasmatische DNase I, deren Funktionsfähigkeit invers mit der Krankheitsaktivität korreliert werden kann (Hakim, Furnrohr et al. 2010). Ähnlich zu verstehen ist die Erkenntnis, dass der Abbau von extrazellulären DNA-Strukturen in Patienten mit akutem SLE-Schub vermindert ist (Leffler, Martin et al. 2012).

Angestoßen von den obigen Ergebnissen suchten Lo et al. (Lo, Corbetta et al. 1997) ebenfalls nach DNA im Plasma von schwangeren Frauen mit dem Ziel fetale DNA zu finden. Es ist bekannt, dass fetale Zellen auch im maternalen Blut auftauchen, sodass man aus jenen Zellen fetale DNA gewinnen könnte. Aber ihr Ansatz war es, fetale cfDNA zu finden, um diese als Screeningmaterial für Chromosomenaberrationen oder Genmutationen nutzen zu können ohne das hohe Risiko für Schwangerschaftskomplikationen der heutigen Standardmethoden der Pränataldiagnostik wie Amniocentese oder Chorionzottenbiopsie eingehen zu müssen. Es gelang von männlichen Feten Y-Chromosom-spezifische Sequenzen zu amplifizieren. Ähnlich der Nachweismöglichkeit von Genmutationen der Protoonkogene ist es auch möglich, Mutationen der fetalen DNA zu detektieren. Im vorliegenden Beispiel wurde eine Mutation des *Fibroblast Growth Factor Receptor 3* (FGFR3) nachgewiesen. Diese Mutation sorgt für das klinische Bild der

Achondroplasie, einer Knochenwachstumsstörung mit vermindertem Extremitätenwachstum (Lim, Kim et al. 2011).

#### **2.1.4. cfDNA im Sport**

Im Gegensatz zu den oben geschilderten Pathologien konnte auch für gesunde Probanden gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen eine gesteigerte Menge an zirkulierender DNA im Plasma vorliegt. Bei Sportlern, die einen Halbmarathon absolvieren, kommt es unter Belastung zu einem Anstieg um den Faktor zwanzig, aber schon zwei Stunden nach Beendigung der Anstrengung normalisiert sich der DNA-Spiegel (Atamaniuk, Vidotto et al. 2004). Erste Überlegungen gingen in Richtung Muskel-DNA, die aus den durch die unter Belastung vorkommenden Wechsel zwischen Hypoxie und Reperfusion geschädigten Zellen freigesetzt würde. Die zeitlich nächste Studie zeigte Sport als Induktor für entzündliche Prozesse, die ebenfalls gefolgt waren von einem Anstieg der DNA. Allerdings waren diese DNA-Anstiege jeweils 96h nach der letzten Trainingseinheit ermittelt worden (Fatouros, Destouni et al. 2006), womit es sich bei dieser Art des cfDNA Anstiegs um einen anderen Mechanismus als bei Atamaniuk handeln muss, da die DNA-Kinetiken sich unterscheiden. Eine andere Studie von Atamaniuk an Gewichthebern nach intensivem Krafttraining zeigte allerdings dieselbe Kinetik wie die in den Halbmarathonläufern mit einer Normalisierung der cfDNA zwei Stunden nach Trainingsende (Atamaniuk, Vidotto et al. 2010). Dass die Kinetik der Normalisierung der DNA-Spiegel nach Belastungsende von der Art und Intensität der Belastung abhängt, wurde in einer Studie an Ultra-Marathon-Läufern deutlich. Hier konnte gezeigt werden, dass nach einem Rennen von sechs Stunden die DNA Level zwar ebenfalls erhöht sind, sich jedoch nicht nach zwei Stunden normalisiert haben. Ganz auf das Ausgangsniveau waren sie erst bei der Messung nach 24 Stunden zurückgekehrt (Atamaniuk, Stuhlmeier et al. 2008). Dass man auch in einem standardisierten Protokoll die gleichen Effekte auf die DNA erzielen kann, wurde zwei Jahre später bewiesen. In einem Laufbandtest mit zunächst aerobem Laufen für 45 Minuten mit anschließender anaerober Ausbelastung wurde auch ein Anstieg um den Faktor 15 gemessen, der nach 30 Minuten immer noch in ähnlicher Höhe vorhanden war, später sich aber gegenüber den Ausgangswerten nicht mehr unterschied. Die gleichzeitig ermittelten Entzündungsparameter hatten eine wesentlich langsamere, doch dafür länger andauernde Kinetik. Das CRP stieg zwar unter der Belastung an, erreichte seinen Höhepunkt jedoch erst nach 24 Stunden. Anhand dieser Feststellung



kann man die Aussage treffen, dass unter Belastung eine aseptische systemische Entzündung abläuft (Fatouros, Jamurtas et al. 2010). Eine Mischung aus Feld- und Laufbandtest etablierte Beiter (Beiter, Fragasso et al. 2011). In der Studie wurden einerseits Läufer nach einem 10 km *cross-country* Lauf auf ihre DNA-Veränderungen untersucht und andererseits Läufer einem auf stufenweise Ausbelastung abzielenden Laufbandtest unterzogen. Bei den Waldläufern konnte eine 7,6-fach höhere DNA nach dem Lauf gemessen werden, wobei die interindividuellen Unterschiede sehr groß waren (Faktor 20). Noch weiter ging es bei den Laufbandtests, bei dem sogar einigen Probanden nach jeder Stufe des Tests Blut abgenommen bekamen. Auf diese Weise stellte man fest, dass der DNA-Anstieg parallel dem Laktatanstieg ist, der aus dem zunehmend größeren anaeroben Muskelstoffwechsel herrührt. Letzterer verläuft in einer exponentiellen Kurve und je näher sich der Sportler dem absoluten, persönlichen Limit nähert, desto größer wird die Steigung der Kurve. Die erste Erkenntnis des Tests war auch hier eine zehnfache Erhöhung der DNA, mit einem immer noch um das Vierfache höheren Wert im Vergleich zur Vorbelastungsprobe nach 30 Minuten. Die zweite war in Bezug auf die Methodik, dass sich auch Laufband Tests für Studienzwecke der DNA-Kinetik eignen. Der Vorteil ist dabei, dass man ein standardisiertes Umfeld aufbauen und jeder Sportler die ganze Zeit überwacht werden kann.

Obwohl diese Studien erst der Beginn der DNA-Forschung im Bereich der Sportphysiologie sind, kann man bereits jetzt feststellen, dass Sport generell eine erhöhte DNA-Menge im Plasma nach Belastung mit sich bringt, die aber je nach Art der Belastung von kürzerer oder längerer Dauer ist. Die Vorherrschende Hypothese zur Herkunft sind belastungsinduzierte Muskelschäden und eine einhergehende Entzündungsreaktion zur Reparatur der geschädigten Myozyten.

## **2.2. Lymphozyten und DNA-Freisetzung**

Auf der Suche nach der Antwort der Frage, woher die zellfreie DNA stammen könnte, die im Plasma bei den unterschiedlichen Pathologien in unterschiedlich hoher Quantität anzutreffen ist, sind neben den als Mikrometastasen in der Zirkulation auftauchenden Tumorzellen noch weitere DNA-Quellen anzunehmen, da die bisher gefundene Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen nicht ausreicht, um die DNA-Anstiege ausreichen zu erklären (Stroun, Maurice et al. 2000). Natürlich muss man auch die Apoptose in Betracht ziehen, wurden doch in Karzinompatienten bevorzugt

Apoptose-spezifische Bandenmuster bei der Gelelektrophorese von DNA-Präparationen gefunden (Fournie, Courtin et al. 1995; Jahr, Hentze et al. 2001). Aber warum gibt es dann auch in Personen ohne Tumorwachstum gesteigerte Plasma DNA-Spiegel? Wie bereits oben dargelegt, bietet die Entzündung in unterschiedlicher Form in verschiedenen Teilbereichen der Medizin Krankheitsbilder mit erhöhten DNA-Spiegeln. Hierbei reagiert das körpereigene Immunsystem auf Stoffe oder Lebewesen, die dem Körper schaden. Und auch Tumore stellen einen Angriffspunkt für das Immunsystem dar (Hellstrom, Sjogren et al. 1971; Steele, Jamieson et al. 2013). In einigen der Paper zur zellfreien DNA wurde bereits darüber spekuliert, dass die freie DNA unter anderem auch aus aktivierten Leukozyten herkommen könnte. Eine erste Entdeckung dazu machten Rogers et al. (Rogers, Boldt et al. 1972), die im Jahr 1972 publizierten, dass durch Phytohämagglutinin (PHA), einem pflanzlichen Mitogen, oder Mumps-Virus Lymphozyten dazu gebracht werden können, DNA in ihr Kulturmedium freizusetzen. Auf den Stimulus hin konnte eine neben der normalen mitotischen Zellvermehrung, die nur bei einem geringen Anteil der Zellen zu sehen war, einsetzende DNA Synthese beobachtet werden, die darin resultierte, dass mehr Gesamt-DNA in der Kultur vorhanden war als durch die Zellteilungsvorgänge hätte erklärt werden können. Die Präsenz der DNA im Medium wurde durch radioaktive Markierung der DNA messbar gemacht und durch Fällung von DNA aus dem Medium überprüft. Im Laufe der Versuche war es möglich zu sehen, dass die Zellen ihre markierte DNA verlieren, sich jedoch nicht gleichzeitig die intrazelluläre DNA-Menge vermindert. Daraus ist ersichtlich, dass es sich um lebendige Zellen handeln muss. Zudem begannen auch Lymphozyten ohne Stimulus nach einigen Tagen DNA zu synthetisieren. Die DNA im Medium zeigte ein spezifisches Muster bei der Gelelektrophorese, weshalb die Autoren folgerten, dass die DNA an Proteine oder Lipide gebunden sein muss. Rogers (Rogers 1976) fand ebenfalls heraus, dass die extrazelluläre DNA in einigen Charakteristika von der intrazellulären unterschiedlich sein muss. Über Schmelzkurvenanalysen berechnete er den Guanin (G) und Cytosin (C) Gehalt der extrazellulären DNA auf 35,5%, während in Zellen vorhandene einen G/C-Gehalt von 42,2% haben muss. Bei der Reassoziationskurve während des Abkühlens unterschieden sich die extra- und die intrazelluläre DNA ebenfalls. Extrazelluläre lag nach kürzerer Zeit zu einem höheren Anteil wieder als Doppelstrang DNA vor, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die extrazelluläre DNA weniger komplex ist und sich somit zusammengehörige Sequenzen leichter zur

Hybridisierung wiederfinden. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass circa zehn Prozent des lymphozytären Genoms repliziert und in das Medium ausgestoßen werden. Weitere Versuche ergaben, dass nach drei Tagen Stimulation in Kultur das Zellpellet etwa drei bis vier Mal so viel DNA besitzt wie ruhende Lymphozyten oder Plazentazellen. Somit ist direkt gezeigt, dass die DNA-Synthese in unmittelbarem Zusammenhang zur Stimulation stehen muss (Rogers 1976). Dass Lymphozyten auch ohne Stimulation eine intrinsische DNA-Freisetzung betreiben zeigten Anker und Kollegen (Anker, Stroun et al. 1975). Dabei wurden Lymphozyten mit der gleichen Methodik wie von Rogers bestrahlt und im Medium unstimuliert belassen. Nach einiger Zeit wurde die im Medium befindliche DNA bestimmt. Dabei zeigte sich, dass auch die unbehandelten Lymphozyten nach circa zwei Stunden einen definierten DNA-Spiegel im Medium aufbauen. Belässt man sie für länger, ändert sich daran nichts mehr. Versetzt man die Lymphozyten alle zwei Stunden mit neuem Medium und bestimmt aus dem vorherigen Medium die DNA-Menge, so kommt man immer wieder auf dieselbe Menge DNA. Das bedeutet demnach, dass sich Lymphozyten ihre eigene Umgebung im Sinne eines *steady state* der DNA einrichten. Auch wenn man die Lymphozyten kurzzeitig aus ihrem Medium entfernt und wieder in dasselbe zurück tut, ändert sich an dem DNA-Gehalt nichts. Wie bereits schon durch Rogers konnte auch in diesem Versuchsansatz gezeigt werden, dass die DNA doppelsträngig ist und nur aus einem bestimmten Anteil der genomischen DNA besteht. Die Autoren mochten sich aber nicht festlegen, ob die DNA aus repetitiven Sequenzen oder extra für die Freisetzung bestimmten DNA-Fragmenten besteht.

Weitere Arbeitsgruppen publizierten Mitte der siebziger Jahre ähnliche Ergebnisse zu der DNA-Freisetzung aus Lymphozyten. Boldt (Boldt, MacDermott et al. 1977) kam dabei zu der Erkenntnis, dass die DNA-Freisetzung eine Lymphozyten-spezifische Eigenschaft sein muss, die durch Co-Kolonisierung mit anderen leukozytären Subpopulationen noch verstärkbar sei. Zudem seien isolierte Tonsillen-Lymphozyten direkt nach der Isolation stärkere Medium-DNA-Produzenten als mit PHA stimulierte. Die Autoren dieser Studie vermuten hinter der DNA-Freisetzung nur eine Möglichkeit der Lymphozyten auf dem Weg in die Ruhephase des Zellzyklus ihre zu viel produzierte DNA zu eliminieren (Staub and Antoni 1978). Bisher war die DNA ausschließlich quantitativ und qualitativ untersucht worden, es hatte aber keiner einen Vorschlag zum Freisetzungsmechanismus oder der Funktion dieser DNA machen können. Bell und Kollegen (Bell, Morrison et al. 1990) konnten 1990

nachweisen, dass kultivierte Mauslymphozyten spontan Apoptose begehen und auf diese Art und Weise niedermolekulare DNA von ca. 140-180 Basenpaaren (bp) Länge im Kulturmedium messen. Aufgrund der Fragmentlängen und qualitativen Proteinnachweisen von Histonproteinen (H2, H3 und H4) schlossen sie auf das Vorhandensein von Nukleosomen. Nukleosomen sind Komplexe aus DNA und Histonen, die dabei helfen, die DNA im Zellkern kondensiert zu halten. Ein Nukleosom besteht aus jeweils einem H2A, H2B, H3 und H4-Protein und den 140 bis 160 Basenpaaren DNA, die das Histonmultimer umschlingen. Dass es sich bei dem Freisetzungsmechanismus für diese Chromatinfragmente um Apoptose handelt, sicherten sie mittels Elektronenmikroskopie, indem sie Zellen unter proapoptischen Bedingungen im Medium beließen und in der Folge unter dem Elektronenmikroskop beobachteten. Ein Jahr später (Bell and Morrison 1991) konnten sie das gleiche Vorgehen auf menschliche Lymphozyten aus Tonsillengewebe mit gleichem Ergebnis anwenden. Darüber hinaus fanden sie heraus, dass Nukleosomen, die nach Freisetzung im Medium befindlich sind, eine mitogene Wirkung auf die kultivierten Lymphozyten besitzen. Zudem können diese Nukleoproteine neben ihrer lymphoproliferativen Eigenschaft auch noch die Synthese von Immunglobulinen stimulieren. Die Autoren gingen davon aus, dass der Effekt der Nukleosomen auf einem spezifischen rezeptorvermittelten Prozess auf die jeweiligen Zellen zurückzuführen ist, aber der genaue Mechanismus blieb dennoch unklar. Außerdem vermuteten sie einen Zusammenhang zwischen ihren Erkenntnissen und dem Systemischen Lupus Erythematoses, da die Apoptoseinduktion durch Nukleosomen von noch intakten Zellen einen sich selbst verstärkenden Kreis darstellt und demzufolge gut in die Vorstellung der Entstehung einer Autoimmunkrankheit passt.

### **2.3. Neutrophil extracellular traps**

Obige Schilderungen bezogen sich ausschließlich auf die Lymphozyten, die aber nur zwanzig bis dreißig Prozent der gesamten Leukozyten ausmachen. Dass auch die granulozytäre Fraktion, genauer gesagt die neutrophilen Granulozyten, in der Lage sind, im Rahmen einer Immunreaktion DNA in die Umgebung zu entlassen, wurde spätestens im Jahre 2004 deutlich. Denn in diesem Jahr sorgte das Paper einer Arbeitsgruppe des Berliner Max-Planck-Instituts (Brinkmann, Reichard et al. 2004) für einiges Aufsehen, die einen Mechanismus der Freisetzung von DNA aus neutrophilen Granulozyten detailliert beschrieben. Da sich die ausgestoßenen DNA-

Massen als netzförmige Strukturen im Fluoreszenzmikroskop darstellten und beobachtbar war, dass diese Strukturen eine bakterizide Fähigkeit besitzen, benannten sie diese *Neutrophil Extracellular Traps*, also aus Neutrophilen stammende extrazelluläre Fallen, kurz NETs. Auf der Suche nach dem Mechanismus, der diesem Prozess zugrunde liegt, fand man weder die Laktatdehydrogenase als unspezifischen Marker für den ungeordneten Zelluntergang im Sinne einer Nekrose, noch verloren die Zellen ihre Membranintegrität, was somit eine Apoptose ausschloss. Deshalb benannten Brinkmann und Kollegen diesen Vorgang NETose in Analogie zu den bisher bekannten, oben genannten Vorgängen.

### **2.3.1. NETose: Was passiert genau?**

Ganz detailliert konnte der Vorgang der NETose drei Jahre später von derselben Arbeitsgruppe beschrieben werden (Fuchs, Abed et al. 2007), indem sie sich NETotische, nekrotische und apoptotische Zellen im Elektronenmikroskop anschauten und feststellten, dass grundlegende morphologische Unterschiede nach einem jeweils spezifisch induzierenden Stimulus vorlagen. Folgt man der Chronologie der Zellaktivierung, so geht man davon aus, dass es wahrscheinlich unter anderem durch ein Signal der Toll-like-Rezeptoren (TLR) (Yipp, Petri et al. 2012), zum Beispiel des TLR 4 für bakterielles Lipopolysaccharid (Brinkmann, Reichard et al. 2004; Yousefi, Mihalache et al. 2009), zum Anstoß der intrazellulären Signalkaskade kommt. Im Laufe derer wird das extrazelluläre Signal über den Raf-MEK-ERK-*pathway* weitergeleitet. Eben genannte Moleküle sind Proteinkinasen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden und das ihnen nachgestellte Molekül ebenfalls phosphorylieren. Der *pathway* endet in der Phosphorylierung einer Untereinheit der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase), wodurch diese erst aktiviert wird. MEK und ERK haben für die Aktivierung beide die gleiche Aminosäure in der NADPH-Oxidase Untereinheit p47<sup>phox</sup> zum Ziel (El Benna, Han et al. 1996). Dabei ist die Blockade jeder einzelnen Stufe, sprich Raf, MEK oder ERK, in der Lage, die ROS und NET-Produktion zu inhibieren (Hakim, Fuchs et al. 2011). Eine dazu konträre Meinung besagt, dass zwar MEK ERK aktiviert, jedoch dieser Schritt nur von Statten gehen kann, wenn die ROS bereits gebildet wurden, somit die NADPH-Oxidase nicht als unterstes Glied der Kaskade steht (Keshari, Verma et al. 2013). Mögliche Erklärungsansätze sind unterschiedliche Methoden. Sicher ist aber, dass es verschiedene Signalwege geben muss, denn der von Brinkmann standardisiert eingesetzte Stimulus, das Phorbol-Myristyl-Acetat PMA, ist ein

Proteinkinase C Aktivator, setzt also schon intrazellulär an. Jedoch ist bei extrazellulärer Stimulation beispielsweise mit *Helicobacter pylori* die NET-Bildung Proteinkinase-C-unabhängig (Hakim, Fuchs et al. 2011). Noch weiter geht die Beobachtung, dass es je nach Stimulus eine NADPH-Oxidase abhängige oder unabhängige NETose gibt (Parker and Winterbourn 2012). Besser beschrieben ist der NADPH-Oxidase-abhängige Signalweg, da in den meisten Papers die Positivkontrolle mit PMA durchgeführt wurde. Die Funktion der NADPH-Oxidase ist die Generierung von Reaktiven Sauerstoff Spezies (*reactive oxygen species* = ROS), wobei das massive Entstehen von ROS auch als *oxidative burst* bezeichnet wird. Im Rahmen des *oxidative burst* wird durch die NADPH-Oxidase ein Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen, sodass  $O_2^-$  entsteht, der wiederum mit Wasser zu  $H_2O_2$  reagiert, um dann letztendlich mit  $Cl^-$  zu Hypochlorsäure  $HOCl$  zu reagieren. Insgesamt besitzen ROS eine starke oxidierende Wirkung auf Proteine und Membranlipide. Der letzte Schritt der Reaktionskaskade wird durch das in Granula der neutrophilen Granulozyten vorkommende Enzym Myeloperoxidase (MPO) katalysiert. Es konnte gezeigt werden, dass bei der NETose der katalytischen Fähigkeit der MPO eine Schlüsselfunktion zukommt. So können Neutrophile von Patienten mit angeborener Myeloperoxidase-Defizienz im Rahmen der *chronic-granulomatous disease* keine NETs produzieren (Metzler, Fuchs et al. 2011). Das liegt daran, dass die Synthese von Hypochlorsäure durch die Myeloperoxidase katalysiert wird, die für diesen Schritt auf extrazelluläres  $Cl^-$  angewiesen ist (Akong-Moore, Chow et al. 2012). Zwar ist die NETose auch durch früher in der Reaktion stehende ROS wie  $H_2O_2$  induzierbar, aber die wichtigste Rolle zur Einleitung der NET-Formung kommt der  $HOCl$  zu (Palmer, Cooper et al. 2012). Bei der Differenzierung der Zellwege kommt den ROS eine entscheidende Funktion zu, indem sie die für die Apoptose verantwortlichen Caspasen an ihrer im katalytischen Zentrum befindlichen Aminosäure Cystin oxidieren und sie somit inaktivieren (Hampton, Stamenkovic et al. 2002). Somit ist bei der Vermeidung der Apoptose die Funktion der NADPH-Oxidase unabdingbar (Fadeel, Ahlin et al. 1999). Liegt eine Defizienz der NADPH-Oxidase vor, können Neutrophile zwar immer noch aktiviert werden, aber anstatt dass sie den Weg in Richtung NETose einschlagen, werden sie apoptotisch. Das liegt daran, dass die Chromatindekondensation verhindert wird, die einen weiteren Meilenstein auf dem Pfad in Richtung NET-Freisetzung darstellt (Remijns, Vanden Berghe et al. 2011). Dieser Vorgang beruht auf der Funktion zweier zentraler Enzyme: Einerseits der ebenfalls granulär vorkommenden

neutrophilen-spezifischen Elastase (NE) und der kernständigen Isoform der Peptidylarginin Deiminase (PAD4). Die neutrophilen-spezifische Elastase wird Stimulus-abhängig aus den Granula freigesetzt und wandert in Richtung Zellkern, was ein aktiver Vorgang zu sein scheint, da sie sich ausschließlich kernwärts bewegt. Im Zellkern besitzt sie lytische Aktivität an den Histonen, wobei sie einerseits das Histonprotein H1 und andererseits die in den Nukleosomen vorkommenden H2A, H2B, H3 und H4 zersetzen kann. Ihren Effekt auf die Dekondensation des Chromatins entfaltet sie aber erst, wenn sie das Histonprotein H4 zersetzt. Die Aktivität der NE ist durch Bindung an DNA herabsetzbar, was einen autoregulatorischen Mechanismus nahelegt, sodass es keine überschießende Aktivität des Enzyms geben kann (Papayannopoulos, Metzler et al. 2010). Die PAD4 ist in der Lage, kalziumabhängig die Aminosäure Arginin in die Aminosäure Citrullin zu überführen (Leshner, Wang et al. 2012). Das Zielprotein für diese Aktivität ist das Histonprotein H3, das an seinem N-Terminus an den Stellen 2, 8 und 17 ein Arginin besitzt. Die Citrullinierung ist eine epigenetische Modifikation wie die Methylierung, wobei erstere aber eine Transkription verhindert und auch in der Lage ist, letztere zu antagonisieren (Cuthbert, Daujat et al. 2004). Zwar ist die PAD4 ein kernständiges Enzym, aber die Hauptaktivität findet im Zytoplasma statt und ist ebenso wichtig für die Dekondensation wie die Elastase (Neeli, Khan et al. 2008). Man stellt sich das so vor, dass durch die Veränderung des Arginin und der damit verbundenen leichten Ladungsänderung des Gesamtproteins eine Abstoßung zwischen Histon und DNA stattfindet (Leshner, Wang et al. 2012). Durch diesen Vorgang werden die Nukleosomen insgesamt leichter für den Abbau zugänglich gemacht, was auch vor dem Hintergrund der Beseitigung der NETs von Bedeutung ist (Wang, Li et al. 2009). Die Deiminierung findet nur solange statt, wie die Zelle noch intakt ist (Neeli, Dwivedi et al. 2009), was auf eine Dissoziation der PAD4 von den Chromatinstrukturen zurückzuführen ist. Was für eine wichtige Position die PAD4 in der Freisetzung von dekondensiertem Chromatin einnimmt, zeigt der Versuch an einer mit PAD4 transfezierten Osteosarkom-Zelllinie, die durch die Expression des Enzyms ebenfalls in die Lage versetzt wurde, Chromatin in NET-ähnlicher Form freizusetzen (Leshner, Wang et al. 2012). Neben der Rolle der ROS-Generierung scheint die Myeloperoxidase, die noch lange Zeit während der NETose granulär verbleibt, auch eine Rolle in der Dekondensation des Chromatins zu spielen. Zwar hat sie selbst keine lytische Fähigkeit auf die Histone wie die Elastase, aber die Histondegradation ist unter

Vorhandensein der MPO beschleunigt, was den Schluss zulässt, dass die beiden Enzyme synergistisch aufeinander wirken. Dieser Effekt bleibt auch erhalten, wenn man die ROS-Bildung inhibiert (Papayannopoulos, Metzler et al. 2010). Während die DNA ihre kompakte Struktur verliert, formt sich der in reifen neutrophilen Granulozyten segmentierte Kern zu einem großen Kern um und beginnt in der Folge kleine Vesikel mit der Kernmembran zu bilden (Fuchs, Abed et al. 2007). Nachdem sich die beiden Kernmembranen weit voneinander entfernt und Vesikel gebildet haben, sorgen Aktin und Mikrotubuli, wie bei der mitotischen Zellteilung, für das Zerreißen der Membranen (Neeli, Dwivedi et al. 2009). Das Äußere des Neutrophilen hat sich in der Zwischenzeit auch dank des sich verändernden Zytoskeletts zu einer abgeflachten Zelle mit Pseudopodien verändert (Brinkmann, Reichard et al. 2004). Letzten Endes kulminiert der ganze Prozess darin, dass sich das nukleäre Chromatin im Zytoplasma mit den granulären Enzymen wie der MPO gemischt hat, die Zellmembran zerreißt und sich das DNA-Enzym-Gemisch in den Extrazellularraum beziehungsweise das Plasma entleert. Die NETs bestehen im Extrazellularraum aus linearen und globulären Domänen, wobei letztere den Nukleosomen entsprechen. Extrazellulär haben die NETs die Funktion Bakterien zu fangen oder ihre Ausbreitung zu verhindern und mit Hilfe der Enzyme zu lysieren, dabei scheint die bakterizide Effizienz derjenigen der Phagozytose zu entsprechen (Fuchs, Abed et al. 2007). Nicht nur die Enzyme der NETs sind Teil der Bakterizidität, sondern auch die Histone scheinen eine Funktion in der unspezifischen Abwehr von Bakterien zu besitzen (Hirsch 1958). Um den NETs zu entkommen exprimieren beispielsweise *Staphylokokkus aureus*, *Streptokokkus pyogenes (GAS)* und *Serratia marcescens* als Pathogenitätsfaktoren eine DNase. DNasen besitzt auch der Mensch, unter anderem im Plasma, und von ihrer Funktion hängt die Effektivität der Beseitigung der DNA-Strukturen ab, wobei der DNA-Verdau durch Komponenten des Komplementsystems, beispielsweise C1q, inhibierbar ist (Leffler, Martin et al. 2012).

Die benötigte Zeit vom Stimulus bis zu den detektierbaren NET-Strukturen ist in der Literatur recht unspezifisch angegeben. Die Freisetzung der NETs im *in vitro-setting* begann bereits nach 10 Minuten (Brinkmann, Reichard et al. 2004) und erreichte ihren Höhepunkt zwischen zwei und vier Stunden nach Beginn der Stimulation (Fuchs, Abed et al. 2007). Es gab neben dem eben geschilderten Vorgang auch noch weitere Beschreibungen zum Mechanismus des Ausstoßens von Chromatinstrukturen zur Bakterienbekämpfung. Demnach gibt es eine schnelle, von



ROS unabhängige Reaktion der Neutrophilen auf Stimulation mittels *Staphylokokkus aureus*, bei der sie nukleäre DNA durch Vesikel der Kernmembran im Sinne einer Exozytose direkt nach extrazellulär befördern. Die dabei entstehenden NETs besitzen aber eine geringere lytische Kapazität als die im Zuge der NETose gebildeten und auch die neutrophilen-spezifische Elastase besitzt in diesem Kontext als bakterizides Enzym nicht sofort ihre Wirkung, sondern kommt erst nach einer Stunde als aktiver Part in den NETs vor (Pilszczek, Salina et al. 2010; Yipp, Petri et al. 2012). Die initialen Beschreibungen der NETs durch mikroskopische Befunde legen nahe, dass es sich zum Großteil um nukleäre, genomische DNA handeln muss. Dem widerspricht der erbrachte Nachweis mitochondrialer DNA in den NETs (Yousefi, Mihalache et al. 2009), die auch nach sehr kurzer Stimulationszeit extrazellulär zu finden waren. Die Versuche demonstrieren, dass Mitochondrien ausgestoßen werden, was mit dem mikroskopischen Befund einhergeht, dass die Neutrophilen unter der NETose ihre Zellorganellen verlieren beziehungsweise diese nicht mehr im Zytoplasma auffindbar sind (Fuchs, Abed et al. 2007). Trotz allem endet auch diese Art der NETose letztlich im Zelltod, wenn auch nach einer viel längeren Zeit. Auch die MT-NETose ist ROS-abhängig.

### **2.3.2. NETose induzierende Stimulantien**

Brinkmann und Kollegen nannten in ihrer Erstbeschreibung des Prozesses der NETose das synthetische Phorbol-Myristyl-Acetat (PMA) den bis dato potentesten bekannten Induktor der NETose (Brinkmann, Reichard et al. 2004). Aber es wurden auch im Körper vorkommende Stoffe benutzt, darunter die Zytokine Interleukin 8 und Tumornekrosefaktor alpha (Neeli, Dwivedi et al. 2009; Wang, Li et al. 2009) oder die der unspezifischen, azellulären Abwehr zugeordnete Komplementkomponente C5a und der Leukozytenwachstumsfaktor Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor GM-CSF (Yousefi, Mihalache et al. 2009). Als Produkte humanpathogener Erreger zeigten Neutrophile auch auf die Stimulation mit Lipopolysaccharid LPS, einem Bestandteil der Gramnegativen Zellwand, Lipoteichonsäure aus der Gram positiven Zellmembran und Zymosan aus der Zellwand der Pilze eine starke NETose Reaktion (Neeli, Dwivedi et al. 2009). *In vitro* wurden aber nicht nur isolierte Zytokine verwendet, um NETose zu erwirken, sondern wurden von diversen Arbeitsgruppen Bakterienstämme experimentell untersucht. Brinkmann inkubierte die Neutrophilen mit *Staphylokokkus aureus*, *Salmonella typhimurium* und *Shigella flexneri* (Brinkmann, Reichard et al. 2004; Wang,

Li et al. 2009) und konnte anhand dieser Versuche die These aufstellen, dass Bakterien durch die Netze an der Ausbreitung gehindert werden. Weitere klinisch wichtige Keime wie *Pseudomonas aeruginosa* (Akong-Moore, Chow et al. 2012) und *Helicobacter Pylori* (Hakim, Fuchs et al. 2011) konnten gleichermaßen als NET-induzierend eingesetzt werden. Das Bakterium *Haemophilus influenzae* wurde auch in einem *case report* als Ursache dafür beschrieben, dass ein Patient an einer Infektion des Atemtraktes starb. Im Sputum dieses Patienten fand man neben dem phagozytierten Bakterium auch NETs in großer Menge (Hamaguchi, Seki et al. 2012). Aber nicht nur Bakterien sind als Stimulus und gleichzeitig auch Zielorganismus der NETose für Neutrophile beziehungsweise NETs verwendbar, sondern auch der Pilz *Candida albicans* (Urban, Ermert et al. 2009; Papayannopoulos, Metzler et al. 2010), das Protozoon *Leishmania amazonensis* (Guimaraes-Costa, Nascimento et al. 2009) oder der Parasit *Toxoplasma Gondi* (Abi Abdallah, Lin et al. 2012). Dass NETs nicht nur in der Lage sind einzellige Lebewesen zu neutralisieren, zeigen die Entdeckung von NETs bei der Gicht (Schorn, Janko et al. 2012). Demnach scheinen Mono-Natrium-Urat-Kristalle mit zu den potentesten NET-Induktoren zu gehören, wobei die NETs keine lytische Fähigkeit auf diese Kristalle haben dürften, sondern sie nur umspinnen.

### **2.3.3. NETs im klinischen Kontext**

Bis jetzt wurde das rein experimentelle Versuchsfeld dargestellt, aber seit der Erstbenennung der NETs hat sich die Forschungswelt in den unterschiedlichsten Disziplinen der Medizin auf die Suche nach ihrer jeweils spezifischen Beziehung zu den NETs gemacht und mittlerweile scheint es fast kein Gebiet mehr zu geben, in dem es nicht auch Einflüsse auf Krankheiten auf Grund von Überaktivierung der Neutrophilen gibt. So ist zum Beispiel in der Hämostaseologie eine Kreuzreaktivität zwischen Neutrophilen und Thrombozyten im Zuge von Entzündungsreaktionen bekannt geworden. Dabei handelt es sich um Toll-like-receptor 4 (TLR4) vermittelte Aktivierung und Aggregation der Plättchen, die in einer nicht genauer beschriebenen Art und Weise die Neutrophilen zur NET-Produktion, jedoch nicht zur NETose bringen (Clark, Ma et al. 2007). Des Weiteren zeigen rote Thromben DNA-Strukturen, aber auch NET-Bestandteile sind in der Lage Thrombozyten zu aktivieren und das klassische Antikoagulans in der Thrombotherapie, das unfraktionierte Heparin, ist in der Lage, NETs zur Auflösung zu bringen. Somit hat man hier eine direkte Brücke gefunden, warum in der akuten Entzündung Thrombosen eine Komplikation darstellen können (Fuchs, Brill et al. 2010; Fuchs, Brill et al. 2012). Es scheint aber

auch direkte Interaktionen zwischen der sekundären Hämostase und der DNA zu geben. Unter gesteigerten Plasma-DNA-Leveln ist eine Zunahme der Thrombin-Entstehung zu beobachten und der Faktor XII des Gerinnungssystems könnte als Sensor für plasmatische cfDNA fungieren und so ihre prothrombotische Fähigkeit vermitteln (Swystun, Mukherjee et al. 2011).

