

Aus der Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Assoziation von kardiovaskulärer Gesundheit und einer 7-CpG epigenetischen Uhr in der Berliner Altersstudie II

Association of cardiovascular health with a 7-CpG epigenetic clock in
the Berlin Aging Study II

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elisa Kubala (geborene Lemke)

Datum der Promotion: 29. November 2024

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung	4
1.1 Die Parameter der epigenetischen Uhr.....	4
1.1.1 Das DNA-Methylierungsalter (DNAm-Alter)	4
1.1.2 Die DNA-Methylierungs-Altersbeschleunigung (DNAmAA)	4
1.1.3 Die 7-CpG epigenetische Uhr	5
1.2 Instrumente zur kardiovaskulären Risikoprognose	5
1.2.1 Der Life's simple 7 (LS7) Score	5
1.2.2 Der Framingham Risk Score (FRS)	6
1.3 Der Zusammenhang zwischen kardiovaskulärer Prävention, kardiovaskulären Risikofaktoren und den verschiedenen epigenetischen Uhren.....	7
2. Methodik	10
2.1 Berliner Altersstudie II (BASE-II) und GendAge.....	10
2.2 Die kardiovaskulären Risikorechner	10
2.2.1 Der Life's simple 7 (LS7) Score	10
2.2.2 Der Framingham Risk Score (FRS)	12
2.3 Die epigenetischen Altersparameter.....	13
2.5 Statistische Analyse.....	14
3. Ergebnisse	16
3.1 Kardiovaskuläre Gesundheit zu beiden Untersuchungszeitpunkten	16
3.1.1 Charakteristika der Kohorte und der kardiovaskulären Risikoscores	16
3.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	20

3.2 Querschnittsanalyse von Ersterhebungsdaten: Zusammenhänge der kardiovaskulären Risikoscores mit der DNAmAA	21
3.2.1 Korrelationen zwischen LS7, FRS und DNAmAA	21
3.2.2 Lineare Regressionsanalyse von DNAmAA und dem LS7	22
3.2.3 Multivariate lineare Regression mit DNAmAA und den LS7 Komponenten	22
3.2.4 Lineare Regression von DNAmAA und dem FRS	23
3.2.5 Multivariate lineare Regression von DNAmAA mit den FRS Komponenten	24
3.3 Längsschnittanalyse: Zusammenhang zwischen dem LS7 aus der Ersterhebung und der DNAmAA aus der Folgerhebung	24
4. Diskussion	26
4.1 Kardiovaskuläre Gesundheit	26
4.1.1 Kardiovaskuläre Gesundheit in der Baseline und im Follow-up	26
4.1.2 Vergleich des FRS aus der Baseline mit dem FRS aus anderen Kohortenstudien	26
4.1.3 Vergleich des LS7 aus der Ersterhebung mit dem LS7 aus anderen Kohortenstudien	27
4.2 Assoziationen von kardiovaskulärer Gesundheit und DNAmAA.....	28
4.2.1 Zusammenhänge zwischen kardiovaskulärem Risiko, Lifestyle und DNAmAA.....	28
4.2.2 Körperliche Aktivität und DNAmAA	30
4.2.3 HDL-Cholesterin, Gesamtcholesterin und ihre Assoziation mit DNAmAA	32
4.2.4 Keine Assoziation von LS7 aus der Ersterhebung mit DNAmAA aus der Folgerhebung	
33	
4.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	33
4.4 Stärken und Schwächen	34
4.5 Ausblick/ Implikationen für zukünftige Forschung	35
5. Schlussfolgerungen	37
Literaturverzeichnis.....	38
Eidesstattliche Versicherung	43
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	44
Auszug aus der Journal Summary List.....	45

Druckexemplar der Originalpublikation	46
Supplementary Material der Originalpublikation: “Cardiovascular health is associated with the epigenetic clock in the Berlin Aging Study II (BASE-II)”	54
Lebenslauf	61
Komplette Publikationsliste	62
Danksagung	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich demographischer, klinischer und epigenetischer Charakteristika zu beiden Untersuchungszeitpunkten.....	16
Tabelle 2: Vergleich des Life's simple 7 zwischen Ersterhebung und Folgeuntersuchung.....	18
Tabelle 3: Vergleich zwischen den Geschlechtern in der Folgeuntersuchung (2018-2020).....	20
Tabelle 4: Lineare Regressionsanalyse von DNAmAA und den kardiovaskulären Risikoproggnoseinstrumenten in der Ersterhebung.....	22
Tabelle 5: Multivariate lineare Regressionsanalyse mit DNAmAA als abhängiger Variable und den Life's simple 7 Komponenten als unabhängigen Variablen in der Ersterhebung.....	23
Tabelle 6: Multivariate lineare Regressionsanalyse von DNAmAA mit den Framingham Risk Score Komponenten in der Ersterhebung.....	24

