

Aus dem Bereich für Innere Medizin III
Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin
Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Böhm
Erstberichterstatter: PD Dr. med. Christian Werner

**Langzeiteffekt von Fußballtraining auf Telomerlänge und
Telomer-assoziierte Proteine in zirkulierenden
mononukleären Zellen bei jungen und alten
Fußballspielern**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2023

vorgelegt von: Katharina Karoline Kamp
geb. am 11.07.1995 in Saarbrücken
wohnhaf in: Talstraße 59, 66119 Saarbrücken

Tag der Promotion: 24.07.2024
Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. D. Menger
Berichterstatter: PD Dr. Christian Werner
Prof. Dr. Tim Meyer

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
1.1	Deutschsprachige Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	2
2	Einleitung.....	3
2.1	Bedeutung von Sport für die kardiovaskuläre Prävention	3
2.2	Kardiovaskuläre und zelluläre Mechanismen von Sport - Fokus auf Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffspezies.....	5
2.3	Zelluläre Alterung und Telomerbiologie.....	9
2.3.1	Zelluläre Alterung	9
2.3.1.1	Zellalterung und p16	10
2.3.1.2	Seneszente Zellen	10
2.3.2	Telomere und Telomer-assoziierte Proteine	11
2.3.2.1	Telomer-assoziierte Proteine	12
2.3.2.2	Telomerase	16
2.3.2.3	Messung der Leukozyten-Telomerlänge als Marker für kardiovaskuläre Gesundheit und Krankheit.....	18
2.4	Vorarbeiten zu körperlicher Aktivität und kardiovaskulärer Zellalterung	19
2.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	24
3	Material	25
3.1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	25
3.2	Primer und Sonden	26
3.2.1	Primer Realtime PCR.....	26
3.2.2	Sonden für Flow-FISH.....	27
3.3	Lösungen, Medien, Puffer	28
3.4	Molekularbiologische Kits	30
3.5	Geräte	30
3.6	Software	31
4	Methoden	32
4.1	Probandenrekrutierung und Materialgewinnung.....	32
4.1.1	Probandenrekrutierung.....	32
4.1.2	Materialgewinnung	33
4.2	Isolation mononukleärer Zellen	33
4.3	Vorbereitung der Assays mit mononukleären Zellen.....	35
4.3.1	Auftauen der Proben	35
4.3.2	Zellzählung	35
4.4	RNA-Isolation, reverse Transkription und Realtime PCR mit cDNA	35
4.4.1	RNA-Isolation	35
4.4.2	DNase-Verdau.....	36
4.4.3	Reverse Transkription	37

4.4.4	Realtime PCR mit cDNA	37
4.5	Telomeraseaktivitätsmessung mittels TRAP-Assay	38
4.5.1	Chaps-Proteinisolation	38
4.5.2	Telomeraseaktivitäts-Messung	39
4.6	Telomerlängenmessung.....	41
4.6.1	Telomerlängenmessung mittels Realtime Polymerasekettenreaktion	41
4.6.1.1	DNA-Isolation aus EDTA-Blut.....	41
4.6.1.2	DNA-Polymerase-Kettenreaktion	42
4.6.2	Telomerlängenmessung mittels Flow-FISH	43
4.6.2.1	Vorbereitung der MNC-Proben.....	43
4.6.2.2	Auftauen und Äquilibration	43
4.6.2.3	Denaturierung und Hybridisierung.....	44
4.6.2.4	Waschen und DNA-Gegenfärbung	44
4.6.2.5	Messung am Durchflusszytometer	44
4.7	Statistische Analyse.....	47
5	Ergebnisse	49
5.1	Klinische Ergebnisse	49
5.2	Experimentelle Ergebnisse	53
5.2.1	Realtime PCR-Messung der mRNA-Expression	53
5.2.2	Telomeraseaktivitätsmessung	57
5.2.3	Telomerlängenmessung	58
5.2.3.1	Realtime PCR Telomerlängenmessung.....	58
5.2.3.2	FACS-Flow-FISH Telomerlängenmessung	58
6	Diskussion.....	61
6.1	Experimentelle Ergebnisse der alten Studienteilnehmer.....	63
6.2	Experimentelle Ergebnisse der jungen Studienteilnehmer.....	65
6.3	Klinische Ergebnisse der alten Studienteilnehmer	67
6.4	Klinische Ergebnisse der jungen Studienteilnehmer.....	68
6.5	Limitationen dieser Studie	69
7	Literaturverzeichnis	71
8	Publikationen und Abstracts	78
9	Danksagung.....	79
10	Lebenslauf.....	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: WHO Report on Global Health Risks.....	4
Abbildung 2: Todesursachen nach Krankheitsarten 2021.....	5
Abbildung 3: Vaskuläre und zelluläre Mechanismen von körperlicher Aktivität.	8
Abbildung 4: The Hallmarks of Aging, (LOPEZ-OTIN et al., 2013).....	9
Abbildung 5: Bedeutung T-Loop-Struktur, (DE LANGE, 2002).	12
Abbildung 6: TRF2-Hemmung, (DE LANGE, 2002).....	14
Abbildung 7: Bild modifiziert von (CALADO, YOUNG, 2009)	17
Abbildung 8: Molecular and biological hallmarks of aging, (AUNAN et al., 2016).....	17
Abbildung 9: Nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation ausgebildete Phasen.	34
Abbildung 10: Beispiel-Amplifikationskurve TRAP-Assay.....	40
Abbildung 11: HEK-Zell-Standardkurve	40
Abbildung 12: Telomerlänge in Leukozyten-Subpopulationen, FACS-FlowFISH.....	46
Abbildung 13: Zuständigkeiten Methodenteil.....	48
Abbildung 14: CONSORT-Flussdiagramm (Consolidated Standards of Reporting Trials)...	51
Abbildung 15: Klinische Daten.....	52
Abbildung 16: TRF2 mRNA Expression	53
Abbildung 17: Ku70 mRNA Expression	54
Abbildung 18: POT1a mRNA Expression	55
Abbildung 19: p16 mRNA Expression	56
Abbildung 20: Telomeraseaktivität.....	57
Abbildung 21: Granulozyten-Telomerlänge	59
Abbildung 22: Lymphozyten-Telomerlänge.....	60

Abkürzungsverzeichnis

AC	aged controls
AF	alte Fußballspieler
AK	alte Kontrollpersonen
AS	aged soccer players
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
Abb.	Abbildung
BMI	Body Mass Index
cDNA	copy DNA
CVD	cardiovascular disease / kardiovaskuläre Erkrankung
d	dezi (10^{-1})
DDR	DNA damage response / DNA-Schadensantwort
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DXA	Dual-Energy X-ray Absorptiometry / Ganzkörper-Dual-Röntgen-Absorptiometrie
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoreszin-Isothiocyanat
Flow-FISH	Fluorescence In-Situ Hybridization
g	Gramm / Erdschwerebeschleunigung
HEK	Human Embryonic Kidney
HR	Homologe Rekombination
JF	junge Fußballspieler
JK	junge Kontrollpersonen
kbp	Kilobasenpaare
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
km	Kilometer
l	Liter
m	milli (10^{-3})
M	Molar
min	Minute (n)

MNC	mononukleäre Zellen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl / nano (10^{-9})
NHE	Nicht-homologe Endverknüpfung
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNA	Peptide nucleic acid
POT1a	Protection of telomeres 1 a
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
s	Sekunden
TRF2	Telomere Repeat-Binding Factor 2
YC	young controls
YS	young soccer players

1 Zusammenfassung

1.1 Deutschsprachige Zusammenfassung

Aktuelle Studien zeigen, dass regelmäßiges Ausdauertraining zu „Anti-Aging“-Effekten auf zellulärer Ebene führt. Fußballtraining ist eine Sportart, die über den Ausdauersport hinaus Komponenten aus hochintensiver intervallförmiger Belastung, Krafttraining und Teamspiel aufweist. Bisher liegen keine Daten zur Auswirkung dieser Sportart auf die Zellalterung vor. In der vorliegenden Studie erfolgten Messungen der Telomerlänge, Telomeraseaktivität und Expression Telomer-assoziiierter Proteine in zirkulierenden mononukleären Zellen junger (JF, Ø 22 Jahre) und alter (AF, Ø 72 Jahre) Fußballspieler sowie unsportlicher altersgleicher Kontrollpersonen (JK, Ø 24 Jahre; AK, Ø 71 Jahre). Es wurden 140 männliche Probanden (n=35 pro Gruppe) in die Studie eingeschlossen. Die Kontrollpersonen übten keine regelmäßige körperliche Aktivität aus. Die jungen Fußballspieler absolvierten im Schnitt 5, die alten Fußballspieler 2 Trainingseinheiten pro Woche. Die Fußballanamnese umfasste 16 Jahre (JF, davon 6 Jahre auf professionellem Niveau) und 61 Jahre (AF). Um Akuteffekte auszuschließen, erfolgten die peripher venösen Blutentnahmen mindestens 48 Stunden nach dem letzten Training. Es erfolgte der Vergleich der Leukozytentelomerlänge anhand des durch Realtime PCR bestimmten T/S-Verhältnisses aus Telomer- (T) und Single Copy Gen 36b4 (S)-DNA. Es zeigten sich kürzere Telomere aller alten Probanden ohne einen Unterschied zwischen Sportlern und Kontrollen. In der Telomerlängenmessung mittels FACS-FlowFISH-Methode zeigten sich bei den alten Fußballspielern längere Telomere in Granulozyten (2,5%) und Lymphozyten (1,3%) im Vergleich zu den alten Kontrollpersonen. Die durch Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP) in HEK (Human Embryonic Kidney) -Zelläquivalenten gemessene Telomeraseaktivität war bei den jungen Fußballspielern höher als bei den jungen Kontrollpersonen. Die mittels real-time PCR bestimmte mRNA-Expression der Telomer-assoziierten Faktoren TRF2, Ku70 und POT1 war bei den jungen Fußballspielern im Vergleich zu den jungen Kontrollen ebenso erhöht. Das Seneszenz-assoziierte Protein p16 war bei den alten Kontrollen, aber nicht bei den alten Fußballspielern, erhöht. Es ergibt sich die Schlussfolgerung, dass langjähriges Fußballtraining der Zellalterung entgegenwirken könnte und dass seine präventiven kardiovaskulären Effekte damit mechanistisch zusammenhängen könnten.

1.2 Abstract

Recent studies indicate that, compared with resistance training, regular endurance training is associated with cellular “anti-aging” effects. In addition to endurance training, soccer training includes more components such as high-intensity interval exercise, strength training and team play. To date, no data are available on the effect of this sport modality on cellular senescence. In the present study, telomere length, telomerase activity and expression of telomere-associated proteins were measured in circulating mononuclear cells of young (YS, \bar{x} 22 years) and aged (AS, \bar{x} 72 years) soccer players and nonathletic age-matched controls (YC, \bar{x} 24 years; AC \bar{x} 71 years). 140 male subjects (n=35 per group) were enrolled in this cross-sectional study. The control subjects had no participation in regular physical activity. The young soccer players completed an average of 5 training sessions per week, the aged soccer players completed 2 training sessions per week. Soccer history of the young athletes covered an average of 16 years, including 6 years at the professional level. Soccer history of the aged athletes covered 61 years. To exclude acute effects, peripheral venous blood sampling was performed at least 48 hours after the last training session. First, leukocyte telomere length was compared using the T/S ratio determined by real-time PCR from telomere (T) and single copy gene 36b4 (S) DNA. Telomeres of all aged subjects were shorter with no difference between athletes and non-athletes. However, more specific telomere length measurement by FACS-FlowFISH showed longer telomeres in granulocytes (2.5%) and lymphocytes (1.3%) of the aged soccer players compared to the aged control subjects. Telomerase activity as measured by telomerase repeat amplification protocol (TRAP assay) standardized by HEK (Human Embryonic Kidney) cell equivalents was higher in the young soccer players than in the young inactive control subjects. In contrast, no differences in telomerase activity were observed between the aged subjects. mRNA expression of telomere-associated factors TRF2, Ku70, and POT1 determined by real-time PCR was increased in the young soccer athletes compared to the young control subjects. The senescence marker p16 was increased in aged inactive controls compared to aged soccer players and young subjects. In conclusion, long-term soccer training may exert cellular anti-aging effects, which may be associated with soccer’s preventive cardiovascular effects.

2 Einleitung

2.1 Bedeutung von Sport für die kardiovaskuläre Prävention

Sportliche Inaktivität gilt weltweit und insbesondere in den westlichen Industrienationen als vierthäufigster Risikofaktor für Mortalität nach arterieller Hypertonie, Nikotinkonsum und erhöhten Blutglukosewerten (Abb. 1). Diese Risikofaktoren sind mitverantwortlich für die Entstehung chronischer Erkrankungen wie Krebs, Diabetes und chronischer Herzerkrankungen. Es wird geschätzt, dass sportliche Inaktivität 21-25% der Mamma- und Kolon-Tumore, 27% der Diabetes-Erkrankungen und 30% der ischämischen Herzerkrankungen verursacht (WHO, 2009). Ein inaktiver Lebensstil bzw. sportliche Inaktivität treffen auf mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung zu (PIEPOLI et al., 2016). Die ischämische Herzerkrankung ist die weltweit führende Todesursache (WHO, 2009). Laut Statistischem Bundesamt gehören kardiovaskuläre Erkrankungen mit 33,3% zu den Haupttodesursachen Deutschlands (Abb. 2). Darüber hinaus ist aufgrund der aktuellen demographischen Entwicklung, mit einem zunehmenden Anteil der älteren Bevölkerung und der Assoziation kardiovaskulärer Erkrankungen mit dem Alter, die kardiovaskuläre Prävention von ausgeprägter gesellschaftlicher Relevanz.

Sportliche Aktivität reduziert sowohl die multikausale als auch die kardiovaskuläre Mortalität um 20-30% (PIEPOLI et al., 2016). Dies ist unter anderem begründet in der Reduktion des Risikos für die oben genannten Erkrankungen. Es kommt zu einer Verbesserung der muskuloskelettalen Gesundheit, der Körpergewichtskontrolle und zu einer Reduktion von Symptomen einer Depression (WHO, 2009). Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) ist sportliche Aktivität moderater Intensität mit einem geringeren Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert (MALIK et al., 2020). Die durch Sport bedingte Reduktion des totalen und abdominellen Körperfettanteils führt zu einer gesteigerten Insulinsensitivität, niedrigeren Blutdruckwerten und einer verbesserten endothelialen Funktion (STEWART, 2002).

Zur Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen wird in den aktuellen Leitlinien der Fachgesellschaften eine regelmäßige sportliche Aktivität empfohlen: Sportliche Aktivität moderater Intensität soll mindestens 150 Minuten pro Woche, sportliche Aktivität hoher Intensität mindestens 75 Minuten pro Woche durchgeführt werden. Eine graduelle Steigerung auf 300 bzw. 150 Minuten pro Woche ist empfohlen. Die Sporteinheiten sollten jeweils mindestens 30 bzw. 15 Minuten andauern und 4-5 Mal pro Woche oder täglich stattfinden

(PIEPOLI et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass Sport sowohl primär als auch sekundär präventive Auswirkungen hat (SCHULER et al., 2013). In einer aktuellen Metaanalyse wurden bei KHK-Patienten mit Zustand nach perkutaner koronarer Intervention vorteilhafte Effekte von Sport als sekundär präventive Maßnahme beobachtet: Es kam zu einer verbesserten linksventrikulären Ejektionsfraktion, zu einem reduzierten Auftreten von kardialen Todesfällen, Myokardinfarkten, Angina Pectoris und Restenosen und zu einer geringeren Notwendigkeit zur Durchführung von Koronarangioplastien (ZHANG, CHANG, 2019).

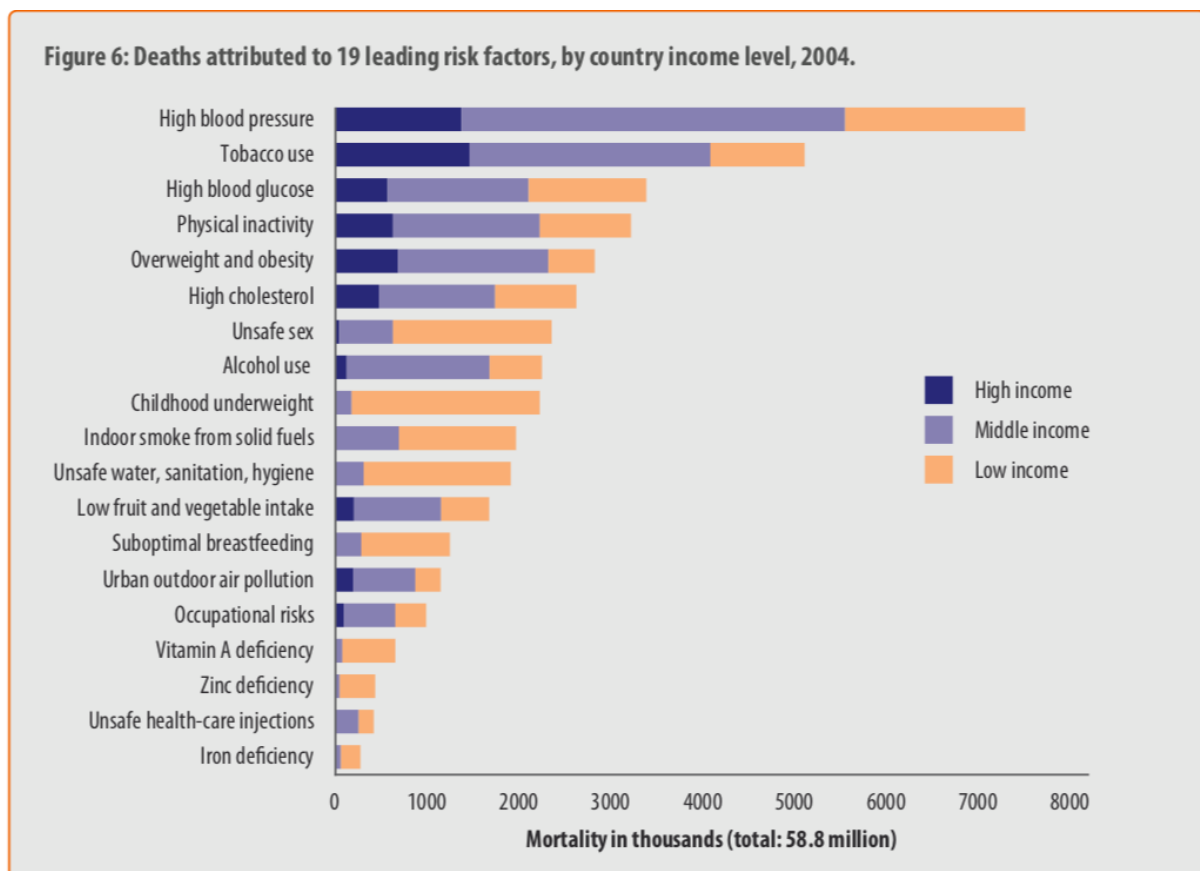


Abbildung 1: WHO Report on Global Health Risks.

Sportliche Inaktivität steht an 4. Stelle der führenden Risikofaktoren für Mortalität.

Quelle: Global Health Risks, Mortality and burden of disease attributable to selected major risks, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2009, ISBN 978 92 4 156387 1

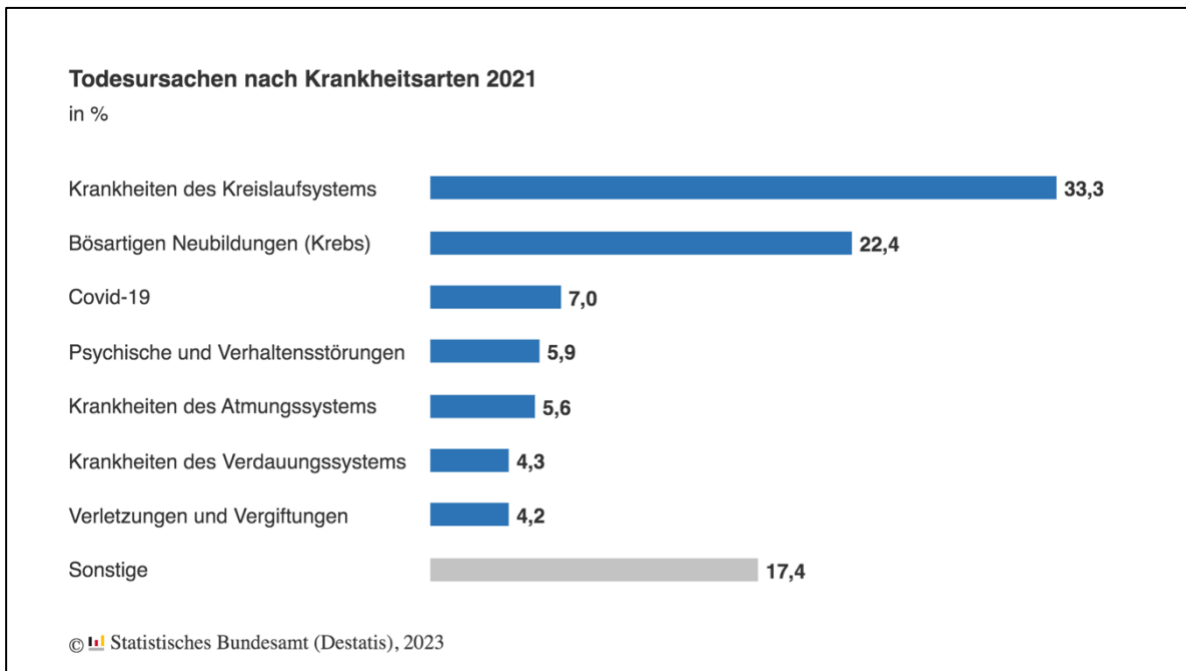


Abbildung 2: Todesursachen nach Krankheitsarten 2021.
Krankheiten des Kreislaufsystems stellen mit 33,3% den größten Teil der Todesursachen in Deutschland dar.
Quelle: Website Statistisches Bundesamt, 2023, Link: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html

2.2 Kardiovaskuläre und zelluläre Mechanismen von Sport - Fokus auf Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffspezies

Zunehmendes Alter geht mit verschiedenen vaskulären und zellulären Veränderungen einher. Es kommt zur endothelialen Dysfunktion, zur Versteifung der arteriellen Gefäße und zur Entstehung von Atherosklerose. Bei der Entstehung von Atherosklerose wird die zelluläre Seneszenz als von den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren unabhängiger Parameter angesehen (WANG, BENNETT, 2012). Diese Mechanismen tragen zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei und können durch Sport auf vielfältige Art und Weise beeinflusst werden:

Körperliche Aktivität führt zu einer gesteigerten endothelialen Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) aufgrund der durch Scherstress induzierten Aktivierung der NO-produzierenden endothelialen NO-Synthase (eNOS). NO bewirkt eine Vasodilatation und somit eine verbesserte Perfusion (HAMBRECHT et al., 2000). Zudem hat eine gesteigerte endotheliale NO-Verfügbarkeit eine Auswirkung auf die Regulation Telomer-assoziiierter Proteine, antioxidative Effekte und führt zu einer Erhöhung endothelialer Progenitorzellen (WERNER et al., 2009).

Bei KHK-Patienten kommt es durch Ausdauersport zu einer gesteigerten Leistungsfähigkeit, einer verbesserten endothelialen Funktion und Kollateralisierung der Koronararterien (HAMBRECHT et al., 2000). Aus dem Knochenmark stammende endotheliale Progenitorzellen hemmen die Entstehung von Atherosklerose, fördern Angiogenese und vaskuläre Reparaturprozesse und verbessern die endotheliale Funktion. Körperliche Aktivität steigert NO-vermittelt die Anzahl dieser Zellen im Blut und reduziert deren Apoptoserate. Es konnte eine Erhöhung des angiogenetisch wirkenden Faktors VEGF (vascular endothelial growth factor) nach sportlicher Intervention festgestellt werden (LAUFS et al., 2004). Nach vier Wochen Training konnte bei Patienten mit stabiler KHK eine deutliche Erhöhung des koronaren kollateralen Blutflusses festgestellt werden (MOBIUS-WINKLER et al., 2016). Nach dreiwöchigem Laufradtraining wurde bei Mäusen eine gesteigerte Kollateralisierung beobachtet. Dieser Effekt konnte bei NOS-defizienten Mäusen nicht beobachtet werden. Somit geht man davon aus, dass die Auswirkung körperlicher Aktivität auf die Kollateralen-Bildung NOS-vermittelt ist (SCHIRMER et al., 2015). Sportliche Aktivität führt im Myokard zu einer verbesserten linksventrikulären diastolischen Funktion sowie zu einer Reduktion der arteriellen Steifigkeit (Compliance) und systemischen Inflammation (STEWART, 2002). Bereits moderates Ausdauertraining schwächt den altersbedingten Verlust der zentralarteriellen Compliance ab bzw. stellt die Compliance bis zu einem gewissen Grad wieder her (TANAKA et al., 2000). Die anti-inflammatorischen Effekte hängen von der Intensität der Aktivität ab: Während es durch akutes Training hoher Intensität vorübergehend zu einem CRP- und Interleukin-6-Anstieg kommen kann, führt regelmäßiges körperliches Training zu einer Reduktion von CRP und verschiedenen Zytokinen (KASAPIS, THOMPSON, 2005).

In einer Studie waren nach 21 Tagen positive Effekte auf Telomer-assoziierte Faktoren bei freiwilligem Laufradtraining bei Wildtyp- nicht aber bei TERT- und eNOS-Knockout-Mäusen vorhanden. Dies zeigt zum einen eine direkte Abhängigkeit dieser durch Sport bedingten Effekte vom Telomerkomplex. Zum anderen lässt sich daraus schließen, dass eNOS maßgeblich an der Vermittlung der resultierenden Auswirkungen von Sport auf die Telomerstabilisierenden Faktoren beteiligt ist (WERNER et al., 2008). Die durch oxidativen Stress (durch Lipopolysaccharid- bzw. Paraquat-Gabe) induzierte Apoptose in Endothelzellen der Aorta war bei Mäusen, die für drei Wochen freiwilliges Laufradtraining durchführten, reduziert. Dieser Effekt war nicht bei TERT- und eNOS-Knockout-Mäusen vorhanden. Man vermutet, dass TERT und eNOS eine synergistische Wirkung in Bezug auf Stress-Resistenz haben. Durch oxidativen Stress kommt es vermehrt zu Reparationsvorgängen, bzw. zu vermehrten Zellteilungen, was zu einem schnelleren Verlust von Telomersequenzen führt. Die Telomerase mit ihrer Untereinheit TERT ist ein anti-apoptotischer Faktor, der endotheliales Zellwachstum reguliert und oxidativem Stress entgegenwirkt (WERNER et al., 2009). Studien haben gezeigt, dass die TERT-Expression in Endothelzellen durch die eNOS reguliert wird (GRASSELLI et al., 2008). Der Schutz vor endothelialer Apoptose durch oxidativen Stress könnte dementsprechend über eine NO-abhängige Telomeraseaktivierung funktionieren. Unabhängig von dieser Funktion besitzt eNOS weitere direkt antioxidative Effekte in dem Sinne, dass eine durch eNOS verbesserte vaskuläre Stressresistenz zu einem reduzierten Bedarf reparativer Zellteilungen und dadurch zu einer reduzierten Telomerabnutzung führt (WERNER et al., 2009). Oxidativer Stress wird durch Sport über ambivalente Mechanismen beeinflusst: Akute körperliche Aktivität hoher Intensität kann zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen. Durch moderate sportliche Aktivität verursachte ROS besitzen eine signalisierende Funktion und bewirken eine Hochregulation verschiedener Enzyme, die für die Elimination reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich sind (GOMEZ-CABRERA et al., 2008). Eine durch körperliche Aktivität erniedrigte Expression der NAD(P)H-Oxidase führt zu einer Reduktion der für oxidativen Stress verantwortlichen reaktiven Sauerstoffspezies (ADAMS et al., 2005). Abbildung 3 fasst die oben beschriebenen Mechanismen von körperlicher Aktivität zusammen.