Anscheinend bringt die Freisetzung von NETs nicht nur Positives für den reagierenden Körper, denn weiterhin konnten Endothelzellschädigungen durch aktivierte Neutrophile beobachtet werden, wobei sie durch die Endothelzellen selbst zur Transmigration und NETose durch Interleukin-8 Freisetzung stimuliert wurden (Gupta, Joshi et al. 2010). Wahrscheinlich ist das im Rahmen einer Sepsis vorkommende Multi-Organ-Versagen ebenfalls eine Folge der überschießenden Immunantwort (Xu, Zhang et al. 2009).

Bei der Atherosklerose handelt es sich um ein Problem der Gefäße, das durch Entzündung der Gefäßmatrix aufrechterhalten und vorangetrieben wird. Zu neuen Erkenntnissen über die Pathogenese der Atherosklerose verhalf die Visualisierung der NETs mittels Mikroskop sowohl intraluminal in den Gefäßen als auch direkt in den atheromatösen Plaques (Megens, Vijayan et al. 2012). NETs sind einerseits durch ihre DNA und andererseits durch ihre daran gebundenen Proteine in der Lage dendritische Zellen, die sich gehäuft in atherosklerotischen Plaques ansammeln, zu stimulieren. Durch diese Interaktion wird die transmurale Entzündungsreaktion noch weiter vorangetrieben und gleicht dann einer Autoimmunreaktion (Doring, Manthey et al. 2012). Ebenfalls in dieses Feld gehört die Feststellung, dass Neutrophile von Mäusen mit hämatologischen Neoplasien ebenso wie mit soliden Tumoren eine verstärkte Tendenz haben NETs zu bilden. Letzten Endes ist das Plasma-DNA-Level in diesen Mäusen dann statistisch eher mit der Anzahl der Neutrophilen in Einklang zu bringen als mit der Tumorgroße, da die Neoplasie auch einen Anstieg der Neutrophilenzahlen mit sich bringt. Wegen der gesteigerten NETose ist bei banalen Infektionen auch das thrombembolische Risiko um ein vielfaches gesteigert (Demers, Krause et al. 2012). Ein weiteres Krankheitsbild, das von hoher klinischer Relevanz ist, ist die Entzündung des Wurmfortsatzes (Appendizitis). Auch hier war es möglich, DNA-Fasern zusammen mit den enzymatischen und nukleosomischen Komponenten nachzuweisen (Brinkmann, Reichard et al. 2004). In Abszessen sind neutrophile Granulozyten aller Stadien der NETose bis hin zum anukleären Granulozyten zu finden (Yipp, Petri et al. 2012). Zudem ist es möglich, aseptische von septischen

Arthritiden zu unterscheiden, indem die Quantifizierung von cfDNA und MPO und mittels gut gewählter *cut-off-values* eine relativ zuverlässige Differenzierung der Ätiologie erlaubt (Logters, Paunel-Gorgulu et al. 2009).

Außerdem gibt es mehrere Krankheitsbilder in der Dermatologie, die mit vermehrten NETs einhergehen. Dabei sind NETotische Neutrophile in Hautläsionen von Psoriasis-Patienten vermehrt auffindbar und wie in Abszessen finden sich hier unterschiedliche Reifegrade der NETose. Mit der NETose ist auch die Freisetzung des für die Psoriasis zentralen Zytokins Interleukin 17 verknüpft, wobei dieses nicht an den extrazellulären NETs anhaften bleibt wie die charakteristischen, enzymatischen Bestandteile MPO und NE (Lin, Rubin et al. 2011). Ein weiteres Beispiel aus der Dermatologie ist der bereits weiter oben erwähnte Systemische Lupus Erythematoses (SLE). Nachdem schon lange bekannt war, dass die DNA- und Nukleosomen-Spiegel beim Lupus erhöht sind (Tan, Schur et al. 1966; Amoura, Piette et al. 1997), kam man im Laufe der Zeit zu der Erkenntnis, dass Neutrophile eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielen müssen, da die Autoantikörper gegen zytoplasmatische Strukturen dieser Zellen gerichtet sind. Die andere wichtige Art der Antikörper ist gegen Doppelstrang-DNA und Nukleosomen gerichtet, womit sich demzufolge Autoantikörper gegen alle Bestandteile der NETs finden lassen. Patienten mit SLE im akuten Schub haben nachgewiesenermaßen eine reduzierte Degradationsfähigkeit von DNA, wobei man sich das Geschehen so vorstellt, dass das für den Plasma-DNA Abbau zuständige Enzym DNase I nicht so gut arbeitet wie im Gesunden. Durch die deswegen längere Verweildauer der DNA und DNA-assoziierten Strukturen im Plasma und die während der NETose durchgeführten Modifikationen an den NET-Proteinen erhöht sich die Immunogenität der NETs. Die so gebildeten Autoantikörper wiederum inhibieren die DNase, indem sie ihr den Zugang zur DNA erschweren (Hakim, Furnrohr et al. 2010). Diesen Teufelskreis verstärkend wirkt noch, dass an Orten der Entzündung das Komplementsystem aktiviert wird und manche Komplementkomponenten ebenfalls in der Lage sind durch DNA-Bindung deren Abbau zu erschweren (Leffler, Martin et al. 2012). Des Weiteren sind NETs von Lupus-Patienten etwas anders zusammengesetzt als in gesunden Kontrollpatienten: Sie besitzen im Vergleich mehr *high-mobility-group-box-protein 1* und *LL37*, zwei DNA-bindende Proteine, die eigentlich in der Zelle transkriptionsregulatorische Aufgaben erfüllen. Sobald sie aber extrazellulär vorkommen, dient ihre DNA-Bindung dazu, dass ihre Träger-DNA leichter von TLRs erkannt wird und somit ein

proinflammatorisches Signal in die Rezeptor-tragende Zelle gelangt (Garcia-Romo, Caielli et al. 2011). Auch dieser Schritt trägt zu der Selbstverstärkung des autoimmunen Prozesses bei.

Ein sehr schwerwiegendes Krankheitsbild in der Gynäkologie ist die Präeklampsie und im weiteren Verlauf die Eklampsie. Bei der Pathophysiologie steht eine Unterversorgung der Plazenta im Mittelpunkt und die deswegen aus ihr freigesetzten Mediatoren führen zum systemischen Anstieg des Blutdrucks der Mutter. Bei Verschlimmerung kann es zu Leber- und Nierenfunktionsstörungen und sogar zu Krampfanfällen der Mutter kommen. Die heute einzige bewährte Therapie, die das Überleben des Feten gewährleistet, ist die Notentbindung per Kaiserschnitt. Es konnte für dieses Krankheitsbild gezeigt werden, dass auch Mikrodebris des Synzytiotrophoblasten in der Lage ist, NETose in gleichem Maße wie PMA oder Interleukin 8 zu induzieren. Zudem sind bei Präeklampsie vermehrt NETs im intervillösen Raum der Plazenta zu finden. Man geht davon aus, dass diese Zellen aktiviert werden und durch die NETs Mikrothromben entstehen, die in letzter Konsequenz zur Mangelversorgung der Plazenta, respektive des Feten führen können (Gupta, Hasler et al. 2006; Hahn, Giaglis et al. 2012). War eine Neutrophilie im weiblichen Reproduktionstrakt vorhanden, konnten in Kühen geringere Fertilitätsraten beobachtet werden. Dafür verantwortlich ist die Interaktion zwischen Neutrophilen und Spermien im Sinne einer NETose-Induktion. Die NETs immobilisieren die Spermien in Folge dessen und später werden sie durch Neutrophile oder andere kompetente Zellen phagozytiert. Im Plasma des Sperma kommt eine Endonuklease ähnlich der plasmatischen DNase vor, mittels derer sich die Spermien aus den NETs befreien können. Bei ihrer Defizienz ist die Fertilität herabgesetzt, da Spermien zu schnell von den NETs eingefangen werden und es nicht mehr zur Befruchtung der Eizelle kommt (Alghamdi and Foster 2005).

#### **2.3.4. NET-analoge Strukturen**

Wenige Jahre nach der Erstbeschreibung der NETs wurden auch für andere Leukozytensubpopulationen analoge Mechanismen zur NETose beschrieben. So wurde zunächst in Darmgewebe von Morbus Crohn Patienten eine Invasion durch eosinophile Granulozyten beobachtet, in deren Nähe DNA gehäuft gefunden wurde. Übertragen ins *in vitro setting* konnte gezeigt werden, dass auch die Eosinophilen in der Lage sind auf Stimulation mit LPS und Zytokinen, aber anderen Zytokinen als die Neutrophilen, DNA freizusetzen. Dieser Vorgang ist ebenfalls ROS-abhängig, besteht

aber aus mitochondrialer DNA und erfolgt wesentlich schneller als die NETose, mit einem Beginn nach 5 und einer maximal laufenden Freisetzung nach 20 Minuten. Bringt man diese Leukozyten mit Bakterien zusammen, ist die bakterizide Kapazität stärker eingeschränkt, wenn man die Phagozytose blockiert als wenn man die DNA-Freisetzung einschränkt, was die DNA-abhängige Abwehrfunktion eher als nebensächliche Fähigkeit klassifiziert (Yousefi, Gold et al. 2008). Und auch für Mastzellen wurde zur gleichen Zeit dasselbe Phänomen beschrieben. Auch in dieser Subpopulation ist die „NETose“ durch Bakterien stimulierbar und ROS abhängig. Während sich in Eosinophilen die Morphologie während der Ausschleusung der DNA von der Neutrophilen-Morphologie unterscheidet, erleiden Mastzellen ebenfalls eine Ruptur der Kernstrukturen und in letzter Konsequenz den Zelltod. Die Analyse der DNA-Netze zeigte hohe Ähnlichkeiten zu den NETs (von Kockritz-Blickwede, Goldmann et al. 2008). Insgesamt scheint somit die leukozytäre DNA eine bisher nicht bekannte Rolle in der unspezifischen, angeborenen Immunität zu spielen und es werden bestimmt in Zukunft noch weitere, tiefergehende Erkenntnisse zu der Funktion und klinischen Relevanz dieses Phänomens gewonnen werden.

## **2.4. Immunsystem und Sport**

### **2.4.1. Leukozytose bei Belastung**

Um den Kreis der Felder zu schließen, auf denen diese Arbeit theoretischen basiert, müssen nicht nur die cfDNA und mögliche Freisetzungsformen beleuchtet, sondern auch die immunologische Situation während der Belastung dargelegt werden.

Wenn man sich also mit der Immunologie der sportlich Belastung befasst, findet man so gut wie in jedem Paper zunächst Aussagen über das Verhalten der Leukozyten im Rahmen der Belastungssituation. Dabei werden die Gesamtleukozytenzahlen und das dazugehörige Differentialblutbild genannt, in der Regel in Bezug auf bestimmte Zeitpunkte im Versuchsablauf. Es werden ein Ruhewert vor, eventuell mehrere Werte während, einer direkt nach der Belastung und anschließend unterschiedlich viele Werte in einer zu definierenden Erholungsperiode genannt. Bei dem Vergleich der einzelnen Zeitpunkte gibt es unabhängig von der Belastungsart die Feststellung, dass unter Belastung alle Zelltypen vermehrt im Blut auftauchen. Beispielhaft seien im Folgenden einige Studien aus der Vielzahl der zu diesem Thema publizierten genannt. Alle Zellzahlen sind immer in  $X \times 10^3$  Zellen pro Mikroliter angegeben.

Ein ziemlich alltägliches Versuchsprotokoll wählten Niemann und Kollegen (Niemann, Henson et al. 2005), die fünfzehn Frauen eine halbe Stunde Walken ließen und anschließend Immunparameter untersuchten. Die Frauen waren Walking gewöhnt und liefen bei einer mittleren Geschwindigkeit von 6,3 km/h, setzten sich somit keiner ungewohnt hohen Belastung aus. Selbst bei dieser moderaten Form der Belastung konnte im Anschluss ein Anstieg der Leukozyten von 6,75 auf 8,25 verzeichnet werden. Eine Stunde nach Beendigung waren es immer noch 7,9. Bei den Leukozytenuntergruppen verhielten sich die Neutrophilen so, dass sie unter Belastung von 3,79 auf 4,59 und in der Erholungsphase nochmal auf 4,76 anstiegen. Die Lymphozyten stiegen unter Belastung ebenfalls an, fielen aber in der Erholungsphase schon wieder auf das Ausgangsniveau ab (2,31 auf 2,92 auf 2,24). Den gegenläufigen Trend von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten findet man auch in der Studie von Camus (Camus, Duchateau et al. 1994). Hierin war ein zwanzig-minütiges Fahrradergometer-Protokoll bei 80% der  $VO_2max$  zu absolvieren. In dem als gut trainiert charakterisierten Probandenkollektiv findet sich ebenfalls die Leukozytose direkt nach der Belastung. In der zwanzig Minuten andauernden Erholungsphase zeigt sich ein Abfall der Gesamtleukozytenzahlen, der aber ausschließlich auf dem Rückgang des Anteils der Lymphozyten basiert. Die Neutrophilen hingegen bleiben konstant in diesem Intervall. Eine ähnliche Feststellung machte Morozov (Morozov, Pryatkin et al. 2003), der männliche Ruderer auf einem Laufband bis zur Erschöpfung in einem Stufenprotokoll belastete und bis zu sechs Stunden nach dem Test Proben nahm. Die Gesamtleukozytenzahlen veränderten sich von 5,4 um 73% auf 9,4 und nach einer, drei und sechs Stunden von 5,1 auf 8,4 und 7,1. Bei Betrachtung der Werte fällt einem der leukozytäre Peak direkt und drei Stunden nach Belastung auf. Die beiden Peaks unterscheiden sich in ihrer Zellzusammensetzung dahingehend, dass der erste durch einen 2,3-fachen Anstieg der Lymphozyten aber nur einen 1,3-fachen der Neutrophilen getragen wird, während der nach drei Stunden 1,85-fach erhöhte Neutrophile aber nur 1,3-fach erhöhte Lymphozyten im Vergleich zur Baseline aufweist. Die Lymphozyten sind eine Stunde nach Belastung deutlich unter den Ausgangswert gefallen, verzeichnen streng genommen also auch einen Anstieg zum drei Stunden Wert. Insgesamt jedoch lässt sich aus dieser Zeitreihe deutlich machen, dass hier ebenfalls der Trend der Neutrophilie im Blut den Ausschlag für die lange anhaltende Leukozytose gibt. Im Rahmen dieser Studie war die Belastung zwanzig Minuten lang und mit 80% der

VO<sub>2</sub>max relativ intensiv, aber die direkte Auswirkung von Belastungsintensität und Leukozytose zeigt eine andere Studie (Gleeson, Blannin et al. 1995), in der die Probanden auf einem Laufband bei 20 km/h 30, 60, 90, 120 und 150 Sekunden oder bis zur Erschöpfung laufen mussten. Untersucht wurden hierbei die Zellveränderungen in der direkten Erholungsperiode. Schon bei den beiden kürzesten Intervallen von 30 und 60 Sekunden gab es eine starke Leukozytose, die aber während der Erholungsphase von fünf Minuten wieder abfiel. Bei den längeren Belastungen war die Leukozytose im Vergleich zum 60 Sekunden Intervall nicht stärker, aber die Reaktion nach Ende der Belastung war eine andere: 90 und 120 Sekunden resultierten in einer stabilen Leukozytose, während 150 Sekunden oder Laufen bis zur Erschöpfung noch zu einem weiteren Anstieg der Leukozyten führte. Hieran kann man sehen, dass jede Art von maximaler Belastung bereits Auswirkungen auf die Leukozyten hat. Einen auf die Zeit bezogenen völlig gegensätzlichen Ansatz verfolgte Galun (Galun, Burstein et al. 1987), der junge Männer 120 km marschieren ließ und während des 24 Stunden dauernden Laufes immer wieder Blutproben entnahm (nach neun, sechzehn und vierundzwanzig Stunden). Dabei war ein Anstieg der Leukozyten bis sechzehn Stunden zu verzeichnen, die vierundzwanzig Stunden Blutprobe unterschied sich allerdings schon nicht mehr von der vor dem Start genommenen Probe und auch während der Erholungsphase gab es keine signifikanten Schwankungen der Leukozytenzahlen mehr. In der Kontrollgruppe, die nur sechs und vierzehn Stunden marschieren musste, wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. In der Studie wurden die Anstiege der Leukozyten als Pseudoleukozytose bezeichnet, was bedeutet, dass die Leukozytose nicht aus neu gebildeten Leukozyten resultiert, sondern nur aus in den Blutstrom durch verschiedene Einflüsse gezogene, bereits in der Peripherie befindliche Leukozyten stammt. Eine weitere Studie, die Effekte von intensiver, langer Belastung auf die Leukozytose untersucht, stammt von Keen (Keen, McCarthy et al. 1995). Hier wurde das Verhalten der Leukozyten im Rahmen eines Fahrrad-Mehretappenrennens in Großbritannien im Jahre 1992 untersucht. Nach jeweils langen Etappen im Verlauf der Rundfahrt wurden abends und am darauf folgenden Morgen Blutproben bei acht Fahrern gesammelt. Während des Rennens gab es keine signifikanten Anstiege der Leukozyten zu beobachten, aber augenscheinlich leichte Anstiege gab es sehr wohl. Die signifikanten Anstiege gab es zwischen den Proben vom Abend und folgenden Morgen. Die Gesamtleukozyten fielen in den drei



gemessenen Nächten im Mittel um 1,92 Zellen ab, während die Neutrophilen dabei 1,22 und die Lymphozyten 0,52 Zellen ausmachten. Der Rest entfiel auf die anderen Untergruppen der Leukozyten. Die Abendproben wurden zwischen 20.30 Uhr und 21.00 Uhr genommen und die Morgenproben zwischen 7.00 und 9.00 Uhr. Wenn man davon ausgeht, dass die Etappen jeweils am Nachmittag zu Ende gegangen waren, hatten die Fahrer auch noch einige Stunden nach Rennende erhöhte Leukozytenwerte, die sich während der Nachtruhe normalisierten. Insgesamt wird in der Studie konstatiert, dass professionelle Radsportler im Vergleich zur Normalbevölkerung erniedrigte Blutleukozytenwerte aufweisen. Eine letzte Studie, die noch vorgestellt werden soll, wurde von Degerstrom mit Skilangläufern mit nationalem Wettkampfniveau durchgeführt (Degerstrom and Osterud 2006). Ziel dieser Studie war es, das Verhalten der Leukozyten nach wiederholter Belastung nachzuvollziehen. Dazu wurden zwei Durchläufe von 30 Minuten bei 80% VO<sub>2</sub>max im Abstand von vier Stunden durchgeführt. Während der ersten Belastung stiegen die Leukozyten wie bekannt an, fielen in der Pause nicht ganz ab und nach der zweiten Belastung erreichten sie einen noch höheren Wert als nach der ersten Belastung. Nach zwei Stunden Erholung waren die Leukozyten immer noch zahlreicher im Blut vorhanden als es direkt nach der ersten Belastung der Fall war. Teilt man die Leukozyten in Lymphozyten und Granulozyten auf, erkennt man, warum die Gesamtleukozyten sich so verhalten. Das liegt daran, dass die Neutrophilen zu jedem Zeitpunkt mehr sind als am vorherigen, also einen kontinuierlichen Anstieg verzeichnen, die Lymphozyten aber ganz regelmäßig nach Belastung ansteigen und danach zuverlässig aufs Ausgangsniveau wieder abfallen. Im Rahmen der Untersuchungen zeigte sich eine negative Korrelation zwischen maximalen Neutrophilen-Leveln und VO<sub>2</sub>max.

#### **2.4.2. Herkunft der Leukozyten**

Aus all den dargelegten Studien wird ersichtlich, dass es unabhängig von der Belastungsart und der Dauer zu einer Leukozytose kommt, die jedoch in ihrer Kinetik von der Dauer und Intensität der Belastung bestimmt wird. Woher diese Leukozyten auf einmal so schnell kommen, ist nicht sicher, aber es gibt dafür experimentelle Erklärungsansätze. Da man schon immer die unter Belastung gesteigerten Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin im Verdacht hatte, zu der Leukozytose beizutragen, wurden mit ihnen auch Versuche durchgeführt. Man konnte zeigen, dass eine Infusion von Adrenalin und Noradrenalin bei Probanden zwar keine so starke

Reaktion in Bezug auf Kreislaufparameter wie Belastung selbst ausüben kann, aber dennoch ein Anstieg von Herzfrequenz, systolischem Blutdruck und der Anzahl weißer Blutkörperchen zu messen war (Muir, Cruz et al. 1984). Da man zudem die *low-flow* Strombahnen des Körpers, in diesem Fall insbesondere die Lunge, unter Verdacht hatte, besonders viele weiße Blutkörperchen an den Endothelien anhaften zu haben, machte man den Versuch, radioaktiv markierte Zellen zu infundieren und ihr Verbleiben in der Lunge mittels Kamera für radioaktive Strahlung aufzuzeichnen. Dabei sah man, dass circa 20% dieser Zellen in der Lungenstrombahn und im Zeitraum von einer halben Stunde auch in Leber und Milz verblieben. Durch die Belastung nahm die Anzahl peripherer, markierter Zellen zu und auch die Infusion von Katecholaminen löste denselben Effekt aus. Man schloss aus diesen Ergebnissen, dass die Mobilisierung der Leukozyten aus der Lungenstrombahn einerseits durch die Katecholamine und andererseits durch die erhöhten Scherkräfte im Rahmen verstärkter Herzarbeit zu erklären sei. Für weitere Erkenntnisse über die Wirkung von Katecholaminen unter Belastung wurde eine Studie mit einem Stufentest auf einem Fahrradergometer durchgeführt (Foster, Martyn et al. 1986). Um den Einfluss der Katecholamine zu sehen, musste jeder Proband den Stufentest einmal mit und einmal ohne den unselektiven Betarezeptorenblocker Propranolol durchführen. Es konnten im Vergleich zum Kontrolldurchlauf im Propranolol-Durchlauf geringfügig kleinere Herz-Auswurfleistungen verzeichnet werden. Bei den Leukozyten ergab sich kein signifikanter Unterschied, aber wenn man Lymphozyten und Neutrophile separat analysiert, wird ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Durchläufen in den beiden höchsten Stufen deutlich. Die Lymphozyten unter Betablockade sind weniger, die Neutrophilen etwas mehr in der Blutbahn vorhanden. Zur Klärung der Rolle der Milz für die Leukozytose unter Belastung führten Baum und Kollegen (Baum, Geitner et al. 1996) einen Fahrradergometertest mit Splenektomierten Probanden und einer Kontrollgruppe durch. Der Milz kommt eine Speicherfunktion für Leukozyten zu, sodass man davon ausgehen könnte, dass unter Belastung viele der dort ruhenden Zellen in den Kreislauf gespült werden. Grundsätzlich hatten die Splenektomierten höhere Ruhe-Leukozytenwerte, aber unter Belastung hatten Kontrollgruppe und Ektomiepatienten keine unterschiedlichen Leukozytenkinetiken. Somit konnte die Milz als für die Belastungsleukozytose wichtiges Organ ausgeschlossen werden.

### 2.4.3. Lymphozyten unter Belastung

Bisher wurden die Lymphozyten nur als Ganzes betrachtet. Aber nicht nur ihre absolute Zahl verändert sich, sondern auch die Relationen unter den einzelnen Subgruppen verschieben sich unter Belastung. Im Rahmen eines zwei Stunden andauernden Laufbandtests bei 65% der VO<sub>2</sub>max konnte beobachtet werden (Shek, Sabiston et al. 1995), dass sich das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten zu Gunsten der CD8<sup>+</sup> Zellen verschiebt. Die CD4<sup>+</sup>-Zellen sind die T-Helferzellen und die CD8<sup>+</sup> die zytotoxischen oder Suppressorzellen. Obwohl beide Zellpopulationen während der Belastung ansteigen, verändert sich das Verhältnis, da sie es unterschiedlich stark tun. In der Erholungsphase von zwei Stunden war eine Depression der Lymphozyten, aber eine Rekonstitution der CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup>-Ratio zu Gunsten der CD4<sup>+</sup>-Zellen zu vermerken. Neben den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen nahmen auch die Natural-Killer- Zellen zu (NK-Zellen), aber die Antikörper-produzierenden B-Zellen veränderten sich nicht signifikant, obwohl sie dem Trend nach leicht anstiegen. Die Immunglobulinproduktion ging unter Belastung zurück und auch *ex vivo* Stimulation erbrachte erniedrigte Antikörperproduktion. Man schreibt diese Beobachtung der veränderten CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Ratio zu, da CD4<sup>+</sup> Zellen für die B-Zellen wichtige Proliferationssignale senden. Dass nicht nur unter kurzfristiger Belastung solche Veränderungen auftreten, zeigten Laperrier und Kollegen (LaPerriere, Antoni et al. 1994). Sie unterzogen gesunde, junge Männer einem zehnwöchigen aeroben Trainingsprogramm und untersuchten vorher und nachher die Immunzellen. Sie fanden heraus, dass das Trainingsprogramm einen Anstieg sowohl der CD4<sup>+</sup> als auch der CD8<sup>+</sup>-Zellen nach sich zog. Zudem stiegen die CD20<sup>+</sup>-Zellen (B-Zellen) an. Die Ratio veränderte sich nicht signifikant. Man schreibt diesen Zellzahlveränderungen eine positive Wirkung auf die Immunität des Probanden zu, da sowohl die unspezifische Abwehr über die CD8<sup>+</sup> Zellen als auch die spezifische Abwehr durch die CD4<sup>+</sup> und CD20<sup>+</sup> Zellen eine Verstärkung erfährt. Dass es sich nicht ganz so einfach darstellen lässt, gibt die Studie von Gleeson (Gleeson, Bishop et al. 2011) zu bedenken. Darin wurde das Auftreten von banalen akuten Respirationstrakts Infektionen (ARI) in Beziehung zum wöchentlichen Trainingsaufwand gesetzt. Es fiel auf, dass die Gruppen mit der hohen und mittleren Trainingsbelastung auch die meisten ARIs bekamen. Die Stimulation des Probandenblutes mit LPS ergab eine gesteigerte Interleukin-10 (IL-10) Antwort der hohen und mittleren Gruppen gegenüber der niedrigen und auch IL-2, IL-4 und Interferon gamma wurden in der hohen Gruppe

mehr ausgeschüttet als in der niedrigen. Alle genannten Zytokine haben immunodepressive Funktion, was somit auch einen Schluss auf die erhöhte Infektionsrate zulässt. Im Kontext mit der vorigen Studie lässt sich folgern, dass moderates Training zwar das Immunsystem positiv, zu hohes Training es aber negativ beeinflusst. Aber anscheinend steigt durch Training nicht nur das Niveau der anti-inflammatorischen Zytokine, sondern sinkt parallel das Level der pro-inflammatorischen IL-6 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF alpha) (Ambarish, Chandrashekara et al. 2012). In der Studie mussten Probanden eine moderate und eine anstrengende Belastung absolvieren, um die Immunreaktion zum Ausgangszeitpunkt zu messen; anschließend wurden sie einen Monat lang trainiert und führten die beiden Tests erneut durch. Zu beiden Zeitpunkten stiegen IL-6 und TNF alpha in Abhängigkeit der Belastungsintensität an, nach dem einen Monat Training aber waren ihre Plasmalevel in Ruhe tendenziell niedriger, unter Belastung unterschieden sie sich nicht. Somit hat man auch hier einen Hinweis auf die immunodepressive Wirkung von konsequenter körperlicher Belastung. Was gleichzeitig aber deutlich wird, ist das akute Anfluten von pro-inflammatorischen Zytokinen in der unmittelbaren Belastungssituation.

#### **2.4.4. Zytokine in der Belastungsimmunologie**

Von den langfristigen Immunprofiländerungen zurück zu den Veränderungen bei intensiver, akuter Belastung führt uns die Studie von Neubauer (Neubauer, König et al. 2008): Die Probanden absolvierten einen Ironman Triathlon und wurden in der Folge auf ihre Zytokinspiegel untersucht. Bei dem bereits vorgestellten IL-10 fiel ein Anstieg unter Belastung auf, der bis fünf Tage nach dem Wettkampf noch messbar war. Ein weiteres Zytokin, was im Rahmen von Studien zur akuten Immunreaktion des Körpers oft untersucht wird, ist das IL-6. Die Funktion von IL-6 ist eine pro-inflammatorische, es löst Fieber und die Aktivierung des Akute-Phase-Systems aus. In den Triathleten wurde ein starker Anstieg von IL-6 gemessen, der bis einen Tag nach dem Rennen anhielt. Weitere pro-inflammatorische Zytokine, die unter Belastung ansteigen, sind Tumornekrosefaktor alpha (TNF alpha) und das Komplementfragment C5 in seiner Aktivierten Form C5a. Dies konnte im Rahmen eines Marathons (Camus, Poortmans et al. 1997), bei einem 20 minütigen Fahrradergometertest bei 80% VO<sub>2</sub>max (Camus, Duchateau et al. 1994) oder bei einem einstündigen Laufbandtest mit 65% VO<sub>2</sub>max mit anschließender Ausbelastung (Scott, Sale et al. 2013) nachgewiesen werden. Bei letzterer Studie wurde zudem das

pro-inflammatorische Zytokin IL-1beta als unter Belastung ansteigend postuliert. Auf der anti-inflammatorischen Seite hingegen gab es einen Anstieg des IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1Ra), einem Protein, das den Rezeptor von IL-1 blockt und somit seine Wirkung verhindert. Die beiden Antagonisten verhielten sich in ihren Kinetiken unterschiedlich: IL-1beta zeigte nur einen Anstieg direkt unter Belastung, IL-1Ra blieb, genauso wie IL-6, bis einen Tag nach Belastung erhöht. Zudem blieb TNF alpha bis zwei Stunden nach Belastung im Plasma erhöht nachweisbar. Im Vergleich von gut trainierten Athleten und einer untrainierten Referenzgruppe während eines Radergometer Stufentests zeigten sich in beiden Gruppen Anstiege von IL-1beta und Histamin, wobei die Athleten wesentlich höhere Level dieser beiden Proteine besaßen. (Vielleicht lässt sich mit den gesteigerten Histaminleveln auch die Anfälligkeit für Asthma bei Ausdauersportlern erklären.) Ein ähnliches Niveau besaß das Interleukin 8, das in beiden Gruppen einen deutlichen Anstieg mit gleichem Endwert aufwies (Mucci, Durand et al. 2000). Auch das IL-8 ist in der pro-inflammatorischen Kaskade von Bedeutung, indem es beispielsweise in der Lage ist, neutrophile Granulozyten zu aktivieren. Um die Zytokinantwort der Immunzellen noch genauer zu untersuchen, bieten sich Stimulationsversuche an. Zusätzlich zu den Messungen der Zytokine im Plasma nach Belastung, die in einer Studie an Triathleten nach einem Sprinttriathlon höhere IL-6 Level gefunden hatte, wurde das an den Abnahmezeitpunkten gewonnenen Blut mit LPS stimuliert und die Zytokine im Überstand gemessen. Man fand in den direkt nach der Belastung entnommenen Zellen gegenüber den Ruhewerten erniedrigte Zytokinantworten in Bezug auf INF gamma, IL-1beta und TNF alpha, allerdings nicht bei IL-6 (Weinstock, König et al. 1997). Ähnliches geht aus der bereits weiter oben zitierten Studie von Degerström hervor (Degerstrom and Osterud 2006). Das Studiendesign mit zwei aufeinanderfolgenden Radergometer Belastungen erbrachte auf LPS-Stimulation von Vollblut direkt nach Belastung eine stärkere Zytokinantwort für IL-6 und IL-8. Die IL-6 Sekretion ging in der Ruhephase wieder auf Baseline Niveau zurück, IL-8 jedoch nicht ganz. Nach der zweiten Belastung unterschieden sich die Reaktionen dahingehend, dass diesmal die IL-6 Antwort gegenüber der ersten Belastung abnahm, die IL-8 Sekretion aber das Ausmaß der ersten Belastung noch überschritt. Das Säulendiagramm der IL-8 Sekretion ist fast deckungsgleich zu dem Diagramm der Neutrophilenzahlen. Daraus mag man schließen können, dass es unter Belastung eine

erhöhte Sekretionsbereitschaft und auch „Kampfbereitschaft“ der Neutrophilen geben kann.

#### **2.4.5. Neutrophile Aktivität durch Belastung**

Dass es bei Belastung zu einer Aktivierung der Neutrophilen kommt, legt die Studie von Reihmane nahe (Reihmane, Jurka et al. 2012). Darin wurde in einem Fahrradstufentest die Myeloperoxidase als Aktivierungsmarker der Granulozyten und die IL-6 und TNF alpha Spiegel bestimmt. IL-6 und MPO stiegen während des Fahrens an und es konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Veränderungen von IL-6 und MPO berechnet werden. Ebenfalls korrelierbar war die Veränderung von IL-6 vor und nach dem Ironman zu MPO davor und einen Tag danach (Neubauer, König et al. 2008). Zusätzlich zu dem Anstieg der plasmatisch vorliegenden Myeloperoxidase fand man bei den Triathleten gesteigerte Level von neutrophilen-spezifischer Elastase. Außerdem waren die Enzyme im Plasma der Athleten einen Tag nach dem Rennen noch erhöht und erreichten ihr Ausgangsniveau erst fünf Tage nach dem Wettkampf. Ein Anstieg der Myeloperoxidase ist auch nach kürzerer Belastung vorhanden, wie zum Beispiel einem Marathon (Camus, Poortmans et al. 1997) oder aber nur zwanzig Minuten Fahrradergometer bei 80%  $VO_2max$ . Dieses führt parallel zur Leukozytose zu einem Anstieg während und einem Abfall zwanzig Minuten nach Ende der Belastung. Obwohl die Verläufe gleichsinnig zu den Leukozyten sind, ließ sich keine signifikante Korrelation berechnen (Camus, Duchateau et al. 1994). Bei einer Belastung von 55%  $VO_2max$  für zwei Stunden findet sich ebenfalls ein Anstieg von Neutrophilen im Plasma und ihres Enzyms Elastase, der noch einige Zeit auf ähnlichem Niveau persistiert. Wenn man aber den Elastase-*release* pro Granulozyt berechnet, nimmt dieser pro Zelle im Verlauf der Erholungszeit von 9h ab. Der *oxidative burst* durch Stimulation der Zellen verhält sich genauso, dass zwar die Gesamt-Kapazität durch die Belastung gesteigert wurde, aber insgesamt die einzelne Zelle eine geringere ROS-Generationsfähigkeit besitzt. Diese Ergebnisse werden durch das parallel Ansteigende Stresshormon Cortisol erklärt, dass als Effekt unter anderem Immunsuppression hat (Li and Cheng 2007). Die MPO abhängige ROS-Produktion nahm unter Belastung zu, nicht nur an mit PMA stimulierten Zellen, sondern auch native Zellen zeigten erhöhte spontane MPO-abhängige ROS-Bildung. Für ihre Aktivierung muss das Enzym aus den Granula entlassen werden (Yamada, Suzuki et al. 2000), was auch dem Mechanismus der oben beschriebenen NETose entspricht. Konsistent mit den Ergebnissen von Li sind die

Ergebnisse von Morozov (Morozov, Pryatkin et al. 2003), der eine erniedrigte *oxidative burst*-Kapazität in der Phase der Erholung fand. Bisher wurde noch keine Studie genannt, die unterschiedliche Belastungsintensitäten mit den gemessenen MPO-Leveln in Verbindung brachte. Darauf zielte die Studie von Bury und Kollegen ab (Bury and Pirnay 1995). Drei Tests wurden mit folgenden Intensitäten durchgeführt: 4h 45%, 3h 60% und 2h 75% VO<sub>2</sub>max. Zur Mitte des Test war eine Staffelung von intensiv nach weniger intensiv beobachtbar, jedoch am Ende war die Zeit die entscheidende Größe für die MPO-Menge im Plasma. Aus diesen Ergebnissen wird eine Tendenz sichtbar, dass die Aktivierung der Neutrophilen abhängig von der Intensität sein könnte, allerdings sind die Auswertungszeitpunkte unglücklich gewählt, da die Mitte der vier Stunden das Ende der zwei Stunden Belastung bedeutet und zum Ende der zwei Stunden der höheren Belastung tatsächlich höhere Werte als nach zwei Stunden leichtem Fahren auffindbar sind. Gleichmaßen sind die Unterschiede der MPO und Elastase zu bewerten, die in Läufern beobachtet wurden (Camus, Pincemail et al. 1992). Zunächst gingen sie bergauf, um schließlich bergab zu rennen. Beide Formen der Belastung hatten einen ähnlichen Effekt auf die Neutrophilenzahlen, aber die mutmaßlich anstrengendere Form, der Bergablauf, führte zu höheren Anstiegen der MPO und Elastase, die während der Erholung längere Zeit erhöht blieb. Daraus lässt sich eine belastungsabhängige Aktivierung der Granulozyten ableiten.