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der LS7 und FRS zu beiden Erhebungszeitpunkten.....	17
Abbildung 2:	Die 7-CpG epigenetische Uhr.....	29

Abkürzungsverzeichnis

BMI= Body-Mass-Index

CpGs= Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinucleotide

DNAm-Alter= DNA-Methylierungsalter

DNAmAA= DNA-Methylierungs-Altersbeschleunigung

FRS= Framingham Risk Score

HbA1c= glykosyliertes Hämoglobin Typ A1c

HDL-C= High Density Lipoprotein-Cholesterin

LS7= Life's simple 7

7-CpG epigenetische Uhr= eine sieben CpG Stellen umfassende epigenetische Uhr

Zusammenfassung

Einleitung: Epigenetische Uhren (=DNA-Methylierungsalter) sind eine vielversprechende Messmethode, um das biologische Alter zu bestimmen. Die DNA-Methylierungs-Altersbeschleunigung (DNAmAA) ist die Abweichung des DNA-Methylierungsalters (DNAm-Alters) vom chronologischen Alter. In unserer Arbeitsgruppe wird eine epigenetische Uhr validiert, die auf sieben Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinucleotiden (CpGs) basiert und in hohem Maße mit dem chronologischen Alter assoziiert ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der DNAmAA der 7-CpG epigenetischen Uhr und der kardiovaskulären Gesundheit bei älteren Erwachsenen gibt. Zusätzlich wurde die Entwicklung der kardiovaskulären Gesundheit der Teilnehmenden über einen Zeitraum von 7,4 Jahren untersucht.

Methoden: Für die vorliegende Arbeit wurden die Daten der Erstuntersuchung und der 7,4 Jahre späteren Folgeuntersuchung verwendet. Die Ersterhebung fand im Rahmen der Berliner Altersstudie II mit 1.671 Teilnehmer*innen ($68,75 \pm 3,7$ Jahre) von 2009 bis 2014 statt. Von Juni 2018 bis März 2020 wurden die Daten des Follow-ups im Rahmen der GendAge-Studie an 1100 Teilnehmenden ($75,6 \pm 3,8$ Jahre) erhoben. Die kardiovaskuläre Gesundheit wurde mit dem Framingham Risk Score (FRS) und dem Life's simple 7 Score (LS7) gemessen. Es wurden Korrelationsanalysen zwischen der DNAmAA und den beiden kardiovaskulären Risikoscores durchgeführt. Des Weiteren wurden unter Adjustierung für das Geschlecht Regressionsanalysen mit der DNAmAA als abhängigen Variable und den beiden Scores als unabhängigen Variablen berechnet. Zusätzlich wurden multivariate lineare Regressionsanalysen mit der DNAmAA als abhängige Variable und den jeweiligen Scorekomponenten und dem Geschlecht als unabhängige Variablen durchgeführt.

Ergebnisse: Frauen hatten in der Erst- und in der Folgeuntersuchung eine niedrigere epigenetische Alterungsrate und waren bezüglich der kardiovaskulären Risikoscores gesünder als Männer. Insgesamt haben die Teilnehmenden sich innerhalb des Untersuchungszeitraums im FRS und im LS7 nur minimal verschlechtert. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt war die DNAmAA mit dem FRS ($\beta = 0,122$, $p = 0,028$) und mit dem LS7 ($\beta = -0,804$, $p = 0,032$) assoziiert. Im Einzelnen waren körperliche Aktivität ($\beta = -0,461$, $p = 0,05$), die HDL-Cholesterin-Komponente des FRS ($\beta = 0,343$, $p = 0,03$) und die Gesamtcholesterin-Komponente des FRS ($\beta = -0,364$, $p = 0,002$) mit der DNAmAA assoziiert. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem LS7 zum ersten Untersuchungszeitpunkt und der DNAmAA der Folgeuntersuchung.

Schlussfolgerung:

Diese Arbeit zeigt, dass die 7-CpG epigenetische Uhr die kardiovaskuläre Gesundheit älterer Menschen, gemessen mit den validierten Instrumenten FRS und LS7, reflektiert. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um herauszufinden, ob sich diese epigenetische Uhr zur Verbesserung der gegenwärtig genutzten kardiovaskulären Risikoprädiktoren eignet.

Abstract

Introduction: Epigenetic clocks (=DNA methylation age) are a promising measurement method to determine biological age. The DNA methylation age acceleration (DNAmAA) is the deviation of the DNA methylation age (DNAm age) from the chronological age. In our group, an epigenetic clock based on seven cytosine-phosphate-guanine dinucleotides (CpGs) associated with chronological age is being validated. The aim of the present work was to investigate, whether there is a relationship between the DNAmAA of the 7-CpGs epigenetic clock and cardiovascular health in older adults. In addition, the development of cardiovascular health of the participants within 7.4 years was investigated.