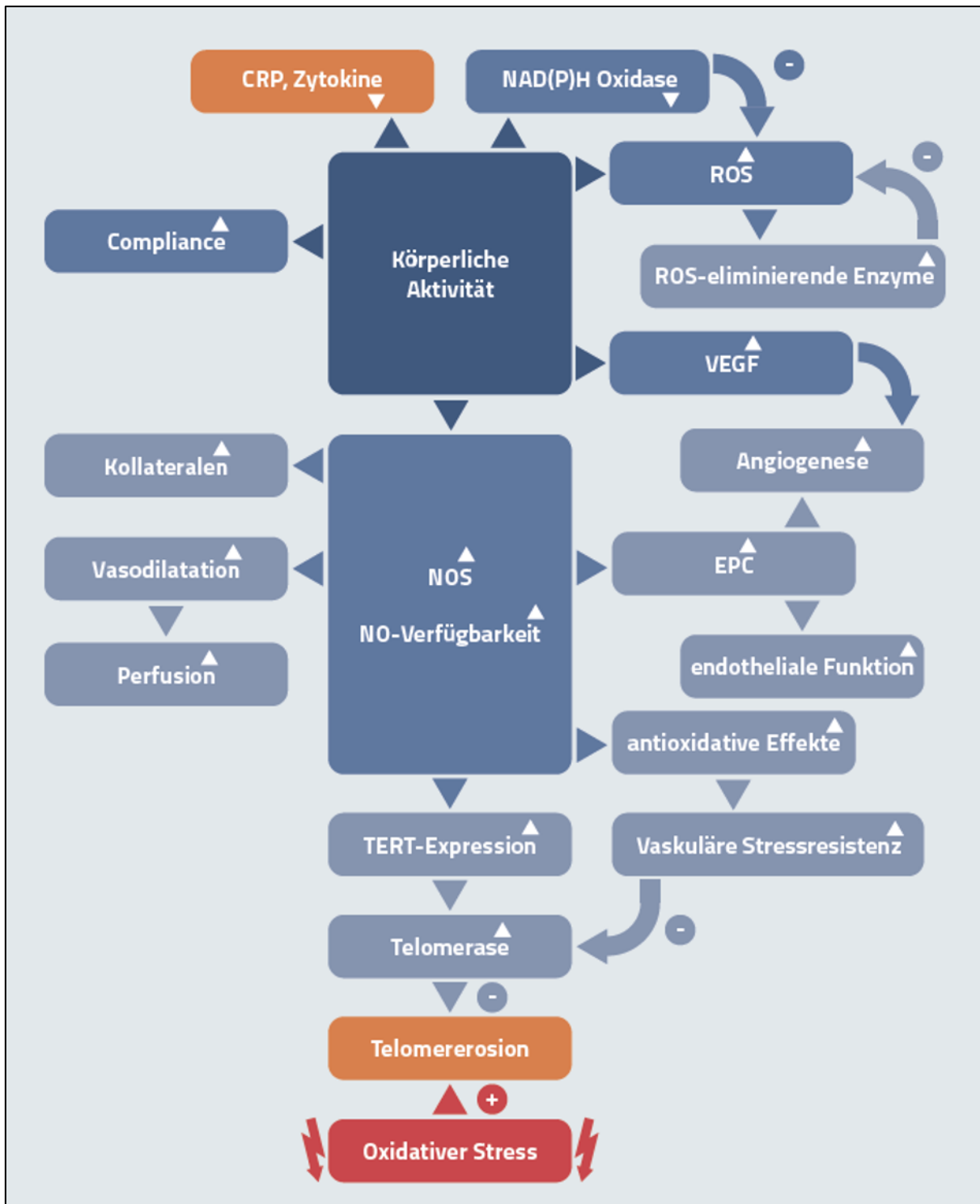


Abbildung 3: Vaskuläre und zelluläre Mechanismen von körperlicher Aktivität.

2.3 Zelluläre Alterung und Telomerbiologie

2.3.1 Zelluläre Alterung

López-Otín hat neun Hauptkomponenten festgelegt, die den Alterungsprozess wesentlich beeinflussen (Abb. 4). Diese Komponenten sind Bestandteil der physiologischen Zellalterung. Deren Verstärkung führt zu einem beschleunigten und deren Verminderung zu einem verlangsamten Alterungsprozess. Zu ihnen zählen unter anderem die genomische Instabilität, die zelluläre Seneszenz und die Telomerlängenverkürzung. Die Akkumulierung von Zellschäden führt zur Entstehung einer genomischen Instabilität. Auch die Entstehung von Neoplasien wird u.a. auf die im Laufe des Lebens entstehenden DNA-Schäden zurückgeführt. Zu diesen Schäden kommt es durch exogene (z.B. physikalische, chemische oder biologische Noxen) und endogene (z.B. reaktive Sauerstoffspezies) Faktoren. Um die Schäden zu minimieren, existiert ein DNA-Reparatursystem (LOPEZ-OTIN et al., 2013). Um einer Anhäufung geschädigter Zellen entgegenzuwirken, existiert der Mechanismus der zellulären Seneszenz. Von zellulärer Seneszenz spricht man, wenn sich eine Zelle dauerhaft im Zellzyklusarrest befindet und sich nicht weiter repliziert. Ein wesentlicher Auslöser der zellulären Seneszenz ist die Verkürzung der Telomere, auf die unter 2.3.2 genauer eingegangen wird (LOPEZ-OTIN et al., 2013).



Abbildung 4: The Hallmarks of Aging, (LOPEZ-OTIN et al., 2013).

2.3.1.1 Zellalterung und p16

In den Zellzyklus sind verschiedene Kontrollmechanismen integriert, um die Replikation geschädigter DNA und dadurch das Entstehen von Neoplasien zu verhindern. Diese Kontrollmechanismen werden als DNA-Schadensantwort (DDR, DNA Damage Response) bezeichnet. Ein wichtiger Bestandteil der DDR sind Tumorsuppressor-Proteine, die durch Signalkaskaden den Zellzyklus anhalten und so die Zelle in Seneszenz oder Apoptose versetzen können. Die zwei wichtigsten an solchen Signalkaskaden beteiligten Proteine sind p53 und p16. Das für diese Arbeit wichtige Tumorsuppressor-Protein ist das Protein p16^{INK4a}, welches als Cyclin-Kinase-Inhibitor der CDK4 (Cyclin-Dependent Kinase 4) fungiert. Damit der Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase übergehen kann, wird ein Transkriptionsfaktor benötigt, der verschiedene dafür notwendige Gene transkribiert. Dieser ist gebunden an das Rb-Protein und kann sich nur von diesem trennen und dadurch aktiv werden, wenn dieses phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung des Rb-Proteins wird von CDK4 durchgeführt. Die Hemmung von CDK4 durch p16 führt zu einem Stopp des Zellzyklus, da die Zelle nicht von der G1 in die S-Phase übertreten kann. Je mehr Stressfaktoren eine Zelle ausgesetzt ist, desto höher ist deren p16-Expression. Dies erklärt, weshalb die p16-Menge in Zellen mit dem Alter ansteigt (ALCORTA et al., 1996; BEN-PORATH, WEINBERG, 2004). P16 in Lymphozyten dient als Biomarker für die zelluläre Alterung (LIU et al., 2009). Der INK4a/ARF-Genlocus des Proteins p16 steht mit altersassoziierten Erkrankungen wie Diabetes, Alzheimer und kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung. Man geht davon aus, dass INK4a/ARF-Antworten Alterungsprozesse beschleunigen, wenn so viele Zellschäden vorliegen, dass die Regenerationskapazität eines Gewebes überschritten wird (LOPEZ-OTIN et al., 2013).

2.3.1.2 Seneszente Zellen

Die steigende Anzahl seneszenten Zellen und deren Anhäufung in verschiedenen Geweben tragen maßgeblich zum Alterungsprozess bei. Seneszente Zellen werden zum Teil durch das Immunsystem und Phagozytose eliminiert. Die Anzahl akkumulierter seneszenten Zellen steigt mit zunehmendem Lebensalter durch deren erhöhte Produktion und eine entstehende Immunseneszenz (AUNAN et al., 2016). Die seneszenten Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und weitere Moleküle, die als Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp (SASP) zusammengefasst werden. Dies dient einerseits der Kommunikation mit dem Immunsystem, der Geweberegeneration und der

Tumorsuppression. Andererseits kann eine chronische SASP-Aktivität seneszenten Zellen in angrenzenden Zellen zur Seneszenz, damit verbundener Geweb dysfunktion und paradoxerweise zur Tumorgenese führen (VICTORELLI, PASSOS, 2017). Man vermutet, dass dieselben Mechanismen und Gene, die den Körper in jungen Jahren vor Schäden wie neoplastischen Erkrankungen schützen, gleichzeitig auf Dauer zur Alterung und Entstehung altersbedingter und neoplastischer Erkrankungen beitragen. Diese Hypothese wird als antagonistische Pleiotropie bezeichnet (CAMPISI, 2003).

2.3.2 Telomere und Telomer-assoziierte Proteine

Telomere sind die Enden eukaryotischer Chromosomen (MCCLINTOCK, 1941; MULLER, 1938) und bestehen aus nicht-codierender doppelsträngiger repetitiver DNA der Sequenz TTAGGG (BLACKBURN, GALL, 1978). Sie dienen dem Schutz der Chromosomen vor End-zu-End-Verschmelzungen, genomischer Instabilität, sowie dem Verlust genomischer DNA während der Zellteilung (BLASCO, 2005; LEVIS, 1989). Bei jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere aufgrund des End-Replikations-Problems (HARLEY et al., 1990; OLOVNIKOV, 1996; WATSON, 1972). Nach ca. 50 Zellteilungen, dem sogenannten Hayflick-Limit (HAYFLICK, MOORHEAD, 1961), hat die Zelle eine kritische Telomerlänge erreicht und es kommt zur zellulären Seneszenz oder dem programmierten Zelltod (Apoptose) (HERRMANN et al., 2018). Ab einer kritisch kurzen Telomerlänge käme es bei weiteren Zellteilungen zum Abbau der codierenden DNA, wodurch die Chromosomen instabil würden. Daher ist die Induktion der Apoptose bzw. Seneszenz eine physiologische Konsequenz zum Schutz des Genoms. Dysfunktionale Telomere lösen eine DNA-Schadensantwort aus, die zur Seneszenz führt (HERRMANN et al., 2018). Eine Telomerdysfunktion kann aus verschiedenen Gründen vorliegen, unter anderem bei Verkürzung der Telomere, Verlust der Telomerasefunktion, strukturellen Schäden oder Defekten der Telomer-assoziierten Proteine. Je nach Intaktheit der DDR kann es zur Alterung oder Tumorgenese kommen (ZHANG et al., 2012).

An den Enden der Telomere befindet sich ein einzelsträngiger 3'-Überhang, der sich zur doppelsträngigen Telomer-DNA hin zurücklagert und dadurch die sogenannte T-Loop-Struktur bildet, die dem Schutz der Telomerenden dient (DE LANGE, 2002; GRIFFITH et al., 1999). Ohne diese Struktur würde der frei liegende 3'-Überhang als Strangbruch erkannt werden und DNA-Reparaturmechanismen in Gang setzen (BLACKBURN, 2001) (Abb. 5).

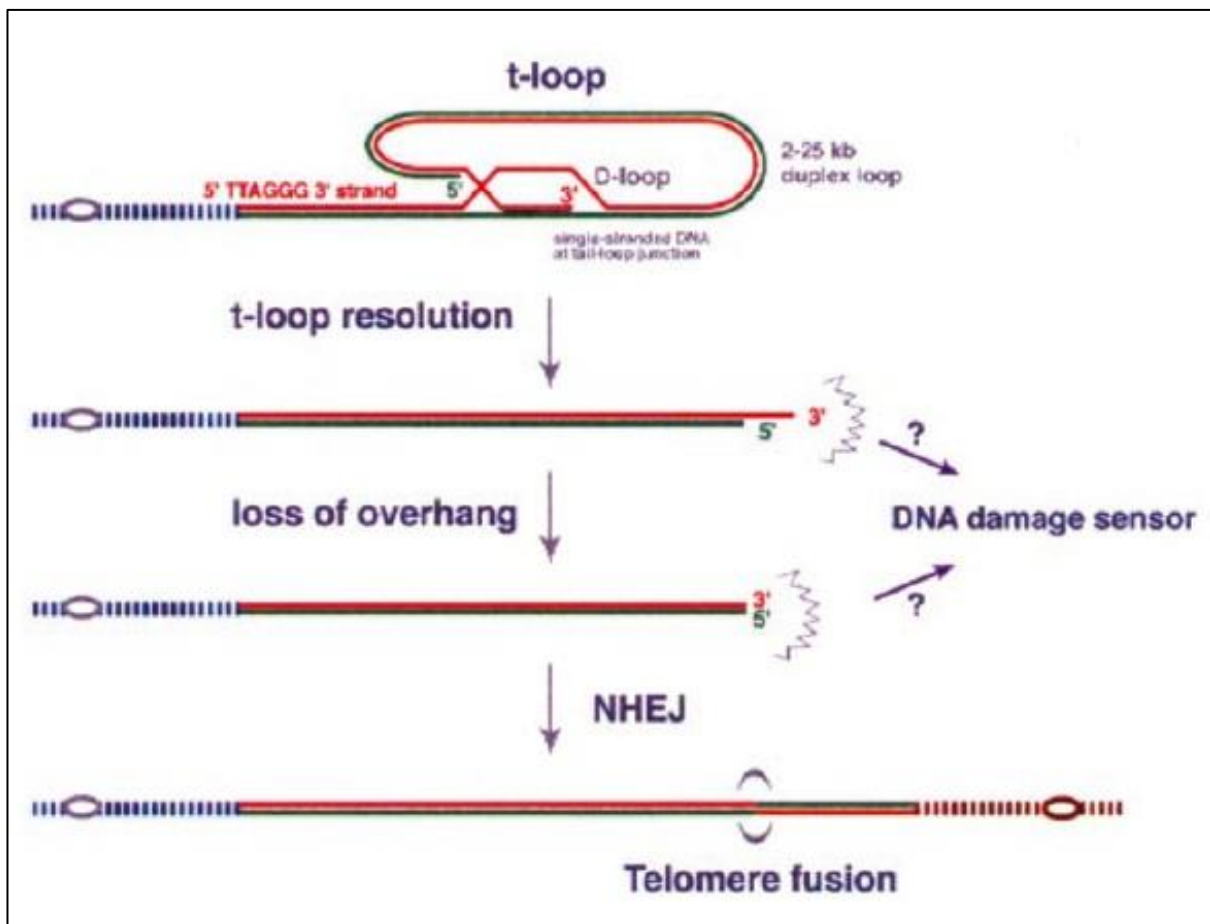


Abbildung 5: Bedeutung T-Loop-Struktur, (DE LANGE, 2002).

Eine Auflösung der T-Loop-Struktur führt zu DNA-Reparaturmechanismen und Telomerverschmelzungen.

2.3.2.1 Telomer-assoziierte Proteine

Der T-Loop wird durch den aus den sechs Proteinen TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TTP1 und RAP1 bestehenden Shelterin-Komplex stabilisiert. Diese Proteine kommen nur an den Enden der Chromosomen vor, stehen ausschließlich in Zusammenhang mit dem Telomerkomplex und sind Bestandteil aller Zellzyklus-Phasen (DE LANGE, 2005). Ohne die T-Loop-Struktur und den Shelterin-Komplex würden die Telomerenenden als DNA-Schäden interpretiert werden. Hier kommen die beiden wichtigen DNA-Reparaturmechanismen nicht-homologe Endverknüpfung (NHE) und homologe Rekombination (HR) zum Tragen. Das für die NHE verantwortliche Enzym DNA-Proteinkinase besteht aus einer katalytischen Untereinheit und einem heterodimeren Protein Ku, welches sich aus den Untereinheiten Ku70 und Ku80 zusammensetzt. Das Protein Ku bindet sequenzunspezifisch mit hoher Affinität an DNA-Enden (BAILEY et al., 1999). Die NHE führt zu chromosomalen End-zu-End-Verschmelzungen. Die HR führt zu einem Sequenz-Austausch zwischen Telomeren untereinander oder Telomeren und

anderen DNA-Abschnitten. Es existieren zwei wichtige Signalkaskaden, die aktiviert werden, wenn DNA-Doppelstrangbrüche registriert werden: Der ATM-Kinase-Weg und der ATR-Kinase-Weg, die zu NHE, HR, Apoptose oder Seneszenz führen können (DE LANGE, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine TRF2 und POT1 des Shelterin-Komplexes untersucht, auf deren Funktion im Folgenden eingegangen wird.

TRF2 (telomeric repeat binding factor 2) bindet direkt an die doppelsträngige Telomersequenz (BILAUD et al., 1997; DE LANGE, 2002). Dieses Protein ist ein zentraler Faktor für den Schutz vor Telomerdysfunktion und chromosomalen Verschmelzungen. Eine besondere Bedeutung hat TRF2 für die Ausbildung der T-Loop-Struktur. Bereits *in vitro* ist TRF2 in der Lage T-Loops auszubilden (DE LANGE, 2002; VAN STEENSEL et al., 1998). Es wurde beobachtet, dass die Expression einer mutierten Telomerase ohne TRF2-Bindungsstellen zur Apoptose führt. Die Hemmung von TRF2 führt unabhängig vom Zeitpunkt der Replikation über direkte Aktivierung des p53/ATM-Kinaseweges zur Apoptose. Zudem bewirkt eine TRF2-Hemmung über den p53- oder den p16-Weg die zelluläre Seneszenz. Ein TRF2-Verlust kommt somit einer Zelle gleich, die kritisch kurze Telomere aufweist. Zudem konnte man bei TRF2-Hemmung chromosomale und Telomer- End-zu-End-Verschmelzungen beobachten, die am ehesten durch NHE entstehen. Man hat einen Verlust des 3'-Überhangs bei TRF2-Hemmung festgestellt. Man nimmt an, dass dadurch keine T-Loop-Formation mehr ausgebildet werden kann und das 3'-Ende der Telomere als Strangbruch von den DNA-Reparaturmechanismen registriert wird (DE LANGE, 2009). Der Verlust von TRF2 führt zum Zellzyklus-Arrest mit Hochregulation des p53/ATM-Kinaseweges. Daraus lässt sich schließen, dass TRF2 eine Schutzfunktion durch Repression des ATM-Kinaseweges besitzt. Zusammen mit POT1 blockiert TRF2 sowohl die NHE als auch die HR (DE LANGE, 2009) (Abb. 6).

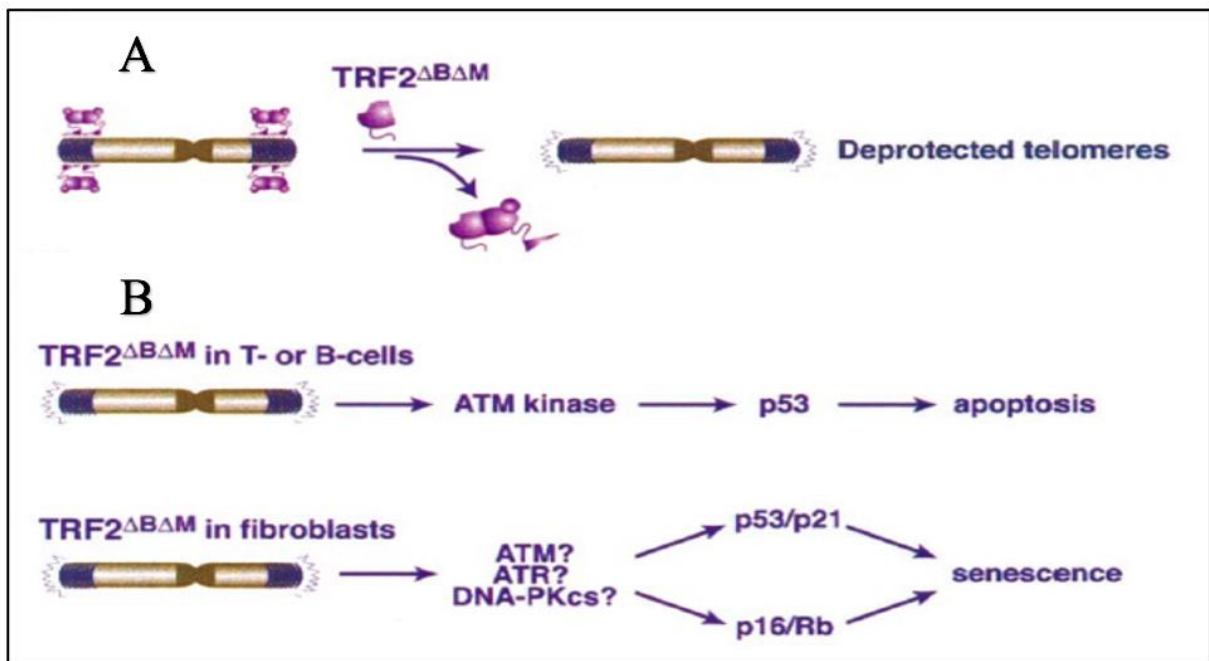


Abbildung 6: TRF2-Hemmung, (DE LANGE, 2002).

A: TRF2-Hemmung führt zum Verlust der Schutzfunktion der Telomere. B: TRF2-Hemmung führt über p53/ATM-Kinase-Weg zur Apoptose und über den p53/p21 oder p16/Rb-Weg zur Seneszenz.

Das Protein POT1 (protection of telomeres 1) bindet als Teil des Shelterin-Komplexes an den 3'-Überhang (BAUMANN, CECH, 2001). Es schützt nicht nur das Ende der Telomere sondern hat auch einen Einfluss auf die Regulation der Telomerlänge (WU et al., 2006). Wenn POT1 gebunden an das 3'-Ende vorliegt und die T-Loop-Struktur stabilisiert, hat die Telomerase keinen Zugang zur Telomersequenz. Man geht davon aus, dass POT1 vom TRF1-Komplex rekrutiert wird, zusammen mit dem TRF1-Komplex die Telomerlänge misst, diese Information übermittelt und durch Bindung bzw. T-Loop-Stabilisierung den Zugang der Telomerase blockiert (Abb. 7). Je länger die Telomere sind, desto höher sind die messbaren POT1- und TRF1-Konzentrationen. Dies legt nahe, dass POT1 eine negative Feedback-Funktion besitzt und verhindert, dass bei langen Telomeren eine weitere Verlängerung stattfinden kann (DE LANGE, 2009; SMOGORZEWSKA, DE LANGE, 2004). So wie TRF2 den ATM-Kinaseweg unterdrückt, unterdrückt POT1 den ATR-Kinaseweg und schützt so vor Seneszenz, Apoptose und homologer Rekombination (DE LANGE, 2009).

Das für die DNA-Reparatur wichtige Protein Ku70 ist darüber hinaus am Schutz und der Stabilisierung der Telomerenden beteiligt. Bei Ku-defizienten Mäusen konnten Telomerverschmelzungen und der Verlust von Telomersequenzen beobachtet werden (BAILEY et al., 1999). Ku bindet nicht direkt an die Telomer-DNA, sondern über einen hoch affinen Protein-Protein-Komplex mit dem zum Shelterin-Komplex gehörenden Protein TRF1,

welches unter anderem für die Telomerlängenregulation verantwortlich ist. Man geht davon aus, dass durch diese Bindung DNA-Reparatur-Bindungsdomänen des Proteins Ku blockiert werden, sodass keine NHE stattfinden kann (HSU et al., 2000). Ku fungiert darüber hinaus als Repressor der homologen Rekombination (DE LANGE, 2009). Zudem hat Ku Einfluss auf die Telomerlänge, indem es mit dem Enzym Telomerase über Bindung an deren RNA-Untereinheit interagiert (TING et al., 2005).

Die Rolle des Tumorsuppressor-Proteins p16 in Bezug auf die Telomerbiologie ist bisher nicht genau bekannt. Einige Studien gingen davon aus, dass eine Seneszenz-Induktion aufgrund einer Telomerdysfunktion primär über p53 und nicht über p16 läuft (BEAUSEJOUR et al., 2003). Eine andere Studie hat anhand von TRF2-defizienten Zellkulturen eine Beteiligung von p16 an einer p53-unabhängigen Antwort auf Telomer-Schäden beobachtet (JACOBS, DE LANGE, 2004). In einer weiteren Studie führte eine initiierte Telomerdysfunktion und zusätzliche p16-Deletion zu einer Verhinderung der Seneszenz. Daraus lässt sich vermuten, dass p16 maßgeblich an der Telomer-induzierten Seneszenz beteiligt ist (ZHANG et al., 2012).

2.3.2.2 Telomerase

Aufgrund des End-Replikations-Problems ist die reguläre DNA-Polymerase, welche nur in 5'-3'-Richtung synthetisieren kann, nicht in der Lage, das Chromosomenende komplett zu replizieren. Der DNA-Einzelstrang der gegenläufigen Richtung muss daher in Fragmenten synthetisiert werden. Zur Synthese werden jeweils kurze RNA-Primer benötigt. Der letzte Primer, der entfernt wird, hinterlässt einen 3'-Überhang, eine Lücke, die nicht gefüllt werden kann. Somit verkürzen sich die Telomere bei jeder Zellteilung. Dieses Problem kann von dem Enzym Telomerase umgangen werden. Die Telomerase besteht aus einer reversen Transkriptase (TERT, Telomerase Reverse Transcriptase Protein) und einer RNA-Untereinheit (TERC). Die RNA-Untereinheit dient der reversen Transkriptase als interner Primer. Durch reverse Transkription der Primer-RNA in DNA kann die Telomerase somit der Verkürzung der Telomere entgegenwirken (GREIDER, BLACKBURN, 1985; SMOGORZEWSKA, DE LANGE, 2004). Der Zugang der Telomerase zu den Telomeren ist nur möglich, wenn die T-Loop-Struktur aufgelöst wird. Man spricht von zwei Stadien, in denen sich die Telomere befinden: Im Stadium der schützenden T-Loop-Kappe und in dem aufgeklappten Stadium ohne Kappe (BLACKBURN, 2001). Der Shelterin-Komplex beeinflusst den Wechsel zwischen den Stadien, reguliert dadurch den Zugang der Telomerase zu den Telomerenden und beeinflusst somit die Telomerlänge. Man vermutet, dass es durch die zunehmende Telomerlängenverkürzung zur Destabilisierung der T-Loop-Struktur sowie zu Änderungen des Proteinkomplexes kommt (GRIFFITH et al., 1999). Auch bei Telomeren normaler Länge hat man beobachtet, dass es durch Verlust von Proteinen des Shelterin-Komplexes zu beschleunigter Zellalterung kommt (LOPEZ-OTIN et al., 2013) (vgl. 2.3.2.1).

In den meisten somatischen Zellen ist die Enzymaktivität der Telomerase gering oder nicht messbar. Eine Ausnahme stellen Zellen mit einer starken Proliferationsfähigkeit, wie Keimzellen, Stammzellen proliferierender Gewebe, Tumorzellen und aktivierte Immunzellen dar (Abb. 8). In aktivierten Lymphozyten liegt eine hohe Telomeraseaktivität vor. Man geht davon aus, dass dies der Immunseneszenz entgegenwirkt und der schnellen klonalen Zellexpansion dient (DE PUNDER et al., 2018).

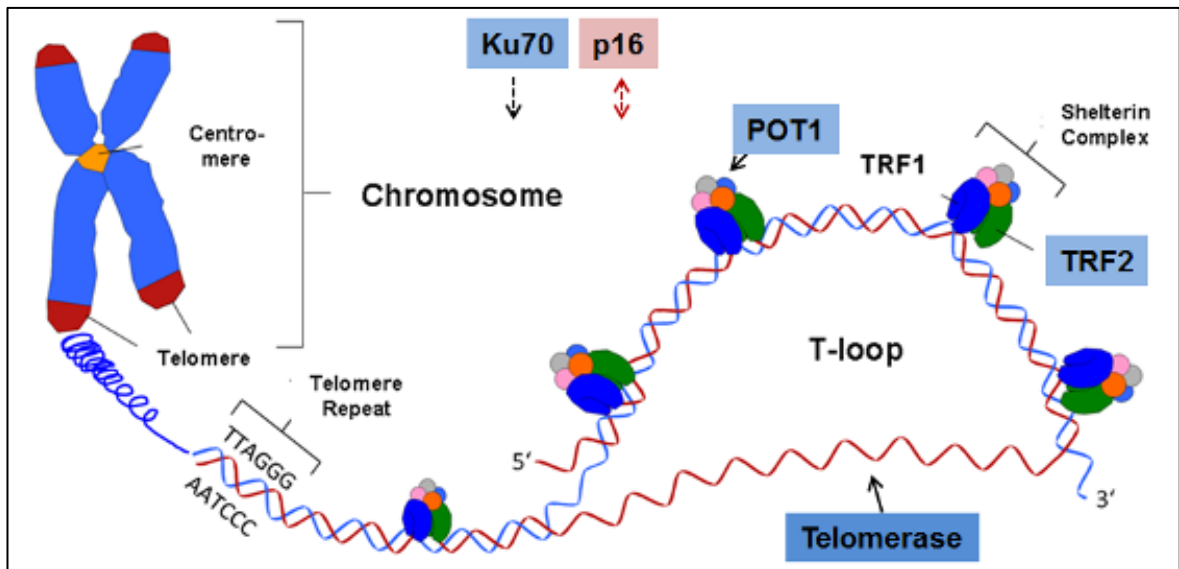


Abbildung 7: Bild modifiziert von (CALADO, YOUNG, 2009)
 Struktur der Telomere und Interaktion mit Telomer-assoziierten Proteinen.