Aus den *in vivo* Versuchen zu den NETs kann man schließen, dass die Neutrophilen durch die während der Belastung anflutenden Zytokine aktiviert werden, es wurden aber auch bakterielle Lipopolysaccharide als Aktivatoren benutzt. Ein Anstieg dieser bakteriellen Bestandteile findet sich im Blut von belasteten Sportlern und auch ein Abfall der Anti-LPS-Antikörper ist zu finden (Bosenberg, Brock-Utne et al. 1988). Die Spiegel der Prä-Wettkampfwerte von Antikörpern und LPS korrelierten mit der Trainingsintensität so, dass man erhöhte Spiegel in stärker trainierenden Sportlern fand. Als Herkunft für LPS wird die bakterielle Darmflora über eine stressinduzierte Leckage der Darmepithelien diskutiert. Es fanden sich aber keinerlei Korrelationen zwischen den Veränderungen von LPS und den dagegen gerichteten Immunglobulinen mit anderen Immunmarkern wie TNF alpha oder MPO (Camus, Nys et al. 1998; Camus, Nys et al. 1998). Da es in einer anderen Studie auch keine Korrelationen zwischen Entzündungsmarkern und Endotoxin gab, wurde die Rolle dieser Stoffe in der belastungsinduzierten Entzündungsreaktion als nicht wesentlich

eingestuft (Camus, Poortmans et al. 1997). Dass LPS aber dennoch eine Rolle in der Reaktion des Körpers während des Sports hat, zeigt folgende Studie (Brock-Utne, Gaffin et al. 1988): Darin war ein 89,4km langer Ultra-Marathon zu absolvieren. 80% der Athleten waren endotoxämisch und diejenigen, die unter acht Stunden benötigten, hatten signifikant niedrigere Endotoxinlevel. Zusätzlich zeigten 80% der über acht Stunden laufenden Symptome wie Übelkeit und Erbrechen, aber nur knapp 20% der unter-acht-Stunden-Läufer. Bei einem Halbmarathon einige Wochen später hatte keiner der Läufer Endotoxin im Blut und zeigte auch keine Symptome.

Man kann also resümieren, dass Belastung unterschiedlicher Art und Dauer mit einer jeweils modifizierten Immunantwort einhergeht. Dabei sind die entscheidenden Parameter die Zellzahlen der einzelnen leukozytären Untergruppen und die freigesetzten Zytokine mit ihrer jeweiligen pro- und anti-inflammatorischen Funktion.

## **2.5. Zusammenfassung der Literatur und Fragestellung**

Wie nun anhand der vorangehend dargelegten Literatur gezeigt werden konnte, ist die sportliche Belastung mit zahlreichen immunologischen Veränderungen verknüpft. Nicht nur die einzelnen Zytokine wie Interleukin 6, 8 oder 10 finden sich vermehrt im Blut, sondern auch die Zellen ändern ihren Aktivitätszustand, indem sie wie die neutrophilen Granulozyten degranulieren und ihre Abwehrfunktion im Plasma zum Tragen kommen lassen. Parallel zu dieser immunologischen Modifikation des Organismus ist ein Anstieg der Plasma-DNA beschrieben worden, für den aber noch kein Freisetzungsmechanismus geschweige denn freisetzender Zelltyp gefunden werden konnte. Ähnliche Plasmaanstiege von zellfreier DNA wie beim Sport findet man in unterschiedlichen Pathologien und auch die systemische Entzündung gehört dazu. In Bezug auf dieses Phänomen ergeben sich Parallelen. Man weiß, dass die DNA in einem entzündlichen Prozess in Form von *Neutrophil Extracellular Traps* aktiv von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird. An dieser DNA gebunden finden sich die sonst granulär vorkommenden Enzyme neutrophilenspezifische Elastase und Myeloperoxidase. Diese beiden Enzyme steigen als indirekte Aktivitätsmarker für diese Granulozytenart ebenfalls an. Aus diesem Sachverhalt ergeben sich folgende Fragen für die vorliegende Arbeit: Lässt sich ein Verhältnis von DNA zu Leukozyten oder gar neutrophilen Granulozyten errechnen? Kann man für die DNA-Anstiege eine Verhältnismäßigkeit zu den granulozytären Enzymen unter Belastung finden? Und



könnte dann im letzten Schluss die DNA unter Belastung auch ein Resultat der NETose sein?

Des Weiteren ist es so, dass seit dem ersten Paper zur DNA unter Belastung zwar nunmehr fast zehn Jahre vergangen sind, aber nur wenige Paper zu diesem Thema existieren. In den Papers wird vor allem der Anstieg der Plasma-DNA zusammen mit anderen im Blut messbaren Parametern betrachtet, aber in keinem Paper findet man eine Aussage über die Verknüpfung der DNA mit den Parametern der sportlichen Belastung. Wie von Beiter (Beiter, Fragasso et al. 2011) vorgeschlagen, soll an einem Ergometrie-Modell mit Amateur-Radsportlern neben der immunologischen Fragestellung untersucht werden, ob es Verknüpfungen zwischen der Belastungsphysiologie und der zellfreien DNA im Plasma gibt.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Probandenkollektiv

##### 3.1.1. Rekrutierungsmethode, Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie wurden insgesamt elf männliche Probanden eingeschlossen, die in der Ambulanz der Abteilung für Sportmedizin des Instituts für Sportwissenschaften der Johannes Gutenberg Universität zu Mainz eine Leistungsdiagnostik im Rahmen einer Spiroergometrie erhalten sollten. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz angenommen. Die Probanden wurden auf die Möglichkeit der Teilnahme hingewiesen und schriftlich wie auch mündlich aufgeklärt. Die eingeschlossenen Radsportler waren  $23 \pm 2,65$  Jahre (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) alt. Sie hatten einen durchschnittlichen BMI von  $22,6 \pm 1,51$  kg/m<sup>2</sup> bei einem Gewicht von  $75,75 \text{ kg} \pm 5,19$  kg und einem Körperfettanteil von  $11,09 \pm 2,86\%$ .

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximum	Minimum
<b>Body-Mass-Index</b>	22,55	1,51	25,00	20,00
<b>Gewicht</b>	75,75	5,19	84,90	68,30
<b>VO<sub>2</sub>max</b>	63,53	8,41	78,50	54,10
<b>Leistung aerobe Schwelle</b>	2,84	,47	3,70	1,90
<b>Leistung maximal</b>	4,94	,48	6,10	4,30
<b>FEV1</b>	4,92	,84	6,12	3,24
<b>Ventilation maximale Last</b>	176,80	22,02	203,00	135,00
<b>Herzfrequenz in Ruhe</b>	83,09	9,84	109,00	72,00
<b>maximale Herzfrequenz</b>	194,55	8,45	207,00	183,00

**Tabelle 1: Probandenkollektiv mit deskriptiven Statistiken. Body-Mass-Index in kg/m<sup>2</sup>; Gewicht in kg; VO<sub>2</sub>max in ml O<sub>2</sub>/min und kg Körpergewicht; Leistung in W/kg Körpergewicht; FEV1 in l; Ventilation in l/min und Herzfrequenz in Schlägen pro Minute**

Als formales Einschlusskriterium wurde zunächst eine Rennlizenz des Bund Deutscher Radfahrer (BDR) vorausgesetzt. Mit dem Lösen dieser Lizenz unterwirft sich der Sportler „den aktuellen Reglements von IOC, UCI, DOSB, BDR; dem aktuellen WADA- und NADA-Code und akzeptiert die darin vorgesehenen Dopingkontrollen, Bluttests und deren Standards“ (Originalaufschrift der Lizenzkarte des BDR). Diese Lizenz berechtigt somit zu der Teilnahme an offiziellen Rennen des BDR sowie

internationalen Rennen. Alle Teilnehmer waren in der Saison 2011 am Renngeschehen beteiligt. Vornehmlich bestand das Rennprogramm aus kurzen, intensiven Kriterien, die auf ein bis zwei Kilometer langen Runden mit einer Gesamtdistanz zwischen 60 und 70 Kilometern ausgetragen werden. Mit Einführung dieser Voraussetzung der Wettkampfteilnahme sollte eine relative Einheit in der Leistungsfähigkeit auf dem Radergometer sichergestellt werden. Des Weiteren mussten die Patienten zwischen 20 und 30 Jahren alt sein. Um anderweitige Beeinflussung der Testergebnisse zu vermeiden, wurde den Patienten gesagt, dass sie ab 48 Stunden vor Testbeginn keinen Alkohol sowie kein Koffein zu sich nehmen dürften. Zudem wurde jegliche Art von Dauermedikation als Ausschlusskriterium gewertet. Um Interferenzen mit der circadianen Rhythmik auszuschließen, wurden die Tests zwischen neun und elf Uhr morgens durchgeführt.

Als weiteres Ausschlusskriterium galt zudem eine Bienengiftallergie, die anamnestisch erfragt wurde, da die hyperämisierende Finalgon-Salbe Stoffe des Bienengiftes enthält. Außerdem führten pathologische Lungenfunktions- und/oder EKG-Alterationen, die einer Belastung im Rahmen einer Ergometrie widersprechen zum Studienausschluss.

### **3.1.2. Abbruchkriterien**

Für den Abbruch des Tests wurden subjektive und objektive Abbruchkriterien formuliert. Bei den subjektiven wurden Angina Pectoris, Dyspnoe, muskuläre Ermüdung, Erschöpfung, Schwindel, starke Kopfschmerzen, Synkope oder andere durch den Probanden angegebene Beschwerden als Abbruchkriterium gewertet.

Als objektive Kriterien zählten Einschränkungen der kardiovaskulären Funktions- und Leistungsfähigkeit, die mit EKG und Blutdruckmessung überwacht wurden. Konkret waren dies ST-Streckenveränderungen, maligne Herzrhythmusstörungen, atypisches Blutdruckverhalten mit Überschreitung des systolischen Blutdrucks über 250 oder des diastolischen Blutdrucks von 120, zudem Blässe oder unkoordinierte Bewegungen des Probanden

### **3.2. Materialien und Geräte**

<b>Gerät/ Material</b>	<b>Hersteller</b>
Ergoselect 200 Fahrradergometer	Ergoline GmbH, Bitz

Ambistick Spirometrie	Geratherm Respiratory GmbH, Bad Kissingen
Blue Cherry Spirometrie Software	Geratherm Respiratory GmbH, Bad Kissingen
Spiro pro+ Pocketspirometer	Jaeger, Höchberg
InBody 3.0 Body composition analyzer	Biospace, Seoul, Südkorea
Monovetten und Venenpunktionsset „Butterfly“	Sarstedt AG und Co, Sarstedt
QIAvac 24 Vacuumpumpe	QIAGEN, Hilden
Heizthermomixer MHR 13	HLC, Bovenden
iMark Microplate Reader	Biorad, München
Microplate Manager 6 Software	Biorad, München
iCycler MyIQ5 Detection System	Biorad, München
Galaxy 170 S Brutschrank, New Brunswick	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5424 R und 5810 R	Eppendorf, Hamburg
10, 100, 1000 µl Pipetten „Research Plus“	Eppendorf, Hamburg
„Multipette stream“	Eppendorf, Hamburg
„Easypet“ Stabpipette	Eppendorf, Hamburg
Stabpipette Cellstar 5, 10, 25, 50 ml	Greiner bio-one, Erlangen
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Erlangen
Falcon tube 15 ml	Greiner bio-one, Erlangen
Reagiergefäße 0,2; 0,5; 1,5ml	Greiner bio-one, Erlangen
PCR-plate Klebefolie „Ampiseal“	Greiner bio-one, Erlangen
qPCR tube plate, white	Peqlab, Erlangen
Excel 2010 für Mac	Microsoft, Bad Homburg vor der Höhe
SPSS 21	IBM, Ehningen

### 3.3. Chemikalien

Chemikalie	Bezugsfirma
PBS	Invitrogen, Darmstadt
UltraPure DNase/RNase free distilled water	Invitrogen, Darmstadt
Tego Puffer 2-fac	Bioline, Luckenwalde
Velocity Polymerase	Bioline, Luckenwalde
MgCl <sub>2</sub> 25mM	Bioline, Luckenwalde
HotStar Taq Plus Polymerase	QIAGEN, Hilden
HotStar Taq PCR-Puffer	QIAGEN, Hilden
QIAmp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
dNTPs	Roth, Karlsruhe
SYBR Green	Sigma, Hamburg
FITC 0.1 µM 10-fach	Sigma, Hamburg
MPO ELISA kit	USCN Life Sciences

### 3.4. Testaufbau

#### 3.4.1. Spiroergometrie

Für die Tests wurde das Fahrradergometer der Ambulanz der Abteilung für Sportmedizin eingesetzt, das mit einem Computer verbunden war, der das Ergometer steuert: Dieser Computer regelt die eingestellte Last, gegen die der Proband arbeiten muss, zudem laufen über diesen PC Blutdruckmessung, 12-Kanal-EKG-Ableitung und die spirometrische Überwachung des Probanden.

Die Spirometrie arbeitet mit einem offenen System, bei dem über eine Atemmaske mit Flow-Meter das inspiratorische sowie das expiratorische Gasgemisch analysiert wird. Die Messgrößen  $VO_2$ ,  $VCO_2$ , Atemzugvolumen, Atemminutenvolumen und Respiratorischer Quotient (RQ) werden mittels *breath-by-breath*-Modus ermittelt, um die kleinstmögliche zeitliche Auflösung dieser Parameter zu erhalten.

Nach einer sportmedizinischen Untersuchung mit Ruhe-EKG, Lungenfunktionsuntersuchung und Körperzusammensetzunganalyse mittels Bioimpedanzanalyse wurden die Probanden auf dem Radergometer dahingehend vorbereitet, dass ihnen das Ohrläppchen mit hyperämischer Finalgon-Salbe eingerieben wurde. Dies dient dazu, dass die Laktatabnahme mittels Stechlanzette und heparinierter Kapillare unter Belastung etwas leichter von statten gehen kann. Die Geometrie des Rades wurde durch Sattel- und Lenkerposition nach Wunsch des Sportlers eingestellt und die EKG-Saugelektroden nach Eindhoven und Wilson angelegt. Anschließend wurde die Spirometriemaske angepasst und mit der Messeinheit verbunden. Nach Äquilibration der Atemgase wurde der Test mit einer einminütigen Aufwärmphase begonnen, in der der Proband zunächst ohne Widerstand pedalierte. Nach dieser ersten Minute wurde der Test mit 50 Watt Eingangsbelastung gestartet. Das Testprotokoll beinhaltete 3 Minuten andauernde Stufen mit 50 Watt Steigerung zur vorherigen, die automatisch durch den Computer eingestellt wurden. Nach jeder Stufe wurde aus dem Ohrläppchen eine Probe Kapillarblut. Auf Zeichen des Sportlers wurde der Test bei völliger Ausbelastung abgebrochen und in eine 6 Minuten lange Ausrollphase übergegangen, in der das Ergometer auf eine Last von 50 Watt eingestellt wurde. Nach dieser Zeit durfte sich der Sportler vom Rad begeben.

#### **3.4.2. Probengewinnung**

Dem Sportler wurden direkt nach Ankunft in der Ambulanz der Abteilung für Sportmedizin nach Erklärung des Einverständnisses zur Teilnahme an der Studie insgesamt zwei 7,5ml EDTA-Röhrchen für die Gewinnung von Plasma und ein 2,7ml EDTA-Röhrchen für die Bestimmung eines Differentialblutbildes mittels standard Venenpunktionstechnik aus einer Armvene entnommen, sodass der Blutverlust insgesamt ca. 17ml bei dieser (Zeitpunkt 1 =T1) und jeder folgenden Entnahme im Verlauf betrug. Die weiteren Entnahmen fanden direkt nach Beendigung des Tests noch auf dem Radergometer sitzend während der Ausrollphase (T2) und neunzig Minuten nach Ende der Belastung statt (T3).

Die Proben für das Differentialblutbild wurden bei 4°C bis zur Abholung durch den Fahrer des Amedes Labors Raunheim gelagert. Für die Weiterverarbeitung des Vollbluts zu Plasma wurden die Entnahmeröhrchen unmittelbar in das nur wenige Schritte entfernte Abteilungslabor gebracht. Dort wurden die Röhrchen eröffnet und das Vollblut der zwei Abnahmebehälter mittels Stabpipette in je ein 15 ml Falcon

Tube überführt. Diese Tubes wurden bei 1600 rcf für 10 min zentrifugiert, anschließend aus der Zentrifuge genommen und nun das Plasma ebenfalls mit Stabpipette von der Zellphase abgenommen und in einem neuen 15 ml Falcon Tube zusammengeführt. Dieses Tube wurde nun bei 16000 rcf für 5 min zentrifugiert, um restliche durch das Abnehmen noch im Plasma befindlichen Zellen und sonstigen Detritus zu beseitigen (Beiter, Fragasso et al. 2011). Nach diesem Schritt wurde das Plasma mit einer Multipette der Firma Eppendorf in 200µl Aliquots aufgeteilt und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### **3.5. Datenauswertung der Spiroergometrie**

Während des Tests speichert die Software der Spiroergometrie alle dreißig Sekunden die aktuellen Werte des Probanden und nach Abschluss des Tests gibt der Computer eine sogenannte Wasserman 9-Felder-Grafik aus, in der der Verlauf der wesentlichen Parameter wie Herzfrequenz, CO<sub>2</sub>-Abgabe und O<sub>2</sub>-Aufnahme, der daraus berechnete Respiratorische Quotient (RQ), die Ventilation und die Wattstufen graphisch dargestellt sind. Zudem fasst er die Ruhe-, Schwellen und Maximalwerte in einer Tabelle zusammen. Der RQ lässt Rückschlüsse darüber zu, welchen Hauptenergieträger der Sportler gerade verbrennt. Bei vornehmlich fettgestützter Energiebereitstellung ist er <1, bei zunehmend anaerobem, kohlenhydratabhängigen Stoffwechsel steigt er über 1. Die höchsten Werte nimmt er kurz nach Belastungsabbruch an, wenn der Sportler versucht seine Sauerstoffschuld ventilatorisch zu kompensieren.

#### **3.5.1. Bestimmung der aerob-anaeroben Schwelle**

Während der Ergometrie werden, wie bereits beschrieben, die Atemgase ständig analysiert und zudem aus dem Ohrläppchen des Probanden Kapillarblut gewonnen. Die metabolische Schwelle wird dabei durch das Programm WinLactat anhand der Laktatkurve des Belastungsintervalls gewählt, während die respiratorische graphisch aus obigen Wassermann-Darstellungen ermittelt wird.

### **3.6. Differentialblutbild**

Die Bestimmung des Differentialblutbildes wurde, genauso wie die weiter unten beschriebene Messung der neutrophilenspezifischen Elastase, aus Praktikabilitätsgründen im Labor Raunheim der Amedes Labor-Gruppe durchgeführt. Diese Bestimmung erfolgt dort aus EDTA-Blut mittels eines vollautomatischen Sysmex XE-5000 Durchflusszytometers. Die Erythrozyten und Thrombozyten werden

darin über Impedanzmessung, die Leukozyten und Lymphozyten über lasergesteuerte Größen- und Strukturunterschiede gemessen.

### **3.7. DNA-Messung**

#### **3.7.1. DNA-Isolation aus Blutplasma**

Zum Teil musste die DNA zunächst aus dem Blutplasma aufgereinigt werden. Dazu wurde das QIAmp DNA Blood Mini Kit verwendet, das mittels speziell beschichteter Säulen die DNA aus dem dazugegebenen Plasma festhält und später mittels Spülpuffer wieder in Lösung bringt.

Die Aufreinigung geschah nach dem vorgegebenen Protokoll für Plasma mittels Vakuumpumpe. Dafür wurden 400µl Plasmaaufgetaut und unter Zugabe von 40µl Proteinase K und 400µl Buffer AL bei 56°C für 30 min auf dem Thermoblock inkubiert und anschließend mit 400µl hundertprozentigem Ethanol versetzt. Diese Lösung wurde nach kurzem Abkühlen auf die vorbereiteten Auftrennungssäulen gegeben, die mit dem QIAGEN QIAvac 24 verbunden waren, um die Flüssigkeit durch die Säule zu saugen. Die Vacuumextraktion ist eine komfortablere und schnellere Alternative zum Abzentrifugieren der Säulen, da man sich jeweils das Herausnehmen und umsetzen der Säulen spart und stattdessen nur die nächste Lösung auf die Säule geben muss. Anschließend wurden die Säulen mit 750µl Buffer AW 1 und nach erneutem Absaugen 750µl Buffer AW 2 gewaschen. Nach einem einminütigen Trockenzentrifugieren bei 1000g wurde die auf der Säule befindliche DNA mit 100µl Buffer AE für 1 min inkubiert. Durch das Verhältnis von 400µl Plasma zu 100µl Elutionspuffer wurde eine vierfache Aufkonzentrierung der DNA im Vergleich zum Plasma erreicht. Jede Säule wurde auf ein neues 1,5 ml Eppendorf Reagenzgefäß gesetzt und bei 6000g für 1 min abzentrifugiert. Das Eluat wurde sofort zur Aufbewahrung in den -20°C Gefrierschrank verbracht.

Aufgrund der großen Probenzahl, die die Anzahl an Absaugstutzen der Vacuumanlage aber auch der Zentrifuge überschritt, wurde die Aufreinigung in zwei Durchgängen durchgeführt: Zunächst die sechs ersten Probanden mit ihren drei Abnahmezeitpunkten und anschließend die zweite Hälfte mit insgesamt 15 Proben.

#### **3.8. DNA-Quantifizierung mittels RT-PCR**

Die *real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR) ist ein Verfahren, das wie die herkömmliche PCR auf einer exponentiellen Vermehrung spezifischer DNA-



Sequenzen beruht. Bei der RT-PCR wird dem Reaktionsansatz ein Fluoreszenzfarbstoff zugefügt, der in jedem Vermehrungszyklus ein bestimmendes Signal emittiert. Übersteigt dieses Signal eine Schwelle (Threshold), wird es detektiert und anhand einer Standardgrade einem absoluten DNA-Wert zugeordnet.

Es kommen zwei verschiedene Primerpaare zum Einsatz, die in hochkonservierten, repetitiven DNA-Sequenzen binden, die über alle Chromosomen gleichmäßig verteilt sind. Mit dieser Primerwahl ist man in der Lage, auch Bruchteile von genomischer DNA zu quantifizieren, da man hier nicht wie bei *single locus primern* davon abhängig ist, dass genau dieses eine Stück Genom freigesetzt wird. Die eine Methode setzt aufgereinigtes Plasma ein und verwendet Primer für das LTR5 Element, die andere verdünntes Plasma und L1PA2-Primer. Für beide PCR-Setups gibt es ein Primerpaar, das ein unter hundert Basenpaare langes Fragment amplifiziert, und ein langes jenseits der zweihundert Basenpaare, um eventuelle Unterschiede in der DNA-Integrität feststellen zu können. Diese Integrität berechnet sich mittels des Quotienten aus Quantität des langen geteilt durch die Quantität des kurzen Fragments dar. Das bedeutet bei einer Integrität von 0,5 doppelt so viele kürzere Fragmente wie lange vorliegen.

### **3.8.1. Real-time PCR aus verdünntem Plasma**

Bei dieser PCR ist das repetitive Element das sogenannte L1PA2-Element, in dem die Primer binden. Es ist ein sogenanntes LINE-Element, was für *long interspersed nuclear element* steht und eine hochkonservierte, nichtkodierende DNA-Sequenz darstellt. Die Sequenz und später die Primer wurden mittels Software gefunden, wobei zunächst im UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) eine geeignete Sequenz gesucht und anschließend mit Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) die entsprechenden Primer nach Schmelzpunkt und Affinität definiert wurden. Die verwendeten Primer amplifizieren ein 90 und ein 222 Basenpaar langes Fragment, die beide circa 3300 Mal im menschlichen Genom binden. Für das kurze Amplikon lautet das Primerpaar *forward* 5'-TGCCGCAATAAACATACGTG-3' und *reverse* 5'-GACCCAGCCATCCCATTAC-3', für das lange ist der *forward* derselbe, der *reverse* lautet aber 5'-TGCCGCAATAAACATACGTG-3'. Als Standards wurde die L1PA2-Sequenz mittels eines E. Coli-Stamms amplifiziert und in einer entsprechenden Verdünnung zur Bestimmung der Standardreihe eingesetzt. Als externer Kalibrator wurde das verdünnte Plasma eines Institutsmitarbeiters verwendet, indem auf jeder Platte die

Detektionsschwelle auf einen definierten Wert dieser Probe gesetzt wurde. Da die Platte nur über 96 Wells verfügt, mussten auch hier die Probanden auf zwei Platten aufgeteilt werden.

Während der Vorbereitungen für den Versuch wurde die Arbeitsbank und alle im Versuch benutzten Geräte für 30 min UV-bestrahlt. Zunächst wurde das Plasma 1:40 in sterilem Wasser verdünnt, indem 117µl H<sub>2</sub>O und 3µl Plasma in einem Reagenzgefäß zusammengeführt wurden. Um Ungenauigkeiten in der Handhabung der Proben und später in der elektronischen Auswertung vorzubeugen, wurden alle Proben in Triplets gemessen. Für das PCR-Mastermix wurden pro Triplet 24µl TEGO-Puffer 2-fach, 0,7µl 10-faches SYBR Green, 0,5µl 0,1µM FiTC, 1µl Velocity Polymerase, 1µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 4µl 3,49µM Primer Mix aus forward und reverse primer eingesetzt und mit einem Triplet rechnerischem Sicherheitsabstand für die vorgesehene Anzahl Proben berechnet. Nun wird in jedes für die Proben vorgesehene Reagenzgefäß zu den 6,4µl verdünnten Plasmas noch 41,6µl Mastermix gegeben. Für die NTC wurden 6,4µl in sterilem Wasser gelöstes Mausplasma verwendet, damit die eventuell durch Plasmaproteine verursachte Beeinflussung der Messung auch in der NTC berücksichtigt wird. Somit hat man pro Triplet ein Gesamtvolumen von 48µl, was drei Mal 15µl für die Einzelmessung plus Pipettierverlust entspricht. Zum Abschluss wird die Platte mit einer PCR-Folie sorgfältig abgeklebt und 2 min bei 1500g in der großen Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wird im iCycler MyIQ5 die Plattenbelegung festgelegt und das Protokoll gewählt. Dieses besteht nach der initialen Heizphase aus einem Halt von zwei Minuten bei 98°C, gefolgt von 35 Zyklen mit Schmelzvorgang für zehn Sekunden bei 94°C, Anlagerung für dreißig Sekunden bei 64°C und Verlängerung für zehn Sekunden bei 79°C. Mit Abschluss des Laufs wurde die Kalibration durchgeführt und die Rohdaten exportiert und in Microsoft Excel 2011 anhand der etablierten Standardkurve die Detektionsschwellen in absolute DNA- Mengen umgerechnet.

### **3.8.2. Real-time PCR aus aufgereinigtem Plasma**

Das zweite Primerpaar zielt auf das LTR5-Element ab. Dieses ist ebenfalls eine hochkonservierte repetitive Sequenz und die verwendeten Primer binden circa 200 Mal im menschlichen Genom. Die Primer wurden nach derselben Art und Weise gefunden wie auch die L1PA2-Primer. Der *forward* Primer für das kurze Fragment von 70 Basenpaaren hat die Sequenz ACCGAGACATTCCATTGCC, während der *reverse* Primer GCCTCTTGAGTTGAGACAAG ist. Das längere über 323 Basenpaare gehende

Primerpaar besteht aus GGAGAGGGTCAGCAGACAAAC für *forward* und GACACCGTAAAGGGTCTGTG für *reverse*. Für die Kalibration der einzelnen Platten wird ein Paar des Standards auf die Platte gebracht, das einerseits  $10^5$  und andererseits  $10^2$  Kopien pro  $\mu\text{l}$  der LTR5-Sequenz entspricht. Über die Bindungsfrequenz des Primers im menschlichen Genom kann man berechnen, wievielen Kopien genomischer DNA dies entspricht und über einen Umrechnungsschritt kommt man auf die absolute Menge genomischer DNA in der Probe. Diese Berechnungen werden in einer vorher angelegten Exceltabelle durchgeführt. Die Kalibration erfolgt anhand des  $10^2$ -Kopien-Standards bei einem festgelegten Detektionsschwellenwert.

Für das Kit müssen pro Triplet 5  $\mu\text{l}$  PCR-Puffer, 1  $\mu\text{l}$  25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,25  $\mu\text{l}$  HotStar Taq Plus-Polymerase, 1  $\mu\text{l}$  10mM dNTPs, 0,7  $\mu\text{l}$  zehnfaches SYBR Green, 0,25  $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{M}$  FiTC und 16,9  $\mu\text{l}$  steriles Wasser in einem Reagiergefäß gemischt werden. Anschließend werden in einem neuen Gefäß 24  $\mu\text{l}$  Kit mit 8  $\mu\text{l}$  Primermix aus *forward* und *reverse* und 16  $\mu\text{l}$  Eluat aus oben beschriebener Aufreinigung beziehungsweise steriles Wasser für die NTC gemischt. Wieder werden 15  $\mu\text{l}$  in jedes Well pipettiert und nach Verschluss der Platte mit Folie die Zentrifugation für 2 Minuten bei 1500 rcf durchgeführt. Auch für diese PCR erfolgt der Lauf im iCycler MyIQ5. Das Protokoll besteht anfangs aus einem Halt von 5 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$ , gefolgt von 40 Zyklen mit Schmelzen für 15 Sekunden bei  $94^\circ\text{C}$ , Anlagerung für 30 Sekunden bei  $61^\circ\text{C}$  und Verlängerung für 30 Sekunden bei  $80^\circ\text{C}$ .

Die Aufreinigung und Messung dieser Methode wurden zum Teil durch Tobias Ehlert und Olga Moser durchgeführt.

### **3.9. Enzymmessungen**

#### **3.9.1. ELISA für Myeloperoxidase**

Zur Bestimmung der Plasmakonzentration der Myeloperoxidase wurde das Kit der Firma USCN Life Sciences verwendet. Das Prinzip des Sandwich ELISA beruht auf an der Oberfläche des Sets gebundenen, spezifischen Antikörpern, die das Plasmaprotein binden. Ein Sekundärantikörper bindet ebenfalls und wird später durch einen weiteren Antikörper, der ein Enzym für Farbreaktionen besitzt, detektiert. Durch Zugabe eines Farbstoffes kann man durch Messung von Absorption in die Quantität des Proteins bestimmen.

Alle in diesem Versuch benutzten Chemikalien sind im Kit enthalten und das Prozedere entspricht dem im Handbuch vorgegeben. Für die Messung werden die Plasmaproben zunächst aufgetaut und im Verhältnis 1:10 mit *ready to use* PBS verdünnt. Anschließend wird das mitgelieferte Referenzprotein in 1ml *standard diluent* gelöst und über weitere Verdünnungen eine Standardreihe erstellt. Die Standardreihe und eine *blank*-Probe aus PBS wird zusammen mit den verdünnten Plasmaproben in Duplikaten auf die ELISA-Platte pipettiert und die Platte dann bei 37°C im Brutschrank für 2 Stunden inkubiert. Alle nun folgenden Inkubationsschritte erfolgen ebenfalls unter Brutschrankbedingungen. Währenddessen werden die *detection reagents A* und *B* mit ihrem jeweiligen *assay diluent A* und *B* verdünnt und nach dreimaligem Waschen der Platten mit *washing solution* wird zunächst *detection reagent A* für eine Stunde und anschließend *detection reagent B* für 30 Minuten hinzugegeben. Um eine sichtbare Reaktion zu erhalten werden die Wells nun für 20 Minuten mit *substrate solution* und zum Schluss noch mit *stop solution* inkubiert. Die durch den letzten Schritt entstandene Färbung der Wells wird im Plate Reader gelesen und mit der Microplate Manager 6 Software ausgewertet. Dabei markiert man die Konzentrationsreihe als Standard und der Computer gibt dem Benutzer für die einzelnen Proben die absolute Menge an Protein anhand dieser Standardkurve aus.

### **3.9.2. PMN-Elastase**

Wie bereits erwähnt, führte diese Analyse das Amedes-Labor durch. Für die Quantifizierung der PMN-Elastase benutzt das Labor das ELISA-Kit der Firma Immun Diagnostik, Bensheim. Dieses Kit beruht auf demselben Prinzip wie das eben beschriebene Kit für die Myeloperoxidase. Auch hier wird das Plasma der Probanden zunächst 1:100 verdünnt. Unterschiede sind lediglich die Inkubationszeit und –temperatur, da hier nur eine Stunde und bei Raumtemperatur inkubiert wird.

