

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin
der Deutschen Sporthochschule Köln
Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin
Geschäftsführender Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

**Trainingsinduzierte Änderung der Serin¹¹⁷⁷-Phosphorylierung der
erythrozytären NO-Synthase und der Gefäßelastizität bei Typ-2 Diabetikern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Jakob Johannes Dicke
aus Leverkusen

promoviert am 07. Dezember 2011

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin
der Deutschen Sporthochschule Köln
Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin
Geschäftsführender Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

**Trainingsinduzierte Änderung der Serin¹¹⁷⁷-Phosphorylierung der
erythrozytären NO-Synthase und der Gefäßelastizität bei Typ-2 Diabetikern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Jakob Johannes Dicke
aus Leverkusen

Promoviert am 07. Dezember 2011

Druckerei:
X-TRA Print | Studentendruckportal.de
Inhaber: André Thomaschewski, René Hoffmann
George-Bähr-Straße 8
01069 Dresden
Deutschland

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, 2011

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Professor Dr. rer. nat. Klara Brixius und die medizinisch-technische Assistentin Frau Mojgan Ghilav durchgeführt worden

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Professor K. Brixius für ihre stetige Unterstützung und freundliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Als weiteres möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Kreislaufforschung und Sportmedizin insbesondere Frau Mojgan Ghilav für die Unterstützung im Labor danken.

David Assadi und David Opitz, ich habe mit euch beiden sehr gerne zusammen gearbeitet und bin froh euch durch die Arbeit an der Sporthochschule kennengelernt zu haben. Das gleiche gilt für Thorsten Kreuzt. Ich würde jederzeit wieder mit euch arbeiten.

Ein weiterer Dank geht an meine Familie, insbesondere an meinen Vater für die Hilfe mit dem Computerprogramm. Meiner Mutter danke ich für die Durchsicht der Arbeit, und meinen Geschwistern für die professionellen Ratschläge in Bezug auf meine Arbeitsweise.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Diabetes Mellitus | 1 |
| 1.2 | Arterielle Hypertonie | 2 |
| 1.3 | Kraft- versus Ausdauersport zur Therapie von Diabetes Typ 2 und Bluthochdruck | 4 |
| 1.4 | Gefäßregulation – die Rolle des Endothels | 7 |
| 1.5 | NOS auf Erythrozyten | 15 |
| 1.6 | Fragestellung der Studie | 16 |
| 2. | Materialien und Methoden | 17 |
| 2.1 | Probanden | 17 |
| 2.2 | Studienaufbau | 17 |
| 2.3 | Fahrradergometrie | 20 |
| 2.4 | Lakatmessung | 21 |
| 2.5 | Endothelmessung | 22 |
| 2.6 | Venöse Blutentnahme und Verarbeitung | 22 |
| 2.7 | Aufbereitung der Blutproben | 22 |
| 2.8 | Immunhistochemische Färbung | 23 |
| 2.9 | Auswertung der Präparate mit Hilfe von ImageJ | 27 |
| 2.10 | Statistik | 28 |
| 3. | Ergebnisse | 29 |
| 3.1 | Leistungsfähigkeit | 29 |
| 3.1.1 | Fahrradergometrie (Ausdauer) | 29 |
| 3.1.2 | Beinpresse (Kraft) | 30 |
| 3.2 | eryNOS-Phosphorylierung am Ser ¹¹⁷⁷ | 32 |
| 3.3 | Prozentuale Aufteilung der Färbeintensität | 35 |
| 3.4 | Blutdruckwerte und Pulswellengeschwindigkeit | 39 |
| 3.4.1 | Blutdruckwerte | 39 |
| 3.4.2 | Pulswellengeschwindigkeit | 42 |
| 4. | Diskussion | 44 |
| 5. | Limitationen und Ausblick der Studie: | 50 |
| 6. | Zusammenfassung | 52 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 53 |
| 8. | Lebenslauf | 62 |

1. Einleitung

1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, bei der ein absoluter oder relativer Insulinmangel herrscht. Laut einer Studie von Wild et. al. steigt die Prävalenz von Diabetes Mellitus auf der Welt von ca. 2.8% im Jahr 2000 auf 4.4% im Jahr 2030. In absoluten Zahlen sind ca. 170 Millionen Menschen der über 20jährigen betroffen.⁶⁸ Somit stellt Diabetes Mellitus eine Volkskrankheit dar. Von den Diabetikern sind mehr als 90% Typ 2 Diabetiker und ca. 5% Typ 1 Diabetiker. Bei letzteren liegt eine Destruktion der β -Zellen im Pankreas zugrunde, was zum absoluten Insulinmangel führt. Bei Typ 2 Diabetikern hingegen sind die Zellen insulinresistent. Das Peptidhormon Insulin ist dafür verantwortlich, dass die Glukose im Blut in die Zellen aufgenommen wird. Daneben regt es die Glykogensynthese an und hemmt die Glukoneogenese und die Lipolyse. Dies alles führt zu einer raschen Blutzuckersenkung. Ist bei einem Menschen aufgrund z.B. einer Insulinresistenz der Blutzuckerspiegel chronisch erhöht, könnten Spätschäden auftreten, wie die Mikro- und Makroangiopathie, die dann langfristig zur Entwicklung von Bluthochdruck führen, die Neuropathie oder auch die Nephropathie.^{28, 53, 57}

Besteht bei einem Patienten längere Zeit ein erhöhter Blutzuckerspiegel, wird an das Hämoglobin der Erythrozyten Zucker angelagert. Das Hämoglobin wird nicht enzymatisch glykiert und es entsteht HbA1c. Diesen Umstand nimmt man sich in der Betreuung diabetischer Patienten zu Hilfe, um den Verlauf zu beobachten, weil das HbA1c stark mit den Blutzuckerwerten der vorangegangenen Wochen korreliert.⁴⁴

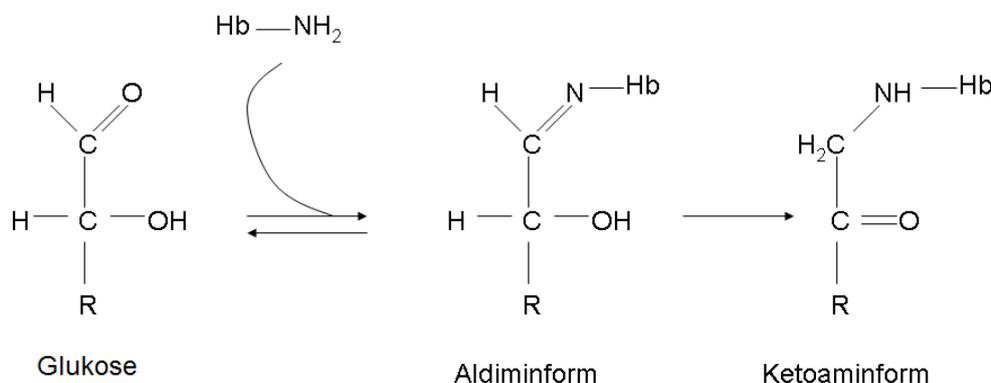


Abbildung 1: Schema der Glykierung des Hämoglobins³⁶

1.2 Arterielle Hypertonie

Arterielle Hypertonie ist definitionsgemäß eine chronische Erhöhung des arteriellen Blutdrucks systolisch über 139mmHg und diastolisch über 89mmHg.²⁵

Sie stellt einen Hochrisikofaktor für kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Ischämien und Blutungen dar. Im Gegenzug gilt bis zu einem Blutdruck von 110/70 mmHg: Je niedriger der Blutdruck ist, um so niedriger ist das kardiovaskuläre Risiko.²⁸

Die Prävalenz der Hypertonie genau zu erfassen ist nicht leicht, da die zunächst symptomlose Krankheit oft erst spät oder gar nicht erkannt wird und damit die so genannte Dunkelziffer vermutlich relativ hoch liegen dürfte. Etwa 30% der Hypertoniker wissen nichts von ihrer Erkrankung und von den bekannten Hypertonikern sind etwa 50% unzureichend oder gar nicht behandelt.²⁸ Einer Studie zufolge liegt die Gesamtprävalenz in Nord-Europa in der Bevölkerungsgruppe, die älter 35 Jahre ist, bei 44%⁷⁰, und die Hypertonie kann somit wie der Diabetes Typ 2 ebenfalls als Volkskrankheit bezeichnet werden. Aufgrund der Hypertonie selber zeigen sich beim Patienten keine Beschwerden, die Folgen des Bluthochdrucks können jedoch zu einer massiven Beeinträchtigung des Gesundheitszustands führen. Zu den häufigsten Folgen zählen Arteriosklerose, Aneurysmata und Linksherz-Hypertrophie. Letztere entsteht kompensatorisch, da der linke Ventrikel einen größeren Druck erzeugt und die Myokardzellen hierfür mehr Kraft aufbringen müssen. Die Arteriosklerose stellt eine Einlagerung in die Blutgefäßwände von unter anderem Lipiden, Makrophagen und Thrombozyten dar. Diese führt an den verschiedenen Organen zu unterschiedlichen Krankheitsbildern: Am Herzen kann sie zu einer koronaren Herzkrankheit und schließlich zum Herzinfarkt führen, im Gehirn zu einem Schlaganfall, an der Niere zu einer hypertensiven Nephropathie, am Auge zu Schäden an der Retina.²⁸ Dabei liegt immer der gleiche Pathomechanismus zugrunde: Die Lumenverengung und die damit verbundene Minderdurchblutung behindern die Funktionalität des jeweiligen Organs bzw. können sich thromboembolische Probleme entwickeln, wenn arteriosklerotische Placques aufreißen.⁵³

Die European Society of Hypertension gibt Tabelle 1 zur Einteilung der arteriellen Hypertonie an :

Tabelle 1. : Einteilung der arteriellen Hypertonie²⁵

| Kategorie | systolisch(mmHg) | diastolisch(mmHg) |
|----------------------------------|------------------|-------------------|
| Optimal | <120 | <80 |
| Normal | 120-129 | 80-84 |
| Hoch Normal | 130-139 | 85-89 |
| Stufe 1 Hypertonie | 140-159 | 90-99 |
| Stufe 2 Hypertonie | 160-179 | 100-109 |
| Stufe 3 Hypertonie | ≥180 | ≥110 |
| Isolierte systolische Hypertonie | ≥190 | <90 |

Wenn die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte eines Patienten in verschiedene Kategorien fallen, dann gilt die höhere Kategorie.

Primäre und sekundäre Hypertonie

Arterielle Hypertonie wird nach ihrer Ursache in primäre und sekundäre Hypertonie eingeteilt, wobei nur bei der sekundären eine Ursache festgestellt werden kann. So kann sie renal, endokrin, iatrogen (medikamentös) oder durch eine Aortenisthmusstenose bedingt sein. Die Nieren-bedingte Hypertonie stellt mit 3-5 % die häufigste Ursache der sekundären Form dar. Dabei führt eine regionale Minderdurchblutung oder eine Gefäß-Pathologie der Niere zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, welches normalerweise den Blutdruck nur erhöhen soll, um die Durchblutung der Niere auch bei Volumenmangel oder sonstiger Hypotonie zu garantieren. Physiologisch führt ein zu niedriger Blutdruck zu einer verstärkten endokrinen Ausschüttung von z.B. Katecholaminen oder Renin, doch die Hypotonie fehlt bei diesen Erkrankungen und somit kommt es zur Hypertonie.

Bei der primären arteriellen Hypertonie, die ca. 90% aller Hypertonie-Fälle ausmacht,⁶⁹ kann bei der Behandlung nur ein symptomatischer Ansatz gewählt werden. Sie kann medikamentös (ACE-Hemmer, Beta-Blocker, Diuretika etc.) behandelt werden. In der ambulanten Therapie wird aber besonders bei leichten Fällen die Umstellung der Lebensgewohnheiten als erste Maßnahme verwandt.

Die deutsche Hochdruckliga e.V. DHL® empfiehlt dazu folgende grundlegenden Änderungen¹³:

1. Beendigung des Rauchens
2. Gewichtsreduktion
3. Verminderung des Alkoholkonsums
4. Körperliche Bewegung und Sport
5. Reduktion des Kochsalzkonsums
6. Eine Ernährung mit Obst und Gemüse und wenig tierischen und gesättigten Fetten.

Verschiedene Studien belegen den blutdrucksenkenden Einfluss von körperlicher Bewegung, jedoch ist es schwierig, verschiedene Blutdruck-Werte oder das Auftreten von Bluthochdruck in einer Bevölkerungsgruppe alleine den verschiedenen körperlichen Aktivitäten der Menschen zuzuschreiben, da sehr viele Faktoren Einfluss auf den Blutdruck haben. Folglich ist es unabdingbar, randomisierte kontrollierte Studien zu verwenden, um den Einfluss zu messen.¹⁶

1.3 Kraft- versus Ausdauersport zur Therapie von Diabetes Typ 2 und Bluthochdruck

Man unterscheidet sportliche Aktivität in zwei Bereiche: den Ausdauer- und den Kraftsport.

Ausdauersport:

Ausdauersport beinhaltet dabei Übungen, bei der sich große Muskelgruppen in dynamischer Bewegung befinden, um speziell die aerobe Ausdauerleistung zu verbessern.

Kraftsport:

Kraftsport beinhaltet Übungen gegen Gewicht oder Kraft mit statischen und/oder isometrischen Bewegungen, um speziell die Muskelkraft, Energie und/oder Kraft-Ausdauer zu verbessern.¹⁶

Einfluss des Sports auf den Diabetes Mellitus Typ 2

Der Diabetes Mellitus Typ 2 wird sowohl durch Ausdauer- als auch Krafttraining günstig beeinflusst, Studien haben jedoch gezeigt, dass die Kombination beider Trainingsformen den größten Effekt zeigt.² Akut bedingt das Training eine erhöhte Glukoseaufnahme aus dem Blut. Insulin führt beim Gesunden zu einem Einbau eines Transporters (GLUT4) in die Zellmembran.³¹ Beim Typ 2 Diabetes wird trotz der Insulinresistenz der Blutzucker bei sportlicher Aktivität gesenkt, indem die Kontraktion der Muskeln über eine Kaskade Proteinkinasen aktiviert und somit eine GLUT4 Translokation bewirkt.⁴⁸ Langfristig führt der Sport zu einer Verstärkung der Insulinsensitivität.^{5,32} Krafttraining führt zu einer vermehrten Muskelmasse und dadurch zu einer quantitativ erhöhten Glukoseaufnahme.² Einer Studie zufolge führt Krafttraining sogar zu einer stärkeren Senkung des HbA_{1c} (s.u.) als Ausdauertraining.⁹

Einfluss des Sports auf die Hypertonie

Die Studienlage zum Effekt von Ausdauer- und Krafttraining auf den Blutdruck ist sehr komplex, da es eine hohe Anzahl von Studien zu dem Thema gibt. Die Qualität der sportlichen Aktivität sowie der späteren Messungen ist jedoch sehr variabel und deswegen zeigen sich auch teilweise widersprüchliche Werte, besonders was die Auswirkungen des Kraftsports angeht. Derzeit scheint es, dass Ausdauertraining eine blutdrucksenkende Wirkung hat, Krafttraining unter Umständen auch, insbesondere bei Kraftausdauer.⁵⁶

So beschreibt das *American College of Sports Medicine* Studien, in denen ein Ausdauertraining bei hypertensiven Patienten zu einer Reduktion des Ruhe-Blutdrucks von im Mittel 7.4/5.8 mmHg führen kann, bei normotensiven Patienten lediglich einen Rückgang von 2.6/1.8 mmHg bewirken kann.⁵² Erklärt wird der Rückgang wie folgt: Der mittlere arterielle Blutdruck ist abhängig vom kardialen Auswurfvolumen und vom peripheren Widerstand (TPR). Da Ausdauertraining keinen senkenden Effekt auf den in Ruhe vorliegenden Auswurf nimmt, muss die Blutdrucksenkung mit dem TPR zusammenhängen. Dieser verhält sich proportional zur Länge des Gefäßes, proportional zur Viskosität des Blutes und umgekehrt-proportional zur vierten Potenz des Radius'. Da weder die Länge des Gefäßes, noch die Viskosität durch das Training beeinflusst werden, muss der Grund in einer Änderung des Gefäßradius' begründet sein. Dieser Gefäßradius wird maßgeblich

durch das Endothel und seine Mediatoren beeinflusst, was später noch eingehender behandelt wird.

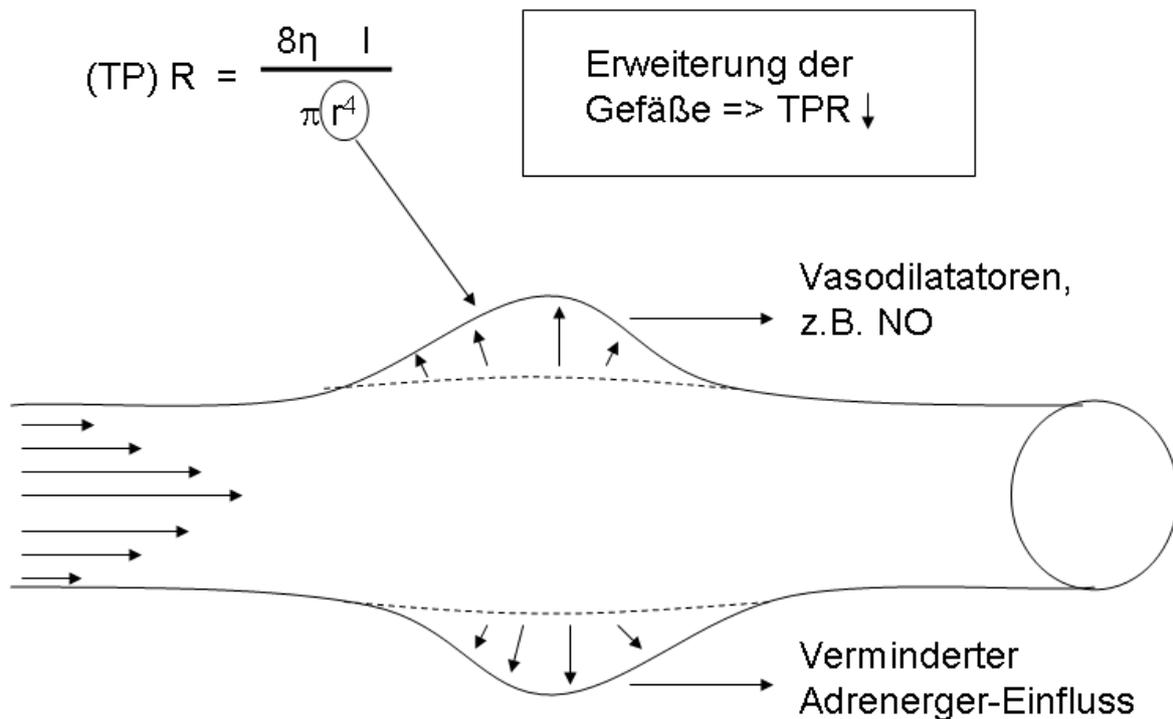


Abbildung 2: Einfluss des Radius' auf den Widerstand

Widersprüchlich zeigen sich die Studienergebnisse bezüglich einer Senkung des Renin-Spiegels. Fagard führt eine Senkung von durchschnittlich 20% an¹⁶, das *American College of Sports Medicine* berichtet über eine Senkung bei normotensiven Probanden, bei hypertensiven jedoch von keiner durchgehenden Reduktion des Plasma-Renins oder der Angiotensin II-Werte im Blut.²

Ein weiterer Faktor, der zur Reduktion des Blutdrucks führt, ist die Gewichtsabnahme, die mit dem Ausdauertraining einhergehen kann.