Methods: Data from the initial assessments and the Follow-up 7.4 years later were used for the present work. The baseline assessments were conducted as part of the Berlin Aging Study II (BASE-II) with 1,671 participants (68.75 ± 3.7 years) from 2009 to 2014. From June 2018 to March 2020, Follow-up data were collected as part of the GendAge study on 1100 participants (75.6 ± 3.8 years). Cardiovascular health was measured using the Framingham Risk Score (FRS) and the Life's simple 7 score (LS7). Correlation analyses were performed between the DNAmAA and the two cardiovascular risk scores. Furthermore, regression analyses adjusting for sex were calculated with the DNAmAA as the dependent variable and the two scores as independent variables. Additional multivariate linear regression analyses were performed with DNAmAA as the dependent variable and the respective score components and sex as the independent variables.

Results: Women had slower epigenetic aging rates at baseline and Follow-up and performed better in cardiovascular risk scores than men. Overall, participants worsened minimally in the FRS and the LS7 over the 7.4 years. At baseline, DNAmAA was associated with FRS ($\beta = 0.122$, $p = 0.028$) and with LS7 ($\beta = -0.804$, $p = 0.032$). Specifically, physical activity ($\beta = -0.461$, $p = 0.05$), the HDL-cholesterol component of the FRS ($\beta = 0.343$, $p = 0.03$), and the total cholesterol item of the FRS ($\beta = -0.364$, $p = 0.002$) were associated with DNAmAA. There was no association between the LS7 score from the baseline and DNAmAA from the Follow-up.

Conclusion: This work shows for the first time that the 7-CpGs epigenetic clock reflects cardiovascular health in older people as measured by the validated FRS and LS7 instruments. Further investigation is needed to determine, whether this epigenetic clock is suitable for improving currently used cardiovascular risk predictors.

1. Einleitung

1.1 Die Parameter der epigenetischen Uhr

1.1.1 Das DNA-Methylierungsalter (DNAm-Alter)

Der stärkste Risikofaktor für chronische und insbesondere kardiovaskuläre Erkrankungen ist das Alter selbst (Jousilahti et al. 1999). Jedoch ist das chronologische Alter, also das Alter, was von Geburt an in Jahren gezählt wird, ein sehr ungenauer Parameter um das tatsächliche biologische Alter festzustellen, da Menschen in unterschiedlichen Geschwindigkeiten biologisch Altern (Ferrucci et al. 2020). Des Weiteren sind Möglichkeiten zur korrekten biologischen Altersbestimmung essenziell, um den Erfolg von regenerativer und Anti-Aging-Medizin zu beurteilen (Horvath et al. 2018). Eine deutlich genauere Messmethode als das chronologische Alter, um das biologische Alter festzustellen, sind die epigenetischen Uhren (Horvath et al. 2018).

Epigenetische Veränderungen sind reversible Veränderungen am Chromatin. Chromatin ist Komplex aus DNA und Proteinen, welcher die Chromosomen bildet. Sie bestimmen den Aktivitätszustand der Gene, in dem sie regulieren, welche DNA-Sequenzen transkribiert werden. Die eigentliche DNA-Sequenz wird hierbei nicht verändert. Epigenetische Veränderungen treten im Laufe des Lebens auf, sind vererbbar und durch verschiedene Lebensstilfaktoren und das Altern beeinflussbar (Spinelli et al. 2020). Zu den epigenetischen Modifikationen zählen: Veränderungen an Histonen, die Veränderung des Chromatin-Status und die DNA-Methylierung, wobei die DNA-Methylierung die derzeit am besten erforschte epigenetische Veränderung ist (Pal 2016, Spinelli et al. 2020). Sie ist die Grundlage für das Erstellen von epigenetischen Uhren.

Epigenetische Uhren prognostizieren das epigenetische Alter anhand des Methylierungsgrades einer jeweils unterschiedlichen Anzahl von Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinucleotiden (CpGs).

Eine Revolution in der Altersforschung war 2013 die Entwicklung der ersten epigenetischen Uhren („*first generation clocks*“) von Horvath mit 353 CpGs und Hannum et al. mit 71 CpGs (Hannum et al. 2013, Horvath 2013). In den darauffolgenden Jahren wurden weitere epigenetische Uhren beschrieben. Dazu gehören die „*second generation clocks*“, bei deren Entwicklung neben dem chronologischen Alter auch mortalitätsassoziierte Laborparameter und Lebensstilfaktoren berücksichtigt wurden, Beispiele sind die Uhren von Levine et al. (PhenoAge) und Lu et al. (GrimAge) (Levine et al. 2018, Lu et al. 2019).