### **3.10. Datenerfassung und statistische Auswertung**

Alle Daten wurden in Excel 2010 zusammengefasst und mittels SPSS 21 auf dem Terminalserver des Zentrums für Datenverarbeitung der Johannes Gutenberg Universität ausgewertet. Es wurden deskriptive Statistiken für alle Parameter erstellt. Die Varianztestung wurde mit dem einseitigen Wilcoxon-Test durchgeführt. Wegen der nicht bei allen Variablen gegebenen Normalverteilung wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman für die Parameter zu den Zeitpunkten und ihre jeweilige Veränderungen zwischen den Messzeitpunkten errechnet. Für die

Korrelationen wurde als kleinstes  $R \geq 0,500$  vorausgesetzt. Abschließend wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt und von den Korrelationen Streudiagramme entworfen. Wegen der Verwendung der Spearman-Korrelation wurde nach Rücksprache mit Frau Dr. Elsässer vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universität Mainz auf Ausgleichsgeraden in den Streudiagrammen verzichtet, da ihre Aussagekraft bei der betrachteten Probandenanzahl nicht groß genug sei. Zudem seien bei Korrelationen die p-Werte ohne Aussage in Bezug auf den numerischen Wert des Koeffizienten, weshalb diese in der Darstellung der Ergebnisse ebenfalls weggelassen wurden. SPSS stellt die Korrelationskoeffizienten in der Ausgabetable mit drei Dezimalstellen dar, welche aus Vereinfachungsgründen im Ergebnisteil auf zwei Stellen gerundet wurden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Deskriptive Statistiken und Wilcoxon-Test

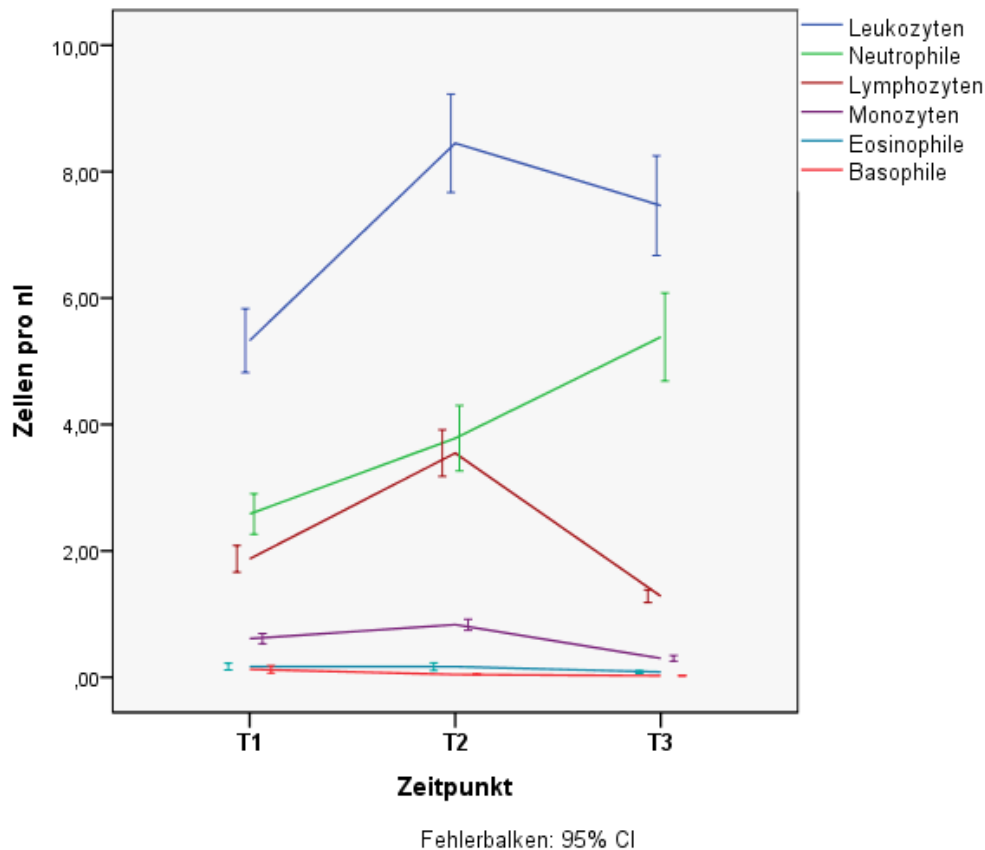
Im Folgenden werden die Ergebnisse der deskriptiven Statistik und des Wilcoxon-Tests dargelegt. Von allen Testungen sind Tabellen mit Informationen über Mittelwerte und Standardabweichung beziehungsweise die p-Werte im Anhang zu finden. Zudem befinden sich im Anhang die Abbildungen, auf die im Text verwiesen wird.

#### 4.1.1. Leistungsphysiologie

Bezüglich ihrer Leistung auf dem Radergometer wurde bei Abbruch der Belastung eine  $VO_2\text{max}$  von  $63,53 \text{ ml} \times \text{kg} \text{ KG}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  ermittelt und auf der Grundlage der Laktatmessung ergaben sich Leistungswerte an der individuellen metabolischen anaeroben Schwelle von  $3,21 \pm 0,51 \text{ W/kg KG}$  und einer maximalen Leistung von  $4,94 \pm 0,48 \text{ W/kg KG}$ . Dabei war die Leistung an der aeroben Schwelle geringfügig niedriger als an der metabolischen und beide Schwellenwerte waren kleiner als die maximale Leistung bei Belastungsabbruch (Abb.1). Die Sportler erreichten bei Belastungsende eine maximale Herzfrequenz von  $194,55 \pm 8,45$  Schlägen pro Minute, bei einer Steigerung um den Faktor 2,34 vom Ausgangswert von  $83,09 \pm 9,84$  Schlägen pro Minute. Das Einsekundenvolumen ( $FEV_1$ ) während der sportmedizinischen Untersuchung vor Belastung war mit  $4,92 \pm 0,84 \text{ l}$  bestimmt worden. Daraus ergaben sich für die maximale Ventilation theoretische Werte von  $196 \text{ l/min}$  nach Berechnung der MVV, der maximalen willkürlichen Ventilation. Tatsächlich kamen die Probanden im Mittel auf  $176,8 \pm 22,8 \text{ l/min}$ . Das mittlere Laktat stieg von  $1,15 \text{ mmol/l}$  auf maximale Werte von  $10,29 \pm 2,17 \text{ mmol/l}$ , was einer Vervielfachung um den Faktor 8,94 entspricht. Auch der letzte belastungsabhängige Parameter, der respiratorische Quotient, stieg von den Schwellenwerten an der respiratorischen zur metabolischen und zum Maximalwert zum Zeitpunkt T2 von 0,94 zu 0,99 und finalen 1,19 an.

Die während der Belastung erhobenen Parameter Herzfrequenz, Blutlaktat, Ventilation, respiratorischer Quotient und Leistung stiegen alle signifikant mit p-Werten im Wilcoxon-Test zwischen 0,003 und 0,005 an. Herzfrequenz und Ventilation zeigten von Ruhe zur ventilatorischen aeroben Schwelle und von der Schwelle zur Ausbelastung leicht gegenläufige Trends (Abb. 2): Die Herzfrequenz stieg zunächst stärker als die Ventilation an, nach der Schwelle jedoch geringer als die Ventilation.

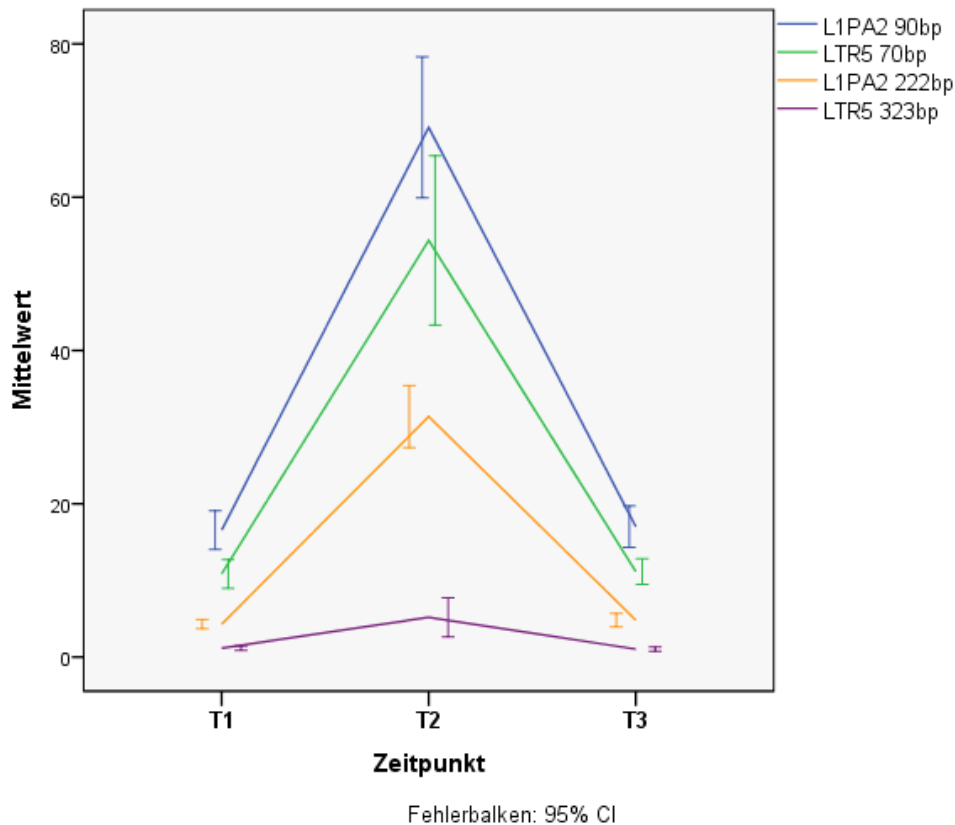
#### 4.1.2. Leukozyten



**Abbildung 3: Zellen pro nl im Testverlauf**

Die aus den Differentialblutbildern gewonnenen Zellzahlen der einzelnen Leukozytensubpopulationen zeigten normwertige  $5,33 \pm 1,17$  Zellen pro nl für die Gesamtzahl der Leukozyten. Davon entfielen  $1,87 \pm 0,49$  auf die Lymphozyten,  $2,58 \pm 0,74$  auf die neutrophilen Granulozyten und die Differenz von 0,88 auf eosinophile und basophile Granulozyten sowie Monozyten. Die Zellen, außer die eosinophilen Granulozyten, stiegen im Belastungsintervall zwischen T1 und T2 signifikant an. Der Anstieg beruhte vor allem auf den Lymphozyten, die um den Faktor zwei im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten um den Faktor 1,55 anstiegen, bei einem Anstieg der Gesamtleukozyten um das 1,67-fache auf  $8,94 \pm 1,81$ . Nach der Belastung sank die Gesamtleukozytenzahl auf nur noch  $7,4 \pm 1,73$ , was auch dem Trend der Lymphozyten entsprach, die auf Werte unter Ausgangsniveau abfielen ( $1,27 \pm 0,23$ ). Die neutrophilen Granulozyten hingegen stiegen zum Zeitpunkt T3 hin weiter an und übertrafen ihr Niveau direkt nach Belastung um den Faktor 1,33. Die übrigen Zellpopulationen nahmen bis auf die Eosinophilen alle signifikant zu und fielen inklusive der eosinophilen signifikant im Erholungszeitraum ab.

### 4.1.3. DNA-Messungen



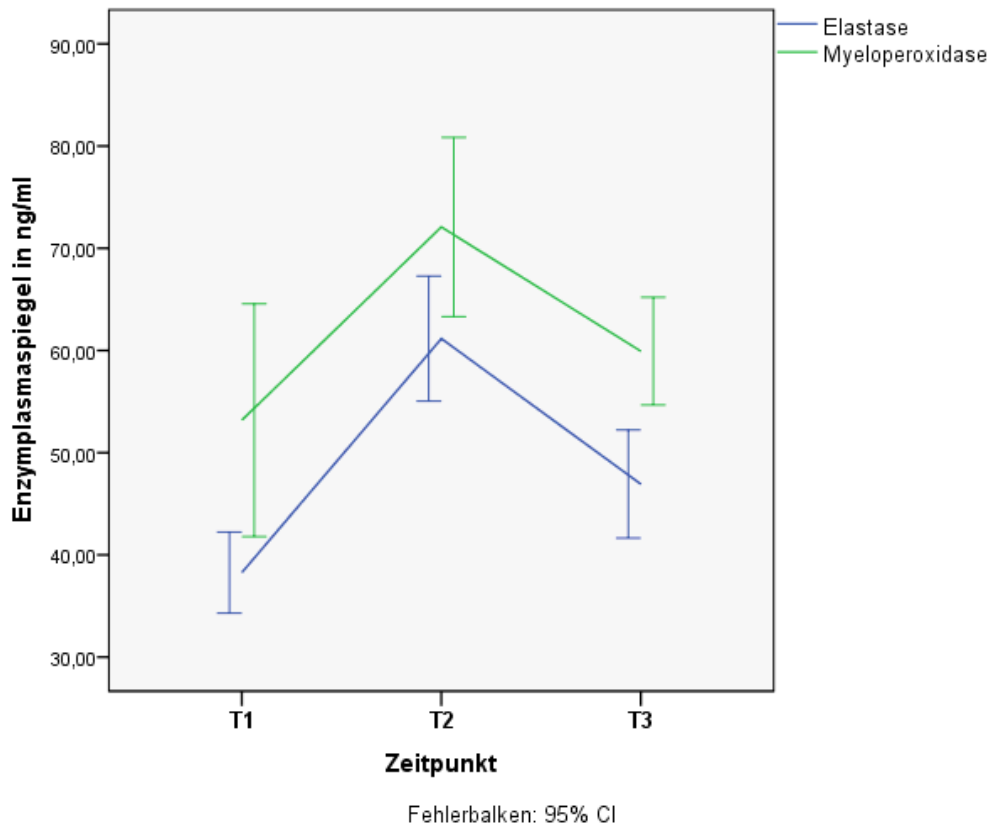
**Abbildung 4: Verlauf der DNA-Spiegel der Einzelmessungen**

Die DNA-Messungen, die zu allen drei Zeitpunkten durchgeführt wurden, zeigen für beide Primerpaare höhere Werte für die kurzen Fragmente als für die langen Fragmente. Zudem maß der direkt die DNA aus verdünntem Plasma messende L1PA2-Primer größere Mengen an DNA als der mit eluierter DNA arbeitende LTR5-Primer. Die Werte nach Belastung waren um den Faktor 5,51 bei den kurzen LTR5-Fragmenten und 4,56 bei den kurzen L1PA2-Fragmenten höher. Die langen Fragmente stiegen unter Belastung um den Faktor 7,01 (LTR5) und 8,29 (L1PA2) an. Im Intervall zwischen Belastungsabbruch und T3-Blutentnahme fielen die DNA-Spiegel um den Faktor 0,24 beim LTR5 und L1PA2 für das kurze Fragment, sowie 0,16 für das lange Fragment des L1PA2. Beim langen Fragment des LTR5-Primers ergab sich der Faktor 1,89 als Mittelwert der DNA-Spiegelveränderungen, da zwar bei den meisten Probanden auch diese Fragmentspiegel abfielen, allerdings einige wenige noch weiter zunahmen. Die Integrität der mittels L1PA2 gemessenen DNA nahm unter der Belastung zu (0,26 auf 0,46) und fiel in der Erholungsphase auf den Ausgangswert wieder ab. Dazu konträr verhielt sich die LTR5-Integrität, da sie unter Belastung geringfügig abfiel (0,11 auf 0,07) und anschließend wieder das vor-Belastungs-Niveau erreichte. Um nun zu erfahren, ob die Mittelwertsunterschiede



signifikant waren, wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt. Dabei ergab sich, dass alle DNA-Spiegel Veränderungen zwischen den Zeitpunkten T1 und T2 außer die Veränderungen der langen Fragmente des LTR5-Primers signifikant waren. Zudem waren die Abfälle der Plasma-DNA-Spiegel im Intervall zwischen T2 und T3 ebenfalls signifikant. Für die Integrität der im Plasma befindlichen DNA konnten signifikante Unterschiede nur für die DNA-Integrität des L1PA2-Primers gezeigt werden.

#### 4.1.4. Elastase und Myeloperoxidase



**Abbildung 6:** Verlauf der neutrophilen-spezifischen Enzyme im Testverlauf. Die Myeloperoxidase ist wegen der günstigeren graphischen Darstellbarkeit mit 10 zu multiplizieren.

Während der Belastung kommt es zu einem Anstieg der granulären Enzyme Elastase und Myeloperoxidase. Während die Elastase um den Faktor 1,75 von  $38,27 \pm 9,81$  ng/ml auf  $67,00 \pm 19,21$  ng/ml ansteigt, verzeichnet die Myeloperoxidase einen Anstieg um das 1,43-fache von  $531,8 \pm 263,2$  ng/ml auf  $760,0 \pm 175,7$  ng/ml. Die Anstiege sind mit einseitigen p-Werten von  $p < 0,001$  (Elastase) und  $p = 0,002$  (MPO) signifikant. Im Intervall zwischen den Blutentnahmen T2 und T3 gab es für beide Enzyme signifikanten Abfälle, die mit p-Werten von  $p = 0,009$  und  $p = 0,006$  deutlich unter dem Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  liegen. Die absoluten Werte für diesen Messzeitpunkt waren im Vergleich zum Vorbelastungsniveau noch leicht erhöht und

betragen für die Elastase  $50,18 \pm 15,76$  ng/ml, während die Myeloperoxidase um den Faktor 0,79 auf nur noch  $597 \pm 112,6$  ng/ml fiel.

## **4.2. Korrelationen der Zeitpunktmessungen**

### **4.2.1. DNA-Messungen**

Da die DNA-Messungen denselben Parameter, nämlich den Plasma-DNA-Spiegel, erfassen, wurde zunächst die Korrelation der einzelnen Messmethoden an den jeweiligen Zeitpunkten (T1, T2 und T3) untereinander durchgeführt, um etwaige Schlüsse auf eine methodische Ungenauigkeit zu erkennen. Die bivariaten Korrelationen nach Spearman ergaben, dass die Messungen in sich gut korrelieren. Die Korrelationskoeffizienten bewegten sich im Bereich von  $R=0,89$  für das Paar der kurzen zu langen Fragmente des L1PA2-Primers nach Belastung (T2) als höchstem Wert (Abb. 7) und  $R=0,61$  für die Korrelation des langen Fragments des L1PA2-Primers mit dem kurzen Fragment des LTR5-Primers vor Belastung. Es fiel allerdings auf, dass die DNA-Werte zum Zeitpunkt T3, die mit dem LTR5-Primer gemessen waren, jeweils nur mit dem kurzen Fragment des L1PA2-Primers korrelieren, aber nicht jedoch das kurze mit dem langen Fragment des LTR5-Primers.

### **4.2.2. DNA-Messungen und Zellen**

Die Korrelation der Zellzahlen mit dem DNA-Spiegel wurde auch über die Zeitpunkte hinweg betrachtet, da es durchaus interessant sein könnte, ob hohe Zellzahlen beispielsweise zum Zeitpunkt T1 mit hohen DNA-Spiegeln bei T2 einhergehen.

Es ergaben sich für die gesamten Leukozyten an T1 und T2 nur ausreichend hohe Korrelationskoeffizienten mit dem langen Fragment des LTR5 nach Belastung mit  $R=-0,6$  beziehungsweise  $R=-0,68$  (Abb. 8). Bei den leukozytären Subpopulationen korrelierten zum Beispiel die direkt gemessene DNA zum Zeitpunkt T1 mit den Lymphozyten T3 mit Koeffizienten von  $R=-0,51$  (90bp) und  $R=-0,52$  (222bp). Bei den im Rahmen dieser Arbeit besonders beachteten neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt T2 ließen sich mit dem langen LTR5-Fragment Korrelationskoeffizienten von  $R=-0,65$  (T1) und  $R=-0,7$  (T2) errechnen (Abb. 9). Die Subpopulation, die die meisten hohen Korrelationen mit den DNA-Spiegeln ergab, waren die basophilen Granulozyten. Sie zeigten Korrelationen zum Zeitpunkt T1 von  $R=-0,64$  für das kurze L1PA2-Fragment und  $R=-0,57$  für das lange LTR5-Fragment. Zu dem Untersuchungszeitpunkt nach der Erholungsphase korrelierten die Basophilen mit

der DNA vor Belastung mit sehr hohen Koeffizienten von  $R=-0,75$  (LTR5 323bp; Abb. 10) und  $R=-0,8$  (L1PA2 90bp) sowie mit den DNA-Plasma-Spiegeln direkt bei Belastungsabbruch mit etwas geringeren  $R=-0,69$  (L1PA2 90bp) und  $R=-0,56$  (L1PA2 222bp und LTR5 323bp). Die eosinophilen Granulozyten korrelierten mit den DNA-Messungen nur über Zeitpunkte hinweg, so zum Beispiel die Eosinophilen vor Belastung mit dem langen L1PA2 ( $R=-0,54$ ) oder aber selbige zum Zeitpunkt T2 mit dem langen Fragment der direkt gemessenen DNA zum Zeitpunkt vor Belastung ( $R=0,52$ ). Ebenso verhielten sich die Monozyten, die zum Zeitpunkt T1 mit allen Zeitpunkten des kurzen LTR5-Fragments, bei T2 noch mit denen vor Belastung und nach Erholung gut korrelieren, aber eben nur mit diesem Fragment und nicht den drei anderen. Dabei sind die Korrelationskoeffizienten im Bereich zwischen  $R=0,51$  für Monozyten bei Belastungsabbruch mit der DNA nach Erholung und  $R=0,58$  für beide Parameter vor Belastung.

#### **4.2.3. Neutrophile und Enzyme**

Die Korrelationen der neutrophilen Granulozyten mit den Plasma-Enzym-Spiegeln ergaben ausreichend hohe Korrelationskoeffizienten für die Zellen mit der Elastase. So war die Elastase vor Belastung mit einem  $R=0,56$  und nach der Erholungsphase mit  $R=0,63$  (Abb. 11) korrelierbar. Allerdings konnten die Myeloperoxidase-Spiegel keine ausreichend hohen Koeffizienten mit den neutrophilen Granulozyten erzielen.

#### **4.2.4. DNA-Messungen und neutrophilenspezifische Enzyme**

Die beiden Enzyme Elastase und Myeloperoxidase wurden ebenfalls mit den DNA-Spiegeln korreliert. Die Elastase erreichte die höchsten Koeffizienten mit den jeweils folgenden Zeitpunkten. So wurde die Korrelation der Elastase vor Belastung mit den langen Fragmenten beider Primer nach Belastung mit  $R=-0,68$  (L1PA2) und  $R=-0,6$  (LTR5) berechnet. Für die Elastase bei Belastungsabbruch mit der DNA nach Erholung (Abb. 12) gab es noch höhere Koeffizienten als bei eben genannter Paarung, die sich zudem für alle DNA-Messungen berechnen ließen. Die kurzen Fragmente korrelierten stärker als die langen, da zum Beispiel das kurze L1PA2-Fragment ein  $R=0,91$  erzielte und dessen langes Fragment den mit  $R=0,52$  niedrigste Koeffizienten aufwies.

Die Myeloperoxidase nach Belastung (T2) zeigte bei der Korrelation gute Koeffizienten mit dem 70bp-Fragment ( $R=0,55$ ) sowie dem 222bp-Fragment ( $R=0,62$ ), beides vor Belastung. Zudem korrelierte sie zum gleichen Zeitpunkt T2

invers mit den langen Fragmenten beider Primer nach Erholung (T3) bei einem  $R=-0,6$  für das 222bp-Fragment und  $R=-0,5$  für das lange LTR5-Fragment. Zeitpunktentsprechende Korrelationen ergaben sich nicht.

#### **4.2.5. DNA und Leistungsphysiologie**

Da es so viele Korrelationen mit einem  $R>0,500$  gab, werden hier nur diejenigen dargelegt, bei denen der leistungsphysiologische Parameter mit größer gleich zwei DNA-Messungen gute Korrelationskoeffizienten erzielte.

Als erster Bereich sollen die respiratorischen Parameter dargelegt werden. Hierbei war es bereits möglich, die Ventilation in Ruhe mit den DNA-Spiegeln des 323bp-Fragments und der beiden L1PA2-Fragmente nach Belastungsabbruch invers zu korrelieren. Das  $R$  lag zwischen  $-0,62$  (222bp) und  $-0,67$  (323bp). Ebenso korrelierte die vor-Belastungs-DNA gut mit der Ruheventilation, da die Koeffizienten  $R=-0,56$  für LTR5 323bp und  $R=-0,6$  für L1PA2 90bp betragen. Die im weiteren Verlauf gemessene Ventilation zum Zeitpunkt der respiratorisch ermittelten Schwelle korrelierte gut mit allen vier DNA-Messungen bei Belastungsabbruch. Der Koeffizient der langen Fragmente war hierbei am höchsten mit  $R=0,68$  für beide Primer (Abb.13). Trotz dieser Ergebnisse für die Ventilation im Verlauf der Belastung war sie zum Zeitpunkt des Belastungsabbruchs nicht mit den DNA-Spiegeln mit einem  $R>0,500$  zu korrelieren. Der aus der Ventilation indirekt abgeleitete Parameter, der respiratorische Quotient RQ, korrelierte invers mit allen vier DNA-Messungen zum Zeitpunkt des Belastungsabbruchs. Hierbei betrug der Korrelationskoeffizient zwischen  $R=-0,6$  und  $R=-0,83$  für das kurze beziehungsweise lange Fragment (Abb.14) der LTR5-Messung. Als weiterer Parameter der körperlichen Anstrengung zeigte die Herzfrequenz an der respiratorisch bestimmten Schwelle Korrelationskoeffizienten von  $R=0,51$  (langes LTR5-Fragment) und  $R=0,51$  (langes L1PA2-Fragment) zum Zeitpunkt des Belastungsabbruchs. Die Maximale Herzfrequenz war invers korreliert mit den DNA-Spiegeln vor Belastung ( $R=-0,58$  und  $R=-0,5$ ). Das Laktat konnte keine mehrfachen, ausreichend hohen Korrelationskoeffizienten erzielen.

Für den Parameter der erbrachten Leistung, also die Leistung in Watt pro Kilogramm Körpergewicht ( $W/kg$  KG), an der respiratorisch bestimmten Schwelle mit den DNA-Spiegeln aller Messmethoden nach Belastungsabbruch wurden die höchsten Koeffizienten der ganzen Leistungsphysiologie berechnet. So betrug das  $R=0,59$  für

das L1PA2 90bp-Fragment und  $R=0,84$  für das kurze LTR5-Fragment (Abb. 15). Ebenfalls gute Korrelationen ließen sich für die Leistung an der metabolisch bestimmten Schwelle und der LTR5-DNA nach Belastung errechnen. Im Gegensatz zur Ventilation war auch die maximal erbrachte Leistung mit allen mittels der vier Messmethoden gemessenen DNA-Spiegeln nach Belastung zu korrelieren. Wie schon an der respiratorisch bestimmten Schwelle bewegten sich die Koeffizienten im Bereich von  $R=0,55$  (langes LTR5) und  $R=0,84$  (kurzes LTR5; Abb.16).

### **4.3. Korrelationen der Veränderungen zwischen den Zeitpunkten**

Es muss bei der Darstellung der Ergebnisse für die Veränderungen zwischen den Zeitpunkten darauf hingewiesen werden, dass ein negativer Korrelationskoeffizient zwischen den Intervallen von T1 nach T2 und T2 nach T3 bedeutet, dass beispielsweise ein starker Anstieg im ersten mit einem starken Abfall im zweiten Zeitraum einhergeht. Das ergibt sich aus der Kalkulation der Veränderung, die als Quotient von T2/T3 berechnet wurde. Der Quotient wird demzufolge umso kleiner desto stärker der Abfall ist. Somit drückt in dieser Darstellung das negative Vorzeichen eines Korrelationskoeffizienten einen starken Anstieg mit einem dazugehörigen starken Abfall aus. Bei Koeffizienten für dieselben Zeitintervalle gilt dies selbstverständlich nicht.

#### **4.3.1. DNA-Messungen**

Für die Korrelationen der Veränderungen der DNA-Spiegel zwischen den Zeitpunkten ergaben sich gute Korrelationskoeffizienten für alle Messmethoden untereinander Zeitintervall-entsprechend und auch nicht Zeitintervall-entsprechend. Beispielsweise war der Koeffizient der beiden LTR5-Fragmente im ersten Intervall  $R=0,96$  und im zweiten  $R=0,74$ . Ebenso verhält es sich zwischen den Messmethoden. Exemplarisch seien hier die beiden kurzen Fragmente genannt, deren Veränderungen während der Belastung mit  $R=0,87$  und während der Erholung mit  $R=0,9$  korrelieren. Bei der inter-Intervallkorrelation ergaben sich weiterhin hohe Korrelationskoeffizienten, hierfür diene das kurze LTR5-Fragment während der Belastung und der Erholung mit  $R=-0,83$  als Beispiel.

#### **4.3.2. DNA-Spiegel und Zellen**

Die jeweils in den Intervallen messbaren Veränderungen der Zellzahlen korrelierten mit den Veränderungen der DNA-Plasma-Spiegel nur bei den Monozyten im Belastungszeitraum mehrfach ausreichend hoch. So waren sowohl beide kurze

Fragmente als auch das lange Fragment des LTR5 mit den Monozyten im Bereich von  $R=-0,5$  für das lange Fragment und  $R=-0,56$  für das kurze L1PA2-Fragment korrelierbar. Die Leukozyten unter Belastung ließen sich ausschließlich mit dem langen, direkt gemessenen Fragment korrelieren, genauso wie die Eosinophilen ( $R=0,51$  beziehungsweise  $R=-0,53$ ).

#### **4.3.3. Neutrophile und Enzyme**

Für die Veränderungen der Neutrophilenzahlen und der Enzym-Plasma-Spiegel ergaben nur die Veränderungen der Myeloperoxidase mit den Neutrophilen gute Korrelationen. Die errechneten Ergebnisse waren intervallentsprechend, sodass jeweils die Neutrophilen- und die Myeloperoxidasenveränderung unter Belastung und im Erholungsintervall ein  $R=-0,57$  (Abb. 18) und  $R=0,72$  ergaben. Für die Veränderungen der Elastase-Spiegel konnten keine ausreichend starken Korrelationen berechnet werden.

#### **4.3.4. DNA-Messungen und neutrophilenspezifische Enzyme**

Genau wie bereits im vorhergehenden Abschnitt war es nicht möglich, die Elastase mit der Veränderung der DNA-Spiegel mit guten Koeffizienten zu korrelieren, wohingegen es wiederum für die Myeloperoxidasenveränderung im Belastungszeitraum mit der Veränderung der durch das kurze L1PA2-Fragment gemessenen DNA bei einem  $R=0,55$  möglich war. Weitere drei gute Korrelationen gab es im Erholungszeitraum. Dabei ergaben sich Korrelationen von  $R=0,7$  ebenfalls mit dem kurzen L1PA2-Fragment als stärkste (Abb. 19) und  $R=0,55$  mit dem langen LTR5-Fragment als schwächste Korrelation.

#### **4.3.5. DNA und Leistungsphysiologie**

Wie im Abschnitt der Korrelationen der einzelnen Zeitpunkte sollen hier aufgrund der Anzahl an starken Einzelkorrelationen nur diejenigen Parameter genannt werden, die mit mehreren DNA-Messungen gute Korrelationen ergaben.

Beginnend wiederum bei der Ventilation war die Ventilationssteigerung im gesamten Belastungsintervall, also Ventilation in Ruhe zur maximalen Ventilation, mit drei der vier DNA-Messungen unter Belastung gut korrelierbar ( $R=0,5$  bis  $R=0,54$ ). Und auch die Ventilationssteigerung zwischen der respiratorisch bestimmten Schwelle und der maximalen Ventilation korrelierte gut mit denselben drei Messmethoden (LTR5 lang und kurz sowie L1PA2 kurz). Bei der Korrelation eben dieser Ventilationsänderungen mit den DNA-Veränderungen im Erholungsintervall ergaben sich  $R=0,53$  (90bp) und

$R=0,83$  (323bp). Bei der statistischen Betrachtung der Gesamtänderung der Ventilation mit den Erholungsveränderungen der DNA korrelierten alle Messmethoden gut bei  $R$  im Bereich von  $R=-0,55$  für das kurze LTR5er und  $R=-0,71$  für dessen langes Fragment. Für die Änderung des respiratorischen Quotienten zwischen der metabolisch bestimmten Schwelle und der Belastungsänderung der DNA waren jeweils die kurzen sowie das lange LTR5er gut invers korrelierbar ( $R=-0,51$  bis  $R=-0,69$ ). Im post-Belastungs-Zeitraum wurden jedoch nur noch die langen Fragmente beider Methoden mit  $R=0,61$  und  $R=0,57$  berechnet. Die Steigerung zwischen der respiratorisch bestimmten Schwelle und dem maximalen RQ korrelierte mit den beiden LTR5-Messungen im Erholungszeitraum bei  $R=0,67$  (70bp) und  $R=0,89$  (323bp). Für die Veränderung der Herzfrequenz zwischen der respiratorischen Schwelle und der maximalen Herzfrequenz und der DNA-Steigerung unter Belastung ergaben sich starke Koeffizienten für alle vier Messungen mit  $R=-0,64$  für den langen L1PA2er als kleinsten Wert und  $R=-0,76$  für den kurzen L1PA2er (Abb. 20) und den langen LTR5er. Die Koeffizienten der Veränderungen der DNA im Erholungszeitraum waren bei einem  $R=0,7$  als niedrigstem, aufgestellt für das kurze LTR5-Fragment, und  $R=0,9$  beim langen L1PA2-Fragment als höchstem ungleich höher.

## 5. Diskussion

Als Ziel der Studie galt es zunächst, die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten mit den Veränderungen der zellfreien DNA unter Belastung und in der darauffolgenden Erholung zu untersuchen und eventuelle Parallelitäten der Veränderungen aufzufinden. Hierdurch sollen Schlüsse ermöglicht werden, die eine Herkunft der DNA aus neutrophilen Granulozyten im Sinne der oben beschriebenen NETs nahelegen. Des Weiteren soll, angesichts der bislang fehlenden Einsichten in die Verknüpfung der DNA mit Belastungsparametern, die explorative Statistik in diesem Bereich eventuelle Abhängigkeiten der DNA-Spiegel von den Indizes der Belastungs- und Leistungsfähigkeit aufzeigen.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse kurz noch ein Mal dargestellt werden um sie anschließend im Kontext des bisher Bekannten zu interpretieren und zu verstehen.

### 5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

#### 5.1.1. Deskriptive Statistiken

Während der Belastungsphase durchliefen alle Probanden eine Anpassung ihres kardiorespiratorischen Systems dahingehend, dass alle bestimmten Parameter wie Herzfrequenz, Ventilation, respiratorischer Quotient und Blutlaktat signifikant anstiegen. Die dabei erbrachte Leistung betrug im Mittel 4,94 W/kg KG.

