

Aus dem Bereich für Innere Medizin III
Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin
Der Medizinischen Fakultät
Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Differentielle Effekte von Ausdauer-, Intervall- und Krafttraining auf
Telomeraseaktivität und Telomerlänge in einer randomisierten,
kontrollierten Studie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2021

vorgelegt von
Joachim Zundler
geboren am 30.07.1992
in Stuttgart- Bad Cannstatt

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Zusammenfassung	1
1.1. Summary	2
2. Einleitung	4
2.1. Einfluss körperlicher Aktivität zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen	4
2.2. Physiologische Alterungsvorgänge des kardiovaskulären Systems	5
2.3. Molekulare Vorgänge der Zellalterung	6
2.3.1. Telomere und telomer-assoziierte Proteine	8
2.3.1.1. Shelterin-Komplex und „End-Protection-Problem“	10
2.3.1.2. Telomerase und „End-Replication-Problem“	13
2.3.2. Seneszenz-regulierende Proteine	13
2.3.2.1. P16	14
2.3.2.2. P53	15
2.3.2.3. Ku70/80	16
2.4. Anpassungsvorgänge des kardiovaskulären Systems bei körperlicher Aktivität	16
2.5. Vorarbeiten	19
2.6. Ziele der Arbeit	21
3. Material und Methoden	23
3.1. Material	23
3.1.1. Verwendete Chemikalien und Reagenzien	23
3.1.2. Primer Real-Time PCR	24
3.1.3. Puffer und Lösung	25

3.1.3.1.	Allgemein verwendete Puffer	25
3.1.3.2.	Puffer für Flow-FISH und Thymozytenisolation	25
3.1.3.3.	Puffer für Real-Time PCR und Vorarbeiten	25
3.1.4.	Molekularbiologische Kits	25
3.1.5.	Geräte und Zubehör	26
3.1.6.	Software	28
3.2.	Methoden	29
3.2.1.	Studiendesign der Akutstudie	29
3.2.2.	Studiendesign der prospektiven Trainingsstudie	30
3.2.2.1.	Probandenrekrutierung	30
3.2.2.2.	Erhebung der Fitnessdaten	32
3.2.2.3.	Indirekte Kalorimetrie	33
3.2.2.4.	Kontrollgruppe und Trainingsgruppen	33
3.2.3.	Isolation der mononukleären Zellen	35
3.2.3.1.	Zellzahlbestimmung	37
3.2.4.	Real-Time PCR und Vorarbeiten	37
3.2.4.1.	RNA-Isolation	37
3.2.4.2.	Bestimmung der RNA-Konzentration	38
3.2.4.3.	DNase Verdau	38
3.2.4.4.	Reverse Transkription	38
3.2.4.5.	Real-Time PCR	39
3.2.5.	Messung der Telomeraseaktivität	40
3.2.5.1.	CHAPS-Isolation	40
3.2.5.2.	TRAP-Assay	40
3.2.6.	Telomerlängenmessung mittels Flow-FISH	41
3.2.6.1.	Thymozytenisolation	42
3.2.6.2.	Vorbereitung der Zellen	43
3.2.6.3.	DNA-Denaturierung und Hybridisierung	43
3.2.6.4.	Waschschritte und DNA-Gegenfärbung	44
3.2.6.5.	Gating-Strategien	45
3.2.6.6.	Analyse am Durchflusszytometer und Auswertung	47
3.2.7.	Telomerlängenmessung mittels Southern Blot	47
3.2.8.	Telomerlängenmessung mittels Real-Time PCR	50
3.2.9.	Statistische Analysen	52

4. Ergebnisse	53
4.1. Cross-over-Akutstudie	53
4.1.1. Charakteristika Probandenkollektiv Akutstudie	53
4.1.2. Regulation der Telomeraseaktivität zirkulierender mononukleärer Zellen im Cross-over-Akutversuch	55
4.1.3. Regulation der mRNA Expression der telomer-stabilisierenden Proteine TRF2 und POT1	56
4.1.4. Regulation der mRNA-Expression des DNA-Reparaturproteins Ku70 und des Seneszenzmarkers P16	57
4.2. Randomisierte, kontrollierte Trainingsstudie	58
4.2.1. Charakteristika Probandenkollektiv	58
4.2.2. Trainingseffekte im Hinblick auf klinische Parameter und körperliche Fitness	61
4.2.3. Differentielle Effekte körperlicher Aktivität auf die Telomeraseaktivität	64
4.2.4. Regulation der TRF2 mRNA Expression	65
4.2.5. Regulation POT1 mRNA Expression	65
4.2.6. Regulation der Ku70 mRNA Expression	65
4.2.7. Regulation der P16 mRNA Expression	66
4.2.8. Regulation der iNOS mRNA Expression	67
4.2.9. Regulation der Telomerlänge	68
4.2.9.1. Messung der Telomerlänge mittels FLOW-FISH und Southern Blot	68
4.2.9.2. Real-Time PCR zur Messung der Telomerlänge mononukleärer Zellen	70
4.2.10. Lineare multivariable Regressionsanalyse der Veränderungen von Telomeraseaktivität und Telomerlänge	71
4.2.11. Die Änderung der maximalen Sauerstoffaufnahme ist mit der molekularen Trainingsantwort assoziiert	72
4.2.12. Repräsentatives Herzfrequenzverhalten der drei Interventionsgruppen	74

5. Diskussion	76
5.1. Differentielle Effekte auf molekulare Zellalterungsvorgänge nach einmaligem Trainingsreiz	76
5.2. Differentielle Effekte auf molekulare Zellalterungsvorgänge nach sechsmonatigem Training	78
5.3. Potentielle Regulationsmechanismen	80
5.4. Erkenntnisse für die Prävention kardiovaskulärer Ereignisse	82
5.5. Limitationen	83
5.6. Ausblick	84
6. Literaturverzeichnis	86
7. Publikation und Danksagung	96
8. Lebenslauf	99

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Abb.	Abbildung
ARF	alternativ reading frame
AT	Ausdauertraining
ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Teleangiectasia and Rad3 related
Bax	Bcl-2-associated X protein
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
CDK 2	Cyclin-Dependent-Kinase 2
CDK 4	Cyclin-Dependent-Kinase 4
CDKN2A	Cyclin-Dependent-Kinase-Inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propansulfonat
Chk 1	Checkpoint Kinase 1
Chk 2	Checkpoint Kinase 2
DDR	DNA-Damage-Response
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F1	Transkriptionsfaktor E2F1
EBM	Endothelial Basal Medium
EKG	Elektrokardiogramm
EPC	Endothelial Progenitor Cells
FACS	Fluorescence-Activated Cell-Sorting
FISH	Fluorescence-In-Situ-Hybridization
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gramm
HDR	Homology directed repair
HEK	Human Embryonic Kidney
INK4A	Inhibitor of CDK 4A
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase

IT	Intervalltraining
k	Kilo (10^3)
kb	kilobase
kg	Kilogramm
KO	Kontrollgruppe
KT	Krafttraining
KU 70	Lupus Ku Autoantigen Protein p70
l	Liter
LDS	2-[4-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-butadienyl]-3-ethylbenzothiazolium perchlorate
m	mili (10^{-3}), Meter
M	Mol
Mdm 2	Mouse double minute 2 homolog
MESF	Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome
MFI	Mean Fluorescence Intensity
miRNA	MicroRNA
MNC	Mononuclear Cells
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl, nano (10^{-9})
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NTC	No Template Control
P16	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
P21	CDK-Inhibitor 1
P53	Tumorsupressorprotein mit Molekularmasse 53kDa
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus d. H^+ -Ionenkonzentration
PNA	Peptide Nucleic Acid
POT 1	Protection of telomeres 1
RAP 1	Repressor/Activator protein 1
Ras	Rat-sarcoma Proto-Onkogen
Rb	Retino Blastoma Tumorsupressorprotein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RQ	Respiratorischer Quotient

SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SAUSE	Saarländische Ausdauer Etappe
TER	Telomerase-RNA
TERT	Telomerase reverse Transkriptase Protein
TIN2	TRF1 Interacting Nuclear factor 2
TPP 1	POT1-TIN2 organizing protein
TRAP	Telomere repeat-amplification protocol
TRF 1	Telomere repeat-binding factor 1
TRF 2	Telomere repeat-binding factor 2
TRF	Terminal Restriction Fragment
TRIS	Tris-[hydroxy-methyl]-aminomethan
u	unit
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VO ₂ max	Maximale Sauerstoffaufnahme

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Initiierung zellulärer Seneszenz	8
Abbildung 2: Aufbau des Telomerkomplexes	10
Abbildung 3: T-Loop Elektronenmikroskopie	11
Abbildung 4 Anpassungsvorgänge durch körperliche Aktivität	19
Abbildung 5: Studiendesign SAUSE-Studie	32
Abbildung 6: Ficoll-Seperation zur Isolation von MNC	36
Abbildung 7: TRAP Essay HEK-Zellen Standardkurve	41
Abbildung 8: Gatin-Strategien Flow-FISH	46
Abbildung 9: Telomerlängenmessung mittels Southern Blot	49
Abbildung 10: Validierung der quantitativen Real-time PCR	51
Abbildung 11: Ergebnisse Telomeraseaktivität Akutstudie	55
Abbildung 12: TRF2 mRNA Expression Akutstudie	56
Abbildung 13: POT1 mRNA Expression Akutstudie	57
Abbildung 14: Ku70 mRNA Expression Akutstudie	58
Abbildung 15: P16 mRNA Expression Akutstudie	58
Abbildung 16: Ergebnisse Telomerasaktivität Sause-Studie	64
Abbildung 17: Real-time PCR Ergebnisse Sause-Studie	66
Abbildung 18: iNOS mRNA Expression Sause-Studie	67
Abbildung 19: Telomerlängenänderung FlowFISH Sause-Studie	69
Abbildung 20: Telomerlängenänderung RT-PCR Sause-Studie	70
Abbildung 21: Lineare multivariable Regressionsanalyse der Veränderungen von Telomeraseaktivität und Telomerlänge	72
Abbildung 22: Telomeraseaktivität und Expression seneszenz- regulierender Faktoren in Abhängigkeit von V_{O_2max}	73
Abbildung 23: Repräsentative Herzfrequenzkurve der verschiedenen Trainingsformen	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika Probandenkollektiv Akutstudie	54
Tabelle 2: Charakteristika Probandenkollektiv Sause-Studie	60
Tabelle 3: Trainingseffekte Sause-Studie	63
Tabelle 4: Anpassungsreaktionen an Kraft- bzw. Ausdauertraining	81

1. Zusammenfassung

Regelmäßige körperliche Aktivität bewirkt verschiedene gesundheitsfördernde Effekte im Organismus und ist mit einer Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert. Die physiologischen Mechanismen körperlicher Anpassung auf verschiedene Arten und Intensitäten von Trainingsreizen sind ein auch heute noch stark bearbeitetes Forschungsthema, ebenso wie die Trainingseffekte im Kontext von Erkrankungen. Wir konzentrieren uns in der Arbeitsgruppe auf die molekularen Mechanismen von körperlicher Aktivität mit einem Fokus auf die Einflüsse auf zelluläre Alterung. Alter und körperliche Inaktivität sind wichtige Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen. Inwieweit diese Risikofaktoren zusammenhängen beziehungsweise Alterungsvorgänge durch körperliche Aktivität beeinflusst werden, ist ungenügend verstanden. Frühere Studien in Mäusen und Menschen lassen einen kurz- und langfristigen „Anti-Aging“-Effekt von Lauf- und Ausdauertraining auf molekulare Regulatoren der Zellalterung wie Telomeraseaktivität, Telomerlänge und Expression telomer-regulierender Proteine vermuten. Die Akuteffekte körperlicher Aktivität auf ebendiese Faktoren, ebenso wie die Frage nach differentiellen Effekten verschiedener Trainingsformen, wurde nun in der vorliegenden Dissertation prospektiv untersucht. Hierfür erfolgten zwei Interventionsstudien: Zum einen ein Akutversuch mit 15 Studienteilnehmern im Cross-over-Design mit Absolvieren eines Lauf- bzw. eines Krafttrainings. Die anschließende Untersuchung der Telomeraseaktivität beziehungsweise die Expression telomer-assoziiierter Proteine zeigte auch bei einmaligem Trainingsreiz eine differentielle Regulation im Sinne eines günstigen Effekts des aeroben Ausdauertrainings auf zelluläre Seneszenz, wohingegen ein solcher Effekt beim Krafttraining nicht beobachtet wurde.

In der prospektiven, kontrollierten, randomisierten Trainingsstudie über einen Zeitraum von 6 Monaten mit insgesamt 124 Probanden wurden die Telomeraseaktivität, die Expression telomer-regulierender Proteine und die Telomerlänge in 4 Gruppen (Kontrollgruppe, aerobe Ausdauergruppe, Intervalltrainingsgruppe, Krafttrainingsgruppe) untersucht. Passend zu den Ergebnissen der Akutstudie fand sich hier ebenfalls eine differentielle Regulation der Telomeraseaktivität mit einer Steigerung lediglich in den beiden ausdauerbasierten Interventionsgruppen. Parallel dazu kam es in diesen beiden Gruppen auch zu einer Zunahme der Telomerlänge,

während in der Krafttrainingsgruppe und in der Kontrollgruppe kein signifikanter Effekt beobachtet werden konnte.

Auf Grund der Limitationen der klinischen Studie lassen die erhobenen Ergebnisse keinen sicheren Schluss auf die verantwortlichen Regulationsmechanismen zu. Die Tatsache, dass sich ähnliche Effekte sowohl in der Akutstudie und der prospektiv kontrollierten, randomisierten Studie zeigten, legen nahe, dass mögliche Ursachen für die differentiellen Effekte in den Trainingsformen selbst zu suchen sind, zum Beispiel in den unterschiedlichen hämodynamischen Antworten auf das Training. Welche Faktoren genau bei ausdauerbasierten Trainingsformen die molekularen Vorgänge günstig beeinflussen, im Gegensatz zu Krafttraining, wäre in zukünftigen Studien zu untersuchen.

In der Praxis kann von den erzielten Ergebnissen abgeleitet werden, dass bei körperlicher Aktivität ein ausdauerbasiertes Training integraler Bestandteil sein sollte und Krafttraining wahrscheinlich kein Ersatz dafür ist. Die Ergebnisse der Dissertation unterstützen die aktuelle Leitlinienempfehlung zur körperlichen Aktivität in der Primär- oder Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen.

1.1. Summary

Regular physical activity induces improvements of many aspects of human health and is a cornerstone of cardiovascular disease prevention. Physiological adaptations to different modalities and intensities of training are even today an area of intense research in sports and rehabilitation medicine. The same holds true for research on training effects in the context of diseases. The molecular effects of physical activity are only known in part. Our workgroup focusses on the protective effects of exercise and the involvement of cellular senescence herein. Physical inactivity and aging are important risk factors for cardiovascular morbidity and mortality. How these risk factors are related and how cellular aging is affected by exercise are insufficiently understood. Previous studies suggest long-term anti-aging effects of physical activity, e.g. on molecular senescence regulators such as telomerase activity, telomere length and regulation of telomere-associated proteins. This thesis investigates acute and chronic effects of physical activity, as well as the comparison of different training modalities, on these factors. Two intervention studies were conducted. First, a crossover study of

young 15 participants, who performed an aerobic endurance training and a resistance training bout on different days. Telomerase activity and expression of telomere-associated proteins were acutely regulated after the training. Compared with endurance training, differential regulation was observed after resistance training.

In the prospective, randomized study the clinical and cellular effects of different training modalities in a primary prevention cohort were investigated. 124 individuals were randomized to four groups (aerobe endurance training, interval training, resistance training, control group) and were trained for 6 months, before regulation of telomerase activity, telomere length and expression of telomere-regulating factors was compared to the baseline measurements. As with the acute exercise study, a differential regulation was revealed. In the two endurance-based intervention groups (aerobic exercise training and interval training), telomerase activity, telomere length and expression of telomere-associated protein were increased. These effects were not present in the control group and the resistance training group.

Due to the limitations of a clinical study, the responsible mechanisms for these findings cannot be fully elucidated. However, the fact that similar effects can be seen as well after a single bout of exercise in a crossover design, as in a prospective long-term study, suggest that reasons for the differential regulation observed lies within the differences between the training modalities, e.g. differences in the hemodynamic response to the training. The precise molecular differences between endurance and resistance training with regard to the cellular effects should be dissected in further studies.

Overall, the results of the study support current guideline recommendations of regular physical activity in primary and secondary prevention of cardiovascular disease with endurance training as an integral component and resistance training as a complimentary rather modality than a substitute.

2. Einleitung

2.1. Einfluss körperlicher Aktivität zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen mit 38,5% aller Todesfälle die häufigste Todesursache in Deutschland dar[73]. Maßgeblich daran beteiligt ist die Tatsache, dass insbesondere ältere Menschen häufig an kardiovaskulären Krankheiten versterben. So waren 2015 ein Anteil von 92% der an kardiovaskulären Erkrankungen verstorbenen Individuen 65 Jahre und älter [73]. Bei einer demographischen Entwicklung, wie sie aktuell in Deutschland und vielen weiteren Industrienationen zu beobachten ist, wird dadurch die gesellschaftliche Relevanz der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen umso deutlicher, auch wenn verbesserte diagnostische und therapeutische Verfahren diesem Trend entgegenwirken.

Für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen ist eine Vielzahl verschiedener Risikofaktoren bekannt. Traditionelle Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose und in der Folge Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse umfassen Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen, hohes Lebensalter und genetische Prädisposition. Neue Risikofaktoren beinhalten z.B. chronische Entzündung, spezifische Lipidveränderungen (Lp(a)), neue genetische Risikovarianten, chronisch-entzündliche Erkrankungen und Umweltfaktoren wie Stress, Lärm und Feinstaub. Bis auf die genetische Prädisposition können alle genannten Risikofaktoren durch Änderung des Lebensstils günstig beeinflusst werden, vor allem Rauchstopp, gesunde Ernährung und körperliche Aktivität. Weltweit wird mittlerweile die körperliche Inaktivität bzw. mangelhafte Regelmäßigkeit oder Intensität an Bewegung mit dem Ziel, sich sportlich zu betätigen, als einer der 10 wichtigsten Risikofaktoren für Erkrankung und Behinderung angesehen [50]. 31,1% der Weltbevölkerung erreicht nicht ein Mindestmaß an körperlicher Aktivität [33].

Bereits seit langem findet sich daher moderate körperliche Aktivität in den Leitlinienempfehlungen der Fachgesellschaften. Sowohl in der Primär- als auch in der Sekundärprävention gibt es starke Evidenz für die präventive Wirksamkeit körperlicher Aktivität [67]. So ist körperliches Training dazu in der Lage, gleichzeitig viele der oben genannten Risikofaktoren langfristig günstig zu beeinflussen. Die reduzierte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität lassen sich teilweise auf eine Reduktion der

arteriellen Hypertonie und einen verbesserter Glukose- und Lipidmetabolismus zurückführen. Zusätzlich sinkt das Risiko bösartiger Neubildungen [48]. Hierbei besteht eine Dosis-Wirkungs-Beziehung [65]. Bereits eine körperliche Aktivität von 90 Minuten pro Woche oder 15 Minuten täglich reduziert die Gesamtmortalität um 14% und bringt eine Verlängerung der Lebenserwartung um 3 Jahre mit sich. Betätigt man sich über diese Maß hinaus, sinkt die Gesamtmortalität pro weiteren 15 min um jeweils 4%, beziehungsweise das Risiko bösartiger Neubildungen um jeweils 1% [83]. Neben der allgemeinen Leistungsfähigkeit wird auch die Glukosehomöostase und die Insulinsensitivität günstig beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass eine körperliche Aktivität von 150 Minuten pro Woche das Auftreten eines Diabetes mellitus Typ II effektiver verhindern konnte als eine medikamentöse Therapie mit Metformin [30]. Auch im Rahmen der Sekundärprävention ist körperliche Aktivität mit geringerer Mortalität und Wahrscheinlichkeit für das erneute Auftreten eines Myokardinfarkts zu senken [88].

2.2. Physiologische Alterungsvorgänge des kardiovaskulären Systems

„Altern“ wird von manchen Forschern insgesamt als bedeutendster Risikofaktor für das Entstehen vaskulärer Erkrankungen angesehen [44], wenn ansonsten kein prädominanter Risiko-Phänotyp vorliegt. Mit zunehmendem Alter kommt es zu vielfältigen Veränderungen des arteriellen Gefäßsystems. Hauptbefunde hierbei sind eine Wandverdickung, Dilatation und Versteifung der Arterien [60]. Für die Zunahme der Wandstärke ist, wie in post-mortem-Untersuchungen gezeigt werden konnte, hauptsächlich eine Hyperplasie der Intima verantwortlich. Damit einhergeht eine endotheliale Dysfunktion, was sich insbesondere in einer reduzierten flussvermittelten Gefäßdilatation deutlich macht [18]. Für das Auftreten einer Gefäßdilatation und Versteifung können altersbedingte Prozesse im Bereich der Tunica Media der Arterien verantwortlich gemacht werden. Insbesondere die herznahen elastischen Arterien unterliegen einem großen Dehnungsstress und werden bei jeder Pulswelle um 10% dilatiert, während Muskelarterien in der Peripherie nur um 2-3% gedehnt werden. In herznahen Gefäßen können mit zunehmendem Alter eine erhöhte Anzahl frakturierter elastinhaltiger Lamellen beobachtet werden. Dies kann sowohl für die Dilatation (durch das Fehlen der elastischen Rückstellkräfte) als auch für die Versteifung der

Gefäßwand (durch den Einbau starrer Kollagene) verantwortlich gemacht werden. Während der Bluttransport durch diese Umstände nicht beeinträchtigt wird, ist die gleichmäßige Fortleitung in die Körperperipherie durch Dilatation und Versteifung der Arterien in hohem Maße beeinträchtigt. Die erhöhte Steifigkeit der Gefäßwand wird in einer Erhöhung der Pulswellengeschwindigkeit und in einer Zunahme der Impedanz deutlich. Diese Umstände bringen eine erhöhte linksventrikuläre Last mit sich. Konsekutiv kommt es zu einer Myokardhypertrophie und einer herabgesetzten Koronarreserve. Ein weiteres Charakteristikum alternder Arterien ist das Vorhandensein atherosklerotischer Plaques, bei deren Entstehung neben den oben genannten kardiovaskulären Risikofaktoren zelluläre Seneszenz eine Rolle spielt [80]. Wesentliche Komplikationen der Atherosklerose sind Myokardinfarkt, zerebrale Ischämie sowie chronische Herz- und Niereninsuffizienz. Auch bei Menschen ohne ausgeprägtes Risikoprofil ist der Alterungsprozess der Arterien alleine ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse (O'Rourke & Hashimoto 2007).

2.3. Molekulare Vorgänge der Zellalterung

Auf molekularer Ebene zeigt sich das Altern eines Organismus in Form des Übergangs der Zellen in das Stadium der Seneszenz. Seneszenz ist ein Phänomen, das zeitlebens, auch während der Embryogenese oder bei Wundheilungsvorgängen, auftritt. „Replikative“ Seneszenz beschreibt eine Form des Zellzyklus-Arrests (G₀-Phase) mit Verlust der Teilungsfähigkeit der Zelle. Im Gegensatz zu quieszenten Zellen ist es seneszenten Zellen nicht mehr möglich in den Zellzyklus einzutreten und zu proliferieren. Alle Körperzellen mit Ausnahme von Stammzellen und Keimzellen gehen im Laufe ihrer Existenz in replikative Seneszenz über, bei zusätzlichem Zellstress kommt es zur Apoptose bzw. Nekrose.

Als Grund für diesen Prozess wird ein natürliches Schutzprogramm des Körpers vor unkontrollierter Zellteilung und somit neoplastischen Erkrankungen angenommen [15]. Es gibt diverse Stressoren, die das Seneszenzprogramm in Gang bringen oder akzelerieren können (**Abbildung 1**). Potentielle Auslöser stellen beispielsweise DNA-Schäden, oxidativer Stress, die Aktivierung von Onkogenen und der Verlust der Telomere dar [7,28]. Senescente Zellen unterscheiden sich von Keimzellen und

maligne transformierten Zellen in dem Verlust ihrer Teilungsfähigkeit, von physiologisch proliferierenden Zellen unterscheiden sie sich durch morphologische Veränderungen sowie eine Umstrukturierung des Chromatins, eine veränderte Genexpression und die Ausprägung eines Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps („SASP“, s.u.).

Zu replikativer Seneszenz kommt es durch schrittweise Degradation der Telomere an den Chromosomenenden, wobei intrinsische Faktoren letztlich den Seneszenzprozess initiieren. Bei der Stress-induzierten Seneszenz kommt es innerhalb kurzer Zeit durch extrinsische Schäden, die zu einer vorzeitigen Aktivierung des Seneszenzprogramms führen. Beide Ursachen münden in gemeinsamen Signalwegen, bei denen insbesondere Tumorsuppressorproteine eine wichtige Rolle spielen. Diese scheinen in jungen Jahren für das Aufrechterhalten der Gesundheit, in höherem Lebensalter für Alterungsvorgänge verantwortlich zu sein [16]. Hierbei sind insbesondere die beiden Tumorsuppressorproteine p53 und Rb-Protein zu nennen. P53 kann sowohl direkt als auch indirekt über eine Aktivierung des Rb-Proteins zur Initiation des Seneszenz-Programms führen. Darüber hinaus besteht ein unabhängiger Signalweg über das Tumorsuppressorprotein p16, das bei vielfältigem Zellstress exprimiert wird und letztendlich ebenfalls zur Rb-Aktivierung und damit zum Zellzyklusarrest führt. Im Lauf des Lebens akkumulieren seneszente Zellen im Gewebe und finden sich bei vielen degenerativen Pathologien wieder. Als Grund hierfür wird angenommen, dass der Mechanismus der Seneszenz neoplastische Erkrankungen des frühen Lebensalters verhindern soll. Im Lauf des Lebens sind akkumulierende seneszente Zellen möglicherweise für physiologische Alterung, aber auch Krebserkrankungen verantwortlich. Verantwortlich für positive und negative Eigenschaften seneszenter Zellen wird der o.g. SASP gemacht, der aus bestimmten pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen besteht. In geschädigtem Gewebe kann der SASP durch Wachstumshemmung, Immunstimulation und Reparaturvorgänge günstig sein. In gesundem Gewebe könnten jedoch lokale Entzündungsreaktionen, Gewebeschäden und Krebserkrankungen begünstigt werden. Aktuell wird vermutet, dass ein transientes Vorkommen seneszenter Zellen wie bei Reparaturvorgängen günstige Effekte hat, während permanentes Vorhandensein wie beim Altern nachteilige Effekte begünstigt [17].

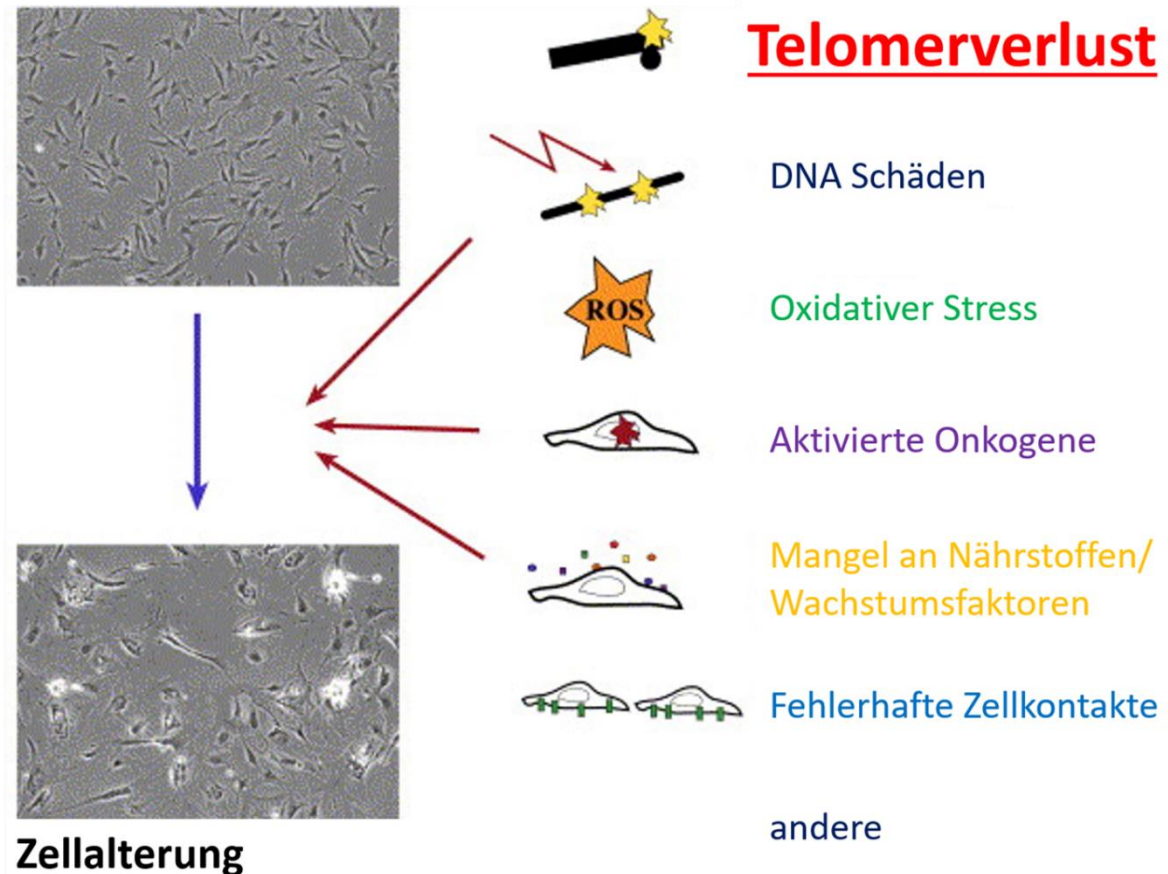


Abb.1: Unterschiedliche Stressoren, die zelluläre Seneszenz auslösen können. Modifiziert nach Ben-Porath et al. (International Journal of Biochemistry and Cell Biology 2005)

2.3.1. Telomere und Telomer-assoziierte Proteine

Während bei Prokaryonten die Erbinformation zirkulär in Form von Plasmiden verpackt ist, ist bei Eukaryonten die DNA in langen, linearen Chromosomen angeordnet. Dies bringt neben vielen Vorteilen aber auch zwei wesentliche Probleme mit sich, an deren Lösung Telomere maßgeblich beteiligt sind. Zum einen ist dies das „End-Replication-Problem“, zum anderen das „End-Protection-Problem“, auf die im weiteren Verlauf genauer eingegangen wird. Telomere stellen ihrem Namen gemäß die Endstücke der Chromosomen dar (**Abbildung 2**). Sie bestehen aus hexamerischen Komplexen repetitiver DNA-Sequenzen mit der Basenabfolge TTAGGG, die im Zusammenspiel mit verschiedenen stabilisierenden Proteinen für den Schutz der Erbinformation vor Rekombination und Degradation verantwortlich sind. Bei jeder Zellteilung geht ein Bruchteil der Telomere verloren, da die DNA-Polymerase nicht dazu in der Lage ist, den kompletten Chromatinstrang erneut zu synthetisieren. Dieser progressive

Telomerverlust wird als eine Art molekulare Uhr verstanden. Ab einer gewissen Anzahl an Zellteilungen - dem sogenannten Hayflick-Limit - und dem damit einhergehenden Telomerverlust geht die Zelle in replikative Seneszenz über. In Stammzellen und Tumorzellen ist die Expression des Enzyms Telomerase so hoch, dass dem Verkürzen der Chromosomenenden effektiv entgegengewirkt werden kann. Defekte der Telomerregulation äußern sich beispielsweise durch vorzeitige Alterungssyndrome oder neoplastische Erkrankungen [14]. Beim Menschen sind die Telomere ca. 10-15kb lang. Eine Besonderheit der Telomere stellt die Tatsache dar, dass sie einen 150-200 Nukleotide langen Überhang am guanin-reichen 3'-Einzelstrang besitzen. Neben dem Gewährleisten der Stabilität der Erbinformation muss daher außerdem sichergestellt werden, dass die Enden der Chromosomen nicht fälschlicherweise als Strangbrüche erkannt werden und somit eine Reihe von Reparaturmaßnahmen beziehungsweise sogar ein Zellzyklusarrest eingeleitet wird [23]. Ihrer Schutzfunktion kommen die Telomere auf verschiedene Art und Weise nach. Zum einen durch Ausbilden einer speziellen räumlichen Struktur, den so genannten T-Loops, zum andern durch Assemblierung verschiedener Proteine zu einem Komplex, der die Telomere ebenfalls stabilisiert und sie sowohl vor Abbau als auch vor Initiierung von DNA-Reparaturmaßnahmen schützt [8]. Die bereits angesprochenen T-Loops sind große Schleifen, die durch Anlagern des überhängenden guanin-reichen Einzelstrangs in den Bereich doppelsträngiger Telomer-DNA entstehen [22]. Dieser dient der Telomerase als Bindungsstelle und ist in der Lage eine charakteristische T-Loop Konfiguration zum Schutz vor Degradation zu bilden. Die charakteristischen TTAGGG-Sequenzen dienen telomer-assoziierten Proteinen wie TRF1 und TRF2 als direkte Bindungsstelle. Diese beiden Proteine fungieren wiederum als Bindungsfaktoren für weitere Proteine, die in ihrer Gesamtheit den so genannten Shelterin-Komplex darstellen.