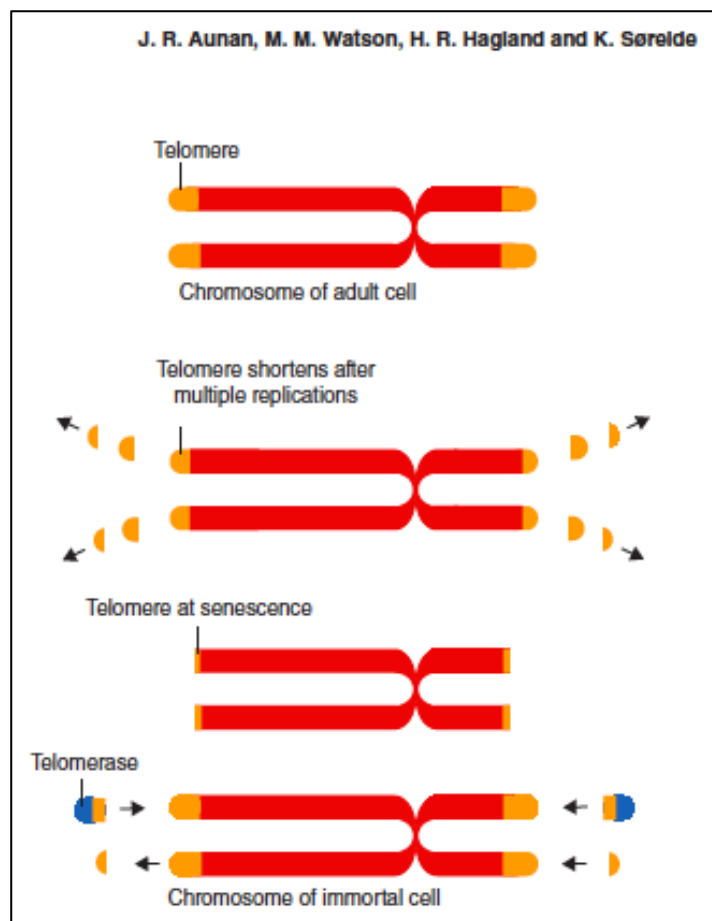


Abbildung 8: Molecular and biological hallmarks of aging, (AUNAN et al., 2016).
 Telomere verkürzen sich mit jeder Zellteilung. Das Enzym Telomerase ist dazu in der Lage, die Telomere und damit das Leben der Zelle zu verlängern und möglicherweise eine Immortalität bei Krebszellen zu bewirken.

2.3.2.3 Messung der Leukozyten-Telomerlänge als Marker für kardiovaskuläre Gesundheit und Krankheit

Die Telomerlänge in Leukozyten verkürzt sich jährlich um ca. 30-35 Basenpaare. Manche Studien zeigen, dass Leukozyten repräsentativ für die Telomerlängenverkürzung im gesamten Körper sind (HERRMANN et al., 2018). Es wird postuliert, dass die Geschwindigkeit, mit der sich die Telomere verkürzen, in allen Geweben vergleichbar ist (DANIALI et al., 2013). Dieser Synchronisations-Hypothese zufolge würde die altersabhängige Telomerlängenverkürzung in zirkulierenden Leukozyten einen repräsentativen Parameter für den gesamten Körper darstellen. Andere Studien gehen von einer Gewebsspezifität der Telomerlänge aus: Je nach Proliferationsaktivität unterscheiden sich schwach von stark proliferierende Gewebe in ihrer Telomerlänge (LUDLOW et al., 2013). Unterschiede zwischen Individuen könnten auch auf einer im frühen Leben festgelegten gewebsspezifischen Telomerlänge basieren, die sich bei in allen Geweben gleicher Telomerlängenverkürzungsgeschwindigkeit im Verhältnis nicht verändert (DANIALI et al., 2013).

Die Telomerlänge, gemessen in zirkulierenden Leukozyten, entspricht der Telomerlänge in Blutgefäßen. Kurze Telomere sind assoziiert mit fortgeschrittener Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen (CVD, cardiovascular diseases). In einer prospektiven Studie wurde die Telomerlänge in zirkulierenden Blutzellen gemessen und die Entwicklung von Karotisatherosklerose sowie der kardiovaskulären Ereignisse ischämischer Apoplex und akuter Myokardinfarkt über einen Zeitraum von zehn Jahren erfasst. Die Probanden, bei denen im Verlauf CVD-Ereignisse auftraten, hatten kürzere Leukozyten-Telomere. Man erklärt sich dies durch eine entstehende Plaqueinstabilität durch Telomer-bedingte Seneszenz. In seneszenten Endothelzellen konnte eine verminderte Reparations- und Remodeling-Kapazität festgestellt werden. Bei fortgeschrittener Atherosklerose führen ein erhöhter Zellumsatz, eine beeinträchtigte Phagozytenaktivität sowie inflammatorischer und oxidativer Stress zur Akkumulierung seneszenten Zellen. Diese fördern eine Gewebsinflammation und einen Matrix-Abbau, der zur Ausdünnung der fibrösen Plaque-Kappe führt. Zudem wurde eine inverse Korrelation der Leukozyten-Telomerlänge mit dem familienanamnestischen CVD-Risiko festgestellt. Daraus lässt sich schließen, dass eine mögliche Vererbbarkeit der Leukozyten-Telomerlänge zur individuellen Prädisposition zu CVD beitragen könnte. Das obere und untere Terzil der Telomerlängen unterschieden sich in ihrem CVD-Risiko um einen Faktor, der der Differenz von 13,9 Jahren des chronologischen Alters entspricht. Die Leukozyten-Telomerlänge gilt als vom chronologischen Alter, Geschlecht und klassischen kardiovaskulären

Risikofaktoren unabhängiger Risiko-Prädiktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen (WILLEIT et al., 2010).

Eine Metaanalyse zeigt pro Standardabweichung reduzierter Telomerlänge ein 21% gesteigertes Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung (CODD et al., 2013). In einem Review wurde eine inverse Korrelation von Leukozytelomerlänge und Risiko für KHK (definiert als Myokardinfarkt, KHK-Tod, Koronarrevaskularisation), unabhängig von konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren, festgestellt (HAYCOCK et al., 2014). Die Verkürzung der Telomere mit zunehmendem Alter ist bereits lange bekannt. Darüber hinaus hat eine Metaanalyse zweier großer prospektiver Studien nach Korrektur der Daten in Bezug auf diese Alterskorrelation eine Assoziation kurzer Telomere mit einem gesteigerten Risiko für einen Tod jedweder Ursache im Vergleich zu Personen mit längeren Telomeren festgestellt (MONS et al., 2017).

2.4 Vorarbeiten zu körperlicher Aktivität und kardiovaskulärer Zellalterung

Körperliche Aktivität könnte unter anderem deswegen positive kardiovaskuläre Effekte haben, da sie die zelluläre Seneszenz und das Telomersystem beeinflusst. Aufgrund von gegensätzlichen Beobachtungen, einer Methodenvielfalt und einem Mangel an kontrollierten Längsschnittstudien ist die Assoziation sportlicher Aktivität mit der Telomerlänge jedoch noch nicht ausreichend gesichert. Außerdem ist der Einfluss von Art, Intensität, Häufigkeit, Dauer und Gesamtmenge der sportlichen Aktivität, der nötig ist, um zelluläre Alterung und Telomere zu beeinflussen, noch unklar (MUNDSTOCK et al., 2015).

In einer systematischen Überprüfung und Metaanalyse wurde bei zwanzig (54%) der eingeschlossenen Studien kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen sportlicher Aktivität und Telomerlänge gefunden, während bei fünfzehn (41%) Studien eine positive Assoziation festgestellt wurde (MUNDSTOCK et al., 2015). In zwei Studien wurde hingegen eine invertierte U-Korrelation in Bezug auf die Telomerlänge sportlich aktiver Personen gefunden (LUDLOW et al., 2008; SAVELA et al., 2013). Dies bedeutet, dass man sowohl bei Nicht-Sportlern als auch bei Extrem-Sportlern, entsprechend den beiden Endpunkten der U-Kurve, kürzere Telomere als bei moderaten Sportlern messen konnte. In der Studie von Savela und Kollegen wurde die Telomerlänge nach 29 Jahren körperlicher Aktivität bestimmt (mittleres Probandenalter 76 Jahre). Bezüglich der anhand ausführlicher Fragebögen erfassten sportlichen Aktivität wurden Walken und Fahrradfahren als moderate Aktivität gewertet,

während hohe Aktivität Laufen, Schwimmen und Hochleistungssport beinhaltet (SAVELA et al., 2013). Ludlow und Kollegen beobachteten die U-Korrelation bei 69 Freiwilligen im Alter von 50 bis 70 Jahren in Bezug auf die letzten fünf Jahre selbstberichteter körperlicher Aktivität (LUDLOW et al., 2008).

Eine mögliche Erklärung dieses Sachverhalts wäre, dass es durch akute Sportexposition hoher Intensität zu oxidativem Stress, DNA-Schäden und inflammatorischen Prozessen kommt, die zu einer höheren reparaturbedingten Zellproliferationsrate führen, wodurch es zur Beschleunigung der Telomerosion kommt. Dies wirkt sich noch nicht nach akuter Belastung sondern erst nach Langzeit-Belastung auf die Telomerlänge aus und könnte mit der antioxidativen Kapazität der Immunzellen korrelieren (LUDLOW et al., 2013). Durch langfristige sportliche Aktivität kommt es andererseits zu einer Verbesserung der anti-inflammatorischen und antioxidativen Antwort. Es ist denkbar, dass die anti-inflammatorischen und antioxidativen Effekte sportlicher Aktivität der Hormesis-Hypothese folgen. Moderate Dosen sportlicher Aktivität könnten sich dementsprechend positiv auf einen Organismus auswirken, während sehr hohe Dosen auch mit schädlichen Effekten einhergehen könnten (MUNDSTOCK et al., 2015).

Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien eine mit steigender Sport-Intensität reduzierte Mortalität sowie längere Telomere entsprechend eines linearen Dosis-Antwort-Prinzips beobachtet (SAVELA et al., 2013).

Bei Männern mit einem niedrig-Risiko Prostatakarzinom konnte 5 Jahre nach einer Lifestyle-Intervention, die neben Diät und Stressmanagement regelmäßiges moderates Ausdauertraining im Sinne von Walking beinhaltet, eine Zunahme der relativen Leukozyten-Telomerlänge festgestellt werden (ORNISH et al., 2013). In einigen Studien konnten darüber hinaus positive Auswirkungen körperlicher Aktivität auf Telomerase, Telomer-assoziierte Proteine und Seneszenzmarker festgestellt werden. Freiwilliges Laufradtraining führte bei Mäusen nach 21 Tagen bzw. nach 6 Monaten zu einer Hochregulation der myokardialen Telomerase sowie der TERT- und TRF2-Expression und zu einer Herabregulation der pro-seneszenten Marker Chk2, p53 und p16. Zudem kam es bei Mäusen nach dreiwöchigem Laufradtraining zu einer Verhinderung der durch Doxorubicin induzierten myokardialen Apoptose (WERNER et al., 2008).

In einer weiteren tierexperimentellen Studie konnte nach dreiwöchigem freiwilligem Laufradtraining bei Mäusen im Vergleich zu inaktiven Kontrollen eine erhöhte Telomeraseaktivität in mononukleären Zellen (MNC) und thorakaler Aorta, eine Hochregulation der TERT-, TRF2-, TRF1- und Ku70-Expression und eine Herabregulation von

Chk2, p53 und p16 beobachtet werden. In dieser Studie zeigte sich bei den Mäusen ein systemischer Effekt, da die Ergebnisse von Aortenwand, MNCs aus dem Knochenmark, Blut und Milz übereinstimmten. Bei TERT-Knockout-Mäusen konnte keiner der genannten durch körperliche Aktivität erzielten Effekte beobachtet werden. Zudem wiesen diese Mäuse eine Hypertonie auf. Dies könnte neben dem indirekten Effekt der Beeinflussung der Zellproliferation und Telomererosion für einen zusätzlichen direkten vaskulären Effekt des Telomerkomplexes sprechen. In der gleichen Arbeit wurden junge (~ 20 Jahre) und mittelalte (~ 51 Jahre) Leichtathleten untersucht, um die Übertragbarkeit der Tierexperimente auf Menschen zu testen. Bei beiden Sportlergruppen konnten in MNCs im Vergleich zu gleichalten, sportlich inaktiven Kontrollen eine erhöhte Telomeraseaktivität und TRF2-Expression festgestellt werden. Eine reduzierte Telomerverkürzung und p16-Expression sowie eine erhöhte Ku70-Expression konnte nur bei den mittelalten Athleten beobachtet werden (WERNER et al., 2009).

Bisher existieren wenige kontrollierte Daten zum Einfluss unterschiedlicher Sportmodalitäten auf die Telomere. In einer aktuellen randomisierten, kontrollierten und prospektiven Studie beobachtete man bei 30-60 Jahre alten, vorausgehend sportlich inaktiven Personen eine Erhöhung der Telomeraseaktivität und der Telomerlänge in Lymphozyten und Granulozyten nach sechsmonatiger, kontrollierter Intervention mit Ausdauer- und Intervalltraining, nicht jedoch mit Krafttraining. Die Probanden, die Ausdauer- und Intervalltraining ausführten, hatten eine höhere maximale Herzfrequenz als die Krafttrainingsgruppe. Eine höhere maximale Herzfrequenz könnte durch erhöhten Scherstress in den Gefäßen eine gesteigerte NO-Ausschüttung bewirken, was erklären könnte, weshalb die beobachteten Effekte nicht in der Krafttrainingsgruppe auftraten. Der mittlere VO₂max-Wert und die mittlere Ruheherzfrequenz war in allen drei Interventionsgruppen vergleichbar. Die Probanden mit überdurchschnittlichen VO₂max-Werten wiesen jedoch eine höhere Telomeraseaktivität auf, als diejenigen mit geringeren Werten. Zudem wurden in der gleichen Studie Akuteffekte von Ausdauertraining mit denen von Krafttraining verglichen. Es konnte nur bei Ausdauertraining eine Telomerase-Erhöhung für ca. vierundzwanzig Stunden beobachtet werden (WERNER et al., 2019) .

Die Effekte von Fußballtraining auf die kardiovaskuläre Zellalterung sind noch kaum untersucht. Eine aktuelle Metaanalyse und systematische Überprüfung, die Männer und Frauen im Alter von 40 Jahren und höher einschloss, kam zu dem Schluss, dass Freizeit-Fußballtraining zu einer verbesserten kardiovaskulären Funktion, Körperzusammensetzung und funktionellen Fähigkeit führt und somit als alternative Sportmodalität zur Verzögerung altersassoziierter physischer und physiologischer Veränderungen und zum Erhalt eines aktiven Lebensstils

genutzt werden sollte (LUO et al., 2018). Ob dies auf zellulärer Ebene zu Effekten führt, ist unbekannt.

Fußballtraining ist eine Sportart mit einem intermittierenden Bewegungsmuster, bestehend aus anaeroben Phasen hoher Intensität, im Wechsel mit Erholungsphasen geringerer Intensität. Einem Review zufolge hat Fußballtraining mit Ausdauertraining vergleichbare und im Vergleich zu moderatem Intervall- und Krafttraining stärkere positive Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System, die maximale aerobe Leistungsfähigkeit, den Blutdruck, den Fettstoffwechsel, die Knochen und die Muskeln (KRUSTRUP et al., 2010a). Bei untrainierten Männern im durchschnittlichen Alter von 68 Jahren kam es nach einjähriger Intervention mit Fußball- oder Krafttraining bei den Fußballspielern zu vorteilhaften kardiovaskulären Effekten: Der linksventrikuläre innere diastolische Durchmesser und das enddiastolische Volumen erhöhten sich, die rechtsventrikuläre systolische Funktion verbesserte sich und die Ruheherzfrequenz verringerte sich. Diese Effekte konnten nicht in der Krafttrainings- und Kontrollgruppe beobachtet werden. Bei beiden Sportinterventionsgruppen kam es zu einer erhöhten linksventrikulären Ejektionsfraktion (SCHMIDT et al., 2014). Fußballtraining zuvor untrainierter, mild bis moderat hypertensiver Männer (~ 46 Jahre) führte nach drei Monaten zu einem größeren linksventrikulären enddiastolischen Volumen, einer verbesserten linksventrikulären diastolischen und systolischen Funktion sowie erniedrigten Blutdruckwerten (ANDERSEN et al., 2014a). Zwölfwöchiges Fußballtraining zuvor untrainierter Männer (~ 68 Jahre) führte zu einer im Vergleich zu vor der Intervention um 15% gesteigerten VO_{2max} . Nach der Intervention kam es zu einer geringeren Herzfrequenz im Gehen (ANDERSEN et al., 2014b). Eine fünfzehnwöchige Fußballintervention bei 35-50 Jahre alten prämenopausalen Frauen mit moderater Hypertonie führte zu deutlich erniedrigten Blutdruckwerten, einer verringerten Gesamtcholesterin- und Triglyzeridkonzentration und einer reduzierten totalen Körperfettmasse im Vergleich zur inaktiven Kontrollgruppe (MOHR et al., 2014). 55-70 Jahre alte Männer und Frauen mit Prädiabetes wurden für eine sechzehnwöchige Intervention in die Gruppen „Fußball und Diät“ und „Diät“ eingeteilt. Im prä- und postinterventionell durchgeführten oralen Glukosetoleranztest zeigten beide Gruppen niedrigere Werte, die Fußballgruppe wies jedoch niedrigere Werte auf als die Diätgruppe. Bei den Fußballspielern kam es zu einem stärkeren Abfall des mittleren arteriellen Drucks, einem größeren Körperfettverlust und einem stärkeren Anstieg der Körpermagermasse als bei der Diät-Gruppe (SKORADAL et al., 2018). In einer Querschnittsstudie wurde bei jungen Profifußballspielern (18-30 Jahre) und älteren langjährigen Fußballspielern (65-80 Jahre) im Vergleich zu gleichalten, untrainierten Kontrollpersonen in der Femur- und Ganzkörper-DXA eine höhere

Knochendichte gemessen. Die alten Fußballspieler hatten trotz eines Altersunterschieds von 47 Jahren eine höhere Knochendichte als die untrainierten jungen Kontrollpersonen (HAGMAN et al., 2018). Bei 20 bis 43 Jahre alten untrainierten Männern führte eine Intervention mit Fußballtraining zu einer gesteigerten Quadrizeps-Muskelmasse. Dieser Effekt konnte nicht bei der verglichenen Lauftrainings-Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe beobachtet werden (KRUSTRUP et al., 2010b). Eine einjährige Intervention mit Fußballtraining führte bei untrainierten, durchschnittlich 68 Jahre alten Männern zu einer Zunahme der Kraft und Bewegungsgeschwindigkeit der ischiokruralen Muskulatur sowie einer Verbesserung der funktionellen Bewegungsfähigkeiten (SUNDSTRUP et al., 2016).

Basierend auf der kürzlich durchgeführten Vorstudie der Arbeitsgruppe Werner und Kollegen (WERNER et al., 2019), die wie oben beschrieben eine Reduktion der Zellalterung in zirkulierenden Zellen ausschließlich bei akutem und chronischem Ausdauertraining, aber nicht bei Krafttraining nachwies, stellte sich die Frage, ob regelmäßiges Fußballtraining vergleichbare Effekte haben könnte.

2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Telomerbiologie stellt einen wichtigen Bestandteil kardiovaskulärer Alterungsprozesse und der Entwicklung altersassoziierter Erkrankungen dar. Sport konnte aufgrund seiner Beeinflussung des Telomersystems und weiterer Seneszenz-assoziiierter Parameter als eine effektive primär und sekundär präventive Maßnahme zur Vorbeugung altersbedingter und kardiovaskulärer Erkrankungen identifiziert werden. Nach den genannten umfangreichen Vorarbeiten stellte sich die Frage, ob Fußball, eine Sportart mit einer dynamischen Mischung aus Ausdauer-, Intervall- und Kraftsport sowie Teamspiel eine vergleichbare Wirkung auf Regulatoren der zellulären Alterung haben könnte. Es existieren nach aktueller Kenntnis keine Studien zur Frage, ob Fußballtraining die altersbedingte Telomerlängenverkürzung und dadurch möglicherweise den biologischen Alterungsprozess beeinflussen kann. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Studie, die Effekte von regelmäßigem professionellem Fußballtraining auf die Telomerlänge sowie auf Telomer-assoziierte Gene und Enzyme in Leukozyten von jungen und alten männlichen Profi-Fußballspielern mit geschlechts- und altersgleichen sportlich inaktiven Personen zu vergleichen. Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen für diese Studie:

1. Wie beeinflusst Fußballtraining die Expression von Genen Telomer-assoziiierter Proteine, die Telomeraseaktivität und die Telomerlänge bei jungen Profi-Fußballspielern im Vergleich zu jungen sportlich inaktiven Kontrollpersonen
2. Wie beeinflusst Fußballtraining die Expression von Genen Telomer-assoziiierter Proteine, die Telomeraseaktivität und die Telomerlänge bei alten Profi-Fußballspielern im Vergleich zu alten sportlich inaktiven Kontrollpersonen
3. Welche Faktoren und klinischen Parameter sind mit Effekten von Fußballtraining auf die Telomerlänge assoziiert

3 Material

3.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
a-D (+) -Glukose	Merck, Darmstadt
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Beads (Quantum FITC-5-MESF)	Bangs Laboratories, Inc., USA
BSA (Bovines Serumalbumin)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt
1x CHAPS lysis buffer	Trapeze, MP Biochemicals, Germany
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DNase I	Peqlab, Erlangen
Ethanol	VWR, Chemicals Prolabo, Darmstadt
FACS-Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FITC-PNA-Sonde	Cambridge Research Biochemicals, UK
FKS (Fötale Kälberserum)	Gibco, Thermo Fisher, USA
Formamid	Roth, Bioscience-Grade
HEK-Zellen	Gibco, Karlsruhe, Germany
Hepes	Gibco, Thermo Fisher, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LDS 751	Thermo Fisher Scientific

Light cycler Fast Start SYBR Green-

PCR Master Mix	Roche, Mannheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roche, Mannheim
Natriumchlorid	Braun, Melsungen
Power SYBR Green PCR Master Mix	Life technologies, Thermo Scientific
RNAasin (RNase Inhibitor)	Promega GmbH, Mannheim
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, ThermoFisher, USA
RPMI-1640-Medium	Gibco by live Technologies
SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems, Thermo Fisher, USA
TRAPeZe 1x CHAPS Lysis Buffer	Trapeze, MP Biochemicals, Germany
Tween20	Sigma-Aldrich, Steinheim
peqGOLD dNTP-Mix	Peqlab, Erlangen
peqGOLD RNApure	Peqlab, Erlangen
peqGOLD DNase 1	Peqlab, Erlangen

3.2 Primer und Sonden

3.2.1 Primer Realtime PCR

Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany; 1:20 verdünnt; for = forward; rev = reverse

Tel-for CGGTTTGTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGG TT

Tel-rev GGCTTGCCTTACC CTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT

36b4-for 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'

36b4-rev	5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'
18s-for	5'-TTG ATT AAG TCC CTG CCC TTT GT-3'
18s-rev	5'-CGA TCC GAG GGC CTC ACT A-3'
TRF2-for	5'-TGT CTG TCG CGG ATT GAA GA-3'
TRF2-rev	5'-GCT GGA AGG TCT CAT ATG AA-3'
POT1-for	5'- TGG GTA TTG TAC CCC TCC AA -3'
POT1-rev	5'- GAT GAA GCA TTC CAA CCA CGG-3'
Ku70-for	5'-GAG CAT CCA GTG TAT CCA AA-3'
Ku70-rev	5'-CAG CAT GAT CCT CTT ATG AC-3'
p16-for	5'-TGC CTT TTC ACT GTG TTG GAG TT-3'
p16-rev	5'-GCA AGA AAT GCC CAC ATG AAT-3'
ACX-Primer	GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC
TS-Primer	AATCCGTCGAGCAGAGTT

3.2.2 Sonden für Flow-FISH

Panagene, Daejeon, Korea, via Cambridge Research Biochemicals, Cleveland, UK

FITC-PNA-Sonde FITC-OO-CCCTAACCTAA CCCTAA

3.3 Lösungen, Medien, Puffer

10xPBS

Natriumchlorid	80g	
Kaliumchlorid	2g	
Na ₂ HPO ₄	14,4g	
KH ₂ PO ₄	2,4g	zu 1l mit H ₂ O pH 7,4
Tween20	1%	

Telomerlängen-PCR

Mastermix	9,2µl Aqua dest.
	0,4µl forward-Primer (1:20 verdünnt) 36b4/ Tel02
	0,4µl reverse-Primer (1:20 verdünnt) 36b4 / Tel02
	7,0µl SYBR-Green Master Mix

Realtime-PCR mit cDNA

Mastermix	9,0µl Aqua dest.
	0,5µl forward-Primer
	0,5µl reverse-Primer
	7,0µl Power SYBR Green PCR Master Mix

TRAP-Assay

Mastermix	10,6µl Aqua dest. 2µl ACX/TS-Primer (0,1µg Primer TS, 0,05µg Primer ACX) 0,4µl Magnesiumchlorid (1.5 mM) 2µl Lightcycler Fast Start SYBR Green PCR Master Mix
------------------	--

Flow-FISH

Einfriermedium	FKS, 10% DMSO
Äquibrierungspuffer (50ml)	37,5 ml Aqua dest., 2,5g a-D(+)-Glukose, 500 µl 1M Hepes, 50 mg BSA in 12 ml Aqua dest. gelöst
Hybridisierungspuffer (50ml)	35 ml deionisiertes Formamid, 1ml 1M Tris (pH 7,5), 0,5 ml NaCl, 2 ml 0,25M Na ₂ PO ₄ (pH 7,4), 11,5 ml Aqua dest.
Waschpuffer (50 ml)	37,5 ml deionisiertes Formamid, 50 mg BSA in 12 ml Aqua dest. gelöst, 1 ml 1M Tris (pH 7,1), 50 µl Tween 20
LDS 751	Konzentration 0,4 µg/ml: 2µl Urlösung (LDS 751 0,1µg/ml Methanol) in 50ml PBS

3.4 Molekularbiologische Kits

QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	(Quiagen, Hilden, Deutschland)
peqGOLD DNase I Kit	(Peqlab, Erlangen)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	(Life technologies, Foster City, USA)

3.5 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
<u>a) Allgemein:</u>	
Heizblock	Haep Labor Consult, Bovenden
Kühlzentrifuge	Sigma, Osterode am Harz
Tischzentrifuge Biofugo Pico	Heraeus, Thermo Ellectron corporation, Osterode
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., USA
Fein-Waage	Acculab sartorius group, USA
“Mr. Frosty” Einfrierhilfe	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
<u>b) Zellisolation:</u>	
Lichtmikroskop	Olympus CK2, Japan
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Hanau
<u>c) RNA-Isolation, reverse Transkription:</u>	
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Px2 Thermal Cycler	Thermo electron corporation, Milford
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
peqSTAR 96X Thermal Cycler System	Peqlab, Erlangen, Germany

d) Realtime-PCR:

StepOnePlus Realtime PCR System Life technologies, Warrington, UK

e) TRAP Assay:

Light Cycler 2.0 (Realtime PCR System) Roche, Mannheim

Glaskapillaren Roche, Mannheim

f) FlowFISH:

FacsCalibur

(Durchflusszytometrie-System) Becton Dickinson, Heidelberg

3.6 Software

CellQuest Pro Software Version 6.0

StepOne Software Version v2.0

LightCycler Software Version 4.1

Microsoft Excel Version 16.39

Microsoft Word Version 16.39

Graph Pad Prism 6.0

4 Methoden

Abbildung 13 führt detailliert auf, welcher Mitarbeiter in dem Projekt, aus dem diese Dissertation entstanden ist, welche Rolle bei der Studie und bei der nachfolgenden Datenerhebung und -auswertung hatte.