Signifikant veränderte sich ebenfalls die Zusammensetzung der Leukozyten. Unter Belastung stieg die Gesamtzahl der Leukozyten stark an, wobei der Hauptanstieg durch die im Vergleich mehr angestiegenen Lymphozyten zu erklären war, gefolgt von den neutrophilen Granulozyten. Von den übrigen Populationen stiegen nur die Monozyten zahlenmäßig bedeutsam an, was aber den grundsätzlich niedrigen Zahlen an eosinophilen und basophilen Granulozyten zu schulden ist. Im Erholungsintervall nahm die Gesamtleukozytenzahl ab, jedoch noch nicht auf Ruhewerte. Dieser Abfall erklärte sich durch einen massiven zahlenmäßigen Rückgang der Lymphozyten im Sinne einer Lymphopenie. Allerdings war das Gesamtleukozytenniveau nicht wie in Ruhe, da die neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den nach-Belastungsleveln noch weiter anstiegen. Genauso wie die Lymphozyten fielen die Monozyten im Erholungszeitraum unter ihr Ausgangslevel. Folglich lagen erhöhte Gesamtzahlen mit Neutrophilie und Lymphopenie vor.



Für die DNA-Spiegel war derselbe Verlauf wie bei den Leukozyten messbar. Die unterschiedlichen Messmethoden zeigten zwar unterschiedliche absolute Werte, aber der Trend des Anstiegs unter Belastung und der Abfall danach waren ähnlich. Die mit der direkten L1PA2 Methode gemessenen DNA-Spiegel waren jeweils im Vergleich der kurzen als auch langen Fragmente höher als die mittels LTR5-Primer aus aufgereinigtem Plasma gemessenen DNA-Werte. Die Anstiege lagen im Bereich des etwa fünf-fachen des Ausgangswertes und normalisierten sich innerhalb der neunzig Minuten Erholungszeit, sodass die DNA-Spiegel nach der Erholungsphase wieder auf dem Ausgangsniveau angekommen waren. Bei der Integrität der DNA im Plasma aus der Ratio von Quantität des langen zu dem kurzen Fragment nahm diese während der Belastungsphase zumindest für das L1PA2-Primerpaar deutlich zu, während sie für das LTR5-Primerpaar etwas abnahm und sich nach Erholung wieder normalisierte.

Die letzte Gruppe der bestimmten Parameter sind die Neutrophilen-spezifischen Enzyme Elastase und Myeloperoxidase. Auch für die Neutrophilen-spezifischen Enzyme konnten signifikante Anstiege unter Belastung und signifikante Abfälle im Erholungszeitraum berechnet werden. Die Plasmamenge der Enzyme verdoppelte sich fast, erreichte aber nach neunzig Minuten Erholung nicht ganz das Ausgangsniveau.

### **5.1.2. Korrelationen der Zeitpunktwerte**

Zunächst wurden die absoluten Werte zu einzelnen Zeitpunkten von Plasma-DNA, Leukozyten, Leistungsphysiologie und Neutrophilen-spezifische Enzyme untereinander korreliert, um später noch ihre Veränderungen in den einzelnen Testintervallen zu korrelieren.

Die Zeitpunkt-entsprechende Korrelation der DNA-Messungen untereinander bestätigte, dass die einzelnen Methoden in sich konsistent den Plasma-DNA-Spiegel abbilden. Als Ausreißer sei das lange Fragment des LTR5-Primers genannt, welches nach Erholung nur noch mit seinem kurzen Fragment korrelierte, jedoch nicht mit den anderen beiden Messmethoden. Abgesehen von diesem Beispiel korrelierten jedoch zu allen Zeitpunkten alle Methoden gut miteinander.

Bei der Korrelation der Leukozyten mit den DNA-Spiegeln wurden, anders als bei den DNA-Messungen, auch Paare über die Zeitpunkte hinaus betrachtet. Die Leukozyten vor und nach Belastung ebenso wie die neutrophilen Granulozyten direkt danach (T2) korrelierten nur mit dem langen Fragment des LTR5-Primers nach Belastung

mit negativem Koeffizienten im Bereich von circa  $R=-0,6$ . Des Weiteren waren die basophilen Granulozyten diejenige Zellsubpopulation, die die meisten guten Korrelationen erzielten. So gab es sowohl zwischen den T1-Basophilen als auch den T3-Basophilen und der T1-DNA gute Korrelationen. Allerdings korrelierten diese Basophilen nach Erholung auch noch mit der DNA bei Belastungsabbruch. Alle oben genannten Korrelationen waren negativen Vorzeichens. Die Eosinophilen zeigten kein klar erkennbares Muster in ihren Korrelationen abgesehen davon, dass sie nur mit den direkt gemessenen Fragmenten korrelierten. Die Monozyten korrelierten positiv ausschließlich mit dem LTR5 70bp-Fragment.

Bei den Korrelationen, die die NET-Hypothese stützen sollen gab es Korrelationen zwischen den Zahlen der Neutrophilen an T1 und T3 mit den entsprechenden Elastase-Spiegeln, wohingegen die Myeloperoxidase keinen korrelativen Zusammenhang ergab. Jedoch war es in der folgenden Korrelation der Enzyme mit den DNA-Spiegeln möglich, die T2-MPO mit der T1-DNA und auch der T3-DNA zu verbinden. Dabei waren die Korrelationen mit der T1-DNA positiv; die nach Erholung waren negativ und nur diejenigen Korrelationskoeffizienten mit den langen Fragmenten beider Primer waren ausreichend hoch. Die Koeffizienten lagen zwischen  $R=\pm 0,5$  und  $R=\pm 0,6$ . Für die Elastase wiederum waren die guten Korrelationen zahlenmäßig noch häufiger und auch die Koeffizienten waren mit maximalen  $R=0,91$  wesentlich besser. So korrelierte die Elastase T1 negativ mit der DNA T2 und positiv zum Zeitpunkt T2 mit der DNA nach Erholung.

Als letzte große Gruppe wurde die Leistungsphysiologie mit der DNA korreliert. Hierbei waren die starken Korrelationen so zahlreich, dass nur mehrfache Korrelationen einzelner Parameter mit einem DNA-Zeitpunkt in Betracht gezogen wurden. Hierbei sind als die Parameter mit den stärksten korrelativen Zusammenhängen der respiratorische Quotient bei maximaler Last, die Ventilation in Ruhe, die Ventilation an der respiratorisch bestimmten aeroben Schwelle, die Leistung an der aeroben Schwelle und die maximale Leistung zu nennen. Der RQ korrelierte genauso wie die Ventilation in Ruhe negativ mit der DNA bei Belastungsabbruch. Dagegen waren die Koeffizienten der Ventilation an der Schwelle, der Leistung an der Schwelle und der maximalen Leistung positiv mit der DNA nach Belastung zu korrelieren. Die anderen Parameter wie Herzfrequenz und Laktat an den unterschiedlichen Zeitpunkten ergaben nur vereinzelte gute Korrelationen.

### 5.1.3. Korrelationen der Veränderungen in den Testintervallen

Um etwaige Zusammenhänge in der Veränderung einzelner Parameter zu entdecken, wurden auch die Veränderungen in den Testintervallen zwischen den einzelnen Zeitpunkten korreliert.

Auch hierbei waren die DNA- Messungen untereinander gut zu korrelieren. Sowohl die Veränderungen in denselben Intervallen als auch die nicht Intervallentsprechenden Veränderungen standen in gutem korrelativen Verhältnis zueinander.

Die an diesem Punkt einzige zu nennende auffällige Zellpopulation waren die Monozyten. Ihr Anstieg unter Belastung war mit der Veränderung der beiden LTR5-Fragmente sowie der des kurzen L1PA2-Fragments im Bereich von  $R=-0,5$  zu korrelieren. Alle anderen Zellpopulationen, seien es die Gesamtleukozyten oder auch die Neutrophilen, hatten jeweils nur eine Korrelation mit einer DNA-Messung.

War bei der Korrelation der Zeitpunkte noch die Elastase das Enzym gewesen, das mit den Neutrophilen gute korrelierte, so war es bei der Berechnung der Korrelationen zwischen den Veränderungen die Myeloperoxidase. Diese ließ sich negativ zwischen T1 und T2 und positiv zwischen T2 und T3 korrelieren, sogar mit einem  $R=0,72$ . Und auch die Korrelationen über die Veränderungen mit der DNA ergaben sich ausschließlich mit der Myeloperoxidase. Insbesondere im Erholungsintervall waren die Koeffizienten mit im Bereich von  $R=0,7$  liegenden Werten sehr gut. Im Belastungszeitraum korrelierte ausschließlich das kurze L1PA2-Fragment positiv mit der Veränderung der MPO-Menge im Plasma.

Zum Abschluss der Ergebniszusammenfassung sollen noch die Korrelationen der Veränderungen der leistungsphysiologischen Parameter mit den Veränderungen der DNA genannt werden. Die Änderung der Ventilation zwischen Ruhe und Maximum korrelierte positiv mit den DNA-Anstiegen, während der Ventilationsanstieg zwischen respiratorisch bestimmter Schwelle und Maximum negativ korrelierte. Das gleiche Phänomen der Vorzeichenumkehr ist bei der Korrelation beider Ventilationsänderungen mit der Veränderung der DNA im Erholungsintervall zu beobachten. Das heißt, dass beide negativ mit dem DNA-Anstieg aber positiv mit dem DNA-Abfall korrelieren. Genauso wie die Ventilation ab der Schwelle verhält sich auch der respiratorische Quotient und korreliert negativ mit den belastungsabhängigen DNA-Anstiegen. Die Herzfrequenz, die in den

Zeitpunktkorrelationen noch keine große Rolle spielte, stellte sich in den Korrelationen der Änderungen stark dar. Wie auch schon bei der Ventilation und dem respiratorischen Quotienten waren die Koeffizienten mit der belastungsabhängigen Veränderung der DNA negativ, um dann mit dem DNA-Abfall positiv zu korrelieren. Auch hier waren die Korrelationskoeffizienten im Bereich von  $R=0,7$  und mehr sehr stark.

## **5.2. Ergebnisinterpretation**

### **5.2.1. Leistungsphysiologische Bewertung des Probandenkollektivs**

Bevor eine inhaltliche Interpretation geschieht, soll der Vorsatz überprüft werden, ein leistungsstarkes und homogenes Probandenkollektiv zusammengestellt zu haben. Für das Kollektiv wurde eine mittlere  $VO_{2max}$  von  $63,5 \text{ ml O}_2/\text{min} \times \text{kg}$  Körpergewicht bestimmt, was einer exzellenten Ausdauerleistungsfähigkeit in dieser Altersgruppe entspricht (Heyward 1998). Man kann also folgern, dass es gelungen war, ein leistungsstarkes Kollektiv zusammenzustellen. Dass ebenfalls eine Homogenität gegeben war, erkennt man an der geringen Standardabweichung der maximalen Leistung von  $4,94 \pm 0,48 \text{ W/kg KG}$ , also auch hier war die selbst gestellte Bedingung erfüllt.

Die leistungsphysiologische Auswertung der Spiroergometrie zeigte erwartungsgemäß starke Anstiege der Ventilation und Herzfrequenz sowie einen exponentiellen Verlauf des Plasmalaktats. Die im Ergebnisteil abgebildete Graphik (Abb. 2) zeigt, dass die Herzfrequenz zunächst stärker ansteigt als die Ventilation, im Zeitraum nach Überschreiten der Schwelle aber letztere den steileren Anstieg zeigt. Genau diesen Verlauf publizierte bereits eine Studie aus dem Jahr 1975 (Vokac, Bell et al. 1975), in der sich Probanden auf dem Fahrradergometer belasten mussten und dann der Verlauf von Herzfrequenz und Ventilation untersucht wurde. Bei einer maximal erreichten Herzfrequenz von 194 Schlägen pro Minute wird in etwa der Bereich der Faustregel für die maximale Herzfrequenz  $220 - \text{Lebensalter}$  erreicht, wobei man diejenigen über 200 Schlägen pro Minute zu den Personen mit besonders hoher maximaler Frequenz zählen muss.

### **5.2.2. DNA-Messung und -Methodik**

Bei der Überprüfung der Plausibilität der DNA-Messungen sieht man, dass sich diese in ihren absoluten Ergebnissen unterscheiden. Diese Unterschiede mögen in der

Methode begründet sein, da die Plasmaproben der etwas niedriger messenden LTR5-Methode zunächst durch eine Aufreinigungsprozedur gelaufen waren und die L1PA2-Methode nur das verdünnte Plasma benötigt. Diese Erklärung mag für die Unterschiede der beiden kurzen Fragmente die wesentliche Erklärung sein, aber für die langen Fragmente könnten noch entscheidender als die Aufreinigung die Längenunterschiede der Target-Sequenz der Primer sein. Diese unterscheidet sich um 101bp zwischen den beiden Methoden. Die gewaltigen Unterschiede der absoluten Menge zwischen den langen und kurzen Fragmenten sieht man im Vergleich der Integrität. Diese liegt bei der LTR5-PCR grundsätzlich um die 10%, aber bei der L1PA2 unterliegt sie Schwankungen und kommt so auf fast 50% nach Belastung. Dass solche Unterschiede zustande kommen, kann daran liegen, dass die für die plasmatische DNA-Beseitigung zuständige DNase I die DNA in Stücke vom Vielfachen von 150bp zerschneidet, was wiederum der Länge eines Nukleosomenabschnittes entspräche. Der eine lange Primer amplifiziert ein Fragment von 323bp, was aber genau oberhalb des Doppelten von 150bp liegt. Stellt man sich nun vor, dass während einer Anstrengung massiv DNA im Blut anfällt und die DNase folglich immer mehr Substrat erhält, hat der 222bp-Primer immer noch eine höhere Wahrscheinlichkeit als der 323bp-Primer in einem im Abbau befindlichen DNA-Strang genau seine Sequenz finden zu können. Aber trotz aller Unterschiede methodischer Natur, die in differierenden Absolutwerten münden, ist wichtig, dass die DNA-Quantifikation und ihre Relationen untereinander stimmig sind, was man auch an den guten Korrelationen sieht.

Unabhängig von den Differenzen der einzelnen Messmethoden ist der Anstieg der Plasma-DNA unter Belastung nachweisbar. Dies deckt sich mit den vorangehend diskutierten Studien, die DNA-Anstiege während Halbmarathon (Atamaniuk, Vidotto et al. 2004), Ultramarathon (Atamaniuk, Vidotto et al. 2010), Krafttraining (Atamaniuk, Vidotto et al. 2010) oder Laufbandergometrie (Beiter, Fragasso et al. 2011) beschrieben, wobei sich das Ausmaß der DNA-Anstiege unterscheidet. Die Halbmarathonläufer stiegen fast um den Faktor 20 an, die Laufband-Läufer zehnfach, während die Gewichtheber nur ca. vierfach stiegen. Daraus könnte man eine Zeit- und Belastungs-abhängige Freisetzung der DNA folgern, da zwar Gewichtheben großen Stress für den Körper bedeutet, dieser allerdings nur von sehr kurzer Dauer ist. Die in dieser Studie gemessenen Anstiege der kurzen Fragmente von fünf- bis neunfach kommen demnach sowohl den Ergebnissen der Kraftsportler als auch der

Laufband-Läufer nahe. Vom Prinzip her war die Laufbandergometrie der Radergometrie mit drei Minuten-Intervallen sehr ähnlich angelegt, aber interessanterweise setzten die auf dem Radergometer belasteten Sportler nur die Hälfte der cfDNA der Laufband-Kohorte frei. Ob es sich dabei um belastungs- oder methodenspezifische Differenzen handelt, kann man noch nicht sicher sagen. Gemessen wurden die Proben in der Laufband-Studie mit einem *Single-locus-Primer* für das Myostatin-Gen und nicht wie in der vorliegenden Studie mit unspezifischen Primern. Deshalb kann es durchaus sein, dass hier die Vergleichbarkeit nicht gegeben ist. Ein genauer Vergleich mit den Forschungsarbeiten von Atamaniuk ist ebenfalls nicht sicher durchzuführen, weil hier in der Literatur die Spezifikation des Primers fehlt.

Somit kann man aus den vorliegenden Studien folgern, dass die Radsportler mit ihrer DNA-Freisetzung im Rahmen des bisher Bekannten liegen, aber aufgrund der methodischen Varianz der einzelnen Studien keine genaue Aussage über den Grund dieser Unterschiede zu treffen ist. Wird der methodische Aspekt vernachlässigt, wäre eine Intensitäts- und Zeit-abhängige Beziehung durchaus möglich.

### **5.2.3. Zelluläre Immunantwort auf Belastung**

Man findet während der Spiroergometrie eine starke Vermehrung der Leukozyten in der Blutbahn, die vornehmlich lymphozytären Ursprungs ist. Es tragen auch die Neutrophilen zu der Steigerung bei, sind jedoch im Vergleich zu den Lymphozyten nicht so bedeutend für den Anstieg der Zellzahl unter Belastung. Während der Erholung sinkt die Leukozytenzahl wieder, allerdings nicht ganz in den Bereich des Ruhewertes. Dies liegt vor allem an der massiv nach Belastung vorliegenden Neutrophilie, während nun die Lymphozyten so stark abgefallen sind, dass sie sogar im Sinne einer Lymphopenie unter ihrem Ausgangswert liegen.

Im Kontext der eingangs diskutierten Literatur liegt diese Studie bezüglich der Belastungsdauer unter den kürzesten, da vielfach Protokolle mit Dauer von mehreren Stunden submaximaler Belastung gewählt wurden. Was aber die Intensität anbelangt, kann man bei einer im Rahmen eines Stufenprotokolls bis zur Erschöpfung durchgeführten Belastung von einer hohen Belastung sprechen. Ebenfalls einen Stufentest mit maximaler Ausbelastung wählte Morozov (Morozov, Pryatkin et al. 2003) in der bereits oben dargestellten Studie, in der Ruderer auf einem Laufband einem Stufentest unterzogen wurden. Beim Vergleichen der Ergebnisse fällt auf, dass

die Leukozytenzahlen vor und direkt nach Belastung quasi identisch sind. Die Erholungsprobe wurde nach einer Stunde und nicht wie in der vorliegenden Studie nach eineinhalb Stunden gewonnen. Eine weitere Probe wurde drei Stunden nach Belastung gewonnen und zeigte einen erneuten Anstieg der Leukozyten, vor allem durch eine massive Neutrophilie getragen. Dies gibt zu bedenken, dass vielleicht die Zellzahlen zum hier verwandten Nachbelastungs-Zeitpunkt von neunzig Minuten nach Belastungsende nicht ganz mit dem Ausgangsniveau übereinstimmen, weil bereits die Neutrophilie gemessen wurde, die sich im weiteren Verlauf noch stärker ausbilden wird. Dass dem nicht so sein muss, könnte man von Camus (Camus, Duchateau et al. 1994) ableiten. Ein ebenfalls zwanzigminütiges Belastungsprotokoll, allerdings submaximal, führte zu einer lymphozytären Leukozytose mit anschließender Neutrophilie bei Lymphopenie. Dieselben Zellzahlveränderungen wie bei den Radsportlern konnten im Rahmen eines Walking-Tests gezeigt werden (Nieman, Henson et al. 2005). Letzten Endes bleibt nur die durch die Literaturdiskussion schon gewonnene Erkenntnis, dass sich das Verhalten und Verhältnis der Zellpopulationen im Plasma je nach Belastungsform und -intensität unterscheidet. Im Kontext der vorgestellten Literatur sind bei den Radsportlern durchaus normale und auch in dieser Höhe zu erwartende Zellzahlveränderungen aufgetreten.

Bei der Korrelation der Zellen und der DNA-Plasma-Spiegel waren keinerlei klare statistische Zusammenhänge gegeben. Man hätte eventuell Korrelationen zwischen Lymphozyten in Ruhe mit den DNA-Spiegeln in Ruhe erwarten können, nachdem ein solches Verhalten schon *in vitro* gezeigt worden war (Anker, Stroun et al. 1975), aber dies war nicht der Fall. Dagegen korrelierten nur die Basophilen T1 mit der dementsprechenden DNA sowohl als auch mit der nach Erholung. Die negative Korrelation zwischen DNA und Basophilen suggeriert eine Beseitigungsfunktion dieser Zellpopulation für die DNA. Dies scheint allerdings recht unwahrscheinlich, da Basophile nicht in der Lage sind zu phagozytieren. Zwar verdoppeln sich die Basophilen unter Belastung, aber ihre Zahlen bleiben dennoch zu gering, als dass man sich diese Zellpopulation als effektiv agierende Zellgruppe vorstellen könnte.

In ähnlicher Weise ist es schwierig, die Korrelationen der Monozyten einzuordnen: Sie korrelieren zu T1 mit allen 70bp-Fragment-Messungen, an T2 noch mit T1 und T3. Im Verlauf des Belastungs-Protokolls ist ihre Veränderung negativ mit der der DNA korreliert. Die für die basophilen Granulozyten nicht zutreffende Überlegung der

DNA-Clearance durch Phagozytose könnte bei den Monozyten durchaus zutreffend sein, da das Aufnehmen von Partikeln aus der Blutbahn ihrer Aufgabe entspricht. Auch die Korrelationen für die zahlenmäßige Veränderung der Monozyten mit der Veränderung der DNA könnten dazu passen. Inwiefern Monozyten reine DNA-Stränge phagozytieren können, konnte in der Literatur-Recherche nicht ermittelt werden. Jedoch konnte bisher gezeigt werden, dass Monozyten *secondarily necrotic cell-derived material* (SNEC), also Zell-Debris von zu Grunde gegangenen Zellen, aufnehmen können (Munoz, Janko et al. 2009). Hinter diesem Begriff stecken alle Teile der Zelle von Organellen über Membranen zu Kern-DNA. Allerdings wird in diesem Artikel nicht klar, wie sehr die Phagozytose dieser SNEC-Partikel von an der DNA anhaftenden Proteinen abhängig ist, da sie beim Vorkommen von Antikörpern gegen ds-DNA von Lupus-Patienten stärker ausgeprägt ist als im Gesunden. Somit ist nicht sicher, dass auch im Abbau befindliche, blanke DNA-Stränge endozytiert werden, da die anti-ds-DNA Antikörper auch mit DNA-ständigen Proteinen interagieren. Allerdings ist bewiesen, dass von Monozyten abstammende Makrophagen zusätzlich zur plasmatisch vorkommenden DNase I für die Beseitigung der NETs verantwortlich sind (Farrera and Fadeel 2013). Folglich ist es durchaus möglich, dass ein zahlenmäßig starkes Vorhandensein dieser Zellen im Blut bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Belastung und demnach auch DNA-Freisetzung mit einer Aktivierung oder Aktivität der Monozyten einhergeht. Die Folge wäre die gezeigte gegenläufige Korrelation der Monozyten und der DNA. Jenseits der Überlegung zur Clearing-Funktion der Monozyten wäre ein mit Zellzerfall verbundener DNA-Anstieg mit den errechneten Korrelationen vereinbar, da Probanden mit hoher DNA geringe Monozytenzahlen aufweisen. Dies könnte auch für die weiter oben angeführten basophilen Granulozyten gelten. Hierbei ist anzuzweifeln, dass gerade nur diese beiden Zellpopulationen zerfallen sollen und ihre DNA freisetzen. Es könnten genauso wahrscheinlich alle anderen Zellen des Körpers sein, die hier aber nicht betrachtet wurden. Folglich wird der ungeordnete Zellzerfall jedweder Form zunächst nicht weiter in Betracht gezogen.

Aus den Betrachtungen über die basophilen Granulozyten und Monozyten wird ersichtlich, dass es keine direkte, offensichtliche Beziehung zwischen DNA-Anstiegen oder auch -abfällen und Zellpopulationen gibt. Zwar scheint es aus der Literatur heraus deutliche Beziehungen zu geben, die aber im Modell der sportlichen Belastung



so nicht bestätigt werden konnten. Die Neutrophilen und ihre DNA-Freisetzungsmöglichkeiten werden im Anschluss diskutiert.

#### **5.2.4. Sind NETs für den DNA Anstieg unter Belastung verantwortlich?**

Aus den vorangegangenen Betrachtungen zum Verhalten der Zellen in der Belastungssituation ging bereits hervor, dass es zu einem massiven Einstrom von Neutrophilen in die Blutbahn kommt, der sich im Erholungsintervall noch verstärkt. Diese Beobachtung ist jedoch rein deskriptiver, numerischer Natur und sagt noch nichts über ihren Aktivitätszustand aus. Für die Hauptfragestellung dieser Arbeit muss sich aber noch mit ihrer Aktivierung beschäftigt werden, was indirekt geschehen kann. Die beiden Enzyme Neutrophilen-spezifische Elastase und Myeloperoxidase sind bereits als unspezifische Aktivitätsmarker beschrieben worden (Peake, Wilson et al. 2004), da sie eine Degranulation und somit Aktivierung der Neutrophilen unter Belastung bezeugen. In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls eine Aktivierung mittels MPO- und Elastase-Anstieg gezeigt werden, der sich nach neunzig Minuten Erholung noch nicht ganz normalisiert hatte. Dazu ist die Literatur etwas widersprüchlich: Einerseits geht man von einer Normalisierung der Plasma-Level bereits nach kurzer Erholung aus (Camus, Pincemail et al. 1992), andererseits ist in anderen Belastungsarten und -dauern eine verzögerte Normalisierung der Plasmaspiegel beschrieben, die maximal bis fünf Tage nach Belastung benötigt (Neubauer, König et al. 2008). Die absoluten Enzymlevel der Elastase entsprechen nicht den Werten, die in unterschiedlichen Belastungsintensitäten bereits beschrieben wurde (Robson, Blannin et al. 1999; Neubauer, König et al. 2008). Und auch für die Myeloperoxidase waren die Triathleten von Neubauer nicht im Bereich der hiesigen Studie, die etwa dreifach so hohe MPO-Spiegel nachwies. Das heißt nicht, dass die hier verwandte Methodik falsch sein muss, finden sich MPO-Werte in dieser Höhe doch durchaus in der Literatur (Bury and Pirnay 1995). Wahrscheinlich resultieren die Differenzen für beide Enzyme aus den unterschiedlichen Belastungsintensitäten, die von moderat bis maximal und lange andauernd reichen. Einen Hinweis darauf gab die Studie von Bury, die unterschiedliche Degranulationskinetiken für unterschiedlichen Belastungsintensitäten und -dauern postulierte.

Bei der statistischen Auswertung der Daten fiel eine gute Korrelierbarkeit der Ruhe-(T1) und Erholungswerte (T3) der Elastase mit den jeweiligen Zeitpunkt-entsprechenden Neutrophilenzahlen auf. Nach Belastung ist die gute Korrelierbarkeit

für diese zwei Parameter allerdings aufgehoben. Für die Myeloperoxidase war keinerlei Korrelation möglich. Basierend auf diesen Zahlen kann folglich von einer Ruhesekretion des granulären Enzyms Elastase ausgegangen werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die beiden Enzyme in unterschiedlichen Typen Granula in der Zelle vorliegen und die Elastase-haltigen schneller und unspezifischer freigesetzt werden als diejenigen, die MPO enthalten (Faurischou and Borregaard 2003). Zudem unterscheidet sich ihre Funktion: Während die MPO ein rein bakterizides Enzym ist, kommt der Elastase auch eine Funktion bei der Zersetzung von Matrixproteinen zu, was benötigt wird, wenn der Granulozyt die Blutbahn verlassen will. Hierzu muss er Extrazellulärmatrix zersetzen können um sich einen Weg durch die das Gefäß umgebenden Strukturen zu bahnen. In Ruhe sezernieren alle Neutrophilen eine gewisse Menge an Elastase, da ein Gleichgewicht von intravasalem und wandständigem Vorhandensein der Zellen vorliegt. Unter Belastung kann man davon ausgehen, dass der erhöhte mechanische Scher-Stress der erhöhten Flussgeschwindigkeit Neutrophile in den Blutstrom reißt (Muir, Cruz et al. 1984) und somit nicht mehr soviel Durchtritt durch die Gefäßwand (Extravasation) stattfindet. Dazu passen könnte der nach Belastung nicht mehr auffindbare statistische Zusammenhang zwischen Neutrophilen und Elastase. Dass die Neutrophilen eine nicht-proportionale Antwort der Elastase auf den Stimulus Belastung geben, ist bereits in der Literatur bekannt (Biondi, Tassi et al. 2003). Auch für die MPO wurde konstatiert, dass die Verhältnismäßigkeit zwischen zahlenmäßigem Anstieg und absoluter MPO im Plasma nicht gegeben ist (Camus, Duchateau et al. 1994; Bury and Pirnay 1995). Im Zuge der Betrachtung der Enzymspiegel und Zellzahlen muss zudem beachtet werden, dass die Neutrophilen nach Erholung zahlenmäßig mehr vorhanden waren als nach Belastung, die Elastase-Spiegel aber fast wieder den Ruhewert erreicht hatten. Somit haben die Neutrophilen nach Belastung eine schwächere konstitutive Sekretion als vorher. Und auch die Zeitpunktkorrelationen mit einer positiven Korrelation zwischen Veränderung der Neutrophilen und MPO-Spiegel im Erholungsintervall stützten diese These. Man beobachtet, dass diejenigen Probanden mit der Plasma-MPO weniger stark abfallen wenn sie stärker mit den Neutrophilen während der Erholung ansteigen. Diese Überlegungen sind konsistent mit den Beobachtungen, dass Neutrophile nach Belastung nicht mehr in der Lage sind, in gleichem Maße *oxidative burst* zu betreiben wie in Ruhe (Li and Cheng 2007), es also zu einer Erschöpfung der Zellen kommt.

Gleiches drückt sich auch in ihrem verringerten Enzym-release pro Zelle aus (Robson, Blannin et al. 1999). Man kann also aus obigen Betrachtungen schließen, dass zwar Neutrophile aktiviert werden, sie aber keine einheitliche Reaktion zeigen. Wahrscheinlich liegen unter Belastung wie in einem Abszess unterschiedliche Aktivierungsstadien nebeneinander vor (Yipp, Petri et al. 2012) und je nach Individuum kann sich diese Reaktion auch zeitlich unterscheiden.

Nachdem die Aktivierung der Neutrophilen unter Belastung gezeigt werden konnte, bleibt die Frage, ob jene Aktivierung auch in Einklang mit den DNA-Anstiegen zu bringen ist. Dies würde helfen zu klären, ob wirklich NETs als DNA-haltige Strukturen für einen Anstieg der DNA verantwortlich sein können. Da die Neutrophilenspezifischen Enzyme in NETs eine strenge räumliche Assoziation zur DNA aufweisen (Brinkmann, Reichard et al. 2004), müssten auch parallele beziehungsweise proportionale Anstiege von DNA und Enzymen statistisch auffällig werden. So sind Korrelationen zwischen der Ruhe-Elastase und der T2-DNA und wiederum der T2-Elastase und der Erholungs-DNA statistisch auffällig, wobei jedoch die erste Korrelation negativ die zweite aber positiv ist. Das lässt die Interpretation zu, dass jemand, dessen Neutrophile eine starke Elastase-Ruhesekretion betreiben, unter Belastung nicht mehr so stark DNA-Freisetzen können. Um diese These zu erhärten fehlen allerdings ähnliche Korrelationen für die MPO. Eine statistische Auffälligkeit der MPO wäre auf Grund der bekannten NET-Struktur wünschenswert. Was man jedoch schließen kann ist, dass durch eine hohe Ruhesekretion die Zelle an Elastase verarmt. Dadurch wäre weniger Elastase vorhanden, die aber unabdingbar für die Dekondensation der DNA im Zuge der NETose ist (Papayannopoulos, Metzler et al. 2010). In den Mechanismus der NETose fügt sich auch die zweite Korrelation in Bezug auf die Elastase ein, da sie hohe Elastase-Spiegel bei Belastungsabbruch mit hohen DNA-Spiegeln nach Erholung verknüpft. Wenn man für das Durchlaufen der NETose einen Zeitansatz von zehn Minuten bis vier Stunden mit Maximum nach zwei Stunden (Brinkmann, Reichard et al. 2004) in Betracht zieht, kann eine Belastung von circa 20 Minuten zu kurz sein, als dass dieser Vorgang schon hätte vollständig ablaufen können. Wenn durch die Belastung nun eine systemische Entzündungsreaktion provoziert wurde, die in der Folge die Neutrophilen stimuliert, können es durchaus nach 90 Minuten NETs sein, die im Plasma vorliegen. Wie bereits erwähnt fehlen zur Elastase parallele Korrelationen der Myeloperoxidase, die nur nach Belastung (T2) positiv mit der Ruhe- und negativ mit der Erholungs-DNA

korreliert, aber nicht mit der Belastungs-DNA selbst. Die Korrelationen zwischen MPO und DNA nach Belastung erreichen nur R-Werte von circa  $R=0,23$ , was kein zufriedenstellender statistischer Wert ist. Die Korrelationen der MPO und DNA bedeuten, dass jemand mit hohen Ruhe-DNA-Werten auch hohe Belastungs-MPO-Level erreicht, aber die hohen Belastungs-MPO-Werte dann mit niedrigen Erholungs-DNA-Leveln vergesellschaftet sind. Allerdings sind es auch nur die langen Fragmente nach Erholung, die korrelieren. Somit verändert sich die Aussage dahingehend, dass hohe Belastungs-MPO-Werte mit höher fragmentierter DNA assoziiert sind, man folglich zwischen MPO-Spiegel und DNA-Abbau eine Verbindung ziehen kann. In dieselbe Richtung deutet die Korrelation der Veränderungen von DNA und MPO, die positiv ist. Dies bedeutet, dass große Abfälle in Plasma-MPO auch mit großen Veränderungen der DNA einhergehen. Fasst man zusammen, resultiert folgendes Modell: Hohe Ruhe-Plasma-DNA-Spiegel enden mit hohen Nach-Belastungs-MPO-Leveln, die sich wiederum proportional zur Gesamt-DNA abbauen, allerdings geht eine hohe T2-MPO mit weniger langen Fragmenten nach Erholung einher. Letzterer Punkt ist in sich wahrscheinlich nicht ganz schlüssig, da die Korrelationen des Erholungszeitraums einerseits aussagen, dass sowohl kurze als auch lange Fragmente gleich stark fallen wie die MPO, aber auf der anderen Seite verzeichnen diejenigen mit hohen T2-MPO-Spiegeln geringere lang-fragmentierte DNA. Somit müssten sie schon bei Belastungsabbruch geringere Mengen an langfragmentierter DNA aufweisen. Das ist auch der Fall, wenn man sich die graphische Auswertung der Einzelmessungen anschaut (nicht gezeigt). Da es, wie bereits oben angedeutet, eine schlechte statistische Verknüpfbarkeit der T2-DNA mit der T2-MPO gibt, muss man von einer recht unspezifischen und unabhängigen Freisetzung der MPO und DNA in das Plasma unter Belastung ausgehen. Da aber bereits angesprochen wurde, dass die Neutrophilen unterschiedlich stark von Belastung aktiviert werden, könnte dies für die NET-gebundene DNA-Freisetzung ebenso der Fall sein.