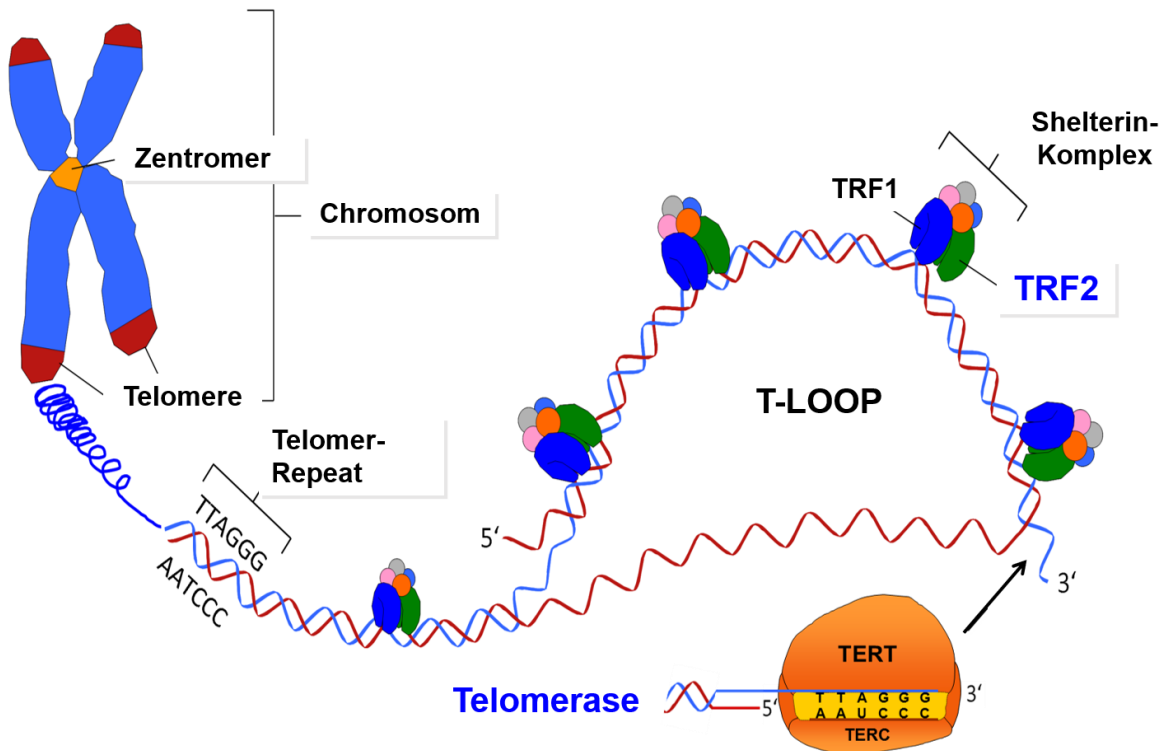


Abb.2: Aufbau des Telomerkomplexes, bestehend aus Telomer-DNA und telomer-assoziierten Proteinen mit Ausbildung der charakteristischen T-Loop-Struktur. Die Telomerase bindet das einsträndige 3' Ende des Telomerstrangs mit ihrer TERC-Untereinheit und die katalytische Untereinheit TERT verlängert das 5'-Ende des Strangs. Modifiziert n. Calado and Young (NEJM 2009).

2.3.1.1. Shelterin-Komplex und „End-Protection-Problem“

Der „Shelterin-Komplex“ zum Schutz der Telomere besteht aus sechs telomer-assoziierten Proteinen. Dazu gehören TRF1, TRF2, POT1, TIN2, RAP1 und TPP1. Alle sechs Untereinheiten finden sich in einem Komplex. Während TRF1, TRF2 und POT1 dafür verantwortlich sind, direkt an die Telomer-DNA zu binden, gewährleisten TPP1, TIN2 und RAP1 die Stabilität des Komplexes durch Ausbilden von Protein-Protein-Bindungen. TRF1 und TRF2 binden sehr spezifisch an die Basenabfolge 5'-YTAGGGTTR-3' in doppelsträngiger DNA und bilden dabei Homodimere. POT1 dagegen bindet spezifisch an einzelsträngige 5'-TTAGGGTTAG-3' Basenanordnung. Da diese 3 Proteine durch Protein-Protein-Bindungen miteinander verbunden sind, hat ein Shelterin-Komplex mindestens fünf DNA-Bindedomänen. Durch das Vorhandensein dieser Proteine an den Telomeren können selbige effektiv von anderen Strukturen, wie z.B. Strangbrüchen, unterschieden werden. Der Shelterin-Komplex ist

auf mehrere Arten dazu in der Lage, die Telomere zu stabilisieren und zu schützen. Zunächst soll auf die Ausbildung spezieller räumlicher Strukturen, sogenannter T-Loops, eingegangen werden. Grundsätzlich werden durch frei liegende DNA-Enden entweder Reparaturvorgänge oder Zellzyklusarrest und Apoptose induziert. Um diese Vorgänge zu vermeiden sorgen die Proteine des Shelterin-Komplexes für die Ausbildung sogenannter T-Loops [29]. In vitro Beobachtungen zeigten, dass bereits das Vorhandensein von TRF2 die Ausbildung von DNA-Schleifen induziert (**Abbildung 3**), weswegen insbesondere TRF2 bei der Ausbildung der T-Loops eine maßgebliche Bedeutung beigemessen wird. Das Umschlagen des doppelsträngigen Telomerbereichs wird als T-Loop bezeichnet. Der überstehende Einzelstrang-Anteil „versteckt“ sich dann zwischen einem vorgeschalteten Doppelstrangabschnitt, was als D-Loop bezeichnet wird [52]. In-vitro-Beobachtungen legen nahe, dass die Integrität der Telomere für die Langlebigkeit der Zelle von größerer Bedeutung ist als die absolute Telomerlänge. Karlseder et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von TRF2 in Zellkultur unabhängig von der Telomerlänge zu einer erhöhten Zellteilungszahl führte [38].

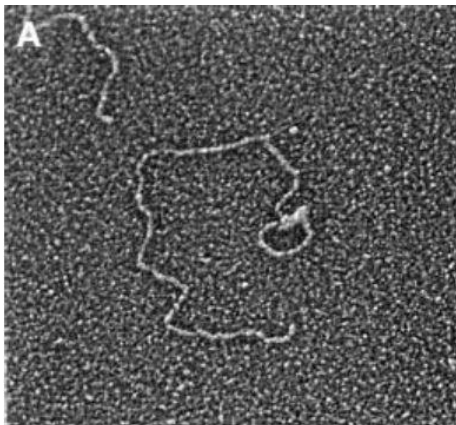


Abb.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer T-Loop Konfiguration, die sich *in vitro* nach Zugabe von TRF2 zu einem Telomer-„Template“ gebildet hat. Quelle: Stansel, de Lange and Griffith, 2001

Nicht nur die räumliche Struktur der Telomere, sondern auch deren Länge wird unter anderem durch den Shelterin-Komplex beeinflusst. Über einen negativen Feedback-Mechanismus kann der Telomerase-Signalweg inhibiert werden [71]. Hier scheint das Vorhandensein vieler Shelterin-Komplexe effektiv die Telomerase zu inhibieren. Da das Vorkommen vieler Shelterin-Komplexe annähernd proportional zur Telomerlänge ist, kann angenommen werden, dass der Telomerase-Signalweg erst bei kurzen Telomeren zum Tragen kommt. Studien legen nahe, dass auch die Bindung von POT1 an den überstehenden Einzelstrang eine maßgebliche Rolle spielt. Bei mutierten POT1 Proteinen, deren Bindungsfähigkeit an den Einzelstrang nicht vorliegt, kommt es zu einem kompletten Verlust der Kontrolle der Telomerlänge [71]. Dies scheint daran zu

liegen, dass das Vorhandensein von mutiertem POT1 den Zugang für die Telomerase an die Einzelstrang-DNA blockiert und diese ihre Funktion nicht aufnehmen kann.

Eine weitere Funktion des Shelterin-Komplexes zeigte sich, als die Untereinheit TRF2 durch Bildung eines Heterodimers mit einem modifizierten TRF2 Molekül in ihrer Bindung an die Doppelstrang-DNA blockiert wurde. Dies führte zu einer Aktivierung des ATM-Kinase-Signalwegs, einer Hochregulation von p53 und einem Zellzyklusarrest [37]. Neben dieser Aktivierung durch das nicht gebundene TRF2 scheint eine weitere direkte Interaktion zwischen TRF2 und der ATM-Kinase zu bestehen, die eine Autophosphorylierung und damit einen wesentlichen Bestandteil des Signalwegs inhibiert. Dies ist insbesondere deswegen interessant, da TRF2 nur an den Enden der Chromosomen lokalisiert ist und damit diesen Signalweg nur lokal zu inhibieren scheint und nicht in der gesamten Zelle. Knock-out Versuche mit POT1 defizienten Mäusen zeigten, dass für eine Inhibition des ATM-Signalwegs POT1 verantwortlich ist [34].

Auch bei der Frage, wie sich Telomere effektiv vor der Initiation von DNA-Reparaturvorgängen wie dem Non-Homologous End Joining (NHEJ) oder der Homology Directed Repair (HDR) schützen, scheint der Shelterin-Komplex eine maßgebliche Rolle zu spielen. Wie oben beschrieben bietet bereits die räumliche Struktur einen gewissen Schutz als Einzel- oder Doppelstrangbruch erkannt zu werden, die Proteine des Shelterin-Komplexes interagieren jedoch auch direkt mit DNA-Reparatur-Faktoren. Während der G1 Phase des Zellzyklus fungiert wieder TRF2 als Hauptrepressor des NHEJ, in der G2 Phase sind jedoch sowohl TRF2 als auch POT1 für eine Suppression des NHEJ verantwortlich. Für eine effektive Kontrolle des HDR-Signalwegs scheinen POT1 und TRF2 ebenfalls gemeinsam verantwortlich zu sein [23]. Neben diesen zwei Proteinen des Shelterin-Komplexes kann ebenfalls das Heterodimer aus den Proteinen Ku70/Ku80 für eine Unterdrückung des HDR verantwortlich sein. Dies scheint zunächst kontraintuitiv, da Ku70/80 als wichtiger Faktor bei NHEJ im Rahmen von Doppelstrangbrüchen der DNA bekannt ist. Im Zusammenhang mit den Telomeren könnte jedoch eine gänzlich andere Funktion vorzuliegen. Die aktuelle Interpretation ist, dass der Shelterin-Komplex die Funktion von Ku70/80 dergestalt beeinflusst, dass es in Lokalisation an den Telomer-Enden DNA-Reparaturmechanismen verhindert [36].

2.3.1.2. Telomerase und „End-Replication-Problem“

Der DNA-Replikationsapparat der Zelle ist die Ursache für die Telomerverkürzung bei jeder Zellteilung. Während die DNA-Polymerase dazu in der Lage ist, den kontinuierlichen Strang in 5´→3´ Richtung ohne Informationsverlust zu kopieren, zeigt sich am diskontinuierlichen Strang das Problem, dass mit Entfernen des terminalen Ogazaki-Fragments ein kurzer DNA-Abschnitt übrig bleibt, der von der DNA-Polymerase nicht mehr synthetisiert werden kann. Dies bringt einen Informationsverlust mit sich, der nach einer gewissen Anzahl Zellteilungen auch kodierende DNA-Bereiche betrifft und somit keine weiteren Zellteilungen erlaubt. Dieses Phänomen ist als „End-Replication-Problem“ bekannt. 1985 gelang es Carol Greider und Elisabeth Blackburn das Enzym Telomerase zu charakterisieren, das als reverse Transkriptase dazu in der Lage ist, der Telomerverkürzung entgegenzuwirken. Die Telomerase besteht aus der katalytischen Untereinheit „Telomerase Reverse Transkriptase Protein“ (TERT) und einem „Telomerase-RNA“-Bestandteil (TERC) [9] (**Abbildung 2**). In vitro sind bereits TERC und TERT ohne weitere Kofaktoren in der Lage, Telomerasequenzen zu verlängern. In vivo spielen die Proteine des Shelterin-Komplexes eine zusätzliche Rolle. Insbesondere POT1 und TPP1, die an den überstehenden Einzelstrang gebunden sind, scheinen bei der Rekrutierung der Telomerase eine wichtige Funktion einzunehmen [64]. Nach Rekrutierung der Telomerase bindet TERC durch Basenpaarung an den überstehenden 3´Strang. Die TERT Untereinheit kann in einem weiteren Schritt diesen Strang - mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerisation - verlängern. Der korrespondierende Strang kann ohne Einsatz der Telomerase von geläufigen DNA-Polymerasen verlängert werden.

2.3.2. Seneszenz-regulierende Proteine

Im Laufe ihres Lebens durchlebt jede Zelle mehrmals den Zellzyklus, der aus 4 verschiedenen Phasen besteht. Neben der Mitosephase (M-Phase), in der die eigentliche Zellteilung stattfindet, gibt es zwei Wachstumsphasen (G1 und G2), die von einer Synthesephase (S-Phase) getrennt werden. Der Zellzyklus steht unter ständiger Kontrolle, um Zellen mit defektem Erbgut zu identifizieren, Reparaturvorgänge zu initiieren und den programmierten Zelltod oder Zellzyklusarrest auszulösen, falls die

Reparatur versagt. Die Kontrollmechanismen sind komplex und vielschichtig, da bei einer Fehlregulation des Zellzyklus beispielsweise Tumore entstehen können und befinden sich jeweils am Ende der G1 und G2 Phase. Eine zentrale Rolle bei diesen Kontrollmechanismen nehmen die Tumorsuppressorproteine p53 und Retinoblastom-(Rb-) Protein ein. Als Antwort auf DNA-Schäden kommt es zu einer spezifischen Antwort, was meist in einem Zellzyklusarrest oder Apoptose mündet. Die Zelle kann sich dann nicht mehr weiter teilen. In den vielfältigen Signalwegen, die als DNA-Damage-response (DDR) bezeichnet werden, kristallisierten sich mehrere Proteine heraus, die als Seneszenzparameter verlässlich herangezogen werden können. Im Folgenden wird insbesondere auf die Proteine p16, p53 und Ku70 eingegangen. P53 wurde in der hier vorliegenden Arbeit zwar nicht als Seneszenzmarker bestimmt, ist aufgrund seiner zentralen Rolle aber ein unerlässlicher Bestandteil in einer Darstellung der zellulären Seneszenz. P16 eignet sich gut als Seneszenzmarker zur Bestimmung des biologischen Alterns, weswegen dieser Marker in der vorliegenden Dissertation bestimmt wurde [51]. Ku70 spielt zum einen eine große Rolle bei der Erkennung von DNA-Schäden und der Initiierung von DNA-Reparaturmechanismen. Darüber hinaus besteht wie oben genannt eine Interaktion mit dem Shelterin-Komplex und der Stabilisierung der Telomerstruktur im Sinne eines anti-seneszenten Effekts [74,81].

2.3.2.1. P16

P16 ist ein Tumorsuppressorprotein, dessen Hauptfunktion als Mitglied der INK4A-Familie (Inhibitoren der cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6) in einer Regulation des Zellzyklus liegt. Es ist neben p14 eines der zwei Produkte des CDKN2A Genlocus und spielt eine maßgebliche Rolle beim Zellzyklusarrest im Rahmen zellulärer Seneszenz, ist jedoch unter „Normalbedingungen“ in adulten Zellen kaum exprimiert. Erst im Rahmen verschiedener Stressoren kommt es zu einer deutlichen Expression von p16, so dass seneszente, aber auch maligne transformierte, Zellen besonders viel p16 Protein aufweisen [3]. Das Synonym „CDK4 Inhibitor“ beschreibt die wesentliche Eigenschaft des Proteins p16. Im Zellzyklus ist ein Komplex aus CDK4/6 und Cyclin D für die Phosphorylierung von Rb-Protein verantwortlich, das wiederum in phosphoryliertem Zustand vom Transkriptionsfaktor E2F1 dissoziiert [69]. E2F1 ist dann für die Transkription mehrerer Gene zuständig, die für einen Progress des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase erforderlich sind. Bei Expression von p16 liegt Rb

in hypophosphoryliertem Zustand vor und kann die Progression des Zellzyklus nicht ankurbeln [7]. Durch Knock-out Versuche wurde die Funktion als Tumorsuppressor verdeutlicht. Während p16-defiziente Fibroblasten sich gegenüber Proto-Onkogen-induzierter Seneszenz widerstandsfähiger zeigten [12], konnte im Mausmodell eine erhöhte Tumoranfälligkeit bei p16-defizienten Mäusen gezeigt werden.

Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist eine Untersuchung von Liu et al., die die Expression von p16 in den verschiedenen Zellen des peripheren Bluts untersuchten und Zusammenhänge zu den Eigenschaften der Spender herstellten. In Zellen des peripheren Bluts zeigte sich ein exponentieller Anstieg von p16 mit zunehmendem Alter der Blutspender. Eigenschaften wie Geschlecht oder BMI zeigten keine Korrelation, ein gleichgerichteter Zusammenhang konnte jedoch zwischen körperlicher Inaktivität und erhöhter p16 Expression sowie Nikotinabusus und p16-Expression erhoben werden. P16 kann somit als Biomarker für das molekulare Alter eines Organismus herangezogen werden [51].

2.3.2.2. P53

P53 ist das bekannteste Tumorsuppressorprotein, das aufgrund seiner zentralen Bedeutung auch als „Wächter des Genoms“ bekannt ist. Es ist in mehr als 50% aller Tumore mutiert. Ist die Funktion erhalten, kann p53 auf vielfältigste Weise agieren. Es kann zum einen DNA-Reparaturmechanismen initiieren oder die Zelle in Apoptose oder den Zellzyklusarrest führen. P53 ist unter Normalbedingungen einem ständigen Abbau durch Proteasen unterworfen. Bei Zellschäden kommt es zu einer Stabilisierung des Proteins und Aktivierung, was wiederum zur Transkription von p21 führt. Dieses Produkt ist in der Lage den Proteinkomplex aus CyclinE/CDK2 zu hemmen. Das Resultat ist, ähnlich wie beim im Vorfeld angesprochenen Signalweg des p16, dass das Rb-Protein nicht phosphoryliert und damit aktiviert werden kann, was einem Zellzyklusarrest gleichkommt. Was die Aktivierung von p53 im Rahmen zellulärer Seneszenz angeht, scheint es mehrerer Aktivierungswege zu geben. Chk1/Chk2 und ATM/ATR Proteine bewirken bei DNA-Schäden von p53 eine posttranskriptionale Stabilisierung durch Phosphorylierung. Bei anderen Stressoren vermittelt das Protein p14 über eine Hemmung den Anstieg der transkriptionalen Aktivität von p53 mit der Folge Apoptose oder Zellzyklusarrest [79]. Insgesamt kann man die Wirkungen von

p53 als „antagonistische Pleiotropie“ bezeichnen: Bei Mäusen mit vermehrter p53-Expression kommt es zu einer wirksamen Tumorsuppression, jedoch auf der anderen Seite zu einer verfrühten Alterung [78]. Wie auch für p16, konnte gezeigt werden, dass das p53-Protein in seneszenten Zellen akkumuliert [43]. Wir sahen für diese Arbeit allerdings p16 als geeigneteren Biomarker in Blutzellen an.

2.3.2.3. Ku70/80

Das Ku-Heterodimer, bei Eukaryonten bestehend aus Ku 70 und Ku 80, ist ein Proteinkomplex mit vielfältigen Aufgaben. Diese zentralen Aufgaben werden eindrücklich in Knock-out Mausmodellen deutlich. Ebenso wie bei den bereits angesprochenen Proteinen p16 und p53 entwickeln Ku70-defiziente Mäuse vermehrt Tumore und zeigen verfrühte Alterungserscheinungen [31]. Am besten charakterisiert ist Ku70/80 für die Initiierung des wichtigsten DNA-Reparaturwegs der Zelle bei Doppelstrangbrüchen, dem NHEJ. Ku70/80 bindet hier direkt an die DNA im Bereich des Strangbruchs, aktiviert direkt und indirekt verschiedene Bestandteile des DNA-Reparatursystems und dient diesem als zentralem Baustein. Für die hier vorliegende Arbeit von besonderem Interesse ist jedoch die Verbindung von Ku zu den Telomeren. Entgegen ihrer sonstigen Funktion wird an den Chromosomenenden kein DNA-Reparaturmechanismus initiiert, sondern die Telomere werden in ihrer Form stabilisiert [81]. Neben der Stabilisierung der Telomerstruktur besitzt Ku auch Auswirkung auf die Telomerlänge. Dies wird mit einer Teilfunktion bei der Rekrutierung der Telomerase erklärt [74] (vgl. 2.3.1.1).

2.4. Anpassungsvorgänge des kardiovaskulären Systems bei körperlicher Aktivität

In dieser Arbeit wurden, um die Zellalterungsvorgänge bei verschiedenen Trainingsformen vergleichen zu können, zirkulierende mononukleäre Zellen des peripheren Blutes bei den Probanden isoliert. Für diese Zellen wurde gezeigt, dass sie gut die Alterungsvorgänge des kardiovaskulären Systems widerspiegeln [25,87].

Im Folgenden soll deswegen auf die Anpassungsvorgänge des kardiovaskulären Systems bei körperlicher Aktivität eingegangen werden. Eine akute Antwort des Gefäßsystems auf körperliche Aktivität findet sich in der zellulären Zusammensetzung des Blutes. Laufs et al. konnten zeigen, dass ein Lauftraining von 30min zu einer vermehrten Freisetzung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) ins periphere Blut führt. Dieser Effekt zeigte sich bei 10-minütiger Belastung allerdings noch nicht. EPC wird eine kardioprotektive Wirkung im Sinne einer Reparaturfunktion, verbesserter Angiogenese und Endothelfunktion zugeschrieben [47]. Auf hormoneller Ebene kommt es als Akutantwort zu einem Anstieg des Serumcortisolspiegels, der jedoch nicht dauerhaft erhöht ist [5].

Eine der wichtigsten Änderungen, die körperliches Training für das Gefäßsystem mit sich bringt, ist eine absolute Erhöhung der Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO) im Gefäßsystem. NO bewirkt eine Vasodilatation und damit eine Verringerung des peripheren Widerstands und eine verbesserte Perfusion. Hauptsächlich verantwortlich für die Produktion von NO ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die durch erhöhten Scherstress im Rahmen körperlicher Aktivität induziert und aktiviert wird [45]. Außerdem konnte ein Effekt auf das Vorkommen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die NO verbrauchen, gezeigt werden. Nach anfänglich leicht erhöhtem Vorkommen von ROS konnte nach längerem Training eine Herabregulation der NAD(P)H-Oxidase [1] und eine Stimulation ROS-abfangender Systeme wie der Superoxiddismutase, Glutathion-Peroxidase und Glutathion gezeigt werden [75].

Neben dieser verbesserten Vasodilatation und Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies zählen auch endotheliale Reparaturvorgänge zu den Anpassungsvorgängen im Rahmen körperlicher Aktivität. Es konnte sowohl für einmaliges als auch regelmäßiges Training eine Mobilisation endothelialer Vorläuferzellen und mesenchymaler Stammzellen und eine Aktivierung dieser beschrieben werden [49]. Hier ist von Bedeutung, dass NO-Synthasen bedeutsam für die Freisetzung dieser Zellen aus dem Knochenmark sind [2].

Eine weitere Auswirkung der körperlichen Aktivität betrifft Reduktion der Rigidität des arteriellen Gefäßsystems. Klinische Studien zeigten einen deutlichen Effekt aeroben Ausdauertrainings auf die Steifigkeit der Aorta. Bei körperlich aktiven Individuen war die Compliance der zentralen Gefäße vergleichbar mit der von deutlich jüngeren nicht körperlich aktiven Vergleichspersonen. Auch eine 3-monatige Intervention mittels moderatem aeroben Ausdauertraining (hauptsächlich Walken) konnte eine

verbesserte Compliance zeigen [76]. Dies ist insbesondere deswegen bedeutend, da eine herabgesetzte zentralarterielle Compliance als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen zählt [4]. Die genauen Hintergründe und Zusammenhänge zwischen körperlicher Aktivität und einer verbesserten arteriellen Steifigkeit sind jedoch nur unvollständig verstanden.

Auch die Fähigkeit des Gefäßsystems Kollateralen zu bilden wird im Rahmen körperlicher Aktivität gesteigert [89]. Hierfür werden ähnlich wie bei der Angiogenese mehrere Stimuli beschrieben, die insbesondere die Rekrutierung von Stammzellen und das Ausschütten von Wachstumsfaktoren wie VEGF beinhalten [77]. Interessanterweise zeigen aktuelle Untersuchungen jedoch die Bedeutung der induzierbaren NO-Synthase für das Kollateralenwachstum. Diese wird unter anderem durch körperliche Aktivität aktiviert. Im Tierversuch konnte für Mäuse, die ein 3-wöchiges freiwilliges körperliches Training auf dem Laufrad absolviert hatten, ein deutlich verbessertes Kollateralenwachstum nach Ligatur der A. femoralis und eine deutlich erhöhte iNOS-Expression nachgewiesen werden. Bei iNOS-defizienten Mäusen war dieser Effekt stark reduziert [66].

Ein weiteres Feld, das Regulationsvorgängen bei körperlicher Aktivität unterliegt, ist die Expression von Micro RNAs (miRNA), die die posttranskriptionelle Genexpression beeinflussen. Hier gibt es bislang noch wenige Daten, jedoch konnte gezeigt werden, dass miRNA 21 Scherstress-vermittelt exprimiert wird und zum einen eine Steigerung der eNOS Expression auslöst sowie die Apoptoserate reduziert [82].

Neben einer Verbesserung der Gefäßcompliance kommt es auch zu einem verbesserten Kollateralenwachstum und einer verringerten Apoptoserate, was sich in epidemiologischen Studien auch auf nicht-molekularer Ebene als Verlängerung der Überlebensdauer widerspiegelt. **Abbildung 4** fasst diese Aspekte zusammen.

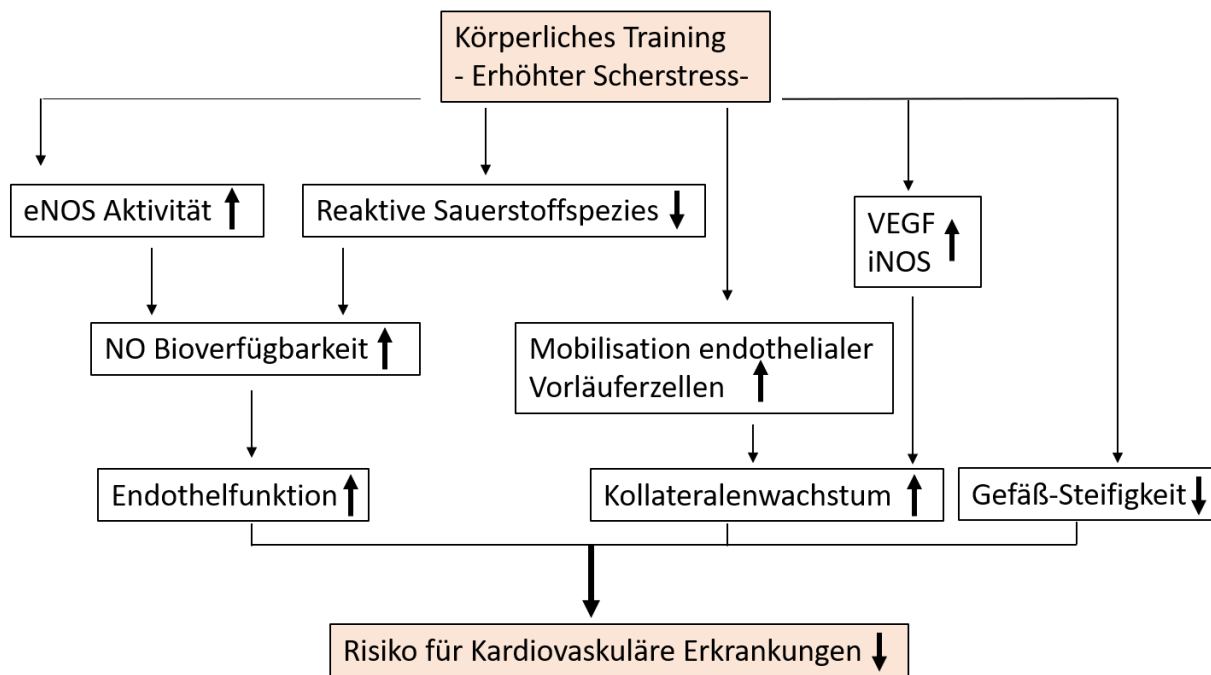


Abb.4: Mögliche Anpassungsvorgänge, die durch körperliche Aktivität im Gefäßsystem ausgelöst werden. Erhöhte Bioverfügbarkeit von NO, verminderte reaktive Sauerstoffspezies, erhöhte VEGF- und iNOS-Spiegel etc. münden letztendlich in eine verbesserte Endothelfunktion, Kollateralenwachstum und eine reduzierte arterielle Steifigkeit, was das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen reduziert. Modifiziert nach Schuler et al. (European Heart Journal, 2013).

2.5. Vorarbeiten

Bereits im Jahr 1953 wurde erstmals der Einfluss körperlicher Aktivität auf das Auftreten koronarer Herzkrankheit untersucht. Morris et al. verglichen das Auftreten koronarer Herzkrankheit zwischen Schaffnern und Busfahrern im Londoner öffentlichen Nahverkehr. Die Beobachtung, dass die hauptsächlich sitzenden Busfahrer signifikant häufiger von koronarer Herzkrankheit betroffen waren, führte zu der Hypothese, dass körperliche Aktivität eine maßgebliche Rolle in der Prävention kardiovaskulärer Krankheiten spielen könne [57]. Dieser präventive Effekt konnte in zahlreichen groß angelegten epidemiologischen Studien in der Folgezeit bestätigt werden. Seit der Entdeckung der Telomerase durch Elisabeth Blackburn und Carol Greider 1985 gewann die Telomerforschung immer mehr an Bedeutung. 2009 wurde Frau Blackburn und Frau Greider zusammen mit Herrn Szostak für ihre jahrelange Forschung an Telomeren der Nobelpreis verliehen.

Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigten sich aktuell mit den Zusammenhängen zwischen körperlicher Aktivität und den Auswirkungen auf die Telomerbiologie. So

konnte in einer Zwillingstudie ein direkter Zusammenhang zwischen körperlicher Aktivität und der Telomerlänge hergestellt und ein „Anti-Aging“-Effekt durch körperliches Training belegt werden [19]. Wilson et al. konnten anhand des Vergleichs von Telomerlängen in zirkulierenden Leukozyten und Aortenbiopsaten zeigen, dass diese zwei Untersuchungsmaterialien sich in der Telomerlänge entsprechen und sich somit von der Telomerlänge zirkulierender Leukozyten Rückschlüsse auf das Alter des arteriellen Gefäßsystems ziehen lassen [87]. Neben Änderungen der Telomerlänge konnte durch Lebensstiländerung auch eine Änderung der Telomeraseaktivität gezeigt werden [61].

Um die molekularen Vorgänge, die durch körperliche Aktivität initiiert werden, und die Zusammenhänge auf Telomerlänge und Telomeraseaktivität genauer zu untersuchen und zusammenzuführen, verwendete die Arbeitsgruppe um Laufs und Werner das Mausmodell des freiwilligen Laufradtrainings. Die Mäuse der Beobachtungsgruppe hatten dabei durch ein Laufrad in ihrem Käfig die Möglichkeit sich freiwillig körperlich zu betätigen, die Kontrollgruppe ohne diese Möglichkeit war inaktiv. In einem ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass in der Trainingsgruppe die Anzahl endothelialer Progenitorzellen in Knochenmark, Blut und Milz signifikant erhöht war. Weiter zeigten sich erhöhte VEGF Spiegel im Blut und ein Ausbleiben dieser Effekte bei Behandlung der Mäuse mit einem NO-Inhibitor. Auch die Apoptoserate der EPCs lag signifikant niedriger in der Trainingsgruppe und es konnte eine verbesserte Angiogenese und Endothel-Reparatur nach Verletzung gezeigt werden [46]. In einem weiteren Schritt betrachtete man im selben Mausmodell des freiwilligen Laufradtrainings die konkreten Auswirkungen auf Telomeraseaktivität, Telomerlänge und verschiedene Seneszenzfaktoren. Nach 3-wöchigem freiwilligen Lauftraining, bei dem die Mäuse im Mittel 4-5km pro 24h zurücklegten, konnte eine Hochregulation der myokardialen Telomeraseaktivität, der TERT-Expression, TRF2- und Ku70/Ku80-Expression beobachtet. Dies war verbunden mit einer reduzierten Expression der pro-apoptotischen Mediatoren bzw. Zellzyklusinhibitoren Chk2, p16 und p53 auf Proteinebene. In TERT bzw. eNOS-defizienten Mäusen konnte durch sportliche Aktivität keine Regulation der genannten Proteine mehr erzeugt werden. Um die physiologische Relevanz dieser anti-apoptotischen Vorgänge zu testen wählte man eine Behandlung der Mäuse mit dem kardiotoxischen Doxorubicin. Hier konnte in der Trainingsgruppe ein deutlich kardioprotektiver Effekt der trainierten Mäuse im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen gezeigt werden [84].