1.1.2 Die DNA-Methylierungs-Altersbeschleunigung (DNAmAA)

Die DNA-Methylierungs-Altersbeschleunigung (DNAmAA) ist die Abweichung des DNAm-Alters vom chronologischen Alter. Für die vorliegende Arbeit wurde die DNAmAA definiert als die Residuen aus einer linearen Regressionsanalyse des DNAm-Alters auf das chronologische Alter, in welcher für die Zellverteilung verschiedener Leukozyten adjustiert wurde (Vetter et al. 2019, Lemke et al. 2022). Damit beschreibt die DNAmAA den Anteil des DNA-Methylierungsalters, der nicht vom chronologischem Alter und der Verteilung der Leukozyten erklärt wird (Vetter et al. 2019). Nach neuestem wissenschaftlichen Stand wird angenommen, dass die DNAmAA zumindest näherungsweise das biologische Alter repräsentiert (Horvath et al. 2018, Spinelli et al. 2020). Welche epigenetische Uhr welche Aspekte des biologischen Alters am besten widerspiegelt ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Menschen, deren epigenetisches Alter höher ist als das chronologische, haben eine positive DNAmAA, altern demnach schneller, sind also biologisch älter als Individuen, die eine negative DNAmAA aufweisen (Horvath et al. 2018).

1.1.3 Die 7-CpG epigenetische Uhr

Eine acht CpG Stellen umfassende epigenetische Uhr wurde als kostengünstige und leichter durchführbare Alternative zu den älteren epigenetischen Uhren mit einer umfangreicheren Anzahl an CpGs von Vidal-Bralo et al. entwickelt (Vidal-Bralo et al. 2017). Sie ist in der Genauigkeit der Altersprognose den umfangreicheren epigenetischen Uhren kaum unterlegen. Jedoch wurde die 8-CpG epigenetische Uhr nicht auf Assoziation mit kardiovaskulären Risikofaktoren untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurde eine sieben CpG Stellen umfassende epigenetische Uhr verwendet, welche von Vetter et al. (Vetter et al. 2019) anhand einer leicht veränderten Version des DNAm age Protokolls von Vidal-Bralo erstellt wurde (Vidal-Bralo et al. 2016). Die Assoziation zwischen Gesundheitsparametern und der 7-CpG Uhr wurde in dem diesem Manteltext zugrundeliegenden wissenschaftlichen Artikel und in weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe belegt (Banszerus et al. 2020, Vetter et al. 2020, Lemke et al. 2022). Banszerus et al. zeigte, dass die 7-CpG Uhr in der LipidCardio Kohorte mit dem Auftreten von koronarer Herzkrankheit, erhöhtem systolischem Blutdruck, Rauchen und erniedrigter glomerulärer Filtrationsrate assoziiert ist (Banszerus et al. 2020). Eine Assoziation zwischen Vitamin D-Mangel und der 7-CpG Uhr wurde ebenso gefunden (Vetter et al. 2020).

1.2 Instrumente zur kardiovaskulären Risikoprognose

1.2.1 Der Life's simple 7 (LS7) Score

Die „Life’s simple 7“ sind ein Score, welcher 2010 von der American Heart Association entwickelt wurde, um kardiovaskuläre Gesundheit zu beschreiben und ihre Entwicklung zu kontrollieren (Lloyd-Jones et al. 2010). Er beinhaltet sieben durch den persönlichen Lebensstil modifizierbare Verhaltensweisen und gesundheitliche Faktoren: körperliche Aktivität, Ernährung, Raucherstatus, Body-Mass-Index (BMI), Nüchternblutglukosewerte, Gesamtcholesterin und Blutdruck. Für jede Kategorie können maximal zwei Punkte vergeben werden. Je höher die Summe der Punkte ist, desto besser die kardiovaskuläre Gesundheit. Je nach endgültigem Punktwert wird die kardiovaskuläre Gesundheit in drei Kategorien unterteilt: optimal (10-14 Punkte), durchschnittlich (5-9) und inadäquat (0-4).

Seit der Veröffentlichung des LS7 konnten viele weitere Studien den Zusammenhang zwischen kardiovaskulärer Gesundheit und dem LS7 nachweisen. Eine Studie hat die Assoziation zwischen dem Auftreten von Herzinsuffizienz und dem LS7 Score bei 6506 Teilnehmenden untersucht, und ist zu dem Ergebnis gekommen, dass ein besserer LS7 Punktwert mit einem geringen Auftreten von Herzinsuffizienz assoziiert ist (Ogunmoroti et al. 2017). Eine weitere Studie mit 7499 Teilnehmer*innen kam zu dem Schluss, dass ein hoher LS7-Score mit einem geringeren Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist (Peng et al. 2017). Die Northern Manhattan Studie (n=2981) konnte einen starken Zusammenhang zwischen kardiovaskulärer Gesundheit und optimalen Werten im LS7 aufzeigen (Dong et al. 2012). Eine Studie (n=706) über Schlaganfallprävention konnte zeigen, dass Patient*innen, die bereits einen Apoplex erlitten hatten, schlechtere Ergebnisse im LS7 zeigten, als Patient*innen, die noch nie einen Schlaganfall hatten (Yang et al. 2015).