Alles in allem scheint es aus den eben geschilderten Betrachtungen heraus schwierig zu sein, die NET-Hypothese mit den vorliegenden Daten zu beweisen. Zwar werden beide Formen der neutrophilen Enzyme in etwa gleich stark unter Belastung ins Plasma sezerniert, aber die DNA zeigt hier kein direktes, paralleles oder proportionales Verhalten, das sich mit der Enzymfreisetzung in Deckung bringen ließe. Die reinen Daten könnten wegen der vorhandenen Anstiege aller NET-Bestandteile dabei auf NETs hindeuten. Und auch wenn man immer wieder statistisch

gute Korrelationen berechnen kann, die den Schluss erleichtern könnten, dass es eine Assoziation der Enzyme zur DNA gibt, beispielsweise die positive Korrelation der MPO und DNA im Erholungsintervall, so ist es dennoch schwierig aus all den Zahlen ein schlüssiges Gesamtkonzept zu etablieren. Aber die große Anzahl an starken Korrelationskoeffizienten macht es wahrscheinlich, dass die Daten nicht bloß auf purem Zufall beruhen. Für einen sicheren Nachweis könnten weitere Untersuchungen mit beispielsweise direkter Visualisierung der NETs im Plasma nach Belastung beweisend sein.

#### **5.2.5. DNA als leistungsphysiologischer Parameter**

Als letzter Punkt soll nun abschließend der Bezug der DNA zur Leistungsphysiologie hergestellt werden. Dabei ist der einfachste Zusammenhang der Statistik der Leistungsphysiologie mit der DNA die positive Korrelation der absoluten Leistung pro Kilogramm Körpergewicht an der aeroben Schwelle sowie der maximal erbrachten Leistung und der DNA-Spiegel zum Zeitpunkt T2, also dem Belastungsabbruch. Gleichermäßen fügt sich in dieses Bild die negative Korrelation des respiratorischen Quotienten bei maximaler Leistung mit der DNA zum Zeitpunkt des Belastungsabbruchs. Wenn man die beiden leistungsspezifischen Werte RQ und maximale Leistung in Verbindung bringt, dann korrelieren sie invers mit einem  $R = -0,54$  miteinander. Aus diesen Zahlen und Zusammenhängen ist ersichtlich, dass jemand mit einer hohen maximalen Leistung nicht über eine große anaerobe Kapazität mit auf Kohlenhydraten basierendem Stoffwechsel verfügt, da numerisch gesehen, ein geringer RQ mit einer höheren Leistung pro Kilogramm Körpergewicht zusammenfällt. Um dazu in der Lage zu sein, muss er eine gute Grundlagenausdauer besitzen, die ihm erlaubt über lange Zeit noch fettbasiert und aerob Leistung zu erbringen. Somit legen die Zahlen nahe, dass der DNA-Spiegel bei Belastungsabbruch ein Maß für die Ausdauerleistungsfähigkeit einer Person sein könnte.

Ein naheliegender Gedanke ist durchaus, dass ein Proband mit hoher Gesamtleistung lange auf dem Fahrrad getreten haben muss. Und gesetzt den Fall, dass die DNA-Freisetzung vor allem ein Zeit-abhängiger Prozess nach erfolgter Stimulation durch Belastungs-bedingte Stimulantien, welche auch immer es seien, ist, dann hat ein Proband mit längerem Belastungsintervall auch länger die Möglichkeit, DNA in das Blut abzugeben. Diese Bedenken müssen aber auch berücksichtigen, dass der Wert in W/kg KG angegeben ist und der Absolutwert gar nicht so entscheidend ist, da die Leistung durch das Gewicht relativiert wird. Es ist möglich, dass unter anderem auch

eine Zeitabhängigkeit gegeben ist, die jedoch durch das Versuchsprotokoll und die Probandenwahl der gegenwärtigen Studie nivelliert und begrenzt werden sollte, da auf ein vergleichbares Leistungsniveau wertgelegt wurde.

Zurück zu der Tatsache, dass ein Ausdauer-trainierter Sportler einen nicht so hohen RQ bei Ausbelastung erzielt, also weniger auf einen reinen Kohlenhydratstoffwechsel angewiesen ist. Dies ermöglicht den Gedanken, dass ein Sportler mit hohem RQ bei maximaler Belastung noch stärker darauf angewiesen ist, die Glukose vollständig aus dem Blut in die Muskeln aufzunehmen. Wenn also die DNA-Freisetzung ein aktiver, Energie-verbrauchender (Glukose-verbrauchender) Prozess ist, ihr aber keine Energieträger unter Belastung zur Verfügung stünden, dann würde es wiederum erklären, dass Sportler mit einem starken anaeroben Stoffwechsel nicht so hohe Level an frei zirkulierender DNA aufweisen können. Sollte im Gegensatz zu den oben diskutierten Ergebnissen die NETose unter Belastung doch eine Rolle spielen, würde sich der Sachverhalt in die Erklärung gut einfügen, dass hohe Blutglukoselevel den *oxidative burst* der neutrophilen Granulozyten beeinträchtigen (Sato, Shimizu et al. 1992) und zudem nach Ausdauertraining die Glucoseaufnahme aus dem Blut nicht mehr so stark von Statten geht wie im untrainierten Zustand (Bergman, Butterfield et al. 1999), also vermehrt Glucose im Blut vorkommt. Wie sehr sich die Blutglucose-Spiegel unter Belastung von trainiert zu untrainiert darstellen, konnte aus der Literatur heraus nicht geklärt werden. In dieser Studie waren alle Probanden als gut trainiert anzusehen, jedoch unterscheidet sich die Fähigkeit des Kohlenhydratstoffwechsels von Person zu Person. Nichts desto trotz bleibt der Schluss weiterhin möglich, dass es eine Verbindung der Ausdauerleistungsfähigkeit und der DNA-Freisetzung gibt. Ob diese Verbindung dasselbe Substrat für die Energiegewinnung, nämlich Glucose, ist oder ein bis dato unbekannter und auch nicht naheliegender Zusammenhang, bleibt weiter zu untersuchen.

Ein weiterer Aspekt des anaeroben, Kohlenhydrat-basierten Stoffwechsels bei ermüdender Belastung ist die Verstoffwechslung von Glucose zu Laktat. Die Brücke zwischen freier DNA und Laktat wurde bereits geschlagen, indem ein quasi paralleler Anstieg von Laktat und DNA im Verlauf einer Ergometer-Belastung beschrieben wurde (Beiter, Fragasso et al. 2011). Bei genauer Betrachtung der Daten fällt ein geringfügig früherer Anstieg der DNA im Vergleich zum Laktat auf. In der vorliegenden Studie ergab sich allerdings keinerlei Korrelation des absoluten Laktats mit der DNA und auch die Veränderungen der DNA korrelierten nicht in dem Maße

mit dem Laktat wie die anderen unter Belastung gemessenen Parameter. Das Laktat korreliert mäßig gut mit der Leistung an der metabolisch bestimmten Schwelle ( $R=0,6$ ), aber äußerst schlecht mit der maximalen Leistung pro Kilogramm Körpergewicht. Aus dieser Beobachtung kann man folgern, dass es zwar eine parallele, exponentielle Freisetzung von DNA und Laktat geben mag, die aber in keinster Weise in absoluten Dimensionen parallel oder verhältnismäßig ist. Der bereits diskutierte RQ gibt ebenso Auskunft über die anaerobe Stoffwechselfähigkeit wie das Laktat. Demzufolge müsste eigentlich die Korrelation des Laktat mit der DNA der des RQ entsprechen, was jedoch nicht der Fall ist. Immerhin korrelieren diese beiden Parameter an der metabolischen Schwelle mit einem  $R=0,54$  miteinander, zu anderen Zeitpunkten wesentlich schlechter. Man muss also schlussfolgern, dass zwar beide Parameter den anaeroben Stoffwechsel abbilden, dies aber mit unterschiedlichen Kinetiken und Absolutwerten tun. In Zusammenschau mit der Beiter-Studie und den gerade angestellten Überlegungen zum anaeroben Stoffwechsel verbleibt der Gedanke, dass die DNA und das Laktat zwar ähnliche exponentielle Freisetzungskinetiken haben, aber durch ihre etwas unterschiedliche zeitliche Anflutung im Plasma nicht in Korrelation zu den hier gefundenen Ergebnissen zu bringen sind. Demzufolge besitzen die DNA und das Laktat unterschiedliche Aussagekraft in Bezug auf die Leistungsfähigkeit eines Probanden: Das Laktat ist eher ein Maß für die Kohlenhydratverstoffwechslung, während die DNA ein prädiktiver Marker für die absolute Leistungsfähigkeit sein könnte.

Als zweite Gruppe der leistungsphysiologischen Parameter wiesen die kardiorespiratorischen Parameter Herzfrequenz und Ventilation hohe Korrelationskoeffizienten mit der DNA auf. Hierbei sind einerseits die Zeitpunktwerte aber auch die Veränderungswerte interessant und aufschlussreich. Ein Sportler mit niedriger Ruheventilation erreicht ein höheres DNA-Niveau bei Belastungsabbruch als ein Sportler mit einer höheren Ruheatmung. An der respiratorisch bestimmten Schwelle ist das Verhältnis andersherum. Somit haben sich diejenigen mit niedrigem Ausgangswert bereits schon verhältnismäßig mehr in Bezug auf die Atmung pro Minute gesteigert als die anderen. Zwar haben wir keine Korrelation, die eine Verbindung zwischen der maximalen Ventilation und der T2-DNA belegt, aber die Zeitpunktveränderungen passen genau in das eben skizzierte Bild: Diese besagen, dass ein starker DNA-Anstieg im Belastungszeitraum mit einem geringeren Anstieg der Ventilation zwischen Schwelle und Maximum einhergeht. Und die Korrelation mit

dem Gesamtanstieg der Ventilation zwischen Ausgangswert in Ruhe und der maximal am Belastungsabbruch erreichten Ventilation fügt sich nahtlos ein. Man kann zumindest für die Ventilation zusammenfassen: Ein Sportler steigert sich bis zur Schwelle stark und anschließend nicht mehr so sehr mit der Ventilation, wenn er kleinere absolute DNA-Mengen im Blutplasma nach Belastung aufweist. Andersherum verhält sich derjenige mit hohen Mengen DNA im Blut: Hier findet bis zur Schwelle ein moderater und später ein relativ stärkerer Ventilationsanstieg statt. Für die Erholungszeit gibt es negative Korrelationen zwischen Ventilationsanstieg und DNA Abfall. Jene beruhen einerseits auf der mathematischen Berechnung der Zeitpunktverhältnisse als Quotient des jeweils folgenden dividiert durch den vorangehenden Wert, andererseits auf der Tatsache, dass diejenigen mit der DNA nicht so stark abfallen können, die unter Belastung auch einen eher geringen Anstieg zu verzeichnen hatten. Passend zu den Werten der Ventilation sind die Korrelationen zwischen DNA und Herzfrequenz an der respiratorisch bestimmten Schwelle und die Veränderung zwischen ebendieser Schwelle und dem Maximum mit der Veränderung der DNA unter Belastung. Daran sieht man trotz der leicht unterschiedlichen Anstiege von Herzfrequenz und Ventilation im Verlauf der Belastung (Abb. 2) eine einheitliche kardiorespiratorische Reaktion des Körpers. Da die DNA nur vor und nach Belastung gemessen wurde, ist es leider nicht möglich, auch die Schwellenwerte miteinander zu korrelieren. Da Ventilation und Leistung an der Schwelle positiv mit der DNA korrelieren, soll auch das Verhältnis zwischen den beiden Leistungsparametern gezeigt werden. Die Leistung korreliert mit der Ventilation an der Schwelle mit einem  $R=0,82$  und bei maximaler Last immerhin noch mit  $R=0,62$ . Somit schließt sich der Kreis der Parameter. Wenn man dann noch beachtet, dass die DNA bei Belastungsabbruch mit Koeffizienten um  $R=0,5$  mit der  $VO_2max$  korreliert, dann ist ein vollständiger Ringschluss der Logik der Belastungsparameter erreicht, da wir die absolute Ventilation und die Sauerstoffaufnahme mit der absoluten Leistung in Verbindung bringen konnten und diese Parameter allesamt positiv mit der frei vorliegenden DNA korrelieren. Es ist somit möglich, Marker der Ausdauerleistungsfähigkeit in Bezug zur Menge an frei vorliegender DNA zu setzen. Dass die Feststellungen in Bezug auf die  $VO_2max$  und die Maximalleistung durchaus stimmig sind, ist bereits gezeigt worden (Hawley and Noakes 1992), wobei es auch Stimmen gibt, die eine derartige Verbindung zwischen  $VO_2max$  und Leistung bestreiten (Bishop, Jenkins et al. 1998). Die Ventilation und die  $VO_2max$  steigen unter



Belastung bis zur respiratorischen Schwelle parallel an, danach steigt die Ventilation disproportional, da die zunehmende Hyperkapnie den Atemtrieb verstärkt. Trotz dieser etwas unterschiedlichen Trends sind  $VO_2\text{max}$  und Ventilation an der Schwelle und beim Maximum gut zu korrelieren. In die Diskussion der respiratorischen Parameter fügt sich der oben diskutierte Sachverhalt des respiratorischen Quotienten ebenfalls ein, da jemand, der dem System nicht so viel Sauerstoff zuführen kann, sei es bedingt durch Limitation der Gasaufnahme oder des -austauschs, mehr anaeroben Stoffwechsel betreiben muss und folglich einen höheren RQ hat. Die andere Position ist derjenige mit guter Sauerstoffaufnahme und darum geringem RQ aber hoher Endleistung und hohem DNA-Spiegel bei Belastungsabbruch.

Für die in sich schlüssigen Überlegungen über die Belastungsphysiologie gibt es in der Literatur ausreichend Nachweise, wenn auch zum Teil widersprüchliche. Aufgrund der oben dargelegten Überlegungen scheint die cfDNA ein plausibler Marker der belastungsphysiologischen Vorgänge zu sein, auch wenn es aus den vorliegenden Daten keinen offensichtlichen Hinweis auf die Zusammenhänge gibt. In diesem Kontext legen die Daten nahe, dass die cfDNA ein indirekter Marker für die Ausdauerleistungsfähigkeit einer Person sein kann. Da aber die Forschung zur zellfreien DNA bei Belastung noch am Anfang steht, bedarf es weiterer Studien zum genauen Verständnis dazu, wie die einzelnen Prozesse ineinander greifen.

### **5.3. Kritische Überlegungen**

Ziel dieser Studie war es primär, mittels indirekter Parameter darüber eine Aussage treffen zu können, ob die DNA aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird. Die hierfür verwandte Methodik entstammt der klinischen NET-Forschung, die als Ansatz des NET-Nachweises jeweils die DNA und die MPO nachweist. *In vitro* geschieht dies meist mikroskopisch, aber Lögters (Logters, Paunel-Gorgulu et al. 2009) führte den NET-Beweis in Kniegelenkspunktaten mit eben dieser Methodik. Nun ist ein Kniegelenkspunktat für gewöhnlich zellfrei und ein Auftreten von MPO und Zellen bedeutet schon eine entzündliche Reaktion. Ganz anders im Plasma, wo immer Leukozyten in einem gewissen Aktivitätsstadium verharren und MPO und Elastase durchgehend in einem niedrigen Grundspiegel messbar sind. Somit muss die Frage erlaubt sein, ob diese Methodik für das Plasma spezifisch genug war. Ein zentrales Protein der NETose sind die citrullinierten Histone, die bisher noch nicht im Blutplasma im Zusammenhang mit anderen Vorgängen nachgewiesen wurden und

folglich ein guter Marker für plasmatische NETose wären. Leider war es wegen technischer Probleme nicht möglich im Rahmen dieser Studie den citH3-Nachweis zu führen. Zudem wäre es sehr wahrscheinlich lohnenswert zu versuchen, ob es von direkt nach Belastung entnommenem Plasma auch möglich ist, dieselben fluoreszenzmikroskopischen Bilder wie nach *in vitro*-Stimulation von neutrophilen Granulozyten zu erzeugen. Eine weitere Möglichkeit wäre die DNA direkt auf Neutrophilen-spezifische Methylierungsmuster zu untersuchen.

## 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie an Radsportlern auf dem Fahrradergometer war es zu zeigen, dass die unter Belastung ansteigende DNA aus aus neutrophilen Granulozyten stammenden NETs besteht. Zudem sollten die während der Belastung gemessenen leistungsphysiologischen Parameter in Bezug zur DNA im Verlauf des Belastungsprotokolls gesetzt werden, um etwaige Zusammenhänge zwischen Belastung, Leistungsfähigkeit und DNA aufzuzeigen. Dafür wurden elf Amateur-Radsportler im Rahmen einer Belastungsergometrie untersucht. Die Messung der Plasma-DNA erfolgte mittels RT-PCR für repetitive Sequenzen während die Aktivierung der Neutrophilen über Enzymmessungen der Myeloperoxidase und Elastase im Plasma geschah.

Alle aus der Literatur bekannten Fakten wie Leukozytose, DNA-Anstieg und Degranulation der Neutrophilen unter Belastung konnten auch im Modell der Fahrradergometrie im Rahmen eines Stufenprotokolls gezeigt werden. Was jedoch nicht eindeutig statistisch zu beweisen gelang, ist eine Verbindung der DNA zu der Degranulationsreaktion der neutrophilen Granulozyten. Zwar erscheinen immer wieder statistische Verbindungen zwischen den Aktivitätsmarkern der neutrophilen Granulozyten und der Plasma-DNA, aber es ist anhand der gegebenen Daten kein einwandfreier Beweis für die These zu erbringen. Die Frage nach der Verknüpfbarkeit von DNA und leistungsphysiologischen Parametern ergab eindeutigere Ergebnisse. So war es möglich, die absolute Leistung eines Probanden proportional mit dem Plasma-DNA-Spiegel zu verknüpfen. Des Weiteren zeigte sich derselbe Zusammenhang auch für die Ventilation und Herzfrequenz. Im Allgemeinen scheint es eine Verknüpfung zwischen Ausdauerleistungsfähigkeit und demzufolge aerober Stoffwechselkapazität und DNA-Freisetzung zu geben.

Zwar ist es noch nicht möglich, die genaue Herkunft und Funktion der DNA während einer sportlichen Belastungssituation zu erklären, aber wenn die DNA in Verhältnis oder Verbindung zu der absoluten körperlichen Leistungsfähigkeit und der Leistungsfähigkeit des kardiorespiratorischen Systems steht, wäre sie gegebenenfalls ein geeigneter Indikator für Aussagen darüber. Für eine solche analytische Funktion bedarf es aber noch mehr Erkenntnissen über die physiologischen Mechanismen, die hinter dem Phänomen der freien DNA unter Belastung stehen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abi Abdallah, D. S., C. Lin, et al. (2012). "Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps." Infection and immunity **80**(2): 768-777.
- Akong-Moore, K., O. A. Chow, et al. (2012). "Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation." PloS one **7**(8): e42984.
- Alghamdi, A. S. and D. N. Foster (2005). "Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps." Biology of reproduction **73**(6): 1174-1181.
- Ambarish, V., S. Chandrashekara, et al. (2012). "Moderate regular exercises reduce inflammatory response for physical stress." Indian J Physiol Pharmacol **56**(1): 7-14.
- Amoura, Z., J. C. Piette, et al. (1997). "Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity." Arthritis Rheum **40**(12): 2217-2225.
- Anker, P., F. Lefort, et al. (1997). "K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer." Gastroenterology **112**(4): 1114-1120.
- Anker, P., H. Mulcahy, et al. (1999). "Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients." Cancer Metastasis Rev **18**(1): 65-73.
- Anker, P., H. Mulcahy, et al. (2003). "Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: time for large-scale clinical studies?" Int J Cancer **103**(2): 149-152.
- Anker, P. and M. Stroun (2012). "Circulating nucleic acids and evolution." Expert Opin Biol Ther.
- Anker, P., M. Stroun, et al. (1975). "Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system." Cancer Res **35**(9): 2375-2382.
- Atamaniuk, J., K. M. Stuhlmeier, et al. (2008). "Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells." Eur J Appl Physiol **104**(4): 711-717.
- Atamaniuk, J., C. Vidotto, et al. (2010). "Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise." Eur J Appl Physiol **110**(4): 695-701.
- Atamaniuk, J., C. Vidotto, et al. (2004). "Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise." Clin Chem **50**(9): 1668-1670.
- Baum, M., T. Geitner, et al. (1996). "The role of the spleen in the leucocytosis of exercise: consequences for physiology and pathophysiology." Int J Sports Med **17**(8): 604-607.
- Beiter, T., A. Fragasso, et al. (2011). "Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo." Clin Chem **57**(4): 633-636.
- Bell, D. A. and B. Morrison (1991). "The spontaneous apoptotic cell death of normal human lymphocytes in vitro: the release of, and immunoproliferative response to, nucleosomes in vitro." Clin Immunol Immunopathol **60**(1): 13-26.
- Bell, D. A., B. Morrison, et al. (1990). "Immunogenic DNA-related factors. Nucleosomes spontaneously released from normal murine lymphoid cells stimulate proliferation and immunoglobulin synthesis of normal mouse lymphocytes." J Clin Invest **85**(5): 1487-1496.
- Bergman, B. C., G. E. Butterfield, et al. (1999). "Muscle net glucose uptake and glucose kinetics after endurance training in men." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): E81-92.

- Biondi, R., C. Tassi, et al. (2003). "Changes in plasma level of human leukocyte elastase during leukocytosis from physical effort." Immunopharmacol Immunotoxicol **25**(3): 385-396.
- Bishop, D., D. G. Jenkins, et al. (1998). "The relationship between plasma lactate parameters, Wpeak and 1-h cycling performance in women." Med Sci Sports Exerc **30**(8): 1270-1275.
- Boldt, D. H., R. P. MacDermott, et al. (1977). "Excretion of DNA by purified human lymphocyte subpopulations." J Immunol **118**(4): 1495-1498.
- Bosenberg, A. T., J. G. Brock-Utne, et al. (1988). "Strenuous exercise causes systemic endotoxemia." J Appl Physiol **65**(1): 106-108.
- Brinkmann, V., U. Reichard, et al. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**(5663): 1532-1535.
- Brock-Utne, J. G., S. L. Gaffin, et al. (1988). "Endotoxaemia in exhausted runners after a long-distance race." S Afr Med J **73**(9): 533-536.
- Bury, T. B. and F. Pirnay (1995). "Effect of prolonged exercise on neutrophil myeloperoxidase secretion." Int J Sports Med **16**(6): 410-412.
- Camus, G., J. Duchateau, et al. (1994). "Anaphylatoxin C5a production during short-term submaximal dynamic exercise in man." Int J Sports Med **15**(1): 32-35.
- Camus, G., M. Nys, et al. (1998). "Endotoxaemia, production of tumour necrosis factor alpha and polymorphonuclear neutrophil activation following strenuous exercise in humans." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **79**(1): 62-68.
- Camus, G., M. Nys, et al. (1998). "Possible in vivo tolerance of human polymorphonuclear neutrophil to low-grade exercise-induced endotoxaemia." Mediators Inflamm **7**(6): 413-415.
- Camus, G., J. Pincemail, et al. (1992). "Plasma levels of polymorphonuclear elastase and myeloperoxidase after uphill walking and downhill running at similar energy cost." Int J Sports Med **13**(6): 443-446.
- Camus, G., J. Poortmans, et al. (1997). "Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race." Clin Sci (Lond) **92**(4): 415-422.
- Chen, X. Q., M. Stroun, et al. (1996). "Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients." Nat Med **2**(9): 1033-1035.
- Choi, J. J., C. F. Reich, 3rd, et al. (2004). "Release of DNA from dead and dying lymphocyte and monocyte cell lines in vitro." Scand J Immunol **60**(1-2): 159-166.
- Clark, S. R., A. C. Ma, et al. (2007). "Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood." Nature medicine **13**(4): 463-469.
- Cuthbert, G. L., S. Daujat, et al. (2004). "Histone Deimination Antagonizes Arginine Methylation." Cell **118**(5): 545-553.
- Degerstrom, J. and B. Osterud (2006). "Increased inflammatory response of blood cells to repeated bout of endurance exercise." Med Sci Sports Exerc **38**(7): 1297-1303.
- Demers, M., D. S. Krause, et al. (2012). "Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(32): 13076-13081.
- Diehl, F., M. Li, et al. (2005). "Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(45): 16368-16373.
- Doring, Y., H. D. Manthey, et al. (2012). "Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis." Circulation **125**(13): 1673-1683.
- El Benna, J., J. Han, et al. (1996). "Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK." Arch Biochem Biophys **334**(2): 395-400.

- Fadeel, B., A. Ahlin, et al. (1999). "Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species." (0006-4971 (Print)).
- Farrera, C. and B. Fadeel (2013). "Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process." *Journal of immunology* **191**(5): 2647-2656.
- Fatouros, I. G., A. Destouni, et al. (2006). "Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining." *Clin Chem* **52**(9): 1820-1824.
- Fatouros, I. G., A. Z. Jamurtas, et al. (2010). "Time of sampling is crucial for measurement of cell-free plasma DNA following acute aseptic inflammation induced by exercise." *Clin Biochem* **43**(16-17): 1368-1370.
- Faurschou, M. and N. Borregaard (2003). "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation." *Microbes and Infection* **5**(14): 1317-1327.
- Foster, N. K., J. B. Martyn, et al. (1986). "Leukocytosis of exercise: role of cardiac output and catecholamines." *J Appl Physiol* **61**(6): 2218-2223.
- Fournie, G. J., J. P. Courtin, et al. (1995). "Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours." *Cancer Lett* **91**(2): 221-227.
- Frickhofen, N., E. Muller, et al. (1997). "Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia." *Blood* **90**(12): 4953-4960.
- Fuchs, T. A., U. Abed, et al. (2007). "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps." *J Cell Biol* **176**(2): 231-241.
- Fuchs, T. A., A. Brill, et al. (2010). "Extracellular DNA traps promote thrombosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(36): 15880-15885.
- Fuchs, T. A., A. Brill, et al. (2012). "Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(8): 1777-1783.
- Galun, E., R. Burstein, et al. (1987). "Changes of white blood cell count during prolonged exercise." *Int J Sports Med* **8**(4): 253-255.
- Garcia-Romo, G. S., S. Caielli, et al. (2011). "Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus." *Sci Transl Med* **3**(73): 73ra20.
- Gleeson, M., N. Bishop, et al. (2011). "Influence of training load on upper respiratory tract infection incidence and antigen-stimulated cytokine production." *Scand J Med Sci Sports*.
- Gleeson, M., A. K. Blannin, et al. (1995). "Short-term changes in the blood leucocyte and platelet count following different durations of high-intensity treadmill running." *J Sports Sci* **13**(2): 115-123.
- Guimaraes-Costa, A. B., M. T. Nascimento, et al. (2009). "Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(16): 6748-6753.
- Gupta, A., P. Hasler, et al. (2006). "Occurrence of neutrophil extracellular DNA traps (NETs) in pre-eclampsia: a link with elevated levels of cell-free DNA?" *Ann N Y Acad Sci* **1075**: 118-122.
- Gupta, A. K., M. B. Joshi, et al. (2010). "Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death." *FEBS Lett* **584**(14): 3193-3197.
- Hahn, S., S. Giaglis, et al. (2012). "Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss." *Frontiers in immunology*(1664-3224 (Electronic)).

- Hakim, A., T. A. Fuchs, et al. (2011). "Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation." *Nat Chem Biol* **7**(2): 75-77.
- Hakim, A., B. G. Furnrohr, et al. (2010). "Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis." (1091-6490 (Electronic)).
- Hamaguchi, S., M. Seki, et al. (2012). "Case of invasive nontypable Haemophilus influenzae respiratory tract infection with a large quantity of neutrophil extracellular traps in sputum." *Journal of inflammation research* **5**: 137-140.
- Hampton, M. B., I. Stamenkovic, et al. (2002). "Interaction with substrate sensitises caspase-3 to inactivation by hydrogen peroxide." (0014-5793 (Print)).
- Hawley, J. A. and T. D. Noakes (1992). "Peak power output predicts maximal oxygen uptake and performance time in trained cyclists." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **65**(1): 79-83.
- Hellstrom, I., H. O. Sjogren, et al. (1971). "Blocking of cell-mediated tumor immunity by sera from patients with growing neoplasms." *Int J Cancer* **7**(2): 226-237.
- Heyward, V. H. (1998). "Advance Fitness Assessment & Exercise Prescription." *The Physical Fitness Specialist Certification Manual 3rd Edition*: 48.
- Hirsch, J. G. (1958). "Bactericidal action of histone." *J Exp Med* **108**(6): 925-944.
- Jahr, S., H. Hentze, et al. (2001). "DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells." *Cancer Res* **61**(4): 1659-1665.
- Keen, P., D. A. McCarthy, et al. (1995). "Leucocyte and erythrocyte counts during a multi-stage cycling race ('the Milk Race')." *Br J Sports Med* **29**(1): 61-65.
- Keshari, R. S., A. Verma, et al. (2013). "Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils." *Journal of cellular biochemistry* **114**(3): 532-540.
- Lam, N. Y., T. H. Rainer, et al. (2003). "Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients." *Clin Chem* **49**(8): 1286-1291.
- LaPerriere, A., M. H. Antoni, et al. (1994). "Effects of aerobic exercise training on lymphocyte subpopulations." *Int J Sports Med* **15 Suppl 3**: S127-130.
- Leffler, J., M. Martin, et al. (2012). "Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease." *J Immunol* **188**(7): 3522-3531.
- Leon, S. A., B. Shapiro, et al. (1977). "Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy." *Cancer Res* **37**(3): 646-650.
- Leshner, M., S. Wang, et al. (2012). "PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures." *Frontiers in immunology* **3**: 307.
- Li, T. L. and P. Y. Cheng (2007). "Alterations of immunoendocrine responses during the recovery period after acute prolonged cycling." *Eur J Appl Physiol* **101**(5): 539-546.
- Lim, J. H., M. J. Kim, et al. (2011). "Non-invasive prenatal detection of achondroplasia using circulating fetal DNA in maternal plasma." *Journal of assisted reproduction and genetics* **28**(2): 167-172.
- Lin, A. M., C. J. Rubin, et al. (2011). "Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis." *Journal of immunology* **187**(1): 490-500.
- Lo, Y. M., T. H. Rainer, et al. (2000). "Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients." *Clin Chem* **46**(3): 319-323.
- Lo, Y. M. D., N. Corbetta, et al. (1997). "Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum." *The Lancet* **350**(9076): 485-487.

- Logters, T., A. Paunel-Gorgulu, et al. (2009). "Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis." *J Orthop Res* **27**(11): 1401-1407.
- Mandel, P. and P. Métais (1948). "Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme." *CR Acad Sci Paris*(142: 241-243).
- Margraf, S., T. Logters, et al. (2008). "Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis." *Shock* **30**(4): 352-358.
- Megens, R. T., S. Vijayan, et al. (2012). "Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis." *Thromb Haemost* **107**(3): 597-598.
- Metzler, K. D., T. A. Fuchs, et al. (2011). "Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity." *Blood* **117**(3): 953-959.
- Moreira, V. G., B. Prieto, et al. (2010). "Usefulness of cell-free plasma DNA, procalcitonin and C-reactive protein as markers of infection in febrile patients." *Ann Clin Biochem* **47**(Pt 3): 253-258.
- Morozov, V. I., S. A. Pryatkin, et al. (2003). "Effect of exercise to exhaustion on myeloperoxidase and lysozyme release from blood neutrophils." *Eur J Appl Physiol* **89**(3-4): 257-262.
- Mucci, P., F. Durand, et al. (2000). "Interleukins 1-beta, -8, and histamine increases in highly trained, exercising athletes." *Med Sci Sports Exerc* **32**(6): 1094-1100.
- Muir, A. L., M. Cruz, et al. (1984). "Leukocyte kinetics in the human lung: role of exercise and catecholamines." *J Appl Physiol* **57**(3): 711-719.
- Munoz, L. E., C. Janko, et al. (2009). "Remnants of secondarily necrotic cells fuel inflammation in systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* **60**(6): 1733-1742.
- Nawroz, H., W. Koch, et al. (1996). "Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients." *Nat Med* **2**(9): 1035-1037.
- Neeli, I., N. Dwivedi, et al. (2009). "Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils." *J Innate Immun* **1**(3): 194-201.
- Neeli, I., S. N. Khan, et al. (2008). "Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils." *J Immunol* **180**(3): 1895-1902.
- Neubauer, O., D. Konig, et al. (2008). "Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress." *Eur J Appl Physiol* **104**(3): 417-426.
- Nieman, D. C., D. A. Henson, et al. (2005). "Immune response to a 30-minute walk." *Med Sci Sports Exerc* **37**(1): 57-62.
- Palmer, L. J., P. R. Cooper, et al. (2012). "Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans." *Clinical and experimental immunology* **167**(2): 261-268.
- Papayannopoulos, V., K. D. Metzler, et al. (2010). "Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps." *Journal of cell biology*(1540-8140 (Electronic)).
- Parker, H. and C. C. Winterbourn (2012). "Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps." *Frontiers in immunology* **3**: 424.
- Peake, J., G. Wilson, et al. (2004). "Changes in neutrophil surface receptor expression, degranulation, and respiratory burst activity after moderate- and high-intensity exercise." *J Appl Physiol* **97**(2): 612-618.



- Pilsczek, F. H., D. Salina, et al. (2010). "A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*." *J Immunol* **185**(12): 7413-7425.
- Rainer, T. H., L. K. Wong, et al. (2003). "Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke." *Clin Chem* **49**(4): 562-569.
- Reihmane, D., A. Jurka, et al. (2012). "The relationship between maximal exercise-induced increases in serum IL-6, MPO and MMP-9 concentrations." *Scand J Immunol* **76**(2): 188-192.
- Remijsen, Q., T. Vanden Berghe, et al. (2011). "Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation." *Cell Res* **21**(17): 1748-1738 (Electronic).
- Robson, P. J., A. K. Blannin, et al. (1999). "Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes." *Int J Sports Med* **20**(2): 128-135.
- Rogers, J. C. (1976). "Characterization of DNA excreted from phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes." *J Exp Med* **143**(5): 1249-1264.
- Rogers, J. C. (1976). "Identification of an intracellular precursor to DNA excreted by human lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(9): 3211-3215.
- Rogers, J. C., D. Boldt, et al. (1972). "Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(7): 1685-1689.
- Sato, N., H. Shimizu, et al. (1992). "MPO activity and generation of active O<sub>2</sub> species in leukocytes from poorly controlled diabetic patients." *Diabetes Care* **15**(8): 1050-1052.
- Schorn, C., C. Janko, et al. (2012). "Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals." *Frontiers in immunology* **3**: 376.
- Scott, J. P., C. Sale, et al. (2013). "Cytokine response to acute running in recreationally-active and endurance-trained men." *Eur J Appl Physiol*.
- Shapiro, B. (1983). "Determination of Circulating DNA Levels in Patients with Benign or Malignant Gastrointestinal Disease." *Cancer* **51**:2116-2120.
- Shaw, J. A., B. M. Smith, et al. (2000). "Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients." *Clin Cancer Res* **6**(3): 1119-1124.
- Shek, P. N., B. H. Sabiston, et al. (1995). "Strenuous exercise and immunological changes: a multiple-time-point analysis of leukocyte subsets, CD4/CD8 ratio, immunoglobulin production and NK cell response." *Int J Sports Med* **16**(7): 466-474.
- Sozzi, G., D. Conte, et al. (2003). "Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer." *J Clin Oncol* **21**(21): 3902-3908.
- Staub, M. and F. Antoni (1978). "Excretion of newly synthesized DNA by tonsil lymphocytes." *Nucleic Acids Res* **5**(8): 3071-3079.
- Steele, C. W., N. B. Jamieson, et al. (2013). "Exploiting inflammation for therapeutic gain in pancreatic cancer." *British journal of cancer* **108**(5): 997-1003.
- Steinman, C. R. (1984). "Circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Isolation and characterization." *J Clin Invest* **73**(3): 832-841.
- Stroun, M. and P. Anker (2005). "Circulating DNA in higher organisms cancer detection brings back to life an ignored phenomenon." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **51**(8): 767-774.
- Stroun, M., P. Anker, et al. (1989). "Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients." *Oncology* **46**(5): 318-322.
- Stroun, M., P. Maurice, et al. (2000). "The origin and mechanism of circulating DNA." *Ann NY Acad Sci* **906**: 161-168.