4.1 Probandenrekrutierung und Materialgewinnung

4.1.1 Probandenrekrutierung

Die Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Peter Krstrup in Dänemark, verteilt auf das Department of Sports Science and Clinical Biomechanics, das SDU Sport and Health Sciences Cluster der University of Southern Denmark, das Institute of Sports Medicine Copenhagen des Bispebjerg Hospital und das Department of Nutrition, Exercise and Sports der University of Copenhagen. Als Probanden dienten 140 ($n=35$ pro Gruppe) junge und alte aktive männliche Profifußballspieler sowie jeweils gleichalte, männliche, gesunde, sportlich nicht aktive Kontrollpersonen. Die Fußballspieler wurden von dem dänischen Fußballverband (Dansk Boldspil-Union; DBU) sowie Trainern der lokalen Fußballvereine in der Nähe von Kopenhagen rekrutiert. Die untrainierten Kontrollgruppen wurden durch Werbung in lokalen Zeitungen und Flyern in lokalen Institutionen rekrutiert.

Die jungen Fußballspieler waren im Schnitt $21,6 \pm 0,5$, die jungen Kontrollpersonen $24,3 \pm 0,6$ Jahre alt (Abb. 15). Die alten Fußballspieler waren durchschnittlich $71,9 \pm 0,5$, die alten Kontrollpersonen $70,1 \pm 0,7$ Jahre alt. Die jungen Fußballspieler absolvierten $5,3 \pm 0,3$ Trainingseinheiten pro Woche und hatten eine Fußballanamnese von $16,3 \pm 0,6$ Jahren, davon $6,2 \pm 0,6$ Jahren auf professionellem Niveau. Die alten Fußballspieler hatten $2,3 \pm 0,2$ Trainingseinheiten pro Woche. Die Fußballhistorie umfasste hier $60,5 \pm 1,4$ Jahre. Alle Probanden waren seit mindestens einem Jahr Nichtraucher, hatten keine chronischen Erkrankungen, Chemo- oder Radiotherapien. Es war ihnen nicht gestattet, mehr als 2 alkoholische Getränke pro Tag zu sich zu nehmen. Milde bis moderate Hypertonie sowie Hyperlipidämie stellten keine Ausschlusskriterien dar. Alle Studienteilnehmer bestätigten schriftlich ihre Zustimmung zur Studienteilnahme und die Korrektheit ihrer Angaben. Die Studie erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki. Sie wurde genehmigt von der lokalen Ethik-Kommission der Hauptstadtregion Dänemarks.

4.1.2 Materialgewinnung

Die Blutentnahme erfolgte morgens, nach 8-stündiger Nüchternheit und ohne Fußballtraining 48 Stunden vor Entnahme, um Akuteffekte auszuschließen. Es wurden 70 ml venöses Blut unter standardisierten Bedingungen entnommen. 60 ml Natrium-Citrat-Blut wurde zur Isolation der mononukleären Zellen verwendet. 10 ml wurden verwendet, um klinische Parameter wie Nüchternblutzucker, HbA1c, Insulin und Lipid-Profil zu bestimmen. Es wurden Blutdruck und Herzfrequenz mittels automatischem Blutdruckmonitor (Omron HBP-1300) nach zehnmütiger Ruhephase in Rückenlage erfasst. Die Messung wurde in 30-Sekunden-Abständen 4 Mal wiederholt. Es wurde der Mittelwert erfasst. Es wurde eine Ganzkörper-Dual-Röntgen-Absorptiometrie (Dual-energy X-ray Absorptiometry, DXA) durchgeführt, um den Körperfettanteil, die Fettverteilung und die Magermasse (Körpergewicht – Fettmasse) zu bestimmen. Die Probanden mussten zuvor ihre Blase entleeren. Der Scan wurde mit Standard-Methoden durchgeführt (iDXA, Lunar Corporation, Madison, WI, USA). Die effektive Strahlendosis lag bei 4.66 μ Sv. Die Analyse wurde mit der enCORE Version 14.10 Software (GE Healthcare) durchgeführt.

4.2 Isolation mononukleärer Zellen

Die Isolation mononukleärer Zellen (MNC) erfolgte in Dänemark mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation von 60 ml Citratblut mit der Biocoll Separating Solution. Hierzu wurden zunächst jeweils 20 ml Citratblut in ein 50 ml Falcon überführt und mit 15 ml 1xPBS auf 35 ml verdünnt. In zwei weitere 50 ml Falcons wurden jeweils 15 ml Biocoll-Lösung vorgelegt, mit welcher anschließend das verdünnte Citratblut vorsichtig überschichtet wurde. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 2200 rpm und 20-minütigem Auslaufen der Zentrifuge bei abgestellter Bremse bildeten sich aufsteigend die Phasen Erythrozyten, Biocoll-Separating-Solution, MNCs und Plasma (Abb. 9). Die mittlere „buffy coat“ Phase, bestehend aus MNCs und Biocoll-Separating-Solution wurde vorsichtig mittels 5 ml-Pipette in eine neues Falcon überführt und mit 1xPBS auf 50 ml verdünnt, wodurch die Zellen gewaschen wurden. Durch 10 Minuten Zentrifugation bei 2200 rpm bildeten sich Pellets am Boden der Falcons. Der Überstand wurde abgegossen, die Pellets wurden mit 10 ml 1xPBS mittels Stabpipette resuspendiert und die Zellsuspension wurde mit 1xPBS auf 30 ml aufgefüllt. Anschließend wurde erneut bei 2200 pm für 10 Minuten zentrifugiert, wodurch die Zellen ein zweites Mal gewaschen wurden. Das Pellet wurde in 2 ml Einfriermedium (RPMI 1640 Medium + 10%

fetales Kalbserum + 5% Dimethylsulfoxid) resuspendiert und in einem Kryoröhrchen auf Eis gestellt, nachdem 10 µl für die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer entnommen wurden. Die Kryoröhrchen wurden über Nacht schonend mittels „Mr. Frosty“ bei -80 °C eingefroren und bis zum Transport gelagert. Die tiefgefrorenen Proben wurden auf Trockeneis nach Deutschland transportiert und bis zum Beginn der Experimente weiterhin bei -80 °C eingefroren.

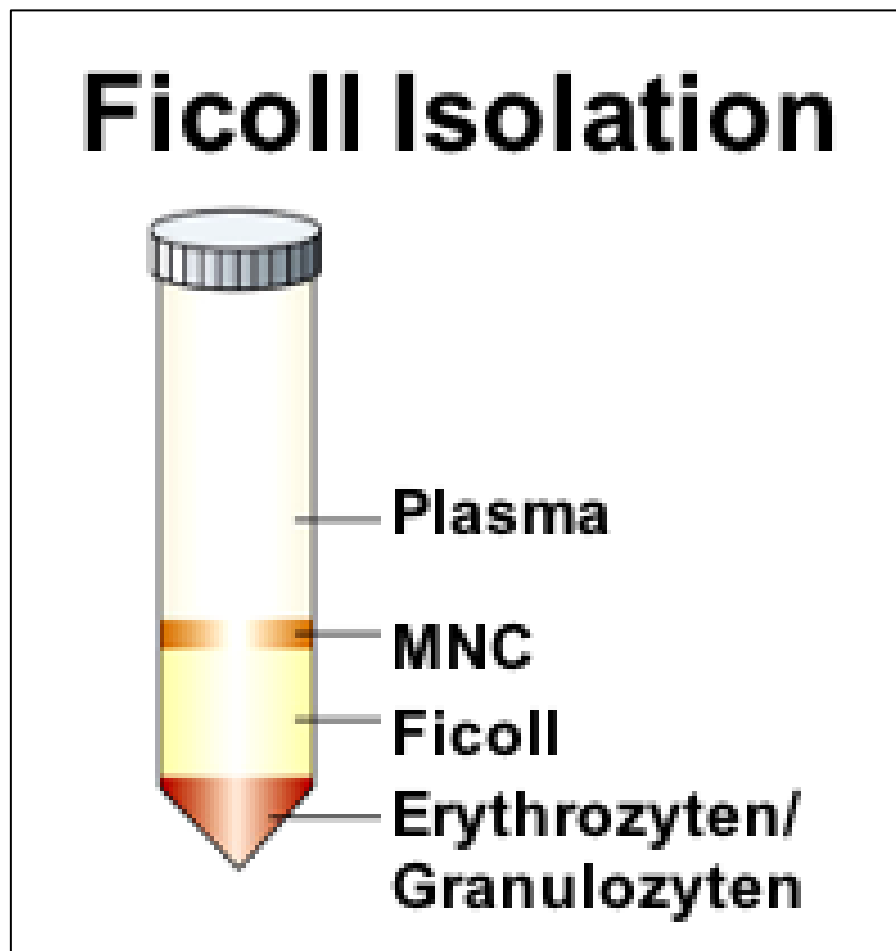


Abbildung 9: Nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation ausgebildete Phasen. Erythrozyten/Granulozyten, Ficoll-Separating Solution, MNCs (mit Resten der Granulozyten-Fraktion), Plasma.

4.3 Vorbereitung der Assays mit mononukleären Zellen

4.3.1 Auftauen der Proben

Für jede Probe wurde ein 15 ml Falcon mit 9 ml RPMI-Medium (+ 10% FKS) vorbereitet, aus dem jeweils 850 µl in das Kryoröhrchen überführt und auf- und abpipettiert wurden, bis die Probe langsam aufgetaut war und in das Falcon überführt werden konnte. Nachdem die Proben für 7 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert wurden, konnte der Überstand vorsichtig abgegossen und die Pellets mit 2 ml PBS vollständig resuspendiert werden.

4.3.2 Zellzählung

Zur Zellzählung wurden je 10 µl der 1:5 oder 1:2 mit PBS verdünnten Proben in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und mindestens zwei Eckquadranten im Zehner-Objektiv ausgezählt. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

Zellzahl/ml = Mittelwert im Eckquadrat x 10.000 x Verdünnung x Endvolumen (2 ml)

Anhand der Zellzahlen konnten die Volumina für die einzelnen Assays berechnet werden:

TRAP-Assay: 10^4 Zellen

Flow FISH: 10^6 Zellen

RNA-Isolation: 10^7 Zellen

4.4 RNA-Isolation, reverse Transkription und Realtime PCR mit cDNA

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener Telomer-regulierender Gene erfolgte eine Realtime-Polymerasekettenreaktion mit copy-DNA. Dazu wurde zunächst die RNA aus den mononukleären Zellen isoliert. Diese wurde anschließend durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben.

4.4.1 RNA-Isolation

Das Volumen mit 10^7 Zellen wurde mit PBS auf 1,5 ml aufgefüllt und 8 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet unter dem Abzug mit 1 ml

peqGOLD RNAPure vorsichtig resuspendiert und bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren. Zu den mononukleären Zellen in 1 ml RNAPure wurden unter dem Abzug 300 µl Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext, bis sie milchig erschienen. Anschließend wurden sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 30 Minuten bei 14000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich in den Röhrchen 3 Phasen: eine obere, farblose, wässrige Phase, eine mittlere, weiße, proteinhaltige Phase und eine untere, gelbe Phase. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in neue, 400 µl Isopropanol enthaltende Röhrchen pipettiert. In diesen Röhrchen wurde die RNA bei -20 °C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wurde nach 60 Minuten Zentrifugation mit 14000 U/min bei 4 °C der Überstand (Isopropanol) abpipettiert und 800 µl eisgekühlter 70%-Ethanol hinzugefügt. Nachdem die Proben gevortext und mit 14000 U/min bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert wurden, wurde der Überstand abpipettiert. Die Pellets wurden unter dem Abzug trocknen gelassen, bis sie durchsichtig erschienen. Anschließend wurden die Pellets mit 20 µl DEPC-H₂O resuspendiert und für 5 Minuten bei 65 °C im Heizblock inkubiert. Die RNA-Konzentration wurde anschließend mittels Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm (NanoDrop 2000) ermittelt. Die Reinheit der RNA wurde anhand von 260/280 nm-Quotienten gemessen.

4.4.2 DNase-Verdau

Um residuelle genomische DNA zu eliminieren, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Für den DNase-Verdau wurden 10 µl mit einer RNA-Konzentration von 2 µg/µl verwendet. Anhand der gemessenen RNA-Konzentrationen wurden die hierfür benötigten Volumina der Probe und des destillierten Wassers berechnet:

$$\text{Volumen Probe} = 2000 / \text{Konzentration RNA (ng/}\mu\text{l)}$$

$$\text{Volumen Aqua dest.} = \text{Volumen Probe} - 10$$

Pro Reaktion wurden 10 µl Mastermix (5,5 µl Aqua dest., 0,5 µl RNase-Inhibitor, 2 µl Digest Buffer, 2 µl DNase) hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben nach kurzer Zentrifugation in den Px2 Thermal Cycler gestellt, wo folgende Schritte durchlaufen wurden: Aufheizen auf 110 °C, 37 °C für 1 Minute, Pause bei 37 °C, 37 °C für 30 Minuten, 75 °C für 10 Minuten, 8 °C für 10 Minuten.

4.4.3 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet. Pro Reaktion wurden 6,8 µl Mastermix (2 µl RT-Puffer, 2 µl Random-Primer, 0,8 µl dNTP-Mix, 1 µl Transkriptase, 1 µl RNase-Inhibitor) und 13,2 µl der DNase verdauten RNA in Reaktionsgefäße gegeben und in den peqSTAR 96X Thermal Cycler gestellt, wo folgende Schritte durchlaufen wurden: Inkubation bei 37 °C für 60 Minuten und Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 93 °C für 5 Minuten.

4.4.4 Realtime PCR mit cDNA

Das Realtime PCR Verfahren ermöglicht neben der Amplifizierung eine zusätzliche Quantifizierung der DNA (HIGUCHI et al., 1993). Der hinzugegebene Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bindet an die doppelsträngige DNA. Die im Gerät zeitgleich mit der Amplifizierung detektierte Fluoreszenzintensität korreliert mit der Menge der amplifizierten DNA. Der sogenannte C_T -Wert (Threshold Cycle) ist die Anzahl der Amplifizierungszyklen, die benötigt werden, um einen definierten Schwellenwert an Fluoreszenzintensität zu erreichen. Der Schwellenwert ist dann erreicht, wenn die Fluoreszenzintensität einer Probe ohne Template (Negativkontrolle) überschritten wird. Anhand des C_T -Wertes kann die Qualität der Amplifikationen überprüft werden. Wenn die dreifach bestimmten Proben innerhalb einer Messung untereinander eine Abweichung des C_T -Wertes um $> 0,5$ hatten, wurde die Messung wiederholt. Es wurde das Referenzgen 18s verwendet, um eventuell vorhandene geringe Unterschiede der pipettierten cDNA-Menge zwischen den einzelnen Proben auszugleichen. Um die mRNA-Expression zu quantifizieren, wurden Standard-Verdünnungsreihen aus allen in dem jeweiligen Lauf verwendeten Proben erstellt. Die Proben wurden mit destilliertem Wasser auf 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 hoch verdünnt. Das Referenzgen 18s wurde mit destilliertem Wasser auf 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 hoch verdünnt. Als Negativkontrolle diente in jedem Durchlauf destilliertes Wasser. In jedem Lauf befanden sich Proben aller vier Probandengruppen, um zufällige methodische Schwankungen von Tag zu Tag auszugleichen. In jedes Reaktionsfeld der Platte wurden mittels elektrischer Pipette je 17 µl Master Mix (9 µl Aqua dest., 0,5 µl forward Primer, 0,5 µl reverse Primer, 7 µl Power SYBR Green PCR Master Mix) und 3 µl Probe gegeben. Anschließend wurde die Platte verschlossen, 3 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert und in das StepOnePlus Realtime PCR System gestellt.

Die initiale Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge erfolgte bei 95 °C für 10 Minuten. Danach folgten 40 Zyklen von je 15 Sekunden 95 °C (Denaturierung) und 1 Minute 60 °C, in denen die Primer-Anlagerung und die Verlängerung der Templates durch die im Power SYBR Green PCR Master Mix enthaltene DNA-Polymerase erfolgte.

4.5 Telomeraseaktivitätsmessung mittels TRAP-Assay

Um die Telomeraseaktivität zu messen, wurde das Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP) verwendet (KIM, WU, 1997). Dieses Verfahren kombiniert eine enzymatische Reaktion mit einer Amplifikation via Realtime PCR. Zunächst erfolgte die Isolation der zellulären Proteine, wie auch der zellulären Telomerase. Der ACX-Primer stellt eine künstliche kurze Telomersequenz dar und bindet an die TERC-Untereinheit der Telomerase und es kommt zur Verlängerung durch die TERT-Untereinheit. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation dieser in vitro gebildeten Telomerstücke via Realtime PCR. Als Vorwärts-Primer kamen der ACX-Primer, als Rückwärts-Primer der TS-Primer zum Einsatz. Sowohl die enzymatische Reaktion als auch die Polymerasekettenreaktion erfolgten in geschlossenen Glaskapillaren. Je aktiver die Telomerase in der isolierten Probe, desto mehr Telomerfragmente werden von ihr in vitro gebaut und desto stärker ist das PCR-Signal in der Realtime PCR.

4.5.1 Chaps-Proteinisolation

Das berechnete Volumen mit 10^4 Zellen wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und mit PBS auf 1 ml aufgefüllt und anschließend 8 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet in 49 µl CHAPS-Lysepuffer resuspendiert. Es wurde 1 µl RNAsin hinzugefügt und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben 20 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Eppendorfgefäß bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

4.5.2 Telomeraseaktivitäts-Messung

Es wurden 5 µl der jeweiligen Probe und 15 µl Mastermix (10,6 µl Aqua dest., 2 µl ACX/TS Primer, 0,4 µl MgCl₂, 2 µl Lightcycler Fast Start SYBR Green PCR Master Mix) in Glaskapillaren pipettiert. Diese wurden in passenden Einsätzen bei 3000 U/min kurz zentrifugiert. Während der anschließenden Inkubation der Proben für 30 Minuten bei 30 °C erfolgte die Telomerverlängerung durch die Telomerase. Anschließend wurden im Lightcycler PCR System folgende Schritte durchlaufen: Die im Lightcycler Fast Start SYBR Green PCR Master Mix enthaltene DNA-Polymerase wurde durch Inkubation bei 95 °C für 10 Minuten aktiviert. Es folgten 40 Amplifikationszyklen mit je 20 Sekunden 95 °C, 30 Sekunden 60 °C und 50 Sekunden 72 °C (Abb. 10). Als Negativkontrolle diente der CHAPS-Puffer, der zuvor 5 Minuten bei 96 °C im Heizblock inkubiert wurde, um eventuelle Verunreinigungen zu eliminieren. Als Positivkontrolle wurden Proteinextrakte von embryonalen menschlichen Nierenzellen (HEK 293) verwendet, um so die Vergleichbarkeit der verschiedenen Läufe sowie eine Qualitätskontrolle zu ermöglichen. Eine Standard-Titrations-Kurve der HEK-Zellen (5 bis 2500 Zellen) wurde erstellt, um die Linearität der Messungen zu gewährleisten ($R^2 = 0,99$) und um die Telomeraseaktivität in HEK-Zell-Äquivalente umzurechnen (Abb. 11). Es wurde eine positive Telomeraseaktivität angenommen, wenn die quantitative Aktivität zwei Mal höher war als die Standardabweichung des Mittelwertes der Negativkontrolle. Um das Risiko eines systemischen Fehlers zu reduzieren, befanden sich in jedem Lauf Proben der vier Probandengruppen.

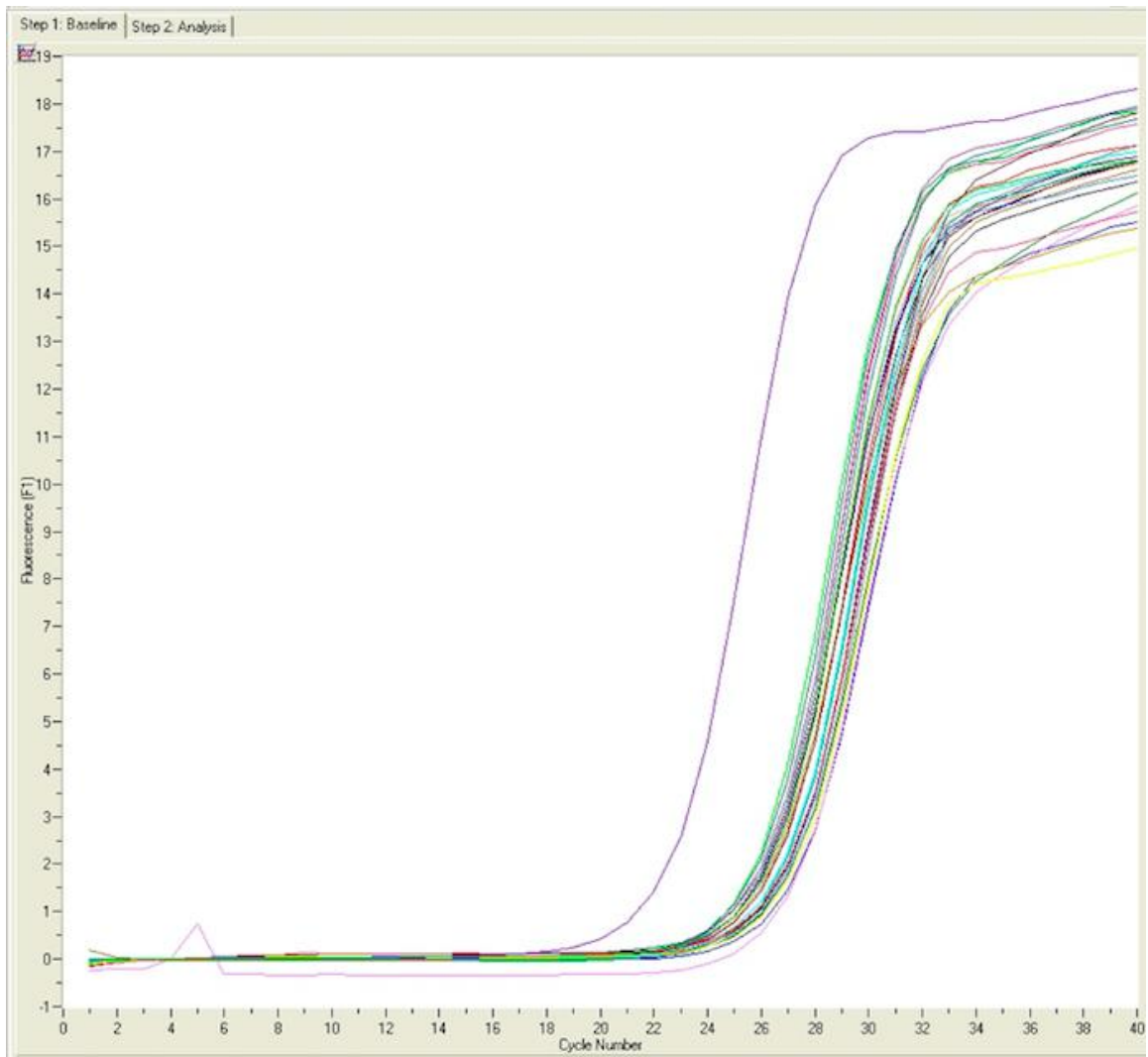


Abbildung 10: Beispiel-Amplifikationskurve TRAP-Assay

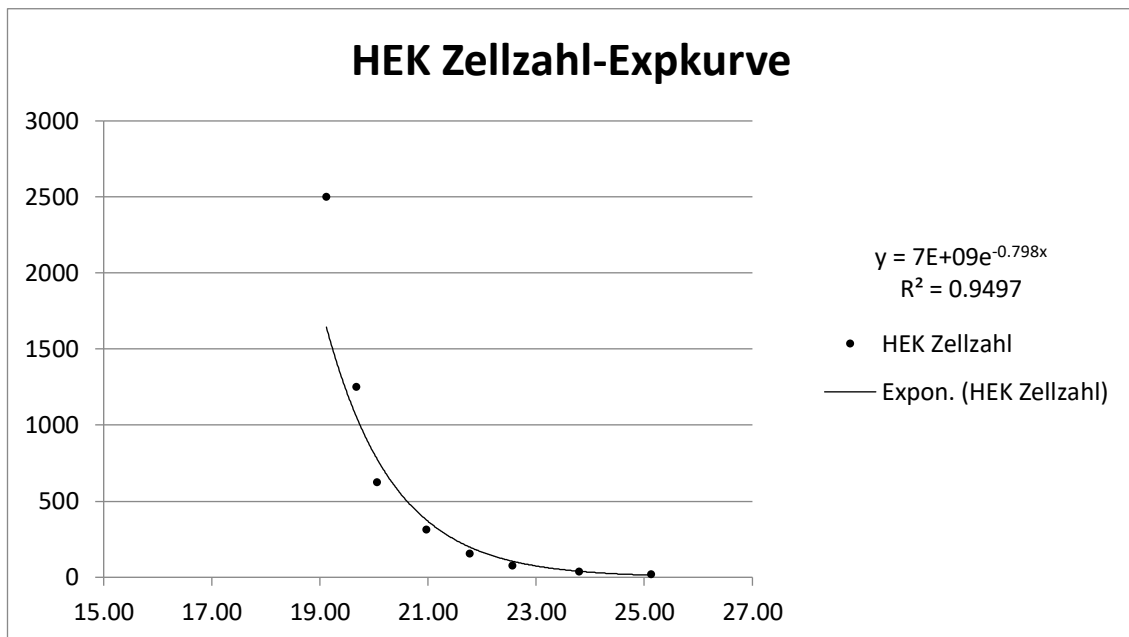


Abbildung 11: HEK-Zell-Standardkurve

4.6 Telomerlängenmessung

Die Telomerlängenmessung in mononukleären Zellen und verschiedenen Leukozyten-subpopulationen erfolgte anhand zwei verschiedener Methoden: Realtime Polymerasekettenreaktion (CAWTHON, 2002) und FACS-Flow-FISH (Fluorescence Activated Cell Sorting - Fluorescence In-Situ Hybridization) (RUFER et al., 1998).

4.6.1 Telomerlängenmessung mittels Realtime Polymerasekettenreaktion

4.6.1.1 DNA-Isolation aus EDTA-Blut

Die PCR-Messung der Telomerlänge erfolgte an genomischer DNA der kernhaltigen Zellen im Blut. Die DNA-Isolation aus EDTA-Blut erfolgte mittels QIAmp DNA Mini Kit anhand des Hersteller-Protokolls. Zu 20 µl QIAGEN Protease wurden zuerst 200 µl aufgetautes EDTA-Blut und danach 200 µl Buffer AL hinzugefügt und durch Puls-Vortexen für 15 Sekunden gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei 56 °C und kurzer Zentrifugation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Ethanol (96-100%) hinzugefügt. Nach 15 Sekunden Puls-Vortexen und kurzer Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde das Lysat vollständig in eine QIAmp Mini Spinsäule (in einem 2 ml Sammelröhrchen) überführt, ohne den Rand zu benetzen. Anschließend wurde für 1 min bei 10.000-12.000 rpm zentrifugiert, das Sammelröhrchen mit dem abzentrifugierten Filtrat verworfen und die Spinsäule in einem neuen 2 ml Sammelröhrchen platziert. Nachdem 500 µl Buffer AW1 hinzugefügt und bei 10.000-12.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert wurde, wurde die Spinsäule in ein neues 2 ml Sammelröhrchen überführt und das Filtrat verworfen. Anschließend wurden 500 µl Buffer AW2 hinzugefügt und für 3 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Spinsäule wurde in einem neuen 2 ml Sammelröhrchen platziert und erneut für 1 Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Spinsäule wurde in ein 1,5 ml Röhrchen überführt und das Sammelröhrchen mit dem Filtrat verworfen. Nach Hinzufügen von 100 µl Buffer AE und Inkubation bei Raumtemperatur (15-25 °C) für 5 Minuten wurde für 1 Minute bei 10.000-12.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde die Spinsäule verworfen und das DNA-Isolat in dem 1,5 ml Röhrchen mit Buffer AE überführt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, um eine ausreichende Menge und Reinheit der DNA nachzuweisen. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

4.6.1.2 DNA-Polymerase-Kettenreaktion

Die Telomerlänge wurde mit einem Realtime PCR-basierten Verfahren bestimmt, welches die Menge der Telomersequenz-Kopien mit den Kopien eines Referenzgens vergleicht. Als Referenzgen diente 36b4 (WERNER et al., 2009). Als telomerspezifischer Primer wurde Tel02 verwendet. Es wurde aus nicht zur Studie gehörenden gepoolten Kontroll-DNAs eine Standardkurve sowohl für die Telomere als auch für das Referenzgen erstellt (zweifache Verdünnungen von 40-2,5 ng). Dies diente der Validierung der Messung sowie dem Nachweis von deren Linearität ($R^2 > 0.99$).