1.2.2 Der Framingham Risk Score (FRS)

Der ursprüngliche FRS wurde 1991 auf Grundlage von Daten von 5573 Teilnehmenden der beiden Framingham Kohorten (Framingham Heart Study und Framingham Offspring Study) publiziert (Anderson et al. 1991). Der geschlechtsspezifische Risikorechner soll das 10-Jahres Risiko an einer koronaren Herzerkrankung (KHK) zu erkranken, eines Tods durch eine KHK, eines Herzinfarkts, eines Herzversagens, eines Schlaganfalls oder einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit bestimmen. Die Baseline-Daten wurden von 1968 bis 1975 erhoben. Im Anschluss folgte eine zwölfjährige Nachbeobachtung der bei Baseline 30 bis 74-jährigen Teilnehmenden. Der in dieser Dissertation verwendete modifizierte FRS wurde 2008 publiziert (D’Agostino et al. 2008). Dieser

Score berücksichtigt folgende acht Prädiktoren: Alter, Geschlecht, HDL-Cholesterin, Gesamtcholesterin, systolischer Blutdruckwert bei behandeltem Bluthochdruck, systolischer Blutdruckwert bei nicht behandeltem Bluthochdruck, Diabetes mellitus (ja oder nein), Raucherstatus (ja oder nein). Je höher der Summen-Punktwert, desto höher das kardiovaskuläre 10-Jahres-Risiko. Der Score berücksichtigt in besonderer Weise das Geschlecht als kardiovaskulären Risikofaktor. Männer erhalten jeweils mehr Punkte als Frauen für den gleichen Risikofaktor. Eine modifizierte Form des FRS wurde in den US-amerikanischen „National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines“ (ATP III- Score) verwendet (Ford et al. 2004). Für deutsche Hausärzte wurde *arriba* (=Aufgabe gemeinsam definieren, Risiko subjektiv, Risiko objektiv, Information über Präventionsmöglichkeiten, Bewertung der Präventionsmöglichkeiten und Absprache über weiteres Vorgehen), ein auf Deutschland epidemiologisch angepasster Risikorechner, entwickelt (Diener 2013) und kürzlich auch validiert (Angelow et al. 2022). Dieser basiert auf dem FRS und prognostiziert das 10-Jahres-Risiko einen Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall zu erleiden. Der FRS wurde in vielen deutschen Studien zur kardiovaskulären Risikobeurteilung verwendet. Im 5-jährigen Follow-up der Heinz-Nixdorf Recall Study (n= 4814) konnte festgestellt werden, dass alle Formen der subklinischen Arteriosklerose mit einem erhöhten FRS assoziiert sind (Geisel et al. 2017). Eine weitere Studie untersuchte das kardiovaskuläre 10-Jahres-Risiko von 1100 Patient*innen mittels sieben verschiedener kardiovaskulärer Risikorechner nach kürzlich stattgehabtem Myokardinfarkt (Garg et al. 2017). Der FRS prognostizierte als einziger Score für mehr als 50% der Patient*innen ein sehr hohes kardiovaskuläres Risiko von $\geq 20\%$.

1.3 Der Zusammenhang zwischen kardiovaskulärer Prävention, kardiovaskulären Risikofaktoren und den verschiedenen epigenetischen Uhren

Die Ergebnisse bezüglich der Assoziation der mittels verschiedener epigenetischer Uhren errechneten DNAmAA und dem kardiovaskulären Risiko sind nicht konsistent. Risikofaktoren und Erkrankungen sind in manchen Studien mit einigen der untersuchten epigenetischen Uhren assoziiert und in anderen Studien nicht. So ist das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen in mehreren Studien mit unterschiedlichen epigenetischen Uhren mit der DNAmAA assoziiert (Perna et al. 2016, Lind et al. 2018, Roetker et al. 2018, Lu et al. 2019, Banszerus et al. 2020). Jedoch konnte in anderen Studien keine Assoziation zwischen dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und der DNAmAA festgestellt werden (Horvath et al. 2016, Dugue et al. 2018, Lind et al. 2018). Verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren wie z.B. das Rauchen (Roetker et al. 2018, Fiorito et al. 2019), Diabetes mellitus Typ II (Horvath et al. 2016, Quach 2017, Roetker et al. 2018),