Für das Krafttraining ist die Studienlage bezüglich des blutdrucksenkenden Effekts sehr übersichtlich. So sehen Braith and Stewart durchschnittlich eine systolische Senkung um 3.2 mmHg und diastolisch um 3.5 mmHg, jedoch geben sie zu bedenken, dass bei den betrachteten neun Studien gerade einmal 20% der Studienteilnehmer einen erhöhten systolischen Wert größer als 140 mmHg, diastolisch nur 13% größer als 90 mmHg hatten.⁷ Um zu klären, ob Krafttraining ursächlich zu einer signifikanten Blutdrucksenkung bei Hypertonikern führt, bedarf es weiterer Studien.

Diese Senkung wird von neurohumoralen und strukturellen Anpassungen nach dem Training beeinflusst, so ergibt sich nach Ausdauertraining ein schwächerer sympathischer Einfluss durch verminderte Katecholamin-Ausschüttung.⁵² Ferner soll die Sensibilität der Gefäße gegenüber Adrenalin und dem wichtigsten peripheren Vasokonstriktor Noradrenalin gesenkt werden bzw. die Anzahl der alpha-Rezeptoren erhöht werden.³³

1.4 Gefäßregulation – die Rolle des Endothels

Ein weiterer Aspekt des Bluthochdrucks ist die Tatsache, dass er durch die Regulation des Gefäßtonus beeinflusst wird. Verschiedenste Einflüsse wirken auf die Gefäßwände ein. Die kontinuierliche Gefäßspannung wird als Ruhetonus bezeichnet. Dieser wird aus dem Basistonus erzeugt, der wiederum durch die Erregung von sympathisch-adrenergen Nervenfasern, die die Blutgefäße umgeben, verstärkt wird. Lokal dilatatorisch wirken demgegenüber eine Erhöhung des CO₂-Partialdrucks bzw. der Wasserstoff-Konzentration, eine Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration sowie eine Herabsetzung des arteriellen O₂-Partialdrucks (mit Ausnahme der Pulmonalgefäße). Daneben haben Gewebemetabolite einen Einfluss auf die Gefäßspannung. Je nach Verteilung der Rezeptoren wirken Histamin, Serotonin, Eikosanoide oder Leukotriene am Endothel.⁵⁷ Dieses besitzt dabei die Modulationsfunktion. Es ist die innerste Zellschicht der Intima der Blutgefäße und wurde lange Zeit nur als selektive Barriere angesehen, die die Diffusion von Makromolekülen aus dem Lumen in das Interstitium zulässt. Man erkannte jedoch auch die Regulierungsfunktion für den Gefäßtonus, die anti-inflammatorische Funktion, die Regulation der Gefäßzellproliferation und die Modulation der Thrombozyten-Aggregation.⁶³ Jeder Mensch besitzt rund 10¹⁴ Endothelzellen, die die Masse von zirka 1.5kg ausmachen und die eine Oberfläche von 1000 Quadratmetern auskleiden. Sie bilden Autakoide (Gewebehormone mit auto- und parakriner Wirkung), setzen sie frei und aktivieren bzw. deaktivieren im Blut zirkulierende vasoaktive Substanzen, wie Serotonin oder Noradrenalin.

Wichtige vom Endothel synthetisierte Autakoide sind Prostazyklin, der Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF), das dilatatorisch wirkende Peptid CNP sowie die stark vasokonstriktorisch wirkenden Peptide Endothelin-1 und Urotensin II. In dieser Arbeit ist der Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF) als vom Endothel freigesetzter Vasodilatator hervorzuheben. Dieser ist identisch mit

Stickstoffmonoxid (NO).⁵⁷ Auf seine Bildung und Wirkung wird im Folgenden vertieft eingegangen.

eNOS

Ein wichtiges Enzym des Endothels stellt die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) dar. Es gibt neben der endothelialen Form noch weitere Isoformen der NO-Synthase, die induzierbare iNOS und die neuronale nNOS. Sie katalysieren alle die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO). Die eNOS und die nNOS sind Kalzium-abhängige Enzyme, die konstitutiv exprimiert werden, die iNOS-Expression ist Kalzium-unabhängig. Letztere kann in verschiedenen Zellen wie Myokardzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen und auch Endothelzellen induziert werden.³ Unter normalen physiologischen Bedingungen wird sie nur wenig exprimiert, wenn aber entzündliche Prozesse im Gewebe vorhanden sind, wird die iNOS durch Zytokine wie IFN- γ , TNF- α , und IL-1 β induziert.⁴⁹ Die dann katalysierte Menge von NO kann die tausendfache Menge annehmen und einen starken Blutdruckabfall bewirken.²⁹

Die NO-Synthasen bestehen aus zwei Monomeren: einer C-terminalen Reduktase-Domäne und einer N-terminalen Oxygenase-Domäne. Die Oxygenase-Domäne besitzt eine prosthetische Häm-Gruppe. Das Häm ist existentiell für die Dimerisation, also die Verknüpfung der beiden Monomere. In den einzelnen vorliegenden Monomeren funktioniert zwar der Elektronenfluss der Reduktase-Domäne, jedoch wird das Eisen für die Bindung von Cofaktoren und Substrat benötigt, was für die letztendliche Funktion des Enzyms unerlässlich ist. An der Oxygenase-Domäne selbst werden die Co-Faktoren (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH₄), molekularer Sauerstoff und das Substrat L-Arginin gebunden. An einer Verbindungsstelle der Monomere ist zudem eine Zink-Thiolat Verbindung vorhanden, welche vierflächig um ein Zink-Ion angeordnet ist. Das Zink ist jedoch eher als strukturell und weniger als katalytisch aktiv anzusehen, so behalten NOS auch ohne Zink-Verbindung ihre katalytischen Eigenschaften.^{3, 20}

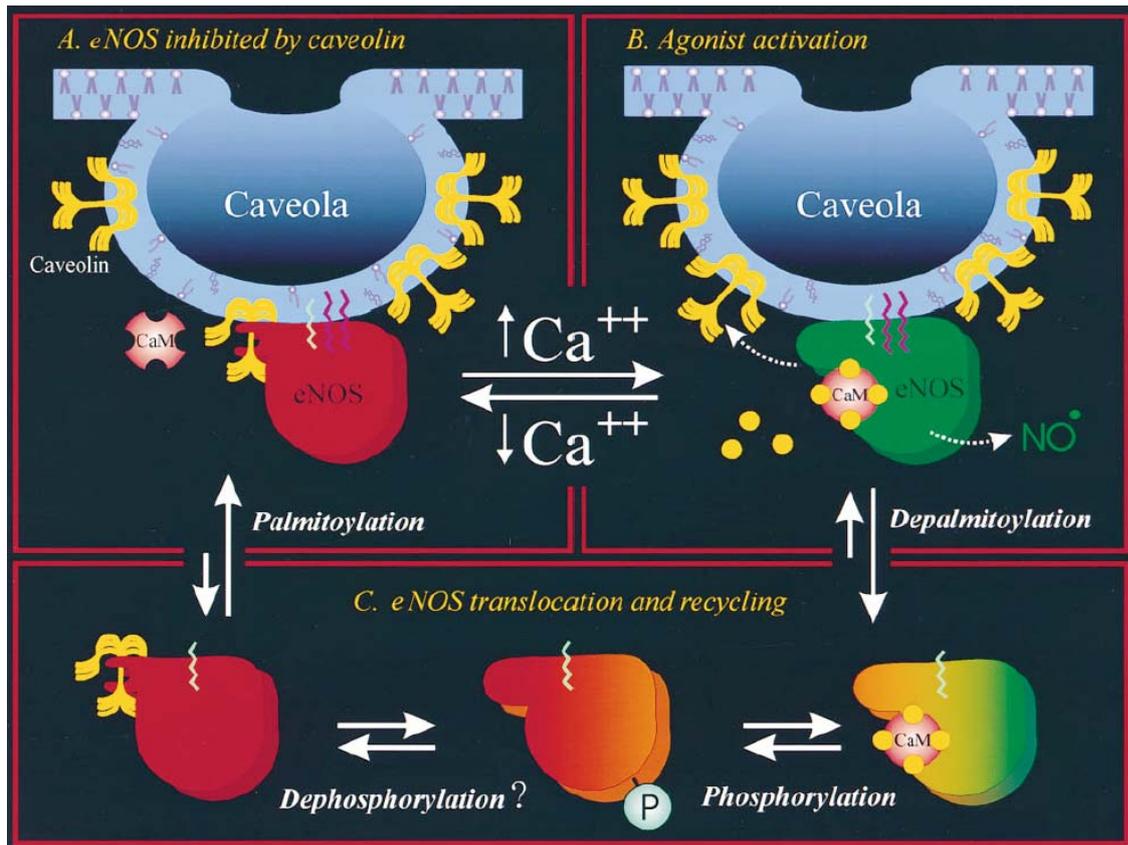


Abbildung 3: Der Zyklus der eNOS-Aktivierung und -Deaktivierung⁴⁵

Die eNOS befindet sich in den Zellen an den Caveolen des Plasmalemmas. Diese Caveolen sind kleine Invaginationen, für die das Vorhandensein des Proteins Caveolin charakteristisch ist. Als einzige der NOS-Isoformen ist die eNOS zweifach acetyliert. Diese posttranslationale Modifikation bewirkt unter anderem die Verankerung im Plasmalemma. Durch Caveolin-1 wird die eNOS inhibiert. Steigt die intrazelluläre Kalzium-Konzentration an, wird das Caveolin durch den Calmodulin/Kalzium-Komplex abgetrennt und die eNOS aktiviert. Dieses wird einerseits durch physiko-chemische Stimuli wie z.B. Scherkräfte und andererseits durch verschiedene Rezeptor-abhängige Mediatoren wie z.B. Bradykinin, Acetylcholin, Serotonin, Histamin, Thrombin oder Adenosintri-phosphat bewirkt, indem diese Mediatoren das intrazelluläre Kalzium erhöhen.^{4,29} Alle NOS-Formen besitzen die C-Terminale Reduktase-Domäne, welche die Reaktion von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) zu $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$ katalysiert. Das Flavin-Mononukleotid (FMN) und das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) erlauben es (ähnlich wie bei der Cytochrom-P450-Reduktase), verstärkt durch den Calmodulin/Kalzium-Komplex, NADPH zwei Elektronen auf den Akzeptor, das Häm auf der N-terminalen Oxygenaseregion, zu übertragen.^{1,43} Die Rolle des Calmodulin/Kalzium-Komplexes

in diesem Zusammenhang zeigt die Kalzium-Abhängigkeit der eNOS. An der Oxygenaseregion wird dann die Oxidation von L-Arginin und O_2 zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO) in Form von zwei Reduktionen katalysiert.

Die eNOS benötigt dafür den Co-Faktor BH_4 , einen der potentesten natürlichen reduzierenden Agenzien.²⁰

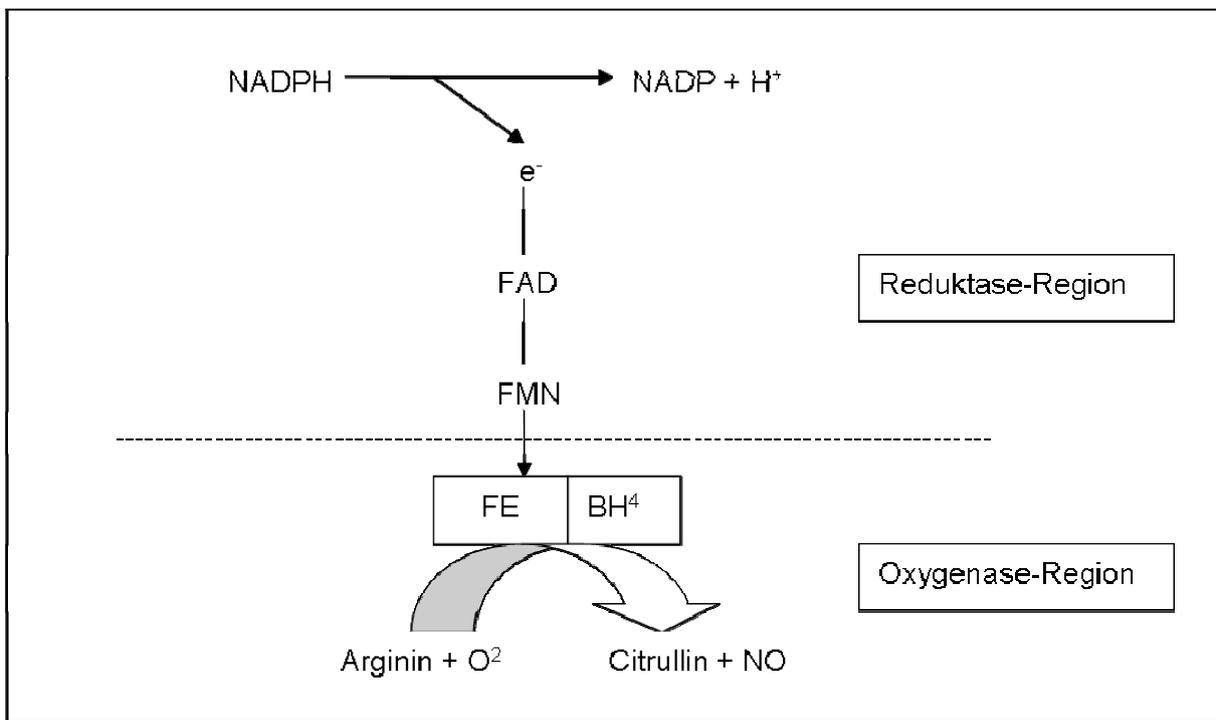


Abbildung 4: Schematische Übersicht der Elektronenflüsse (modifiziert nach Alderton et.al.)¹

Das entstandene NO erweitert die Blutgefäße, indem es in die glatte Muskelzelle diffundiert und durch Aktivierung der Guanylatcyclase in der Gefäßmuskulatur die zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP)-Konzentration erhöht. Das cGMP steigert durch die aktivierte cGMP-abhängige Kinase I die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kalzium-aktivierten Kalium-Kanälen und induziert so eine Hyperpolarisation und verhindert einen Kalzium-Einstrom. Zusätzlich phosphoryliert die cGMP-abhängige Kinase (cGK-I β) das Inositol-Trisphosphat(IP₃)-Rezeptor-assoziierte G-Kinase-Substrat (IRAG) und unterbindet dabei eine Kalzium-Ausschüttung.³⁰ In glatten Muskelzellen führt eine Kalzium-abhängige Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins zu einer Tonuserhöhung. Die durch das NO verminderte Kalzium-Ausschüttung führt nun zu einer Dilatation der glatten Muskelzelle, da die Dephosphorylierung des Myosins überwiegt.^{47,57} Durch diese Vasodilatation werden die Gefäße geschützt.

Zudem verhindert das NO die Plättchen-Aggregation und –Adhäsion sowie die Leukozytenadhäsion an die Gefäßwand, indem es die Leukozyten-Adhäsionsmoleküle CD11/CD18 an der Verbindung mit der Gefäßwand behindert und deren Expression unterdrückt.²⁰ Aufgrund seiner Funktion glaubt man, dass das NO ein wichtiger Faktor zur Verhinderung von Arteriosklerose ist.

Endotheliale Dysfunktion

Endotheliale Dysfunktion umfasst einige pathologische Zustände, darunter verminderte antikoagulatorische und verminderte anti-inflammatorische Eigenschaften des Endothels, eine beeinträchtigte Modulation der Wachstumsregulation und die Dysregulation von Gefäßumbauten. In der gängigen Literatur wird der Begriff der endotheliale Dysfunktion auch im Sinne einer fehlenden Endothel-abhängigen Gefäßrelaxation - aufgrund einer beeinträchtigten Aktivität von NO in der Gefäßwand - verwendet.¹⁰

Es gibt zahlreiche Risikofaktoren, die die Funktion der eNOS beeinträchtigen, z.B. Hypercholesterinämie, Rauchen, Bluthochdruck oder chronische Herzinsuffizienz.¹⁴ Im Falle der Hypertonie stellt Rizzoni die Frage, ob die endotheliale Dysfunktion ein primäres oder ein sekundäres Phänomen, also ob sie die Ursache der Hypertonie, ist. Tiere mit genetischer Prädisposition für Hypertonie zeigen schneller eine Schädigung am Endothel als Folge von erhöhten Scherkräften. Bei Patienten mit sekundärem Hypertonus hat sich, obwohl keine bekannte genetische Prädisposition bestand, eine verschlechterte vasodilatatorische Reaktion auf Acetylcholin gezeigt. Jedoch zeigte sich bei normotensiven Nachkommen von Hypertonikern früher eine Veränderung der Endothel-abhängigen Vasodilatation am Unterarm, was wiederum für eine genetische Rolle in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion spricht. Genetische Marker dafür wurden bisher jedoch nicht gefunden.⁵⁵ Fest steht, dass der mittlere NO-Spiegel von Patienten mit essentieller Hypertonie gegenüber dem einer Kontrollgruppe signifikant vermindert ist und dass Rauchen die NO-Produktion senkt.²¹

Obwohl der Pathomechanismus unklar ist, erkennt man das gehäufte Auftreten von endothelialer Dysfunktion bei Patienten mit den oben genannten Risikofaktoren.

Es gibt einige Theorien darüber, wie sie entsteht. Es werden z.B. eine verminderte Expression oder Aktivität, eine erniedrigte Sensibilität der glatten Muskulatur gegenüber NO oder der einschränkende Einfluss durch radikale Sauerstoff-Moleküle

(ROS) diskutiert. ROS sind reaktive Sauerstoffverbindungen sowie molekularer Sauerstoff, die alle in aeroben Zellen entstehen. Sie besitzen oftmals einzelne freie Elektronen und sind somit als Radikale anzusehen. Sie oxidieren dann Strukturen wie die DNA, Kohlenhydrate oder Lipide. Diese Geschehen fasst man unter dem Begriff oxidativer Stress zusammen.¹⁰

Dabei wird die Theorie, dass die ROS für die Dysfunktion ursächlich sind am besten dadurch gestützt, dass die endotheliale Funktion durch die Gabe von Antioxidantien, wie z.B. Ascorbinsäure, rasch verbessert wird.⁵⁸

Ein weiterer Hinweis für den Zusammenhang zwischen den arteriosklerotischen Risikofaktoren und den ROS liegt bei den NADPH-Oxidasen (NOX) Diese Oxidasen produzieren einen erheblichen Teil der Sauerstoff-Radikale und sind in arteriosklerotischen Gefäßen vermehrt vorhanden.

Überdies wird auch ein Zusammenhang von der endothelialen Dysfunktion mit der Xanthinoxidase diskutiert. Diese oxidieren normalerweise im Purinstoffwechsel Hypoxanthin und Xanthin zu Harnstoff. Bei dieser Reaktion entsteht neben Harnstoff auch $2\text{H}^+ + \text{O}_2^-$.