Wenn die zweifach bestimmten Proben innerhalb einer Messung untereinander eine Abweichung des C_T -Wertes um $> 0,5$ hatten, wurde die Messung wiederholt. In jedem Lauf befanden sich Proben aller vier Probandengruppen. In jedem Lauf wurden dieselben zwei nicht mit der Studie assoziierten Kontroll-DNAs gemessen, was der Vergleichbarkeit der Ergebnisse diente. Als Negativ-Kontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet.

Die isolierte genetische DNA wurde mit destilliertem Wasser auf 40 ng/3 μ l (13,34 ng/ μ l) verdünnt. Mit Hilfe einer elektronischen Pipette wurden 17 μ l Mastermix (9,2 μ l Aqua dest., 0,4 μ l forward-Primer, 0,4 μ l reverse-Primer, 7 μ l SYBR Green Master Mix) und 3 μ l Proben-DNA in die jeweiligen Wells der PCR-Platte gegeben. Die Platte wurde verschlossen, 3 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert und in das StepOnePlus Realtime PCR-System gestellt. Zunächst erfolgte ein initialer Polymerase-Aktivierungs-Schritt bei 95 °C für 10 Minuten. Danach folgten 40 Zyklen, die aus jeweils 15 Sekunden bei 95 °C zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge und 60 Sekunden bei 58 °C zur Primer-Anlagerung und Template-Verlängerung bestanden. Nach jedem Lauf wurden Schmelzkurven generiert, um unspezifische PCR-Produkte zu eliminieren. Die Daten wurden mittels StepOnePlus Software analysiert. Daraufhin wurden die Daten in Microsoft Excel exportiert, formatiert und mit der vergleichenden $\Delta\Delta$ - C_T -Methode analysiert. Es wurden Quotienten aus Telomer-Kopien und Referenzgen-Kopien gebildet (T/S-Ratio) und dadurch relative Unterschiede in der Menge der Telomer-repeat-Sequenzen ermittelt. Die Daten wurden als Säulendiagramm für jede Gruppe dargestellt (Mittelwerte \pm SEM). Als wichtiger Unterschied zu der folgenden Flow-FISH-Methode ist zu nennen, dass die PCR den mittleren T/S-Quotienten aller kernhaltigen Zellen der Probe misst und sich verschiedene Zellpopulationen nicht voneinander abgrenzen lassen.

4.6.2 Telomerlängenmessung mittels Flow-FISH

Die Flow-FISH Methode ist eine Kombination aus der Durchflusszytometrie (flow cytometry) und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Aufgrund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften können die Telomerlängen verschiedener Zellpopulationen einer Blutprobe unterschieden werden (BAERLOCHER et al., 2006; RUFER et al., 1998). Dazu wurde die DNA mit einer telomerspezifischen, mit Fluoreszin-Isothiocyanat (FITC) markierten Peptid-Nukleinsäure-Sonde (PNA) hybridisiert. Diese bindet stärker und spezifischer an DNA-Einzelstränge als konventionelle Sonden. Die Intensität des dadurch entstehenden Fluoreszenzsignals korreliert mit der Länge der unterschiedlichen Telomersequenzen.

4.6.2.1 Vorbereitung der MNC-Proben

Das berechnete Volumen mit 10^6 Zellen (vgl. Kap. 4.3.2) wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und mit PBS auf 2 ml aufgefüllt und anschließend 8 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet in 1 ml Flow-FISH-Einfriermedium resuspendiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

4.6.2.2 Auftauen und Äquilibrierung

Die zuvor in Flow-FISH-Einfriermedium (FCS+10%DMSO) eingefrorenen mononukleären Zellen, eine MNC Vergleichsprobe und ein Cryovial mit Thymozyten wurden langsam aufgetaut und in 15 ml Falcons mit 9 ml RPMI-Medium (FKS) überführt. Aus dem Thymozyten-Cryovial wurden 50 μl (entsprechend 10^5 Zellen) zu jeder Probe hinzugegeben, die restlichen Thymozyten wurden ebenfalls in ein Falcon mit RPMI gegeben und im weiteren Verlauf wie die Proben mitbehandelt. Die Proben wurden für 7 Minuten bei 1800 rpm bei $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, der Überstand abgegossen, die Pellets in jeweils 500 μl Äquilibrierungspuffer resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden in der Tischzentrifuge bei 3500 rpm für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert.

4.6.2.3 Denaturierung und Hybridisierung

Die Pellets wurden vorsichtig ohne Luftblasenbildung in 500 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert. Daraufhin wurden sie 10 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert. In dieser Zeit wurde die telomerspezifische Fluoreszenz-markierte FITC-PNA-Sonde vorbereitet. Die Sonde (MW 5408g/M) war bei Lieferung mit 54 µl destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 0,1 nM/L verdünnt und wurde bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Zum Verwenden wurde die Sonde für 5 Minuten bei 65 °C in einem Heizblock erwärmt und das benötigte Volumen wurde mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Es wurde je 7 µl (0,3 µg) der verdünnten PNA-Sonde zu den Proben hinzugefügt. Die Proben wurden verschlossen und für 12 Minuten ins vorgeheizte Wasserbad bei 75 °C gestellt, wodurch die Zellmembranen denaturierten und die Sonde in die Zellen gelangte. Die Hybridisierung der Sonde erfolgte daraufhin bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 90 Minuten.

4.6.2.4 Waschen und DNA-Gegenfärbung

Die Waschschritte erfolgten, um die nicht gebundene PNA-Sonde abzuspielen. Es wurden 900 µl Waschpuffer hinzugegeben, 7 Minuten bei 400 0rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand bis auf 150 µl abpipettiert. Anschließend folgten 2 Waschgänge mit je 600 µl Waschpuffer, 7 Minuten Zentrifugation bei 4000 rpm und Abpipettieren bis auf 150 µl. Um kernlose Zellen nachzuweisen und verschmolzene Zellkerne zu detektieren, erfolgte eine DNA-Gegenfärbung. Dazu wurden die Proben in 400 µl LDS 751 (0,4 µg/ml) lichtgeschützt für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

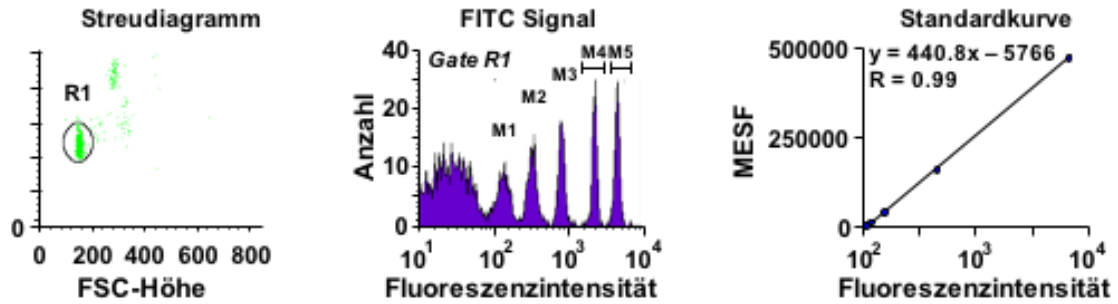
4.6.2.5 Messung am Durchflusszytometer

Die Proben wurden in FACS-Röhrchen mit 1000 µl FACS-Flow überführt und auf Eis gestellt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer FACS Calibur und wurde mit der Cell Quest Pro Software 6.0 ausgewertet. Es wurde in jedem Lauf eine Referenz-Probe mit mononukleären Zellen einer nicht zur Studie gehörenden Person gemessen, welche stets vergleichbare Fluoreszenz-Intensitäten wie die Studien-Proben aufwies. Um systematische Fehler zu reduzieren, wurden in jedem Lauf Proben aller vier Probandengruppen getestet. Zudem wurden

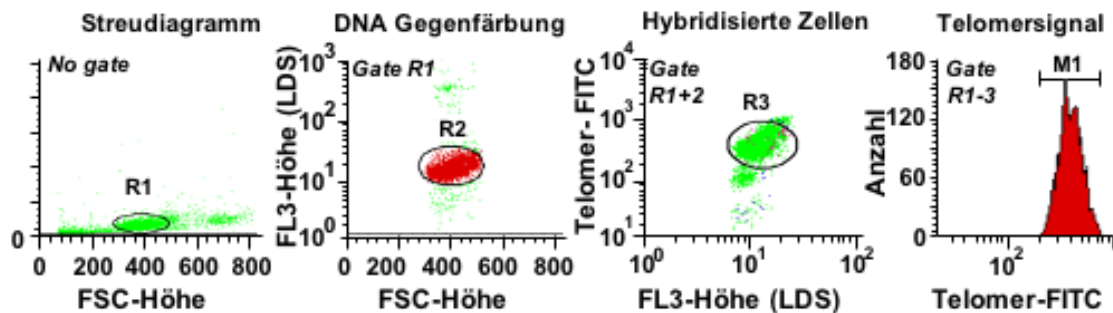
in jedem Lauf 10^5 Rinder-Thymozyten aus einer Thymozytenisolation zu jeder Probe hinzugegeben, sowie eine Probe mit reinen Rinder-Thymozyten gemessen (BAERLOCHER et al., 2006). Dies erfolgte, um einen internen Telomerlängen-Standard zu haben und um tagesabhängige Schwankungen auszugleichen. Aufgrund der gleich langen und insgesamt kürzeren Telomerlängen verglichen mit menschlichen Zellen, sind Rinder-Thymozyten hierzu gut geeignet. Die Datenanalyse erfolgte verblindet ohne Kenntnis der Zugehörigkeit der Proben zu den vier unterschiedlichen Gruppen. Um ausschließlich einzelne, mononukleäre und euploide Zellen zu analysieren, erfolgte ein „Gating“ sowie die zuvor durchgeführte DNA-Gegenfärbung (Abb. 12). Das Gating bestand aus einer Differenzierung von Thymozyten, Lymphozyten und Granulozyten in einem Streudiagramm (R1). Die Population in R1 wurde auf eine effektive DNA-Gegenfärbung (FL3-Kanal, rot) analysiert, um R2 zu definieren. Als nächstes wurden die Zellen selektiert, die eine adäquate DNA-Gegenfärbung erhalten hatten, sowie mit der Fluoreszenz-Sonde markiert (FL1-Kanal, grün) worden waren (R3). Ein falsch hohes Telomer-Signal kann durch aneinander geklottete oder fusionierte Kerne oder polyploide Zellen entstehen. Um diese aus dem Gating auszuschließen, wurde der FL3-Peak gegen die FL3-Fläche aufgetragen. Eine kleine FL3-Fläche (mononukleäre, euploide Zellen) wurde mit einem zusätzlichen Gate (R4) gesichert. Es wurden nur Zellen aus den Gates R1-R4 für das Analyse-Histogramm ausgewählt, in welchem die spezifische Telomer-FITC-Fluoreszenz durch die Software analysiert wurde. Es wurde für jede Zellpopulation (Thymozyten, Lymphozyten, Granulozyten) eine eigene Analyse erstellt. Um die gemessenen Intensitäten in Telomerlängeneinheiten zu konvertieren, wurden in jedem Lauf FITC-markierte „Beads“, welche definierte Mengen an Fluoreszenz besitzen (MESF = Molecules of equivalent soluble fluorochrome), parallel zu den Proben gemessen. Es wurde eine Standardkurve ($R = 0.99$) aus den Mittelwerten der Beads-Kalibrierungsmessungen, in der MESF-Werte gegen die Fluoreszenz-Intensitäten aufgetragen wurden, erstellt. Anhand dieser Kurve wurden die Fluoreszenz-Intensitäten der Thymozyten, Lymphozyten und Granulozyten in MESF-Werte konvertiert. Die MESF-Werte wurden abschließend anhand einer zuvor aus einer anderen Studie (WERNER et al., 2019) erstellten Southern Blot Standard Kurve in Kilobasenpaar-Einheiten (kbp) konvertiert.

FlowFISH FACS Gating und Validierung

A - Kalibrierungs-Beads



B - Thymozyten



C - Mononukleäre Zellen, Thymozytenstandard, alle Gates

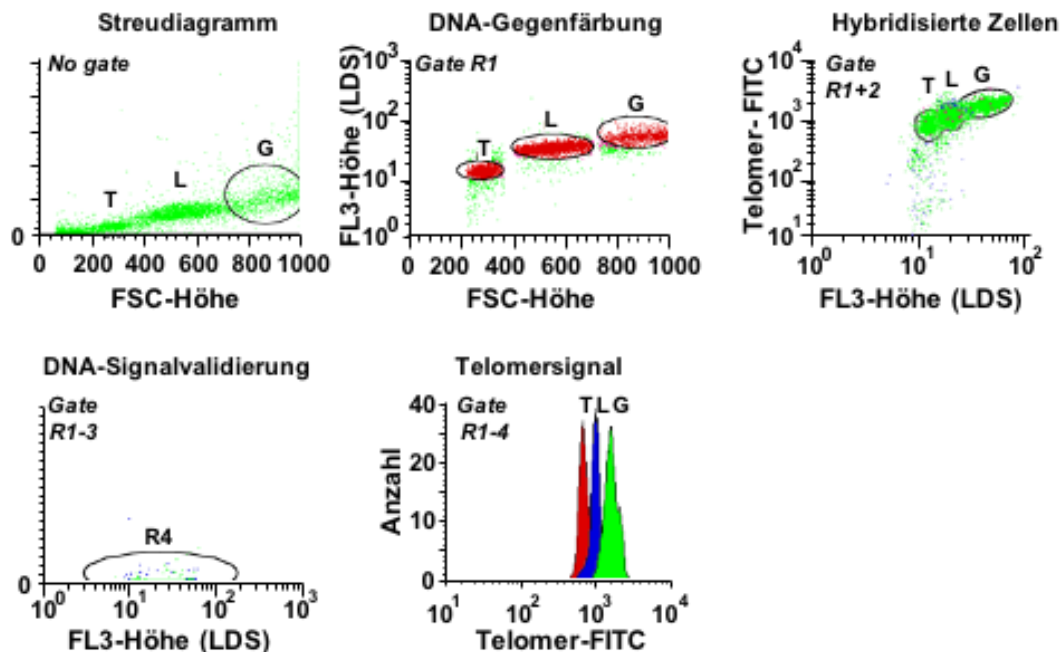


Abbildung 12: Telomerlänge in Leukozyten-Subpopulationen, FACS-FlowFISH.
 (A) Kalibrierungs-Beads und MESF-Standardkurve. (B) Pro Probe wurden je 10^5 Rinder-Thymozyten als interner Standard verwendet. (C) Komplettes Gating für eine repräsentative Probe (T – Thymozyten, L – Lymphozyten, G – Granulozyten). LDS751 wurde zur DNA-Gegenfärbung verwendet.

4.7 Statistische Analyse

Alle Parameter wurden auf eine Normalverteilung anhand des Kolmogorov-Smirnoff-Verfahrens untersucht. 6 Parameter waren normalverteilt: Granulozyten-Telomerlänge, Magermasse des Körpers, Magermasse der Beine, A/G-Quotient, Blutdruck und Größe. Diese Parameter wurden unter den Probandengruppen anhand von ANOVA und dem Newman-Keuls-Test als Post-hoc-Test verglichen. Für die verbleibenden Parameter wurden Gruppenunterschiede anhand des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests und Newman-Keuls-Tests analysiert. Im Fall von ungleichen Gruppengrößen bei fehlenden Messwerten wurde der Dunn's-Test als post-hoc-Test genutzt. Effektgrößen (ES; effect size) wurden kalkuliert als Unterschiede in Mittelwerten, die durch zusammengefasste Standardabweichungen geteilt wurden und nach Hopkins et al. interpretiert wurden (HOPKINS et al., 2009): $ES \leq 0.2$ trivial, $ES > 0.2-0.6$ klein, $ES > 0.6-1.2$ moderat, $ES > 1.2-2.0$ groß, $ES \geq 2.0$ sehr groß. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in Graphen und Tabellen mit 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Das statistische Signifikanzniveau wurde bei P-Werten $< 0,05$ festgelegt.

Methode	Ausführung	Auswertung/ Interpretation
Probandenrekrutierung	Marie Hagman	Marie Hagman, Peter Krustrup
Materialgewinnung	Marie Hagman	Marie Hagman
Erhebung klinischer Daten	Marie Hagman	Marie Hagman
Durchführung klinischer Messungen	Rigshospitalet, Dänemark	Marie Hagman
MNC-Isolation	Marie Hagman, angelernnt durch C. Werner	Marie Hagman, Christian Werner
RNA-Isolation	Katharina Kamp, angelernnt durch C. Cassel	Marie Hagman, Christian Werner
Reverse Transkription	Katharina Kamp, angelernnt durch C. Cassel	Marie Hagman, Christian Werner
qPCR mit cDNA	Katharina Kamp, angelernnt durch C. Cassel	Marie Hagman, Christian Werner
TRAP-Assay	Katharina Kamp, angelernnt durch C. Cassel	Marie Hagman, Christian Werner
Telomerlängen-PCR	Katharina Kamp, angelernnt durch C. Cassel	Marie Hagman, Christian Werner
Flow-FISH	Katharina Kamp, angelernnt durch C. Cassel	Marie Hagman, Christian Werner
Statistische Analyse	Marie Hagman, Christian Werner	Marie Hagman, Christian Werner

Abbildung 13: Zuständigkeiten Methodenteil.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische Ergebnisse

Abbildung 14 gibt einen Überblick des Flussdiagramms der Studie. Alle 140 Probanden, die eingeschlossen wurden, wurden klinisch und molekular charakterisiert. Der Vergleich der klinischen Daten zwischen den Gruppen ist in Abbildung 15 gezeigt.

Die jungen Fußballspieler waren zwischen 18 und 30 Jahre alt. Der Altersdurchschnitt lag bei 22 Jahren. Zum Zeitpunkt der Studie absolvierten sie im Durchschnitt 5, mindestens jedoch 4 Trainingseinheiten pro Woche. Dies schloss die Spiele pro Woche ein. Ihre Trainingslaufbahn umfasste im Durchschnitt 16, mindestens jedoch 10 Jahre. Davon erfolgten im Durchschnitt 6 Jahre Training in der 2. Dänischen Liga oder höher. Neben dem Fußballtraining führten die Sportler 2 sonstige Trainingseinheiten pro Woche durch, die vor allem Krafttraining und Lauftraining beinhalteten.

Die älteren Fußballspieler waren zwischen 65 und 80 Jahre alt. Der Altersdurchschnitt lag bei 72 Jahren. Zum Zeitpunkt der Studie absolvierten sie im Durchschnitt 2, mindestens jedoch 1 Trainingseinheit pro Woche. Dies schloss ein Spiel pro Woche ein. Ihre Trainingslaufbahn umfasste im Durchschnitt 61, mindestens jedoch 40 Jahre. Sie spielten in der „Danish Super Grand Old Masters (65+)“-Liga oder der „Grand Veteran Masters (70+)“-Liga. Neben dem Fußballtraining erfolgte 1 sonstige Trainingseinheit pro Woche, die Lauftraining, Krafttraining, Fahrrad fahren, Golf, Tennis, Schwimmen, Tanzen oder Gymnastik beinhaltete.

Die alten Kontrollpersonen übten seit 22 Jahren kein reguläres körperliches Training aus. Sie waren im Durchschnitt 71 Jahre alt. Die jungen Kontrollpersonen hatten seit 5 Jahren kein reguläres körperliches Training. Sie waren im Durchschnitt 24 Jahre alt. 10 der Probanden haben nie an einem regulären körperlichen Training teilgenommen. Jeweils 10 Probanden der Gruppen alte Fußballspieler und alte Kontrollpersonen nahmen blutdrucksenkende und/oder cholesterinsenkende Medikamente.

Wie in Abbildung 15 gezeigt, waren die jungen Fußballspieler 2,7 Jahre jünger als die jungen Kontrollpersonen ($p = 0,002$). Die alten Fußballspieler waren 1,8 Jahre älter als die alten Kontrollpersonen ($p = 0,013$). Reguläres Fußballtraining war assoziiert mit Unterschieden der Körperzusammensetzung.

Verglichen mit den jungen Kontrollen lag bei den jungen Fußballspielern ein um 7,6 kg niedrigeres Körpergewicht vor ($p < 0,001$, $ES = 0,58$) und sie wiesen einen um $2,2 \text{ kg/m}^2$ niedrigeren BMI auf ($p < 0,001$, $ES = 0,65$). Im Vergleich mit den jungen Kontrollpersonen zeichnete sich die Gruppe der jungen Fußballspieler durch einen 14,2% kleineren Ganzkörperfettanteil aus ($p < 0,001$, $ES = 1,50$). Der androide Fettanteil war 20,7% ($p < 0,001$, $ES = 1,47$), der gynoide Fettanteil 14,4% ($p < 0,001$, $ES = 1,48$) geringer. Der Quotient aus androidem und gynoidem Fettanteil (A/G-Quotient) war um 0,3 niedriger ($p < 0,001$, $ES = 1,00$). Die Messung der Körpermagermasse ergab einen um 6,0 kg höheren ($p < 0,001$, $ES = 0,90$), die der Beinmagermasse einen um 1,5 kg höheren Wert ($p = 0,010$, $ES = 0,56$) (Abb. 15). Zudem hatten die jungen Fußballspieler im Vergleich zu den jungen Kontrollpersonen eine um 9/min. niedrigere Herzfrequenz ($p < 0,001$, $ES = 0,90$). Es zeigten sich eine um 0,40 mmol/l niedrigere Gesamtcholesterin- ($p > 0,001$, $ES = 0,45$) und LDL-Cholesterinkonzentration ($p > 0,001$, $ES = 0,53$), sowie eine um 0,41 mmol/l niedrigere Triglyzeridkonzentration ($p > 0,001$, $ES = 0,77$).

Verglichen mit den alten Kontrollpersonen wiesen die alten Fußballspieler ein um 4,8 kg geringeres Körpergewicht auf ($p = 0,002$, $ES = 0,44$). Der BMI lag $1,7 \text{ kg/m}^2$ unter dem der alten Kontrollpersonen ($p = 0,013$, $ES = 0,46$). Die Gruppe der alten Fußballspieler war charakterisiert durch einen um 4,1% geringeren Ganzkörperfettanteil ($p < 0,001$, $ES = 0,64$). Der androide Fettanteil war 5,6% ($p < 0,001$, $ES = 0,57$) und der gynoide Fettanteil 3,9% niedriger ($p = 0,022$, $ES = 0,64$). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Körpermagermasse. Die Messung des Blutglukoseprofils ergab bei den alten Fußballspielern im Vergleich zu den alten Kontrollpersonen ein besseres Ergebnis. Der geschätzte Durchschnittsblutzucker war 0,4 mmol/l ($p < 0,001$, $ES = 0,60$), der Insulinspiegel im Blut $27 \text{ } \mu\text{mol/l}$ niedriger ($p = 0,005$, $ES = 0,60$). Die Herzfrequenz der alten Fußballspieler war mit 60/min. nicht signifikant niedriger im Vergleich zu den alten Kontrollpersonen (63/min.). Der Blutdruck und das Cholesterinprofil zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 15).

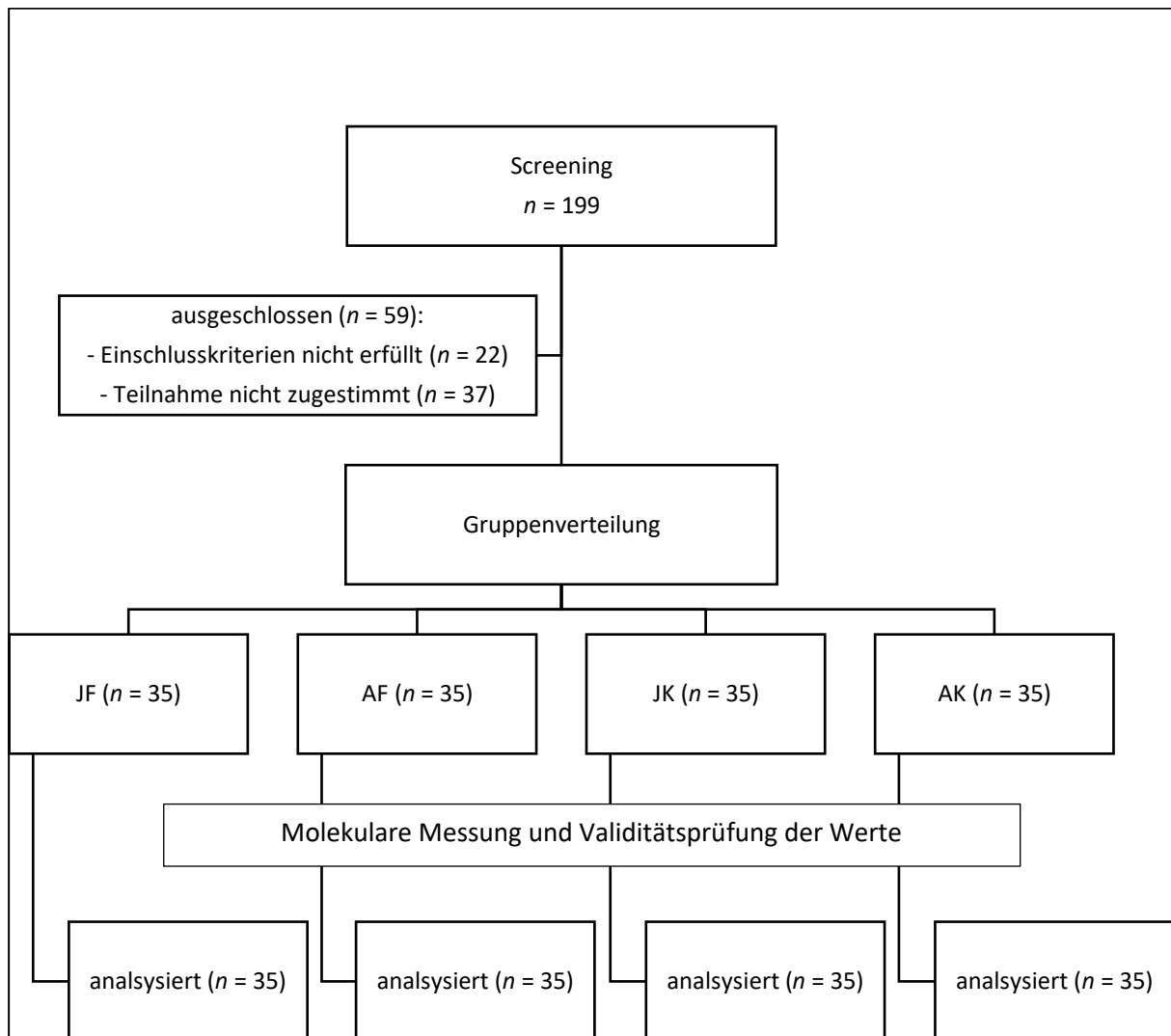


Abbildung 14: CONSORT-Flussdiagramm (Consolidated Standards of Reporting Trials). Anzahl der Probanden, die die Auswahlkriterien erfüllten und Zuteilung zu den Probandengruppen „junge Fußballspieler“ (JF), „junge Kontrollpersonen“ (JK), „alte Fußballspieler“ (AF), „alte Kontrollpersonen“ (AK); n, Anzahl der Probanden.