niedrige HDL-Cholesterinwerte (Roetker et al. 2018), Übergewicht (Horvath et al. 2014, Li et al. 2019), erhöhter BMI (Nevalainen et al. 2017, Quach 2017, Fiorito et al. 2019, Ryan et al. 2019) und Bluthochdruck (Quach 2017, Lind et al. 2018, McCartney et al. 2018, Banszerus et al. 2019) sind in unterschiedlichen Studien mit einer beschleunigten epigenetischen Alterungsrate assoziiert. Zudem wurden Assoziationen zwischen einer hohen DNAmAA und ungesunder Ernährung (Quach 2017) und geringer oder keiner körperliche Aktivität (Roetker et al. 2018) gefunden. Andererseits gab es einige Studien, die jeweils keine Assoziation zwischen der epigenetischen Alterungsrate und kardiovaskulären Risikofaktoren wie Bluthochdruck (McCartney et al. 2018) und Rauchen (Metaanalyse) (Ryan et al. 2019), bzw. Lifestylefaktoren wie z.B. gesunder Ernährung (Simons et al. 2016, Dugue et al. 2018) oder Bewegung (Simons et al. 2016, Dugue et al. 2018, Banszerus et al. 2020) festgestellt haben.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die sogenannten „*second generation clocks*“ wie GrimAge und PhenoAge mit unterschiedlichen Scores für körperliche Aktivität, Obst- und Gemüseverzehr, diversen Ernährungsbiomarkern (z.B. Carotinoide), Blutglukosespiegel, BMI, systolischem Blutdruck und Rauchen assoziiert sind (Levine et al. 2018, Lu et al. 2019, McCrory et al. 2021).

In der Publikation, die diesem Manteltext zugrunde liegt, wurde der Zusammenhang zwischen der DNAmAA, gemessen über eine epigenetische Uhr mit sieben CpGs, und der kardiovaskulären Gesundheit, dargestellt durch den LS7 und den FRS, untersucht (Lemke et al. 2022). Es wurde die Hypothese untersucht, dass günstigere Ergebnisse in den beiden kardiovaskulären Risikorechnern mit einer verlangsamten DNAmAA bzw. mit einem jüngeren biologischen Alter assoziiert sind (Lemke et al. 2022). Darüber hinaus wurde die Hypothese untersucht, dass der LS7-Score stärker mit der DNAmAA assoziiert ist als der FRS, da er anders als der FRS, die beiden Lifestylefaktoren körperliche Aktivität und Ernährung miteinschließt, von denen angenommen wird, dass sie die epigenetische Alterung stark beeinflussen (Quach 2017, Levine et al. 2018, Roetker et al. 2018, Fiorito et al. 2019).

In diesem Manteltext werden zudem längsschnittliche Untersuchungen zur Veränderung des kardiovaskulären Gesundheitszustandes der BASE-II-Teilnehmer*innen über einen Zeitraum von 7,4 Jahren vorgestellt, die noch nicht anderweitig veröffentlicht wurden. Dabei wurde die Hypothese untersucht, dass sich die kardiovaskulären Risikoscores (FRS und LS7) über die Zeit mit zunehmendem Alter der Proband*innen verschlechtern.

Ferner sollte untersucht werden, ob bei Teilnehmenden, welche von der Erstuntersuchung bis zur Folgeuntersuchung in der gleichen LS7 Kategorie geblieben sind, ein Zusammenhang zwischen

dem Life's simple 7 Wert aus der Erstuntersuchung und der DNAmAA aus der Folgeuntersuchung besteht.

2. Methodik

2.1 Berliner Altersstudie II (BASE-II) und GendAge

Die Berliner Altersstudie II (BASE-II) ist eine multidisziplinäre Studie, mit dem Ziel die Mechanismen und Faktoren, welche das Altern beeinflussen, besser zu verstehen. Von 2009 bis 2014 wurden 2171 Proband*innen aus dem Großraum Berlin in der Baselineerhebung untersucht. Hier von gehörten 1671 Teilnehmer*innen zu der älteren Altersgruppe (60-84 Jahre) und 500 zur jüngeren Altersgruppe (20-37 Jahre) (Bertram et al. 2014). Die freiwilligen Proband*innen wurden nach schriftlicher Einwilligung in die Studie aufgenommen. BASE-II wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt, Genehmigungsnummer EA2/029/09. Im Zeitraum der zweitägigen medizinischen Untersuchungen wurde der objektive und subjektive Gesundheitszustand der Teilnehmer*innen untersucht.

Die Follow-up Datenerhebung fand im Rahmen der GendAge-Studie von Juni 2018 bis März 2020 statt (Demuth et al. 2021). Die GendAge Studie untersucht geschlechtsspezifisch und genderspezifisch kardiovaskuläre Risikofaktoren und metabolische Erkrankungen bei älteren BASE-II-Proband*innen. Hier wurden an zwei Tagen im Abstand von einer Woche 1100 Proband*innen der älteren Altersgruppe (65-94 Jahre) im Durchschnitt 7,4 Jahre nach der Erstuntersuchung in der Charité untersucht (Demuth et al. 2021). Die Teilnehmer*innen wurden nach Aufklärung und Unterzeichnung einer schriftlichen Einverständniserklärung in die Studie eingeschlossen. Die GendAge-Studie wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer EA2/144/16). Die GendAge Studie ist im Deutschen Register für Klinische Studien registriert (Studien-ID: DRKS00016157).