Interessanterweise vermag die eNOS, wenn nicht genügend Substrat oder Co-Faktor vorhanden ist, selber ROS zu bilden, zumeist O_2^- oder H_2O_2 , welches mit NO zu Peroxynitrit ONOO^- reagiert. Die ROS schädigen die eNOS, indem sie den Zink-Kern angreifen bzw. den Co-Faktor BH_4 zu BH_2 oxidieren und somit dem Enzym seine eigentliche Funktionalität nehmen, wodurch es wiederum ROS bildet statt des gefäßschützenden NO. Dieser Zustand des Enzyms wird als entkoppelt bezeichnet. Dabei erfolgt der Elektronen-Transport zum Eisen-Dioxid während der stufenweisen Aktivierung vom O_2 nicht schnell genug, und es kommt zur Dissoziation des Eisen-Dioxin-Komplexes und der Bildung von O_2^- .^{20, 46, 47}

Shesely et.al. zeigen in ihrer Studie, dass Mäuse, deren eNOS-Gen inaktiviert wurde, signifikant höhere Blutdruckwerte aufweisen. Homozygoten (-/-) Mäusen fehlte die eNOS völlig, bis auf geringeres Körpergewicht waren die Mäuse ansonsten gesund. Sie wiesen einen durchschnittlich um 18mmHg erhöhten Blutdruck auf, bei heterozygoten Mäusen (+/-) war er um 4mmHg erhöht.⁶¹ Diese Studie unterstreicht den Einfluss der eNOS auf den Blutdruck und somit die Beziehung zwischen endothelialer Dysfunktion und erhöhtem Blutdruck.

Die Regulation der eNOS

Die endotheliale NO Synthase wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Zunächst bestimmt der Ort des Enzyms seine Wirksamkeit: In der Plasmamembran ist die Aktivität bis zu siebenfach erhöht gegenüber der zytosolisch gebundenen Form, wobei es in den caveolären Abschnitten sogar noch neun bis zehnmal höher als in der übrigen Zellmembran ist.⁶⁰ Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Caveolen sowohl Bradykinin-Rezeptoren als auch kationische Aminosäuren-Kanäle (CAT-1) besitzen, welche das Substrat Arginin transferieren. Des Weiteren kommen in den Caveolen Östrogen- und VEGF-Rezeptoren und Kalzium-Kanäle vor. Diese Bedingungen verschaffen der eNOS optimale Voraussetzungen.²²

-Kalziumabhängige Regulierung

Die eNOS-Aktivität wird auch stark durch den Kalziumgehalt in der Zelle bestimmt. Durch verschiedene Stimuli wie Bradykinin, Östradiol, Serotonin, VEGF und Histamin wird über die Freisetzung von Inositol-4-5-trisphosphat (IP3) der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt gesteigert und dadurch die Verbindung mit Caveolin-1 gelöst und ein Kalzium-Calmodulin-Komplex gebildet. Daraufhin steigt die eNOS vermittelte NO-Bildung an.⁵⁴ Auch wenn das Substrat fehlt und das Enzym im entkoppelten Zustand ist, führt ein erhöhter Kalzium-Spiegel zu einem Aktivitätsanstieg, hierbei jedoch zu einer erhöhten Katalyse von O_2^- und nicht von NO.¹²

- Phosphorylierung

Weiterhin beeinflussen mechanische Kräfte die Aktivität der eNOS weitestgehend Kalzium-unabhängig. So führen Scherkräfte zu einer mechanischen Dehnung der Blutgefäße und somit der Endothelzellen. Dort wird die Phosphatidylinositol-3-Kinase aktiviert, die daraufhin die Akt-Kinase (Pkb) phosphoryliert und aktiviert. Diese wiederum setzt an der eNOS am Serin¹¹⁷⁷ der Reduktase-Domäne an. Die Phosphorylierung am Serin¹¹⁷⁷ findet auch durch Östrogen-, VEGF-, Insulin- oder Bradykinin-vermittelte Kinasen statt. Die Steigerung der Aktivität beträgt etwa das Doppelte bis zum Dreifachen der Basalaktivität. In vitro wurde auch für die cAMP-abhängige Kinase (Pka) eine eNOS-Phosphorylierung am Serin und damit eine gesteigerte Aktivität nachgewiesen.

Eine negative Rückkopplung stellt die Phosphorylierung am Threonin Thr⁴⁹⁵ durch die Proteinkinase C (Pkc) dar. Wird die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration erhöht und

somit die eNOS-Aktivität erhöht, wird auch gleichzeitig die eNOS am Thr⁴⁹⁵ phosphoryliert und somit wird die Regulation gewährleistet. Die Phosphorylierung am Thr⁴⁹⁵ hemmt die Calmodulin-Verbindung und wirkt so aktivitätsmindernd.^{22, 46, 60}

Ein weiterer Angriffspunkt für die Kinasen ist das Ser¹¹⁴ der Oxygenase-Domäne. Diese Phosphorylierung scheint durch Bradykinin sowie Scherkräfte begünstigt. Die Regulierungsfunktion selber muss noch geklärt werden, die örtliche Nähe zur BH4-Bindungsstelle lässt eine Regulierung der Dimerisation vermuten.

Daneben gibt es Ansätze, eine Regulierung durch die Phosphorylierung am Serin⁶³³ zu erkennen. Dieser Aminosäurerest befindet sich in dem inhibitorischen Abschnitt, der die CaM-Bindung drosseln soll. Auch hier müssen noch weitere Untersuchungen erfolgen, um eine genaue Regulierungsfunktion nachzuweisen.¹⁹

-Genexpression

Ein weiterer Aspekt, der beachtet werden muss, ist die Rolle der Genexpression. Scherkräfte, Wachstumsfaktoren, Lysophosphatidylcholin, Zellwachstum, oxidierte Linolsäure und 3-hydroxy-3-methylglutaryl Koenzym-A Reduktase-Inhibitoren bewirken eine vermehrte Expression der eNOS, wohingegen Tumor Nekrose Faktoren, Hypoxie, Lipopolysaccharide, Thrombin und oxidiertes LDL die eNOS mRNA reduzieren. Sowohl transkriptionale also auch posttranskriptionale Mechanismen zeigen sich hierfür verantwortlich.⁵⁹

-Hitzeschockprotein 90

Regulatorisch bedeutsam ist auch das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90). Als Chaperon-Protein ist es sowohl an der Faltung der NO-Synthasen als auch am Einbau des Häms beteiligt.¹⁹ Überdies soll das Hsp90 die eNOS allosterisch modifizieren und somit regulieren.¹ Auch soll die Calmodulin-induzierte Ablösung vom Caveolin durch die Verbindung mit dem Hsp90 verstärkt werden. Dies kann durch Histamin, VEGF oder wiederum Scherkräfte ausgelöst werden.²²

1.5 NOS auf Erythrozyten

Bis ins Jahr 1996 kannte man die NO-Synthasen hauptsächlich von den Endothelzellen. Dann wurde jedoch erstmals eine NO-Synthase in den Erythrozyten nachgewiesen. Sie galt zunächst als inaktiv bzw. man konnte ihr keine genaue Funktion zuerkennen.⁵⁴

Zehn Jahre später wurde dann mittels Immunfluoreszenz, Western Blot und Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) eine aktive NO-Synthase ähnlich der aus den Endothelzellen nachgewiesen. Bisher war es aufgrund des hohen Hämoglobin- und Proteingehalts schwierig gewesen, die NOS nachzuweisen. Dies änderte sich, als Erythrozyten-spezifische Nachweismethoden ausgearbeitet wurden. Es zeigte sich, dass die NOS im Zytoplasma und in der Plasmamembran liegt, in der Membran 20-30% häufiger, jedoch nur auf der zytoplasmatischen Seite.

Die Regulation der erythrozytären NOS (eryNOS) scheint in der jetzigen Betrachtung begrenzt, da den roten Blutkörperchen einige wichtige Zellorganellen fehlen, wie z.B. der Zellkern, das endoplasmatische Retikulum oder der Golgi-Apparat. Es scheint, dass die eryNOS maßgeblich durch das Angebot des Substrats Arginin reguliert wird. Zudem spielen auch die Kalzium-Konzentration und auch die Phosphorylierung am Serin¹¹⁷⁷ eine Rolle.

Diskutiert wird eine hemmende Regulierung durch einen Cav-1-Flotillin-Komplex, der an der Membran die Aktivität der NOS einschränkt. Dieser wird wiederum von einem durch Scherkräfte eingesetzten erhöhten Kalziumeinstrom und somit vermehrten CaM-Bindungen aufgehoben und es entsteht ein Kreislauf, bei dem nach einem Abfall der Kalzium-Konzentration die Verbindung der eryNOS mit dem Cav-1-Flotillin-Komplex wieder geknüpft wird.⁵⁰

Durch das Stickstoffmonoxid wird die Deformierbarkeit der Erythrozyten selber gesteigert und die Thrombozytenaggregation gehemmt, so dass es die Fließeigenschaften des Bluts aus pathophysiologischer Sicht positiv beeinflusst.

1.6 Fragestellung der Studie

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von dreimonatigem Ausdauer- und Kraftsport auf die Expression der erythrozytären NO-Synthase von an Diabetes Mellitus Typ 2 erkrankten Probanden.

Im Einzelnen werden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Hat das Training einen Einfluss auf die eryNOS-Phosphorylierung am Serin¹¹⁷⁷?

Hierfür wurden die Blutentnahmen immunhistochemisch gefärbt und densitometrisch ausgewertet.

2. Hat das Training eine veränderte Verteilung der Phosphorylierungszustände zur Folge?

Hierfür wurden die densitometrisch erhobenen Daten prozentual aufgeteilt und graphisch dargestellt.

Aus den Ergebnissen folgen die anschließenden Fragestellungen:

3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der veränderten Phosphorylierung am Serin¹¹⁷⁷ zum Blutdruck vor und nach Training?

Hierfür wurden die Blutdruckwerte mit den Werten der Phosphorylierung verglichen.

4. Spielen die Gefäßelastizitäten der großen bzw. kleinen Gefäße für die veränderten Phosphorylierungen am Serin¹¹⁷⁷ eine Rolle?

Hierfür wurden die Werte der Pulswellengeschwindigkeit mit den Werten der Phosphorylierung verglichen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Probanden

Das Probandenkollektiv für diese Studie wurde aus der „Diabetes-Aktiv“ Studie der Deutschen Sporthochschule in Köln gewonnen. Für die Probanden galten folgende Einschlusskriterien:

- männlich,
- >30 Jahre alt,
- körperlich inaktiv,
- Diabetes mellitus **Typ 2**, nicht insulinpflichtig.

Aus der Studie ausgeschlossen wurden Probanden, die bereits eine nachgewiesene diabetische Folgekrankheit wie Nephropathie, Retinopathie oder sonstige Gefäßschäden aufwiesen. Zusätzlich durfte auch kein Alkohol oder Drogenmissbrauch vorliegen. Auch das Vorliegen einer chronisch obstruktiven Pneumopathie (COPD) oder einer Anämie führten zum Ausschluss.

32 Teilnehmer wurden randomisiert ausgewählt und die Hälfte jeweils einer Ausdauer- bzw. einer Kraftgruppe zugeteilt. Von den 32 Probanden mussten vier während des Interventionsprogramms aufgrund von gesundheitlichen Problemen aufhören. Abgesehen davon wurden weitere Probanden wegen einer zu geringen Anwesenheit ausgeschlossen, da eine 90prozentige Anwesenheit verpflichtend war, um in der Studie berücksichtigt zu werden.

2.2 Studienaufbau

Die Probanden wurden insgesamt dreimal untersucht. Jede dieser Untersuchungen erstreckte sich über zwei Tage. Bei der Eingangsuntersuchung wurden eine Anamnese und eine Echokardiographie durchgeführt. Nach diesem Eingangstermin sollten die Probanden weiterhin für sechs Wochen körperlich inaktiv bleiben, um mit ihnen drei Monate später eine Kontrolluntersuchung durchführen zu können. Daraufhin begann das zwölfwöchige Training, indem sowohl bei der Kraft-, als auch bei der Ausdauer-Gruppe jeweils zwei Trainingseinheiten unter Aufsicht von Sportwissenschaftlern der Sporthochschule und eine selbstständige Einheit zu

Hause durchgeführt wurden. Wiederum drei Monatespäter erfolgte dann die Abschlussuntersuchung.

Das Training:

Sowohl das Kraft- als auch das Ausdauertraining erfolgte für die Probanden individuell an die Belastungsmöglichkeiten jedes einzelnen angepasst.

Bei der **Ausdauer-Gruppe** wurde dabei an der aeroben Schwelle bei ca. 2 mmol Laktatproduktion trainiert, um sicher zu stellen, dass in aerober und nicht in anaerober Stoffwechsellage trainiert wurde. Blutdruck, Herzfrequenz und subjektive Belastung gemäß einer modifizierten Borg-Skala (siehe Tabelle 1) wurden vor, während und nach dem Training erfasst.

Eine Trainingseinheit bestand aus vier Teilen:

1. Aufwärmen: 2 Minuten Belastung <50% der ermittelten Trainingsbelastung.
2. Aufwärmen: 5 Minuten Belastungssteigerung von <50 auf 100%.
3. Training: bei 100 % Belastungsintensität zu Beginn 15 Minuten bis 40 Minuten am Ende der drei Monate. Des Weiteren sollte eine subjektive Steigerung von anfangs leicht bis am Ende Maximalbelastung stattfinden.
4. Erholung: Neben einer Belastungsreduktion auf null Watt wurden die Trainingsparameter von den leitenden Trainingsleitern festgehalten.

Für das Heimtraining wurde den Probanden die Grundtechniken von Walken und Nordic Walking beigebracht, sodass jeder selber wählen konnte. Zur Steuerung des eigenen Trainings wurden die Probanden dazu angehalten, den individuellen Trainingspuls als Gradmesser zu verwenden. Auch hierbei wurden die objektiven Werte und die subjektiven Werte der BORG-Skala in einem Trainingsprotokoll festgehalten.

Für die Teilnehmer der **Kraftgruppe** begann das Training mit einer dreiwöchigen Einübung der Übungen an den Kraftgeräten. Daraufhin folgte ein wiederum dreiwöchiges Kraftausdauertraining. Schließlich folgte ein sechswöchiges Muskelaufbautraining.

Während des Trainings wurden die Wiederholungen an den Geräten von 2 x 20 über 2 x 15 bis auf 2 x 12 gesenkt, jedoch der maximale Kraftaufwand von 50% über 70% auf 80 % gesteigert.

Tabelle 1: Belastungsskala modifiziert nach der Borg- Skala⁶

| | |
|----|------------------------|
| 6 | |
| 7 | Sehr, sehr leicht |
| 8 | |
| 9 | Sehr leicht |
| 10 | |
| 11 | Recht leicht |
| 12 | |
| 13 | Etwas anstrengender |
| 14 | |
| 15 | Anstrengend |
| 16 | |
| 17 | Sehr anstrengend |
| 18 | |
| 19 | Sehr, sehr anstrengend |

Die drei Untersuchungen an der Sporthochschule umfassten folgende Komponenten:

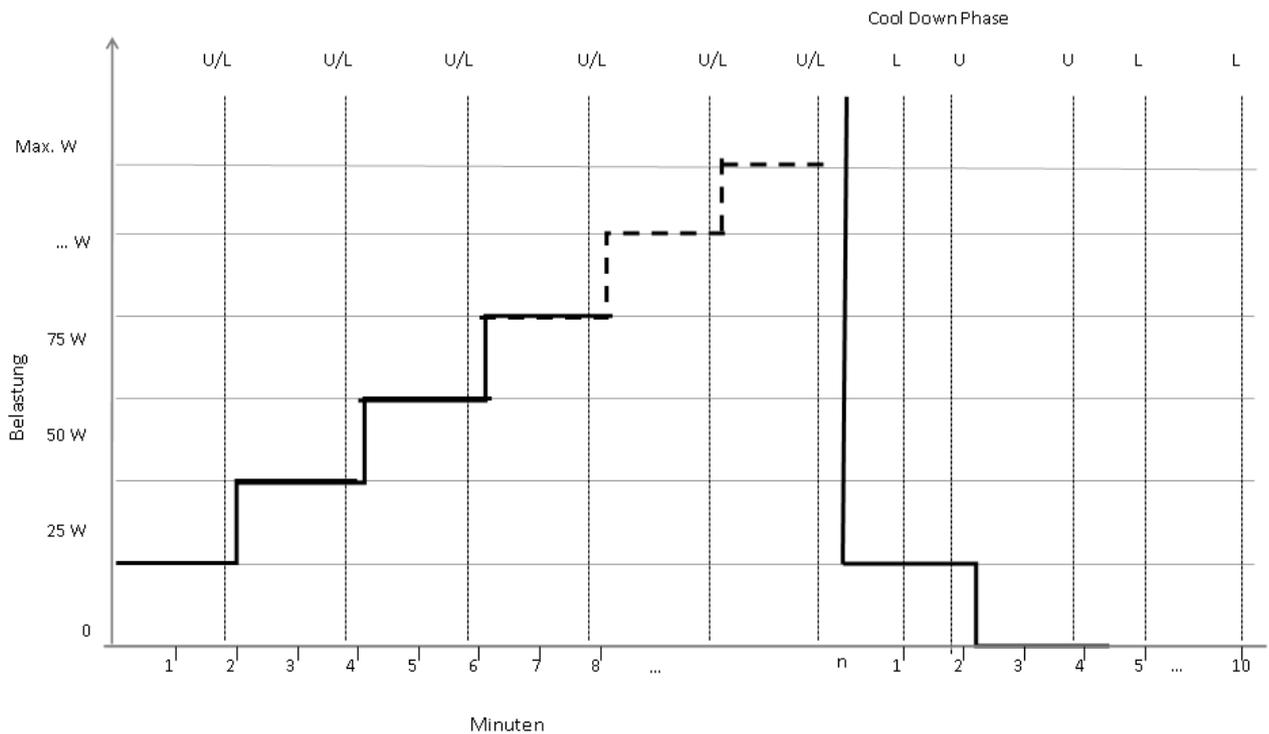
- *Nüchtern glukose (am Vortag der eigentlichen Untersuchung),*
- *ein Ruhe-EKG, ein Belastungs-EKG nach WHO-Schema (siehe 2.3),*
- *Herzfrequenz in Ruhe und nach Belastung,*
- *Laktat in Ruhe und nach Belastung (siehe 2.4),*
- *BMI und Bauchumfang,*
- *Insulin, Proinsulin und Cholesterinwerte & Triglyceride,*
- *Endothelmessung (siehe 2.5),*
- *venöse Blutabnahmen (siehe 2.6),*
- *Kraftmessung (Desmotronic von der Fa. Schnell, Peutenhausen).*

2.3 Fahrradergometrie

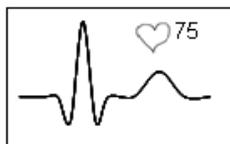
Die Fahrradergometrie wurde mit dem Ergoline Ergometrics 900 (Bitz, Deutschland) und dem EKG-Gerät Ergoline Ergoscript EK3012 (Bitz, Deutschland) durchgeführt. Auf dem EKG wurde während der gesamten Belastung auf Zeichen von Ischämie, Extrasystolen etc. geachtet, daneben noch auf einen eventuell zu starken Blutdruckanstieg oder sonstige unphysiologische Ereignisse, die zu einem Abbruch der Ergometrie geführt hätten. Wenn es zu keinem Abbruch kam, führten die Probanden die Untersuchung bis zur Maximalbelastung durch. Die Belastungsintensität wurde neben den eingestellten Leistungsstufen als subjektive Belastung mittels BORG-Skala (siehe oben) erhoben. Minimaler Anstrengung wurde der Wert 6 zugeordnet, maximaler Anstrengung kurz vor Abbruch der Belastung der Wert 20.