Beim Menschen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Werner et al. zeigten eine höhere Telomeraseaktivität, Expression telomer-stabilisierender Proteine und eine verminderte Expression von Seneszenzmarkern in mononukleären Zellen von jungen und langjährigen Ausdauerathleten im Vergleich zu körperlich inaktiven jungen und älteren Kontrollprobanden. Bei Untersuchungen der Blutzell-Telomerlänge in den über Jahrzehnte hinweg sportlich sehr aktiven „Master“-Athleten zeigte im Vergleich zu gematchten inaktiven Kontrollen eine deutliche Reduktion der Telomerverkürzung [85]. Melk et. al konnten in einer prospektiven Trainingsstudie bei 59 männlichen Probanden eine signifikant längere Telomerlänge nach 6-monatigem intensiven Training mit einem wöchentlichen Trainingsumfang von 210min feststellen. Außerdem war die Telomeraseaktivität signifikant erhöht und die Expression von p16 reduziert. Neben diesen Trainingsstudien, die einen längeren Trainingszeitraum beobachteten, gibt es nur wenige Akutstudien, die sich mit den unmittelbaren Auswirkungen eines Trainingsreizes auf die Zellalterung und der verantwortlichen Regulationsmechanismen befassen. Auch bei diesen Akuteffekten fanden sich erste Hinweise für einen möglichen „Anti-Aging“-Effekt körperlichen Trainings bereits bei einmaligem Trainingsreiz. Bereits nach 30-minütigem Training auf einem Laufband konnte eine Hochregulation der TERT-mRNA zusammen mit der Expression mehrerer miRNAs beobachtet werden [20]. Auch die Telomeraseaktivität und die TRF2 Expression sind möglicherweise akut nach einer Trainingsintervention verändert [90]. Die molekularen Regulationsmechanismen für diese Beobachtungen blieben jedoch weitgehend unklar. Ebenso wurde die Frage nach differentiellen Effekten verschiedener Trainingsformen und den Auswirkungen eines einmaligen Trainingsreizes bis dato nie untersucht.

2.6. Ziele der Arbeit

Körperliche Aktivität beeinflusst in vielfältiger Weise die körperliche Gesundheit. Dazu gehören unter anderem ein höheres Leistungsvermögen, eine verbesserte Endothelfunktion, erhöhte Insulinsensitivität und verbesserter Fettstoffwechsel. Ausdauertraining und Krafttraining sind deswegen seit langem alleine oder in Kombination fester Bestandteil und eine Klasse-I-Empfehlung in den Leitlinien zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen. Dem Intervalltraining wird, im Gegensatz

zum reinen Ausdauertraining, eine höhere Effektivität und eine effizientere Verbesserung des kardiovaskulären Trainingsstatus zugeschrieben. Die hier vorgestellte Akutstudie ist die erste Studie in einem Cross-over-Design, die direkt Ausdauertraining mit Krafttraining im Hinblick auf Telomeraseaktivität, Telomer-assoziierte Proteine und Seneszenzparameter vergleicht. Die Saarländische Ausdauer-Etappe („SAUSE“) - Studie ist die erste prospektive, randomisierte, kontrollierte Trainingsstudie, die über einen 6-monatigen Beobachtungszeitraum die Trainingsformen Ausdauertraining, Krafttraining und Intervalltraining im Hinblick auf physiologische Anpassungsvorgänge und Zellularungsprozesse untersucht.

Somit werden folgende Ziele formuliert:

1. Akutstudie: Messung der Telomeraseaktivität, telomer-stabilisierender Proteine und Seneszenzmarker nach einmaligem Trainingsreiz, a) nach Ausdauertraining und b) nach Krafttraining, im Cross-over Design.
2. SAUSE-Studie: Prospektive Untersuchung der differentiellen Effekte einer 6-monatigen Trainingsintervention mit 3 verschiedenen Sportarten auf a) diese Marker und b) die Telomerlänge in einer randomisierten, kontrollierten Trainingsstudie in einer gesunden Primärpräventionskohorte.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verwendete Chemikalien und Reagenzien

a-D(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH, Berlin
Bovines Serumalbumin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DNase I	PeqLab, Erlangen
DNase I, Typ II-s	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Endothelial basal medium	Gibco Life technologies, Carlsbad, Germany
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
FACS-Flow	BD Biosciences, Erembodegem-Aalst
FITC-PNA-Sonde	Cambridge Research Biochemicals, UK
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Formamid deionisiert	Carl Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HEK- Zellen	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Merck, Darmstadt
Isopropanolol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LDS 751	Exciton, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
PeqGOLD RNAPure	PeqLab, Erlangen
peqGOLD Universal-Agarose	PeqLab, Erlangen
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Waltham Massachusetts, USA
Recombinant RNAsin	Promega GmbH, Mannheim
RPMI1640 medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
TRAPeze 1x CHAPS Lysis Buffer	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
Tris- (hydroxymethyl) aminomethane	VWR International GmbH, Darmstadt
Türks Lösung	Merck, Darmstadt

3.1.2. Primer Real-Time PCR

Primer ACX	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
Primer TS	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
Primer TRF2:	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
fw 5'-TGT CTG TCG CGG ATT GAA GA- 3'	
rev 5'-GCT GGA AGG TCT CAT ATG AA- 3'	
Primer 18s:	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
fw 5'-TTG ATT AAG TCC CTG CCC TTT GT-3'	
rev 5'-CGA TCC GAG GGC CTC ACT A - 3'	
Primer P16:	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
fw 5'-TGC CTT TTC ACT GTG TTG GAG TT-3',	
rev 5'-GCA AGA AAT GCC CAC ATG AAT-3'	
Primer POT1	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
fw 5'- TGG GTA TTG TAC CCC TCC AA- 3'	
rev 5`- GAT GAA GCA TTC CAA CAA CGG - 3'	
Primer Ku70	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
fw 5'- GAG CAT CCA GTG TAT CCAA- 3'	
rev 5'- CAG CAT GAT CCT CTT ATG AC - 3'	
Primer iNOS	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
fw 5'-CTG GCA AGT GGG TGA AAG AT-3'	
rev 5`-GGG GAA CAG ACT GGG TGT TA-3'	
Primer Tel02	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

fw 5'-CGGTTTGGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3'

rev 5'- GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'

Primer 36b4

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

fw 5'- CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'

rev 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

3.1.3. Puffer und Lösungen

3.1.3.1. Allgemein verwendete Puffer

10x PBS 80g NaCl (1,37 M/l), 2g KCl (27 mM/l), 2,4g KH₂PO₄
(18 mM/l), 14,4g Na₂HPO₄ (101 mM/l), (pH 7,4; ad 1l mit
A. dest)

3.1.3.2. Puffer für Flow-Fish und Thymozytenisolation

Einfriermedium FKS, 10% DMSO
Äquilibrierungspuffer 2,5g α-D(+)-Glukose, 50mg BSA, 500µl 1M HEPES, (ad
50ml mit A. dest)
Hybridisierungspuffer 37,5ml Formamide, 1,0ml Tris 7,5, 0,5ml NaCl, 0,5ml
NaH₂PO₄ 7,4, 10,5ml A.dest.
Waschpuffer 1 37,5ml deionisiertes Formamid, 50mg BSA in 12ml ddH₂O
gelöst, 0,5ml 1M Tris (pH 7,1), 50µl Tween 20

3.1.3.3. Puffer für Real-time RCR und Vorarbeiten

Digest-Puffer 500ml RPMI, 25ml FCS, 5ml Heparin (10000U/ml), 1
Flasche (11mg) DNase I Typ II-s

3.1.4. Molekularbiologische Kits

LightCycler FastStart Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA Master Sybr Green I
High Capacity cDNA Reverse Life technologies, Foster City, USA

Transkription Kit

Qlamp DNA blood mini kit

TeloTAGGG Kit (Southern Blot)

FITC-PNA – Sonde

Quantum FITC-5 MESF Premix

Qiagen, Hilden

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Panagene, Daejeon, Korea, via Cambridge

Research Biochemicals, Cleveland, UK

Bangs Laboratorie, Fischer, IN, USA via

Polysciences, Eppelheim

3.1.5. Geräte und Zubehör

Allgemein:

Autoklav

Eppendorf Thermomixer Comfort

Fahrradergometer Innocor 500

Metamax II System

Heizblock

Kühlzentrifuge Centri Napco 2019R

Laborzentrifuge Sigma 1K15

Laufband Woodway ELG 70

Magnetrührer Combimac RCH

Janke und Kunkel

Seven compact S220 PH-Meter

Photometer

DU 730 Life Science Spectrophotometer

Pipetboy

Tischzentrifuge

Biofuge pico Heraeus

Mr. Frosty Freezing Container

Pulsuhr mit Brustgurt

Fitnessgeräte

- Rückenstreckung und Bauchpresse

- Kabelzug-Klimmzug

Tuttnauer Systec 3050EL

Eppendorf AG, Hamburg

Innovision, Dänemark

Cortex Biophysik, Leipzig

HCL Laborsysteme, Aschaffenburg

Thermo Fisher Scientific, Waltham

Massachusetts USA

Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode

Woodway GmbH, Weil am Rhein

IKA Labortechnik, Staufen

Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

INTEGRA Biosciences AG, Zizers (CH)

Thermo Fisher Scientific, Waltham

Massachusetts USA

Thermo Fisher Scientific, Braunschweig

Polar, Kempele, Finland

Dr. Wolff, Arnsberg

Gym 80 International, Gelsenkirchen

- Rudern sitzend	Gym 80 International, Gelsenkirchen
- Beinpresse sitzend	Gym 80 International, Gelsenkirchen
- Beinpresse sitzend	Gym 80 International, Gelsenkirchen
- Brustpresse sitzend und liegend	Gym 80 International, Gelsenkirchen
Vortexer VF2, Janke und Kunkel	IKA Labortechnik, Staufen
Vortex mixer VV3	VWR International GmbH, Darmstadt
Waagen	Acculab UK, Edgewood, NY
-VIC-Series 0.01g Precision Balances	
-ALC-Series 0.0001g Analytical Balances	

Verbrauchsmaterial

Eppendorf Reagiergefäß 0,5;1,5;2,0ml	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
CryoTube NUNC Nalgene	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA
15ml; 50ml Falcon	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Stabpipette 5;10;25ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
S-Monovette 10ml 9Natriumcitrat	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
S-Monovette 10ml Serum	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
S-Monovette 2,9ml EDTA	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
Transferpipetten	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
Photometer Küvetten	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
Cell-Strainer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Zellisolation

Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Sterilbank Safe 2020 (Klasse II)	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts US

TRAP Assay

LightCycler-System	Roche, Mannheim
Glaskapillaren	Roche, Mannheim

Real- Time PCR

Nano Drop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA
----------------	--

PCR Eppis	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
96 well reaction Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA
96 well reaction Plate- Folie	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA
StepONEPlus Real Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham Massachusetts USA
Elektrische Pipette + Spitzen	BRAND GmbH, Wertheim

FLOW Fish und Durchflusszytometrie

FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
--------------	------------------------------

Southern Blot

Fusion SL Workstation	Peqlab, Erlangen
-----------------------	------------------

Laktatbestimmung

Super GL	Greiner, Flacht
----------	-----------------

3.1.6. Software

Image Studio Light 4	LI-COR Biotechnology, Lincoln USA
Light-Cycler 3 Frontscreen	Roche, Mannheim
StepOne Software	Applied Biosystems, Waltham Massachusetts USA
Cell Quest Pro (Facs)	BD Biosciences, Erembodegem-Aalst
FusionCapt Software 16.09	Peqlab, Erlangen
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
IBM SPSS Statistics 20.0	IBM Corporation, Armonk, New York, USA
GraphPad Prism	San Diego, Kalifornien, USA

3.2. Methoden

3.2.1. Studiendesign der Akutstudie

Um die akuten Effekte körperlicher Aktivität auf Telomere und Zellalterung zu untersuchen, absolvierten 15 gesunde, mäßig sportliche Probanden im Alter zwischen 23 und 27 Jahren in einem Cross-over-Design jeweils einen Laufversuch und ein Krafttraining mit venösen Blutentnahmen vor, nach und 24h nach dem Training. Die Trainingseinheiten waren mindestens 48 Stunden getrennt. Im Vorfeld wurden alle Probanden im Rahmen einer Anamnese, einer körperlichen Untersuchung, einer Spiroergometrie und mittels Ruhe-EKG auf ihre Leistungsfähigkeit und Gesundheit geprüft. Während des spiroergometrischen Belastungstests auf dem Fahrradergometer absolvierte man nach 4-minütiger Aufwärmphase (2min sitzen, 2min treten ohne Widerstand) ein Rampen-Protokoll mit Steigerungsschritten von 30 Watt pro 2 Minuten, bis die ventilatorische Ausbelastung erreicht war. Mittels der Spiroergometrie wurden der maximale Puls unter Belastung und die Herzfrequenzreserve bestimmt. Alle Probanden nahmen keine regelmäßigen Medikamente ein und waren Nichtraucher. Vor den Trainingseinheiten waren die Probanden mindestens 24 h nicht sportlich aktiv. Die schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie wurde eingeholt.

Während des Laufversuchs waren die Probanden angehalten für 45 min im Stadion zügig auf ebener Strecke Runden zu laufen. Die Zielherzfrequenz sollte bei 70% der maximalen Herzfrequenzreserve liegen. Zu diesem Zweck wurde die Herzfrequenz mittels eines Brustgurtes mit Speicherfunktion überwacht und aufgezeichnet. Die venösen Blutentnahmen fanden unmittelbar vor dem Start und unmittelbar nach Beendigung des Laufens statt. Bis zur nächsten Blutentnahme 24h nach der Trainingseinheit waren die Probanden nicht sportlich aktiv.

Das Krafttraining wurde an acht im Vorfeld definierten Geräten im Fitnessstudio durchgeführt, um alle großen Muskelgruppen abzudecken. Hierzu zählten folgende Übungen: Rückenstreckung, Bauchpresse, Kabelzug-Klimmzug, sitzend Rudern, sitzende Beinpresse, sitzende Beinstreckung, sitzende und liegende Brustpresse. Im Rahmen eines Probetrainings bestimmten die Probanden an einem Termin im Vorfeld für jedes Gerät ihr individuelles 20-Wiederholungs-Maximum. Beim Akutversuch selbst wurden 2 Sätze mit je 15 Wiederholungen in Höhe dieses Gewichts pro Gerät

durchgeführt. Das Gesamtgewicht der bewegten Gewichte wurde berechnet. Analog zum Laufversuch fand die Blutentnahme wieder direkt vor, unmittelbar im Anschluss an das Training und 24h danach statt, um dann im Anschluss an die Blutentnahme die Ficoll-Isolation wie unten beschrieben durchzuführen.

3.2.2. Studiendesign der prospektiven Trainingsstudie

3.2.2.1. Probandenrekrutierung

In Zusammenarbeit des Instituts für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes in Saarbrücken (Prof. Dr. med. T. Meyer) und der Klinik für Innere Medizin III – Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin des Universitätsklinikums (Prof. Dr. med. M Böhm) wurde eine prospektive, kontrollierte, randomisierte Studie mit einer Studiendauer von 26 Wochen durchgeführt, um die Langzeiteffekte verschiedener Trainingsarten auf die Zellalterung zu untersuchen. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes freigegeben (148/10) und bei clinicaltrials.gov registriert (NCT01263522). Schriftliches Einverständnis war Voraussetzung vor Teilnahme an der Studie und die Namen der Probanden wurden pseudonymisiert.

Es wurden durch das Saarbrücker Institut insgesamt 1534 Freiwillige gescreent (**Abbildung 5**). Von diesen wurde nach strukturierten telefonischen Befragungen 366 passende Probanden zu einem Vorstellungstermin eingeladen, bei denen eine körperliche Untersuchung, ein Ruhe-EKG und eine Blutentnahme stattfanden, um allgemeine Gesundheitsdaten zu erhalten und mögliche Ausschlussgründe zu evaluieren. Die Einschlusskriterien wurden so gewählt, dass die Probanden dem typischen Teilnehmer eines Sportprogramms im Rahmen der Primärprävention entsprachen. Konkret wurden Personen zwischen 30 und 60 Jahren mit einem $BMI < 30 \text{ kg/m}^2$, einer körperlichen Aktivität von weniger als 1h Sport pro Woche und einer $VO_2\text{max} < 45 \text{ ml/kg/min}$ eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren aktiver Zigarettenkonsum (oder Rauchstopp innerhalb der letzten 12 Monate), bekannte KHK, kardiovaskuläre Risikofaktoren, die eine Dauermedikation bedingen, und jedwede Umstände, die die Bewältigung des Trainingsprotokolls behindert hätten.

Diesen Kriterien entsprachen 266 Probanden, welche in 4 Gruppen randomisiert

wurden. Neben der Kontrollgruppe gab es eine aerobe Ausdauergruppe, eine Intervalltrainingsgruppe und eine Krafttrainingsgruppe. Die Zuteilung geschah mithilfe eines adaptiven Randomisierungsprotokolls, d.h. die Kriterien Geschlecht und maximale Sauerstoffaufnahmekapazität ($VO_2\text{max}$) wurden als Schichtungsparameter herangezogen. Die $VO_2\text{max}$ wiederum wurde nochmals in 3 Gruppen eingeteilt ($<30\text{ml/kg/min}$; $30\text{-}40\text{ml/kg/min}$; $>40\text{ml/kg/min}$). Durch diese Form der Randomisierung wurden Geschlechter und verschiedene Level von körperlicher Fitness möglichst gleichmäßig auf die Gruppen verteilt. Während des sechsmonatigen Studienzeitraums gab es 119 Studienabbrecher; hauptsächlich aufgrund mangelnder Compliance (Compliance $<70\%$) zum Studienprotokoll oder orthopädischen Problemen. 23 Probanden mussten aufgrund insuffizienter Probenqualität bzw. fehlender Ausbelastung in einer der beiden Spiroergometrien ($RQ < 1,0$) von der Analyse ausgeschlossen werden, sodass letztendlich 124 Probanden in die molekularbiologische Auswertung der Studienergebnisse, die die Grundlage dieser Dissertationsarbeit ist, eingeschleust werden konnten. Davon gehörten 35 der Kontrollgruppe an, 26 der aeroben Ausdauergruppe, 29 der Intervalltrainingsgruppe und 34 der Krafttrainingsgruppe. Bei allen Probanden wurde vor Beginn der Studie mithilfe einer Spiroergometrie nach unten genanntem Protokoll eine Bestimmung der körperlichen Leistungsfähigkeit durchgeführt. Von der Blutentnahme wurden, mononukleäre Zellen isoliert und direkt verarbeitet, wie unten beschrieben, oder bei -80°C eingefroren. Serum und Urin wurden ebenfalls asserviert. Diese wurde nach Beendigung des sechsmonatigen Studienzeitraums wiederholt, ebenso wie die Blutentnahme bei Studienbeginn.

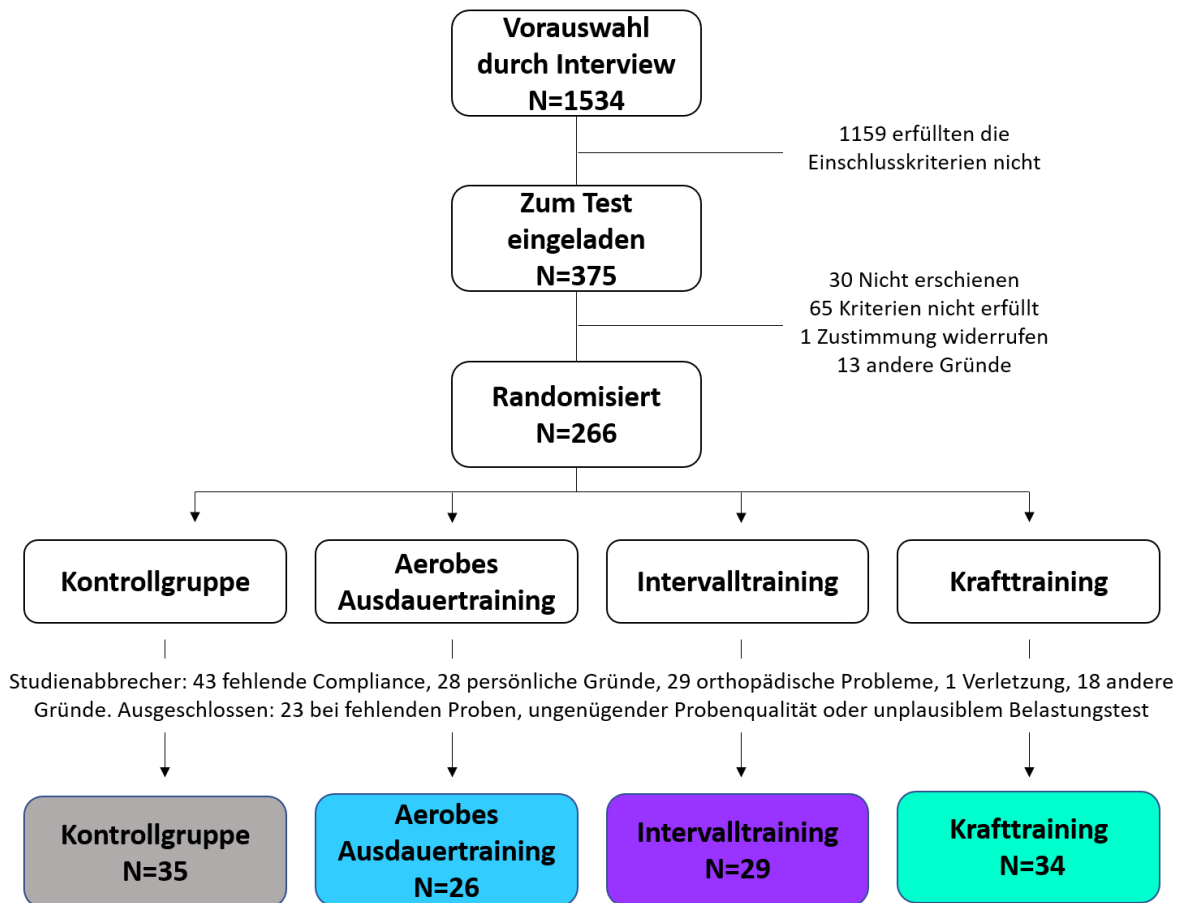


Abb.5: Studiendesign der prospektiven SAUSE-Trainingsstudie. Nach Randomisierung von 266 geeigneten Probanden in die vier Beobachtungsgruppen konnten nach dem 6-monatigen Studienzeitraum Daten von insgesamt 124 Probanden molekularbiologisch ausgewertet werden.

3.2.2.2. Erhebung der Fitnessdaten

Die Spiroergometrie wurde auf einem motorbetriebenen Laufband durch das durchgeführt. Mit dem Ziel der Ermittlung der submaximalen Herzfrequenzkurven wurde zu Beginn eine schrittweise Belastungserhöhung gewählt. In Abschnitten von 3 Minuten wurde die Geschwindigkeit um 1km/h erhöht. Die Ausgangsgeschwindigkeit wurde nach individuellen Kriterien (BMI, Geschlecht, Alter) zwischen drei und sieben Kilometer pro Stunde gewählt. Die Steigung betrug durchgängig 0,5 Grad. Nach jedem 3-minütigen Abschnitt wurde in einer Pause von 30 Sekunden Kapillarblut aus dem Ohrläppchen zur Laktatbestimmung entnommen. Um die Testdauer für eine optimale Bestimmung der VO_2max nicht zu überschreiten, wurde im Anschluss an die schrittweise Belastungserhöhung eine stufenweise Erhöhung der Geschwindigkeit (0,8km/h/min) gewählt. Die Geschwindigkeitserhöhung fand hier kontinuierlich bis zur

Erschöpfung statt. Als objektive Kriterien für eine maximale Ausbelastung wurden folgende Kriterien angesehen: Maximale Herzfrequenz ($\geq 200 - \text{Lebensalter}$), Blut-Laktatkonzentration $>8\text{mmol/l}$ und ein respiratorischer Quotient $>1,1$. Zwei dieser drei Faktoren mussten erfüllt werden, um den Ausbelastungskriterien zu entsprechen. Das individuelle Protokoll eines jeden Probanden war zu Beginn und Ende der Studie identisch. Zur Bestimmung der Laktatkonzentration wurde kapilläres Blut aus einem hyperämisierten Ohrläppchen in der Belastungspause und 2 Minuten nach Beendigung der Belastung entnommen. Sofort im Anschluss wurden die Proben hämolysiert und mithilfe eines enzymatisch-amperometrischen Systems bestimmt. Die den Test durchführenden Ärzte waren verblindet.

3.2.2.3. Indirekte Kalorimetrie

Die basale Stoffwechselrate wurde bei den Probanden der Kontrollgruppe und der Krafttrainingsgruppe jeweils zu Beginn und nach Beendigung der Studie mittels indirekter Kalorimetrie bestimmt. Die Messungen fanden immer morgens nach nächtlichem, 12-stündigen Fasten in einem dunklen Raum statt, wobei die Probanden angehalten waren, für 30 Minuten in flachliegender Position zu ruhen, jedoch nicht einzuschlafen. Mit einem tragbaren Stoffwechselanalysegerät (Metamax II System) wurde für diesen Zeitraum kontinuierlich die Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidabgabe bestimmt. Als Maß für den Grundumsatz wurde aus den erhobenen Messwerten der respiratorische Quotient unter Ruhebedingungen berechnet.

3.2.2.4. Kontrollgruppe und Trainingsgruppen

Die Teilnehmer der Kontrollgruppe wurden angehalten ihren inaktiven Lebensstil und ihre natürliche Ernährung über 6 Monate unverändert beizubehalten. Durch regelmäßigen telefonischen Kontakt wurde in dieser Gruppe die Compliance sichergestellt.

In den drei Interventionsgruppen wurden über den gesamten Studienzeitraum von 26 Wochen drei Trainingseinheiten pro Woche durchgeführt. Die minimale Trainings-

Compliance um in die Auswertung aufgenommen zu werden, wurde bei 70% (55 durchgeführte Trainingseinheiten) definiert. Um das Training zu steuern und gleichzeitig auch die Compliance kontrollieren zu können, wurde jeder Proband mit einer individuell programmierten Pulsuhr mit Speicherfunktion und einem Herzfrequenzsensor ausgestattet. Mindestens eine Trainingseinheit pro Woche fand unter Aufsicht eines Betreuers statt, wobei die gespeicherten Daten der Uhr jeweils ausgelesen und kontrolliert wurden.

Das aerobe Ausdauertraining bestand aus Laufeinheiten von 45 Minuten bei 60% der Herzfrequenzreserve. Die Trainingsherzfrequenz wurde mithilfe der ermittelten Parameter bei der eingangs durchgeführten Leistungsdiagnostik und der Karvonen-Formel folgendermaßen ermittelt werden: Trainingsherzfrequenz: $0,6 \times (\text{Maximalpuls} - \text{Ruhepuls}) + \text{Ruhepuls}$ [39].

Das Krafttraining fand ebenfalls dreimal wöchentlich für 45 Minuten statt. Alle Teilnehmer trainierten an der Deutschen Hochschule für Prävention und Gesundheitsmanagement Saarbrücken unter Aufsicht.

Bestandteil des Krafttrainings waren 8 maschinengebundene Übungen. Dazu gehörten: Rückenstreckung und Bauchpresse, Kabelzug-Klimmzug, sitzend Rudern, sitzende Beinpresse, sitzende Beinstreckung, sitzende und liegende Brustpresse. Um die Trainingsintensität passend und vergleichbar zu gestalten, wurde bereits an einem Termin vor dem Studienbeginn das individuelle 20-Wiederholungs-Maximum (20 RM) für jedes Gerät bestimmt. Während der Studie selbst wurden an jedem Gerät 2 Sätze mit 15 Wiederholungen mit dem Gewicht des 20 RM durchgeführt.

Wie die anderen beiden Gruppen auch, absolvierte die Intervalltrainingsgruppe ihr Trainingsprogramm ebenfalls dreimal wöchentlich für 45 Minuten. Die Probanden absolvierten in jedem Training ein von Hoff und Helgerud vorbeschriebenes „4x4 High Intensity“ Protokoll (Hoff und Helgerud, 2004). Wie auch in der aeroben Ausdauergruppe waren alle Probanden mit Pulsuhr und Herzfrequenzsensor ausgestattet. Die 10-minütige Aufwärmphase sollte aus einem lockeren Steigerungslauf bis zu einer Zielherzfrequenz von 60-75% der Herzfrequenzreserve bestehen. Dem schlossen sich vier 4-minütige Belastungen bei 80-90% der Herzfrequenzreserve an. Zwischen den Belastungen wurde - bei 65-70% der Herzfrequenzreserve - für jeweils drei Minuten langsam gejoggt. Am Ende des Programms stand eine 10-minütige Auslaufphase bei 60-70% der Herzfrequenzreserve. Auch hier wurde mindestens ein Training pro Woche unter

Aufsicht durch Studienpersonal durchgeführt, wobei die gespeicherten Daten der anderen Trainingseinheiten kontrolliert wurden.

Nach Beendigung des sechsmonatigen Trainingszeitraums wurden die Probanden aller vier Gruppen zu einem Abschlusstest in das Institut für Sport- und Präventivmedizin Saarbrücken eingeladen. Der Abschlusstest fand im Zeitraum von mindestens zwei bis maximal sieben Tagen nach der letzten Trainingseinheit statt. Dies diente dazu, mögliche Akuteffekte oder einen bereits einsetzenden Abbau des Leistungsniveaus zu vermeiden. Im Rahmen dieses Termins fand eine venöse Blutentnahme zur Bestimmung von Basisdaten, zur Serum- / Uringewinnung und zur Isolation von mononukleären Zellen statt. Im Anschluss absolvierten die Probanden wie im Eingangstest auch eine Belastungsspiroergometrie auf dem Laufband.

3.2.3. Isolation der mononukleären Zellen

Den Teilnehmern der Akutstudie wurde zu drei Zeitpunkten (vor, direkt nach, 24h nach Training) 20ml venöses Blut in Citratröhrchen abgenommen, den Teilnehmern der prospektiven Trainingsstudie zu zwei Zeitpunkten 40ml, nämlich vor Beginn und nach Ende der Studie. Die Isolation der mononukleären Zellen erfolgte stets steril unter Zellkulturbedingungen. Es wurden durchweg sterile Einmalartikel oder autoklavierte Instrumente benutzt.

Um die peripheren mononukleären Zellen zu isolieren, wurde die Methode der Ficoll-Isolation verwendet (**Abbildung 6**). Diese beruht auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Durch die Verwendung eines weitverzweigten Zuckerpolymeres wird eine Separationslösung höherer Dichte als Wasser eingesetzt. Das macht die Auftrennung verschiedener Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte möglich. Zunächst wurden 20ml Citratblut in ein 50ml Falcon überführt und bis zu einem Volumen von 35ml mit 1xPBS steril aufgefüllt. In einen zweiten Falcon wurden 15ml Biocoll Separating Solution vorgelegt und im Anschluss vorsichtig mit dem Blut-PBS- Gemisch überschichtet. Nach Zentrifugation bei 2200 rpm für 20min bei Raumtemperatur ohne Bremse konnten vier verschiedene Phasen unterschieden werden. In der oberen Interphase befanden sich die mononukleären Zellen, die vorsichtig abpipettiert und in ein neues Falcon überführt wurden. Die Zellsuspension wurde dann mit 1xPBS steril auf 50ml aufgefüllt. Nach einer weiteren 10-minütigen

Zentrifugation bei 2200rpm mit Bremse konnte deutlich ein Zellpellet abgegrenzt werden. Der Überstand wurde abgegossen, während die mononukleären Zellen in 30ml 1xPBS steril resuspendiert wurden. Dem schloss sich eine erneute 10-minütige Zentrifugation bei 2200rpm an zum Waschen der Pellets an. Der Überstand wurde verworfen. Bei der Akutstudie wurde das Pellet nun in 2ml 1xPBS steril resuspendiert und die Zellzahl mithilfe der Neubauer- Zählkammer bestimmt. Dann wurden die Zellen für die verschiedenen Assays aufgeteilt (Telomerase, RNA-Isolation, Reserve) und entsprechend weiterverarbeitet). Das Zellpellet der Probanden der prospektiven Trainingsstudie wurden nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 4ml Gefriermedium resuspendiert, auf Kryotubes verteilt und schonend in einem Gefrierschrank bei -80°C eingefroren und nach der Studie tiefgekühlt in das molekularbiologische Labor nach Homburg transferiert. Zur Weiterverarbeitung wurden alle Proben einer Interventionsgruppe zur selben Zeit aufgetaut. Durch Transfer der gefrorenen Zellen in 9ml EBM wurden die zytotoxischen Effekte des Dimethylsulfoxids gehemmt. Nach Zentrifugation wurden auch die Zellen dann wie bei der Akutstudie auch in 2ml 1xPBS steril resuspendiert und vor der weiteren Verarbeitung (Telomerase, RNA-Isolation, DNA-Isolation, Telomerlänge, Reserve) in der Neubauer- Zählkammer gezählt.