2.2 Die kardiovaskulären Risikorechner

2.2.1 Der Life's simple 7 (LS7) Score

Der Life's simple 7 ist ein Score, welcher 2010 von der American Heart Association entwickelt wurde, um kardiovaskuläre Gesundheit zu beschreiben und ihre Entwicklung zu kontrollieren (Lloyd-Jones et al. 2010). Er beinhaltet sieben durch den persönlichen Lebensstil modifizierbare Verhaltensweisen und gesundheitliche Faktoren: körperliche Aktivität, Ernährung, Raucherstatus, Body-Mass-Index (BMI), Nüchternblutglukosewerte, Gesamtcholesterin und Blutdruck. Für jeden Lebensstilfaktor können null bis zwei Punkte vergeben werden. Diese Punkte werden addiert und

ergeben dann den endgültigen Score. 0 bis 4 Punkte entsprechen inadäquater, 5 bis 9 Punkte durchschnittlicher und 10 bis 14 Punkte optimaler kardiovaskulärer Gesundheit.

Für diese Studie wurden drei Parameter des LS7 Scores angepasst. Im originalen LS7 der American Heart Association wurde der Nüchternblutglukosewert als Parameter verwendet. In dieser Dissertation wurde das glykosylierte Hämoglobin_{A1c} (HbA_{1c}) als Langzeitparameter für die Blutglukose verwendet. Der originale LS7 teilt körperliche Bewegung in drei Kategorien ein: keine körperliche Aktivität (0 Punkte), moderate körperliche Aktivität für 1-149 min. pro Woche oder starke körperliche Aktivität für 1-74 min pro Woche oder eine Mischung aus moderater und starker körperlicher Aktivität für 1-149 min pro Woche (1 Punkt) und moderate Aktivität für ≥ 150 min pro Woche oder starke körperliche Aktivität für ≥ 75 min. pro Woche oder eine Mischung aus beidem für ≥ 150 min. pro Woche (2 Punkte) (Lloyd-Jones et al. 2010). Für die vorliegende Arbeit wurde der Parameter körperliche Aktivität etwas verändert und auf Grundlage des Baecke Fragebogens (Baecke et al. 1982) in die Kategorien: „nie“ (0 Punkte), „manchmal“ (1 Punkte), und „häufig bis immer“ (2 Punkte) eingeteilt. In der Follow-up-Erhebung wurde der Baecke Fragebogen nicht mehr erfasst, weshalb für den Vergleich zwischen LS7 zu beiden Untersuchungszeitpunkten, der RAPA-Fragebogen (Topolski et al. 2006) für die Einteilung der körperlichen Aktivität verwendet wurde. Die körperliche Aktivität wurde wie folgt definiert:

Ungesundes Verhalten (0 Punkte):

- selten oder nie körperlich aktiv

Durchschnittliches Verhalten (1 Punkt), wenn eine Aussage zutrifft:

- leichte oder mittelstarke körperliche Aktivität/ nicht jede Woche
- leichte körperliche Aktivität/ jede Woche
- Muskeltraining/ jede Woche
- Übungen um die Flexibilität zu erhöhen wie z.B. Yoga oder Stretching/ jede Woche
- mittelstarke körperliche Aktivität < 30 min./Tag bzw. < 5 Tage/Woche
- starke körperliche Aktivität < 20 Minuten/Tag bzw. < 3 Tage/Woche

Ideal gesundes Verhalten (2 Punkte), wenn eine Aussage zutrifft:

- mittelstarke körperliche Aktivität ≥ 30 min./Tag, mindestens ≥ 5 Tage/ Woche
- starke körperliche Aktivität ≥ 20 min./Tag, mindestens ≥ 3 Tage/ Woche

Beispiele für leichte körperliche Bewegung waren: entspanntes spazieren gehen, Staubsaugen oder Gartenarbeit. Bei der moderaten körperlichen Betätigung sollte der Herzschlag erhöht sein, aber

man sollte noch sprechen können. Beispiele hierfür waren: schnelles Gehen, Aerobic Training oder entspanntes Schwimmen. Der Herzschlag sollte stark erhöht sein bei starker körperlicher Aktivität; Sprechen ist kaum noch möglich. Beispiele für starke körperliche Aktivität waren: Joggen, Tennis, Treppenmaschine/ Cross Trainer.

Gesunde Ernährung wurde durch sechs Parameter definiert:

1. Obst ≥ 1 Portion pro Tag
2. Gemüse ≥ 1 Portion pro Tag
3. Fisch ≥ 2 Portionen pro Woche
4. mit Zucker gesüßte Getränke ≤ 1 pro Woche
5. verarbeitetes Fleisch $\leq 1,5$ pro Woche
6. unverarbeitetes rotes Fleisch $\leq 1,5$ Portionen pro Woche

Proband*innen, die fünf bis sechs Kriterien erfüllten, erhielten zwei Punkte für ideale Ernährung. Erfüllten die Proband*innen drei bis vier Parameter, wurde ein Punkt für intermediäre Ernährung vergeben. Erfüllten die Proband*innen lediglich ein bis zwei Kriterien, erhielten sie null Punkte für eine schlechte Ernährung. Das Ernährungsverhalten der Proband*innen wurde mit dem Verzehrhäufigkeitsfragebogen der EPIC-Studie erhoben (Nothlings et al. 2007).