Die Belastungsstufen wurden anhand des WHO-Schemas gewählt. Gestartet wurde mit einer Belastung von 25 Watt, die alle zwei Minuten um 25 Watt erhöht wurde. Am Ende jedes zweiminütigen Zyklus' wurden EKG, Herzfrequenz, Blutdruck und Laktatwerte gemessen bzw. erfasst. Nachdem die maximale Belastungsstufe erreicht wurde, mussten die Probanden zwei Minuten in einer Cool-Down-Phase bei 25 Watt und danach noch mal zwei Minuten ohne Widerstand weiterfahren. Am Ende dieser Zyklen wurden die oben beschriebenen Messungen durchgeführt. Einzig das Laktat

wurde nach Belastungsende jeweils in der fünften und zehnten Minute und nicht nach zwei Minuten am Ohrläppchen abgenommen. Der Testleiter entschied, wenn die Vitalparameter eine Normalisierung anzeigten, das endgültige Ende der Fahrradergometrie.



U= Herzfrequenz,
EKG



Blutdruck



L= Laktatdiagnostik

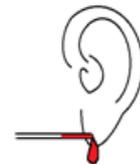


Abbildung 5: Schema der Untersuchung

2.4 Laktatmessung

Die Laktatmessung fand immer kurz vor Ende einer Belastungsstufe sowie eine, fünf und zehn Minuten nach Belastungsende statt. Hierzu stach der Testleiter mit einer Einmallinganzette (Haemostilett, Fa. ASID Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland) in das durch leichten Druck hyperämisierte Ohrläppchen. Mit einer 20µl End-to-End-

Kapillare (Fa. EKF- Diagnostik, Barleben, Deutschland) wurde das Blut aufgenommen und dann in ein Eppendorfcup inklusive Systemlösung (Fa. Eppendorf Hamburg, Deutschland) gegeben. Mit 1ml der vorgekühlten Systemlösung wurde das Blut durch leichtes Schütteln vermischt und daraufhin bei 4°C gelagert.

Das Messgerät Ebio-plus (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde vor den Messungen durch einen konfektionierten Standard kalibriert. Geeicht wurde es anschließend mit vier Kontrollen. Dieses Prozedere wurde in regelmäßigen Abständen wiederholt.

2.5 Endothelmessung

Die Endothelmessung erfolgte per Pulswellengeschwindigkeit mit dem Arteriographen Tensioclinic (Unimedica, London, UK). Dabei wird den Patienten die Manschette an den Oberarm gelegt und diese misst dann zunächst oszillometrisch den arteriellen Blutdruck. Daraufhin pumpt sich die Manschette ca. 35mmHg höher als der gemessene Wert auf. Dann wiederum misst die Manschette die im Arm vor der Manschette ankommenden Pulswellen. Der Arteriograph dividiert nun die Strecke vom Jugulum zur Symphyse, die die Reflexion der Pulswelle von der Bifurkation der Aorta darstellt, durch die gemessene Differenz der Pulswellen und man erhält die Pulswellengeschwindigkeit in m/s. Für die Messung der großen Gefäße wurde die Manschette ähnlich einer Blutdruckmessung am Oberarm, für die Messung der kleinen Gefäße an den Unterarm und ein Drucksensor an die A. radialis angelegt.

2.6 Venöse Blutentnahme und Verarbeitung

Bei jeder Untersuchung wurden vier Blutproben mit EDTA-Vakuetten (Becton Dickinson Vacutainer Systems -Europe, Heidelberg, Deutschland) entnommen. Die erste bei Ankunft der Probanden (t₀). Diese spiegelt den Ruhezustand wider. Daraufhin folgte das Belastungs-EKG und direkt im Anschluss folgte die zweite Blutentnahme (t₁).

2.7 Aufbereitung der Blutproben

Unmittelbar nach der Entnahme wurden 200 µl EDTA-Blut mit der gleichen Menge Paraformaldehydlösung (PFA 4% in 0.1 molarem Phosphatpuffer) in ein Eppendorfgefäß gegeben, um sie dann 20 Minuten zu inkubieren, damit die

Erythrozyten fixiert werden. Dann wurde das Eppendorfgefäß bei 800 Rotationen pro Minute (rpm) für drei Minuten zentrifugiert (Zentrifuge- Rotixa 1200, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Der entstandene Überstand wurde abpipettiert und ein Phosphatpuffer (PBS, 0.1 mol) auf die Probe gegeben und vermischt. Nach drei Minuten Inkubationszeit wurde erneut mit 800 rpm für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand erneut abpipettiert. Schließlich wurde der Probe 800µl PBS zugegeben und sie gekühlt bei ca. 4°C gelagert.

2.8 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung wurde ein Standardprotokoll modifiziert, welches im Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Abteilung Molekulare und Zelluläre Sportmedizin der DSHS Köln unter Leitung von Professor Bloch entwickelt wurde. Das Grundprinzip dieser Methode besteht darin, dass sich durch die Bindung von Antikörpern an das zu untersuchende Enzym und durch die Markierung des Antikörpers mittels eines speziellen Farbstoffs die Aktivität des Enzyms anzeigen lässt.

Hierfür werden 15µl einer Blutprobe auf einem Objektträger (Menzel, Braunschweig Deutschland) ausgestrichen und durch mehrmaliges Schwenken über einem Bunsenbrenner (Intega Biosciences, Fernwald, Deutschland) hitzefixiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Leitz, Deutschland) kontrolliert, ob genug Erythrozyten auf dem Objektträger vorhanden waren und ob diese in unversehrtem Zustand waren.

Daraufhin wurden auf den Objektträgern zwei Bereiche mit Hilfe eines Fettstifts (Firma Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) markiert, einer für den Antikörper und einer für die immunhistologische Kontrolle (IHC) als Negativ-Kontrolle. Bei beiden Bereichen wurde exakt gleich verfahren, nur dass auf der IHC kein primärer Antikörper verwendet wurde.

Zu Beginn des eigentlichen Färbevorgangs wurden die Präparate einmal für drei Minuten mit Tris-Pufferlösung (TBS 0.05 mol, ph 7.6) gewaschen. Ein Waschvorgang dauerte im Verlaufe der Färbung immer genau drei Minuten, weswegen von hier an keine Angabe zur Länge der Waschungen gegeben wird. Anschließend wurde 0.1-prozentiges angewärmtes Trypsin für 30 Minuten auf die Präparate gegeben, um die Erythrozytenmembran zu perforieren. Um für das Trypsin optimale katalytische Voraussetzungen zu schaffen, wurden die Objektträger für diese Zeit in einen

Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) bei 37°C gegeben. Nach den 30 Minuten wurden die Präparate wieder dem Brutschrank entnommen und die Reaktion mit zweimaligem Spülen mit TBS abgestoppt. Um die endogenen Peroxidasen zu inaktivieren, wurde den Präparaten nun für zweimal zehn Minuten eine Lösung aus 2% Wasserstoffperoxid (H_2O_2), 18% destilliertem Wasser (H_2O) und 80% Methanol (CH_3OH) zugesetzt. Da das H_2O_2 sehr flüchtig ist, musste die Lösung zweimal frisch angesetzt und aufgetragen werden. Es schloss sich erneut ein Spülvorgang mit TBS an. Als nächstes wurde eine dreiprozentige in TBS gelöste Milcheiweißpulverlösung (Firma Bio- Rad Laboratories) angesetzt und für 30 Minuten auf die Präparate gegeben, um unspezifische Bindungen des Antikörpers aufgrund von Ladungsunterschieden zu verhindern. Ohne danach zu spülen, wurde der primäre Antikörper rabbit Anti-phospho-eNOSSer¹¹⁷⁷ (Firma Upstate, Lake Placid, USA) in der Verdünnung 1:1000 in 0.3-prozentiger Milcheiweißpulverlösung und 0.03 prozentigem TWEEN 20 als Stabilisator für 60 Minuten auf die Präparate gegeben. Daraufhin wurde zweimal mit TBS gespült und die Präparate mit einem sekundären Antikörper, einem biotinylierten Antikörper (goat Anti-rabbit, biotinylated, Firma DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), der gegen die Kaninchenantikörper bindet, wiederum in 0.3-prozentiger Milcheiweißpulverlösung in der Verdünnung 1:400 für 30 Minuten inkubiert. Dieser sollte sich an den primären Antikörper binden. Abgestoppt wurde dieser Vorgang durch zweimaliges Spülen mit TBS. Als nächstes wurde ein Streptavidin-Horseradish-Peroxidase- Komplex (Firma Amersham Biosciences) in der Verdünnung 1:150 für 30 Minuten auf die Präparate gegeben. Dieser sollte sich wiederum an den zweiten Antikörper binden, um im nächsten Schritt den Färbestoff zu binden. Zunächst wurden die Präparate erneut zweimal mit TBS gespült. Der Färbestoff, die 3.3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung, musste angesetzt und gefiltert werden. Dafür wurden 15 ml 0,1 molaren Phosphatpuffer (pH 7.4) folgende Stoffe zugegeben: 7.5 mg DAB, 300 µl von 0.05 molarem Nickel-II-Sulfat ($NiSO_4 \times 6 H_2O$), 300 µl zehnpromzentige β -D-Glukose-Lösung, 6 mg Ammoniumchlorid (NH_4Cl) und zuletzt 50 µl Glukose-Oxidase. Auf den Präparaten musste nun immer wieder lichtmikroskopisch kontrolliert werden, wann sich auf den eigentlichen Färbefeldern im Vergleich zu den IHC-Feldern eine Färbung ergeben hat. Dies war im durchschnitt nach fünf Minuten erfolgt, sodass die DAB-Lösung sofort dreimalig mit TBS ab gespült wurde.

Dann wurden die Objektträger an der Luft getrocknet und danach entwässert, indem sie durch eine Alkoholreihe aus 70-, 96- und 100-prozentigem Ethanol und Xylol gegeben wurden. Anschließend wurden sie mit dem Eindeckmedium Entellan und einem Deckglas fixiert und konnten nun ausgewertet werden.

Tabelle 2: Übersicht über die immunhistochemische Färbung

| | |
|-----|--|
| 1. | Ausstriche anfertigen, hitzefixieren und markieren |
| 2. | 1x Spülen mit TBS (3 min.) |
| 3. | 30 min. mit vorgewärmten 0.1%igem Trypsin bei 37° im Brutschrank andauern |
| 4. | 2x Spülen mit TBS (3 min.) |
| 5. | 2x 10 min. mit: Methanol (20ml) + Aqua dest. (4.5 ml) + H ₂ O ₂ (0.5 ml) |
| 6. | 1x Spülen mit TBS (3 min.) |
| 7. | 30 min. mit 3%igem Milchlösung (3mg Milchpulver auf 100ml TBS) |
| 8. | 60 min: 0.3%ige Milchlösung mit 1. AK (1:500) + 0.03%iges Tween 20 |
| 9. | 2x Spülen mit TBS (3 min.) |
| 10. | 30 min.: 0.3%ige Milchlösung mit 2. AK: Anti-Rabbit biotinylated (1:400) |
| 11. | 2x Spülen mit TBS (3 min.) |
| 12. | 30 min. mit Horseradish-Peroxidase-Komplex (1:150 in TBS) |
| 13. | 2x Spülen mit TBS (3 min.) |
| 14. | Entwickeln mit DAB-Lösung (15 ml PB/ 0.1 M, 150 µl DAB, 150 µl NiSO ₄ , 300 µl Glukose, 150 µl NH ₄ Cl, zuletzt 50 µl Peroxidase + abfiltrern) |
| 15. | 3x Spülen mit TBS (3 min.) |
| 16. | Lufttrocknen |
| 17. | Fixierung mit Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und Xylol und anschließend eindecken |

Ansätze:

| | |
|-----|--|
| TBS | <p>Trispuffer 0,05 mol [pH 7.6]:</p> <p>6.057g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in 250ml Aqua dest. lösen</p> <p>8.766g NaCl (=150mmol) dazugeben</p> <p>Mit 1n (ca. 80ml) auf pH 7.6 einstellen</p> <p>Mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen</p> <p>pH-Kontrolle</p> |
| PB | <p>Phosphatpuffer 0,1 mol [pH 7.4]:</p> <p>14.4g/Dinatrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)</p> <p>2.6g/Natrium-Dihydrogenphosphat.Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)</p> <p>pH einstellen!</p> |
| DAB | <p>Diaminobenzidin - Lösung:</p> <p>15ml 0.1 mol PB [pH 7.4]:</p> <p>150μl Diaminobenzidin (DAB) = 7.5mg</p> <p>150μl Ammoniumchlorid (NH_4Cl) = 6.0mg</p> <p>300μl Nickel-II-Sulfat (NiSO_4) = 0.05 mol (Merk, 6727.0100)</p> <p>300μl 10% β-D-Glukose (Sigma, G5250)</p> <p>50 μl Glukoseoxidase (Sigma, Type VII, G2 50000 Units)</p> <p>Filtrieren</p> |

2.9 Auswertung der Präparate mit Hilfe von ImageJ

Die Präparate konnten nun am Computer mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ 1.37v (National Institutes of Health, USA) ausgewertet werden. Hierzu mussten digitale Bilder der Erythrozytenausstriche angefertigt werden. Unter Verwendung des Mikroskops (Zeiss KS 300) konnten nun mit vierzigfach vergrößerndem Objektiv und dem zehnfach vergrößernden Okular die Ausstriche betrachtet werden. Dann wurden geeignete Ausschnitte mit der Videokamera (DXC-1850 P bzw. 3CCD der Firma Sony) digital aufgenommen und an einem PC an die KS 300-Software weitergeleitet und als TIFF-Datei unkomprimiert gesichert. Diese TIFF-Dateien konnten nun von ImageJ (Version 1.37v) genutzt werden, um die Erythrozyten mit dem Tool „oval selection“ auszuwählen und densitometrisch die durchschnittliche Graufärbung zu bestimmen. Es wurde darauf geachtet, dass der Hintergrund dem Wert 215 ± 5 entsprach, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. Pro Ausstrich wurden je 35-40 Erythrozyten der Färbung und 10-15 Zellen der IHC-Kontrolle ausgewertet und die Werte in Microsoft-Excel-Tabellen übernommen. Um einzig die Erythrozytenfärbung zu erhalten, wurde nun von den gemessenen Werten der Erythrozyten der Hintergrundwert abgezogen.

| |
|--|
| Erythrozytenfärbung = gemessene Erythrozytenwerte - Hintergrundwerte |
|--|

Als nächstes musste sichergestellt werden, dass man nur die Antikörperkomplexfärbung als Wert erhält und hierfür wurde der durchschnittliche IHC-Wert von den gemessenen Erythrozyten abgezogen

| |
|---|
| Antikörperkomplexfärbung = Erythrozytenfärbung – IHC-Wert |
|---|

Die so erhaltenen Antikörperkomplexfärbungswerte sind die für diese Arbeit relevanten Werte, die anzeigen, inwieweit sich die Enzymaktivität verändert hat bzw. wie sie sich über den Zeitraum von drei Monaten verändert hat.



Abbildung 6: Das Programm ImageJ, mit dem die Graustufen ausgemessen wurden

2.10 Statistik

Die erhobenen Graustufenwerte der Erythrozyten wurden als Mittelwerte erhoben. Diese wurden in dem Programm Excel von Microsoft (Version 2003, SP3) zusammengefasst und dann wurde mit Hilfe eines einseitigen t-Tests die Signifikanz bestimmt. Verglichen wurden die Graustufen der Probanden vor und direkt nach Belastung sowie die Werte vor und nach dem dreimonatigen Training. Auch die erhobenen Laktat- und Blutdruckwerte, die Werte der Gefäßelastizität und die Werte der Fahrradergometrie sowie die der Beinpresse wurden mit dem t-Test untersucht. Wenn $p \leq 0,05$ ergab, wurde von einem signifikanten Ergebnis ausgegangen. Diese signifikanten Veränderungen sind in den Grafiken mit einem Sternchen gekennzeichnet (*).

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht die Veränderungen der Phosphorylierung der eryNOS am Ser¹¹⁷⁷ nach körperlichem Training. Um einen Einfluss auf diese Phosphorylierung zu haben, muss das Training effektiv sein. Unter Punkt 3.1 sind die Ergebnisse des Trainings der Diabetes Aktiv Studie angegeben, die schon in der sportwissenschaftlichen Dissertation „Der Einfluss einer sporttherapeutischen Trainingsintervention auf die Dichte der Monocarboxylattransporter in Skelettmuskulatur und Erythrozyten bei nicht-insulinpflichtigen Typ 2 Diabetikern“³⁹ untersucht wurden.

3.1 Leistungsfähigkeit

In den Abbildungen 7 bis 9 sind die Resultate des Ausdauer- bzw. Krafttrainings aufgeführt. Zunächst wird die Veränderung der körperlichen Aktivität anhand der Leistungen am Fahrradergometer in Watt und die Veränderungen der Laktatwerte betrachtet. Anschließend werden die Veränderungen der isometrischen Kraft mit Hilfe der Beinpresse beobachtet:

3.1.1 Fahrradergometrie (Ausdauer)

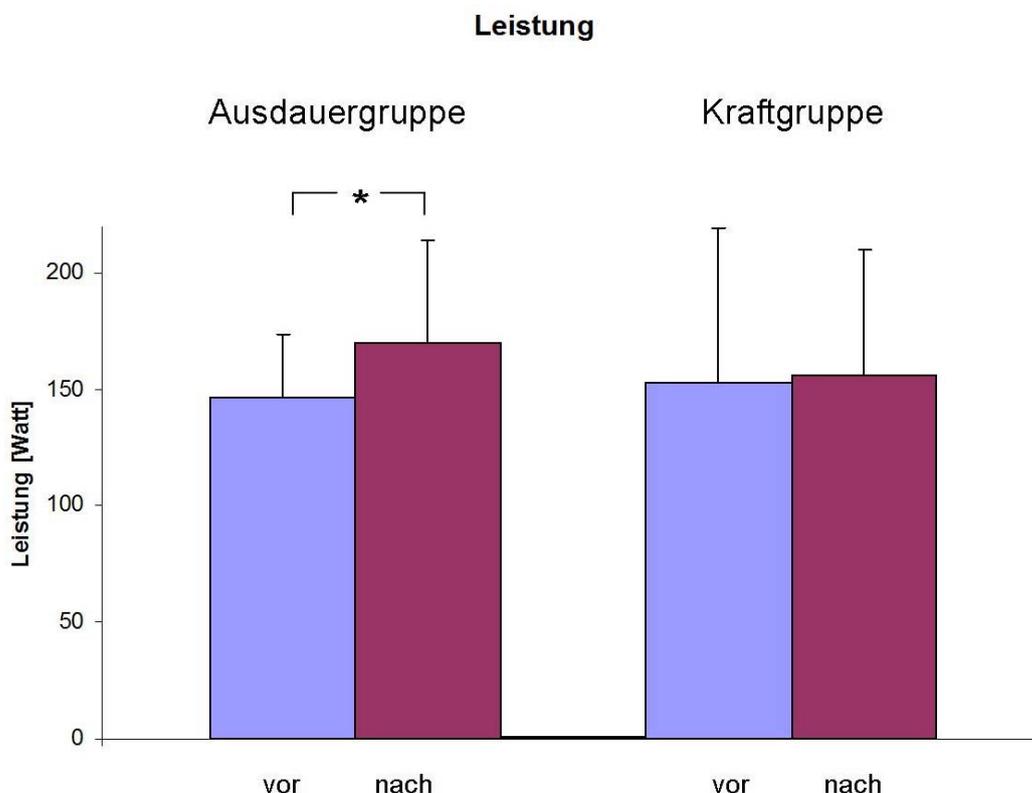


Abbildung 7: Leistungsveränderung bei der fahrradergometrischen Messung vor und nach dem dreimonatigen Training

In der Ausdauergruppe ergab sich beim Training auf dem Fahrradergometer ein Anstieg der maximalen Ausdauerleistung von durchschnittlich 147 auf 169 Watt ($p^*=0.03$). In der Kraftgruppe ist kein signifikanter Anstieg zu erkennen ($p=0.34$).