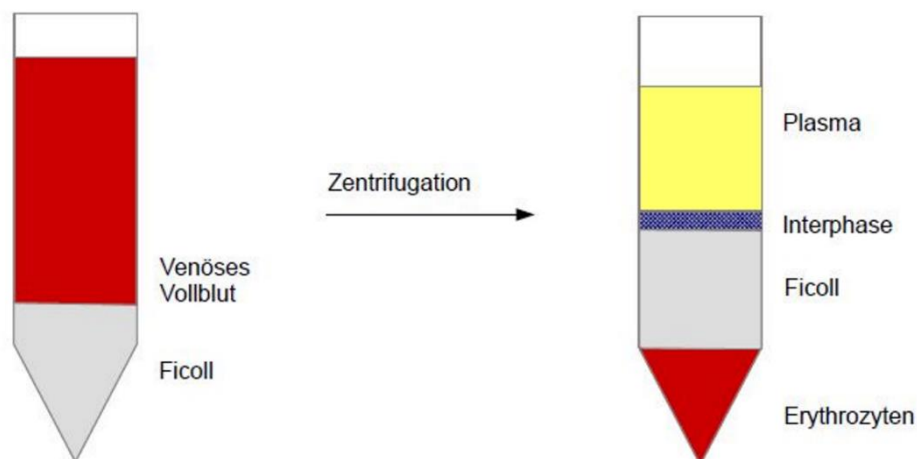


Abb.6: Ficoll-Isolation mononukleärer Zellen (MNC): Nach Zentrifugation mit der Ficoll-Separationslösung ordnen sich die verschiedenen Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte in verschiedenen Phasen an. Dem vorsichtigen Abpipettieren der Interphase, die die MNC enthält, schließen sich mehrere Waschschrte an.

3.2.3.1. Zellzahlbestimmung

Um die Zahl der isolierten mononukleären Zellen zu bestimmen, wurden diese mithilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Vor der Zellzählung wurde die Zell-Lösung 1:20 verdünnt. 50µl der Türks Lösung zur Leukozytenzählung wurden hierfür mit 45µl 1xPBS steril und 5µl Zell-Lösung versetzt. Von diesem Gemisch wurden 10µl in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Auf dem Grund der Zählkammer ist ein quadratisches Feld von 3mm Kantenlänge und einer Tiefe von 0,1mm eingraviert. Dieses Quadrat unterteilt sich wiederum in 4 äußere Kleinquadrate der Kantenlänge 1mm, die von einem gitterförmigen Netz, den so genannten Thomalinien getrennt werden. Der Umstand, dass in der Kammer nur ein genau definiertes Volumen pro Quadrat ausgezählt werden kann, lässt einen auf eine Zellkonzentration der Gesamtsuspension schließen. In diesem Fall wurden die Zellen in den 4 äußeren Eckquadraten inklusive der äußeren Begrenzungslinien und exklusive der inneren Begrenzungslinie gezählt. Folgende Formel wurde verwendet, um auf die Gesamtzellkonzentration zu schließen: $\text{Zellen/ml} = (20 \times 10^4 \times \text{Gesamtzellzahl}) / 4$. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zur weiteren Verarbeitung auf 3 Portionen aufgeteilt. Für die CHAPS Isolation und den TRAP Assay wurden 10^5 Zellen benutzt, zur RNA-Isolation und anschließenden Experimenten 10^7 Zellen. Der Rest der Zellsuspension wurde in Kryotubes für die Flow FISH Analyse bzw. Reserve bei -80°C asserviert.

3.2.4. Real-Time PCR und Vorarbeiten

3.2.4.1. RNA-Isolation

Ein Zellisolat von 10^7 Zellen wurde in 1ml RNA PureGOLD lysiert und bei -80°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet. Hierfür wurde der Zellsuspension unter besonderen Schutzmaßnahmen (Abzug) 300µl Chloroform beigegeben und gründlich, bis zur Trübung der Suspension gemischt. Dies diente der Denaturierung der Proteine. Im Anschluss wurde diese Suspension für 30min bei 14000rpm bei 4°C zentrifugiert, wodurch sich 3 verschiedene Phasen ausbildeten. Davon wurde die wässrige, die Nukleinsäuren beinhaltende Oberphase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß

überführt und mit 400µl eisgekühltem Isopropanol versetzt. Zur Optimierung der RNA-Ausfällung wurden die Proben dann über Nacht bei -20°C gelagert. Am Folgetag wurden die Proben zunächst für 60min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und auf das weiße Pellet wurden 800 µl 70% Ethanol gegeben. Nach 15 min Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4°C wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet für ca. 30 min unter dem Abzug bei Raumtemperatur trocknen gelassen, bevor es in 30 µl DEPC-Wasser gründlich resuspendiert wurde. Zum Abschluss der RNA-Isolation wurde die Suspension für 5min bei 65°C in einem Heizblock erhitzt. Die RNA-Isolate konnten dann bei -80°C gelagert werden.

3.2.4.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde mithilfe eines Spektralphotometers bei 260nm und 280nm bestimmt. Mithilfe des 260/280nm Quotienten konnte der Reinheitsgrad der isolierten RNA beurteilt werden.

3.2.4.3. DNase Verdau

Um residuelle genomische DNA zu entfernen, fand im Anschluss an die RNA-Isolation ein DNase-Verdau statt. Hierfür wurden 2µg der isolierten RNA mit Aqua ad injectabilia auf 10µl Volumen aufgefüllt. Dem wurden 10µl des Mastermix für den DNase Verdau zugefügt. Pro Probe wurden für diesen 5,75µl Aqua ad iniectionabilia, 2µl Digest Buffer, 0,25µl RNasin und 2µl DNase I verwendet. Im Anschluss wurden die Proben im Thermocycler für 30min bei 37°C inkubiert und für 10min auf 75°C erhitzt. Die Proben wurden im Anschluss bei -80°C aufbewahrt.

3.2.4.4. Reverse Transkription

1µg der aufgereinigten RNA wurde mithilfe des HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kits in einem peqSTAR 96X Thermal Cycler system in cDNA

umgeschrieben. Hierfür wurden 10µl, also 1µg der RNA mit 10µl Mastermix versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für fünf Minuten auf 93°C erhitzt um die reverse Transkriptase zu inaktivieren.

3.2.4.5. Real-Time PCR

Die Real-time PCR ist ein quantitatives Verfahren und ist damit eine Weiterentwicklung der rein qualitativen PCR, die erstmals von Mullis beschrieben wurde [58]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet um die Reaktionsprodukte zu quantifizieren. Dieser bindet an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA, wodurch die Fluoreszenz messbar wird. Die Zunahme der Fluoreszenz ist proportional zur Menge doppelsträngiger DNA und lässt somit eine quantitative Aussage zu. Für die Reaktion wurde das Kit Power SYBR® Green PCR Master Mix und ein StepOnePlus™ Real-Time PCR System verwendet. Die 96 well Mikrotiterplatte wurde mit einem Reaktionsvolumen von 20µl befüllt. Dieses setzte sich aus 3µl aufgereinigter cDNA und 17µl Mastermix zusammen. Der Mastermix beinhaltete pro Probe folgende Bestandteile: 7µl SYBR Green, Primer fw 0,5µl, Primer rev 0,5µl, PCR H₂O 9µl. Es wurden die o.g. Primer verwendet. Je nach der zu amplifizierenden Zielsequenz wurde die cDNA vor dem Assay mit sterilem Wasser verdünnt (18s:1/100; TRF2:1/40; Ku70:1/40; p16:1/10; POT1:1/40; iNOS: 1:20). 18s stellte bei jedem Lauf das gleichmäßig exprimierte „housekeeping“ Gen dar. Die einzelnen Schritte der Polymerasekettenreaktion waren folgende: Zunächst wurde die cDNA durch Erhitzen auf 95°C für 10min denaturiert. Im Anschluss folgten 40 Zyklen, die aus einem Denaturierungsschritt (15s bei 95°C) und einem Annealing- bzw. Elongationsschritt von 1min bei 60°C bestand. Mithilfe einer Verdünnungsreihe gepoolter cDNA von 10 Proben wurde eine Real-Time PCR Standardkurve erstellt, um die Effektivität der PCR-Reaktion zu prüfen und die relative Expression der mRNA-Konzentration in jeder Probe zu bestimmen. Bei jeder Messung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, wobei der Variabilitätskoeffizient innerhalb eines Reaktionslaufs unter 5 Prozent liegen musste.

3.2.5. Messung der Telomeraseaktivität

Die Telomeraseaktivität wurde mittels eines quantitativen TRAP-Assay gemessen [40,84,85]. Hier werden zunächst die zellulären Proteine (inklusive der Telomerase) in 1xCHAPS Lysepuffer isoliert. In einem ersten Schritt synthetisiert die probeneigene Telomerase Telomersequenzen an den zugegebenen TS-Primer, welcher ein künstliches Telomerfragment darstellt. Direkt im Anschluss erfolgte die Hitzeinaktivierung der Telomerase und die Amplifikation mithilfe des telomer-spezifischen CX-Primers. Eine Quantifizierung war durch Verwendung von SYBR-Green als Fluoreszenzfarbstoff möglich. Der gesamte Reaktionszyklus (enzymatische Reaktion und PCR) erfolgte in einem geschlossenen Glaskapillarsystem, welches für die Durchführung der PCR mit Hilfe des LightCycler 3 Instruments (Roche) verwendet wurde.

3.2.5.1. CHAPS-Isolation

Zur Verwendung kam ein Zellisolat von 10^5 Mononukleären Zellen. Diese wurden in 49µl TRAPeze 1xCHAPS Lysepuffer suspendiert, im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei 4°C für 30 Minuten und eine Zentrifugation bei 4°C mit 4000rpm für 20 Minuten. Danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, mit 1µl RNAsin versehen und bis zur Durchführung der Assays bei -20°C gelagert.

3.2.5.2. TRAP-Assay

Das Lysat wurde standardmäßig mit 10,6µl PCR-Wasser, 2µl Primermischung (1µl TS und 1µl ACX), 0,4µl MgCl₂ und 2µl Fast Start SYBR Green PCR Master Mix pro Probe versetzt. Als Positivkontrolle dienten Human Embryonic Kidney Zellen (HEK) mit bekannt hoher Telomeraseaktivität. Für die ganze Studie wurden eingefrorene HEK-Zellaliquots aus einer Isolation benutzt. Als Negativkontrolle diente TRAPeze 1xCHAPS Lysepuffer. Das Gemisch wurde in Glaskapillaren überführt und mit Hilfe gekühlter (-20°C) Zentrifugeneinsätze 10s bei 1000rpm zentrifugiert, um die Probe in den unteren Teil der Kapillare zu bringen und anschließend für exakt 30 Minuten bei

30°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte mithilfe des TS-Primers die Elongation durch die Telomerase. Nach Einsetzen der Kapillaren in den LightCycler wurden in einem ersten Heizschritt bei 90°C für eine Dauer von 10 Minuten die Telomerase inaktiviert und gleichzeitig die im Master-Mix enthaltene hitzestabile DNA-Polymerase aktiviert. Im Anschluss erfolgte eine PCR mit 40 Zyklen (jeweils 20 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 60°C und 50 Sekunden bei 72°C). Um die Linearität des Tests zu überprüfen, wurde eine 10-Punkt Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe von 2500 HEK293-Zellen bis 5 HEK293-Zellen ($R^2 = 0,99$) ermittelt (**Abbildung 7**). Der Trap-Assay wurde als positiv erachtet, wenn die Telomeraseaktivität 2-fach über der Standardabweichung der Aktivität der Negativkontrolle lag. Um das Risiko systematischer Fehler zu reduzieren, waren in jedem Lauf Proben aller Studiengruppen vorhanden. Dies gilt sowohl für die Akut- als auch für die Langzeitstudie.

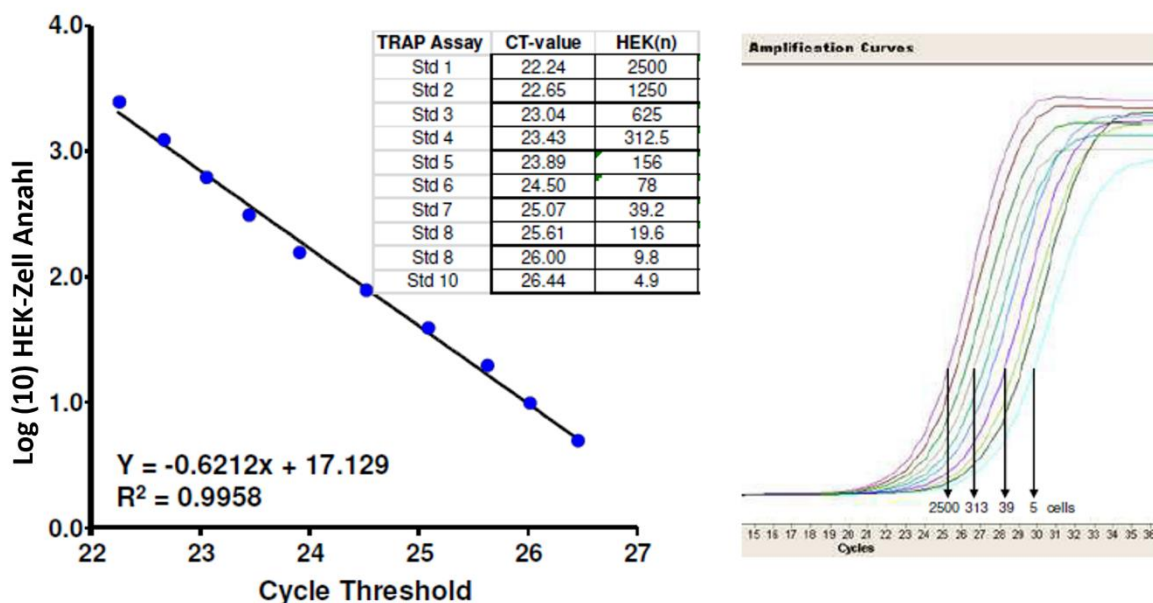


Abb.7: Human Embryonic Kidney (HEK) 293 Tumorzellen dienten im TRAP-Assay als Positivkontrolle. Die Telomeraseaktivität der Proben wurde verglichen mit einer 10-Punkt-Standardkurve, die aus einer Verdünnung von 2500-5 HEK Zellen ermittelt wurde.

3.2.6. Telomerlängenmessung mittels Flow-FISH

Zur Bestimmung der Telomerlänge wurde unter anderem die Flow-FISH Methode eingesetzt [6,85]. Hier wird die Methode der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)

mit der Durchflusszytometrie kombiniert. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Zellen in Suspension auf der Grundlage ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. In Kombination erlauben die FISH und die Durchflusszytometrie Aussagen über die Telomerlänge in spezifischen Zellpopulationen. Zur Hybridisierung wurde eine mit Fluoreszein-Isothiocyanat (grün fluoreszierend) markierte Peptid-Nukleinsäure-Probe verwendet, deren Sequenz spezifisch für Telomer-Repeats ist. Im Gegensatz zu konventionellen DNA-Sonden bietet diese den Vorteil, stärker und spezifischer an die im Rahmen des Protokolls denaturierten DNA-Einzelstränge zu binden (Egholm et al., 1993).

3.2.6.1. Thymozytenisolation

Um einen internen Standard bei der Telomerlängenmessung mittels Flow-Fish zu generieren, wurden wie von Baerlocher et al. vorgeschlagen Thymozyten aus dem Thymus eines Kalbs (Schlachthof Färber, Zweibrücken) isoliert, da diese anhand Größe und Granularität gut von menschlichen Lymphozyten unterschieden werden können. Nach Entfernen des Fett- und Bindegewebes wurde der Thymus unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur in ca. 5x5mm kleine Stücke geschnitten. Diese Stücke wurden in eine Zellkulturschale mit 20ml Digest-Buffer gegeben. Mittels einer abgeknickten Kanüle oder eines Skalpells wurde die Organkapsel ausgeschabt. Größere Gewebebrocken und die Organkapsel selbst wurden verworfen. Um die Suspension zu homogenisieren, wurde diese mehrfach durch eine Spritze mit aufgesetzter Kanüle gespült, bis unter mikroskopischer Kontrolle keine Zellklumpen mehr vorlagen. Auf diese Art und Weise wurden 12 Falcons vorbereitet und bei 450g für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 15ml PBS+DNAse resuspendiert und im Anschluss mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Dies ließ man für ein bis zwei Minuten sedimentieren. Danach wurde der Überstand aller Falcons gesammelt und das entsprechende Volumen 0,2% Formaldehyd in PBS dazugegeben und für 10 Minuten sanft geschüttelt. Zur Zentrifugation mit 450g für 10min bei 4°C wurde die Lösung wieder auf 50ml Falcons aufgeteilt. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 50ml kalten 1xPBS resuspendiert, bevor nochmals für 10 min bei 4°C und 450g zentrifugiert wurde. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das nun weiße Pellet in 10ml kalten 1xPBS resuspendiert und die

Zellsuspension aller Falcons gesammelt. Es wurde ein Aliquot zur Zellzählung mittels der Neubauer-Zählkammer (s.o.) entnommen. Ziel-Zellkonzentration war $3 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter. Die Zellsuspension wurde mit 1xPBS entsprechend verdünnt, um diese Konzentration zu erreichen, und bei -80°C gelagert.

3.2.6.2. Vorbereitung der Zellen

Nach vorsichtigem Auftauen und Zählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer, wie im Vorfeld beschrieben, wurden 10^6 MNC der Studienteilnehmer der SAUSE-Studie in 1ml Flow-FISH Gefrier-Medium (pures FKS mit 10% DMSO) bis zum endgültigen Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

Zunächst wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und sofort im Anschluss mit 9ml RPMI-1640-Medium + 10% FKS in einem 15ml Falcon aufgefüllt. Als interne Referenz wurden 10^5 Rinderthymozyten zugegeben (s.o.). Diese können im FACS-Gerät einfach von menschlichen Zellen anhand Größe und Granularität unterschieden werden und dienen als interner Standard zum Vergleich der Proben. Die Suspension wurde 7 Minuten bei 1300rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 500 μl Äquilibrierungspuffer (pro 50ml Aqua dest. 2,5g a-D(+) Glucose, 500 μl 1M HEPES, 50mg BSA) resuspendiert, in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und nochmals für 7 Minuten bei 900g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sorgfältig und vollständig abpipettiert.

3.2.6.3. DNA-Denaturierung und Hybridisierung

Die Zellen wurden anschließend in 600 μl Hybridisierungspuffer (10mM Natriumhydrogenphosphat, pH 7,4, 10mM Natriumchlorid, 20mM Tris, pH 7,5 und 70% Formamid in Aqua dest.) vorsichtig resuspendiert, ohne Luftblasen zu generieren. Die Lösung wurde 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde die telomer-spezifische FITC-PNA (FITC-PNA, Panagene, Daejeon, Korea, via Cambridge Research Biochemicals, Cleveland, UK; Sequence: FITC-OO-CCCTAA-CCCTAA-CCCTAA) Sonde frisch vorbereitet (lichtgeschützt). Bei Lieferung war die Probe (MW 5408g/M) durch Zugabe von 54 μl Aqua dest. auf eine Konzentration von

0,1nM/L verdünnt worden und als Vorratslösung bei 4°C bis zur Verwendung gelagert worden. Beim Gebrauch wurde die Vorratslösung zunächst auf 65°C im Heizblock erhitzt, das benötigte Volumen entnommen und 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt. Pro Probe wurden 7µl (0,34µg) Telomer-PNA Lösung verwendet. Im Anschluss an die Inkubation im Hybridisierungspuffer wurden die Zellen 12min im 85°C heißen Wasserbad erhitzt, um eine Permeabilisierung zu erzielen, dann wurden die Proben mit der Sonde vermischt und für 2 Sekunden maschinell geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die Proben in einer Dunkelkammer für 90min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Anlagerung der komplementären Telo-PNA an die DNA.

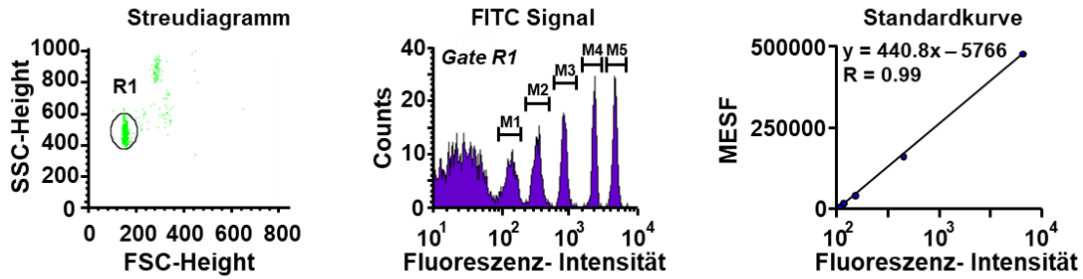
3.2.6.4. Waschschritte und DNA-Gegenfärbung

Um die nicht gebundene Telo-PNA zu entfernen, wurden die Proben drei Waschschritten unterzogen. Im ersten Schritt erfolgte die Zugabe von 900µl Waschpuffer 1 (s.o.) und anschließende Zentrifugation (1500g, 7min). Der Überstand wurde bis auf 100µl abgesaugt und die Zellen danach noch zweimal mit 600µl Waschpuffer 1 gewaschen. Nach erneutem Absaugen des Überstandes bis auf 100µl wurden die Proben dann mit 400µl DNA-Gegenfärbelösung versetzt. Die Ausgangslösung von LDS 751 (rot fluoreszierend), dem Farbstoff, der sich in die Doppelstrang-DNA einlagert, wurde auf 1mg/ml in purem Methanol verdünnt. Die Konzentration der endgültig benutzten Lösung war dann 0,4µg/ml (2µl Ausgangslösung verdünnt in 50ml 1x PBS). Die telomer-markierten Zellen wurden für 30min bei Raumtemperatur inkubiert und dabei gegengefärbt. Diese DNA-Gegenfärbung diente als wichtige interne Qualitätskontrolle bei der nachfolgenden durchflusszytometrischen Untersuchung, vor allem um sicherzustellen, a) dass sie gemessenen Grünfluoreszenzen aus DNA-haltigen Zellen stammen und b) dass im Gating pro Telomersignal nur 1 Zelle gated wird und nicht Zellkonglomerate, die beim Waschen evtl. nicht getrennt wurden und dementsprechend die Telomermessung verfälschen würden. Dazu erfolgte u.g. Gating-Strategie (FL3-Höhe vs. Fläche).

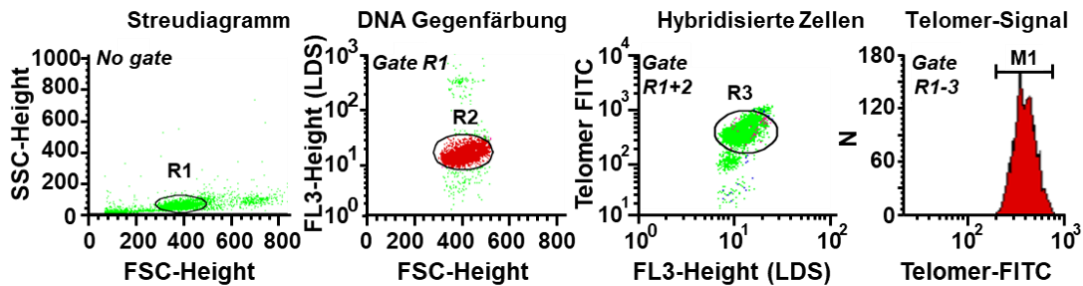
3.2.6.5. Gating-Strategien

Im Streudiagramm (**Abbildung 8**) wurden zunächst Thymozyten (T), Lymphozyten (L) und Granulozyten (G) voneinander differenziert (R1-Gate). Die Population in R1 wurde auf erfolgte DNA-Gegenfärbung (FL3-Kanal) geprüft, um damit R2 zu definieren. In einem weiteren Schritt wurden Zellen, die sowohl adäquat DNA-gegengefärbt und mit der FITC Sonde versehen waren, als R3 markiert. Um auszuschließen, dass verklumpte oder polyploide Zellen erfasst werden (und damit ein falsch hohes Telomer-Signal simulieren), wurde separat die Höhe des FL3 Kanals gegenüber der FL3 Fläche aufgetragen, wobei eine niedrige FL3-Fläche durch ein zusätzliches Gate R4 ausgewertet wurde. Es wurden nur Zellen von R1-R4 zur Auswertung herangezogen, wobei die spezifische Telomer-FITC Fluoreszenz mithilfe der Software erfasst wurde (M1). Diese Sortierung wurde getrennt voneinander für jede einzelne Zellpopulation durchgeführt.

A – Kalibrierung



B – Thymozyten



C – Mononukleäre Zellen mit Thymozyten (interner Standard)

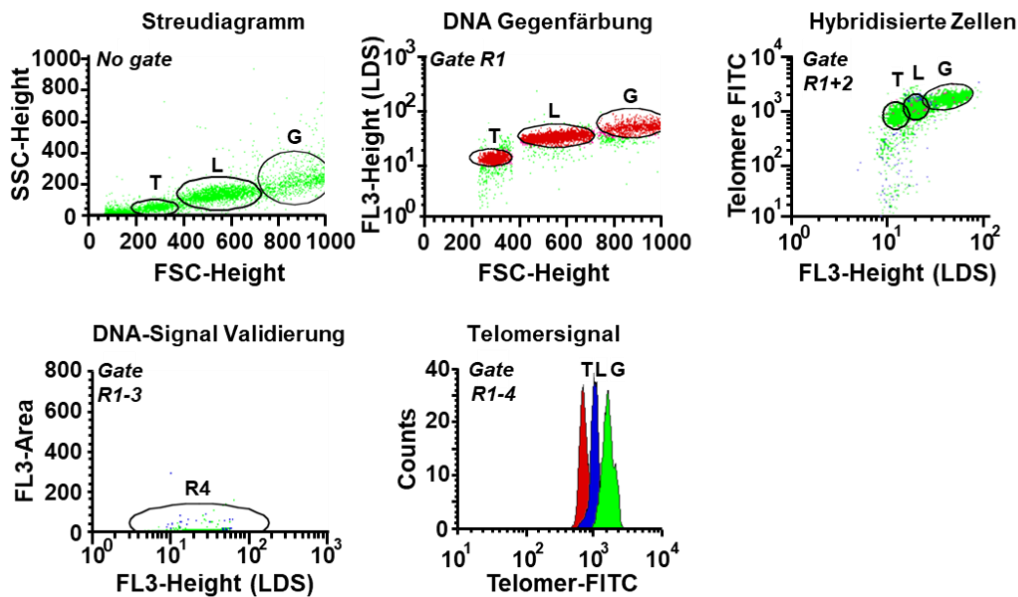


Abb. 8: Gatingstrategien des Flow-FISH. Zunächst wurden in jedem Lauf FITC markierte Mikrobeads definierter Größe und bekannter Fluoreszenzeigenschaften untersucht (**A - links**). Nach Auswahl des FITC-Signals (**A- Mitte**) wurde die mittlere Fluoreszenzintensität für die Beads M1-M5 bestimmt und eine Standardkurve (**A- rechts**) bestimmt. Mithilfe der Standardkurve konnten in den weiteren Untersuchungen die MESF-Werte angegeben werden. Unter „**B**“ wurden die Thymozyten als interner Standard untersucht. Wie für alle Proben lag eine doppelte Markierung mit LDS und FITC vor. Links ist das Streudiagramm der Thymozyten zu sehen. Nach initialem Gating auf die Thymozyten wurde in einem nächsten Schritt die LDS-Markierung verifiziert. Diese Population wurde dann auf die Telomer-Fluoreszenz untersucht und die mittlere Intensität der Thymozyten-Telomerfluoreszenz bestimmt (**B-rechts**; N= Anzahl der Ereignisse/Zelle). Im Abschnitt „**C**“ sind die Gating-Schritte einer repräsentativen

Probe zu sehen. Bei jeder Messung wurden 10^6 MNC eines Studienteilnehmers und 10^5 Thymozyten gleichzeitig untersucht. Im Streudiagramm sind Thymozyten (T), Lymphozyten (L) und Granulozyten (G) zu unterscheiden. Unter "DNA Gegenfärbung" ist die LDS-Fluoreszenz dargestellt. "**C- Hybridisierung**" zeigt, dass alle Zellpopulationen auch FITC-PNA gebunden sind. In einem weiteren Gating-Schritt wurde durch Auftragen der FL3-Height (LDS Fluoreszenz) gegenüber der FL3-Fläche gewährleistet, dass nur singuläre Events berücksichtigt wurden (FL3-Fläche $<10^2$). Letztendlich konnte so die mittlere Fluoreszenz-Intensität jeder Population bestimmt werden ("**C- Telomersignal**"):
Zur Veranschaulichung eingefärbtes und gemergtes Schaubild; rot: Thymozyten; blau: Lymphozyten; grün: Granulozyten).

3.2.6.6. Analyse am Durchflusszytometer, Auswertung und interne Validierung

Die Messung der Telomerlänge erfolgte durch quantitative Fluoreszenzmessung anhand der hybridisierten, fluoreszierenden Telo-PNA am Durchflusszytometer, die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest Pro. Um die täglichen Schwankungen auszugleichen, wurden in jedem Lauf FITC-konjugierte Beads benutzt, die jeweils definierte Mengen an Fluoreszenz, die sogenannten MESF („Molecules of equivalent soluble fluorochrome“), aufweisen. Diese wurden an jedem Messtag zusätzlich zu den Proben getestet. Des Weiteren waren in jedem Lauf Negativkontrollen (Probe ohne PNA-Sonde) und die Probe einer nicht zur Studienpopulation gehörenden Person als Referenz-Kontrolle vorhanden. Zusätzlich dazu stellten Rinder-Thymozyten einen Bezugspunkt als interne Referenz dar. Alle Proben der Studie wurden in zwei Läufen komplett durchgemessen, um zusätzlich Tagesschwankungen auszugleichen. Die durch die Flow-FISH-Messung erhaltenen mittleren Fluoreszenzwerte pro Probe und Zellpopulation (MFI – mean fluorescence intensity) wurden über eine hierfür etablierte Southern Blot Standardkurve (siehe unten) in Kilobasenpaare (kbp) umgerechnet.

3.2.7. Telomerlängenmessung mittels Southern-Blot

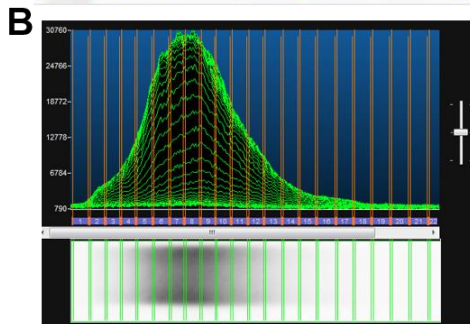
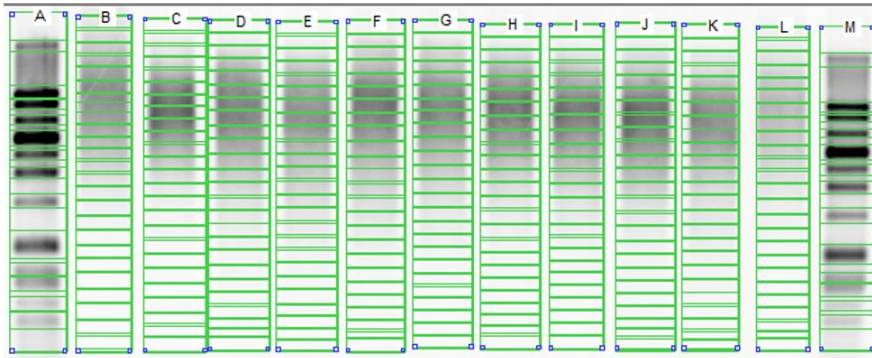
Der Southern Blot stellt derzeit den Goldstandard zur Bestimmung der absoluten Telomerlänge dar [41]. Da es sich um eine aufwändige, zeitintensive, gel-basierte Methode handelt, ist sie für größere Studien ungeeignet. Oft wird der Southern Blot dazu herangezogen, Beobachtungen in anderweitig gewonnenen

Untersuchungsergebnissen zu standardisieren. In dieser Studie wurde die Telomerlänge in 20 MNC DNA-Proben von Teilnehmern der SAUSE-Studie bestimmt. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden dazu benutzt, die MESF-Werte aus der oben beschriebenen Flow-FISH Methode in Basenpaare umzurechnen.