	Junge Fußballspieler (n=35)	Junge Kontrollpersonen (n=35)	Alte Fußballspieler (n=35)	Alte Kontrollpersonen (n=35)
Klinische Parameter				
Alter (Jahre)	21.6 ± 0.5 **†††###	24.3 ± 0.6 †††###	71.9 ± 0.5 #	70.1 ± 0.7
Größe (cm)	181.7 ± 0.9 †††###	181.7 ± 1.1 †††###	176.3 ± 1.0	175.9 ± 1.0
Körpergewicht (kg)	77.0 ± 1.1 ***†††###	84.6 ± 2.8	82.9 ± 1.6 ##	87.7 ± 2.0
BMI (kg/m ²)	23.3 ± 0.3 ***†††###	25.5 ± 0.7 †††###	26.7 ± 0.5 #	28.4 ± 0.7
Körperzusammensetzung				
Fettanteil (%)	14.5 ± 0.6 ***†††###	28.7 ± 1.4 ##	29.0 ± 1.0 ###	33.1 ± 1.1
Androider Fettanteil (%)	12.6 ± 0.9 ***†††###	33.3 ± 2.1 ###	36.7 ± 1.5 ###	42.4 ± 1.7
Gynoider Fettanteil (%)	14.2 ± 0.7 ***†††###	28.7 ± 1.4 #	26.2 ± 1.0 #	30.1 ± 1.0
A/G-Quotient	0.9 ± 0.0 ***†††###	1.1 ± 0.0 †††###	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0
Körpermagermasse (kg)	63.1 ± 0.9 ***†††###	57.0 ± 1.1	55.9 ± 0.8	56.0 ± 0.8
Beinmagermasse (kg)	21.8 ± 0.3 *†††###	20.3 ± 0.5	19.4 ± 0.3	19.4 ± 0.4
Klinische Untersuchung				
RHF (Schläge/min.)	52 ± 1 ***†††###	61 ± 1	60 ± 1	63 ± 2
SB (mmHg)	119 ± 1 †††###	117 ± 2 †††###	141 ± 3	137 ± 2
DB (mmHg)	64 ± 1 †††###	66 ± 1 †††###	82 ± 3	80 ± 1
MAD (mmHg)	82 ± 1 †††###	83 ± 1 †††###	102 ± 2	99 ± 1
Klinische Chemie				
Nüchternblutglukose (mmol/l)	4.9 ± 0.1 †††###	4.9 ± 0.1 †††###	5.6 ± 0.1	5.5 ± 0.1
HbA1c (mmol/l)	5.9 ± 0.1 ###	5.5 ± 0.1 §§§†††###	6.0 ± 0.1 ###	6.3 ± 0.1
Insulin (pmol/L)	48 ± 3 ###	64 ± 5 ##	61 ± 5 ##	88 ± 9
Gesamtcholesterin (mmol/l)	3.9 ± 0.1 ***†††###	4.3 ± 0.2 †††###	5.5 ± 0.1	5.4 ± 0.2
HDL-C (mmol/l)	1.49 ± 0.04 †	1.30 ± 0.04 §§§†††###	1.73 ± 0.08 ##	1.56 ± 0.07
LDL-C (mmol/l)	2.3 ± 0.1 ***†††###	2.7 ± 0.2 †††###	3.3 ± 0.1	3.5 ± 0.2
Triglyzeride (mmol/l)	0.72 ± 0.05 ***†††###	1.13 ± 0.11 †#	1.14 ± 0.07	1.31 ± 0.10

Abbildung 15: Klinische Daten.

Klinische Parameter, Körperzusammensetzung, klinische Untersuchung und klinische Chemie der jungen Fußballspieler, alten Fußballspieler, jungen Kontrollpersonen, alten Kontrollpersonen. Gruppen-Mittelwerte ± SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, verglichen mit JK; † p < 0.05, †† p < 0.01, ††† p < 0.001, verglichen mit AF; # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, verglichen mit AK; §§§ p < 0.001, verglichen mit JF. BMI: Body Mass Index; RHF: Ruheherzfrequenz; SB: systolischer Blutdruck; DB: diastolischer Blutdruck; MAD: mittlerer arterieller Druck; HbA1c: Hämoglobin A1c; HDL-C: High-Density Lipoprotein Cholesterin; LDL-C: Low-Density Lipoprotein Cholesterin.

5.2 Experimentelle Ergebnisse

5.2.1 Realtime PCR-Messung der mRNA-Expression

Durch die Realtime PCR wurde die Genexpression verschiedener Telomer-regulierender Gene auf mRNA-Ebene untersucht. Das Protein TRF2 ist Teil des Shelterin-Komplexes und dient der Ausbildung der schützenden T-Loop-Struktur. Diese stellt einen essentiellen Bestandteil zum Schutz vor Seneszenz und Apoptose dar. Die relative mRNA-Expression von TRF2 war bei den jungen Fußballspielern 5,49 (95% KI: 3,56-7,42). Die jungen Kontrollpersonen hatten einen Wert von 1,70 (95% KI: 0,88-2,52). Somit war die mRNA-Expression von TRF2 bei den jungen Fußballspielern im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe 3,2-fach erhöht ($p = 0,003$, ES = 0,86). Die Messung der relativen TRF2-mRNA-Expression der alten Kontrollpersonen ergab 1,50 (95% KI: 0,83-2,16). Verglichen mit den jungen Fußballspielern lag hier eine 3,7-fach erhöhte mRNA-Expression vor ($p = 0,003$, ES = 0,91). Die alten Fußballspieler unterschieden sich mit dem Messergebnis 3,96 (95% KI: 1,85-6,07) nur tendenziell von den alten Fußballern ($p = 0,560$, ES = 0,60) (Abb. 16).

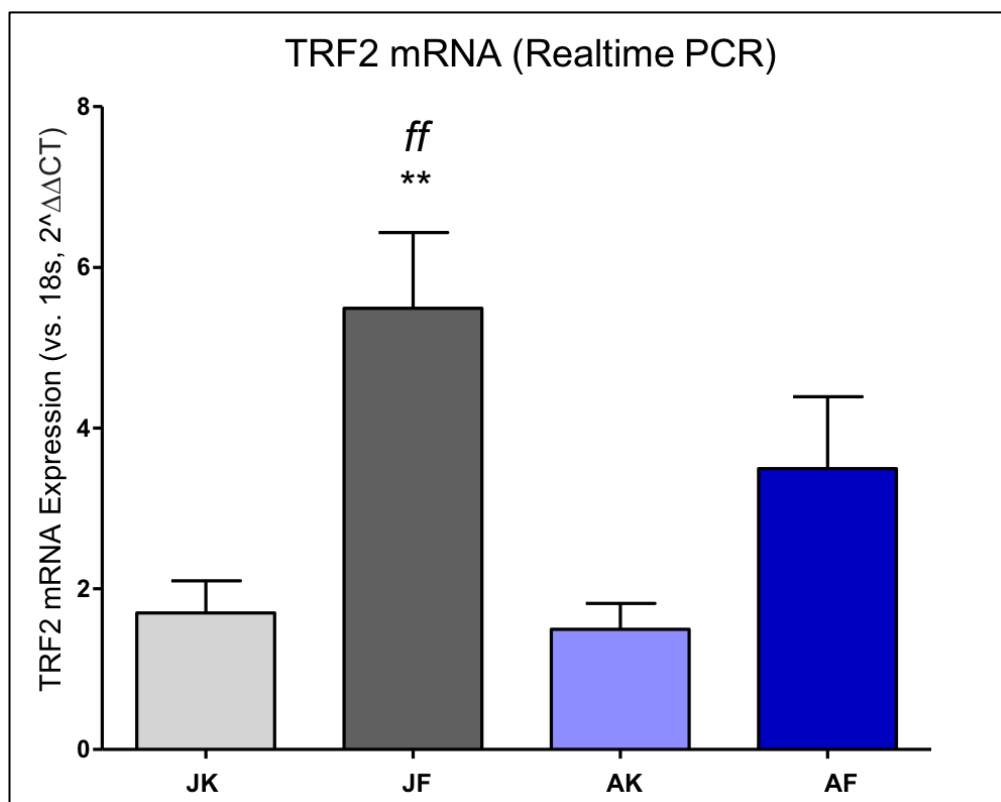


Abbildung 16: TRF2 mRNA Expression bei jungen Fußballspielern (JF), jungen Kontrollen (JK), alten Fußballspielern (AF), und alten Kontrollen (AK). Normierung auf 18s mRNA. ** $p < 0,01$ im Vergleich mit JK, *ff* $p < 0,01$ verglichen mit AK.

Das für die DNA-Reparatur wichtige Protein Ku70 dient dem Schutz der Telomerenden vor Verschmelzungen und interagiert mit der Telomerase. Die relative mRNA-Expression von Ku70 war bei den jungen Fußballspielern 2,87 (95% KI: 1,76-3,99). Die jungen Kontrollpersonen hatten den Wert 1,28 (95% KI: 0,83-1,72). Somit war die Ku70 mRNA-Expression der jungen Fußballspieler im Vergleich zu den jungen Kontrollpersonen 2,2-fach höher ($p < 0,001$, ES = 0,61). Die alten Kontrollpersonen wiesen eine relative Ku70-mRNA-Expression von 1,29 auf, normiert auf 18s (95% KI: 1,03-1,56). Bei den jungen Fußballspielern zeigte sich im Vergleich zu der alten Kontrollgruppe eine 2,2-fach erhöhte mRNA-Expression von Ku70 ($p = 0,016$, ES = 0,62). Die alten Fußballspieler waren durch eine tendenziell höhere Ku70-mRNA-Menge charakterisiert [1,77 (95% KI: 1,30-2,23)], welche sich aber von den alten Kontrollpersonen nicht signifikant unterschied ($p = 1,000$, ES = 0,44) (Abb. 17).

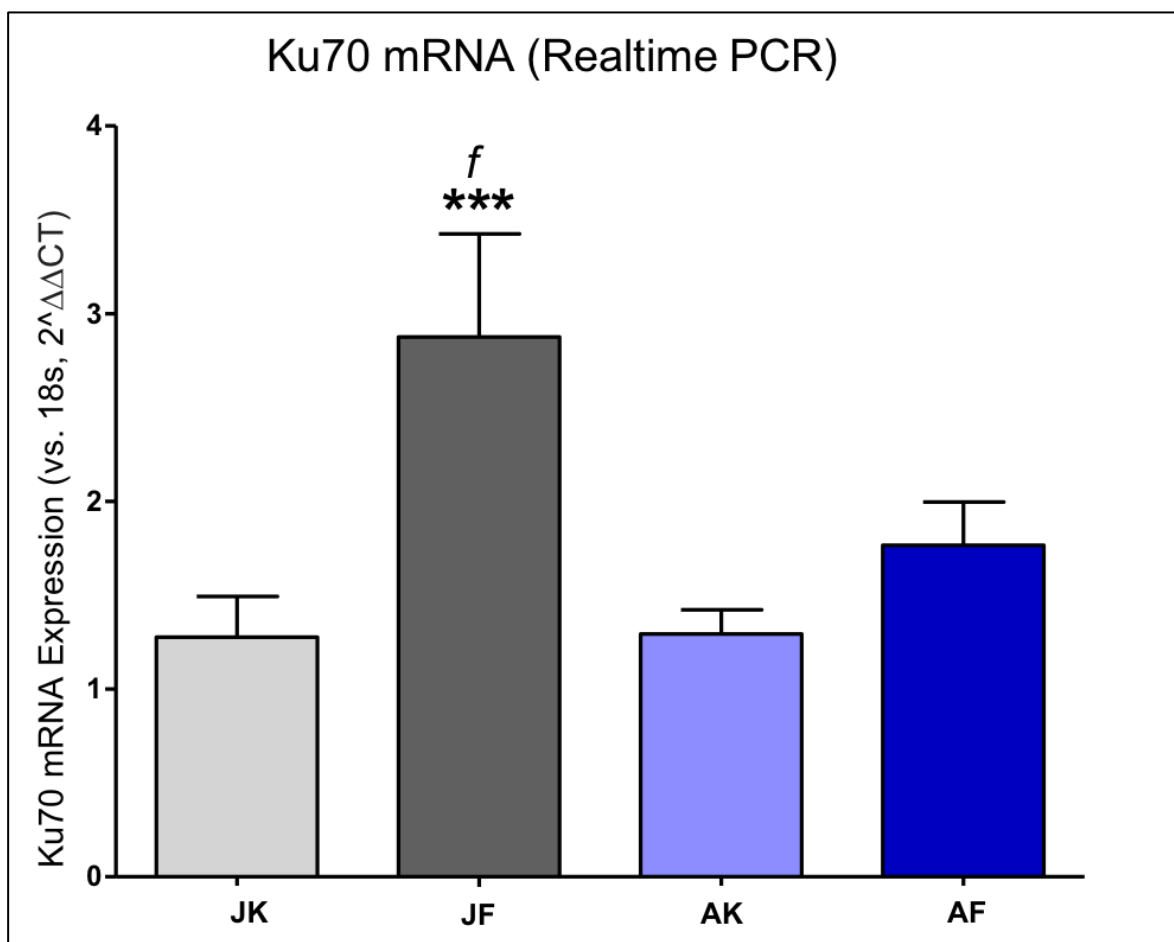


Abbildung 17: Ku70 mRNA Expression bei jungen Fußballspielern (JF), jungen Kontrollen (JK), alten Fußballspielern (AF), und alten Kontrollen (AK). Normierung auf 18s mRNA. *** $p < 0,001$, verglichen mit JK; $f p < 0,05$, verglichen mit AK.

Das Protein POT1a besitzt als struktureller Teil des Shelterin-Komplexes eine wichtige Schutzfunktion für die Telomere und ist an einem negativen Feedback-Mechanismus der Telomerlängenregulation beteiligt. Die POT1a-Expression der jungen Fußballspieler lag bei 2,35 (95% KI: 1,77-2,92). Die jungen Kontrollpersonen hatten den Wert 1,07 (95% KI: 0,92-1,22). Somit war die mRNA-Expression des Gens POT1a bei den jungen Fußballspielern im Vergleich zu den jungen Kontrollpersonen 2,2-fach erhöht ($p = 0,002$, ES = 0,93). Die alten Fußballspieler wiesen einen Wert von 1,22 auf (95% KI: 0,89-1,55). Bei den alten Kontrollpersonen ergab die Messung 0,74 (95% KI: 0,58-0,91), weshalb sich die alten Fußballspieler nicht signifikant von den alten Kontrollpersonen unterschieden ($p = 0,085$, ES = 0,66). Verglichen mit den alten Fußballspielern ($p = 0,003$, ES = 0,78) sowie mit den alten Kontrollpersonen ($p < 0,001$, ES = 1,10) lag bei den jungen Fußballspielern eine höhere POT1a mRNA-Expression vor (Abb. 18).

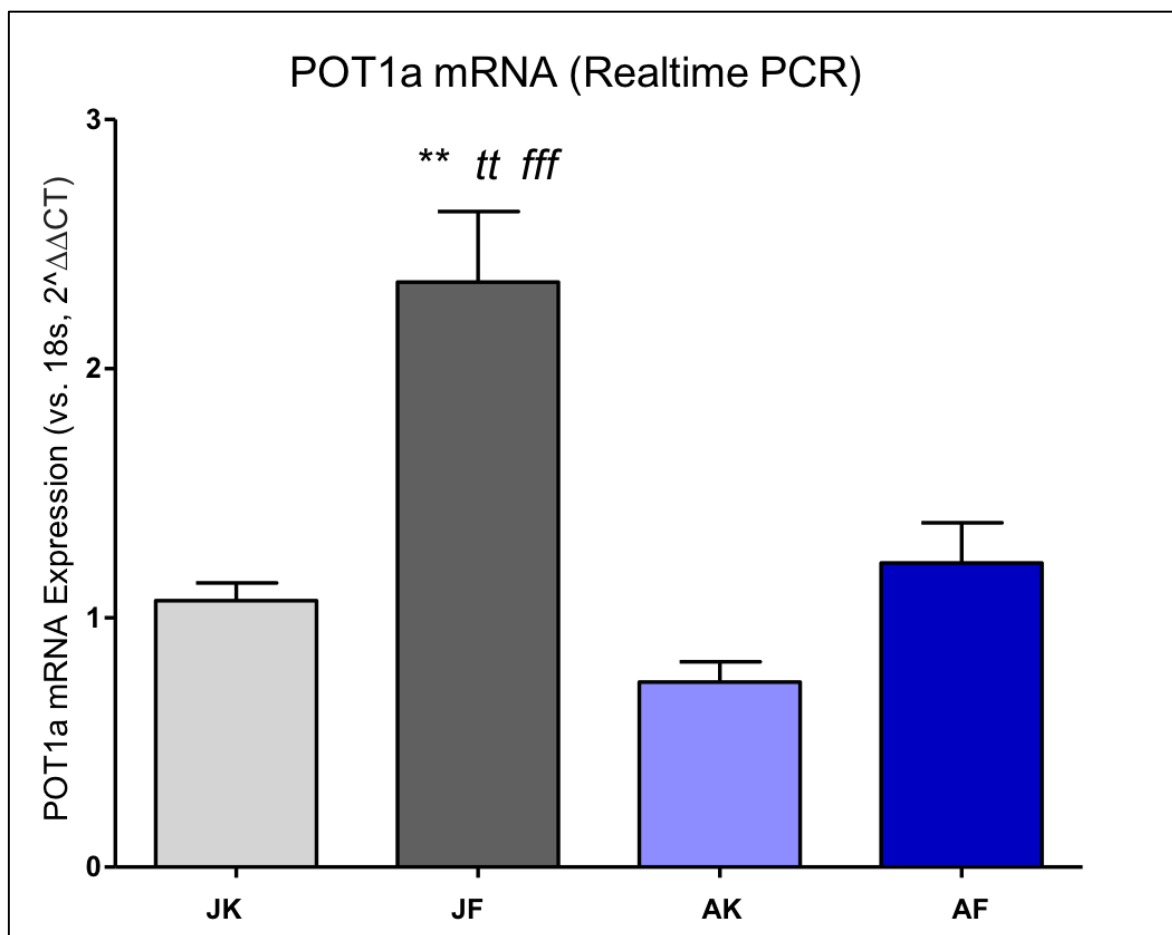


Abbildung 18: POT1a mRNA Expression bei jungen Fußballspielern (JF), jungen Kontrollen (JK), alten Fußballspielern (AF), und alten Kontrollen (AK). Normierung auf 18s mRNA. ** $p < 0,01$, verglichen mit JK; *tt* $p < 0,01$., verglichen mit AF; *fff* $p < 0,001$, verglichen mit AK.

Das Tumorsuppressor-Protein p16 dient als Biomarker der Zellalterung und steht mit altersassoziierten Erkrankungen in Verbindung. Es ist an dem Signalweg der Telomer-induzierten Seneszenz beteiligt. Die p16-mRNA-Expression der alten Kontrollpersonen lag bei 2,53 (95% KI: 1,87-3,19). Die alten Fußballspieler hatten den Wert 1,59 (95% KI: 1,24-1,94). Somit war die p16-Expression bei den alten Kontrollpersonen im Vergleich zu den alten Fußballspielern 1,6-fach erhöht ($p = 0,025$, ES = 0,59). Das Messergebnis der jungen Kontrollpersonen ergab 1,14 (95% KI: 0,90-1,37). Bei den alten Kontrollpersonen lag eine 2,2-fach höhere p16-mRNA-Expression als bei den jungen Kontrollpersonen vor ($p < 0,001$, ES = 0,87). Die jungen Fußballspieler wiesen eine p16-mRNA-Expression von 1,30 auf (95% KI: 0,98-1,62), sodass die Gruppe der alten Kontrollpersonen durch eine 1,9-fach höhere p16-mRNA-Menge charakterisiert war ($p < 0,001$, ES = 0,76). Im Vergleich der p16-mRNA-Expression der alten Fußballspieler mit derer beider junger Probandengruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Es zeigte sich kein Unterschied der p16-mRNA-Expression der beiden jungen Probandengruppen (Abb. 19).

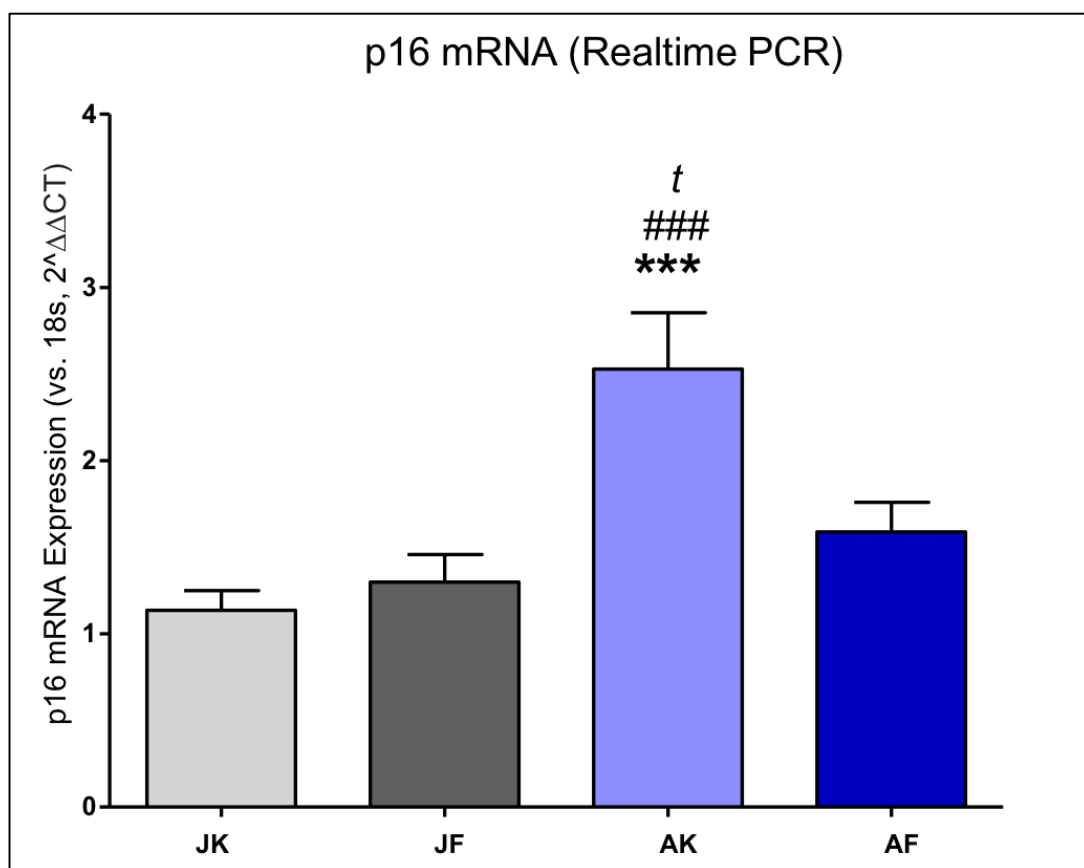


Abbildung 19: p16 mRNA Expression bei jungen Fußballspielern (JF), jungen Kontrollen (JK), alten Fußballspielern (AF), und alten Kontrollen (AK). Normierung auf 18s mRNA. *** $p < 0,001$, verglichen mit JK; t $p < 0,05$, verglichen mit AF; ### $p < 0,001$, verglichen mit JF.

5.2.2 Telomeraseaktivitätsmessung

Die Telomeraseaktivität wurde mittels TRAP-Assay bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein Enzymaktivitäts-Protokoll, gefolgt von einer Realtime PCR der gebildeten Telomerstücke im Reagenzglas. Die Messwerte der Proben werden auf HEK-Tumorzellen mit definierter Telomeraseaktivität bezogen.

Bei den jungen Fußballspielern ergab das TRAP-Assay eine Telomeraseaktivität von 130 HEK-Zell-Äquivalenten (95% KI: 79-181). Bei den jungen Kontrollpersonen zeigte sich eine Telomeraseaktivität von 31 HEK-Zell-Äquivalenten (95% KI: 23-29). Somit war die Telomeraseaktivität der jungen Fußballspieler im Vergleich zu den jungen Kontrollpersonen 4,2-fach erhöht ($p = 0,001$, ES = 0,85). Die alten Fußballspieler hatten eine Telomeraseaktivität von 78 HEK-Zell-Äquivalenten (95% KI: 45-110). Bei den alten Kontrollpersonen wurde eine Telomeraseaktivität von 86 HEK-Zell-Äquivalenten gemessen (95% KI: 51-122). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Telomeraseaktivität der alten Fußballspieler und der alten Kontrollpersonen ($p = 1,000$, ES = 0,10). Die alten Kontrollpersonen wiesen eine höhere Telomeraseaktivität auf als die jungen Kontrollpersonen ($p = 0,042$, ES = 0,74) (Abb. 20).

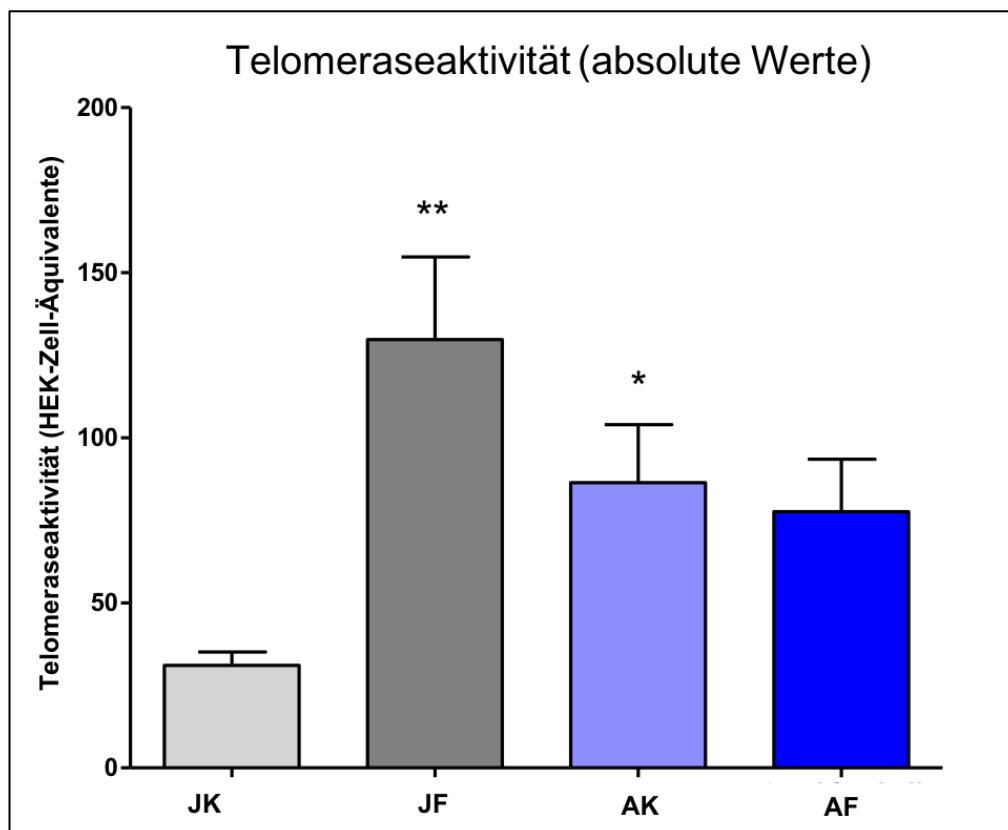


Abbildung 20: Telomeraseaktivität bei jungen Fußballspielern (JF), jungen Kontrollen (JK), alten Fußballspielern (AF) und alten Kontrollen (AK). Berechnung in HEK-Zell-Äquivalenten. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ verglichen mit JK.

5.2.3 Telomerlängenmessung

5.2.3.1 Realtime PCR Telomerlängenmessung

Die Leukozyten-Telomerlängen, die durch den Telomer/Referenzgen-Quotienten (T/S-Quotient) ermittelt wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Probandengruppen ($p = 0,263$, ES = 0,10-0,51). Der T/S-Quotient der alten Fußballspieler betrug 1,03 (95% KI: 0,82-1,24). Der Wert der alten Kontrollpersonen lag bei 1,12 (95% KI: 0,98-1,26). Die jungen Fußballspieler hatten einen T/S-Quotient von 1,40 (95% KI: 1,05-1,75). Die jungen Kontrollpersonen wiesen ein Ergebnis von 1,32 auf (95% KI: 1,03-1,61). Daher bestand die Notwendigkeit, ergänzend eine Messmethode anzuwenden, mit der einzelne Leukozytenpopulationen separat gemessen werden können.

5.2.3.2 FACS-Flow-FISH Telomerlängenmessung

Die FACS-Flow-FISH-Analyse mit Rinder-Thymozyten als interner Kontrollstandard in jeder Probe ist die Goldstandard-Methode zur Messung von Telomerlängen in Leukozyten-Subpopulationen in klinischen Studien (BAERLOCHER et al., 2006) (siehe Methodenteil).