3.1.2 Beinpresse (Kraft)

Hier wurde die Wirkung des Trainings auf die Kraft mittels der Beinpresse gemessen. Verglichen wurden dabei die beidbeinige Anstrengung sowie die jedes einzelnen Beines.

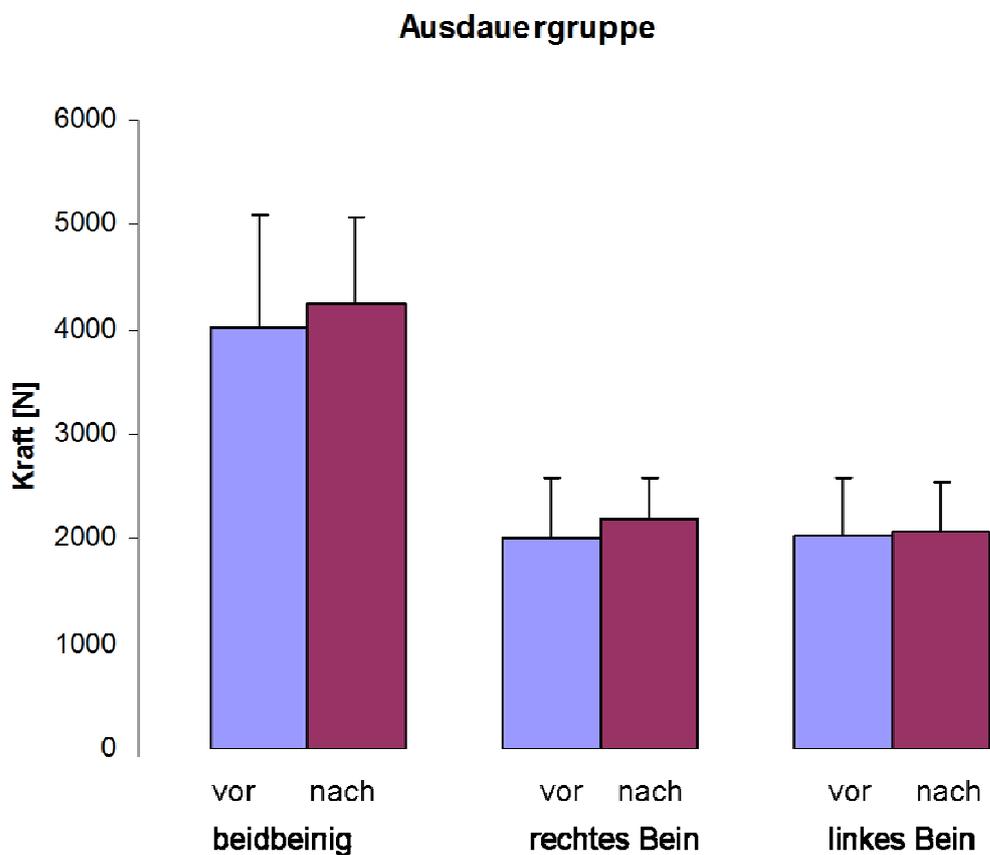


Abbildung 8: Übersicht über Krafterzeugung der Ausdauergruppe an der Beinpresse beidbeinig, und jeweils einbeinig vor und nach dem dreimonatigen Training

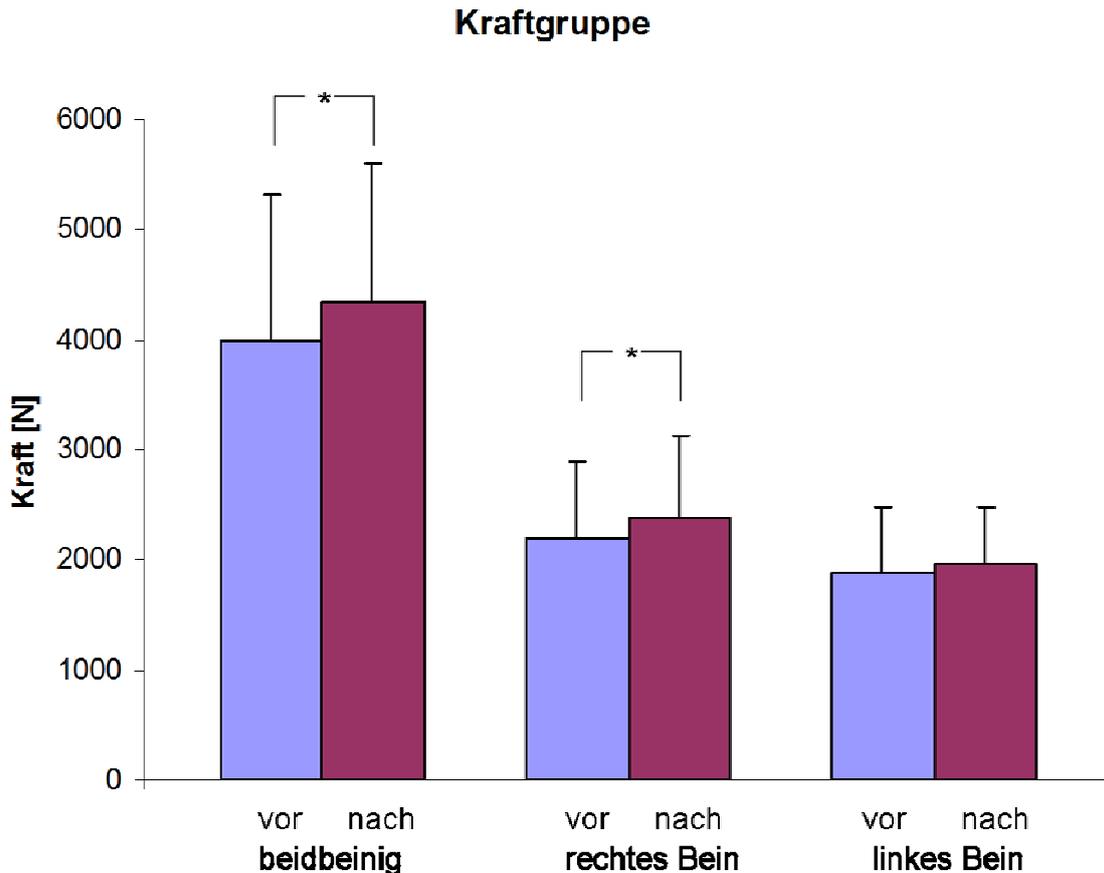


Abbildung 9: Übersicht über Krafterzeugung der Kraftgruppe an der Beinpresse beidbeinig, und jeweils einbeinig vor und nach dem dreimonatigen Training

In Abbildung 9 ist ein signifikanter Anstieg der aufgebrauchten Kraft bei den Probanden der Kraftgruppe bei den Messungen mit der Beinpresse bei der beidbeinigen Kraftmessung von 4001 auf 4343 Newton ($p=0.002$) zu sehen. Bei der Messung des rechten Beins steigt der Wert von 2188 auf 2371 Newton ($p=0.025$). Bei der Messung des linken Beins (Steigerung von 1890 Newton auf 1966 Newton) und bei allen Messungen bei den Probanden der Ausdauergruppe ist kein signifikanter Unterschied vorhanden.

Man erkennt bei der Auswertung der Werte der Fahrradergometrie einen signifikanten Anstieg der Maximalbelastbarkeit in der Ausdauergruppe. Kein Effekt ist bei den Probanden der Kraftgruppe zu sehen, da es sich bei der Fahrradergometrie um einen ausdauertrainingsspezifischen Parameter handelt. Bei der Kraftgruppe sieht man hingegen eine signifikante Steigerung bei der isometrischen Krafttestung an der Beinpresse, die einen Parameter für das Krafttraining darstellt.

3.2 eryNOS-Phosphorylierung am Ser¹¹⁷⁷

Im nächsten Abschnitt kann nun aufgrund des nachgewiesenen Trainingseffekts der Fragestellung nachgegangen werden, ob eine der Trainingsformen einen Effekt auf die erythrozytäre NO-Synthase zeigt.

In den Abbildungen 10 und 11 wird der Einfluss des Trainings auf die eryNOS-Phosphorylierung am Ser¹¹⁷⁷ von Ausdauer- und Kraftgruppe dargestellt:

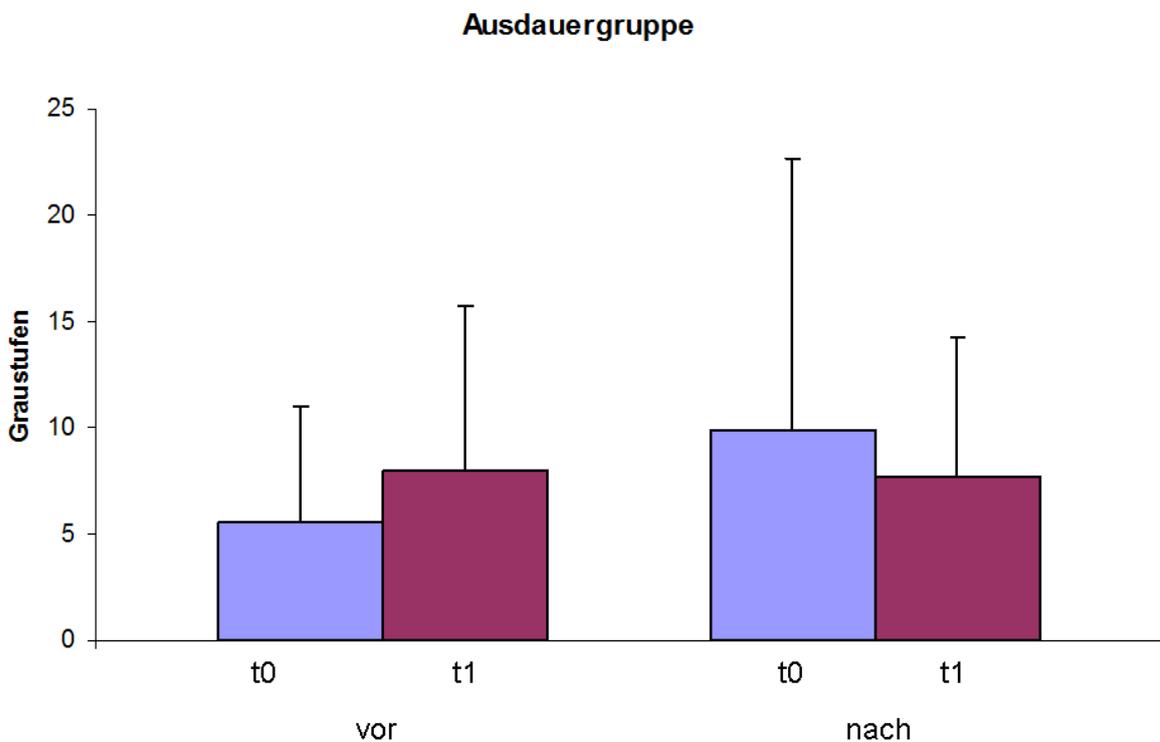


Abbildung 10: Übersicht über die Phosphorylierung der eryNOS am Ser1177 durch die gemessenen Graustufen der Erythrozyten der Ausdauergruppe vor und nach dem dreimonatigen Training

Bei den Probanden der Ausdauergruppe wird die Phosphorylierung der eryNOS am Ser¹¹⁷⁷, dargestellt durch die Graustufen der Erythrozyten, nicht signifikant beeinflusst. Vor dem dreimonatigen Training steigt die Phosphorylierung am Ser¹¹⁷⁷ von der Ruhephase von 5.5 (t_{0_vor}) auf 7.9 (t_{1_vor}) zur Belastung an, nach dem dreimonatigen Training fällt sie nach Belastung von 9.9 (t_{0_nach}) auf 7.6 (t_{1_nach}) ab, signifikante Unterschiede sind nicht vorhanden.

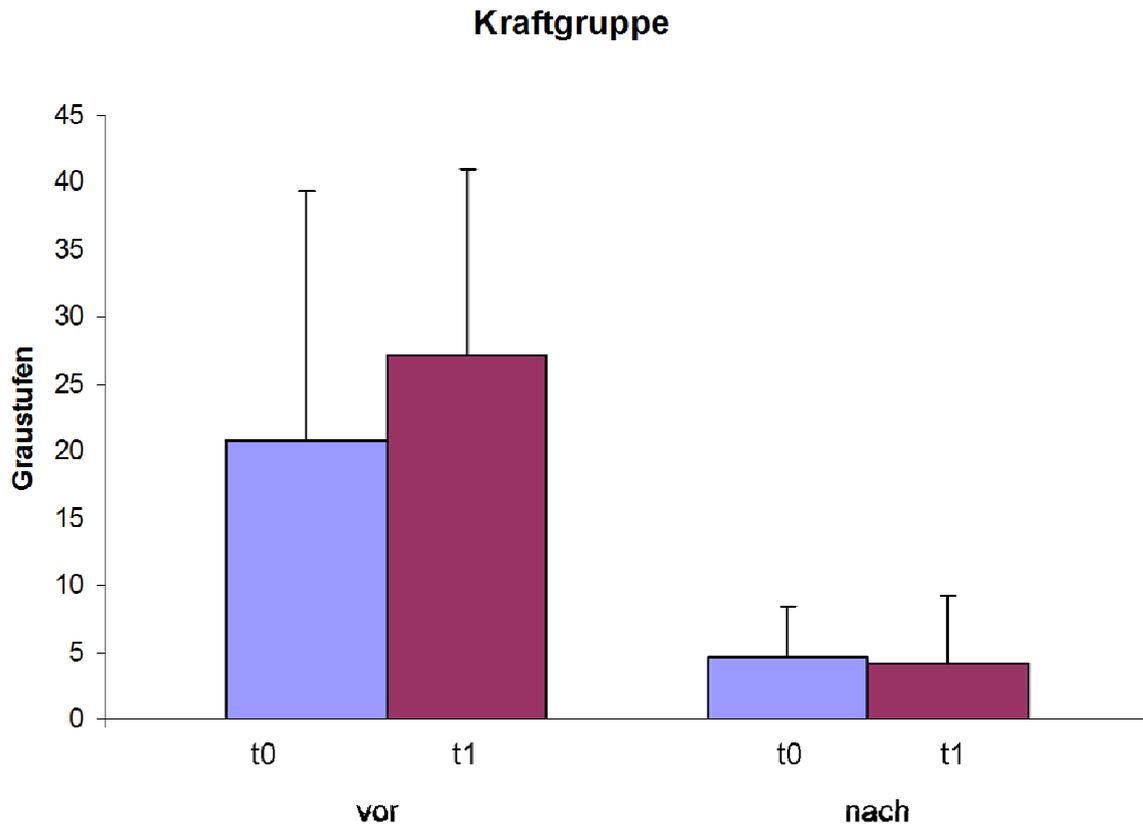


Abbildung 11: Übersicht über die Phosphorylierung der eryNOS am Ser1177 durch die gemessenen Graustufen der Erythrozyten der Kraftgruppe vor und nach dem dreimonatigen Training

Wie auch bei den Probanden der Ausdauergruppe, zeigt sich in Abbildung 11 keine signifikante Veränderung der eryNOS-Phosphorylierung am Ser¹¹⁷⁷. Sie steigt nach Belastung von 20.8 ($t_{0\text{vor}}$) auf 27.1 ($t_{1\text{vor}}$) an, nach dem dreimonatigen Training fällt sie nach Belastung von 4.6 ($t_{0\text{nach}}$) auf 4.1 ($t_{1\text{nach}}$) ab. Es ist somit keine Korrelation mit der vorher gesehenen Leistungssteigerung zu sehen.

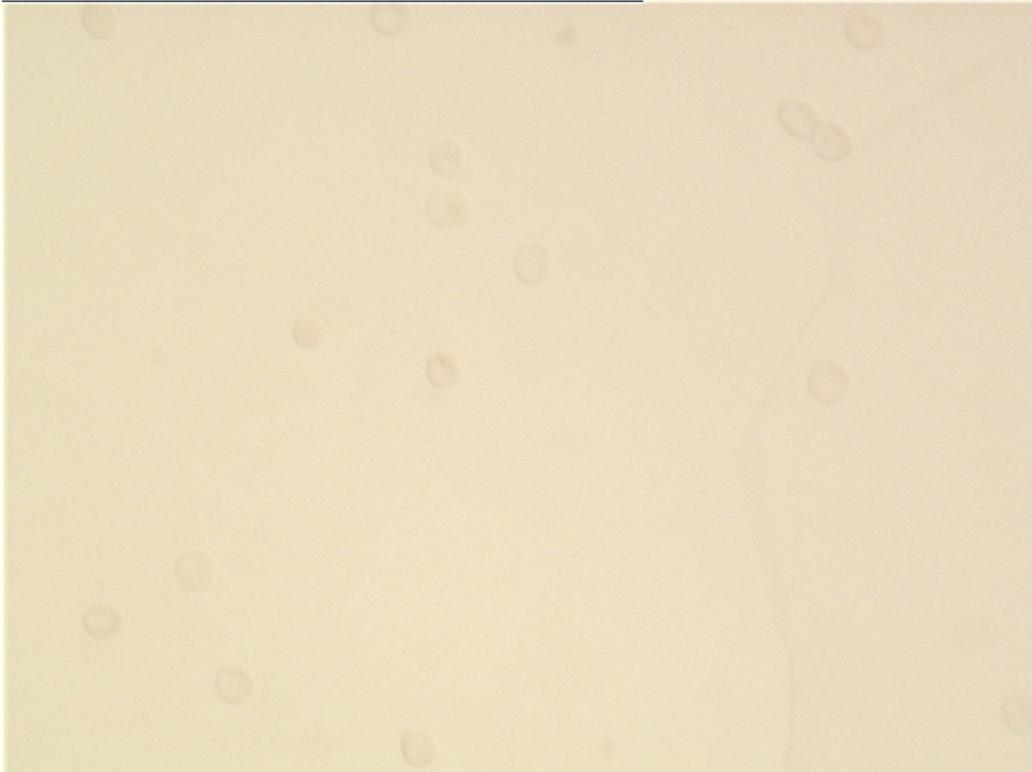


Abbildung 12: Mikroskopisches Bild der Erythrozyten nach immunhistochemischer Färbung vor dem dreimonatigen Training

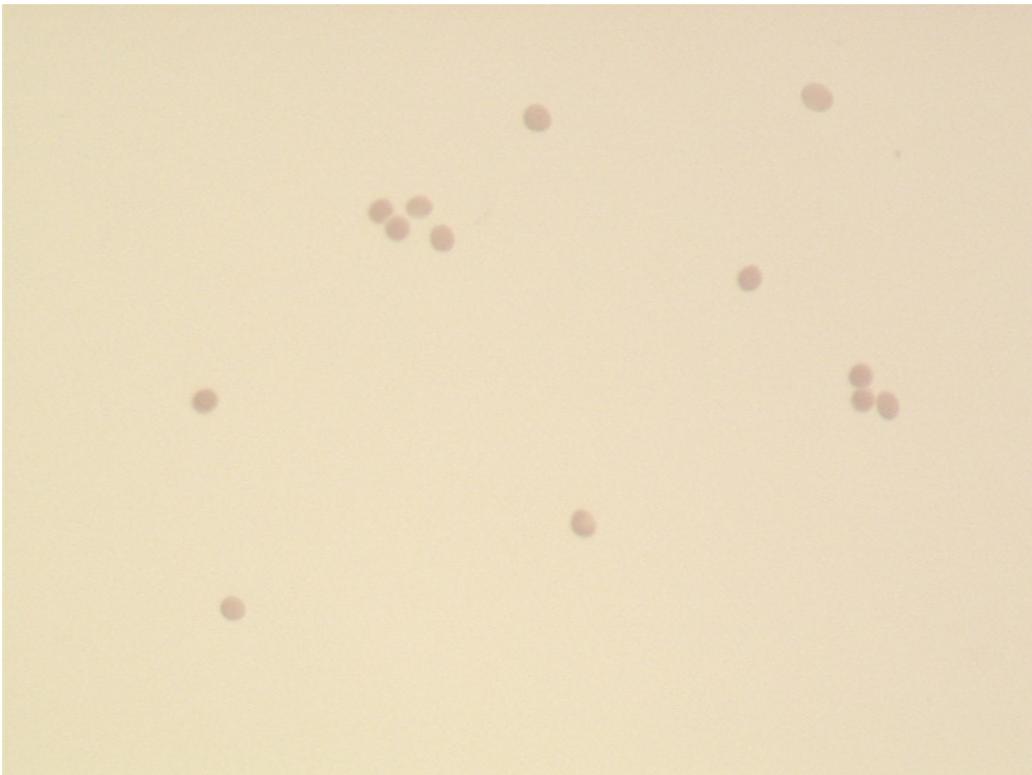


Abbildung 13: Mikroskopisches Bild der Erythrozyten nach immunhistochemischer Färbung nach dem dreimonatigen Training

Nachfolgend wird untersucht, ob die Verteilung der Erythrozyten mit starker oder leichter Anfärbung einen Zusammenhang mit der Leistungssteigerung erkennen lässt.