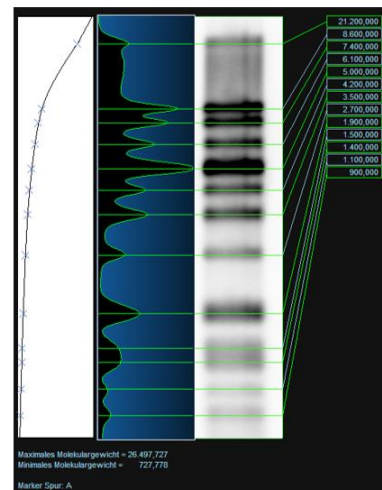
Zur Bestimmung der Terminalen Restriktions-Fragment (TRF)-Länge der MNC DNA-Proben wurde das TeloTAGGG Telomerlängen Kit (Roche, Mannheim, Germany, Cat. No. 12209136001) verwendet. Alle Materialien sind im Kit enthalten. Zunächst wurden 1,5µg DNA mithilfe der Restriktionsenzyme Hinf 1 und Rsa 1 verdaut. Diese beiden häufig verwendeten molekularen Scheren sind dazu in der Lage, genomische DNA in viele kleine Fragmente zu schneiden, ohne dabei jedoch den DNA-Strang im Bereich der Telomersequenz schneiden zu können. Im Anschluss daran wurden die Fragmente auf einem 0,8% Agarose-Gel aufgetrennt und auf dem Gel depuriniert, denaturiert und neutralisiert. Nach diesem Schritt wurden die DNA-Fragmente über Nacht auf eine positiv geladene Nylon-Membran übertragen. Es erfolgte eine Fixierung mittels UV-Quervernetzung („crosslinking“) und im Anschluss eine Prä-Hybridisierung in DIG Easy Hyb Lösung für 45min bei 42°C. Die endgültige Hybridisierung erfolgte mit DIG markierten Telomer-Proben für 3h bei 42°C. Die Detektierung der terminalen Restriktionsfragmente erfolgte mit anti-DIG Antikörpern, die mit alkalischer Phosphatase gekoppelt waren und dem chemilumineszenten CDP-Star Substrat der alkalischen Phosphatase. Die chemilumineszenten Signale wurden mit dem FUSION SL System (Peqlab, Erlangen Germany) erfasst und mithilfe der FusionCapt Software Version 16.09B (Peqlab) ausgewertet. Um die Länge des terminalen Restriktionsfragments auf dem Gel zu bestimmen, benötigt man zum einen die absolute Länge des Telomerfragments und die Intensität des chemilumineszenten Signals des Fragments. Die absolute Länge des Telomerfragments lässt sich bestimmen, indem man einem Standardwert bekannten Molekulargewichts auf dem Gel vergleicht (**Abbildung 9**, Bande A und M). Mithilfe dieser Parameter konnte die mittlere Länge des terminalen Restriktionsfragments bestimmt werden. Die hierfür notwendigen Bestimmungen wurden mit der FUSION SL Workstation unter Zuhilfenahme der FusionCapt Software durchgeführt. Die mittlere Telomerlänge wurde dabei wie von Kimura et al. beschrieben berechnet: $TRF = \frac{\sum(OD_i)}{\sum(OD_i/L_i)}$. Dabei bezeichnet OD_i die optische Dichte und L_i die Länge eines terminalen Restriktionsfragments in einem Rechteck des Rasters auf dem Gel. Die hier ermittelten Werte wurden gegen deren im Flow-FISH ermittelten MESF-Werte aufgetragen und

somit eine Standardkurve erstellt um für die weiteren Proben die MESF-Werte in Basenpaare umrechnen zu können.

A *Repräsentative Filmaufnahme mit aufgelegtem Raster*



Optische Dichte in jedem Rechteck eines Streifens



Molekulargewicht / TRF Längen-Marker

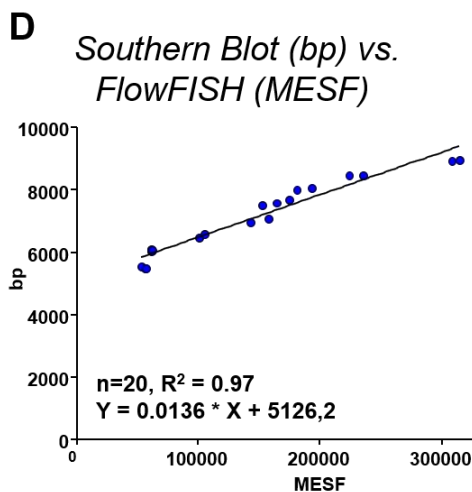


Abb. 9: Messung der Telomerlänge mononukleärer Zellen mittels Southern Blot. **(A)** zeigt eine repräsentative Filmaufnahme mit aufgelegtem Raster aus 25 Rechtecken zur Messung der optischen Dichte und der Länge des terminalen Restriktionsfragments in jedem Rechteck. **(B)** zeigt ein Beispiel der Densitometrie. Unter **(C)** ist ein Beispiel einer Markerbande des Molekulargewichts zu sehen, mit deren Hilfe nach oben angegebener Formel die Länge des terminalen Restriktionsfragments eines jeden Rechtecks bestimmt wurde. **(D)** Standardkurve der im Southern Blot gemessenen TRF-Längen (bp) verglichen mit den MESF-Werten aus der FlowFISH in denselben Proben ($R^2=0,97$)

3.2.8. Telomerlängenmessung mittels Real-Time PCR

Neben der Telomerlängenmessung mittels FlowFISH/Southern Blot (s.o.) wurde in der hier vorliegenden Arbeit außerdem mit der Methode der Real-Time PCR eine Bestimmung der Telomerlänge durchgeführt. Hier wird die Menge der Telomersequenzen mit dem Gen 36b4, welches nur in einer einzigen Kopie pro Genom vorkommt [85], mithilfe eines StepOnePlus Real-time-PCR System (Applied Biosystems) verglichen. Unter Verwendung des Qiamp DNA Blood Mini Kits (Quiagen, Deutschland) wurde die genomische DNA aus 2 Millionen mononukleären Zellen isoliert. Der DNA-Gehalt und die Reinheit der Proben wurden photometrisch bestimmt. Die Proben wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C konserviert. Zur Validierung des Assays wurde sowohl für die Telomer- als auch für die 36b4-PCR eine 5-Punkt-Standardkurve (Verdünnung von 40ng–2,5ng) mit gepoolter Kontroll-DNA von Probanden, die nicht Teil der Studie waren, erstellt ($R^2 > 0,99$) (**Abbildung 10**). Die Kontroll-DNA wurde in jedem Lauf mitgemessen, um eine Vergleichbarkeit der Einzelläufe zu erlauben. In jedem Lauf fand eine Doppelbestimmung von jeweils 40ng Proben-DNA statt, außerdem waren in jedem Lauf Proben aller Studien-Arme in Verwendung. Bei Abweichungen der Doppeltbestimmung von $Ct > 0,5$ wurde die Messung wiederholt. Als Negativkontrolle diente PCR-Mastermix ohne DNA (No template control, NTC).

Der Mastermix für jeden PCR-Lauf bestand aus 3µl cDNA, 7µl SYBR Green Mix (Applied Biosystems), 150nmol/L telomerspezifische Primer (fw:CGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT); rev: GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT) oder 36b4 Primer (fw: CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC; rev: CCCATTTATCATCAACGGGTACAA). Diese Mischung wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 20µl aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte mit den Proben die PCR in einem StepOnePlus Real-time PCR-System (Applied Biosystems, Deutschland) mit folgenden Reaktionsschritten: Aktivierungsschritt bei 95°C; gefolgt von 40 Zyklen für 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 58°C. Zur Sicherstellung, dass ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wurde, wurde eine Schmelzkurve erstellt. Die Rohdaten wurden mit der herstellereigenen StepOnePlus Software analysiert.

In einem nächsten Schritt wurden die Daten der PCR in Microsoft Excel übertragen und formatiert. Zur Bestimmung des Verhältnisses aus Telomer / Single copy gene (T/S) wurde die vergleichende $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode benutzt. Hiermit konnten die relativen Unterschiede in der Anzahl an Wiederholungen der spezifischen Telomersequenz interindividuell zu verschiedenen Zeitpunkten („prä“ Gegenüber „post“) bestimmt werden.

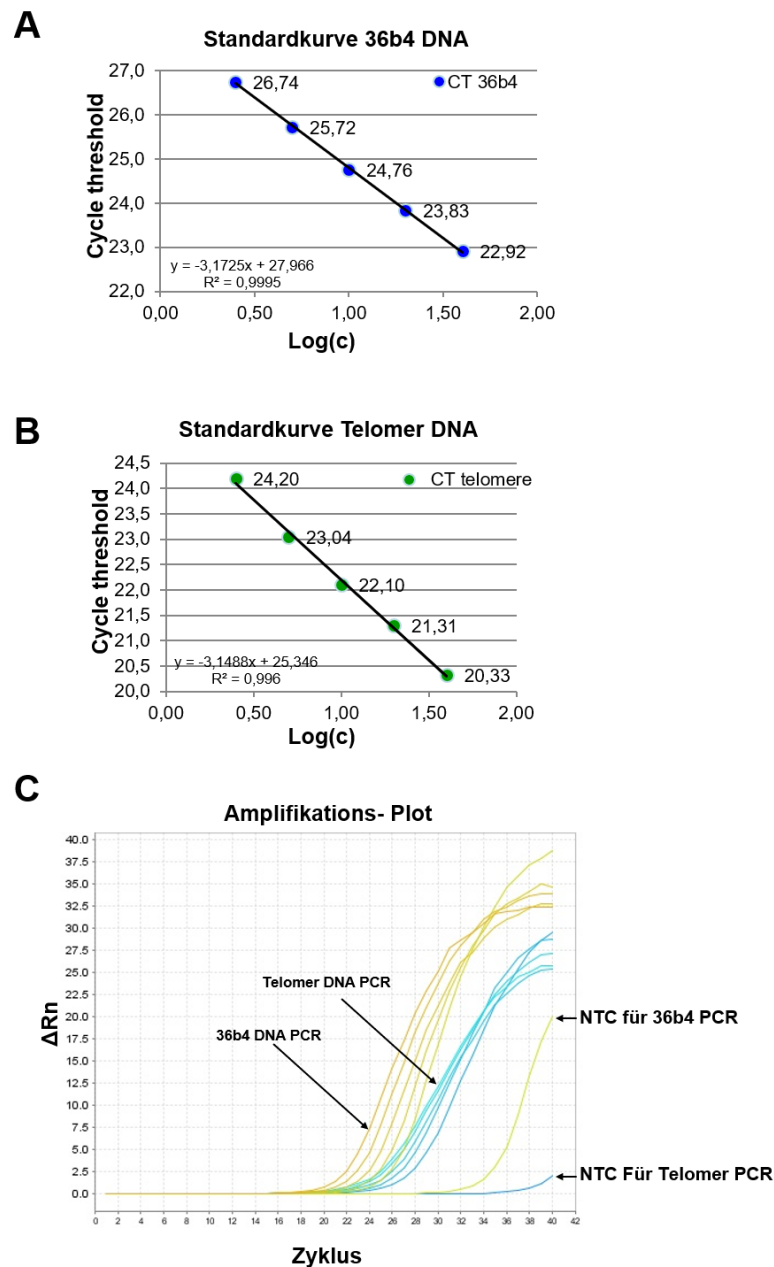


Abb. 10: Validierung der quantitativen Real-time-PCR zur Messung der Telomerlänge. Die Menge der Telomer-DNA wurde im Vergleich zur Menge der DNA des „single copy gene“ 36b4 gemessen. **(A)** Standardkurve der 36b4 DNA PCR ($R^2=0,99$); **(B)** Standardkurve der Telomer-DNA ($R^2=0,99$). **(C)** Originalkurve der quantitativen PCR zu sehen (36b4 DNA gelb; Telomer-DNA blau. NTC = No template control).

3.2.9. Statistische Analysen

Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die präsentierten Daten als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Für die Cross-over-Akutversuche wurden die Veränderungen der Telomeraseaktivität über die Zeit mittels einfacher Varianzanalyse für wiederholte Messungen innerhalb jeder Trainingsform analysiert. In der randomisierten, kontrollierten Trainingsstudie wurden die Ausgangsdaten zwischen den Gruppen ebenfalls mittels einfacher Varianzanalyse verglichen.

Um Veränderungen der Blutbestandteile, Serummarker, der klinischen Chemie, klinischer und körperlicher Trainingsvariablen während des Beobachtungszeitraums zu vergleichen, wurden diese Größen mittels gepaartem t-Test für verwandte Gruppen und zweifaktorieller Varianzanalyse für wiederholte Messungen (Wiederholungsfaktor: Test; kategorischer Prädiktor: Gruppe; post-hoc Test: Bonferroni Test) analysiert. T-Tests wurden ebenso verwendet, um die Veränderungen der Telomerlängen und Telomeraseaktivität innerhalb einer Gruppe zu analysieren; Differenzen unter den verschiedenen Gruppen wurde mittels einfacher Varianzanalyse und dem Bonferroni post-hoc Test geprüft.

GEE-Modelle (generalized estimating equation; dt.: generalisierte Schätzgleichung) wurden benutzt, um den Einfluss der Arbeitsgruppe, des Alters, des Geschlechts, des BMI und der Ausgangs-VO₂max auf die Änderungen der Telomerlänge und der Telomeraseaktivität zwischen „prä“ und „post“-Zeitpunkt der SAUSE-Studie zu untersuchen. Um die Hypothese einer Normalverteilung zu testen wurde der Kolmogorov-Smirnov Test angewandt. Alle Variablen, die in den GEE-Modellen benutzt worden sind, waren normalverteilt.

Assoziationen zwischen molekularen Regulatoren, klinischen Variablen und Leistungsparametern wurden mittels zweiseitiger Pearson'scher Korrelation geprüft.

Unterschiede der Telomeraseaktivität, geschichtet nach Trainingsantwort, wurde mittels T-Test geprüft.

Die Tests wurden mittels SPSS 20.0 und GraphPad Prism 5.01 durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Cross-over-Akutstudie

4.1.1. Charakteristika Probandenkollektiv Akutstudie

Insgesamt nahmen 15 gesunde Teilnehmer an der Akutstudie teil. **Tabelle 1** zeigt die wesentlichen Charakteristika. Alle Teilnehmer waren Medizinstudenten im Alter zwischen 23 und 27 Jahren, die im Rahmen von Freizeitsport moderat aktiv waren. Im Belastungstest auf dem Fahrradergometer konnten folgende Daten erhoben werden. Die relative Wattleistung betrug 3,5 W/kg. Der Normwert für die durchschnittliche Ergometerleistung beträgt bei einem untrainierten 30-jährigen gesunden Mann 3,0 Watt/kg Körpergewicht. Für Frauen gilt ein Wert von 2,5 W/kg Körpergewicht. Pro weitere Lebensdekade reduziert sich diese Leistungsfähigkeit um 10 Prozent [70]. Die erhobenen Daten zeigen also eine überdurchschnittliche Belastbarkeit und einen guten Trainingszustand der Probanden. Während der Belastung kam es zu einem Anstieg der maximalen Herzfrequenz auf 171,5 bpm im Mittel. Der Blutdruck stieg auf 190,5 mmHg (systolisch) beziehungsweise 97,8 mmHg (diastolisch) an. Unter Belastung stieg die maximale Sauerstoffaufnahme auf 2858 ml an. Es kam zu einer maximalen Ventilation von 156 l/min. Mithilfe der ermittelten Werte war es möglich, die maximale Sauerstoffaufnahmekapazität VO_{2max} als objektiven Parameter für die Leistungsfähigkeit zu bestimmen. In diesem Probandenkollektiv konnte eine auf das Körpergewicht bezogene mittlere VO_{2max} von 41,4ml/kg/min ermittelt werden. Auch das entspricht einer leicht überdurchschnittlichen Leistungsfähigkeit.

Im aeroben Belastungstest wurde eine Strecke von $7,4 \pm 0,3$ km zurückgelegt, d.h. die mittlere Geschwindigkeit betrug 9,9km/h. Die mittlere Herzfrequenz lag dabei bei $155 \pm 2,3$ bpm, die maximale Herzfrequenz bei $178 \pm 2,9$ bpm. Nach der Karvonen-Formel ergibt sich eine Intensitätsfaktor von 0,83, was einem intensiven Ausdauertraining entspricht [39]. Während des Krafttrainings wurden durchschnittlich $10,32 \pm 1,09$ Tonnen bewegt. Damit wurden im Schnitt 229kg/min Gewichte bewegt, was ebenfalls einer intensiven Belastung entspricht.

Ausgangsdaten (n=15)	
Geschlecht (weiblich / männlich)	7 / 8
Alter (Jahren)	24.5 (0.4)
Body mass index (kg / m²)	23.1 (0.7)
Trainingsumfang (Stunden / Woche)	4.3 (0.4)
Ruhepuls (bpm)	61.7 (2.5)
Ruheblutdruck systolisch (mmHg)	127.5 (2.9)
Ruheblutdruck diastolisch (mmHg)	83.3 (3.3)
Kardiopulmonaler Belastungstest auf dem Fahrradergometer	
Leistung (Watt / kg)	3.5 (0.2)
Maximale Herzfrequenz (bpm)	171.5 (2.5)
Maximaler Blutdruck systolisch (mmHg)	190.0 (4.6)
Maximaler Blutdruck diastolisch (mmHg)	97.8 (1.5)
Maximale Sauerstoffaufnahme (ml)	2858 (260)
Maximale Sauerstoffaufnahmekapazität VO_{2max} (ml / kg / min)	41.4 (2.0)
Sauerstoffpuls (ml / min⁻¹)	18.3 (1.9)
Einsekundenkapazität (l / sec)	3.9 (0.3)
Maximale Ventilation (l / min)	156 (12.6)
Akutstudie	
Laufstrecke Ausdauertraining (AT) (km)	7.3 (0.4)
Mittlere Herzfrequenz AT (min⁻¹)	155.3 (2.3)
Trainingsintensität AT	0.83
Bewegtes Gewicht Krafttraining (KT) (kg)	10320 (1090)

Tabelle 1: Charakteristika der Teilnehmer der Cross-over-Akutstudie Ausdauertraining vs. Krafttraining (jeweils 45 Minuten). Abkürzungen: KT= Krafttraining, AT= Ausdauertraining, bpm= beats per minute. Berechnungen: Sauerstoffpuls = maximale Sauerstoffaufnahme / maximale Herzfrequenz. Trainingsintensität = (mittlere Herzfrequenz – Ruheherzfrequenz) / (maximale Herzfrequenz – Ruheherzfrequenz).

4.1.2. Regulation der Telomeraseaktivität zirkulierender mononukleärer im Cross-over-Akutversuch

Ein Zusammenhang zwischen langjähriger Ausdaueraktivität und gesteigerter Telomeraseaktivität in zirkulierenden mononukleären Zellen wurde in der Vorarbeit beschrieben [85]. Hierbei handelte es sich allerdings um eine Querschnittstudie und die Blutentnahmen erfolgten bewusst außerhalb akuter Trainingsreize. Es stellte sich die Frage, wie schnell es nach einem Trainingsreiz zu einem Anstieg der Telomeraseaktivität kommt. Um zu beantworten, ob bereits einmaliges Ausdauer- oder Krafttraining mit einer Aktivitätssteigerung assoziiert ist, wurden Aktivitätsmessungen mittels TRAP-Assay in der aktuellen Cross-over Studie aus Blutentnahmen vor, direkt nach und 24h durchgeführt (**Abbildung 11**). In den Messungen zeigte sich, dass bereits einmaliges Ausdauertraining eine Aktivitätssteigerung der Telomerase von 189 ± 16 (Prä) auf 250 ± 36 (Post) auf 306 ± 47 (24h Post) HEK- Zell- Äquivalente mit sich brachte. Absolvierten die gleichen Probanden ein intensives Krafttraining gleicher Dauer an einem anderen Tag, konnte keine Zunahme der Telomeraseaktivität beobachtet werden.

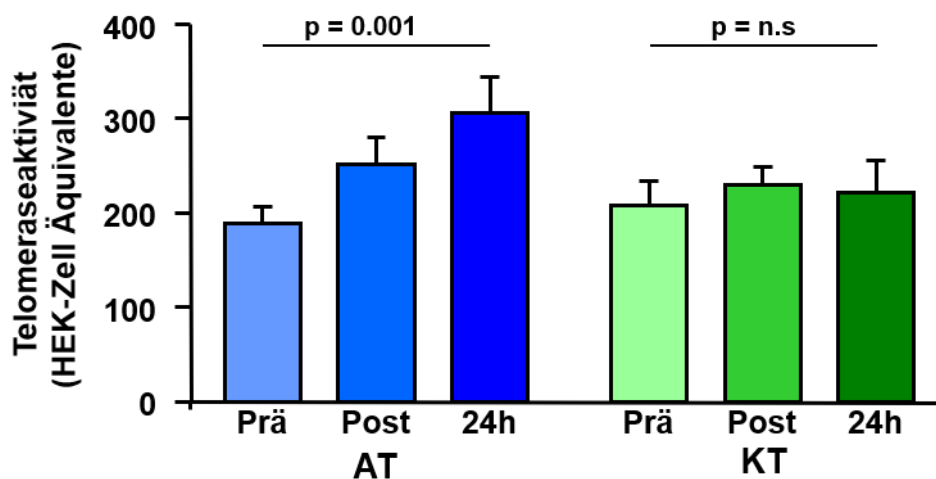


Abb.11: Cross-over-Vergleich der Akutregulation der Telomeraseaktivität nach einmaligem Ausdauertraining (AT) bzw. Krafttraining (KT). Dargestellt sind Absolutwerte in Form von HEK-Zell-Äquivalenten.

4.1.3. Regulation der mRNA-Expression der telomer-stabilisierenden Proteine TRF2 und POT1

Betrachtet man mittels Real-Time PCR die mRNA- Expression telomer-assoziiierter Proteine wie des Telomere-repeat binding factor (TRF2) und des Protection of telomeres (POT1), so finden sich auch hier differenzielle Effekte. TRF2 spielt eine wichtige Rolle in der Ausbildung sogenannter T-Loop Strukturen an den Enden der Telomere. Dies schützt die Chromosomenenden vor Degradation und Anomalien wie beispielsweise End-zu-End-Fusionen. POT1 ist ebenso an der Stabilisierung der T-Loops beteiligt. In den **Abbildungen 12** und **13** sind die Ergebnisse der real-time PCR Untersuchungen dargestellt. Die mRNA-Expression vor Absolvieren der Trainingseinheit wurde als Bezugswert herangezogen, die Werte im Verlauf sind als relative Änderungen der mRNA-Expression bezogen auf den Ausgangswert dargestellt. Bei einmaligem Ausdauertraining kam es bei den Probanden zu einem 1,46-fachen Anstieg der TRF2 mRNA Expression 24h nach dem Training. Für TRF2 konnte auch im Krafttraining eine Regulation der mRNA Expression beobachtet werden (**Abb. 12**). Diese fiel mit einem 1,17-fachen Anstieg nach 24h jedoch schwächer aus. Auch POT1 zeigte bei einmaligem Ausdauertraining eine Hochregulation auf die 1,47-fache mRNA Expression. Hier kommt es beim Absolvieren des Krafttrainings jedoch zu keiner Änderung der mRNA Expression (**Abb. 13**).

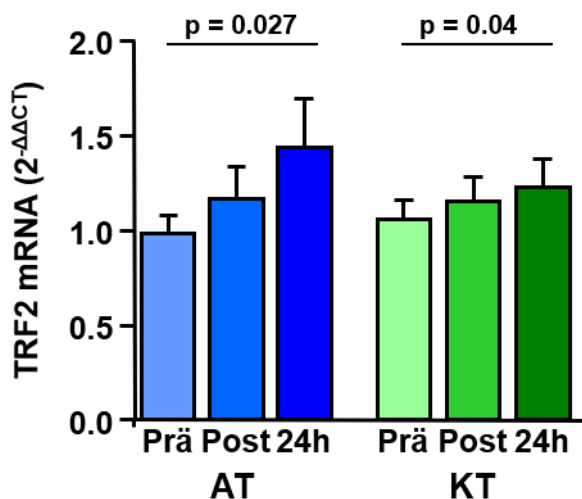


Abb. 12: Real-time PCR-Analyse der mRNA Expression von TRF2 im Akutversuch.

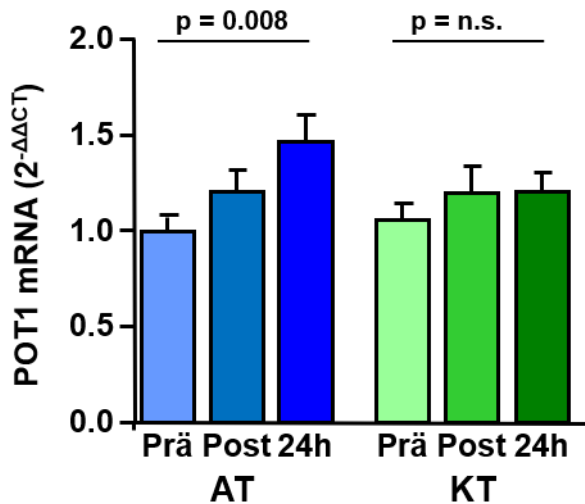


Abb. 13: Real-time PCR-Analyse der mRNA Expression von POT1 im Akutversuch.

4.1.4. Regulation der mRNA-Expression des DNA-Reparaturproteins Ku70 und des Seneszenzmarkers p16

Neben den telomer-stabilisierenden Faktoren lassen sich auch aus der Expression der Proteine Ku70 beziehungsweise p16 Rückschlüsse auf Zellalterungsvorgänge ziehen. Ku70 ist zusammen mit Ku80 als Heterodimer Bestandteil des Ku-Komplexes und spielt eine wichtige Rolle bei DNA Reparaturvorgängen, insbesondere bei Doppelstrangbrüchen (vgl. 2.3.2.3). Die mittels Real-Time PCR gemessene mRNA-Expression von Ku70 im Rahmen des Ausdauer-Akutversuches zeigte eine erhöhte Ku70 Expression nach dem Training. Bei denselben Probanden bewirkte Krafttraining keine Regulation der Ku70-Expression in zirkulierenden mononukleären Zellen (**Abb. 14**). P16 als wichtiger Vertreter sogenannter Seneszenzfaktoren [32] unterlag ebenfalls einer differenziellen Regulation bei unterschiedlichen Trainingsmethoden. Während es nach Absolvieren des aeroben Ausdauertrainings zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression von p16 auf $59 \pm 13\%$ (*post*) beziehungsweise $77 \pm 15\%$ (*24h Post*) gegenüber dem Ausgangswert kam, konnte bei denselben Studienteilnehmern beim Krafttraining sogar eine 1,42-fache Zunahme der p16 mRNA Expression ($p=0,003$) beobachtet werden (**Abb. 15**).

Die Daten unterstützen frühere Hinweise auf eine akute Beeinflussung von Telomerproteinen durch Ausdauertraining und zeigen in denselben Probanden erstmals, dass Krafttraining in diesem Setting kaum Effekte hat.

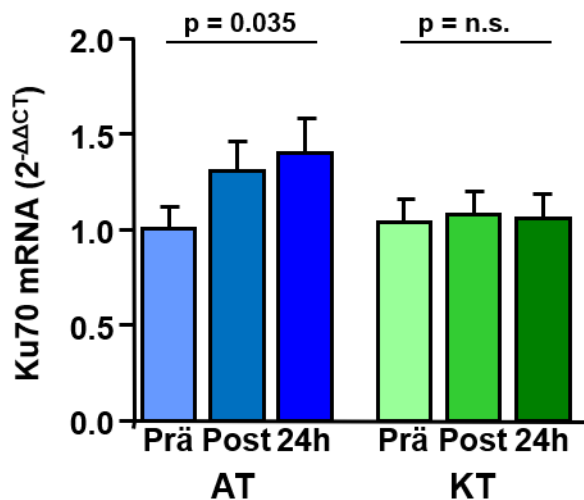


Abb.14: Real-time PCR-Analyse der mRNA Expression von Ku70 im Akutversuch.

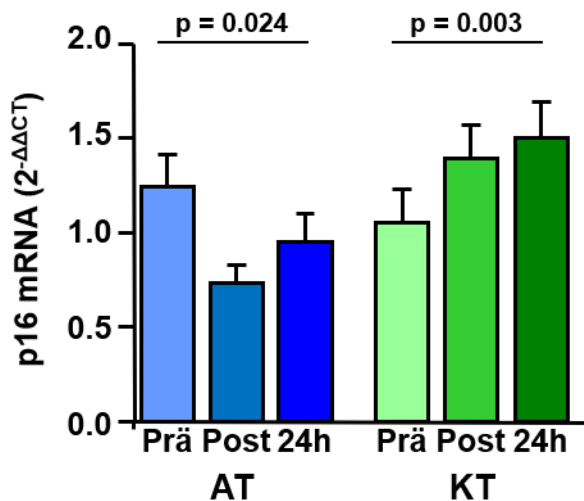


Abb.15: Real-time PCR-Analyse der mRNA Expression des Seneszenzmarkers p16 im Akutversuch.

4.2. Prospektive Trainingsstudie

4.2.1. Charakteristika Probandenkollektiv

Screening, Studieneinschluss und die Randomisierung in die vier Probandengruppen erfolgte wie in Kap. 3 beschrieben durch das Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität Saarbrücken. Diese Dissertation befasst sich mit der Analyse der in Saarbrücken erhobenen klinischen Daten und den in Homburg gemessenen molekularbiologischen Daten zur zellulären Alterung. Insgesamt nahmen 266 Probanden an der prospektiven Trainingsstudie teil. Wie auch in der Akutstudie waren

aktiver Nikotinkonsum, Rauchstopp innerhalb der letzten 12 Monate und regelmäßige Medikamenteneinnahme ein Ausschlusskriterium. Die Studienteilnehmer sollten möglichst realitätsnah Personen entsprechen, denen im Rahmen eines primärpräventiven Ansatzes regelmäßige körperliche Aktivität empfohlen wird. Einschlusskriterien waren ein Alter zwischen 30-60 Jahren, keine Vorerkrankungen und keine regelmäßige sportliche Aktivität (>1h/Woche) im Vorfeld. Ausgewertet werden konnten insgesamt 124 Probanden, davon 35 Probanden für die Kontrollgruppe, 26 Probanden in der aeroben Ausdauergruppe, 29 Probanden der Intervalltrainingsgruppe und 34 Probanden der Krafttrainingsgruppe.

Tabelle 2 zeigt die Basischarakteristika der Probanden. Das mittlere Alter lag für alle Gruppen zwischen 48 Jahren und 50 Jahren. In der Eingangsuntersuchung wurden unter anderem der BMI, der Blutdruck und die Ruheherzfrequenz erfasst. Hier zeigt sich in allen Gruppen eine sehr homogene Verteilung der Ausgangswerte. Neben der klinischen Untersuchung und Bestimmung allgemeiner Gesundheitsparameter wurden zusätzlich in einer venösen Blutabnahme klinisch-chemische Parameter bestimmt, um Effekte der verschiedenen Trainingsformen auf den Glukose- und Lipidmetabolismus zu testen. Zu Beginn der Studie lag eine homogene Verteilung zwischen den Gruppen vor. Alle Gruppen wiesen in Bezug auf das Gesamtcholesterin leicht erhöhte Werte auf (Normwert <200mg/dl), aber waren bzgl. des LDL-Cholesterins im für die Allgemeinbevölkerung empfohlenen Wert (<115mg/dl). Bestandteil der Eingangsuntersuchung war auch eine Spiroergometrie auf dem Laufband. Durch Bestimmung der maximalen Herzfrequenz, der Maximalgeschwindigkeit, der Laktatkonzentration und insbesondere der VO₂max konnte hier zu Beginn der Studie eine nahezu identische Leistungsfähigkeit der verschiedenen Trainingsgruppen dokumentiert werden. Ein RQ>1,1 bei der Spiroergometrie zeigte die ventilatorische Ausbelastung an (ein Wert von $\geq 1,0$ war neben einer $\geq 70\%$ igen Trainingscompliance Voraussetzung für die Aufnahme in die Auswertung). Eine Bestimmung der basalen Stoffwechselrate mittels indirekter Kalorimetrie wurde für die Kontrollgruppe (1622kcal) und die Krafttrainingsgruppe (1677kcal) durchgeführt.

Kontroll- gruppe	Aerobes Aus- dauertraining	Intervall- training	Kraft- training	P-Wert
---------------------	-------------------------------	------------------------	--------------------	--------

N = 124	35	26	29	34	
Geschlecht (M/W)	12 / 23	9 / 17	10 / 19	14 / 20	
Alter (Jahre)	50.2 (1.2)	49.5 (1.4)	48.4 (1.2)	48.1 (1.3)	0.61

Klinische Daten

Body mass index (kg/m ²)	24.2 (0.5)	23.8 (0.7)	24.5 (0.6)	24.8 (0.6)	0.64
Syst. Blutdruck (mmHg)	131 (2.7)	132 (3.0)	125 (5.0)	132 (2.2)	0.35
Diast. Blutdruck (mmHg)	84 (1.7)	86 (2.1)	82 (3.2)	86 (1.2)	0.63
Ruheherzfrequenz (bpm)	64 (1.7)	65 (1.5)	68 (2.0)	67 (1.6)	0.32

Klinische Chemie

Nüchternglukose (mg/dl)	96 (1.5)	96 (1.2)	98 (1.5)	96 (1.5)	0.44
Nüchterninsulin (μ U/ml)	4.60 (0.4)	4.48 (0.5)	6.11 (0.5)	5.19 (0.5)	0.05
Gesamtcholesterin (mg/dl)	212 (6.7)	224 (8.4)	212 (6.7)	206 (7.6)	0.41
HDL Cholesterin (mg/dl)	55 (3.4)	58 (4.1)	53 (3.2)	56 (2.8)	0.77
LDL Cholesterin (mg/dl)	105 (5.4)	114 (7.1)	106 (6.0)	102 (5.6)	0.59

Laufband Ergometrie

Maximale Herz- frequenz (bpm)	178 (2.1)	183 (1.9)	178 (2.0)	182 (1.9)	0.19
VO _{2max} (ml/kg*min)	35.1 (0.9)	35.3 (1.2)	35.1 (0.9)	35.3 (0.9)	0.99

Maximalgeschwindigkeit (km/h)	10.0 (0.3)	9.9 (0.3)	10.0 (0.2)	10.0 (0.3)	0.99
km/h bei 130 bpm	5.5 (0.4)	4.5 (0.6)	4.5 (0.5)	5.6 (0.3)	0.14
km/h bei 150 bpm	7.2 (0.2)	7.2 (0.2)	6.9 (0.1)	7.2 (0.2)	0.56
km/h bei Laktatkonz. von 2mM/l	4.9 (0.5)	4.6 (0.6)	4.7 (0.6)	5.3 (0.4)	0.82
Respiratorischer Quotient (RQ)	1.17 (0.02)	1.12 (0.02)	1.10 (0.02)	1.11 (0.04)	0.28
Grundumsatz (kcal)	1622 (50)	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	1677 (70)	0.53

Tabelle 2: Basischarakteristika der Studienteilnehmer der prospektiven Trainingsstudie.