- Swystun, L. L., S. Mukherjee, et al. (2011). "Breast cancer chemotherapy induces the release of cell-free DNA, a novel procoagulant stimulus." *J Thromb Haemost* **9**(11): 2313-2321.
- Tan, E. M., P. H. Schur, et al. (1966). "Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus." *J Clin Invest* **45**(11): 1732-1740.
- Tomochika, S., N. Iizuka, et al. (2010). "Increased serum cell-free DNA levels in relation to inflammation are predictive of distant metastasis of esophageal squamous cell carcinoma." *Experimental and therapeutic medicine* **1**(1): 89-92.
- Urban, C. F., D. Ermert, et al. (2009). "Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*." *PLoS pathogens* **5**(10): e1000639.
- Vasavda, N., P. Ulug, et al. (2007). "Circulating DNA: a potential marker of sickle cell crisis." *Br J Haematol* **139**(2): 331-336.
- Vasioukhin, V., P. Anker, et al. (1994). "Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia." *Br J Haematol* **86**(4): 774-779.
- Vokac, Z., H. Bell, et al. (1975). "Oxygen uptake/heart rate relationship in leg and arm exercise, sitting and standing." *J Appl Physiol* **39**(1): 54-59.
- von Kockritz-Blickwede, M., O. Goldmann, et al. (2008). "Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation." *Blood* **111**(6): 3070-3080.
- Wang, B. G., H. Y. Huang, et al. (2003). "Increased plasma DNA integrity in cancer patients." *Cancer Res* **63**(14): 3966-3968.
- Wang, Y., M. Li, et al. (2009). "Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation." *J Cell Biol*(1540-8140 (Electronic)).
- Weinstock, C., D. Konig, et al. (1997). "Effect of exhaustive exercise stress on the cytokine response." *Med Sci Sports Exerc* **29**(3): 345-354.
- Xu, J., X. Zhang, et al. (2009). "Extracellular histones are major mediators of death in sepsis." (1546-170X (Electronic)).
- Yamada, M., K. Suzuki, et al. (2000). "Effect of exhaustive exercise on human neutrophils in athletes." *Luminescence* **15**(1): 15-20.
- Yipp, B. G., B. Petri, et al. (2012). "Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo." *Nat Med* **18**(9): 1386-1393.
- Yousefi, S., J. J. Gold, et al. (2008). "Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense." *Nat Med*(1546-170X (Electronic)).
- Yousefi, S., C. Mihalache, et al. (2009). "Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps." *Cell Death Differ* **16**(11): 1438-1444.

## 8. Anhang

### 8.1. Tabellen der deskriptiven Statistiken

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximum	Minimum	Perzentile		
					25	50	75
Herzfrequenz in Ruhe	83,09	9,84	109,00	72,00	76,00	81,00	85,00
Herzfrequenz aerobe Schwelle	157,91	14,69	187,00	128,00	153,00	157,00	164,00
Herzfrequenz metabolische Schwelle	161,64	11,45	182,00	140,00	157,00	161,00	168,00
maximale Herzfrequenz	194,55	8,45	207,00	183,00	188,00	194,00	202,00
Ventilation in Ruhe	16,80	5,07	27,00	11,00	13,50	15,00	19,50
Ventilation aerobe Schwelle	79,20	20,15	111,00	53,00	59,75	75,50	95,00
Ventilation maximale Last	176,80	22,02	203,00	135,00	157,50	184,00	195,25
RQ an aerober Schwelle	,94	,02	,98	,90	,93	,95	,96
RQ an metabolischer Schwelle	,99	,03	1,04	,93	,96	,99	1,00
RQ bei maximaler Last	1,19	,04	1,29	1,14	1,16	1,18	1,21
Laktat Ruhe	1,15	,25	1,60	,80	1,00	1,20	1,30
Laktat metabolische Schwelle	2,55	,57	3,30	1,50	2,00	2,70	3,10
maximales Laktat	10,29	2,17	15,20	7,90	8,20	10,20	11,70
Leistung aerobe Schwelle	2,84	,47	3,70	1,90	2,60	2,90	3,20
Leistung metabolische Schwelle	3,21	,51	4,10	2,30	2,80	3,30	3,50
Maximale Leistung	4,94	,48	6,10	4,30	4,50	4,90	5,20

**Tabelle 2: Deskriptive Statistiken der Leistungsphysiologie. Herzfrequenz in Schlägen pro Minute; Ventilation in l/min; RQ= respiratorischer Quotient; Laktat in mmol/l; Leistung in Watt/kg Körpergewicht**

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximum	Minimum	Perzentile		
					25	50	75
Leukozyten T1	5,33	1,17	7,40	3,70	4,20	5,20	6,00
Leukozyten T2	8,94	1,81	13,00	7,30	7,70	8,20	9,70
Leukozyten T3	7,40	1,73	10,50	4,90	5,70	7,50	8,50
Lymphozyten T1	1,87	,49	2,91	1,15	1,60	1,84	2,00
Lymphozyten T2	3,75	,87	5,59	2,16	3,43	3,70	4,27
Lymphozyten T3	1,27	,23	1,60	,85	1,08	1,27	1,44
Neutrophile T1	2,58	,74	4,22	1,68	1,85	2,59	2,88
Neutrophile T2	4,00	1,24	6,24	2,89	2,93	3,85	4,80
Neutrophile T3	5,34	1,53	8,30	2,99	4,05	5,52	5,86
Eosinophile T1	,17	,12	,44	,06	,07	,14	,21
Eosinophile T2	,18	,15	,51	,00	,06	,15	,31
Eosinophile T3	,08	,05	,16	,02	,03	,11	,13
Basophile T1	,03	,02	,07	,01	,02	,02	,05
Basophile T2	,05	,02	,08	,00	,03	,05	,07
Basophile T3	,02	,01	,04	,01	,02	,02	,04
Monozyten T1	,61	,19	,97	,28	,50	,59	,75
Monozyten T2	,88	,20	1,25	,63	,67	,88	1,04
Monozyten T3	,30	,11	,46	,14	,25	,30	,42

Tabelle 3: Leukozyten gesamt und unterteilt in Subpopulationen dargestellt für jeden einzelnen Abnahmezeitpunkt in Zellen pro nanoliter

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximum	Minimum	Perzentile		
					25	50	75
PCR LTR5 70bp T1	10,84	4,32	18,02	6,00	7,41	9,01	14,08
PCR LTR5 70bp T2	57,32	26,13	101,30	18,87	37,23	56,88	77,70
PCR LTR5 70bp T3	11,06	3,70	17,60	5,75	6,99	12,04	13,29
PCR LTR5 323bp T1	1,16	,68	2,27	,04	,55	1,21	1,80
PCR LTR5 323bp T2	5,47	6,19	16,83	,16	,27	2,75	11,23
PCR LTR5 323bp T3	1,04	,63	2,48	,28	,60	,83	1,52
PCR L1PA2 90bp T1	16,57	5,81	29,63	10,74	11,42	14,09	20,36
PCR L1PA2 90bp T2	72,88	21,08	110,11	47,12	51,45	78,60	87,39
PCR L1PA2 90bp T3	16,85	5,86	32,82	12,33	13,58	14,54	18,56
PCR L1PA2 222bp T1	4,30	1,40	7,10	2,39	2,73	4,51	5,08
PCR L1PA2 222bp T2	33,11	9,29	50,25	22,53	24,28	33,00	43,04
PCR L1PA2 222bp T3	4,77	1,88	9,76	2,61	3,86	4,13	5,11

Tabelle 4: DNA-Messungen für alle Primer und Zeitpunkte in ng/ml.

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximum	Minimum	Perzentile		
					25	50	75
Elastase T1	38,27	9,18	50,00	23,00	29,00	40,00	46,00
Elastase T2	67,00	19,21	110,00	45,00	55,00	63,00	75,00
Elastase T3	50,18	15,76	85,00	30,00	37,00	48,00	59,00
Myeloperoxidase T1	53,18	26,32	109,00	27,00	33,00	42,00	63,00
Myeloperoxidase T2	76,00	17,57	103,00	55,00	62,50	68,00	93,50
Myeloperoxidase T3	59,70	11,26	73,00	36,00	51,75	62,50	68,00

Tabelle 5: Neutrophilen-spezifische Enzyme Elastase und MPO in ng/ml für jeden Abnahmezeitpunkt. Die Werte der MPO sind aus Gründen der graphischen Darstellbarkeit durch den Faktor zehn zu geteilt.

## 8.2. Graphiken der deskriptiven Statistiken

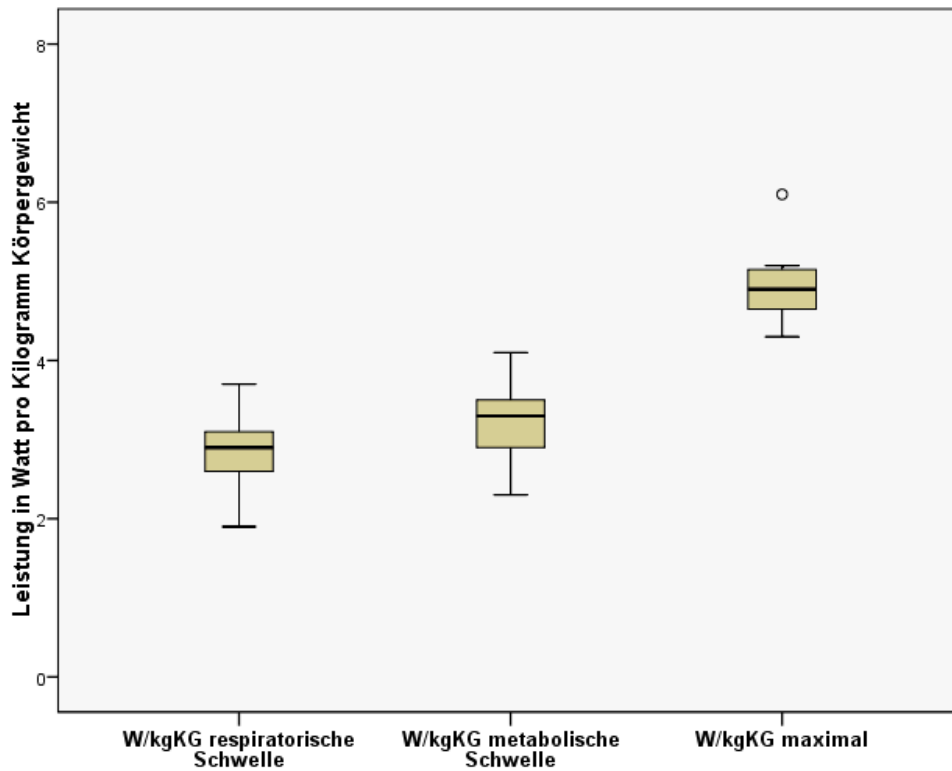
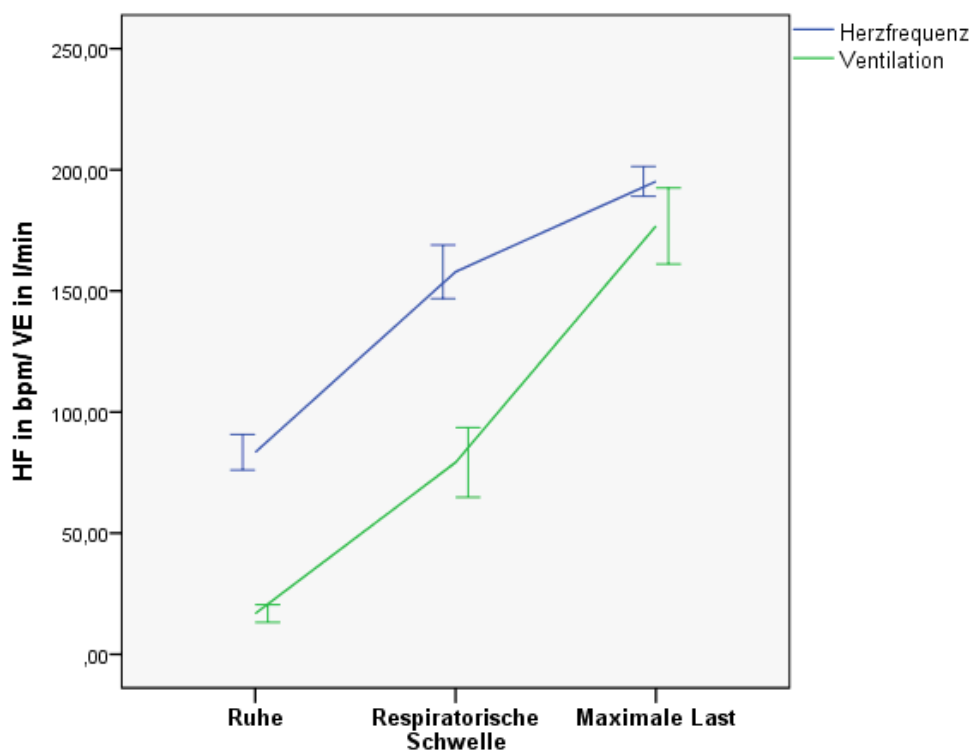


Abbildung 1: Leistung zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Test



Fehlerbalken: 95% CI

Abbildung 2: Verlauf Herzfrequenz und Ventilation

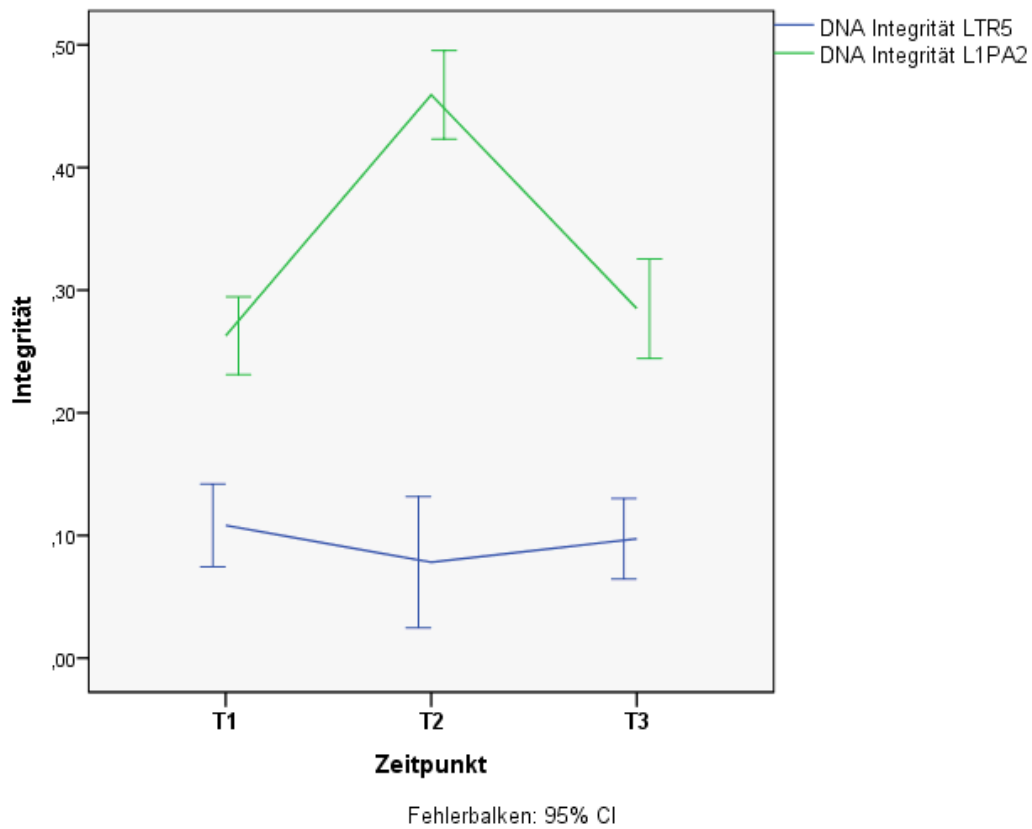


Abbildung 5: DNA-Integrität im Testverlauf

### 8.3. Beispielhafte Streudiagramme der Korrelationen

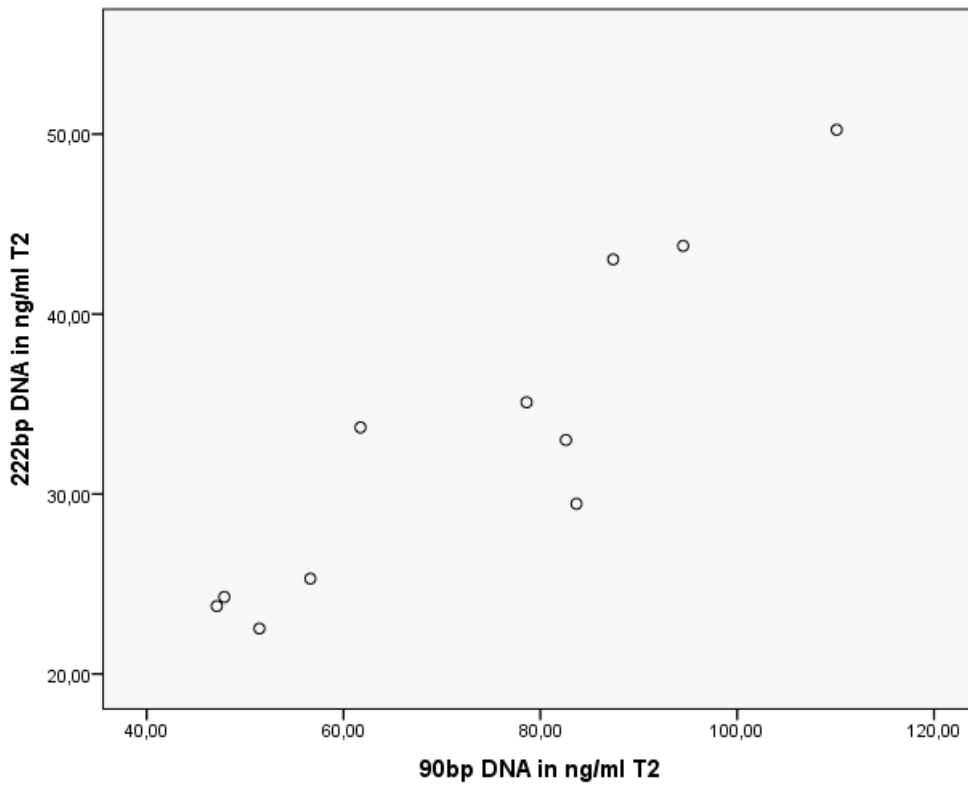
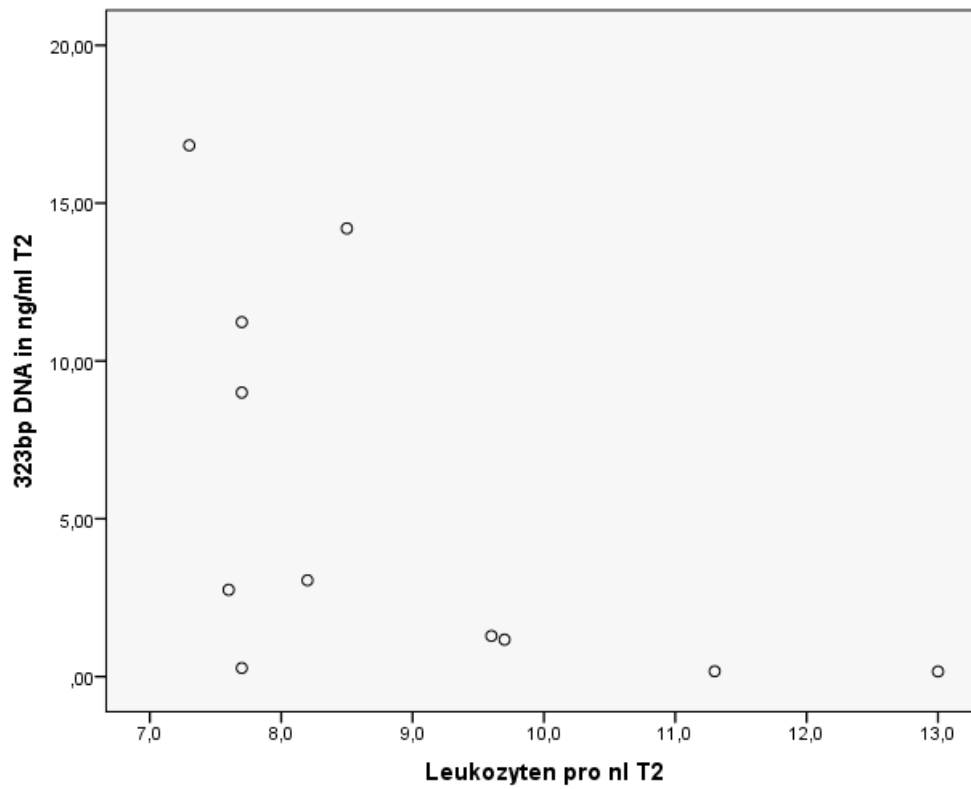
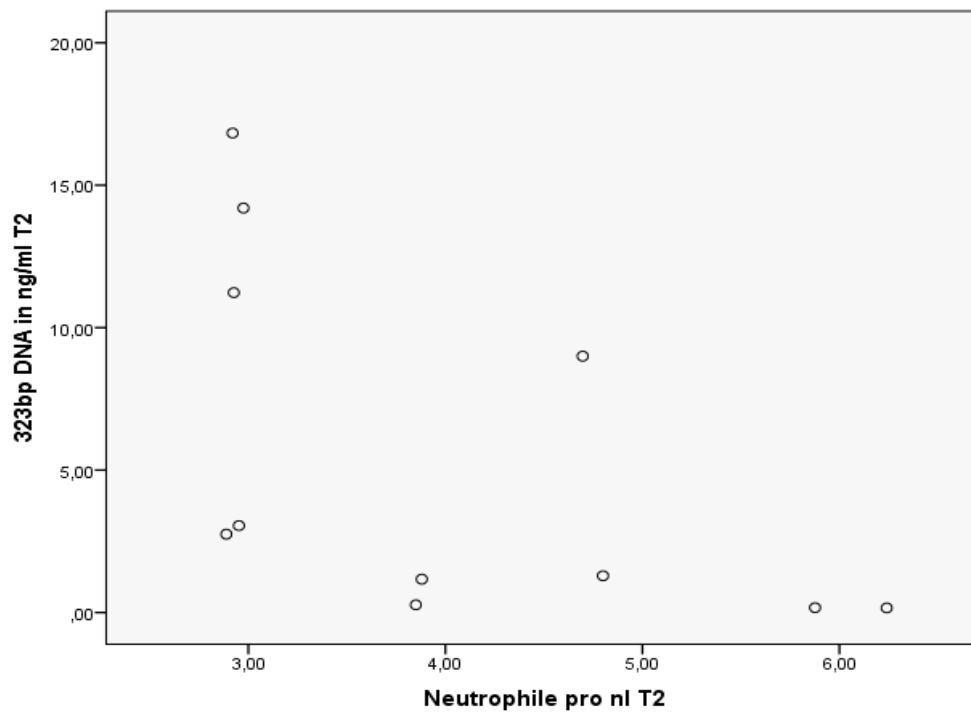


Abbildung 7: Korrelation der DNA-Messungen des L1PA2-Primers zum Zeitpunkt T2



**Abbildung 8: Korrelation der Leukozyten T2 mit dem langen Fragment der LTR5 PCR an T2**



**Abbildung 9: Korrelation der Neutrophilen und des langen Fragments der LTR5 PCR an T2**

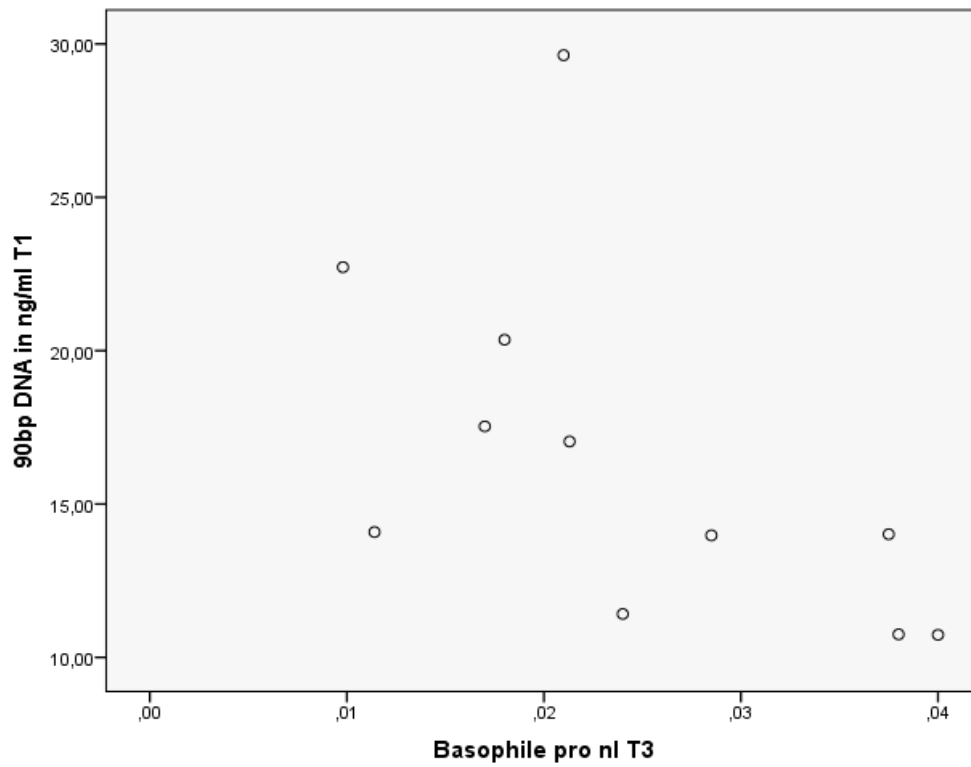


Abbildung 10: Korrelation der Basophilen und des kurzen Fragments der L1PA2 PCR Zeitpunkt übergreifend

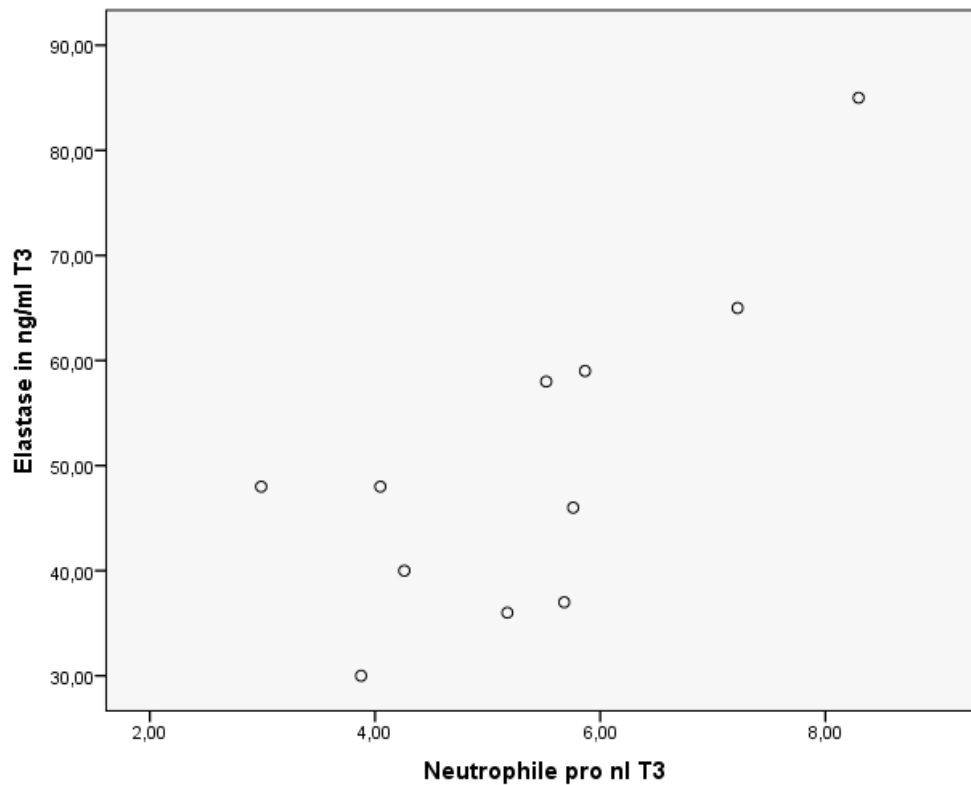
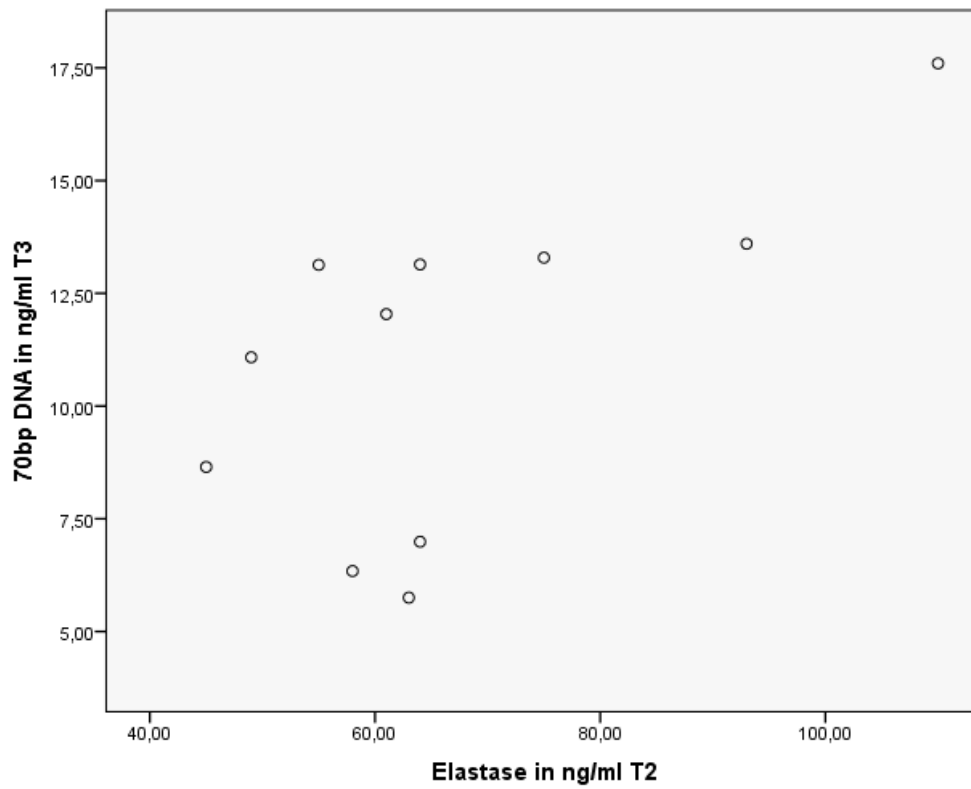
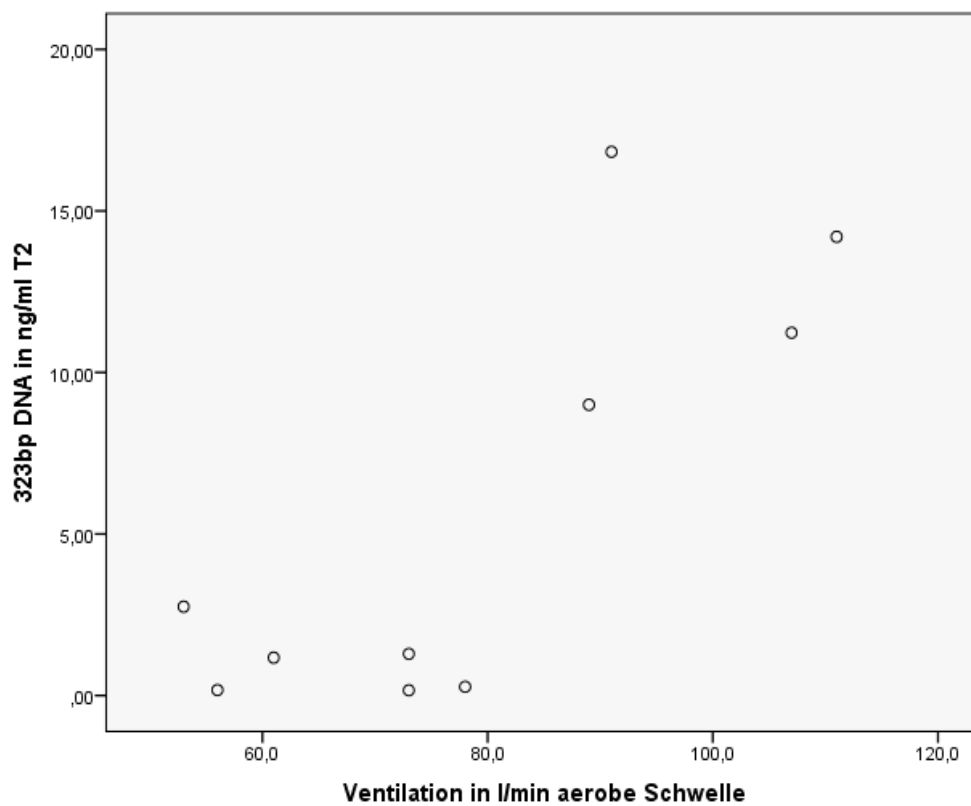