3.3 Prozentuale Aufteilung der Färbeintensität

Die folgenden Abbildungen 14 bis 17 zeigen die prozentuale Aufteilung der Färbeintensität der Erythrozyten in 10er-Schritten:

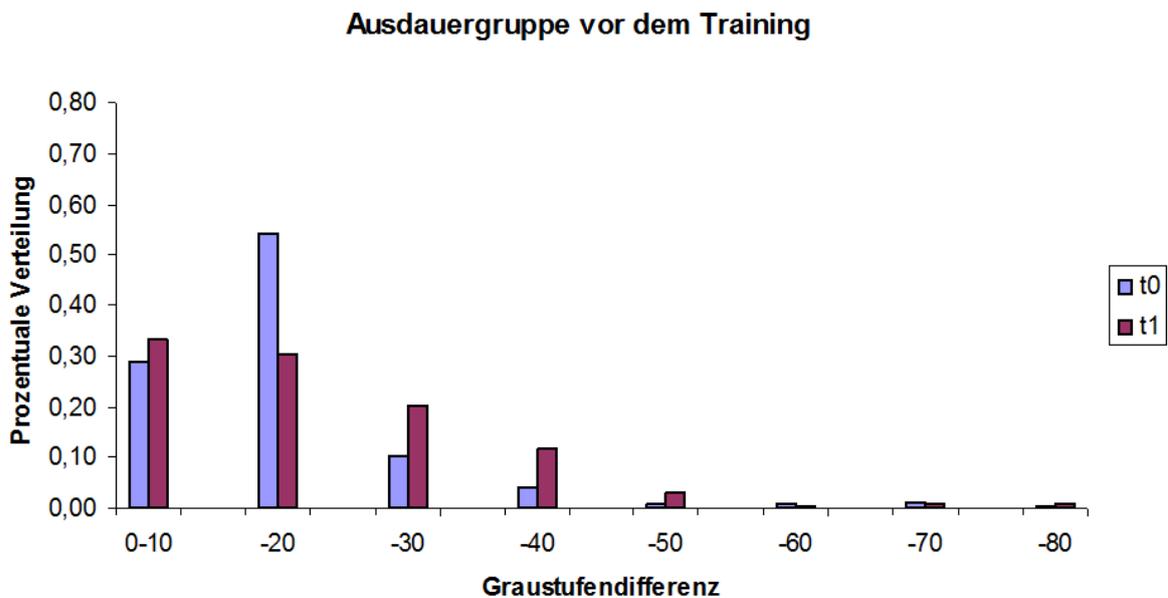


Abbildung 14: Übersicht über die prozentuale Verteilung der gemessenen Graustufen der Erythrozyten der Ausdauergruppe vor dem dreimonatigen Training

Vor der Belastung sind 93% der Erythrozyten in den Graustufen von 0-30 zu finden. Nach Belastung verteilen sich die Erythrozyten gleichmäßiger und auch weiter hin zu den stärker gefärbten Stufen.

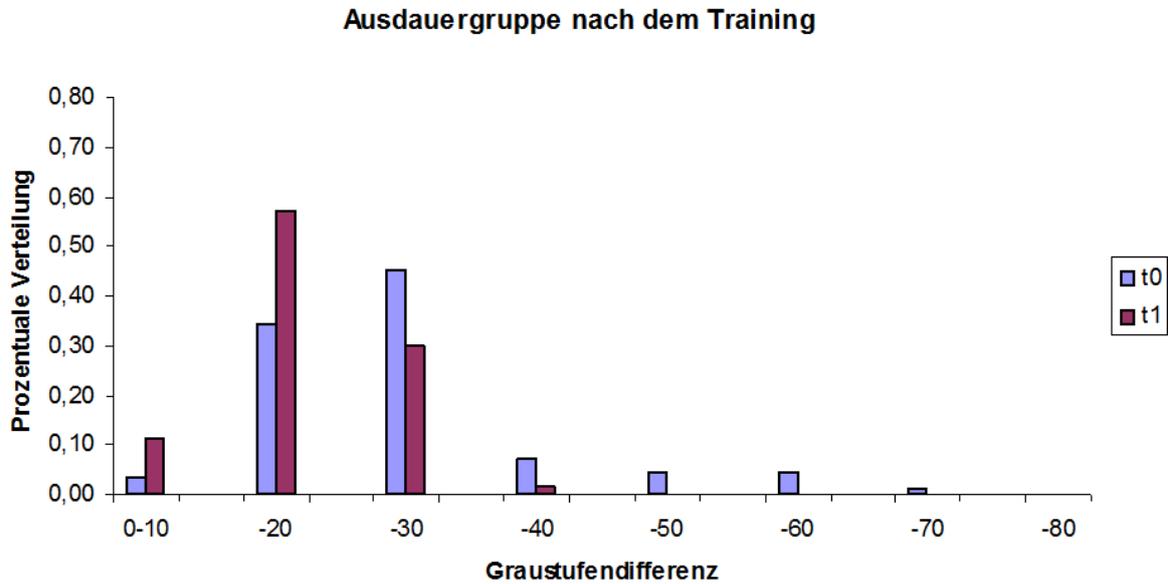


Abbildung 15: Übersicht über die prozentuale Verteilung der gemessenen Graustufen der Erythrozyten der Ausdauergruppe nach dem dreimonatigen Training

Nach dem dreimonatigen Training sind sowohl vor (82%) als auch nach der Belastung (98%) die meisten Zellen im Bereich von 0-30. Eine Verschiebung hin zu den höheren Bereichen wie vor dem Training findet nicht statt.

Kraftgruppe vor dem Training

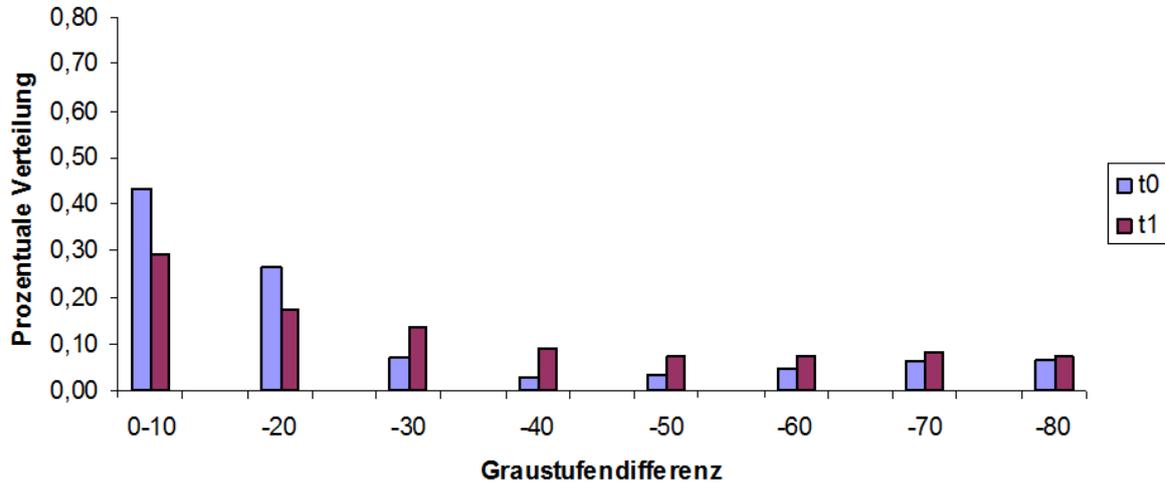


Abbildung 16: Übersicht über die prozentuale Verteilung der gemessenen Graustufen der Erythrozyten der Kraftgruppe vor dem dreimonatigen Training

Bei den Probanden der Kraftgruppe ist wie bei der Ausdauergruppe vor der Belastung mit 76% die Mehrzahl der Erythrozyten im schwach gefärbten Bereich (0-30) zu finden. Nach Belastung sind weniger Zellen in diesem Bereich zu finden, die Verteilung ist ausgeglichener.

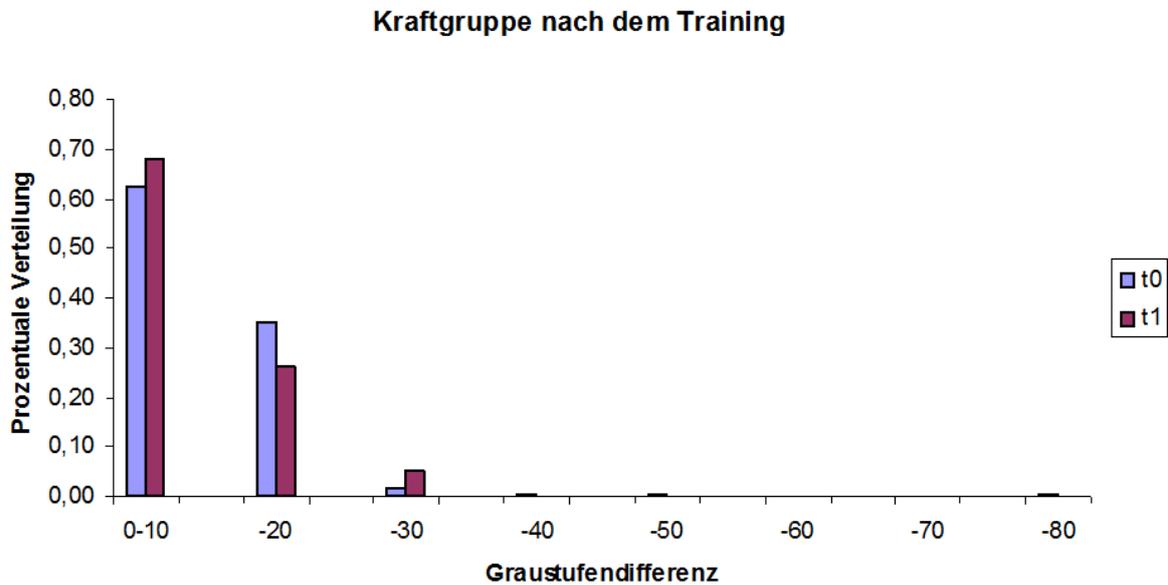


Abbildung 17: Übersicht über die prozentuale Verteilung der gemessenen Graustufen der Erythrozyten der Kraftgruppe nach dem dreimonatigen Training

Nach dem dreimonatigen Krafttraining sind die Zellen sowohl vor als auch nach Belastung nahezu komplett im Bereich von 0-30 angeordnet.

Man erkennt in beiden Trainingsgruppen eine Verschiebung von der gleichmäßigen Verteilung der gefärbten Zellen in allen Graustufen hin zu einer Verteilung in den Bereichen mit schwacher Färbung.

Im nächsten Abschnitt wird untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Blutdruckveränderungen und den oben erhobenen Werten besteht und somit eine mechanische Komponente einfließt.

3.4 Blutdruckwerte und Pulswellengeschwindigkeit

3.4.1 Blutdruckwerte

Blutdruck in Ruhe - Ausdauergruppe

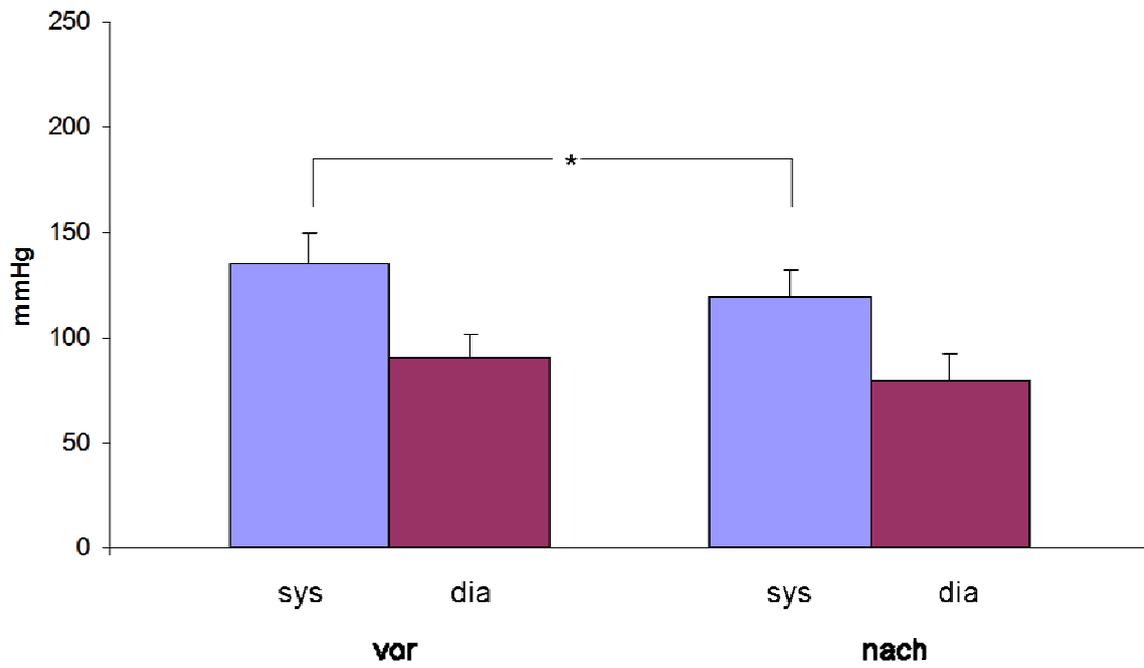


Abbildung 18: Übersicht über die Blutdruckwerte der Ausdauergruppe in Ruhe in Systole und Diastole vor und nach dem dreimonatigen Training

Blutdruck bei Maximalbelastung - Ausdauergruppe

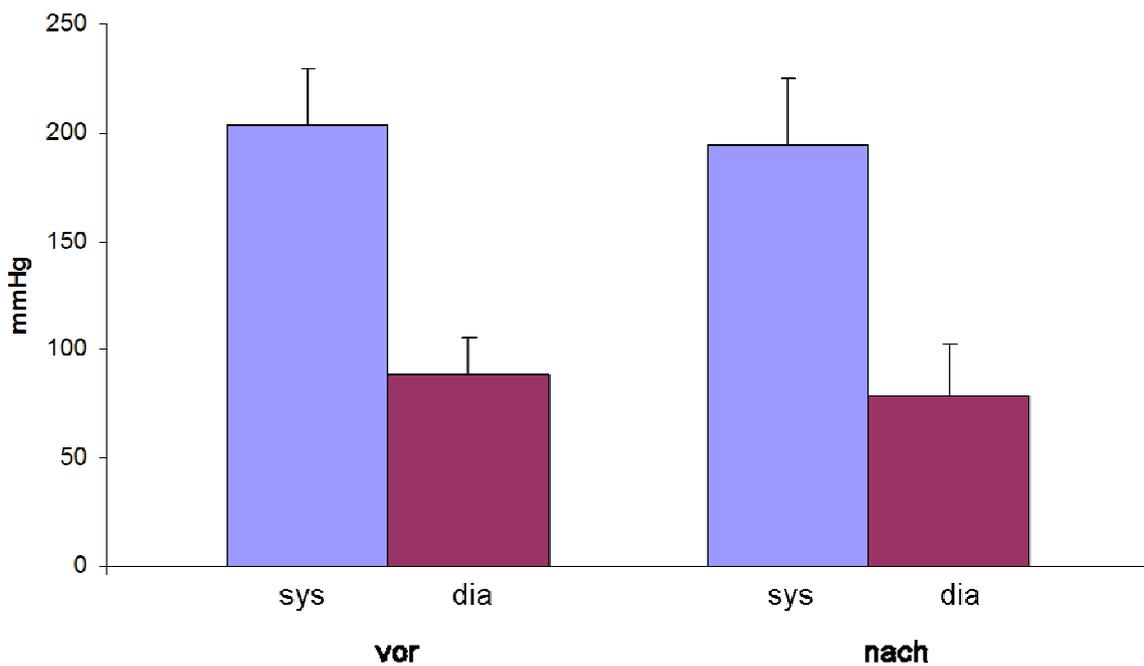


Abbildung 19: Übersicht über die Blutdruckwerte der Ausdauergruppe bei Maximalbelastung in Systole und Diastole vor und nach dem dreimonatigen Training

Nach dem dreimonatigen Training erkennt man in Abbildung 18 eine signifikante Senkung des Ruhe-Blutdrucks in der Ausdauergruppe, sowohl beim systolischen (von 135.1mmHg auf 119.8mmHg, $p=0.043$) als auch beim diastolischen (90.8mmHg auf 88.7mmHg, $p=0.004$) Wert. Der Blutdruck unter Maximalbelastung ist in keiner Gruppe signifikant verändert, jedoch erzeugen die Probanden nach dem dreimonatigen Training eine höhere Leistung und auf diese reagiert der Körper wiederum mit einem erhöhten Blutdruck.