4.2.2. Trainingseffekte im Hinblick auf klinische Parameter und körperliche Fitness

Nach Durchlaufen des 6-monatigen Studienzeitraums mit einer Trainingsfrequenz von 3 x / Woche und einer minimalen Trainingscompliance von 70% (≥ 55 dokumentierte Trainingseinheiten) wurde bei allen Studienteilnehmern ein Abschlusstest durchgeführt und die Werte mit dem Ausgangstest verglichen (**Tabelle 3**). Neben der Abschlussuntersuchung und der venösen Blutentnahme wurde wiederum eine Leistungsdiagnostik auf dem Laufband und für die Krafttrainingsgruppe zusätzlich die Bestimmung der basalen Stoffwechselrate erfolgte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in den Interventionsgruppen mit Ausnahme der Intervalltrainingsgruppe zu einer Reduktion der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte kam. In der Krafttrainingsgruppe senkte sich der systolische Blutdruck signifikant (delta post vs. prä -3,24mmHg). Die Ruheherzfrequenz reduzierte sich in allen 3 Interventionsgruppen, lediglich in der aeroben Ausdauergruppe war die Reduktion statistisch signifikant (-6,76bpm). Beim Body-Mass-Index (BMI) gab es eine signifikante Änderung in der Intervalltrainings- und der aeroben Ausdauergruppe. Hier senkte sich der BMI um -0,45 kg/m² (Ausdauergruppe) bzw. um -0,48 kg/m² (Intervalltrainingsgruppe). In der Laboranalyse zeigten sich weitgehend keine signifikanten Änderungen der Laborparameter. Allein in der Ausdauergruppe kam es

zu einer signifikanten Senkung des Gesamtcholesterinspiegels um im Mittel - 10.62mg/dl.

Bei der Leistungsdiagnostik konnte deutlich das bessere Trainingsniveau in allen 3 Interventionsgruppen gezeigt werden. Während es in der Kontrollgruppe, wie zu erwarten, zu keiner Veränderung während des Studienzeitraums gekommen ist, zeigte die Ausdauergruppe sowohl bei der VO_{2max} (+2,69ml/kg/min) als auch bei der maximal erreichten Geschwindigkeit (+1,1km/h) signifikant verbesserte Leistungsparameter. In der Intervalltrainingsgruppe veränderten sich die VO_{2max} (+2,76 ml/kg/min) und die Maximalgeschwindigkeit (+1,4km/h) in etwa vergleichbar zum aeroben Ausdauertraining. In der Krafttrainingsgruppe fand sich keine Reduktion der maximalen Herzfrequenz. Die VO_{2max} stieg mit +2,97ml/kg/min vergleichbar zu den anderen Trainingsgruppen an, jedoch nicht die Maximalgeschwindigkeit. Deutlich fällt auch die Erhöhung des Grundumsatzes an Energie in der Krafttrainingsgruppe nach dem 6-monatigen Studienzeitraum auf. Im Mittel kam es zu einer Erhöhung der basalen Stoffwechselrate um 158,88kcal. Dies spricht für eine Zunahme der stoffwechselaktiven Muskelmasse und zeigt damit indirekt die Effektivität des Krafttrainings, ergänzend zur Steigerung der VO_{2max} .

Auf Grund der großen Unterschiede zwischen verschiedenen Trainingsformen ist es immer noch ungelöste Frage, wie deren Intensität zu vergleichen ist, um Unterschiede in den Trainingseffekten und Studienendpunkten wie hier molekularen Regulatoren zu interpretieren. Aktueller Konsens ist, dass die maximale Sauerstoffaufnahme ein objektiver Vergleichsparameter ist. Demzufolge lässt sich als Ergebnis festhalten, dass in der SAUSE-Studie 4 homogene Gruppen verglichen wurden, dass es keine signifikanten Änderungen in der Kontrollgruppe gab und dass alle 3 Trainingsformen eine vergleichbare Änderung der VO_{2max} bewirkten, also über 6 Monate gesehen ähnlich intensiv waren. Betont werden muss auch, dass in dieser Studie die Compliance mit den Trainingseinheiten gut kontrolliert war und nur Probanden mit einer hohen Trainingscompliance in den nachfolgenden gezeigten Analysen zu Regulatoren der Zellalterung repräsentiert sind.

Kontrollgruppe	Aerobe Ausdauergruppe		Intervalltrainingsgruppe		Krafttrainingsgruppe	
Δ post vs. prä	Δ post vs. prä	P vs. Ko	Δ post vs. prä	P vs. Ko	Δ post vs. prä	P vs. Ko

Klinische Charakteristika

Body Mass Index (kg/m²)	0.04 (0.14)	-0.45 (0.20)	0.041	-0.48 (0.16)	0.015	-0.22 (0.14)	0.18
Systolischer Blutdruck (mmHg)	2.68 (1.91)	-1.28 (2.44)	0.20	1.81 (1.90)	0.75	-3.24 (1.64)	0.022
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	0.00 (1.25)	-2.23 (1.67)	0.28	-1.81 (1.04)	0.29	-2.82 (1.44)	0.14
Ruheherzfrequenz (bpm)	-2.74 (1.04)	-5.36 (1.24)	0.11	-6.76 (1.36)	0.020	-6.00 (1.41)	0.07

Klinische Chemie

Nüchtern-glukose (mg/dl)	-0.66 (1.58)	-3.35 (1.22)	0.21	0.24 (1.31)	0.67	-0.74 (1.25)	0.97
Nüchtern-Insulin (μU/ml)	0.06 (0.38)	-0.31 (0.31)	0.47	-0.55 (0.42)	0.29	-0.37 (0.33)	0.39
Gesamtcholesterin	3.57 (4.31)	-10.62 (3.85)	0.023	1.21 (3.99)	0.69	3.09 (4.94)	0.94
HDL Cholesterin (mg/dl)	5.71 (1.41)	3.47 (1.42)	0.28	6.90 (1.81)	0.60	4.65 (1.45)	0.60
LDL Cholesterin (mg/dl)	22.76 (3.21)	14.69 (3.67)	0.10	19.18 (3.78)	0.47	19.91 (4.17)	0.59

Ergometrie (Laufband)

Max. Herzfrequenz (bpm)	1.12 (1.03)	-2.48 (1.63)	0.06	-4.79 (0.99)	<0.001	0.24 (1.05)	0.56
VO_{2max} (ml/kg*min)	-1.01 (0.54)	2.69 (0.74)	<0.001	2.76 (0.95)	0.001	2.97 (1.03)	0.001
Maximalgeschwindigkeit (km/h)	-0.05 (0.10)	1.10 (0.12)	<0.001	1.38 (0.12)	<0.001	0.44 (0.11)	0.002
km/h bei 130 bpm	0.17 (0.07)	0.44 (0.11)	0.032	0.55 (0.08)	0.001	0.19 (0.07)	0.82
km/h bei 150 bpm	0.20 (0.07)	0.73 (0.16)	<0.001	0.99 (0.09)	<0.001	0.20 (0.08)	0.98
km/h bei Latktatkonz. 2mM	-0.08 (0.15)	0.81 (0.19)	<0.001	0.46 (0.16)	0.019	-0.07 (0.09)	0.94

Basale Stoffwechselrate (kcal)	-13.12 (34.66)	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt	158.88 (44.76)	0.003
---------------------------------------	----------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	----------------	-------

Tabelle 3: Änderung der Charakteristika der Studienteilnehmer im Verlauf des Beobachtungszeitraums. KO = Kontrollgruppe

4.2.3. Differentielle Effekte körperlicher Aktivität auf die Telomeraseaktivität zirkulierender mononukleärer Zellen

Die Aktivität des Anti-Seneszenz-Enzyms Telomerase in den mononukleären Blutzellen (MNC) war eine der primären Fragestellungen des molekularbiologischen Teils der SAUSE-Studie. Wie in Kap. 3 aufgeführt, wurde die Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay bestimmt und als HEK-Zelläquivalente angegeben. Nach Absolvieren des 6-monatigen Trainingszeitraums wurde in den beiden Ausdauergruppen eine Zunahme der MNC-Telomeraseaktivität beobachtet. Während in der Kontrollgruppe und der Krafttrainingsgruppe keine signifikanten Veränderungen der Telomeraseaktivität gemessen werden konnten, konnte in der Intervalltrainingsgruppe und der aeroben Ausdauertrainingsgruppe ein mehr als 2-facher Anstieg der Telomeraseaktivität, verglichen mit dem Ausgangswert, gemessen werden (**Abb. 16**). Sowohl bezogen auf den Ausgangswert der zugehörigen Ausdauergruppe als auch bezogen auf den Post-Zeitpunkt der Kontrollgruppe, waren die Anstiege der Telomeraseaktivität in diesen beiden Gruppen signifikant. Die mittleren prozentualen Änderungen der einzelnen Gruppen betragen vs. Ausgangswert: KG ($124 \pm 14 \%$), KT ($169 \pm 22 \%$), IT ($264 \pm 49 \%$), AT ($298 \pm 70 \%$).

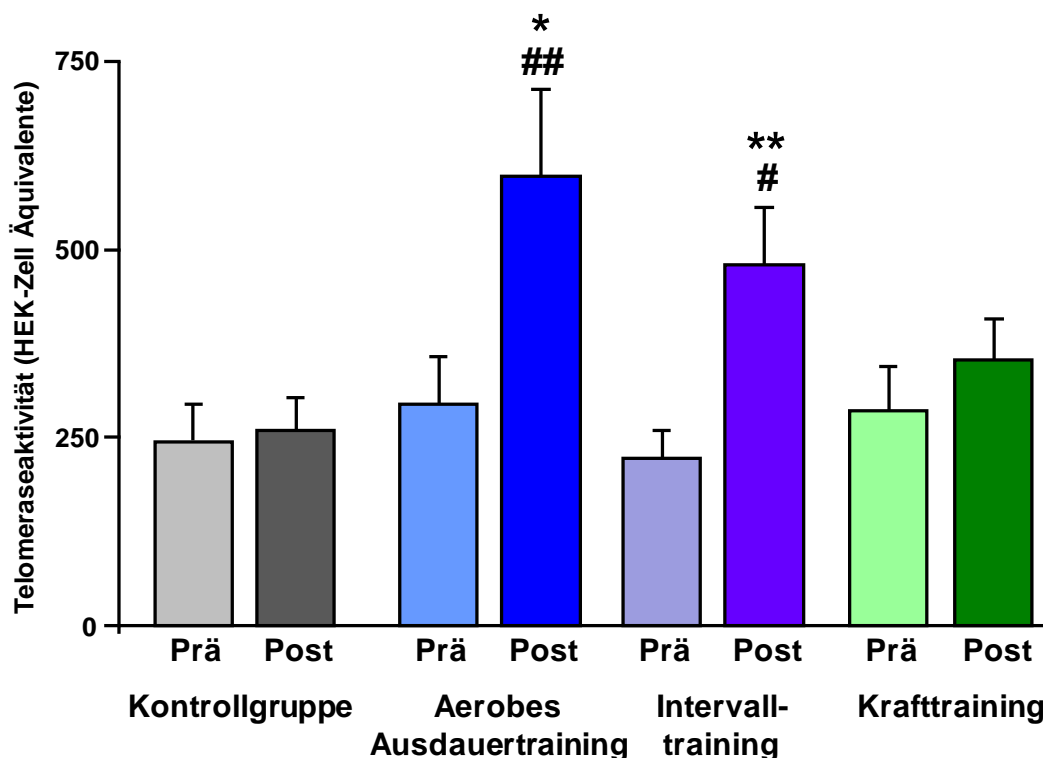


Abb. 16: Telomeraseaktivität, angegeben als HEK-Zell Äquivalente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ bezogen auf Prä-Zeitpunkt derselben Gruppe. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ bezogen auf Post-Zeitpunkt der Kontrollgruppe

4.2.4. Regulation der TRF2 mRNA-Expression

Gemessen wurde in dieser Analyse mittels Real-Time PCR die Expression der mRNA von TRF2, das wie oben beschrieben maßgeblich an der Ausbildung der telomer-stabilisierenden T-Loops beteiligt ist. In allen drei Trainingsgruppen kam es zu einem deutlichen Anstieg des telomer-regulierenden Faktors TRF2 (**Abb.17A**). Während die Kontrollgruppe keine Effekte aufwies, waren die Effekte der verschiedenen Trainingsgruppen vergleichbar (mittlere %-Anstiege: KG $114 \pm 17\%$, AT $243 \pm 17\%$, IT $254 \pm 29\%$, KT $342 \pm 17\%$). Der Anstieg war sowohl in Bezug auf den Ausgangswert der jeweiligen Gruppe als auch in Bezug auf den Zeitpunkt „Post“ der Kontrollgruppe statistisch signifikant.

4.2.5. Regulation der POT1 mRNA Expression

Ebenso wie TRF2 gehört auch POT1 zu den telomer-assoziierten Proteinen und dient als stabilisierender Faktor. Durch Beteiligung an der Ausbildung der T-Loops und somit der Stabilisierung der Chromosomenenden wirkt auch POT1 dem Abbau der Chromosomenenden und damit der Zellalterung entgegen. Nach 6-monatigem Training kam es ganz ähnlich zu TRF2 bei der Expression der mRNA von POT1 in allen 3 Interventionsgruppen zu einem signifikanten Anstieg (mittlere %-Anstiege: KG $107 \pm 20\%$, AT $166 \pm 26\%$, IT $214 \pm 17\%$, KT $248 \pm 27\%$) (**Abb.17B**).

4.2.6. Regulation der Ku70 mRNA Expression

Die mRNA Expression von Ku70 als DNA-Reparaturprotein, das durch seine Interaktion mit Proteinen des Shelterinkomplexes auch die Zellalterung hemmt, war nach 6-monatigem Training in allen drei Interventionsgruppen heraufreguliert, bezogen auf die Ausgangsbestimmung und bezogen auf den Zeitpunkt „Post“ der Kontrollgruppe (mittlere %-Anstiege: KG $142 \pm 12\%$, AT $251 \pm 27\%$, IT $310 \pm 31\%$, KT $182 \pm 12\%$) (**Abb. 17 C**).

4.2.7. Regulation der p16 mRNA Expression

Die mRNA Expression des Seneszenzmarkers p16 war in allen drei Interventionsgruppen nach Beenden des sechsmonatigen Trainingszeitraums signifikant reduziert (mittlere %-Anstiege: KG 103 ± 35%, AT 41 ± 24%, IT 67 ± 26%, KT 51 ± 39%) (**Abb. 17D**).

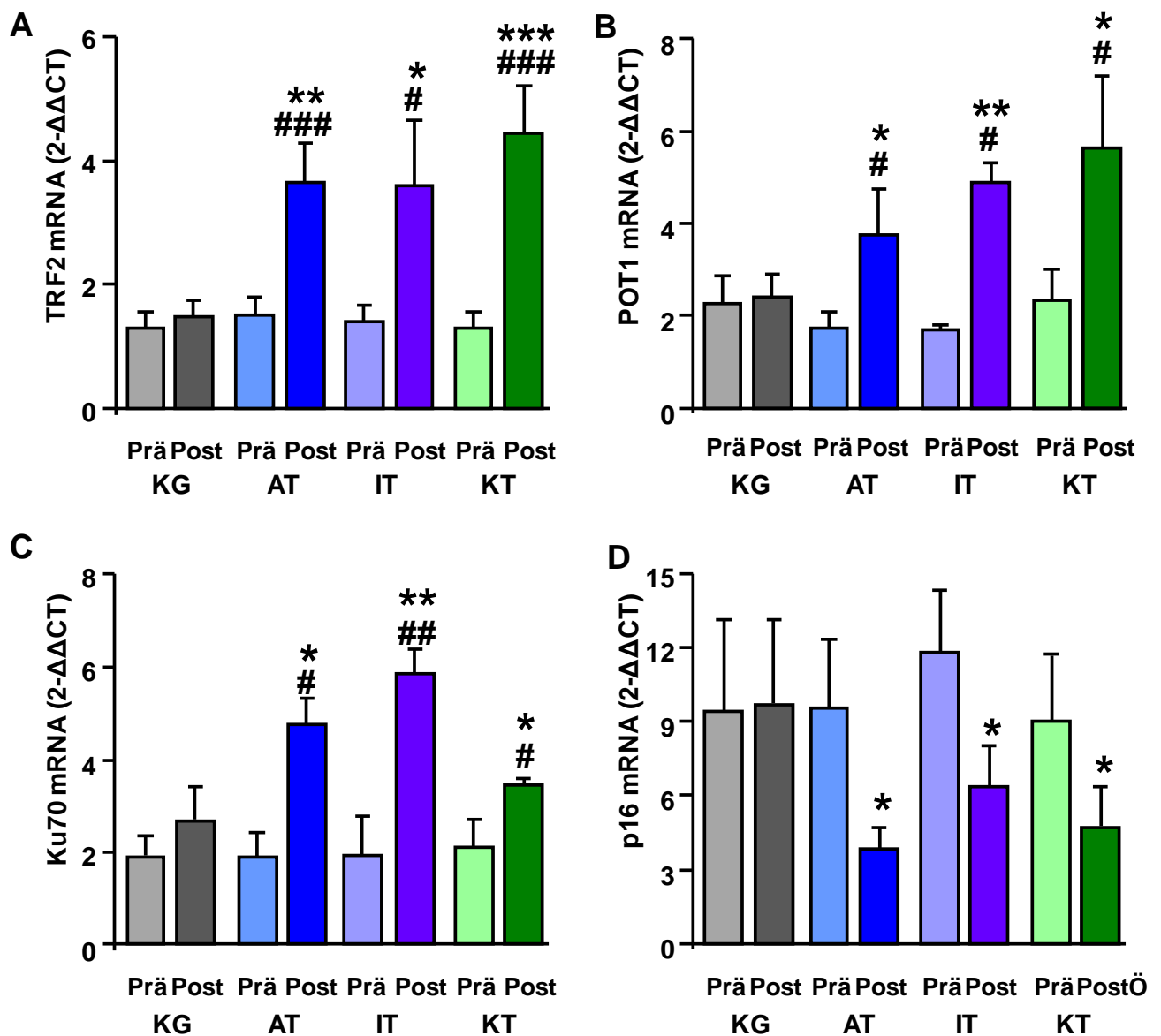


Abb. 17: mRNA Expression von (A) TRF2, (B) POT1, (C) Ku70 und (D) p16, dargestellt als Mittelwert ± SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. „Prä“ der korrespondierenden Gruppe. # $p < 0,5$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. „Post“ der Kontrollgruppe.

4.2.8. Regulation der iNOS mRNA Expression

NO-Synthasen spielen eine wichtige Rolle bei der protektiven Signaltransduktion, die durch Scherstress an der endothelialen Glykokalyx ausgelöst wird, sowie bei der Neoarteriogenese bzw. dem Kollateralenwachstum. Ob es Unterschiede zwischen verschiedenen Trainingsmodalitäten gibt, ist unbekannt. In Blutzellen ist die induzierbare NO-Synthase (iNOS) die dominante Isoform. In der SAUSE-Studie zeigte sich eine differentielle Regulation der MNC iNOS mRNA Expression nach 6 Monaten Ausdauer- vs. Krafttraining. Während es in der Ausdauergruppe und der Intervalltrainingsgruppe zu einem 3-fachen Anstieg der mRNA Expression von iNOS kam, war in der Krafttrainingsgruppe kein Effekt zu beobachten. Auch die intra-individuelle iNOS mRNA Expression war einer ähnlichen Regulation unterworfen (mittlere %-Anstiege: KG $87 \pm 28\%$, AT $329 \pm 43\%$, IT $357 \pm 35\%$, KT $127 \pm 30\%$) (**Abb. 18**).

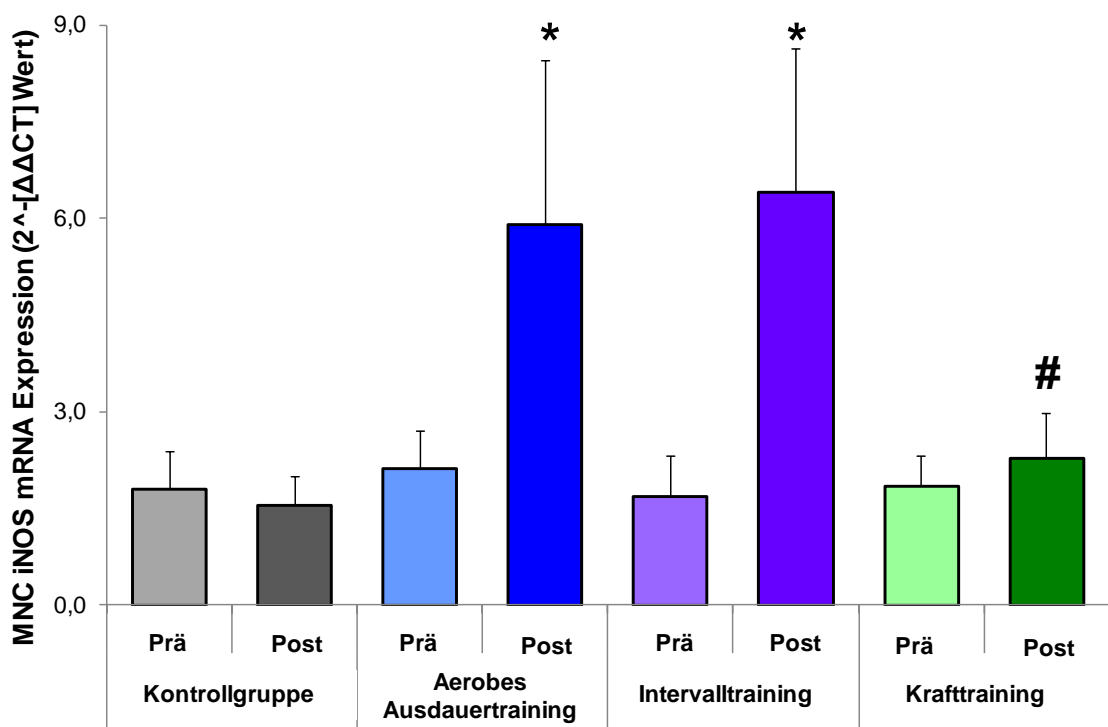


Abb. 18: iNOS mRNA-Expression in der SAUSE-Studie. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. # $p < 0,05$ im Vergleich zur Ausdauergruppe.

Im Gegensatz zur Telomeraseaktivität und iNOS-Expression, bei denen 6-monatiges Krafttraining keinen signifikanten Effekt zeigte, waren TRF2, POT1 und Ku70 bei allen 3 Trainingsformen heraufreguliert und p16 auf mRNA Ebene vermindert. Es stellte sich

nun die Frage, ob es basierend auf dieser differentiellen Regulation auch Unterschiede in der Telomerlänge gibt.

4.2.9. Regulation der Telomerlänge

Die Bestimmung der Telomerlängenänderung erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden. Zum einen mittels FACS-FlowFISH und Real-Time PCR. Als Bestätigungsexperiment und zur genauen Umrechnung der mittels Fluoreszenz gemessenen Telomerlängen Absolutwerte (Basenpaare) wurde die Southern Blot-Methode herangezogen.

4.2.9.1. Messung der Telomerlängenänderung mittels Flow-FISH

Abbildung 19 zeigt die Telomerlängenänderung für Lymphozyten und Granulozyten während des 6-monatigen Beobachtungszeitraums für die vier verschiedenen Gruppen. Nach 6 Monaten fand sich eine diskrete Abnahme der Telomerlänge in der Kontrollgruppe und der Krafttrainingsgruppe. Signifikante Unterschiede fanden sich in der aeroben Ausdauer- und Intervalltrainingsgruppe. Hier zeigte sich für beide Zellpopulationen eine signifikante Zunahme der Telomerlänge. Unter Zuhilfenahme der Ergebnisse aus dem Southern-Blot konnten die Ergebnisse in absolute Kilo-Basen-Paare umgerechnet werden. In der Ausdauergruppe kam es bei den Lymphozyten zu einer Zunahme der Telomerlänge um $218 \pm 42\text{bp}$, bei den Granulozyten um $248 \pm 70\text{bp}$. In der Intervalltrainingsgruppe betrug die Zunahme $214 \pm 57\text{bp}$ (Lymphozyten) und $261 \pm 62\text{bp}$ (Granulozyten) (**Abb.19A**). Beim Vergleich der relativen intra-individuellen Änderungen der Telomerlänge fanden sich ähnliche Ergebnisse (**Abb.19C**). Die aerobe Ausdauergruppe und die Intervalltrainingsgruppe zeichnete sich durch 3,3-3,5% längere Telomere nach Absolvieren des 6-monatigen Beobachtungszeitraums aus.

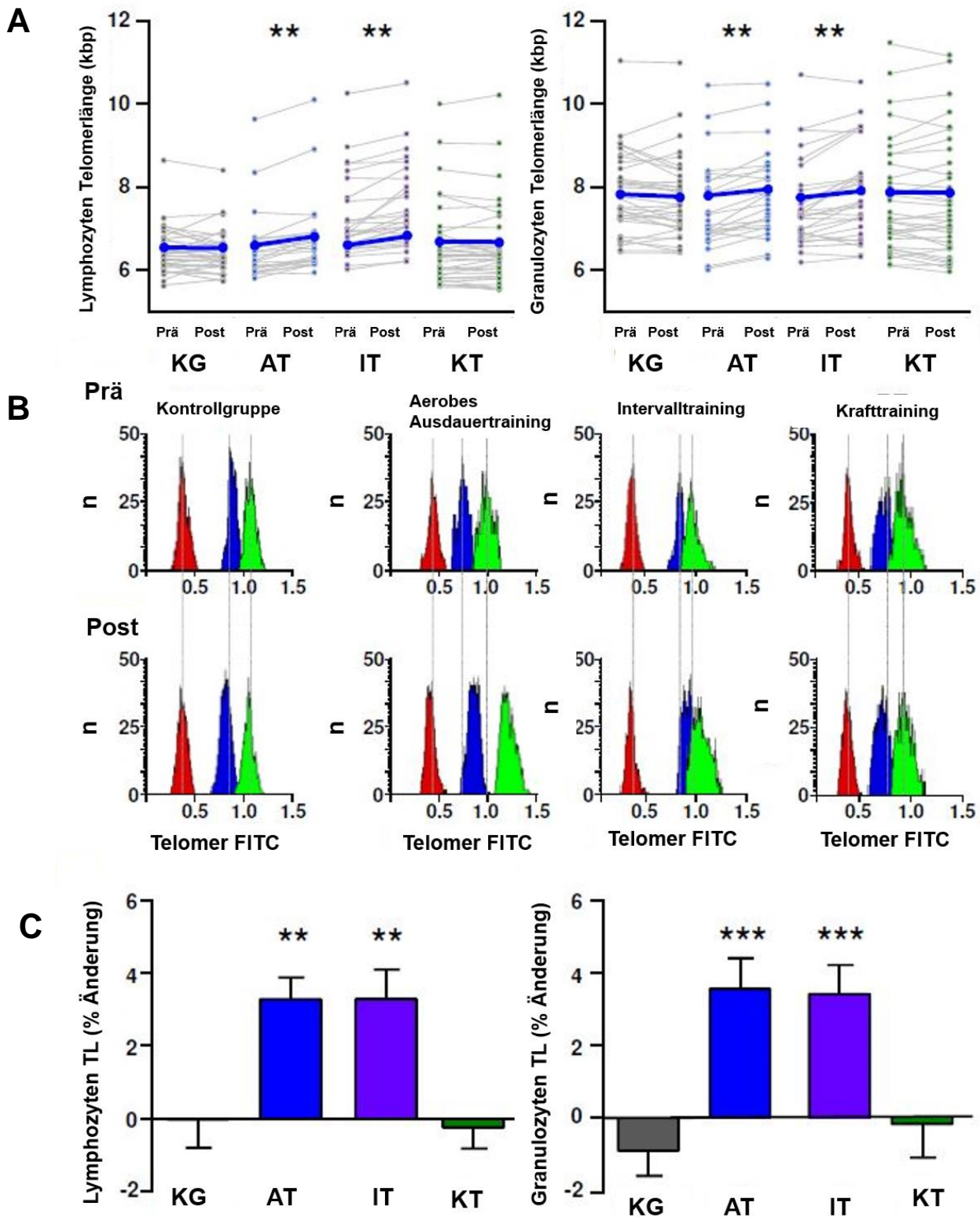


Abb. 19: Telomerlängenmessung mittels FlowFISH-FACS. **(A)** Individuelle absolute Telomerlängen für Lympozyten und Granulozyten in den 4 Gruppen. Mittelwerte sind als blaue Balken dargestellt. $**p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. **(B)** FlowFISH-FACS-Bilder für jeweils einen repräsentativen Teilnehmer jeder Gruppe; Trainingsintervention bzw. Kontrolle; „prä“ (obere Zeile) u. „post“ (untere Zeile); rot: Thymozyten (interner Standard); blau: Lympozyten; grün: Granulozyten. **(C)** Mittelwert der individuellen prozentualen Veränderung der Lympozyten- bzw. der Granulozyten-Telomerlänge für jede Gruppe. $**p < 0,001$, $***p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.2.9.2. Real-Time PCR zur Messung der MNC-Telomerlänge

Mithilfe dieser ergänzenden Methode wurden die mittels FlowFISH-FACS gewonnenen Ergebnisse bestätigt. Die Telomerlänge wurde in der genomischen DNA der mononukleären Zellen des peripheren Blutes durch Einsatz einer Real-Time PCR bestimmt. Im Gegensatz zur FlowFISH-Methode werden hier alle Zellpopulationen gleichzeitig gemessen. Die PCR-Methode wird sehr häufig angewendet, weil sie im Gegensatz zur FlowFISH-Methode eine Analyse großer Probenzahlen in kurzer Zeit erlaubt. Allerdings ist sie weniger genau und eher „Hypothesen-generierend“, z.B. ist keine Differenzierung verschiedener Zellpopulationen möglich. Passend zu den oben gewonnenen Erkenntnissen konnte auch hier in der Kontroll- und Krafttrainingsgruppe keine signifikante Änderung der Leukozyten-Telomerlänge nach 6 Monaten beobachtet werden. In der Ausdauer- und Intervalltrainingsgruppe fand sich jedoch ein signifikanter Anstieg (Ausdauer: $\Delta T/S: 0,14 \pm 0,05$; Intervall: $\Delta T/S: 0,06 \pm 0,05$) (**Abb. 20**).

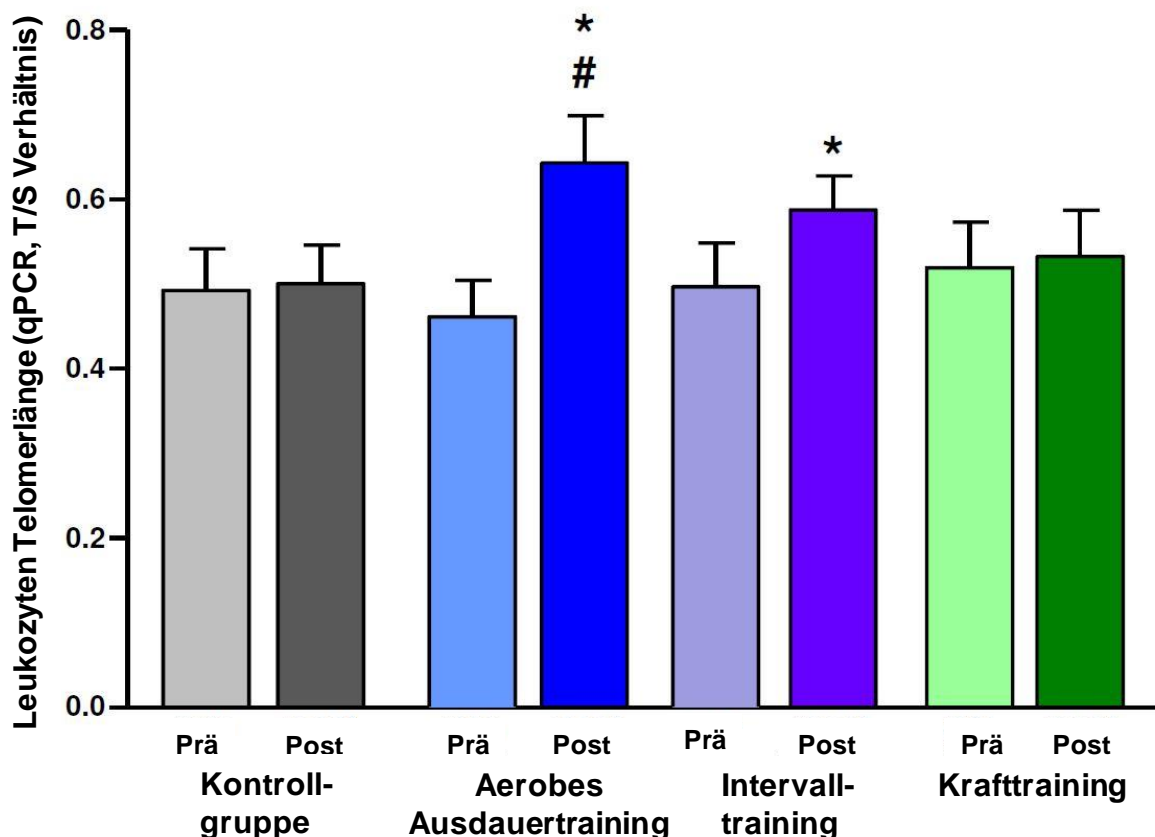


Abb.20: Die Leukozytentelomerlänge mittels Real-time PCR bestimmt. Neben der Telomerlänge (T) wurde das Single-copy-Gen 36b4 (S) amplifiziert. Dies erlaubt die Berechnung eines Verhältnisses T/S für jeden Probanden zu beiden Bestimmungszeitpunkten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der T/S Ratio pro Gruppe. * $<0,05$ gegenüber dem Zeitpunkt „Prä“ der korrespondierenden Gruppe. # $<0,05$ gegenüber dem Zeitpunkt „Post“ der Kontrollgruppe.