Die Messung erbrachte einen signifikanten Unterschied der Telomerlängen zwischen allen alten und allen jungen Probanden, unabhängig davon, ob sie Sportler waren oder nicht. Alte Probanden hatten eine ~4-7% kürzere Telomerlänge in Granulozyten ($p < 0,01$, ES = 0,70-1,19). In den Lymphozyten der alten Probanden lag eine ~3-4% kürzere Telomerlänge ($p < 0,001$, ES = 0,67-1,15) verglichen mit den jungen Probanden vor. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Lymphozyten- bzw. Granulozyten-Telomerlängen zwischen jungen Fußballspielern und jungen Kontrollpersonen festgestellt werden. Bei den alten Probanden zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede der Telomerlängen zwischen den Gruppen. Die Telomerlänge der Granulozyten der alten Fußballspieler betrug 7344 Basenpaare (95% KI: 7203-7486 bp). Die Telomerlänge der Granulozyten der alten Kontrollpersonen betrug 7168 Basenpaare (95% KI: 7062-7273 bp). Somit war die Granulozyten-Telomerlänge der alten Fußballspieler im Vergleich zu den alten Kontrollpersonen 177 Basenpaare länger ($p = 0,047$, ES = 0,48) (Abb. 21). Dies entspricht einem Unterschied von 2,5%. Die Telomerlänge der Lymphozyten der alten Fußballspieler betrug 6332 Basenpaare (95% KI: 6251-6413 bp). Die Telomerlänge der Lymphozyten der alten Kontrollpersonen lag bei

6250 Basenpaaren (95% KI: 6192-6309 bp). Die Lymphozyten-Telomerlänge der alten Fußballspieler war im Vergleich zu den alten Kontrollpersonen 82 Basenpaare länger ($p = 0,009$, $ES = 0,39$) (Abb. 22). Dies entspricht einem Unterschied von 1,3%. Somit liegt die Interpretation nahe, dass die altersbedingte Telomerlängenverkürzung bei alten Fußballspielern im Vergleich zu alten Nichtsportlern signifikant reduziert ist.

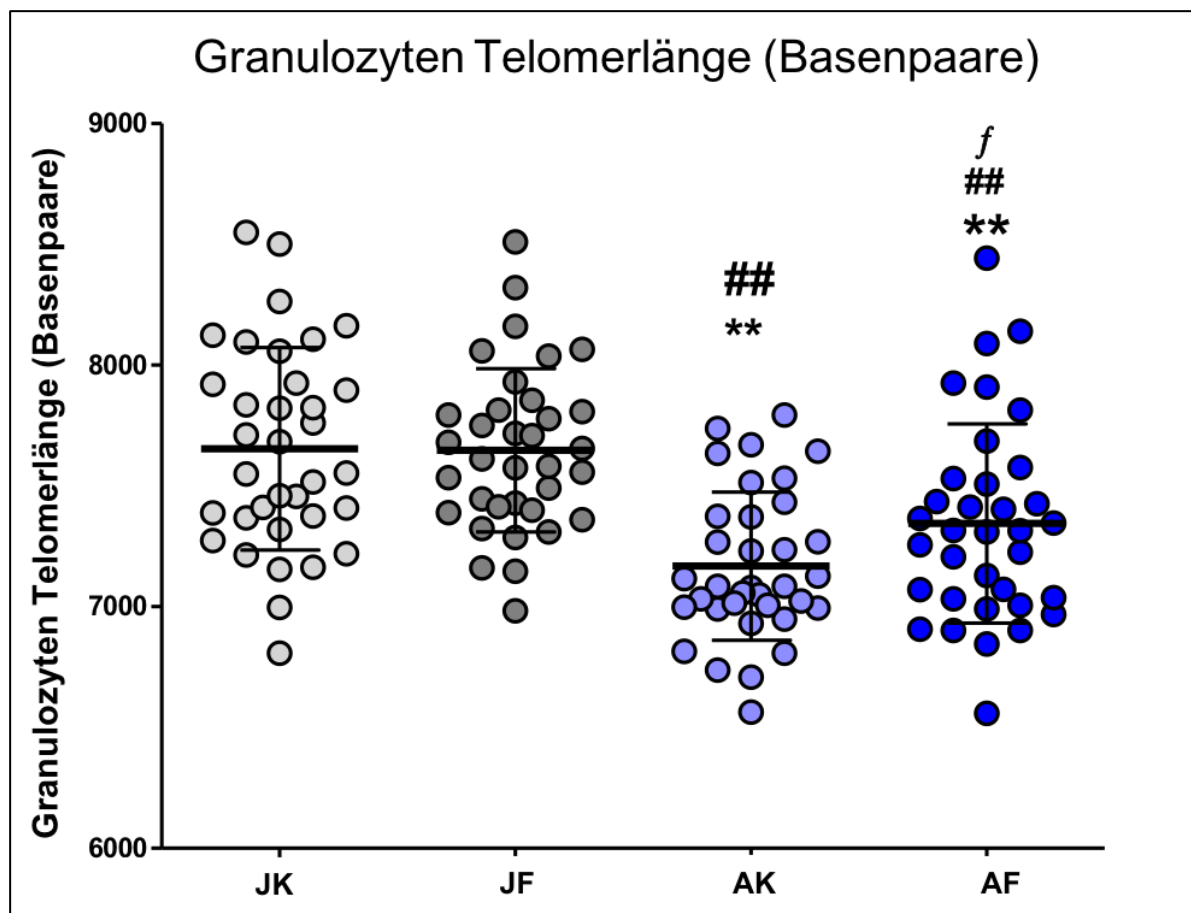


Abbildung 21: Granulozyten-Telomerlänge transformiert in Basenpaar-Werte, bei jungen Fußballspielern (JF), jungen Kontrollen (JK), alten Fußballspielern (AF) und alten Kontrollen (AK). ## $p < 0,01$, verglichen mit JF; ** $p < 0,01$, verglichen mit JK; f $p < 0,05$, verglichen mit AK.

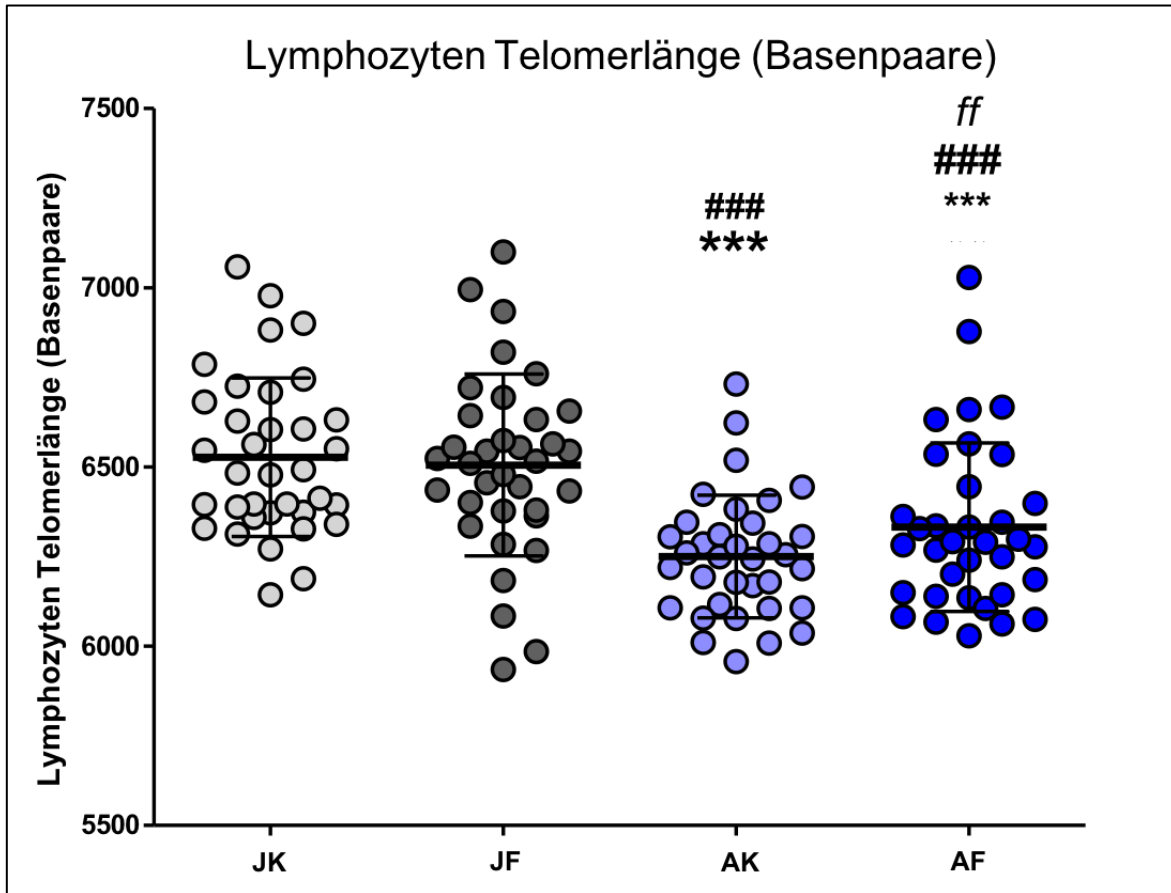


Abbildung 22: Lymphozyten-Telomerlänge transformiert in Basenpaar-Werte, bei jungen Fußballspielern (JF), jungen Kontrollen (JK), alten Fußballspielern (AF) und alten Kontrollen (AK). ### $p < 0,001$, verglichen mit JF; *** $p < 0,001$, verglichen mit JK; *ff* $p < 0,01$, verglichen mit AK.

6 Diskussion

Die vorliegende Querschnittsstudie hatte zum Ziel, erstmals Telomerlänge und Telomer-assoziierte Proteine in jungen und alten Fußballerspielern zu vergleichen. Hierzu wurden molekularbiologische Analysen in den mononukleären peripheren Blutzellen von 4 Gruppen à 35 Probanden durchgeführt. Der wichtigste klinisch-experimentelle Befund ist eine signifikante Reduktion der altersabhängigen Telomerlängenverkürzung in Leukozytensubpopulationen langjähriger Fußballathleten von ca. 72 Jahren mit einer mittleren Sportanamnese von ca. 61 Jahren. Dies war mit einer deutlichen Reduktion des Seneszenzmarkers p16 im Vergleich zu gleich alten, inaktiven Kontrollpersonen vergesellschaftet. Junge Profi-Fußballspieler von ca. 22 Jahren zeigten eine höhere Telomeraseaktivität und Expression der Telomer-stabilisierenden Faktoren POT1a und TRF2 sowie des DNA-Maintenanceproteins Ku70, was auf lange Sicht die relative Telomerverlängerung bei Sportlern im Vergleich zu inaktiven Personen erklären könnte.

Da sportliche Aktivität sowohl die Gesamtsterblichkeit als auch die kardiovaskuläre Mortalität reduziert, wird in den aktuellen Leitlinien eine regelmäßige sportliche Aktivität zur kardiovaskulären Prävention empfohlen (VISSEREN et al., 2021). Den positiven Effekten von Sport liegen vielfältige Mechanismen zu Grunde, die unter anderem dem Entstehen oder dem Progress kardiovaskulärer Erkrankungen entgegenwirken (HAMBRECHT et al., 2000; LAUFS et al., 2004; MALIK et al., 2020; STEWART, 2002; TANAKA et al., 2000). Ein neuer Mechanismus ist die positive Beeinflussung des Telomersystems und damit der zellulären Seneszenz (WERNER et al., 2009; WERNER et al., 2008). Die Leukozyten-Telomerlänge wird als von den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren möglicherweise unabhängiger Risiko-Prädiktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen angesehen (WILLEIT et al., 2010). Es existieren bereits einige Studien, die den Einfluss verschiedener sportlicher Aktivitäten auf die Telomere und Telomer-assoziierte Proteine untersuchen (LUDLOW et al., 2008; MUNDSTOCK et al., 2015; ORNISH et al., 2013; SVELA et al., 2013; WERNER et al., 2019). Es ist jedoch noch unklar, welchen Einfluss Art, Intensität, Häufigkeit, Dauer und Gesamtmenge der sportlichen Aktivität haben (MUNDSTOCK et al., 2015). Somit besteht ein Bedarf an Studien zur Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Sportmodalitäten auf die Telomere. Fußball ist eine Sportart mit einem intermittierenden Bewegungsmuster, bestehend aus anaeroben Phasen hoher Intensität abgewechselt mit Erholungsphasen geringerer Intensität (KRUSTRUP et al., 2010a). Es liegen bereits Arbeiten vor, die positive Auswirkungen von

Fußballtraining auf das kardiovaskuläre System, die maximale aerobe Leistungsfähigkeit, den Blutdruck, den Fettstoffwechsel, die Knochen und die Muskeln demonstriert haben (ANDERSEN et al., 2014a; ANDERSEN et al., 2014b; HAGMAN et al., 2018; KRUSTRUP et al., 2010a; KRUSTRUP et al., 2010b; LUO et al., 2018; MOHR et al., 2014; SCHMIDT et al., 2014; SKORADAL et al., 2018; SUNDSTRUP et al., 2016). Die vorliegende Studie ist die erste Querschnittsstudie, die die Effekte von lebenslangem Profi-Fußballtraining auf Leukozyten-Telomerlänge, Telomeraseaktivität und mRNA-Expression des pro-seneszenten Proteins p16 und der Telomer-assoziierten Proteine TRF2, Ku70 und POT1a untersucht.

Aufgrund der Möglichkeit der nicht-invasiven Gewinnung und der wahrscheinlich für das Herz-Kreislaufsystem insgesamt repräsentativen Eigenschaften wurde in dieser Studie, wie es üblich ist, die Telomerlängenmessung in Leukozyten durchgeführt (DANIALI et al., 2013; HERRMANN et al., 2018; LUDLOW et al., 2013). Die Telomerlängen-PCR ist relativ schnell und an vielen Proben gleichzeitig durchzuführen. Sie gilt aber als hypothesen-generierend, weil einzelne Zellpopulationen nicht gesondert betrachtet werden können. Effekte auf die Telomerlänge in einer Gruppe können sowohl unter- als auch überschätzt werden (GUTIERREZ-RODRIGUES et al., 2014). In der vorliegenden Studie zeigten sich in der Flow-FISH-Untersuchung signifikante Telomerlängenunterschiede, nicht jedoch in der Realtime PCR. Dieses Ergebnis bestätigt vorangehende Studien, die die Flow-FISH-Methode als genaueste, sensitivste, spezifischste und reproduzierbarste Methode zur Telomerlängenmessung in Leukozyten-Subpopulationen bewerten (BEHRENS et al., 2017; GUTIERREZ-RODRIGUES et al., 2014).

6.1 Experimentelle Ergebnisse der alten Studienteilnehmer

Alte Fußballspieler hatten sowohl in Granulozyten als auch in Lymphozyten längere Telomere als ihre altersgleichen inaktiven Kontrollpersonen. Die Expression des pro-seneszenten Proteins p16 war bei den alten Fußballern reduziert. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede bezüglich der Telomeraseaktivität und der Telomer-assoziierten Proteine bei den alten Sportlern im Vergleich zu den alten Nichtsportlern.

Da die Telomerase maßgeblich zur Telomerkonservierung beiträgt (AUNAN et al., 2016), ist es bemerkenswert, dass kein Unterschied der Telomeraseaktivität zwischen alten Fußballspielern und alten Kontrollpersonen gemessen wurde. Es wird vermutet, dass die Telomerase und das Protein p16 kooperativ die zelluläre Seneszenz regulieren. Eine erhöhte p16-Expression wirkt den anti-seneszenten Effekten der Telomerase entgegen (YANG et al., 2008). Somit könnte bereits alleine die erniedrigte p16-Expression der alten Fußballspieler im Vergleich zu den alten Kontrollpersonen, die eine 1,6-fach höhere p16-Expression aufwiesen, positive Auswirkungen auf die Telomerlänge haben. Laut Literaturangaben steigt die Expression von p16 mit zunehmendem Alter deutlich an, um die Stammzellproliferation aufgrund von steigendem oxidativem Stress und akkumulierten ROS zu reduzieren (LIU et al., 2009; YANG et al., 2008). Dennoch war die p16-Expression der alten Fußballspieler nicht höher als die der beiden jungen Probandengruppen. Somit ist es denkbar, dass lebenslanges regelmäßiges Fußballtraining den altersassoziierten p16-Anstieg reduziert und auf diese Weise der Telomerverkürzung entgegenwirkt. Die anti-seneszenten Proteine TRF2, Ku70 und POT1a unterschieden sich zwar nicht zwischen den alten Probandengruppen, die Effektgrößen waren aber dennoch klein bis moderat. Deswegen kann vermutet werden, dass diese Faktoren zu den Unterschieden der Telomerlänge beigetragen haben könnten.

Aufgrund von negativen Feedback-Mechanismen weiß man aus anderen Modellen, dass die Telomerase bevorzugt zu kurzen Telomeren rekrutiert wird (SMOGORZEWSKA, DE LANGE, 2004). Da die Telomerlängen-Verkürzung der alten Fußballspieler aufgrund der genannten Faktoren reduziert und somit die Telomerlänge besser erhalten war, wäre ein solcher negativer Feedback-Mechanismus auf die Telomeraseaktivität in dieser Studienkohorte denkbar. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass die Telomerase akut nach Ausdauertraining heraufreguliert wird (WERNER et al.; 2019). Da hier ein anderes Studiendesign vorlag, ist jeweils eine „steady state“ Messung erfolgt, um Akuteffekte möglichst auszuschließen.

Einer der möglichen Mechanismen für die Telomeraseaktivierung, neben dem Scherstress, ist IGF1 (insuline like growth factor 1) (TORELLA et al., 2004). Die IGF1-Konzentration nimmt mit zunehmendem Alter ab. Durch Sport kann es zu einer IGF1-Erhöhung kommen

(POEHLMAN, COPELAND, 1990). Freiwilliges Laufradtraining bei Mäusen führte zu einer Hochregulation der myokardialen IGF1-Expression (WERNER et al., 2008). Allerdings zeigte eine prospektive, randomisierte klinische Studie mit einer sechsmonatigen Trainingsintervention keine Regulation von IGF-1 bei einer chronischen, regelmäßigen, der Präventionsempfehlung entsprechenden, körperlichen Aktivität, obwohl deutliche Telomereffekte zu beobachten waren (WERNER et al., 2019).

Der in dieser Studie beobachtete zelluläre „Anti-Aging-Effekt“ von Fußball bestätigt die Ergebnisse früherer Studien zu Ausdauertraining, die gezeigt haben, dass moderates oder intensives Ausdauertraining anti-seneszente Effekte in zirkulierenden Blutzellen bewirkt (LAROCCA et al., 2010; ORNISH et al., 2013; TUCKER, 2017; WERNER et al., 2009; WERNER et al., 2008; WERNER et al., 2019). Der Telomerlängenunterschied von 177 Basenpaaren in Granulozyten und 82 Basenpaaren in Lymphozyten zwischen alten Fußballspielern und alten Kontrollpersonen ist weniger stark ausgeprägt als der in der Studie von LaRocca und Kollegen. Diese Studie zeigte eine ca. 900 Basenpaare größere Leukozytentelomerlänge älterer Ausdauerathleten verglichen mit gleichalten Nichtsportlern (LAROCCA et al., 2010). Der weniger stark ausgeprägte Effekt bei den alten Fußballspielern könnte in der geringeren Menge wöchentlichen Trainings (3,5 Trainings/Woche) im Vergleich zu den alten Ausdauerathleten (≥ 5 Trainingseinheiten/Woche, >45 min/Tag) und der Messmethode begründet liegen. Zudem waren die alten Fußballspieler deutlich älter (≈ 72 Jahre) als die Ausdauerathleten (55-72 Jahre) und die Leukozytentelomerlänge wurde mittels einer modifizierten Southern Blot Analyse und nicht anhand der in dieser Studie verwendeten Flow-FISH-Methode bestimmt. Die Studien lassen sich somit nicht direkt miteinander vergleichen, treffen aber qualitativ vergleichbare Aussagen.

Ob eine signifikante Assoziation körperlicher Aktivität und der Telomerlänge besteht, wurde über viele Jahre hinweg diskutiert. Während ein systematischer Review von 2015 keine deutliche Assoziation zeigte (MUNDSTOCK et al., 2015), zeigte sich in einer Querschnittsstudie von 2017 mit fast 6000 20 bis 84 Jahre alten Männern und Frauen ein Unterschied von um 140 Basenpaare längeren Telomeren bei Personen mit einer hohen körperlichen Aktivität im Vergleich zu nicht aktiven Kontrollpersonen, was einem biologischen Altersvorteil von 9 Jahren entspricht (TUCKER, 2017). In Bezug auf diese Angaben hätten die älteren Fußballspieler dieser Studie einen biologischen Altersvorteil von ungefähr 11 Jahren, bezogen auf die Telomerlänge in Granulozyten, und 5 Jahren, bezogen auf die Telomerlänge in

Lymphozyten, verglichen mit den älteren Kontrollpersonen. Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien könnten unter anderem durch die unterschiedlichen Sportmodalitäten bedingt sein. In einer kürzlich veröffentlichten randomisierten und kontrollierten Studie mit vorangehend inaktiven Probanden führten sechs Monate Ausdauer- oder Intervalltraining, nicht aber Krafttraining, zu einer erhöhten Telomeraseaktivität und Telomerlänge (WERNER et al., 2019). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass es in der Regel bei Ausdauertraining zu einer höheren Herzfrequenz kommt als bei Krafttraining. Dies führt zu einem höheren Scherstress in den Gefäßen, wodurch es zu stärkeren Effekten auf zellulärer Ebene kommen könnte (GRASSELLI et al., 2008; SCHIRMER et al., 2015; WERNER et al., 2009; WERNER et al., 2008).

6.2 Experimentelle Ergebnisse der jungen Studienteilnehmer

Da im Vergleich zu den jungen Kontrollpersonen bei den jungen Fußballspielern sowohl die Telomeraseaktivität als auch alle Telomer-assoziierten Proteine erhöht waren und die Expression des pro-seneszenten Proteins p16 erniedrigt war, war es überraschend, dass kein Telomerlängenunterschied zwischen den jungen Probandengruppen festgestellt werden konnte. Allerdings wurden telomer-konservierende Effekte von Langzeit-Ausdauertraining bisher nur bei Probanden mittleren oder höheren Alters beobachtet (BORGHINI et al., 2015; LAROCCA et al., 2010; OSTHUS et al., 2012; WERNER et al., 2009). Werner und Kollegen fanden heraus, dass der altersabhängige Telomerverlust in Lymphozyten und Granulozyten mittelalter Athleten (\bar{x} 51 Jahre), die mehrere Jahrzehnte lang Ausdauersport betrieben, abgeschwächt war. Im Gegensatz dazu lagen bei jungen professionellen Mittel- und Langstreckenläufern (\bar{x} 20 Jahre) keine Telomerlängenunterschiede im Vergleich zu gleichalten Nichtsportlern vor (WERNER et al., 2009). Das gleiche altersabhängige Ergebnis konnte bei Ultramarathon-Läufern festgestellt werden: Nur Athleten über 53 Jahre hatten längere Telomere (BORGHINI et al., 2015). Beim Vergleich gut trainierter Ausdauerathleten mit Nicht-Athleten, die auf mittlerem Niveau trainierten, zeigte sich nur bei den alten (66-77 Jahre), nicht jedoch bei den jungen (22-27 Jahre) Athleten eine reduzierte Telomerverkürzung (OSTHUS et al., 2012). Beide Studien begründeten diese Ergebnisse mit der geringeren Anzahl an Jahren, in der die jungen Menschen sportlich aktiv waren. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass die Trainings-Menge von sieben Einheiten pro Woche möglicherweise zu hoch ist. Es wurde eine inverse U-Korrelation zwischen Telomerlänge, Trainingsvolumen und -intensität festgestellt:

Bei einer sehr hohen Sportintensität konnten kürzere, mit denen unsportlicher Kontrollpersonen vergleichbare, Telomerlängen festgestellt werden, als bei Sportlern, die weniger intensiv und häufig trainierten (LUDLOW et al., 2008; SAVELA et al., 2013). Akuteffekte im Sinne einer durch akuten oxidativen Stress ausgelösten Telomerlängenverkürzung können als unwahrscheinlich angesehen werden, da die Studienteilnehmer für mindestens 48 Stunden vor Blutentnahme keinen Sport ausüben durften.

Somit ist es am wahrscheinlichsten, dass trotz der hohen Menge wöchentlichen Trainings das junge Alter (Ø 22 Jahre) der jungen Fußballspieler der Grund für den fehlenden Unterschied bei der Telomerlänge zwischen den jungen Probanden ist.

Die Tatsache, dass es bei den jungen Fußballspielern zu einer deutlichen Erhöhung der telomerstabilisierenden Faktoren und der Telomerase sowie einer Erniedrigung der p16-Expression kommt, bietet Raum für die Hypothese, dass die Telomere der jungen Sportler auf lange Sicht besser erhalten bleiben.

6.3 Klinische Ergebnisse der alten Studienteilnehmer

Lebenslanges Fußballtraining ist mit einer vorteilhaften Körperzusammensetzung, einem verbesserten Fett- und Glukoseprofil und einer verringerten Ruheherzfrequenz assoziiert (ANDERSEN et al., 2014a; ANDERSEN et al., 2014b; KRUSTRUP et al., 2010a; LUO et al., 2018; MOHR et al., 2014; SCHMIDT et al., 2014; SKORADAL et al., 2018). Die alten Fußballspieler wiesen ein geringeres Körpergewicht, einen niedrigeren BMI und niedrigere Ganzkörper-, Android- und Gynoid-Fettanteile als die alten Kontrollpersonen auf. Die Körpermagermasse war bei beiden Gruppen gleich. Diese Ergebnisse stimmen mit aktuellen Querschnittsstudien überein, die alte Fußballspieler (Ø 68 Jahre) mit gleichaltrigen untrainierten Kontrollen verglichen (MANCINI et al., 2017; SCHMIDT et al., 2015). Die ähnliche Körpermagermasse der trainierten und untrainierten Männer kann am ehesten durch das insgesamt höhere Körpergewicht der untrainierten Personen erklärt werden: Die höhere Magermasse der Sportler wird ausgeglichen durch die aufgrund des insgesamt gesteigerten Gewichts gleichermaßen gesteigerte Magermasse der Nichtsportler.

Übereinstimmend mit unseren Erkenntnissen konnten weder Schmidt et al. noch Mancini et al. statistisch bedeutsame Effekte lebenslangen Fußballtrainings auf Blutdruck, Cholesterin und Nüchternblutglukose beobachten, während es bei Schmidt et al. zu einer um 6/min. (SCHMIDT et al., 2015) niedrigeren Ruheherzfrequenz kam. In dieser Studie war die Ruheherzfrequenz der alten Fußballspieler (60/min.) im Vergleich zu den alten Kontrollpersonen (63/min.) nicht verringert. Hierbei ist es wichtig zu beachten, dass 26 % der älteren Probanden dieser Studie Antihypertensiva einnahmen, was in der Studie von Schmidt et al. nicht der Fall war.

Bei den alten Fußballern wurde ein günstigeres Glukoseprofil mit geringeren HbA_{1c}-Werten und Insulinkonzentrationen gemessen, verglichen mit den alten unспортlichen Kontrollen. Dies bestätigt das Ergebnis einer Studie, in der bei mittelalten Männern mit Typ 2 Diabetes bereits eine 6-monatige Fußballtrainingsintervention zu einer signifikanten HbA_{1c}-Reduktion führte (ANDERSEN et al., 2014c). Die Autoren begründeten diesen Effekt mit einer gesteigerten mikrovaskulären Muskelperfusion oder einer gesteigerten muskulären GLUT-4-Expression. GLUT-4 stellt einen Haupt-Glukosetransporter des Skelettmuskels dar, der für die insulinstimulierte Glukoseaufnahme verantwortlich ist (DAUGAARD, RICHTER, 2001). Muskuloskelettale Anpassungen der alten Fußballspieler sind wahrscheinlich, können aber in dieser Studie nicht belegt werden. Bekanntermaßen reduzieren niedrigere Durchschnittsglukose- und Insulinspiegel der alten Fußballspieler das Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 (HUANG et al., 2019).