Blutdruck in Ruhe - Kraftgruppe

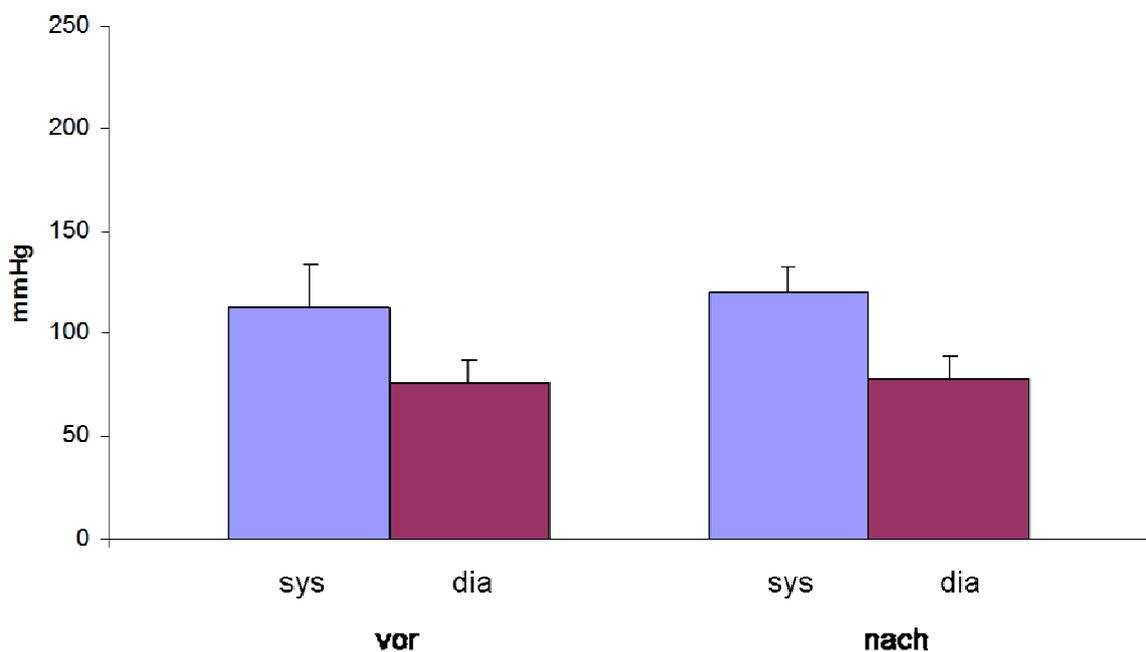


Abbildung 20: Übersicht über die Blutdruckwerte der Kraftgruppe in Ruhe in Systole und Diastole vor und nach dem dreimonatigen Training

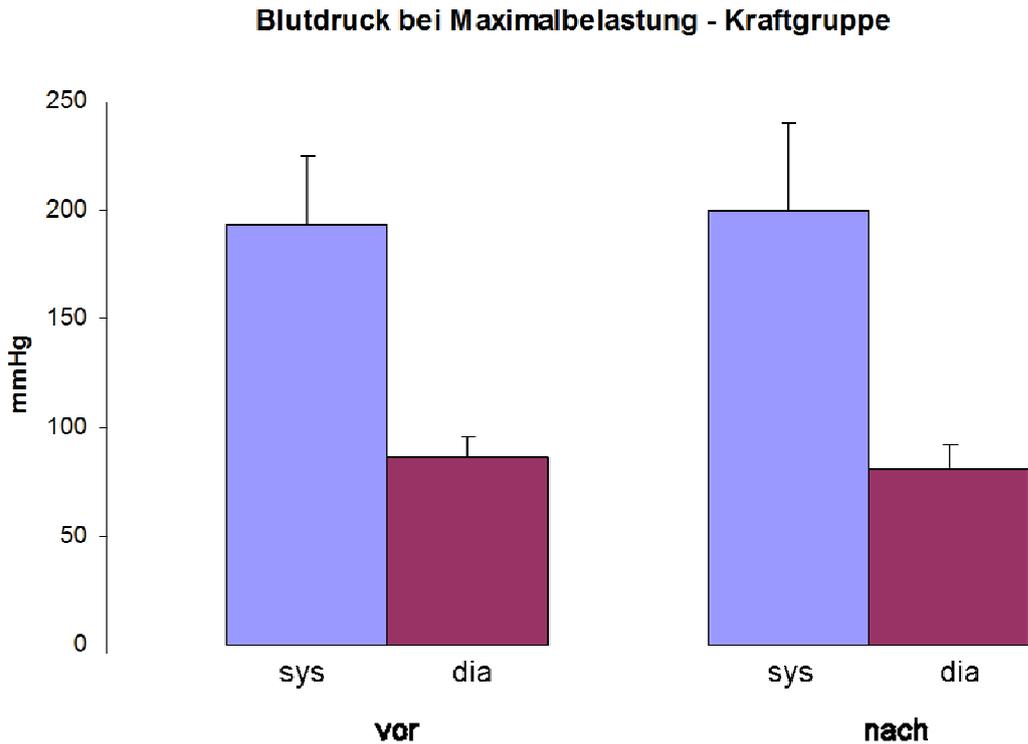


Abbildung 21: Übersicht über die Blutdruckwerte der Kraftgruppe bei Maximalbelastung in Systole und Diastole vor und nach dem dreimonatigen Training

In den Abbildungen 20 und 21 ist keine signifikante Veränderung erkennbar. In Ruhe steigt der systolische Blutdruck von 112.9mmHg auf 120.2mmHg nach dem dreimonatigen Training ($p(\text{sys})=0.138$). Der diastolische Druck steigt von 75.7mmHg auf 78mmHg. ($p(\text{dia})=0.072$). Unter Maximalbelastung ist auch in dieser Gruppe keine Veränderung zu sehen.

Als Schlussfolgerung erkennt man: Veränderungen der eryNOS-Phosphorylierung oder der Verteilung der unterschiedlich aktivierten eryNOS korrelieren nicht mit den Blutdruckänderungen.

Da der Blutdruck keinen mechanischen Zusammenhang darzustellen scheint, der Einfluss auf die eryNOS nimmt, wird weiterhin untersucht, ob die Elastizität der Gefäße für die Veränderungen in der eryNOS-Phosphorylierung verantwortlich ist. Dafür wurden die Pulswellengeschwindigkeit als Parameter für die Scherkräfte in den großen und kleinen Gefäßen bestimmt:

3.4.2 Pulswellengeschwindigkeit

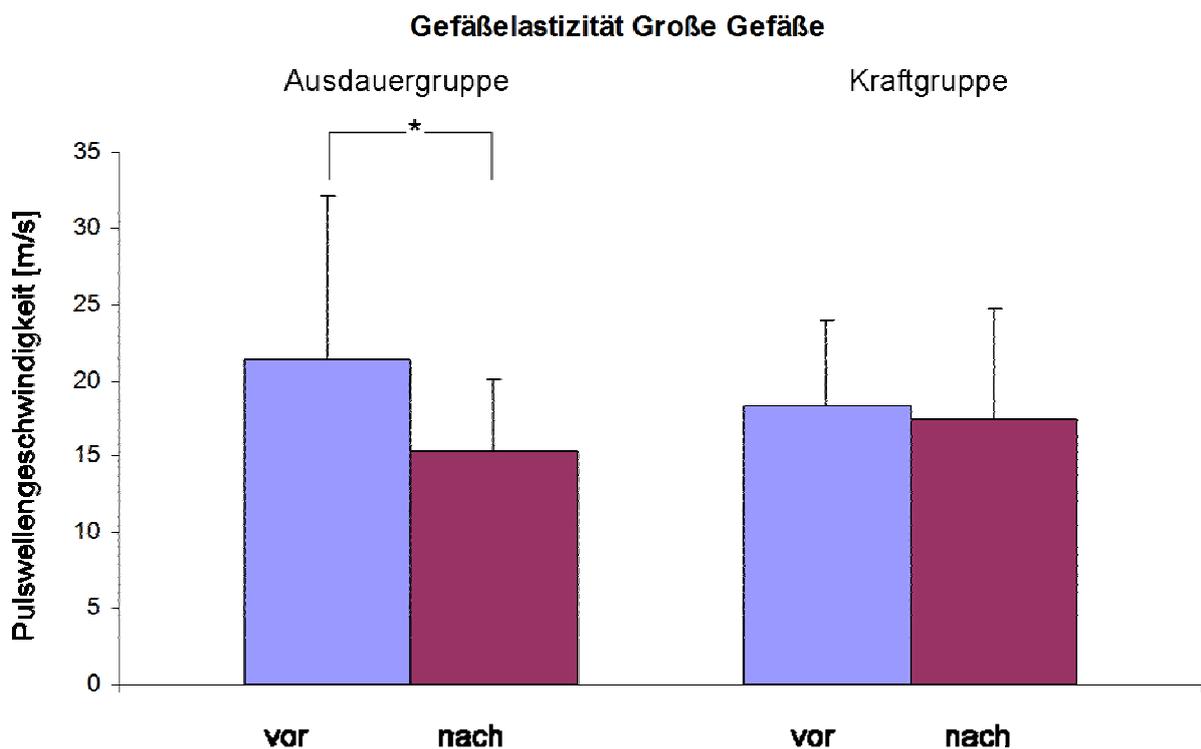


Abbildung 22: Übersicht über die Gefäßelastizität der großen Gefäße vor und nach dem dreimonatigen Training

Die Pulswellengeschwindigkeit nimmt in den großen Gefäßen der Probanden der Ausdauergruppe signifikant von 21.3 m/s auf 15.3 m/s ab ($p=0.01$). In der Kraftgruppe bleibt sie unverändert.

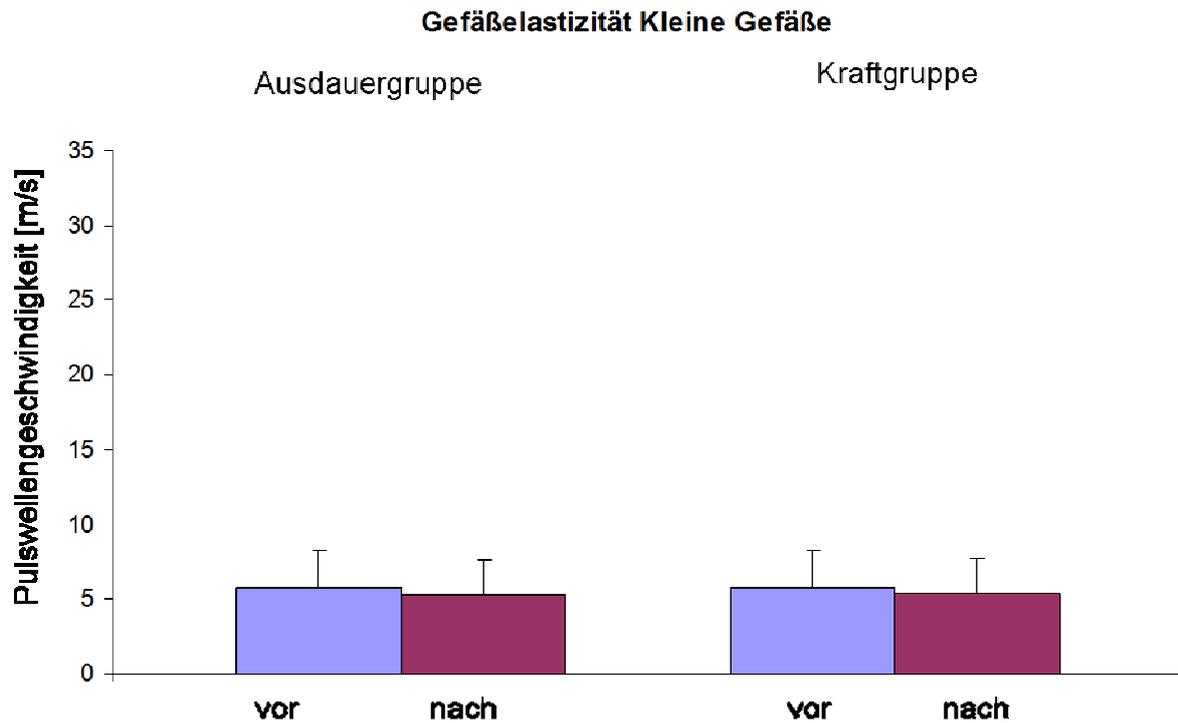


Abbildung 23: Übersicht über die Gefäßelastizität vor und nach dem dreimonatigen Training in den kleinen Gefäßen

In den kleinen Gefäßen verändert sich die Pulswellengeschwindigkeit nicht signifikant. Bei den Probanden der Ausdauergruppe sinkt sie von 5.8 m/s auf 5.3 m/s. In der Kraftgruppe zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen nach dem Training.

4. Diskussion

Es gibt bisher wenige Studien, die sich mit dem Effekt von körperlicher Belastung auf die eryNOS beschäftigen. Die hier vorgelegte Studie vergleicht den Effekt von Ausdauer- beziehungsweise Krafttraining auf die eryNOS. Ein besonderer Aspekt dabei ist, dass die Probanden unter einer Stoffwechselerkrankung, nämlich unter dem Diabetes Mellitus Typ 2, leiden. Welchen Einfluss der Diabetes auf die Ergebnisse der Messungen zeigt, wird später gesondert berücksichtigt. Ein wesentliches Problem bei der Diskussion der erhobenen Daten stellt die geringe Datenlage in der Literatur zu der eryNOS dar. Deshalb können teilweise nur die Ergebnisse zur im Endothel gelegenen eNOS betrachtet werden.

Das in dieser Studie gezeigte Training hat sowohl im Ausdauer- als auch im Kraftbereich eine zu erwartende Steigerung im jeweiligen Bereich erreicht. In der Ausdauergruppe ist eine - fahrradergometrisch nachgewiesene - signifikante Steigerung der Leistung vorhanden, in der Kraftgruppe ist eine Steigerung bei der isometrischen Krafttestung zu beobachten. Diese ist bei der beidbeinigen und bei der Untersuchung mit dem rechten Bein signifikant, beim Test mit dem linken Bein allerdings nicht signifikant.

Die Steigerung der Leistung beweist die Effektivität des Trainings und zeigt, dass die nötigen Voraussetzungen für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit in dieser Hinsicht gegeben sind.

Betrachtet man die **Phosphorylierung der erythrozytären NO-Synthase** am Ser¹¹⁷⁷ anhand der densitometrisch gemessenen Graustufenwerte der beiden Probandengruppen, fällt als erstes auf, dass die Absolutwerte der Kraftgruppe basal sehr viel höher liegen als die der Ausdauergruppe. Dies ist nicht zu erklären, da zu diesem Zeitpunkt noch kein Training stattgefunden hat und somit die beiden Gruppen ähnlich ausfallen müssten.

Als zweites fällt auf, dass grundsätzlich kein Effekt auf die Phosphorylierung erkennbar ist: Weder ist vor dem dreimonatigem Training direkt nach der Belastung eine Veränderung der Phosphorylierung zu sehen, noch verändert sie sich nach dem dreimonatigem Training in den Basalwerten, noch nach dem dreimonatigen Training nach Belastung.

Betrachtet man zunächst den Effekt des Trainings auf die im Endothel gelegene NO-Synthase, so geben Hambrecht et.al. an, dass eine vierwöchige körperliche Belastung einen positiven Effekt auf die eNOS-Phosphorylierung am Serin¹¹⁷⁷ und somit auf die Aktivität der NO-Synthasen hat.²⁶

Die bisherigen Studien, die sich mit der eNOS im Endothel beschäftigen, gehen davon aus, dass die eNOS-Phosphorylation am Ser¹¹⁷⁷ durch zwei wesentliche Elemente gesteigert wird: aufgrund höherer Durchflussraten hervorgerufene Scherkräfte im Gefäßsystem und durch freie Sauerstoffradikale, die bei intensivem körperlichem Training vermehrt gebildet werden.³⁷ Insbesondere das beim Sport vom Körper gebildete H₂O₂ soll die Expression und Phosphorylierung der eNOS¹¹⁷⁷ verstärken.^{41,65}

Einer vorangegangenen Studie der Sporthochschule Köln zufolge steigt die Phosphorylierung der erythrozytären NOS am Ser¹¹⁷⁷ nach einer Stufenbelastung signifikant an.²⁹ Hier waren die Probanden untrainiert, also vergleichbar mit den Probanden der hier vorgelegten Studie vor dem Training, jedoch handelte es sich um junge gesunde Probanden.

Eine Studie, die die Phosphorylierung der erythrozytären NOS nach einem mehrwöchigen Training misst, existiert bisher nicht.

Betrachtet man daneben die Auswirkungen des körperlichen Trainings auf die Expression der NO-Synthasen, so gibt ein Review von Green et.al. Studien an, die besagen, dass in Tiermodellen zwar nach vier Wochen eine Verstärkung der eNOS Expression zu messen ist, nach bis zu 16 Wochen aber nicht mehr. Dies wird darauf zurückgeführt, dass die Gefäße sich auf die Belastung einstellen und durch eine Lumenvergrößerung den Scherkräften entgegenwirken und somit eine belastungsabhängige Vasodilatation überflüssig wird und die endothelvermittelte NO-Freisetzung durch die eNOS vermindert wird.²³ Die in dieser Studie erhobenen Daten beziehen sich auf einen Zeitraum von zirka 12 Wochen, was für die im Endothel gelegene eNOS keine Steigerung bzw. eine zunächst gesteigerte und dann durch die Durchmesserergrößerung wieder gesenkte Expression bedeuten würde. Ob der gleiche Effekt für die eryNOS gilt, kann durch die hier erhobenen Daten nicht gesichert werden.

Zusammenfassend kann man zur Phosphorylierung der erythrozytären NO-Synthase feststellen, dass der mechanische Aspekt des Sports auf die Hämodynamik von Bedeutung sein könnte, der biochemische Aspekt für die Erythrozyten aber wegen der fehlenden Dehnung eher eine Begründung darzustellen scheint.

Wenn man die **Blutdruck**-Werte betrachtet, ist zu beobachten, dass der Ruhe-Blutdruck in der Ausdauergruppe von durchschnittlich 135.1mmHg auf 119.8mmHg sinkt. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit der derzeitigen Studienlage, die besagt, dass der Blutdruck durch Ausdauersport sowohl durch verstärkte sympathische Stimulation als auch aufgrund verstärkter Endothelfunktion gesenkt wird. Die für diese Studie gemessenen Werte der Kraftgruppe zeigen keine Senkung. Welcher Effekt auf die Blutdrucksenkung hierbei von den Erythrozyten ausgeht, gilt es herauszufinden.

Bei Hypertonikern wird die verschlechterte Endothelfunktion unter anderem durch die verstärkten Angiotensin-II-Spiegel im Blut begründet. Das Angiotensin-II kann direkt die NADPH-Oxidase aktivieren, die vermehrt ROS bildet, welche durch die verschlechterte Endothelfunktion wiederum zu einem erhöhten Blutdruck führt.²⁷ Umgekehrt scheinen die durch Sport gesenkten Blutdruckwerte diese Enzyme in ihrer Aktivität zu hemmen und damit den negativen Kreislauf zu durchbrechen. Das bedeutet, dass durch den gesenkten Blutdruck weniger Angiotensin-II gebildet wird, welches wiederum weniger Radikalbildung zur Folge hat und damit die Endothelfunktion weniger angegriffen wird.

Da in der hier vorliegenden Studie weder eine Korrelation zwischen den Blutdruckwerten zu der eryNOS-Aktivität, noch zu der Verschiebung der prozentualen Verteilung der Erythrozyten hergestellt werden kann, muss man die Schlussfolgerung ziehen, dass keine mechanische Beeinflussung auf die erythrozytäre NOS durch den Blutdruck stattzufinden scheint.