4.2.10. Lineare multivariable Regressionsanalyse der Veränderungen von Telomeraseaktivität und Telomerlänge

Tabelle 2 zeigt, dass die adaptive Randomisation in der SAUSE-Studie erfolgreich war und zu einer homogenen Verteilung auf die 4 Gruppen geführt hat, was Alter, Geschlecht und VO₂max bei Studieneinschluss betrifft. Vor diesem Hintergrund scheinen die beobachteten molekularbiologischen Effekte auf Telomer-assoziierte Proteine und Seneszenzregulatoren unabhängig von Unterschieden in den Basischarakteristika der Gruppen zu sein. Allerdings war es sinnvoll, über die in den vorangehenden deskriptiven Analysen hinaus eine Regressionsanalyse durchzuführen, um die statistische Validität der wichtigsten Befunde zu prüfen. Nachdem die Normalverteilung aller inkludierten Variablen gezeigt war, eignete sich hierzu am besten das als *general estimation equation* gezeigte multivariable lineare Regressionsmodell, in dem die Veränderungen bestimmter Zielparameter zwischen zwei Zeitpunkten in Bezug gesetzt werden können zu numerischen Parametern, die über die Zeit ebenfalls Änderungen unterliegen (Alter, BMI, VO₂max) und dies gleichzeitig zwischen mehr als zwei Gruppen zu untersuchen. Die GEE-Analyse zeigte, dass die Änderungen der Telomerlänge und Telomeraseaktivität in der AT- und IT-Gruppe statistisch signifikant waren im Vergleich zu KG u. Kontrollgruppe. Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Veränderungen der körperlichen Leistungsfähigkeiten mit den molekularen Veränderungen assoziiert sind.

Lymphocyte telomere length					b) Adjusted model (N=241)				
a) Influence of study group (N=244)									
Parameter	Regression coefficient B	Standard error	Hypothesis test		Parameter	Regression coefficient B	Standard error	Hypothesis test	
			Wald-Chi-Square	Sig.				Wald-Chi-Square	Sig.
Constant term	5.24	52.72	0.010	0.92	Constant term	-159.53	482.53	0.11	0.74
[d1=1] = AET	187.18	70.61	7.03	0.008	[d1=1] = AET	195.35	73.31	7.10	0.008
[d2=1] = IT	209.10	76.97	7.38	0.007	[d2=1] = IT	220.16	78.85	7.80	0.005
[d3=1] = RT	-16.27	69.61	0.06	0.82	[d3=1] = RT	7.44	72.16	0.011	0.92
[d1-3=0] = Control	Reference				[Sex=1]	40.09	57.77	0.48	0.49
Missing samples excluded: N=2 telomere length					Age	5.66	4.68	1.46	0.23
					VO2max	-0.76	3.89	0.04	0.85
					BMI	-4.91	9.52	0.27	0.61
					Missing samples excluded: N=2 telomere length, N=3 BMI post				

Granulocyte telomere length					b) adjusted model (N=241)				
a) Influence of study group (N=244)									
Parameter	Regression coefficient B	Standard error	Hypothesis test		Parameter	Regression coefficient B	Standard error	Hypothesis test	
			Wald-Chi-Square	Sig.				Wald-Chi-Square	Sig.
Constant term	-53.18	55.79	0.91	0.34	Constant term	325.04	552.70	0.35	0.56
[d1=1] = AET	266.07	92.99	8.19	0.004	[d1=1] = AET	259.19	93.46	7.69	0.006
[d2=1] = IT	314.56	82.38	14.58	0.0001	[d2=1] = IT	316.46	83.75	14.28	0.0002
[d3=1] = RT	45.59	93.66	0.24	0.63	[d3=1] = RT	51.41	100.72	0.26	0.61
[d1-3=0] = Control	Reference				[Sex=1]	31.73	83.57	0.14	0.70
Missing samples excluded: N=2 telomere length					Age	-1.56	5.41	0.08	0.77
					VO2max	-0.61	4.68	0.02	0.90
					BMI	-12.55	13.12	0.92	0.34
					Missing samples excluded: N=2 telomere length, N=3 BMI post				

Telomerase activity					b) adjusted model (N=229)				
a) Influence of study group (N=232)									
Parameter	Regression coefficient B	Standard error	Hypothesis test		Parameter	Regression coefficient B	Standard error	Hypothesis test	
			Wald-Chi-Square	Sig.				Wald-Chi-Square	Sig.
Constant term	36.62	38.29	0.92	0.34	Constant term	676.57	437.65	2.39	0.12
[d1=1] = AET	266.54	115.39	5.34	0.021	[d1=1] = AET	273.62	113.20	5.84	0.016
[d2=1] = IT	185.07	62.22	7.15	0.008	[d2=1] = IT	207.09	71.25	8.45	0.004
[d3=1] = RT	34.12	53.37	0.41	0.52	[d3=1] = RT	64.25	57.98	1.23	0.27
[d1-3=0] = Control	Reference				[Sex=1]	-0.99	56.48	0.00	0.99
Missing samples excluded: N=8 telomerase					Age	2.14	4.06	0.28	0.60
					VO2max	-9.67	5.53	3.07	0.08
					BMI	-16.68	9.61	3.01	0.08
					Missing samples excluded: N=8 telomerase, N=3 BMI post				

Abb.21: General estimating equation (GEE, gemischtes lineares Regressionsmodell), um den Einfluss der Trainingsintervention unter Einziehung klinischer Variablen auf Telomerlänge in Leukozytensubpopulationen und MNC-Telomeraseaktivität in der SAUSE-Studie zu prüfen, zeigt dass die Veränderungen statistisch signifikant und unabhängig von Alter, Geschlecht, BMI und VO2max zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt sind.

4.2.11. Die Änderung der maximalen Sauerstoffaufnahme ist mit der molekularen Trainingsantwort assoziiert

Unter der Vermutung, dass die Änderung der körperlichen Leistungsfähigkeit eine Vorhersage der zellulären Antwort ermöglicht, wurde dieser Zusammenhang näher untersucht. Pearson-Korrelationen zwischen verschiedenen Parametern körperlicher Leistungsfähigkeit und Telomeraseaktivität, Telomerlänge bzw. Expression Telomer- oder Seneszenz-assoziiierter Proteine zeigten insgesamt nur eine schwache Assoziation. Ebenso fanden sich keine Assoziationen zu den (geringen) Veränderungen klinischer Parameter wie Ruhepuls, Blutdruck, oder metabolischer Parameter. Da die Gruppen bei Studienstart wie in **Tab. 1** gezeigt sehr homogen waren, liegt dies entweder an der geringen N-Zahl oder daran, dass kein Zusammenhang besteht. Außerdem lassen molekularbiologische Analysen in Blutzellen evtl. keine Rückschlüsse auf Trainingseffekte im ganzen Körper zu, die von

multiplen Faktoren beeinflusst werden. Dennoch unternahmen wir den kategorischen Vergleich zwischen dem objektivsten Vergleichsmaß der körperlichen Trainingseffekte zwischen den Gruppen, der Änderung der maximalen Sauerstoffaufnahmekapazität VO₂max (zwischen den einzelnen Interventionsgruppen ähnlich, **Tabelle 3**) und molekularen Regulatoren. Bei Individuen mit einem überdurchschnittlichen Anstieg der VO₂max zeigten sich nach 6-monatigem Training auch eine überdurchschnittliche Zunahme der Telomeraseaktivität und kongruente Veränderungen von TRF2, POT1 und Ku70 sowie eine inverse Veränderung von p16 (**Abb. 22**). Dies eröffnet die Perspektive einer Verbindung von klinischer Trainingsantwort zu molekularer Trainingsantwort, doch die zugrundeliegenden Mechanismen lassen sich aus dieser Beobachtung nicht ableiten.

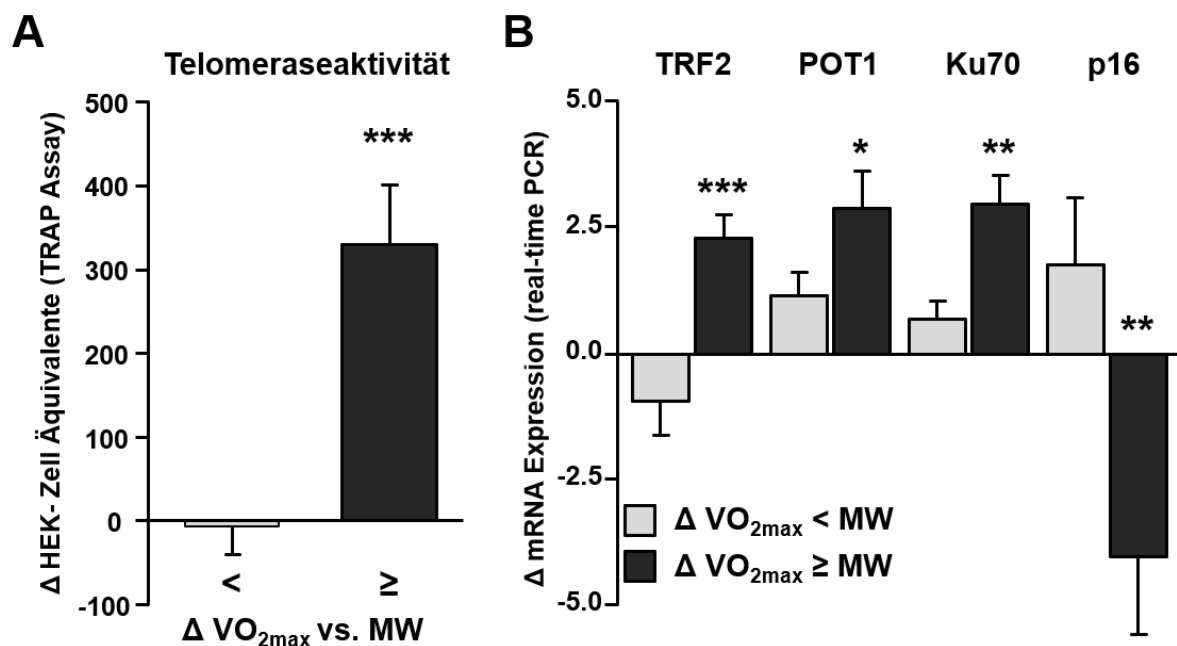


Abb.22: Änderung der Telomeraseaktivität und Expression seneszenz-regulierender Faktoren in Abhängigkeit der Änderung der maximalen Sauerstoffaufnahmekapazität (VO₂max) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 im Vergleich zu VO₂max <MW. MW = Mittelwert aller Trainingsgruppen.

4.2.12. Repräsentatives Herzfrequenzverhalten der drei Interventionsgruppen

Wie in **Tab. 1, 2** und **Abb. 21** gezeigt, waren die Gruppen zu Beginn der SAUSE-Studie homogen verteilt und die differentielle Regulation der Telomerparameter zwischen Ausdauer- und Krafttraining war nur von der Trainingsintervention abhängig. Der in **Abb. 22** gezeigte kategorische Zusammenhang zwischen Änderungen der VO₂max, über alle Probanden gesehen, und molekularen Veränderungen, gibt einen Hinweis auf mögliche direkte Zusammenhänge zwischen körperlicher Fitness und zellulärer Alterung, erlaubt jedoch keinen Rückschluss auf Unterschiede zwischen den Trainingsformen. Wir haben die Hypothese, dass unterschiedliche hämodynamische Beanspruchungen im Vergleich zwischen Ausdauer- und Krafttraining bedeutsam sind. In Unterstützung dieser Hypothese zeigt **Abb. 23** abschließend einen direkten Vergleich des Herzfrequenzverlaufs eines männlichen Studienteilnehmers beim Absolvieren aller Studienprotokolle der Langzeitstudie unter kontinuierlicher Aufzeichnung der Herzfrequenz mittels Pulsuhr. Es zeigt sich deutlich, dass sowohl in der Ausdauer- als auch in der Intervalltrainingsgruppe eine deutlich höhere mittlere und maximale Herzfrequenz zu verzeichnen ist als in der Krafttrainingsgruppe. In der Ausdauer- und Intervalltrainingsgruppe zeigt sich eine ähnliche maximale Herzfrequenz (AT = 184/min, IT = 183/min). Die durchschnittliche Herzfrequenz ist in der Ausdauertrainingsgruppe leicht höher als in der Intervalltrainingsgruppe (AT = 163/min, IT = 154/min). Mit einer durchschnittlichen Herzfrequenz von 101/min und einer maximalen Herzfrequenz von 127/min unterscheidet sich das Krafttraining hier deutlich beim Herzfrequenzverhalten. Dies unterstreicht die Hypothese, dass hämodynamische Unterschiede zwischen Ausdauer- und Krafttraining für die molekularen Unterschiede bedeutsam sein könnten. Leider liegen solche Aufzeichnungen nicht systematisch von den Probanden der SAUSE-Studie vor.

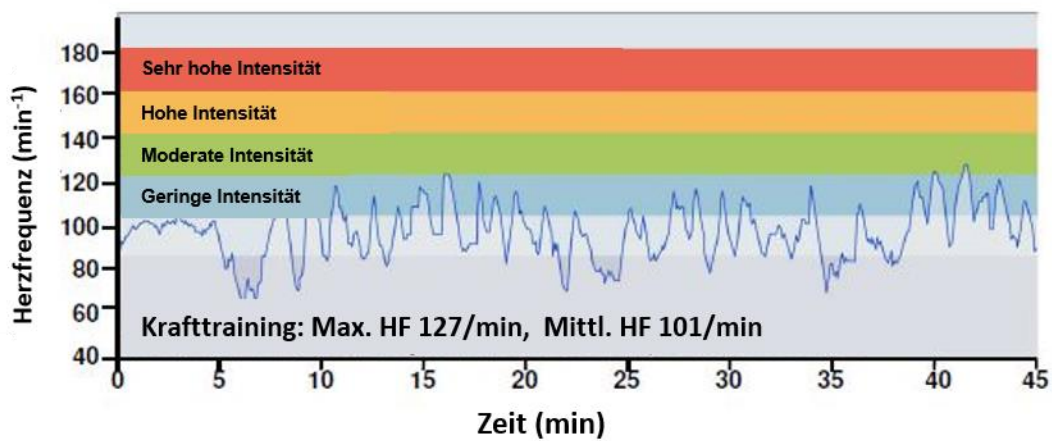
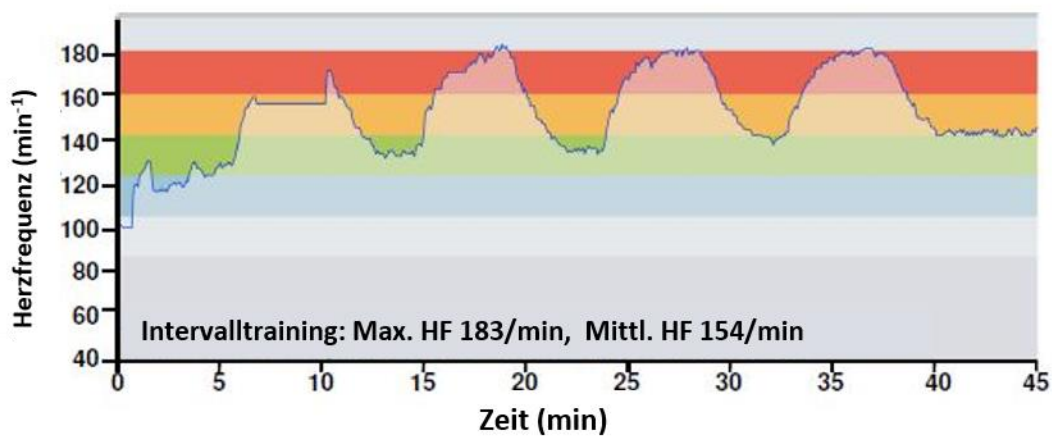
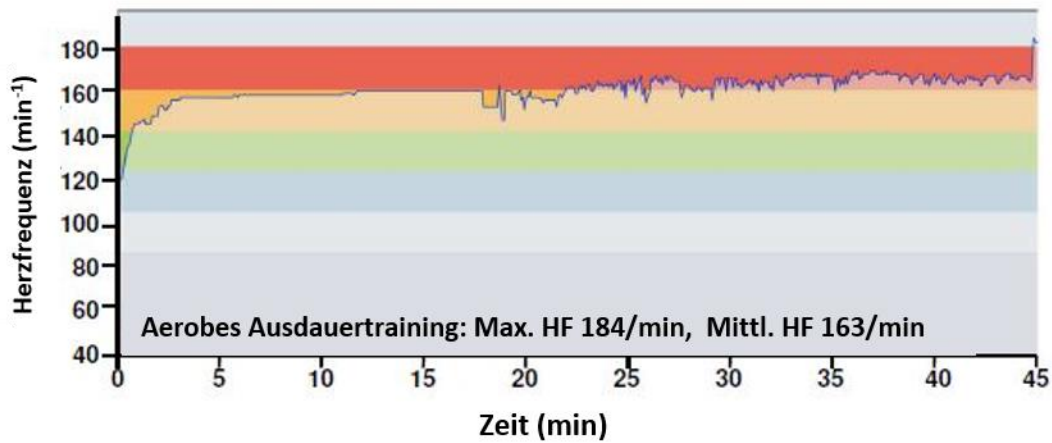


Abb.23.: Interindividueller Vergleich eines männlichen, durchschnittlich trainierten Studienteilnehmers beim Absolvieren der Studienprotokolle der Interventionsgruppen der Langzeitstudie. Die beiden Formen der Ausdauerbelastung zeichnen sich durch deutlich höhere mittlere und maximale Herzfrequenzen gegenüber dem Krafttraining aus.

5. Diskussion

5.1. Differentielle Effekte auf molekulare Zellalterungsvorgänge nach einmaligem Trainingsreiz

In unserer alternden Gesellschaft ist das Thema der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen von größter Relevanz. Die Telomerbiologie verbindet zwei der stärksten kardiovaskulären Risikofaktoren miteinander, das Altern und die körperliche Inaktivität. Am Ende der Chromosomen sind die Telomere maßgeblich an der genomischen Integrität beteiligt und für die Unversehrtheit der Erbinformation mitverantwortlich [11,23]. Im natürlichen Alterungsprozess kommt es zu einem schrittweisen Telomerverlust und ab Erreichen einer kritischen Grenze zu einem Verlust der Teilungsfähigkeit und damit zu replikativer Seneszenz. Stammzellen und auch Krebszellen sind dazu in der Lage, die Telomerlänge über zahlreiche Zellteilungen hinweg aufrechtzuerhalten und sind potentiell unbegrenzt teilungsfähig (Blackburn 2001). Nicht nur beim natürlichen Alterungsprozess spielt die Telomerlänge eine maßgebliche Rolle; der Abbau der Telomere ist auch an der Entstehung verschiedener Krankheitsprozesse und Syndrome beteiligt [10]. So konnte beispielsweise ein Zusammenhang zwischen der Telomerlänge zirkulierender Leukozyten und dem Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis und weitere Erkrankungen hergestellt werden [13,25,61,62]. Mehrere Interventionsstudien zeigen jedoch, dass die Regulation der Telomerlänge Lebensstiländerungen zugänglich ist und einem Abbau in begrenztem Rahmen entgegengewirkt werden kann [24,26,62]. Zu diesen Lebensstiländerungen zählt auch körperliche Aktivität. Hier konnte gezeigt werden, dass körperliche Aktivität nicht nur die allgemeine Leistungsfähigkeit, Gewicht und metabolische Parameter positiv beeinflusst, sondern auch ein Regulator der Telomerlänge und damit der Zellalterung ist [19,46,59,62,84,85].

Die Akuteffekte körperlicher Betätigung auf zelluläre Alterungsfaktoren sind bisher weitgehend unbekannt. Daten aus zwei Akutstudien zu körperlicher Aktivität legen eine Akutregulation von Telomerase und telomer-assoziierten mRNAs und miRNAs nahe. Chilton et al. untersuchten an 22 jungen Männern zu drei Zeitpunkten (prä, post, 1h post) die mRNA Expression nach 30-minütigen Lauftraining auf einem Laufband. Neben der Beobachtung einer Veränderung der Leukozytensubpopulation nach Belastung konnte interessanterweise eine Hochregulation der TERT-mRNA und

zahlreiche regulierte miRNAs beobachtet werden, die mit der Telomeraseaktivität und Telomerefunktion assoziiert sind [20]. TERT steht für die katalytische Untereinheit des Enzyms Telomerase, sodass vermutet werden konnte, dass auch die Gesamtaktivität dieses Enzyms einer Regulation durch körperliche Aktivität unterliegt. Diese Beobachtung konnte in einer Studie von Zietzer et. al bestätigt werden. Hier wurden zwei verschiedene Gruppen beobachtet. In einer ersten Studie beobachtete man 26 junge Probanden (m=13, w=13) in einem Cross-over-Design. Verglichen wurde ein einmaliges 30-minütiges Lauftraining und eine einmalige 45-minütige IRST (individual shear rate therapy). Dieser Vergleich erfolgte mit dem Hintergedanken an die mangelnde Belastbarkeit eines älteren Patientenkollektivs mit kardiovaskulären Erkrankungen wie pAVK. Nach einmaligem 30-minütigen Lauftraining konnte eine signifikante Erhöhung der Telomeraseaktivität in den MNCs festgestellt werden, die sich jedoch nicht nach IRST fand. In einer zweiten Studie untersuchte man die Langzeiteffekte einer IRST bei 14 älteren Patienten. Nach insgesamt 30h IRST konnte hier ebenfalls ein Anstieg der Telomeraseaktivität und eine Hochregulation der TRF2-mRNA beobachtet werden. Fragen nach einer differentiellen Regulation der Telomeraseaktivität und mRNA-Expression telomer-assoziiierter Proteine bei verschiedenen Trainingsformen und deren mögliche Hintergründe blieben bislang komplett unbeantwortet. Diesbezüglich liefert die hier vorliegende Akutstudie wichtige neue Erkenntnisse. In einem Cross-over-Design wurde bei 15 jungen, gesunden Probanden nach einer Leistungsdiagnostik und einem Probetraining an ausgewählten Kraftgeräten jeweils ein 45-minütiges Lauftraining bzw. ein 45-minütiges Krafttraining an 8 vorgegebenen Geräten durchgeführt. TRAP-Assay und Real-time-PCR Ergebnisse aus Ficoll-isolierten MNCs zeigten eine signifikante differentielle Regulation mehrerer Parameter. Ähnlich wie bei Zietzer et. al kam es nach dem Lauftraining zu einer signifikanten Steigerung der Telomeraseaktivität, sowohl direkt im Anschluss an das Training als auch 24h danach. Dieser Effekt ließ sich bei denselben Probanden nach Krafttraining nicht beobachten. Mittels Real-Time PCR untersuchten wir die mRNA-Expression von TRF2, Ku70, POT1 und p16. Die drei Proteine TRF2, Ku70 und POT1 spielen eine Rolle bei der Regulation der Zellalterung. p16 gilt neben seiner Funktion als Tumorsuppressorprotein als bedeutender Seneszenzmarker. Isoliert nach dem Ausdauertraining fand sich eine Heraufregulation der telomer-stabilisierenden Faktoren TRF2, Ku70 und POT1. Beim Krafttraining kam es zu keiner Regulation dieser Faktoren, jedoch war die mRNA-Expression von p16

nach Krafttraining signifikant erhöht, nach Lauftraining signifikant erniedrigt. Diese differentielle Regulation ist eine neue und unerwartete Erkenntnis deren genaue Mechanismen noch weiter untersucht werden müssen.

5.2. Differentielle Effekte auf molekulare Zellalterungsvorgänge nach sechsmonatigem Training

Seit Morris et al im Jahr 1953 ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko für hauptsächlich sitzende Busfahrer im Gegensatz zu den aktiveren Schaffnern beschrieben haben, gab es eine Reihe von Studien, die einen positiven Effekt von körperlichem Training auf viele Aspekte körperlicher Gesundheit gezeigt haben. Dazu gehören eine erhöhte körperliche Leistungsfähigkeit, bessere Endothelfunktion, gesteigerte Insulinsensitivität, Verbesserung autonomer Funktionen, niedrigere Blutdruckwerte, abdominale Fettreduktion, verbessertes Lipidprofil, Verbesserung von Entzündungsparametern und positive psycho-soziale Effekte [42,63,67]. Parallel dazu wurde ein Zusammenhang zwischen regelmäßigem körperlichem Training und Regulatoren der Zellregeneration und -alterung beobachtet [19,46,59,62,66,84,85]. Zwischen Telomerlänge in zirkulierenden Leukozyten und kardiovaskulärer Morbidität konnte mehrfach ein direkter Zusammenhang festgestellt werden (z.B. Farzaneh-Far *et al.*, 2008). All diese Beobachtungen führten zu einer Empfehlung der Fachgesellschaften zur Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen mithilfe körperlichen Trainings [63].

Trotz der vielen epidemiologischen Belege fehlt es fast komplett an prospektiven Trainingsstudien zum Thema der Auswirkung körperlicher Aktivität auf Zellalterungsparameter. Einzig Melk et al. untersuchten bei 59 männlichen Probanden mit einem wöchentlichen Trainingsumfang von 210min in einer prospektiven Trainingsstudie die Effekte körperlicher Aktivität auf das biologische Alter. Zu diesem Zweck wurde nach sechs Monaten die Telomerlänge bestimmt, die Telomeraseaktivität gemessen und die p16-Expression bestimmt. Hier ließen sich für alle 3 Parameter Ergebnisse im Sinne eines „Anti-Aging“-Effekts zeigen [56]. Die Ergebnisse der Studie lassen jedoch nur begrenzte Rückschlüsse zu, da die Studie weder kontrolliert noch randomisiert war. Außerdem ist das exakte Trainingsprotokoll nicht bekannt, es waren nur männliche Teilnehmer in die Studie eingeschlossen und die Methode der

Telomerlängenmessung ist nicht detailliert beschrieben. Dies ist in Anbetracht des spannenden Ergebnisses sehr schade. Ein differentieller Effekt verschiedener Trainingsformen wie Kraft- oder Intervalltraining ist bisher nie untersucht worden. Weitere prospektive Trainingsstudien zum Thema körperlicher Aktivität und deren Effekten auf die Zellalterung liegen nicht vor. Nach den Ergebnissen unserer Vorstudien (Werner et al., 2009) und der Akutstudie wurde in der prospektiven Trainingsstudie besonders auf eine Kontrollgruppe, eine optimale Randomisierung, einen genügenden Nachbeobachtungszeitraum und die Aufnahme verschiedener Trainingsformen Wert gelegt. Zudem sollten diese möglichst eine vergleichbare Trainingsintensität haben. Ferner kamen nur Probanden in die molekulare Analyse, bei denen im Rahmen der durch Trainer, Pulsuhren und Trainingstagebücher eine mindestens 70%ige Trainingscompliance nachweisbar war.

Im Vergleich zur Akutstudie wurde in der SAUSE-Studie bei einem Beobachtungszeitraum von sechs Monaten auch die Telomerlänge mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Außerdem wurde ergänzend zur Kraft- und Ausdauergruppe, die schon in der Akutstudie vorhanden waren, noch eine Intervalltrainingsgruppe aufgenommen. Dem Intervalltraining wird eine effektivere Steigerung der kardio-respiratorischen Fitness als bei gleichmäßiger Ausdauerbelastung zugesprochen [21,86]. Ob sich diese Wirksamkeit auf die körperliche Leistungsfähigkeit auch auf zelluläre Alterungsfaktoren übertragen lässt, wurde bislang noch nie untersucht.

In allen 3 Interventionsgruppen war nach Absolvieren des 6-monatigen Studienzeitraums eine ähnliche Steigerung der körperlichen Fitness - gemessen an der VO₂max - zu sehen. Wie erwartet zeigten sich Steigerungen der maximalen Laufgeschwindigkeit bei 130bpm und 150bpm eher in den Ausdauergruppen und eine Steigerung der basalen Stoffwechselrate in der Krafttrainingsgruppe aufgrund der gesteigerten Muskelmasse. Effekte des Trainings auf Puls, Blutdruck und klinisch-chemische Parameter waren sichtbar und gingen in die erwartete Richtung, waren aber eher dezent, wie bei einer gesunden Primärpräventionskohorte zu erwarten.

Die Hauptidee der Studie fand sich bei Untersuchung differentieller Effekte der drei verschiedenen Trainingsformen auf die Telomerlänge und die Telomeraseaktivität.

Während Intervall- und aerobes Ausdauertraining über den 6-monatigen Beobachtungszeitraum zu einer signifikanten Steigerung der Telomerlänge führte,

konnte dies in der Kraftgruppe und der Kontrollgruppe nicht beobachtet werden. Parallel dazu verhielt sich auch die Telomeraseaktivität, die lediglich in den beiden ausdauerbasierten Trainingsgruppen deutlich erhöht war. Diese Beobachtungen sind gut mit den Ergebnissen aus der Akutstudie in Deckung zu bringen. Unterschiede zwischen der akuten und der chronischen Studie fanden sich allerdings bei der Regulation der telomer-assoziierten Proteine und des Seneszenzmarkers p16. Während es in der Akutstudie auch hier nur nach Ausdauertraining zu einer signifikanten Regulation kam, war in der prospektiven Trainingsstudie eine Regulation sowohl in der Intervall- als auch in der aeroben Ausdauergruppe und der Kraftgruppe zu verzeichnen. In allen drei Interventionsgruppen war die mRNA Expression für die telomer-stabilisierenden Proteine TRF2, Ku70 und POT1 signifikant erhöht, im Gegenzug in allen drei Gruppen die Expression von p16 signifikant erniedrigt. Die Unterschiede der Regulation zwischen dem Akutversuch und der prospektiven Trainingsstudie zeigen die Notwendigkeit prospektiver, randomisierter Trainingsstudien mit Kontrollgruppe und einem langen follow-up Zeitraum auf, weil akut und chronisch unterschiedliche Effekte zu beobachten sind.

5.3. Potentielle Regulationsmechanismen

Bei der Frage nach potentiellen Regulationsmechanismen muss das Studiendesign und Trainingsprotokoll der hier vorliegenden Trainingsstudien genauer betrachtet werden. Die Akutstudie erfolgte in einem Cross-over-Design, während die Langzeitstudie prospektiv, kontrolliert und randomisiert durchgeführt wurde. Der Umstand, dass die Akuteffekte im Cross-over-Design bzgl. der Telomerase kongruent zu den beobachteten Effekten der Langzeitstudie sind, legt nahe, dass der die Trainingsform selbst bedeutsam ist für die Wirkung auf die Telomerase. Wo liegen nun also die Unterschiede der verschiedenen Trainingsformen, die einen messbaren Effekt in zirkulierenden mononukleären Zellen erklären könnten? Die grundsätzlichen Unterschiede finden sich zum einen im Trainingsablauf, zum anderen in der Belastung des Muskelapparats und des Herz-Kreislaufsystems. Während der Trainingsablauf beim 45-minütigen Lauftraining von einer kontinuierlichen, gleichmäßigen submaximalen Belastung ohne Pausen gekennzeichnet ist, gibt es beim Krafttraining zwischen den einzelnen Serien und Geräten vorgegebene Pausen zur Erholung. Das

Intervalltraining ist gekennzeichnet durch ein Wechsel aus submaximaler Belastung bei 60-75% der Herzfrequenzreserve und Intervallen hoher Belastung bei 80-90% der Herzfrequenzreserve [35]. Dies bringt eine grundsätzlich andere hämodynamische Belastung des Herz-Kreislaufsystems mit sich. Herzfrequenz und Blutdruck sind beim Kraft- und Intervalltraining einer größeren Schwankungsbreite unterworfen, wobei das Intervalltraining durch ein höheres Aktivitätslevel im Gegensatz zum Krafttraining gekennzeichnet ist. Langfristig kommt es durch diese Unterschiede der Trainingsformen auch zu einer unterschiedlichen Anpassungsreaktion des Körpers. So kommt es im Rahmen aeroben Ausdauertrainings zu deutlich stärkeren Veränderungen kardio-vaskulärer Parameter als im Rahmen des Krafttrainings [55]. Diese Unterschiede finden sich in **Tabelle 4** zusammengefasst.