Abbildung 11: Korrelation der Neutrophilen und der Plasma-Elastase an T3





**Abbildung 12: Korrelation der Elastase und dem kurzen Fragment der LTR5 PCR Zeitpunkt übergreifend**



**Abbildung 13: Korrelation der Ventilation an der respiratorischen Schwelle und des langen Fragments der LTR5 PCR T2**

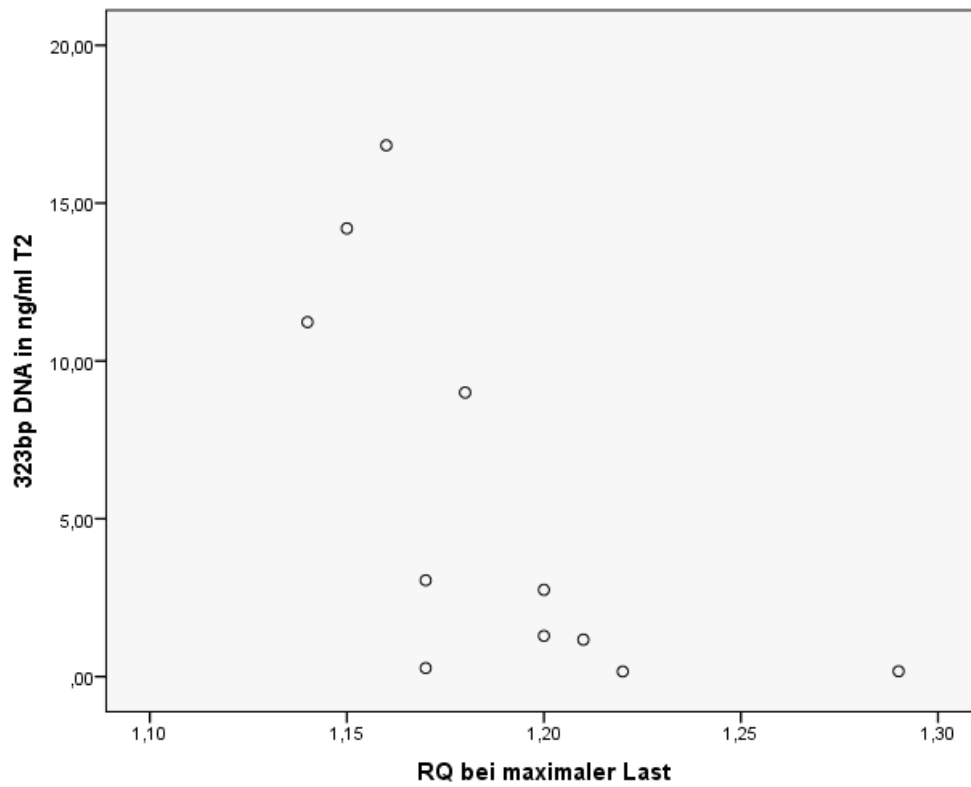


Abbildung 14: Korrelation des RQs bei maximaler Last und des langen Fragments der LTR5 PCR an T2

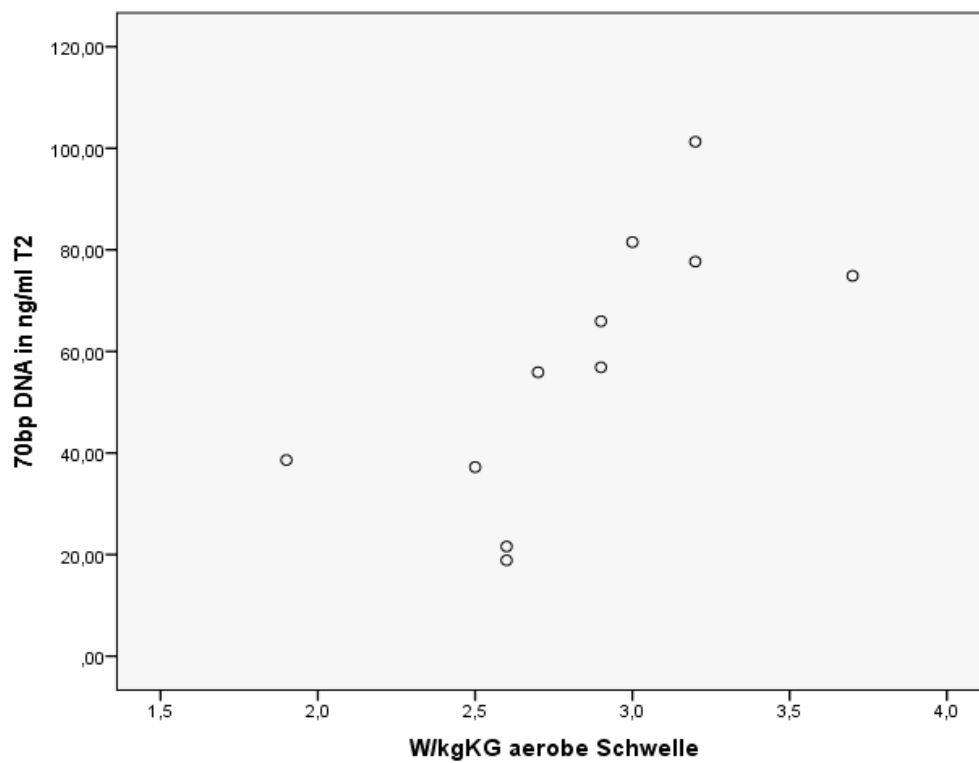


Abbildung 15: Korrelation der Leistung an der Schwelle und des kurzen Fragments der LTR5 PCR T2

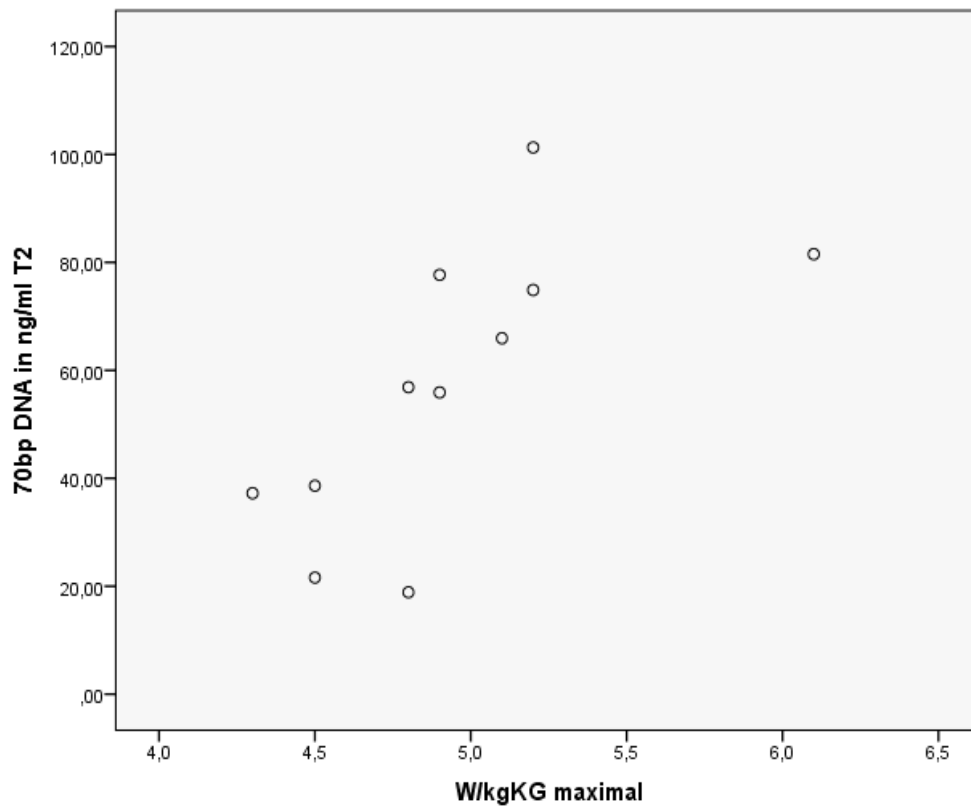


Abbildung 16: Korrelation der maximalen Leistung und des kurzen Fragments der LTR5 PCR T2

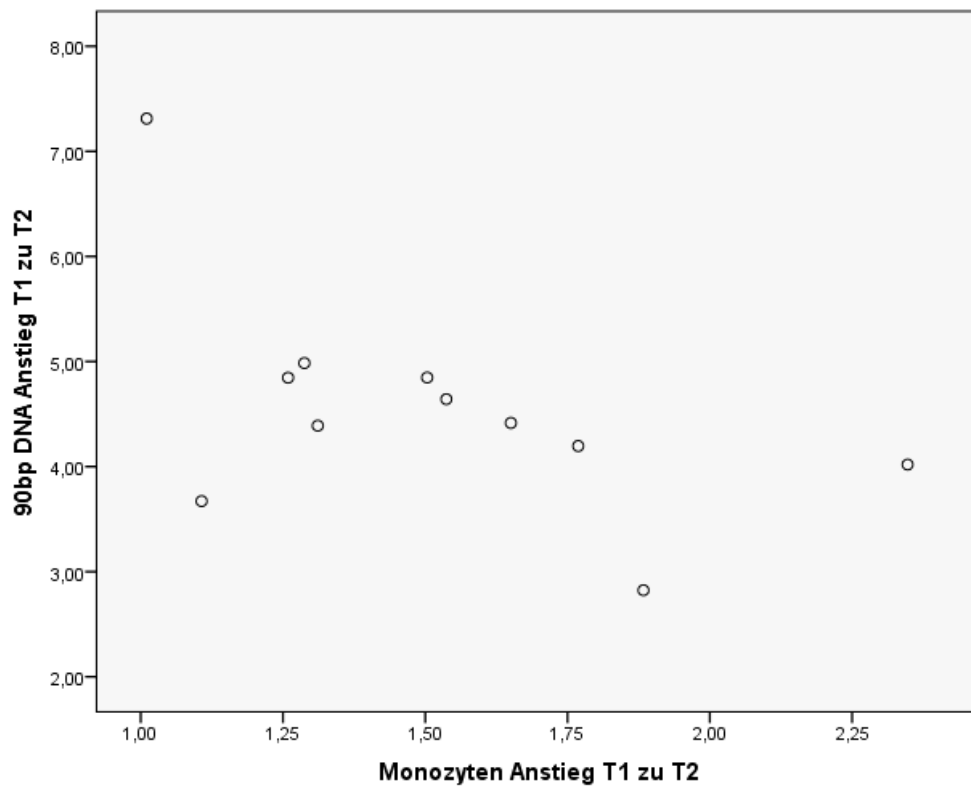


Abbildung 17: Korrelation der Veränderungen der Monozyten und des kurzen Fragments der L1PA2 PCR im Belastungsintervall

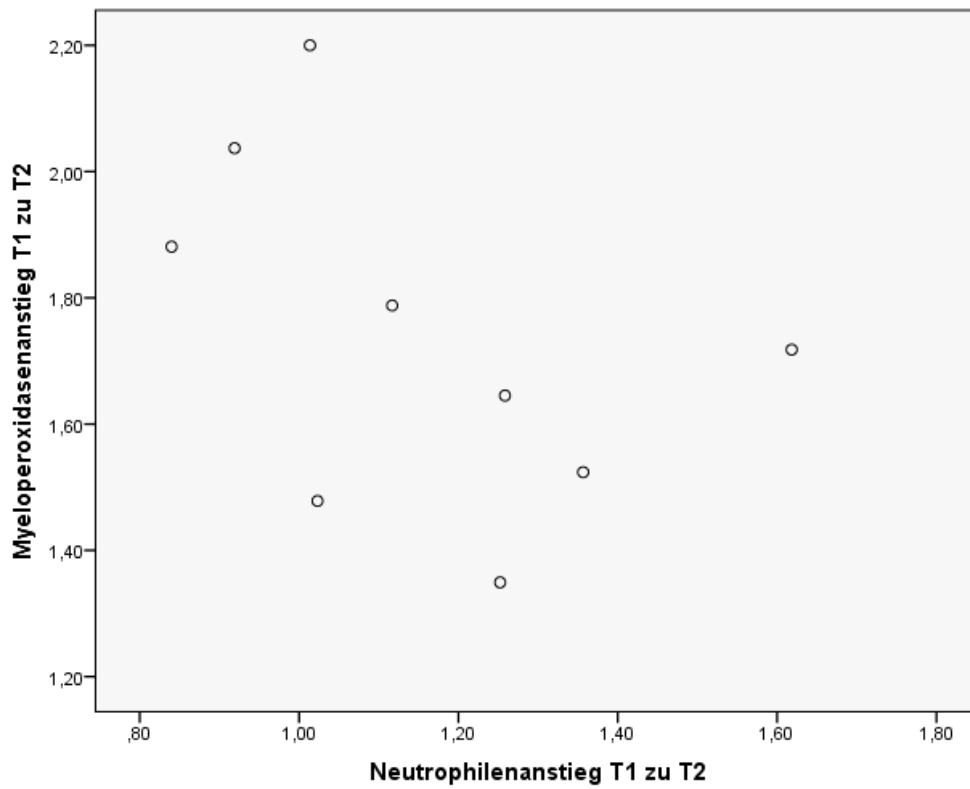


Abbildung 18: Korrelation der Veränderung der Neutrophilen und der Myeloperoxidase im Belastungsintervall

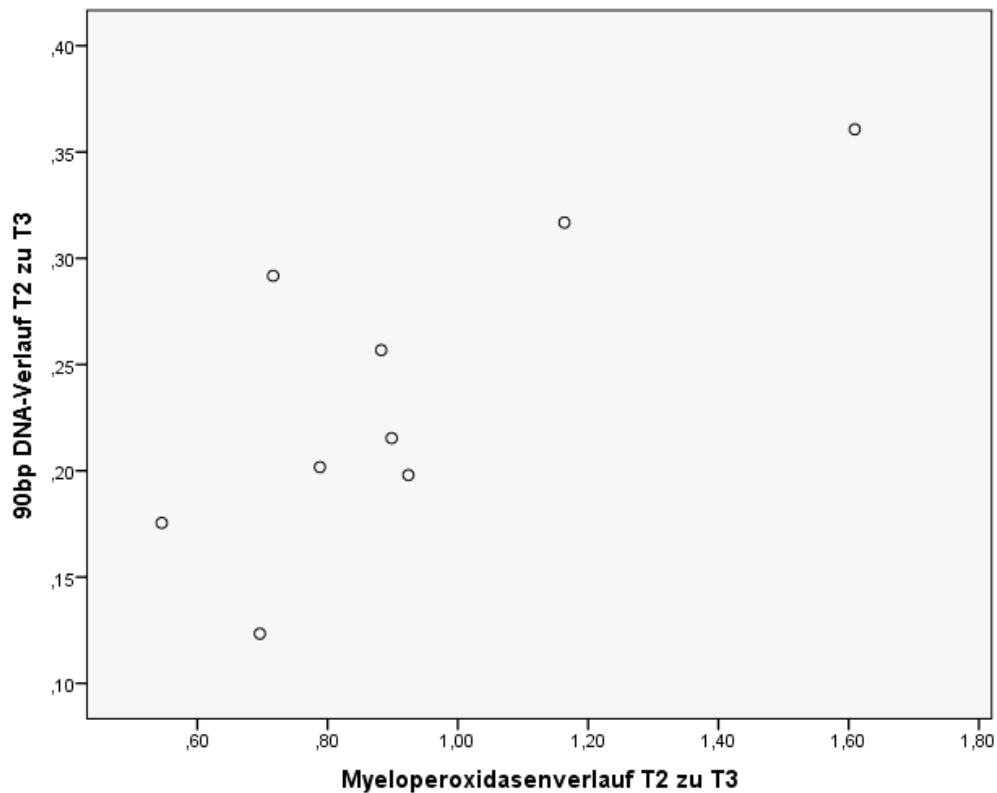
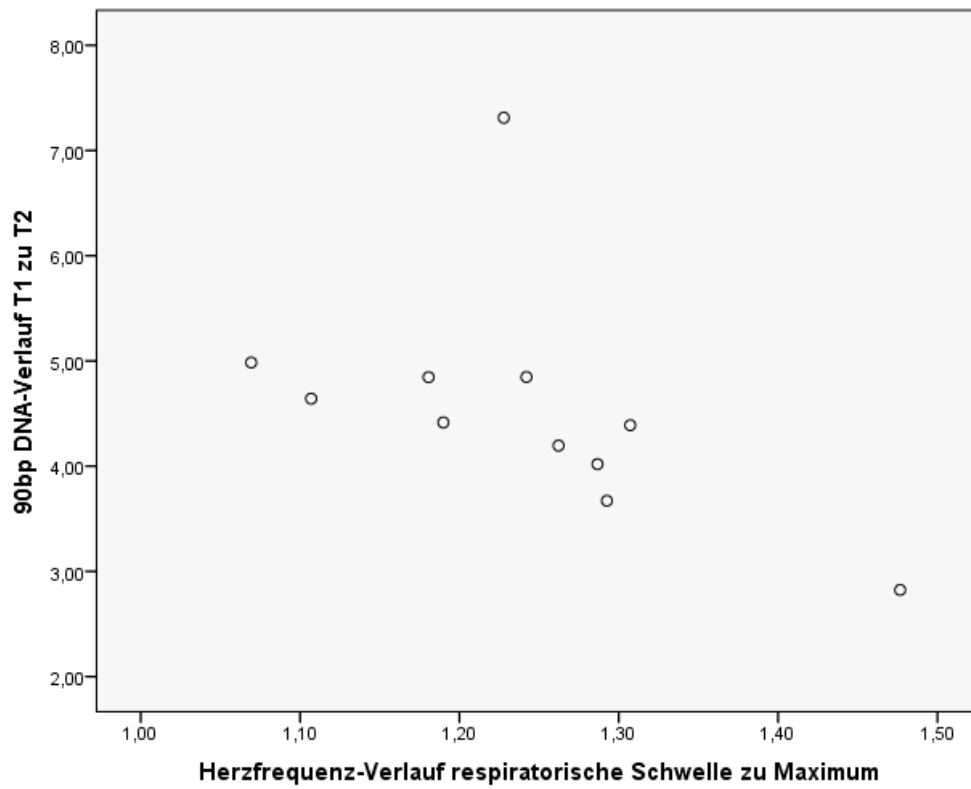


Abbildung 19: Korrelation der Veränderung der Myeloperoxidase und des kurzen Fragments der L1PA2 PCR



**Abbildung 20: Korrelation der Veränderung der Herzfrequenz zwischen der Schwelle und dem Maximum und des kurzen Fragments der L1PA2 PCR**

## 8.4. Tabellen über Vervielfachungen in den Intervallen und deren Wilcoxon-Tests

Die Werte in den Tabellen drücken die faktorielle Zunahme (*fold-change*) der Parameter aus. Dabei erfolgte die Berechnung als Quotient des jeweils später liegenden Zeitpunkts dividiert durch den früheren Zeitpunkt. Hinter der Tabelle der deskriptiven Statistik ist die Ergebnistabelle der p-Werte des Wilcoxon-Tests zu finden.

### 8.4.1. Änderungen der leistungsphysiologischen Parameter

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximum	Minimum	Perzentile		
					25	50	75
Herzfrequenz Ruhe zu Maximum	2,36	,18	2,57	1,90	2,29	2,40	2,47
Herzfrequenz aerobe Schwelle zu Maximum	1,24	,11	1,48	1,07	1,18	1,24	1,29
Herzfrequenz metabolische Schwelle zu Maximum	1,21	,08	1,35	1,06	1,14	1,22	1,25
Ventilation Ruhe zu Maximum	11,22	2,74	13,86	5,78	10,03	12,14	13,26
Ventilation aerobe Schwelle zu Maximum	2,33	,48	3,21	1,74	1,86	2,34	2,61
RQ aerobe Schwelle zu maximale Last	1,26	,05	1,36	1,16	1,22	1,26	1,30
RQ metabolische Schwelle zu maximale Last	1,21	,05	1,32	1,15	1,17	1,20	1,24
Laktat Ruhe zu maximal	9,12	1,87	11,70	5,63	7,46	9,08	10,60
Laktat metabolische Schwelle zu max	4,16	,97	6,08	3,10	3,30	4,10	5,17
Leistung aerobe Schwelle zu maximal	1,77	,26	2,37	1,41	1,63	1,73	1,85
Leistung metabolische Schwelle zu maximal	1,56	,23	1,96	1,27	1,36	1,53	1,71

Tabelle 6: Veränderungen der leistungsphysiologischen Parameter zwischen Ruhe, Schwelle und maximaler Leistung. RQ= respiratorischer Quotient

	Ventilation maximale Last - Ventilation in Ruhe	Ventilation maximale Last - Ventilation aerobe Schwelle	maximale Herzfrequenz - Herzfrequenz in Ruhe	maximale Herzfrequenz - Herzfrequenz aerobe Schwelle	maximales Laktat - Laktat Ruhe	maximales Laktat - Laktat metabolische Schwelle
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,001	,001	,000	,000	,000	,000
	W/kgKG maximal - W/kgKG aerobe Schwelle	W/kgKG metabolische Schwelle - W/kgKG aerobe Schwelle	RQ maximale Last - RQ aerober Schwelle	RQ an metabolischer Schwelle - RQ an aerober Schwelle		
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,000	,000	,000		

### 8.4.2. Zellzahländerungen

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximum	Minimum	Perzentile		
					25	50	75
Leukozyten T1 zu T2	1,70	,27	2,17	1,37	1,48	1,70	2,00
Leukozyten T2 zu T3	,83	,15	1,04	,62	,70	,82	,99
Lymphozyten T1 zu T2	2,03	,37	2,74	1,45	1,79	1,98	2,30
Lymphozyten T2 zu T3	,36	,08	,57	,26	,31	,35	,38
Neutrophile T1 zu T2	1,13	,22	1,62	,84	,98	1,05	1,26
Neutrophile T2 zu T3	1,35	,26	1,94	,93	1,21	1,38	1,45
Monozyten T1 zu T2	1,52	,39	2,35	1,01	1,26	1,50	1,77
Monozyten T2 zu T3	,35	,13	,59	,20	,23	,33	,39
Basophile T1 zu T2	,47	,12	,65	,32	,34	,48	,56
Basophile T2 zu T3	1,63	,77	2,74	,00	1,18	1,74	2,04
Eosinophile T1 zu T2	,94	,40	1,52	,00	,82	,90	1,16
Eosinophile T2 zu T3	,50	,15	,73	,31	,38	,48	,67

Tabelle 7: Veränderungen der Leukozyten unter Belastung (T1 nach T2) und in der neunzigminütigen Erholungsphase (T2 nach T3)

	Leukozyten T2 - Leukozyten T1	Leukozyten T3 - Leukozyten T2	Lymphozyten T2 - Lymphozyten T1	Lymphozyten T3 - Lymphozyten T2	Neutrophile T2 - Neutrophile T1	Neutrophile T3 - Neutrophile T2
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,003	,000	,000	,000	,001
	Eosinophile T2 - Eosinophile T1	Eosinophile T3 - Eosinophile T2	Basophile T2 - Basophile T1	Basophile T3 - Basophile T2	Monozyten T2 - Monozyten T1	Monozyten T3 - Monozyten T2
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,517	,001	,021	,007	,000	,000

### 8.4.3. DNA-Veränderungen

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximum	Minimum	Perzentile		
					25	50	75
PCR LTR5 70bp T1 zu T2	5,51	2,37	9,98	2,14	3,60	5,52	7,32
PCR LTR5 70bp T2 zu T3	,24	,15	,56	,11	,13	,18	,30
PCR LTR5 323bp T1 zu T2	7,01	8,47	29,09	,08	,48	6,23	10,48
PCR LTR5 323bp T2 zu T3	1,89	3,14	9,55	,07	,09	,32	4,25
PCR L1PA2 90bp T1 zu T2	4,56	1,10	7,31	2,82	4,02	4,42	4,85
PCR L1PA2 90bp T2 zu T3	,24	,09	,39	,12	,18	,22	,32
PCR L1PA2 222bp T1 zu T2	8,29	2,71	12,83	4,15	5,37	8,87	10,16
PCR L1PA2 222bp T2 zu T3	,16	,07	,33	,05	,11	,15	,18

Tabelle 8: Veränderungen der DNA-Spiegel zwischen den einzelnen Abnahmezeitpunkten

	PCR LTR5 70bp T2 - PCR LTR5 70bp T1	PCR LTR5 70bp T3 - PCR LTR5 70bp T2	PCR LTR5 323bp T2 - PCR LTR5 323bp T1	PCR LTR5 323bp T3 - PCR LTR5 323bp T2	DNA Integrität LTR5 T2 - DNA Integrität LTR5 T1	DNA Integrität LTR5 T3 - DNA Integrität LTR5 T2
Exakte Signifikanz (1- seitig)	,000	,000	,034	,021	,319	,382
	PCR L1PA2 90bp T2 - PCR L1PA2 90bp T1	PCR L1PA2 90bp T3 - PCR L1PA2 90bp T2	PCR L1PA2 222bp T2 - PCR L1PA2 222bp T1	PCR L1PA2 222bp T3 - PCR L1PA2 222bp T2	DNA Integrität L1PA2 T2 - DNA Integrität L1PA2 T1	DNA Integrität L1PA2 T3 - DNA Integrität L1PA2 T2
Exakte Signifikanz (1- seitig)	,000	,000	,000	,000	,000	,001

#### 8.4.4. Enzymänderungen

	Mittelwert	Standardab- weichung	Maximum	Minimum	Perzentile		
					25	50	75
Elastase T1 zu T2	1,77	,34	2,21	1,22	1,45	1,81	2,13
Elastase T2 zu T3	,78	,27	1,44	,39	,63	,75	,87
Myeloperoxidase T1 zu T2	1,74	,27	2,20	1,35	1,50	1,72	1,96
Myeloperoxidase T2 zu T3	,91	,31	1,61	,55	,71	,88	1,04

Tabelle 9: Veränderungen der Enzymspiegel

	Elastase T2 - Elastase T1	Elastase T3 - Elastase T2	Myeloperoxidase T2 - Myeloperoxidase T1	Myeloperoxidase T3 - Myeloperoxidase T2
Exakte Signifikanz (1- seitig)	,000	,009	,002	,006

#### 8.5. Korrelationstabellen

##### 8.5.1. NET-Korrelationen

Neutrophile	Enzym	Korrelationskoeffizient
Neutrophile T1	Elastase T1	,560
Neutrophile T3	Elastase T3	,629

Enzym	DNA-Messung	Korrelationskoeffizient
Elastase T1	PCR LTR5 70bp T2	-,647
Elastase T1	PCR L1PA2 222bp T2	-,679
Elastase T1	PCR LTR5 323bp T2	-,597
Elastase T1	PCR L1PA2 90bp T3	,610
Elastase T2	PCR LTR5 323bp T1	,706
Elastase T2	PCR LTR5 70bp T3	,615



<b>Elastase T2</b>	PCR L1PA2 90bp T3	,911
<b>Elastase T2</b>	PCR LTR5 323bp T3	,580
<b>Elastase T2</b>	PCR L1PA2 222bp T3	,519
<b>Elastase T3</b>	PCR LTR5 323bp T3	,628
<b>Myeloperoxidase T2</b>	PCR LTR5 70bp T1	,550
<b>Myeloperoxidase T2</b>	PCR L1PA2 222bp T1	,617
<b>Myeloperoxidase T2</b>	PCR LTR5 323bp T3	-,502
<b>Myeloperoxidase T2</b>	PCR L1PA2 222bp T3	-,600
<b>Myeloperoxidase T3</b>	PCR LTR5 70bp T3	,663

### 8.5.2. Leistungsphysiologie

<b>Parameter</b>	<b>DNA-Messung</b>	<b>Korrelationskoeffizient</b>
<b>RQ max. Last</b>	PCR LTR570bp T2	-,603
<b>RQ max. Last</b>	PCR LTR5 323bp T2	-,826
<b>RQ max. Last</b>	PCR L1PA2 90bp T2	-,530
<b>RQ max. Last</b>	PCR L1PA2 222bp T2	-,699
<b>RQ an metabolischer Schwelle</b>	PCR LTR5 323bp T3	-,777
<b>Ventilation in Ruhe</b>	PCR LTR5 323bp T1	-,558
<b>Ventilation in Ruhe</b>	PCR L1PA2 90bp T1	-,595
<b>Ventilation in Ruhe</b>	PCR L1PA2 90bp T2	-,632
<b>Ventilation in Ruhe</b>	PCR LTR5 323bp T2	-,669
<b>Ventilation in Ruhe</b>	PCR L1PA2 222bp T2	-,620
<b>Ventilation in Ruhe</b>	PCR LTR5 323bp T3	-,554
<b>Ventilation aerobe Schwelle</b>	PCR LTR5 70bp T2	,517
<b>Ventilation aerobe Schwelle</b>	PCR L1PA2 90bp T2	,559
<b>Ventilation aerobe Schwelle</b>	PCR L1PA2 222bp T2	,675
<b>Ventilation aerobe Schwelle</b>	PCR LTR5 323bp T2	,675
<b>Herzfrequenz in Ruhe</b>	PCR LTR5 70bp T3	-,538

<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle</b>	PCR L1PA2 222bp T1	-,566
<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle</b>	PCR LTR5 323bp T2	,511
<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle</b>	PCR L1PA2 222bp T2	,507
<b>Herzfrequenz metabolische Schwelle</b>	PCR L1PA2 222bp T1	-,545
<b>Maximale Herzfrequenz</b>	PCR LTR5 70bp T1	-,575
<b>Maximale Herzfrequenz</b>	PCR L1PA2 222bp T1	-,501
<b>Maximale Herzfrequenz</b>	PCR LTR5 70bp T2	-,538
<b>Laktat Ruhe</b>	PCR LTR5 323bp T3	-,513
<b>Laktat metabolische Schwelle</b>	PCR LTR5 323bp T1	-,530
<b>Laktat metabolische Schwelle</b>	PCR LTR5 323bp T3	-,794
<b>W/kgKG Aerobic Threshold</b>	PCR LTR5 70bp T2	,842
<b>W/kgKG Aerobic Threshold</b>	PCR LTR5 323bp T2	,764
<b>W/kgKG Aerobic Threshold</b>	PCR L1PA2 222bp T2	,723
<b>W/kgKG Aerobic Threshold</b>	PCR L1PA2 90bp T2	,586
<b>W/kgKG Aerobic Threshold</b>	PCR LTR5 323bp T3	-,794
<b>W/kgKG metabolic Threshold</b>	PCR LTR5 70bp T2	,588
<b>W/kgKG metabolic Threshold</b>	PCR LTR5 323bp T2	,661
<b>W/kgKG maximal</b>	PCR LTR5 70bp T2	,835
<b>W/kgKG maximal</b>	PCR L1PA2 90bp T2	,546
<b>W/kgKG maximal</b>	PCR L1PA2 222bp T2	,748
<b>W/kgKG maximal</b>	PCR LTR5 323bp T2	,550

## 8.6. Korrelation der Zeitpunktveränderung

### 8.6.1. NETs-Korrelationen

<b>Enzymveränderung</b>	<b>DNA-Veränderung</b>	<b>Korrelationskoeffizient</b>
<b>Myeloperoxidase T1 zu T2</b>	PCR L1PA2 90bp T1 zu T2	,550
<b>Myeloperoxidase T2 zu T3</b>	PCR L1PA2 90bp T2 zu T3	,700
<b>Myeloperoxidase T2 zu T3</b>	PCR LTR5 70bp T2 zu T3	,653

<b>Myeloperoxidase T2 zu T3</b>	PCR LTR5 323bp T2 zu T3	,552
---------------------------------	-------------------------	------

<b>Neutroveränderung</b>	<b>Enzymveränderung</b>	<b>Korrelationskoeffizient</b>
<b>Neutrophile T1 zu T2</b>	Myeloperoxidase T1 zu T2	-,567
<b>Neutrophile T2 zu T3</b>	Myeloperoxidase T2 zu T3	,717

### 8.6.2. Leistungsphysiologie

<b>Parameterveränderung</b>	<b>DNA-Veränderung</b>	<b>Korrelationskoeffizient</b>
<b>W aerobe Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 323bp T2 zu T3	,569
<b>W aerobe Schwelle zu max</b>	PCR L1PA2 222bp T2 zu T3	,509
<b>Ventilation aerobe Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 70bp T1 zu T2	-,539
<b>Ventilation aerobe Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 323bp T1 zu T2	-,564
<b>Ventilation aerobe Schwelle zu max</b>	PCR L1PA2 90bp T1 zu T2	-,515
<b>Ventilation aerobe Schwelle zu max</b>	PCR L1PA2 90bp T2 zu T3	,527
<b>Ventilation aerobe Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 323bp T2 zu T3	,830
<b>Ventilation aerobe Schwelle zu max</b>	PCR L1PA2 222bp T2 zu T3	,552
<b>Ventilation Ruhe zu max</b>	PCR LTR5 70bp T1 zu T2	,552
<b>Ventilation Ruhe zu max</b>	PCR LTR5 323bp T1 zu T2	,539
<b>Ventilation Ruhe zu max</b>	PCR L1PA2 90bp T1 zu T2	,503
<b>Ventilation Ruhe zu max</b>	PCR LTR5 70bp T2 zu T3	-,547
<b>Ventilation Ruhe zu max</b>	PCR LTR5 323bp T2 zu T3	-,709
<b>Ventilation Ruhe zu max</b>	PCR L1PA2 90bp T2 zu T3	-,636
<b>Ventilation Ruhe zu max</b>	PCR L1PA2 222bp T2 zu T3	-,685
<b>RQ metabolische Schwelle zu max. Last</b>	PCR LTR5 70bp T1 zu T2	-,555
<b>RQ metabolische Schwelle zu max. Last</b>	PCR LTR5 323bp T1 zu T2	-,536
<b>RQ metabolische Schwelle zu max. Last</b>	PCR L1PA2 90bp T1 zu T2	-,509
<b>RQ metabolische Schwelle zu max. Last</b>	PCR LTR5 323bp T2 zu T3	,569
<b>RQ metabolische Schwelle zu max. Last</b>	PCR L1PA2 222bp T2 zu T3	,609
<b>RQ aerobe Schwelle zu max. Last</b>	PCR L1PA2 90bp T1 zu T2	,682

<b>RQ aerobe Schwelle zu max. Last</b>	PCR LTR5 70bp T2 zu T3	,667
<b>RQ aerobe Schwelle zu max. Last</b>	PCR LTR5 323bp T2 zu T3	,888
<b>Herzfrequenz metabolische Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 70bp T1 zu T2	-,691
<b>Herzfrequenz metabolische Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 323bp T1 zu T2	-,691
<b>Herzfrequenz metabolische Schwelle zu max</b>	PCR L1PA2 90bp T1 zu T2	-,555
<b>Herzfrequenz metabolische Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 323bp T2 zu T3	,569
<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 70bp T1 zu T2	-,755
<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 323bp T1 zu T2	-,764c
<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle zu max</b>	PCR L1PA2 90bp T1 zu T2	-,764
<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle zu max</b>	PCR L1PA2 222bp T1 zu T2	-,636
<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 70bp T2 zu T3	,671
<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle zu max</b>	PCR LTR5 323bp T2 zu T3	,702
<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle zu max</b>	PCR L1PA2 90bp T2 zu T3	,764
<b>Herzfrequenz aerobe Schwelle zu max</b>	PCR L1PA2 222bp T2 zu T3	,900
<b>Laktat Ruhe zu max</b>	PCR L1PA2 90bp T1 zu T2	-,534