Die Erythrozyten sind im Gegensatz zu Endothelzellen sehr formvariabel. Diese Eigenschaft ist wichtig, so müssen sie auch durch die kleinsten Kapillaren hindurchfließen, ohne eine Verstopfung zu erzeugen

Als eine weitere mechanische Komponente neben den verschiedenen Blutdruckwerten wurde die **Pulswellengeschwindigkeit** gemessen. Diese gibt an, wie schnell sich die Pulswelle in den Arterien bewegt, und gibt damit indirekt einen Hinweis auf deren Elastizität. Die Gefäße werden im älter werdenden Menschen durch den Abbau von Elastin und dem vermehrten Einbau von Kollagenfasern immer steifer.³⁸ Ist die Arterie besonders elastisch, wie z.B. die Aorta mit ihrer Windkesselfunktion, ist die Geschwindigkeit eher gering. Ist das Gefäß eher steif, nimmt die Pulswellengeschwindigkeit zu. Zum Effekt von Training auf die Elastizität der Gefäße gibt es unterschiedliche Untersuchungen. Einerseits wird von einer erhöhten Pulswellengeschwindigkeit der Aorta⁶⁶ und auch von einer sonographisch größeren Compliance der Arterien bei Ausdauersportlern⁶⁴ berichtet, andererseits wird nach einem achtwöchigen Training keine Senkung der Pulswellengeschwindigkeit bei 65jährigen Probanden gezeigt¹⁸. In einer weiteren Studie mit einem kombinierten Kraft- und Ausdauertraining über einen Zeitraum von sechs Monaten wurde keine Änderung der Pulswellengeschwindigkeit festgestellt.⁶² Mit 12 Wochen bezieht sich die hier vorliegende Studie auf einen Trainings-Zeitraum, der also eher keine Veränderungen in diesem Bereich erwarten lässt.

In unseren Untersuchungen nimmt die Geschwindigkeit in den großen Gefäßen der Probanden der Ausdauergruppe ab, die großen Gefäße werden also nach dem dreimonatigen Training elastischer. In Bezug auf die erhobenen Werte für die eryNOS Aktivität ist keine Korrelation erkennbar. Geht man also auf die Arbeitshypothese zurück, die besagt, dass die durch den Sport gewonnene Elastizität möglicherweise einen abschwächenden Effekt auf die vasodilatatorische eryNOS haben könnte, da diese keinem so schnellen Blutfluss ausgesetzt sind, muss man schlussfolgern: Dies trifft nicht zu.

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist der **Diabetes Mellitus**. Die Probanden stehen alle in einer kranken Stoffwechsellage. Dieser Umstand könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse des Trainings und damit der Messungen haben. Man weiß von diabetischen Menschen zum Beispiel, dass das Hämoglobin ihrer Erythrozyten durch die hohen Glukosevorkommen im Blut glykiert werden. Diese Reaktion erfolgt nicht-enzymatisch und kann von ärztlicher Seite als guter Gradmesser der Blutzuckerwerte der letzten vier Monate gewertet werden. Diese schon bekannte Veränderung durch den Diabetes zeigt jedenfalls, dass durch den kranken Stoffwechsel auch biochemische Unterschiede auftreten.

Zusätzlich ist die Makro- und die Mikroangiopathie besonders zu erwähnen. Brownlee untersuchte diese bei Diabetikern und fand insgesamt vier Gründe, die alle einer vermehrten Radikalbildung in den Mitochondrien zugrunde liegen⁸:

- Advanced Glycation Endproducts (AGE),
- Polyol Pathway Aktivierung,
- Protein Kinase C (PKC) Aktivierung und
- Hexosamine Pathway Aktivierung.

Kurz gefasst stellen sich die Gründe folgendermaßen dar:

Advanced Glycation Endproducts (AGE) sind Ergebnisse einer nicht enzymatischen Reaktion von Zuckern mit Proteinen^{11,51}, ähnlich wie die oben beschriebene Glykierung des Hämoglobins. Es können sowohl Plasmaproteine als auch Membranproteine der Erythrozyten glykiert werden. Wautier et. al. beschreiben, dass diese glykierten Erythrozyten an AGE-Rezeptoren (RAGE) binden können. Infolge dessen verändern sich die Endothelzellen und es entsteht eine Entzündungsreaktion, die mit einer Hyperpermeabilität, vermehrter ROS-Bildung und Ausschüttung von Zytokinen einhergeht^{24,67}. Die ROS schwächen die endothelvermittelte Vasodilatation ab. Diskutiert wird in der Literatur neben der vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen auch die Hemmung der eNOS selber. Dabei wiederum werden unterschiedliche Mechanismen als Ursache in Betracht gezogen. Fest steht jedenfalls, dass die eNOS-Phosphorylierung durch die AGEs gehemmt wird. Ob eine reduzierte eNOS-Expression, eine posttranslationale Modifikation oder eine

Hemmung des Angebots der Kofaktoren des Enzyms weiteren Einfluss hat, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.^{42,71}

PKC Aktivierung hemmt die Insulin stimulierte PI-3 Kinase-Aktivität sowie die eNOS mRNA Expression.^{17,40}

Neben dieser Erkenntnis wurde in vitro nachgewiesen, dass über die Aktivierung des Hexosamine Pathway die eNOS mit N-Acetyl-Glukosamin modifiziert wird. Ganz spezifisch wird die Serin¹¹⁷⁷-Modifikation durch die Hyperglykämie gesteigert und somit entsteht reziprok eine gesenkte eNOS-Aktivität.¹⁵

Bezieht man diese Umstände in die Bewertung der Untersuchung ein, muss man feststellen, dass diese Mechanismen natürlich nicht in Erythrozyten ablaufen können, da hier keine Mitochondrien existieren. Ebenso wie lange unbekannt war, dass Erythrozyten eine e(ry)NOS besitzen, sind die Wirkungen des Diabetes noch unbekannt.

Insgesamt ist zu erkennen, welche besondere Situation bei Diabetikern gegeben ist und dass es dabei noch viele Bereiche zu erforschen gibt. Für die vorliegende Studie stellt die diabetische Stoffwechsellage eine Besonderheit dar, die einerseits die Ergebnisse schwieriger zu interpretieren macht, aber auch interessante zusätzliche Erkenntnisse und Fragestellungen fördern könnte.

5. Limitationen und Ausblick der Studie:

Seit die NOS der Erythrozyten gefunden wurde, wurde über ihre Funktion diskutiert. Eine These besagt, dass die Erythrozyten durch die NO-vermittelte Gefäßdilataion ihre eigene Zirkulation sicherstellen. Die Mikrozirkulation umfasst die Gefäße der Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Diese reichen im Durchmesser von 10-100µm der Arteriolen und Venolen bis zu nur 4-10µm der Kapillaren.³⁴ Da ein Erythrozyt selber im Durchschnitt 7.5 µm groß ist, muss er elastisch sein, um die kleinsten Gefäße passieren zu können. Hierzu gibt es Hinweise, dass die NO-Bildung im Erythrozyt die Flexibilität erhöht.³⁵ Es macht jedoch auch Sinn, dass er selber durch Katalysierung von NO die Gefäße, in denen er fließt, weiten kann.

Erst seit ein paar Jahren weiß man um die Rolle der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase. Untersuchungen hierzu sind noch nicht sehr weit fortgeschritten und somit stellt auch diese Studie eine Neuheit dar. Zwar hat man schon den Einfluss von unterschiedlichen Trainingsformen auf die eryNOS untersucht, doch bei diesen Studien wurden junge gesunde Menschen betrachtet.

In der hier vorliegenden Studie sind jeweils neun Probanden mit zwei unterschiedlichen Trainingsformen trainiert worden. Die Frage, ob ein gezieltes Training mechanischen oder physiko-chemischen Einfluss auf die eryNOS hat, bleibt jedoch vorerst unbeantwortet.

Einschränkend muss man weiterhin festhalten, dass in dem vorliegenden Fall ausschließlich die Phosphorylierung an der Bindungsstelle Serin¹¹⁷⁷ untersucht wurde. Außer dieser gibt es weitere Ansatzpunkte, wie zum Beispiel Thr⁴⁹⁵ Serin⁶³³ Ser¹¹⁴, über die die NOS reguliert wird. Diese könnten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Dass sich der vorliegenden Studie keine signifikanten Ergebnisse ablesen lassen, ist möglicherweise auf den Umstand zurückzuführen, dass die hier untersuchten Probanden Diabetiker sind. Denn vorige Untersuchungen mit gesunden jungen Männern haben Zusammenhänge zwischen eryNOS-Aktivität und körperlichem Training gezeigt, sodass sich die Vermutung aufdrängt, dass der Gesundheitszustand einen Einfluss auf die messbaren Ergebnisse hat.

Man kann festhalten, dass es durchaus Hinweise auf Veränderungen der eryNOS durch Training gibt. Zukünftige Studien könnten Rückschlüsse auf die Wirkungsweisen von körperlichem Training zeigen und somit auch therapeutische Ansatzpunkte und Ziele in der nicht-medikamentösen Behandlung von zum Beispiel arterieller Hypertonie aufweisen.

6. Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid ist ein wichtiger Regulator der Gefäße. In der Notfallmedizin kennt man es als Glyceroltrinitrat, welches zu NO umgebaut wird und z.B. die Herzkranzgefäße erweitern kann. Daneben beeinflusst es die Flexibilität der Erythrozyten und die Adhäsionsfähigkeit der Leukozyten.

Im menschlichen Körper wird NO endogen durch NO-Synthasen gebildet, die unter anderem in den Endothelzellen der Gefäßwände vorhanden sind. Vor einiger Zeit hat man zusätzlich festgestellt, dass es ebenfalls von den Erythrozyten gebildet wird, welches ein neues Licht auf die Erythrozyten und ihre Funktion im Herzkreislaufsystem geworfen hat.

Die hier vorliegende Studie beschäftigt sich mit dem Einfluss von dreimonatigem Ausdauer- bzw. Kraftsport bei an Diabetes Mellitus Typ 2 erkrankten Männern auf die eryNOS. Jeweils neun Probanden wurden für die Ausdauer- und die Kraftgruppe untersucht.

Vor und nach dem dreimonatigen Training wurde die Pulswellengeschwindigkeit gemessen und jeweils eine Blutentnahme vor der Belastung und eine unmittelbar danach durchgeführt. Während der Belastung wurden zusätzlich ein Belastungs-EKG geschrieben und die Laktatwerte erhoben. Die Effektivität des Trainings wurde per Beinpresse und Fahrradergometrie nachgewiesen. Die Blutproben wurden immunhistochemisch gefärbt, um die Phosphorylierung sichtbar zu machen. Nach Trypsinierung bei 37°C und anschließendem Blockieren mit 0,3% Milchpulver wurden die Erythrozyten mit dem primären Antikörper rabbit Anti-phospho-eNOSer¹¹⁷⁷ inkubiert. Danach wurden der sekundäre Antikörper und der Farbstoff DAB hinzugegeben. Mikroskopisch wurde dann densitometrisch die Intensität der Graustufen untersucht, um die Veränderungen der Phosphorylierungen festzustellen. Es zeigte sich nach den körperlichen Untersuchungen bei der Ausdauergruppe eine Verbesserung in der Ausdauerleistungsfähigkeit und bei der Kraftgruppe eine Verbesserung im Kraftbereich. Eine Veränderung der Phosphorylierung konnte weder direkt nach Belastung, noch nach dem Training gezeigt werden. Auch konnte kein Zusammenhang mit den Veränderungen des Blutdrucks oder der Pulswellengeschwindigkeit gezeigt werden.

Die Untersuchungen konnten keinen Einfluss sportlicher Aktivität auf die eryNOS bei Diabetikern nachweisen.

7. Literaturverzeichnis

1. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615
2. American Diabetes Association (2010). Exercise and type 2 diabetes: American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Exercise and type 2 diabetes. Med Sci Sports Exerc* 42:2282-2303
3. Andrew PJ, Mayer B (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43:521-531
4. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J (1999). Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 55:1078-1087
5. Bajpeyi S, Tanner CJ, Slentz CA, Duscha BD, McCartney JS, Hickner RC, Kraus WE, Houmard JA (2009). Effect of exercise intensity and volume on persistence of insulin sensitivity during training cessation. *J Appl Physiol* 106:1079-1085
6. Borg G (1998). Borg's perceived exertion and pain scales. Champaign, IL: Human Kinetics
7. Braith RW, Stewart KJ (2006). Resistance exercise training: its role in the prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 113:2642-2650
8. Brownlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820
9. Bweir S, Al-Jarrah M, Almalty AM, Maayah M, Smirnova IV, Novikova L, Stehno-Bittel L (2009). Resistance exercise training lowers HbA1c more than aerobic training in adults with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 1:27

10. Cai H, Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844
11. Caßelmann C (2005). Die altersabhängige Expression von Advanced Glycation Endproducts (AGE) - Rezeptoren am menschlichen Herzen. Medizinische Dissertation. Halle
12. Chen CA, Druhan LJ, Varadharaj S, Chen YR, Zweier JL (2008). Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme. *J Biol Chem* 283:27038-27047
13. DHL® DHeV (2008). Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie. Heidelberg: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/046-001_S2_Behandlung_der_arteriellen_Hypertonie_06-2008_06-2013.pdf (Zuletzt abgerufen am 19.4.2011)
14. Drexler H, Hornig B (1999). Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 31:51-60
15. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 108:1341-1348
16. Fagard RH (2006). Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:853-856
17. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R (2002). Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* 106:466-472

18. Ferrier KE, Waddell TK, Gatzka CD, Cameron JD, Dart AM, Kingwell BA (2001). Aerobic exercise training does not modify large-artery compliance in isolated systolic hypertension. *Hypertension* 38:222-226
19. Fleming I, Busse R (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R1-12
20. Forstermann U, Munzel T (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113:1708-1714
21. Giansante C, Fiotti N (2006). Insights into human hypertension: the role of endothelial dysfunction. *J Hum Hypertens* 20:725-726
22. Govers R, Rabelink TJ (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F193-206
23. Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R (2004). Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 561:1-25
24. Grossin N, Wautier MP, Wautier JL (2009). Red blood cell adhesion in diabetes mellitus is mediated by advanced glycation end product receptor and is modulated by nitric oxide. *Biorheology* 46:63-72
25. GuidelinesCommittee (2003). 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 21:1011-1053
26. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G (2003). Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 107:3152-3158

27. Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C (2006). Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med* 259:351-363
28. Herold G (2009). *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold Verlag
29. Hertrich T (2007). *Durch Sport induzierte Veränderungen der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) in humanen Erythrozyten*. Medizinische Dissertation. Köln
30. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* 113 (Pt 10):1671-1676
31. Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G (2005). *Biochemie des Menschen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG
32. Houmard JA, Tanner CJ, Slentz CA, Duscha BD, McCartney JS, Kraus WE (2004). Effect of the volume and intensity of exercise training on insulin sensitivity. *J Appl Physiol* 96:101-106
33. Ketelhut RG, Franz IW, Scholze J (1997). Efficacy and position of endurance training as a non-drug therapy in the treatment of arterial hypertension. *J Hum Hypertens* 11:651-655
34. Kleinbongard P, Keymel S, Kelm M (2007). New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood. *Thromb Haemost* 98:970-974
35. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozuyaman B, Schnurch HG, Godecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rosen P, Kelm M (2006). Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 107:2943-2951

36. Koenig RJ, Blobstein SH, Cerami A (1977). Structure of carbohydrate of hemoglobin Alc. *J Biol Chem* 252:2992-2997
37. Kojda G, Hambrecht R (2005). Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res* 67:187-197
38. Kraft KA, Arena R, Arrowood JA, Fei DY (2007). High aerobic capacity does not attenuate aortic stiffness in hypertensive subjects. *Am Heart J* 154:976-982
39. Kreutz T (2010). Der Einfluss einer sporttherapeutischen Trainingsintervention auf die Dichte der Monocarboxylattransporter in Skelettmuskulatur und Erythrozyten bei nicht-insulinpflichtigen Typ 2 Diabetikern. Sportwissenschaftliche Dissertation. Köln
40. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL (2000). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101:676-681
41. Lauer N, Suvorava T, Ruther U, Jacob R, Meyer W, Harrison DG, Kojda G (2005). Critical involvement of hydrogen peroxide in exercise-induced up-regulation of endothelial NO synthase. *Cardiovasc Res* 65:254-262
42. Linden E, Cai W, He JC, Xue C, Li Z, Winston J, Vlassara H, Uribarri J (2008). Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:691-698
43. Matsuda H, Iyanagi T (1999). Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. *Biochim Biophys Acta* 1473:345-355

44. McCarter RJ, Hempe JM, Chalew SA (2006). Mean blood glucose and biological variation have greater influence on HbA1c levels than glucose instability: an analysis of data from the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 29:352-355
45. Michel T, Feron O (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100:2146-2152
46. Mohamad A (2005). Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Phosphorylation. Medizinische Dissertation. Frankfurt a.M.
47. Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E (2008). Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 40:180-196
48. Musi N, Fujii N, Hirshman MF, Ekberg I, Froberg S, Ljungqvist O, Thorell A, Goodyear LJ (2001). AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise. *Diabetes* 50:921-927
49. Niess AM, Sommer M, Schlotz E, Northoff H, Dickhuth HH, Fehrenbach E (2000). Expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human leukocytes: responses to running exercise. *Med Sci Sports Exerc* 32:1220-1225
50. Ozuyaman B, Grau M, Kelm M, Merx MW, Kleinbongard P (2008). RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends Mol Med* 14:314-322
51. Peppas J UJ, Vlassara H. (2003). Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. *Clin Diabetes* 21:186-187
52. Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA (2004). American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc* 36:533-553

53. Philipp T (1999). Arterielle Hypertonie. In: Alexander K, Daniel WG, Diener HC (ed). Thiemes Innere Medizin - TIM. 1st ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, p. 1445-1456
54. Porten S (2007). Trainingsinduzierte Veränderungen der eNOS in humanen Erythrozyten. Medizinische Dissertation. Köln
55. Rizzoni D (2002). Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fantasy? *J Hypertens* 20:1479-1481
56. Rost R (2005). Sport- und Bewegungstherapie bei inneren Krankheiten. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag
57. Schmidt RF, Lang F, Thews G (2005). Physiologie des Menschen. Heidelberg: Springer
58. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T (2008). Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10:1115-1126
59. Searles CD (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C803-816
60. Shaul PW (2002). Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 64:749-774
61. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13176-13181
62. Stewart KJ, Bacher AC, Turner KL, Fleg JL, Hees PS, Shapiro EP, Tayback M, Ouyang P (2005). Effect of exercise on blood pressure in older persons: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 165:756-762

63. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A (2000). Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101:948-954
64. Tanaka H, Dinunno FA, Monahan KD, Clevenger CM, DeSouza CA, Seals DR (2000). Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation* 102:1270-1275
65. Thomas SR, Chen K, Keaney JF, Jr. (2002). Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 277:6017-6024
66. Vaitkevicius PV, Fleg JL, Engel JH, O'Connor FC, Wright JG, Lakatta LE, Yin FC, Lakatta EG (1993). Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. *Circulation* 88:1456-1462
67. Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J, et al. (1994). Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7742-7746
68. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053
69. Wilmore JHC, David L. (1994). *Physiology of sport and exercise*. Champaign, IL: Human Kinetics
70. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, Kastarinen M, Poulter N, Primatesta P, Rodriguez-Artalejo F, Stegmayr B, Thamm M, Tuomilehto J, Vanuzzo D, Vescio F (2003). Hypertension prevalence

and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *Jama* 289:2363-2369

71. Xu B, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A (2003). Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *Faseb J* 17:1289-1291

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.