	Ausdauertraining	Krafttraining
VO2	+++	+/=
Ruhepuls	--	=
Schlagvolumen	++	=
Maximale kardiale Auswurfleistung	++	=
Systolischer Ruheblutdruck	-/=	=
Diastolischer Ruheblutdruck	-/=	=
Linksventrikuläre Hypertrophie	asymmetrisch	symmetrisch
Überlastungsmechanismus	Volumenbelastung	Volumen- und Druckbelastung

Tabelle 4: Anpassungsreaktionen an Kraft-bzw. Ausdauertraining, modifiziert nach: Meka et al., *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 2008)

Um die unterschiedlichen hämodynamischen Anforderungen der verschiedenen Trainingsformen zu verdeutlichen, wurde ein direkter Vergleich der drei Trainingsformen im Hinblick auf das Herzfrequenzverhalten durchgeführt. **Abb. 23** zeigt, dass die mittlere und die maximale Herzfrequenz bei Intervall- und Ausdauertraining in beiden Fällen deutlich höher ist als beim Krafttraining. Dies bringt wahrscheinlich einen erhöhten laminaren Scherstress beim Ausdauer- und Intervalltraining mit sich.

Ein potentieller Regulator der beobachteten hämodynamischen Unterschiede auf die gewonnenen Erkenntnisse auf zellulärer Ebene stellt Stickstoffmonoxid dar. Eine

erhöhte Bioverfügbarkeit von NO ist einer der wesentlichen Mediatoren protektiver Effekte körperlicher Aktivität [46] und wird mit einem verlangsamten Alterungsprozess des Gefäßsystems in Verbindung gebracht [53]. Knock-out Mausmodelle mit eNOS-defizienten Mäusen zeigten bereits, dass Effekte von Ausdauertraining auf Telomeraseaktivität und Expression telomer-regulierender Proteine bei diesen Mäusen nicht nachweisbar waren [85]. Diesbezüglich ist die Studie von Zietzer et al. interessant, da hier in einer Gruppe älterer Patienten mit pAVK nach 30h-ISRT eine signifikante Steigerung der Telomeraseaktivität gemessen werden konnte. Bei der ISRT wird genau dieser Scherstress erzeugt, ohne dass dem jedoch eine körperliche Anstrengung vorangeht. Geht man von einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid als Vermittler zwischen Scherstress und Telomerregulation aus, kommt auch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) ins Spiel. Hochinteressant ist vor diesem Hintergrund, dass für iNOS eine aktivitätsabhängige Hochregulation beschrieben wurde [66], die für die Neoarteriogenese von zentraler Bedeutung ist. Unterstützt wird diese Hypothese in der prospektiven Trainingsstudie durch die Regulation der iNOS mRNA-Expression, die ebenfalls isoliert in den Ausdauergruppen gesteigert ist. Betrachtet man die Korrelationen der iNOS mRNA-Expression zur Telomeraseaktivität, TRF2, POT1 und Ku70, finden sich auch hier gleichgerichtete Zusammenhänge. Dies spricht für eine wichtige Rolle im Signalweg zwischen körperlicher Aktivität und den Auswirkungen auf die Zellalterung.

5.4. Erkenntnisse für die Prävention kardiovaskulärer Ereignisse

Die aktuelle Empfehlung der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie empfiehlt als Klasse 1A Empfehlung eine moderate körperliche Aktivität von mindestens 150min pro Woche oder intensive körperliche Aktivität von mindestens 75min pro Woche zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse. Eine spezifische Trainingsform ist unter körperlicher Aktivität nicht genauer definiert, wobei jedoch darauf hingewiesen wird, dass es für aerobes Ausdauertraining die solideste Datenlage gibt [63]. Außerdem wird auf eine positive Dosis-Wirkungsbeziehung hingewiesen und empfohlen, im Verlauf den Umfang körperlicher Aktivität auf wöchentlich 300min moderate oder 150min fordernde körperliche Aktivität zu steigern. Für Intervalltraining gibt es aufgrund der aktuellen Datenlage keine klaren Empfehlungen zur Nutzung dieser Trainingsform zur

Prävention kardiovaskulärer Ereignisse [27]. Für Krafttraining werden positive funktionelle Effekte, erhöhte Muskelmasse und Knochendichte, aber auch positive Effekte auf Blutruck- und Lipidverhalten angeführt. Eingeschränkt wird die Empfehlung jedoch dadurch, dass diese Beobachtungen insbesondere bei Kombination mit aerobem Ausdauersport beobachtet wurden [68].

Die hier vorliegende Studie, die mit einer ähnlichen Trainingsintensität durchgeführt wurde, die in der Leitlinie propagiert wird, bringt für die praktische Anwendung im Rahmen eines primärpräventiven Ansatzes mehrere Erkenntnisse mit sich. Zunächst zeigte sich in der prospektiven Trainingsstudie, dass die Wahl der Trainingsform auf die körperliche Leistungsfähigkeit – gemessen an der VO₂max – eine untergeordnete Rolle spielt. Auch Intervalltraining war hier den anderen Trainingsformen nicht deutlich überlegen. Auf zellulärer Ebene finden sich jedoch sehr wohl differentielle Effekte der unterschiedlichen Trainingsprogramme. Hier zeigte sich ein zellulärer „Anti-Aging“-Effekt der ausdauerbasierten Trainingsgruppen. Als gut zu bestimmender Biomarker dieser anti-seneszenten Effekte konnte die MNC-Telomeraseaktivität identifiziert werden. Diese Ergebnisse legen statt eines alternativen Einsatzes einen ergänzenden Einsatz von Krafttraining im Rahmen kardiovaskulärer Präventionsprogramme nahe. Eine weitere Erkenntnis ist, dass die Telomeraseaktivität nicht nur mit der Trainingsform korreliert, sondern auch mit dem individuellen Trainingseffekt der Probanden (gemessen an der VO₂max). Diese Erkenntnis kann zur besseren Trainingssteuerung genutzt werden, um sogenannte Responder zu identifizieren und ggf. bei Non-Respondern das Training anzupassen.

5.5. Limitationen

Im Vergleich zu anderen kardiovaskulären Studien ist die Teilnehmeranzahl der hier vorliegenden Studie als gering einzuschätzen. Dies liegt jedoch auch an den Herausforderungen randomisierter, prospektiver Trainingsstudien. Generell ist auch bei anderen Trainingsstudien über einen längeren Beobachtungszeitraum eine vergleichbare Drop-out Rate zu verzeichnen [54]. Dennoch ist die vorliegende Arbeit die bisher größte prospektive Trainingsstudie zum Thema der Trainingseffekte auf zelluläre Alterungsvorgänge. Auch der Umstand, dass sofort im Anschluss an jede Blutentnahme eine frische Isolation der mononukleären Zellen nötig war, bringt mit

sich, dass bei wenigen Probanden unvollständige Proben vorlagen oder keine aussagekräftigen Ergebnisse erhoben werden konnten. Während des Studienzeitraums mag es auch dazu gekommen sein, dass die Alltagsaktivitäten der Studienteilnehmer Elemente anderer Trainingsformen beinhalteten, jedoch ist dies auch in der Kontrollgruppe anzunehmen, sodass von einem vernachlässigbaren Effekt auszugehen ist. Die hier vorliegenden Ergebnisse aus einer klinischen Studie lassen keine tiefgehenden Schlüsse auf den vermuteten Signalweg zu, liefern jedoch die Basis für dessen weitere Charakterisierung in zukünftigen Studien. Z.B. muss durch die zeitliche Limitation der SAUSE-Studie vorerst offenbleiben, ob ein langfristiges Krafttraining - unabhängig von einer Steigerung der Telomeraseaktivität - durch die Effekte auf telomer-stabilisierende Proteine bzw. den Shelterinkomplex, doch zu einer Präservierung der Telomerlänge führen kann im Vergleich zu körperlich inaktiven Personen. Abschließend ist zu betonen, dass die Erkenntnisse in einer gesunden Primärpräventionskohorte mittleren Alters gewonnen worden. Ob sich in älteren oder kränkeren Patienten ähnliche Erkenntnisse gewinnen lassen würden, ob eine geringere Trainingsintensität ausreichen würde, und wie lange die Effekte des Trainings auf die Zellalterung überhaupt anhalten, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

5.6. Ausblick

Die gewonnenen Erkenntnisse bieten eine mögliche Grundlage zur individuellen Gestaltung präventiver Trainingsprogramme im Sinne einer „personalisierten Medizin“. Wenn eine Hemmung der Zellalterung das Ziel der Trainingsintervention wäre, könnten kraftbasierte Trainingsformen zumindest kurzfristig weniger effektiv sein. Aerober Ausdauersport oder Intervalltraining sollten hier ein unverzichtbarer Bestandteil sein. In weiteren Studien gilt es, passende zelluläre Seneszenzmarker zu finden, die den „Anti-Aging“-Effekt verlässlich anzeigen, möglichst ohne die Notwendigkeit einer Isolation mononukleärer Zellen und der Bestimmung der Telomeraseaktivität. Bislang sind zu diesem Zweck keine validen Serumparameter identifiziert, die einfach zu messen sind. Zur Klärung der vermuteten Mediatorfunktion von scherstressvermittelter NO-Freisetzung auf die zellulären Effekte sind weitere Untersuchungen sinnvoll, die die Unterschiede des Scherstress und die NO-

Ausschüttung zwischen verschiedenen Trainingsarten vergleichen. Hierbei bietet sich neben einer prospektiven Trainingsstudie mit Kontrollgruppe zusätzlich wieder eine Studie im Cross-over-Design an. Um den Scherstress vergleichen zu können, sind Herzfrequenz- und Blutdruckprofile aller Probanden sowohl in Ruhe als auch unter Belastungsbedingungen anzulegen. Der Zusammenhang zwischen körperlicher Aktivität, Expression von iNOS- und eNOS-mRNA und Zellalterung könnte im Tiermodell durch Knock-out Modelle und Behandlung einer Gruppe mit Inhibitoren der NO-Synthase (z.B. NG-nitro-L-arginine) genauer untersucht werden. Neben diesem potentiellen Signalweg dürfen weitere Mediatoren, die durch körperliche Anstrengung induziert werden, nicht außer Acht gelassen werden. Eine Messung des Cortisolspiegels oder anderer Hormonregulatoren, die an der Stressantwort auf Trainingsreize beteiligt sind, könnte zur Interpretation weiterer Erkenntnisse hilfreich sein. Es stellt sich die Frage, ob die beobachteten Effekte einer geänderten Zusammensetzung des peripheren Blutes mit vermehrter Ausschwemmung von Leukozytensubpopulationen mit höherer Telomeraseaktivität und Telomerlänge geschuldet sind. Hier bietet eine getrennte Messung der Telomeraseaktivität in den jeweiligen Subpopulationen einen Versuchsansatz. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern also den Nährboden für die weitere Erforschung des Zusammenhangs von körperlicher Aktivität und Zellalterung.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R (2005) Impact of Regular Physical Activity on the NAD(P)H Oxidase and Angiotensin Receptor System in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* 111:555–562
2. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S (2003) Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9:1370–1376
3. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13742–7
4. Arnett DK, Evans GW, Riley WA (1994) Arterial Stiffness: A New Cardiovascular Risk Factor? *Am J Epidemiol* 140:669–682
5. Bachi ALL, Rios FJO, Vaisberg PHC, Martins M, de Sá MC, Victorino AB, Foster R, Sierra APR, Kiss MAPD, Vaisberg M (2015) Neuro-immuno-endocrine modulation in marathon runners. *Neuroimmunomodulation* 22:196–202
6. Baerlocher GM, Vulto I, de Jong G, Lansdorp PM (2006) Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat Protoc* 1:2365–76
7. Ben-Porath I, Weinberg RA (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37:961–976
8. Blackburn EH (2001) Switching and Signaling at the Telomere. *Cell* 106:661–673
9. Blackburn EH, Collins K (2011) Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003558
10. Blackburn EH, Epel ES, Lin J (2015) Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* 350:1193–8
11. Blasco MA (2007) Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 3:640–649
12. Brookes S, Rowe J, Ruas M, Llanos S, Clark PA, Lomax M, James MC,

- Vatcheva R, Bates S, Vousden KH, Parry D, Gruis N, Smit N, Bergman W, Peters G (2002) INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *EMBO J* 21:2936–45
13. Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, Thompson JR, Ford I, Shepherd J, Packard CJ, Samani NJ (2007) Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* 369:107–114
 14. Calado RT, Young NS (2009) Telomere Diseases. *N Engl J Med* 361:2353–2365
 15. Campisi J (2001) Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 11:S27–S31
 16. Campisi J (2003) Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 3:339–349
 17. Campisi J (2013) Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol* 75:685–705
 18. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE (1994) Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol* 24:471–476
 19. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, Kimura M, Lu X, Spector TD, Aviv A (2008) The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. *Arch Intern Med* 168:154–8
 20. Chilton WL, Marques FZ, West J, Kannourakis G, Berzins SP, O'Brien BJ, Charchar FJ (2014) Acute exercise leads to regulation of telomere-associated genes and microRNA expression in immune cells. *PLoS One* 9:e92088
 21. Costigan SA, Eather N, Plotnikoff RC, Taaffe DR, Lubans DR (2015) High-intensity interval training for improving health-related fitness in adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 49:1253–61
 22. de Lange T (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21:532–540
 23. de Lange T (2009) How Telomeres Solve the End-Protection Problem. *Science* (80-) 326:948–952
 24. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM (2004) Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl*

Acad Sci 101:17312–17315

25. Farzaneh-Far R, Cawthon RM, Na B, Browner WS, Schiller NB, Whooley MA (2008) Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1379–84
26. Farzaneh-Far R, Lin J, Epel ES, Harris WS, Blackburn EH, Whooley MA (2010) Association of Marine Omega-3 Fatty Acid Levels With Telomeric Aging in Patients With Coronary Heart Disease. *JAMA* 303:250
27. Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, Arena R, Balady GJ, Bittner VA, Coke LA, Fleg JL, Forman DE, Gerber TC, Gulati M, Madan K, Rhodes J, Thompson PD, Williams MA (2013) Exercise Standards for Testing and Training. *Circulation* 128:873–934
28. Fyhrquist F, Saijonmaa O, Strandberg T (2013) The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 10:274–283
29. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* 97:503–514
30. Group DPPR (2002) Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *N Engl J Med* 346:393–403
31. Gu Y, Seidl KJ, Rathbun GA, Zhu C, Manis JP, van der Stoep N, Davidson L, Cheng H-L, Sekiguchi JM, Frank K, Stanhope-Baker P, Schlissel MS, Roth DB, Alt FW (1997) Growth Retardation and Leaky SCID Phenotype of Ku70-Deficient Mice. *Immunity* 7:653–665
32. Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, Rydkina E, Vujcic S, Balan K, Gitlin I, Leonova K, Polinsky A, Chernova OB, Gudkov A V. (2016) Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging (Albany NY)* 8:1294–1315
33. Hallal PC, Andersen LB, Bull FC, Guthold R, Haskell W, Ekelund U (2012) Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *Lancet* 380:247–257
34. Hockemeyer D, Daniels J-P, Takai H, de Lange T (2006) Recent Expansion of the Telomeric Complex in Rodents: Two Distinct POT1 Proteins Protect Mouse Telomeres. *Cell* 126:63–77
35. Hoff J, Helgerud J (2004) Endurance and Strength Training for Soccer Players.

Sport Med 34:165–180

36. Hsu HL, Gilley D, Galande SA, Hande MP, Allen B, Kim SH, Li GC, Campisi J, Kohwi-Shigematsu T, Chen DJ (2000) Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev* 14:2807–12
37. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T (1999) p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283:1321–5
38. Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T (2002) Senescence Induced by Altered Telomere State, Not Telomere Loss. *Science* (80-) 295:2446–2449
39. KARVONEN MJ, KENTALA E, MUSTALA O (1957) The effects of training on heart rate; a longitudinal study. *Ann Med Exp Biol Fenn* 35:307–15
40. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011–5
41. Kimura M, Stone RC, Hunt SC, Skurnick J, Lu X, Cao X, Harley CB, Aviv A (2010) Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nat Protoc* 5:1596–1607
42. Kraus WE, Bittner V, Appel L, Blair SN, Church T, Després J-P, Franklin BA, Miller TD, Pate RR, Taylor-Piliae RE, Vafiadis DK, Whitsel L (2015) The National Physical Activity Plan: a call to action from the American Heart Association: a science advisory from the American Heart Association. *Circulation* 131:1932–40
43. Kulju KS, Lehman JM (1995) Increased p53 Protein Associated with Aging in Human Diploid Fibroblasts. *Exp Cell Res* 217:336–345
44. Lakatta EG, Levy D (2003) Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises. *Circulation* 107:
45. Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Büttner K, Drexler H, Hornig B, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G (2000) Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 101:2264–70
46. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G (2004) Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109:220–6

47. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Böhm M, Kindermann W, Nickenig G (2005) Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 12:407–414
48. Lee I-M, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT (2012) Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet* 380:219–229
49. Lenk K, Uhlemann M, Schuler G, Adams V (2011) Role of endothelial progenitor cells in the beneficial effects of physical exercise on atherosclerosis and coronary artery disease. *J Appl Physiol* 111:321–328
50. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, Amann M, Anderson HR, Andrews KG, Aryee M, Atkinson C, Bacchus LJ, Bahalim AN, Balakrishnan K, Balmes J, Barker-Collo S, Baxter A, Bell ML, Blore JD, Blyth F, Bonner C, Borges G, Bourne R, Boussinesq M, Brauer M, Brooks P, Bruce NG, Brunekreef B, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Bull F, Burnett RT, Byers TE, Calabria B, Carapetis J, Carnahan E, Chafe Z, Charlson F, Chen H, Chen JS, Cheng ATA, Child JC, Cohen A, Colson KE, Cowie BC, Darby S, Darling S, Davis A, Degenhardt L, Dentener F, Des Jarlais DC, Devries K, Dherani M, Ding EL, Dorsey ER, Driscoll T, Edmond K, Ali SE, Engell RE, Erwin PJ, Fahimi S, Falder G, Farzadfar F, Ferrari A, Finucane MM, Flaxman S, Fowkes FGR, Freedman G, Freeman MK, Gakidou E, Ghosh S, Giovannucci E, Gmel G, Graham K, Grainger R, Grant B, Gunnell D, Gutierrez HR, Hall W, Hoek HW, Hogan A, Hosgood HD, Hoy D, Hu H, Hubbell BJ, Hutchings SJ, Ibeanusi SE, Jacklyn GL, Jasrasaria R, Jonas JB, Kan H, Kanis JA, Kassebaum N, Kawakami N, Khang YH, Khatibzadeh S, Khoo JP, Kok C, Laden F, Lalloo R, Lan Q, Lathlean T, Leasher JL, Leigh J, Li Y, Lin JK, Lipshultz SE, London S, Lozano R, Lu Y, Mak J, Malekzadeh R, Mallinger L, Marcenes W, March L, Marks R, Martin R, McGale P, McGrath J, Mehta S, Mensah GA, Merriman TR, Micha R, Michaud C, Mishra V, Hanafiah KM, Mokdad AA, Morawska L, Mozaffarian D, Murphy T, Naghavi M, Neal B, Nelson PK, Nolla JM, Norman R, Olives C, Omer SB, Orchard J, Osborne R, Ostro B, Page A, Pandey KD, Parry CDH, Passmore E, Patra J, Pearce N, Pelizzari PM, Petzold M, Phillips MR, Pope D, Pope CA, Powles J, Rao M, Razavi H, Rehfuss EA, Rehm JT, Ritz B, Rivara FP, Roberts T, Robinson C,

- Rodriguez-Portales JA, Romieu I, Room R, Rosenfeld LC, Roy A, Rushton L, Salomon JA, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Sapkota A, Seedat S, Shi P, Shield K, Shivakoti R, Singh GM, Sleet DA, Smith E, Smith KR, Stapelberg NJC, Steenland K, Stöckl H, Stovner LJ, Straif K, Straney L, Thurston GD, Tran JH, Van Dingenen R, Van Donkelaar A, Veerman JL, Vijayakumar L, Weintraub R, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams HC, Williams W, Wilson N, Woolf AD, Yip P, Zielinski JM, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M (2012) A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2224–2260
51. Liu Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, Torrice C, Ibrahim JG, Thomas NE, Sharpless NE (2009) Expression of *p16^{INK4a}* in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* 8:439–448
 52. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M (2013) Telomeres—structure, function, and regulation. *Exp Cell Res* 319:133–141
 53. McCarty MF (2004) Optimizing endothelial nitric oxide activity may slow endothelial aging. *Med Hypotheses* 63:719–723
 54. McDermott MM, Ades P, Guralnik JM, Dyer A, Ferrucci L, Liu K, Nelson M, Lloyd-Jones D, Van Horn L, Garside D, Kibbe M, Domanchuk K, Stein JH, Liao Y, Tao H, Green D, Pearce WH, Schneider JR, McPherson D, Laing ST, McCarthy WJ, Shroff A, Criqui MH (2009) Treadmill exercise and resistance training in patients with peripheral arterial disease with and without intermittent claudication: a randomized controlled trial. *JAMA* 301:165–74
 55. Meka N, Katragadda S, Cherian B, Arora RR (2008) Endurance exercise and resistance training in cardiovascular disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis Rev Ther Adv Cardiovasc Dis* 2:115–121
 56. Melk A, Tegtbur U, Hilfiker-Kleiner D, Eberhard J, Saretzki G, Eulert C, Kerling A, Nelius A-K, Hömme M, Strunk D, Berliner D, Röntgen P, Kück M, Bauersachs J, Hilfiker A, Haverich A, Bara C, Stiesch M (2014) Improvement of biological age by physical activity. *Int J Cardiol* 176:1187–1189
 57. Morris JN, Heady JA, Raffle PAB, Roberts CG, Parks JW (1953) Coronary heart-disease and physical activity of work. *Lancet*
 58. Mullis KB, Faloona FA (1987) [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a

- polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335–350
59. Mundstock E, Zatti H, Louzada FM, Oliveira SG, Guma FT, Paris MM, Rueda AB, Machado DG, Stein RT, Jones MH, Sarria EE, Barbé-Tuana FM, Mattiello R (2015) Effects of physical activity in telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev* 22:72–80
 60. O'Rourke MF, Hashimoto J (2007) Mechanical Factors in Arterial Aging. *J Am Coll Cardiol* 50:1–13
 61. Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C, Magbanua MJM, Marlin R, Yglecias L, Carroll PR, Blackburn EH (2008) Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol* 9:1048–1057
 62. Ornish D, Lin J, Chan JM, Epel E, Kemp C, Weidner G, Marlin R, Frenda SJ, Magbanua MJM, Daubenmier J, Estay I, Hills NK, Chainani-Wu N, Carroll PR, Blackburn EH (2013) Effect of comprehensive lifestyle changes on telomerase activity and telomere length in men with biopsy-proven low-risk prostate cancer: 5-year follow-up of a descriptive pilot study. *Lancet Oncol* 14:1112–1120
 63. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney M-T, Corrà U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FDR, Løchen M-L, Löllgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, van der Worp HB, van Dis I, Verschuren WMM, Binno S, De Backer G, Roffi M, Aboyans V, Bachl N, Bueno H, Carerj S, Cho L, Cox J, De Sutter J, Egidi G, Fisher M, Fitzsimons D, Franco OH, Guenoun M, Jennings C, Jug B, Kirchhof P, Kotseva K, Lip GY, Mach F, Mancia G, Bermudo FM, Mezzani A, Niessner A, Ponikowski P, Rauch B, Rydén L, Stauder A, Turc G, Wiklund O, Windecker S, Zamorano JL, Zamorano JL, Aboyans V, Achenbach S, Agewall S, Badimon L, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Carerj S, Dean V, Erol Ç, Fitzsimons D, Gaemperli O, Kirchhof P, Kolh P, Lancellotti P, Lip GY, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Roffi M, Torbicki A, Vaz Carneiro A, Windecker S, Metzler B, Najafov R, Stelmashok V, De Maeyer C, Dilic M, Gruev I, Milicic D, Vaverkova H, Gustafsson I, Attia I, Duishvili D, Kostova N, Ferrières J, Klimiashvili Z, Hambrecht R, Tsioufis K, Szabados E, Andersen K, Vaughan C, Zafir B, Novo S, Davletov K, Jashari F, Kerimkulova A, Mintale I, Saade G,

- Petrulioniene Z, Delagardelle C, Magri CJ, Rudi V, Oukerraj L, Çölkesen BE, Schirmer H, Jankowski P, dos Reis RP, Gherasim D, Nedogoda S, Zavatta M, Giga V, Filipova S, Padial LR, Kiessling A, Mach F, Mahdhaoui A, Ural D, Nesukay E, Gale C (2016) 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* 37:2315–2381
64. Sandin S, Rhodes D (2014) Telomerase structure. *Curr Opin Struct Biol* 25:104–110
 65. Sattelmair J, Pertman J, Ding EL, Kohl HW, Haskell W, Lee I-M (2011) Dose Response Between Physical Activity and Risk of Coronary Heart Disease Clinical Perspective. *Circulation* 124:
 66. Schirmer SH, Millenaar DN, Werner C, Schuh L, Degen A, Bettink SI, Lipp P, van Rooijen N, Meyer T, Böhm M, Laufs U (2015) Exercise promotes collateral artery growth mediated by monocytic nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:1862–71
 67. Schuler G, Adams V, Goto Y (2013) Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease: results, mechanisms, and new perspectives. *Eur Heart J* 34:1790–9
 68. Schwingshackl L, Missbach B, Dias S, König J, Hoffmann G (2014) Impact of different training modalities on glycaemic control and blood lipids in patients with type 2 diabetes: a systematic review and network meta-analysis. *Diabetologia* 57:1789–1797
 69. Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704–7
 70. Siegenthaler W, Blum HE, Amann-Vesti BR, Arnold C, Bals R, Beuschlein F, Böhm M, Büttner U, Düsing R, Er F, Fromm M, Gärtner R, Gay S, Geißler M, Häussinger D, Hallek M, Harendza S, Hoffmann U, Hohlfeld R, Kanz L, Kaufmann SHE, Kindermann M, Kohlhase J, Kreuzer K-A, Laufs U, Link A, Ludwig M, Maack C, Martin S, Moradpour D, Müller-Ladner U, Nawroth PP, Neumann-Haefelin C, Oertel WH, Opitz OG, Panzer U, Passarge E, Peter H-H, Pichler WJ, Reincke M, Richter WO, Rosenow F, Schaberg T, Scheller B, Schepelmann K, Scherbaum WA, Schneider A, Schopohl J, Schwacha H, Semmo N, Stahl RAK, Staib P, Strasburger CJ, Tatò F, Tauber R, Thaiss F, Thimme R, Vogelmeier C, Eckardstein A von, Weisel K, Wenzel U, Zidek W, Ziegler R, Zygmunt M (2006) *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme

Verlag, Stuttgart

71. Smogorzewska A, de Lange T (2004) Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. *Annu Rev Biochem* 73:177–208
72. Stansel RM, de Lange T, Griffith JD (2001) T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J* 20:5532–40
73. Statistisches Bundesamt (2019) Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online.
74. Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE (2003) Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* 17:2384–95
75. Takeshita S, Inoue N, Ueyama T, Kawashima S, Yokoyama M (2000) Shear Stress Enhances Glutathione Peroxidase Expression in Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 273:66–71
76. Tanaka H, Dinunno FA, Monahan KD, Clevenger CM, DeSouza CA, Seals DR (2000) Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation* 102:1270–5
77. Thomas KA (1996) Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 271:603–6
78. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee Park S, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415:45–53
79. Wahl GM, Carr AM (2001) The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* 3:E277–E286
80. Wang JC, Bennett M (2012) Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res* 111:245–59
81. Wang Y, Ghosh G, Hendrickson EA (2009) Ku86 represses lethal telomere deletion events in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12430–5
82. Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD (2010) MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun* 393:643–648
83. Wen CP, Wai JPM, Tsai MK, Yang YC, Cheng TYD, Lee M-C, Chan HT, Tsao CK, Tsai SP, Wu X (2011) Minimum amount of physical activity for reduced

- mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet* 378:1244–1253
84. Werner C, Hanhoun M, Widmann T, Kazakov A, Semenov A, Pöss J, Bauersachs J, Thum T, Pfreundschuh M, Müller P, Haendeler J, Böhm M, Laufs U (2008) Effects of Physical Exercise on Myocardial Telomere-Regulating Proteins, Survival Pathways, and Apoptosis. *J Am Coll Cardiol* 52:470–482
 85. Werner C, Furster T, Widmann T, Poss J, Roggia C, Hanhoun M, Scharhag J, Buchner N, Meyer T, Kindermann W, Haendeler J, Bohm M, Laufs U (2009) Physical Exercise Prevents Cellular Senescence in Circulating Leukocytes and in the Vessel Wall. *Circulation* 120:2438–2447
 86. Weston KS, Wisløff U, Coombes JS (2014) High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 48:1227–34
 87. Wilson WRW, Herbert KE, Mistry Y, Stevens SE, Patel HR, Hastings RA, Thompson MM, Williams B (2008) Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J* 29:2689–2694
 88. Witt BJ, Jacobsen SJ, Weston SA, Killian JM, Meverden RA, Allison TG, Reeder GS, Roger V éroniqu. L (2004) Cardiac rehabilitation after myocardial infarction in the community. *J Am Coll Cardiol* 44:988–996
 89. Zbinden R, Zbinden S, Meier P, Hutter D, Billinger M, Wahl A, Schmid J-P, Windecker S, Meier B, Seiler C (2007) Coronary collateral flow in response to endurance exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14:250–257
 90. Zietzer A, Buschmann EE, Janke D, Li L, Brix M, Meyborg H, Stawowy P, Jungk C, Buschmann I, Hillmeister P (2017) Acute physical exercise and long-term individual shear rate therapy increase telomerase activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Physiol* 220:251–262

7. Danksagung und Publikation

Mithilfe der Ergebnisse dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

Hauptpublikation:

Christian Werner, Anne Hecksteden, Arne Morsch, **Joachim Zundler**, Melissa Wegmann, Jürgen Kratzsch, Joachim Thiery, Mathias Hohl, Jörg Thomas Bittenbring, Frank Neumann, Michael Böhm, Tim Meyer, Ulrich Laufs. (2019) 'Differential effects of endurance, interval, and resistance training on telomerase activity and telomere length in a randomized, controlled study', *European heart journal*, 40(1), pp. 34–46.

Abstractpublikationen:

Werner C, Hecksteden A, Zundler J, Böhm M, Meyer T, Laufs U (2015) Differentielle Effekte von Ausdauertraining, Intervalltraining und Krafttraining auf Telomeraseaktivität und Seneszenzmarker in zirkulierenden mononukleären Zellen. *Clin Res Cardiol* 104, Suppl 1, P1090.

Werner C, Hecksteden A, Zundler J, Boehm M, Meyer T, Laufs U (2015) Differential effects of aerobic endurance, interval and strength endurance training on telomerase activity and senescence marker expression in circulating mononuclear cells. *European Heart Journal* 36 (Abstract Supplement), 383.

Werner C, Hecksteden A, Zundler J, Böhm M, Meyer T, Laufs U (2016) Inducible NO synthase mediates differential effects of aerobic endurance, interval and resistance training on telomerase activity and cellular senescence. *Clin Res Cardiol* 105, Suppl 1, V922

Werner C, Hecksteden A, Zundler J, Boehm M, Meyer T, Laufs U (2016) Differential effects of aerobic endurance, interval and resistance training on cellular senescence and inducible NO synthase. *European Heart Journal* 37 (Abstract Supplement), 37-38.

Werner C, Hecksteden A, Zundler J, Wegmann M, Böhm M, Meyer T, Laufs U (2017) Prospective study of differential effects of aerobic endurance, interval and resistance training on telomerase activity and telomere length in circulating mononuclear cells. European Heart Journal 38 (Abstract Supplement), P3996.

Werner C, Hecksteden A, Zundler J, Wegmann M, Böhm M, Meyer T, Laufs U (2018) Differential effects of aerobic endurance, interval and resistance training on telomerase activity and telomere length in circulating mononuclear cells in a prospective, randomized, controlled trial. Clin Res Cardiol 107, Suppl 1, V889

Posterpräsentation SPIG 2016:

J. Zundler, C. Werner, A. Hecksteden, M. Böhm, T. Meyer, U. Laufs
Inducible NO synthase mediates differential effects of aerobic endurance, interval and resistance training on telomerase activity and cellular senescence

Danksagung:

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Menschen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle sehr herzliche bedanken möchte:

Herrn Professor Dr. M. Böhm, Herrn Professor Dr. U. Laufs danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation in den Räumlichkeiten des Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikum des Saarlandes durchzuführen.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. Tim Meyer und seinen Mitarbeitern des sportwissenschaftlichen Instituts der Universität des Saarlandes für die gemeinsame Durchführung der prospektiven Interventionsstudie und durchweg gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank geht an Herr PD Dr. Christian Werner, der die Idee zu dieser Dissertation im Rahmen seiner wissenschaftlichen Tätigkeit konzipierte und mich dabei – nicht nur wissenschaftlich - stets unterstützte, sondern auch durch sein hilfsbereites, freundliches und stets motivierendes Verhalten wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat. An dieser Stelle möchte ich mich ebenso bei allen medizinisch- technischen Assistenten und Assistentinnen bedanken, die mir in vielen Fragen eine große Hilfe waren und in deren Team es großen Spaß gemacht hat wissenschaftlich tätig zu sein.

Zudem danke ich meinen Eltern für deren Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums sowie meiner Frau Anna-Maria, die die Entstehung dieser Dissertation trotz der vielen Jahre, die dafür aufgewendet wurden, motivierend, stützend und aufbauend begleitete und somit einen wesentlichen Anteil am Gelingen der Dissertation trägt.

8. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion. 15.09.2022
Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. M. D. Menger
Berichterstatter: PD Dr. Christian Werner
Prof. Dr. Tim Meyer