6.4 Klinische Ergebnisse der jungen Studienteilnehmer

Bei den jungen Fußballspielern waren im Vergleich zu den jungen untrainierten Kontrollpersonen alle drei Messwerte der Körperfettanteile (gesamt, android, gynoid) erniedrigt. Reduziertes Körperfett vermindert das Risiko der Entwicklung eines metabolischen Syndroms oder einer kardiometabolischen Dysfunktion und geht mit einer reduzierten Mortalität einher (OLIVEROS et al., 2014). Es wurde mehrfach beobachtet, dass bereits kurze Fußballinterventionen Körperfettmasse und -anteil untrainierter Erwachsener verringern, während die Körpermagermasse hingegen nicht immer gesteigert wird (BANGSBO et al., 2015; MILANOVIC et al., 2019; SARMENTO et al., 2020). In unserer Studie konnte bei den jungen Fußballspielern eine höhere Körpermagermasse als bei den jungen Kontrollpersonen festgestellt werden. In einer Längsschnittstudie mit ca. 200.000 jungen und mittelalten Probanden (\bar{x} 39 Jahre), wurde beobachtet, dass besonders bei jungen Personen (< 50 Jahre) die relative Muskelmasse nach einem Dosis-Antwort-Prinzip negativ mit dem Auftreten von Typ 2 Diabetes assoziiert ist (HONG et al., 2017). Somit ist es möglich, dass die gesteigerte Körpermagermasse der jungen Fußballspieler das Risiko für das Auftreten eines Diabetes mellitus Typ 2 reduziert.

Die jungen Fußballspieler hatten ein günstigeres Lipidprofil mit geringeren LDL-Cholesterin-, Gesamtcholesterin-, und Triglyzeridkonzentrationen sowie eine um 9/min. verringerte Ruheherzfrequenz verglichen mit den jungen Kontrollpersonen. Die Reduktion des Gesamt- und LDL-Cholesterins durch Fußballinterventionen konnte bereits häufig beobachtet werden, ist jedoch nicht immer statistisch signifikant (BANGSBO et al., 2015). In einer Metaanalyse wurde der Effekt von Freizeit-Fußballtraining auf das LDL-Cholesterin als „möglicherweise vorteilhaft“ und auf die Ruheherzfrequenz als „sehr wahrscheinlich vorteilhaft“ eingestuft (MILANOVIC et al., 2019). Eine gesteigerte Ruheherzfrequenz geht mit einem gesteigerten myokardialen Sauerstoffverbrauch einher und reduziert gleichzeitig den koronaren Blutfluss. Es wird davon ausgegangen, dass die Ruheherzfrequenz nicht nur einen Prädiktor für die kardiale Mortalität, sondern auch für die Mortalität jedweder Ursache darstellt (COOK et al., 2008). Somit kann die niedrigere Ruheherzfrequenz der jungen Fußballspieler als protektiver Faktor angesehen werden.

Zusammengefasst verdeutlichen die festgestellten klinischen Gruppenunterschiede die vorteilhaften Effekte lebenslangen Fußballtrainings, das allgemeine Gesundheitsprofil zu verbessern, mit dem Ziel, das Risiko zukünftiger kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen zu reduzieren.

6.5 Limitationen dieser Studie

Eine generelle Limitation von Querschnittsstudien wie dieser stellt der fehlende Nachweis der Kausalität dar. Neben dem Alter und der über das Leben geleisteten körperlichen Aktivität gibt es einige weitere Faktoren, wie Geschlecht, Raucherstatus, Adipositas (HUZEN et al., 2014), ernährungsbedingte Antioxidantien und Vitamine (PAUL, 2011), Interleukin-6-Level, sozioökonomischer Status (SHIELS et al., 2011) und psychisches Stresslevel (EPEL et al., 2004), die mit der Leukozyten-Telomerlänge assoziiert sind. Ob diese sich kausal auf harte Endpunkte wie Lebensspanne oder Mortalität auswirken, ist in vielen Fällen nicht klar.

Die klinischen Ergebnisse zeigen, dass beide Sportlergruppen niedrigere Werte für Körpergewicht, BMI und Körperfettanteile sowie teilweise günstigere metabolische Laborwerte als ihre jeweils altersgleichen Kontrollgruppen aufweisen. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Gruppenunterschiede der experimentellen Ergebnisse ebenso von dem metabolischen Profil beeinflusst wurden, wie von der körperlichen Aktivität selbst. Da das metabolische Profil mit der körperlichen Aktivität in Verbindung steht (STEWART, 2002; WHO, 2009), ist es schwer, diese beiden Parameter unabhängig voneinander zu betrachten.

Alle Teilnehmer waren Nichtraucher und es war ihnen nicht gestattet, mehr als 2 alkoholische Getränke pro Tag zu sich zu nehmen. Die Ernährung der Teilnehmer wurde in dieser Studie jedoch nicht kontrolliert und dokumentiert. Es ist denkbar, dass die professionellen Athleten eine gesündere Ernährung sowie einen insgesamt gesünderen Lebensstil hatten. Unterschiede bezüglich des sozioökonomischen Status und des individuellen Stresslevels wurden nicht berücksichtigt, könnten aber als mit sportlicher Inaktivität assoziierte Faktoren für diese Studie relevant sein (ALGREN et al., 2018).

Darüber hinaus war die Menge des wöchentlichen sowie des lebenslangen Trainings selbstberichtet und die Intensität des aktuellen Trainings wurde nicht gemessen. Die mittlere Herzfrequenz während des Trainings wurde in dieser Studie nicht erfasst. Man hat allerdings beobachtet, dass Fußballtraining mit einer hohen mittleren und maximalen Herzfrequenz einher geht (KRUSTRUP et al., 2010a; KRUSTRUP et al., 2010b). Zudem kann man bei den jungen Profifußballspielern (≥ 2 . Dänische Liga) ein hohes Intensitätslevel als vorausgesetzt betrachten. Trotz des hohen Alters konnten hohe mittlere Herzfrequenzen von ca. 84% der maximal möglichen Herzfrequenz HR_{max} , sowie lange Zeitspannen (18% der Trainingszeit) mit $> 90\%$ der HR_{max} bei alten Sportlern während des Fußballtrainings beobachtet werden (ANDERSEN et al., 2014b). Somit kann auch bei den alten Fußballspielern eine hohe Trainingsintensität zu erwarten gewesen sein. Dennoch wäre es interessant gewesen, den objektiven Parameter VO_{2max} (maximale Sauerstoffaufnahme) der Probanden zu bestimmen,

da die Telomerlänge mit dem individuellen Fitness-Level assoziiert ist (LAROCCA et al., 2010).

Unsere Studie beinhaltete ausschließlich dänische Männer, weshalb keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Effekte bei Frauen oder Männern aus anderen Ländern ebenso auftreten würden.

Aus diesen Gründen besteht die Empfehlung zu weiteren randomisierten, kontrollierten prospektiven Studien mit einem erweiterten Testspektrum, um die durch Fußball bedingten präventiv wirksamen regulatorischen Prozesse besser zu differenzieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Adams V, Linke A, Krankel N, Erbs S, Gielen S, Mobius-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. 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* 93:13742-13747
3. Algren MH, Ekholm O, Nielsen L, Ersboll AK, Bak CK, Andersen PT (2018) Associations between perceived stress, socioeconomic status, and health-risk behaviour in deprived neighbourhoods in Denmark: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 18:250
4. Andersen LJ, Randers MB, Hansen PR, Hornstrup T, Schmidt JF, Dvorak J, Sogaard P, Krstrup P, Bangsbo J (2014a) Structural and functional cardiac adaptations to 6 months of football training in untrained hypertensive men. *Scand J Med Sci Sports* 24 Suppl 1:27-35
5. Andersen TR, Schmidt JF, Nielsen JJ, Randers MB, Sundstrup E, Jakobsen MD, Andersen LL, Suetta C, Aagaard P, Bangsbo J, Krstrup P (2014b) Effect of football or strength training on functional ability and physical performance in untrained old men. *Scand J Med Sci Sports* 24 Suppl 1:76-85
6. Andersen TR, Schmidt JF, Thomassen M, Hornstrup T, Frandsen U, Randers MB, Hansen PR, Krstrup P, Bangsbo J (2014c) A preliminary study: effects of football training on glucose control, body composition, and performance in men with type 2 diabetes. *Scand J Med Sci Sports* 24 Suppl 1:43-56
7. Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Soreide K (2016) Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br J Surg* 103:e29-46
8. 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* 1:2365-2376
9. Bailey SM, Meyne J, Chen DJ, Kurimasa A, Li GC, Lehnert BE, Goodwin EH (1999) DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14899-14904
10. Bangsbo J, Hansen PR, Dvorak J, Krstrup P (2015) Recreational football for disease prevention and treatment in untrained men: a narrative review examining cardiovascular health, lipid profile, body composition, muscle strength and functional capacity. *Br J Sports Med* 49:568-576
11. Baumann P, Cech TR (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292:1171-1175
12. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22:4212-4222
13. Behrens YL, Thomay K, Hagedorn M, Ebersold J, Henrich L, Nustede R, Schlegelberger B, Gohring G (2017) Comparison of different methods for telomere length measurement in whole blood and blood cell subsets: Recommendations for telomere length measurement in hematological diseases. *Genes Chromosomes Cancer* 56:700-708
14. Ben-Porath I, Weinberg RA (2004) When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* 113:8-13
15. Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E (1997) Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* 17:236-239

16. Blackburn EH, Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120:33-53
17. Blackburn EH (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106:661-673
18. Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6:611-622
19. Borghini A, Giardini G, Tonacci A, Mastorci F, Mercuri A, Mrakic-Sposta S, Moretti S, Andreassi MG, Pratali L (2015) Chronic and acute effects of endurance training on telomere length. *Mutagenesis* 30:711-716
20. Calado RT, Young NS (2009) Telomere diseases. *N Engl J Med* 361:2353-2365
21. Campisi J (2003) Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 3:339-349
22. Cawthon RM (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e47
23. Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL, Hottenga JJ, Fischer K, Esko T, Surakka I, Broer L, Nyholt DR, Mateo Leach I, Salo P, Hagg S, Matthews MK, Palmen J, Norata GD, O'Reilly PF, Saleheen D, Amin N, Balmforth AJ, Beekman M, de Boer RA, Bohringer S, Braund PS, Burton PR, de Craen AJ, Denniff M, Dong Y, Douroudis K, Dubinina E, Eriksson JG, Garlaschelli K, Guo D, Hartikainen AL, Henders AK, Houwing-Duistermaat JJ, Kananen L, Karssen LC, Kettunen J, Klopp N, Lagou V, van Leeuwen EM, Madden PA, Magi R, Magnusson PK, Mannisto S, McCarthy MI, Medland SE, Mihailov E, Montgomery GW, Oostra BA, Palotie A, Peters A, Pollard H, Pouta A, Prokopenko I, Ripatti S, Salomaa V, Suchiman HE, Valdes AM, Verweij N, Vinuela A, Wang X, Wichmann HE, Widen E, Willemsen G, Wright MJ, Xia K, Xiao X, van Veldhuisen DJ, Catapano AL, Tobin MD, Hall AS, Blakemore AI, van Gilst WH, Zhu H, consortium CA, Erdmann J, Reilly MP, Kathiresan S, Schunkert H, Talmud PJ, Pedersen NL, Perola M, Ouwehand W, Kaprio J, Martin NG, van Duijn CM, Hovatta I, Gieger C, Metspalu A, Boomsma DI, Jarvelin MR, Slagboom PE, Thompson JR, Spector TD, van der Harst P, Samani NJ (2013) Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet* 45:422-427, 427e421-422
24. Cook S, Delacretaz E, Hess OM (2008) [Is resting heart rate a cardiovascular risk factor?]. *Praxis (Bern 1994)* 97:601-611
25. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, Desai K, Granick M, Aviv A (2013) Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun* 4:1597
26. Dugaard JR, Richter EA (2001) Relationship between muscle fibre composition, glucose transporter protein 4 and exercise training: possible consequences in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Physiol Scand* 171:267-276
27. de Lange T (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21:532-540
28. de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19:2100-2110
29. de Lange T (2009) How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 326:948-952
30. de Punder K, Heim C, Przesdzing I, Wadhwa PD, Entringer S (2018) Characterization in humans of in vitro leucocyte maximal telomerase activity capacity and association with stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 373
31. 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 U S A* 101:17312-17315
32. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J (2008) Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 44:126-131

33. Grasselli A, Nanni S, Colussi C, Aiello A, Benvenuti V, Ragone G, Moretti F, Sacchi A, Bacchetti S, Gaetano C, Capogrossi MC, Pontecorvi A, Farsetti A (2008) Estrogen receptor-alpha and endothelial nitric oxide synthase nuclear complex regulates transcription of human telomerase. *Circ Res* 103:34-42
34. Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-413
35. 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
36. Gutierrez-Rodrigues F, Santana-Lemos BA, Scheucher PS, Alves-Paiva RM, Calado RT (2014) Direct comparison of flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. *PLoS One* 9:e113747
37. Hagman M, Helge EW, Hornstrup T, Frstrup B, Nielsen JJ, Jorgensen NR, Andersen JL, Helge JW, Krustup P (2018) Bone mineral density in lifelong trained male football players compared with young and elderly untrained men. *J Sport Health Sci* 7:159-168
38. Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G (2000) Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 342:454-460
39. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458-460
40. Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, Butterworth AS, Thompson A, Willeit P (2014) Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 349:g4227
41. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621
42. Herrmann M, Pusceddu I, Marz W, Herrmann W (2018) Telomere biology and age-related diseases. *Clin Chem Lab Med* 56:1210-1222
43. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11:1026-1030
44. Hong S, Chang Y, Jung HS, Yun KE, Shin H, Ryu S (2017) Relative muscle mass and the risk of incident type 2 diabetes: A cohort study. *PLoS One* 12:e0188650
45. Hopkins WG, Marshall SW, Batterham AM, Hanin J (2009) Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. *Med Sci Sports Exerc* 41:3-13
46. 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* 14:2807-2812
47. Huang T, Glass K, Zeleznik OA, Kang JH, Ivey KL, Sonawane AR, Birman BM, Hersh CP, Hu FB, Tworoger SS (2019) A Network Analysis of Biomarkers for Type 2 Diabetes. *Diabetes* 68:281-290
48. Huzen J, Wong LS, van Veldhuisen DJ, Samani NJ, Zwinderman AH, Codd V, Cawthon RM, Benus GF, van der Horst IC, Navis G, Bakker SJ, Gansevoort RT, de Jong PE, Hillege HL, van Gilst WH, de Boer RA, van der Harst P (2014) Telomere length loss due to smoking and metabolic traits. *J Intern Med* 275:155-163
49. Jacobs JJ, de Lange T (2004) Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* 14:2302-2308
50. Kasapis C, Thompson PD (2005) The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol* 45:1563-1569
51. Kim NW, Wu F (1997) Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res* 25:2595-2597

52. Krstrup P, Aagaard P, Nybo L, Petersen J, Mohr M, Bangsbo J (2010a) Recreational football as a health promoting activity: a topical review. *Scand J Med Sci Sports* 20 Suppl 1:1-13
53. Krstrup P, Christensen JF, Randers MB, Pedersen H, Sundstrup E, Jakobsen MD, Krstrup BR, Nielsen JJ, Suetta C, Nybo L, Bangsbo J (2010b) Muscle adaptations and performance enhancements of soccer training for untrained men. *Eur J Appl Physiol* 108:1247-1258
54. LaRocca TJ, Seals DR, Pierce GL (2010) Leukocyte telomere length is preserved with aging in endurance exercise-trained adults and related to maximal aerobic capacity. *Mech Ageing Dev* 131:165-167
55. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Mische E, Bohm M, Nickenig G (2004) Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109:220-226
56. Levis RW (1989) Viable deletions of a telomere from a Drosophila chromosome. *Cell* 58:791-801
57. 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
58. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194-1217
59. Ludlow AT, Zimmerman JB, Witkowski S, Hearn JW, Hatfield BD, Roth SM (2008) Relationship between physical activity level, telomere length, and telomerase activity. *Med Sci Sports Exerc* 40:1764-1771
60. Ludlow AT, Ludlow LW, Roth SM (2013) Do telomeres adapt to physiological stress? Exploring the effect of exercise on telomere length and telomere-related proteins. *Biomed Res Int* 2013:601368
61. Luo H, Newton RU, Ma'ayah F, Galvao DA, Taaffe DR (2018) Recreational soccer as sport medicine for middle-aged and older adults: a systematic review. *BMJ Open Sport Exerc Med* 4:e000336
62. Malik A, Kanduri JS, Asbeutah AAA, Khraishah H, Shen C, Welty FK (2020) Exercise Capacity, Coronary Artery Fatty Plaque, Coronary Calcium Score, and Cardiovascular Events in Subjects With Stable Coronary Artery Disease. *J Am Heart Assoc* 9:e014919
63. Mancini A, Vitucci D, Labruna G, Imperlini E, Randers MB, Schmidt JF, Hagman M, Andersen TR, Russo R, Orru S, Krstrup P, Salvatore F, Buono P (2017) Effect of lifelong football training on the expression of muscle molecular markers involved in healthy longevity. *Eur J Appl Physiol* 117:721-730
64. McClintock B (1941) The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* 26:234-282
65. Milanovic Z, Pantelic S, Covic N, Sporis G, Mohr M, Krstrup P (2019) Broad-spectrum physical fitness benefits of recreational football: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 53:926-939
66. Mobius-Winkler S, Uhlemann M, Adams V, Sandri M, Erbs S, Lenk K, Mangner N, Mueller U, Adam J, Grunze M, Brunner S, Hilberg T, Mende M, Linke AP, Schuler G (2016) Coronary Collateral Growth Induced by Physical Exercise: Results of the Impact of Intensive Exercise Training on Coronary Collateral Circulation in Patients With Stable Coronary Artery Disease (EXCITE) Trial. *Circulation* 133:1438-1448; discussion 1448
67. Mohr M, Lindenskov A, Holm PM, Nielsen HP, Mortensen J, Weihe P, Krstrup P (2014) Football training improves cardiovascular health profile in sedentary, premenopausal hypertensive women. *Scand J Med Sci Sports* 24 Suppl 1:36-42

68. Mons U, Muezzinler A, Schottker B, Dieffenbach AK, Butterbach K, Schick M, Peasey A, De Vivo I, Trichopoulou A, Boffetta P, Brenner H (2017) Leukocyte Telomere Length and All-Cause, Cardiovascular Disease, and Cancer Mortality: Results From Individual-Participant-Data Meta-Analysis of 2 Large Prospective Cohort Studies. *Am J Epidemiol* 185:1317-1326
69. Muller HJ (1938) The remaking of chromosomes. *The Collecting Net Woods Hole*, 13
70. Mundstock E, Zatti H, Louzada FM, Oliveira SG, Guma FT, Paris MM, Rueda AB, Machado DG, Stein RT, Jones MH, Sarria EE, Barbe-Tuana FM, Mattiello R (2015) Effects of physical activity in telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev* 22:72-80
71. Oliveros E, Somers VK, Sochor O, Goel K, Lopez-Jimenez F (2014) The concept of normal weight obesity. *Prog Cardiovasc Dis* 56:426-433
72. Olovnikov AM (1996) Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol* 31:443-448
73. 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
74. Osthus IB, Sgura A, Berardinelli F, Alsnes IV, Bronstad E, Rehn T, Stobakk PK, Hatle H, Wisloff U, Nauman J (2012) Telomere length and long-term endurance exercise: does exercise training affect biological age? A pilot study. *PLoS One* 7:e52769
75. Paul L (2011) Diet, nutrition and telomere length. *J Nutr Biochem* 22:895-901
76. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corra U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FDR, Lochen ML, Lollgen 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, Group ESCSD (2016) 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* 37:2315-2381
77. Poehlman ET, Copeland KC (1990) Influence of physical activity on insulin-like growth factor-I in healthy younger and older men. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1468-1473
78. Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM (1998) Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 16:743-747
79. Sarmiento H, Manuel Clemente F, Marques A, Milanovic Z, David Harper L, Figueiredo A (2020) Recreational football is medicine against non-communicable diseases: A systematic review. *Scand J Med Sci Sports* 30:618-637
80. Savela S, Saijonmaa O, Strandberg TE, Koistinen P, Strandberg AY, Tilvis RS, Pitkala KH, Miettinen TA, Fyhrquist F (2013) Physical activity in midlife and telomere length measured in old age. *Exp Gerontol* 48:81-84
81. Schirmer SH, Millenaar DN, Werner C, Schuh L, Degen A, Bettink SI, Lipp P, van Rooijen N, Meyer T, Bohm M, Laufs U (2015) Exercise promotes collateral artery growth mediated by monocytic nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:1862-1871

82. Schmidt JF, Hansen PR, Andersen TR, Andersen LJ, Hornstrup T, Krstrup P, Bangsbo J (2014) Cardiovascular adaptations to 4 and 12 months of football or strength training in 65- to 75-year-old untrained men. *Scand J Med Sci Sports* 24 Suppl 1:86-97
83. Schmidt JF, Andersen TR, Andersen LJ, Randers MB, Hornstrup T, Hansen PR, Bangsbo J, Krstrup P (2015) Cardiovascular function is better in veteran football players than age-matched untrained elderly healthy men. *Scand J Med Sci Sports* 25:61-69
84. Schuler G, Adams V, Goto Y (2013) Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease: results, mechanisms, and new perspectives. *Eur Heart J* 34:1790-1799
85. Shiels PG, McGlynn LM, MacIntyre A, Johnson PC, Batty GD, Burns H, Cavanagh J, Deans KA, Ford I, McConnachie A, McGinty A, McLean JS, Millar K, Sattar N, Tannahill C, Velupillai YN, Packard CJ (2011) Accelerated telomere attrition is associated with relative household income, diet and inflammation in the pSoBid cohort. *PLoS One* 6:e22521
86. Skoradal MB, Weihe P, Patursson P, Mortensen J, Connolly L, Krstrup P, Mohr M (2018) Football training improves metabolic and cardiovascular health status in 55- to 70-year-old women and men with prediabetes. *Scand J Med Sci Sports* 28 Suppl 1:42-51
87. Smogorzewska A, de Lange T (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 73:177-208
88. Stewart KJ (2002) Exercise training and the cardiovascular consequences of type 2 diabetes and hypertension: plausible mechanisms for improving cardiovascular health. *JAMA* 288:1622-1631
89. Sundstrup E, Jakobsen MD, Andersen LL, Andersen TR, Randers MB, Helge JW, Suetta C, Schmidt JF, Bangsbo J, Krstrup P, Aagaard P (2016) Positive effects of 1-year football and strength training on mechanical muscle function and functional capacity in elderly men. *Eur J Appl Physiol* 116:1127-1138
90. Tanaka H, Dinunno FA, Monahan KD, Clevenger CM, DeSouza CA, Seals DR (2000) Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation* 102:1270-1275
91. Ting NS, Yu Y, Pohorelic B, Lees-Miller SP, Beattie TL (2005) Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Res* 33:2090-2098
92. Torella D, Rota M, Nurzynska D, Musso E, Monsen A, Shiraishi I, Zias E, Walsh K, Rosenzweig A, Sussman MA, Urbanek K, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A (2004) Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res* 94:514-524
93. Tucker LA (2017) Physical activity and telomere length in U.S. men and women: An NHANES investigation. *Prev Med* 100:145-151
94. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92:401-413
95. Victorelli S, Passos JF (2017) Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine* 21:14-20
96. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, Carballo D, Koskinas KC, Back M, Benetos A, Biffi A, Boavida JM, Capodanno D, Cosyns B, Crawford C, Davos CH, Desormais I, Di Angelantonio E, Franco OH, Halvorsen S, Hobbs FDR, Hollander M, Jankowska EA, Michal M, Sacco S, Sattar N, Tokgozoglu L, Tonstad S, Tsioufis KP, van Dis I, van Gelder IC, Wanner C, Williams B, Societies ESCNC, Group ESCSD (2021) 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* 42:3227-3337

97. Wang JC, Bennett M (2012) Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res* 111:245-259
98. Watson JD (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239:197-201
99. Werner C, Hanhoun M, Widmann T, Kazakov A, Semenov A, Poss J, Bauersachs J, Thum T, Pfreundschuh M, Muller P, Haendeler J, Bohm M, Laufs U (2008) Effects of physical exercise on myocardial telomere-regulating proteins, survival pathways, and apoptosis. *J Am Coll Cardiol* 52:470-482
100. 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
101. Werner CM, Hecksteden A, Morsch A, Zundler J, Wegmann M, Kratzsch J, Thiery J, Hohl M, Bittenbring JT, Neumann F, Bohm M, Meyer T, Laufs U (2019) Differential effects of endurance, interval, and resistance training on telomerase activity and telomere length in a randomized, controlled study. *Eur Heart J* 40:34-46
102. WHO (2009) Global health risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks (Geneva, Switzerland, World Health Organization).
103. Willeit P, Willeit J, Brandstatter A, Ehrlenbach S, Mayr A, Gasperi A, Weger S, Oberhollenzer F, Reindl M, Kronenberg F, Kiechl S (2010) Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1649-1656
104. Wu L, Multani AS, He H, Cosme-Blanco W, Deng Y, Deng JM, Bachilo O, Pathak S, Tahara H, Bailey SM, Deng Y, Behringer RR, Chang S (2006) Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell* 126:49-62
105. Yang DG, Liu L, Zheng XY (2008) Cyclin-dependent kinase inhibitor p16(INK4a) and telomerase may co-modulate endothelial progenitor cells senescence. *Ageing Res Rev* 7:137-146
106. Zhang H, Chang R (2019) Effects of Exercise after Percutaneous Coronary Intervention on Cardiac Function and Cardiovascular Adverse Events in Patients with Coronary Heart Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Sports Sci Med* 18:213-222
107. Zhang X, Wu X, Tang W, Luo Y (2012) Loss of p16(Ink4a) function rescues cellular senescence induced by telomere dysfunction. *Int J Mol Sci* 13:5866-5877

8 Publikationen und Abstracts

Originalveröffentlichung:

Hagman M, Werner C, **Kamp K**, Fristrup B, Hornstrup T, Meyer T, Böhm M, Laufs U, Krstrup P. Reduced telomere shortening in lifelong trained male football players compared to age-matched inactive controls. *Prog Cardiovasc Dis.* 2020; 63:738-749. DOI: 10.1016/j.pcad.2020.05.009.

Kongresspräsentationen:

C. Werner, M. Hagman, **K. Kamp**, B. Fristrup, T. Hornstrup, T. Meyer, M. Böhm, U. Laufs, P. Krstrup. Effects of soccer training on telomere length and telomerase activity in young and aged soccer players. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy564.P660>

K. Kamp, C. Werner, M. Hagman, T. Meyer, M. Böhm, P. Krstrup, U. Laufs. Effekte von regelmäßigem Fußballtraining auf Telomerlänge und Telomeraseaktivität bei jungen und alten Fußballspielern. *Clin Res Cardiol* 108, Suppl 1, April 2019 - Beitrag V132. DOI: 10.1007/s00392-019-01435-9.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christian Werner, für sein Vertrauen und die Überlassung dieses Themas danken. Er hat mich während der gesamten Arbeit sehr gut betreut und stand mir stets unterstützend zur Seite.

Zudem möchte ich der Klinik für Innere Medizin III unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm des Universitätsklinikums des Saarlandes für die Möglichkeit der Durchführung dieser medizinischen Forschungsarbeit bedanken. Einen Dank auch an alle medizinisch-technischen Assistenten des Labors, insbesondere an meinen Betreuer Christian Cassel, für die gute Anleitung und Hilfe bei den Experimenten. Darüber hinaus bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit mit dem Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes.

Mein besonderer Dank geht an das Department of Sports Science and Clinical Biomechanics des SDU Sport and Health Sciences Cluster der University of Southern Denmark für die gute Kooperation. Unter anderem danke ich Marie Hagman und Peter Krstrup für die Probandenrekrutierung, Datenanalyse und -auswertung.

Mein persönlicher Dank geht an meinen Vater, der mich bei der grafischen Darstellung unterstützte, sowie an meine Mutter, die mir durch Form- und Korrekturvorschläge half. Ich bedanke mich bei meiner Freundin Lina für die gemeinsamen täglichen Besuche in der Bibliothek.

Große Dankbarkeit gilt meiner gesamten Familie, meinen Freunden sowie meinem Partner, durch deren Vertrauen und Motivation ich stets die Kraft und Zuversicht habe, meine Ziele zu verfolgen.

10 Lebenslauf

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