Für die Errechnung des BMIs wurde das Körpergewicht (in Kilogramm) durch die Körpergröße (in Metern) zum Quadrat dividiert. Das Körpergewicht (in Kilogramm) und die Körpergröße (in Zentimetern) wurden mit einer elektronischen Mess- und Wiegestation (seca 764, seca, Hamburg, Deutschland) bis auf eine Dezimalstelle gemessen. Der Blutdruck in der Ersterhebung wurde im Sitzen an beiden Armen mit einem elektronischen Sphygmomanometer (boso-medicus memory, Jung Willingen, Germany) gemessen. Danach wurde der Durchschnitt aus den beiden systolischen und diastolischen Werten gebildet. In der Folgerhebung wurde der Blutdruck mit dem OMRON 500 Blutdruckmessgerät jeweils an beiden Armen insgesamt drei Mal an zwei unterschiedlichen Tagen gemessen. Hier wurden ebenfalls die Mittelwerte aus allen Messungen gebildet. Der Raucherstatus wurde eingeteilt in: nie oder vor >12 Monaten aufgehört (2 Punkte), vor <12 Monaten aufgehört (1 Punkt) oder aktiver Raucher (0 Punkte).

2.2.2 Der Framingham Risk Score (FRS)

Die in dieser Dissertation verwendete Version des FRSs wurde 2008 publiziert (D'Agostino et al. 2008). Der geschlechtsspezifische Score ermittelt für alle Personen ab 30 Jahren das Risiko in den nächsten zehn Jahren ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden. Er berücksichtigt folgende acht

Prädiktoren: Alter, Geschlecht, HDL-C, Gesamtcholesterin, systolische Blutdruckwerte bei behandeltem und nicht behandeltem Bluthochdruck, Diabetes mellitus Typ 1 und 2 (ja oder nein), Raucherstatus (ja oder nein). Der Score unterscheidet zwischen den Geschlechtern, indem Frauen und Männern unterschiedliche Punktwerte je Kategorie zugewiesen werden. Frauen können pro Prädiktor -3 bis 12 Punkte erhalten, wohingegen Männer -2 bis 15 Punkte erreichen können. Die Summe der erreichten Punkte definiert das kardiovaskuläre 10-Jahres-Risiko in Prozent. Das niedrigste kardiovaskuläre Risiko für Frauen ist mit <1% definiert, das entspricht ≤ -2 Summenpunkten im FRS. Erreichen Frauen ≥ 21 Punkte im FRS, entspricht das einem kardiovaskulären Risiko von >30%. Das niedrigste kardiovaskuläre Risiko (<1%) bei Männern entspricht ≤ -3 Punkten im FRS und das höchste kardiovaskuläre Risiko (>30%) entspricht >18 Punkten im FRS. Die in der Publikation (Lemke et al. 2022) verwendeten FRS Daten von der Ersterhebung der BASE-II-Studie, wurden bereits von Dr. Nora Berger für ihre Dissertation berechnet (Berger 2019). Die FRS-Daten aus der Folgearhebung im Rahmen der GendAge-Studie wurden für die vorliegende Arbeit erstmals berechnet. Die für den FRS verwendeten Blutdruckwerte, Größe und Gewicht wurden in Ersterhebung und in der Folgeuntersuchung auf dieselbe Weise erhoben wie für den LS7 Score (siehe oben).

2.3 Die epigenetischen Altersparameter

Die Parameter der epigenetischen Uhr, das DNA-Methylierungsalter (DNAm-Alter) und die DNA-Methylierungs-Altersbeschleunigung (DNAmAA), wurden von Valentin Vetter aus DNA von Leukozyten bestimmt (Vetter et al. 2019). Hierfür wurde eine leicht veränderte Version des DNAm age Protokolls von Vidal-Bralo verwendet (Vidal-Bralo et al. 2016). Nachdem eine multiple lineare Regressionsanalyse mit chronologischem Alter als abhängiger Variable und den jeweiligen CpG Stellen als unabhängigen Variablen durchgeführt wurde, wurde eine CpG Stelle (cg10917602) aus der Berechnung des DNAm-Alters ausgeschlossen, da sie das Modell der Vorhersage des chronologischen Alters nicht verbesserte. Dies führte zu einer epigenetischen Uhr mit sieben CpG Stellen (Vetter et al. 2019).

Für die Ersterhebung wurde für die Berechnung der DNAmAA eine modifizierte Version der *intrinsic epigenetic age acceleration* (IEAA) von Quach und Kollegen angewandt (Quach 2017). Die DNAmAA ist das Residuum der linearen Regressionsanalyse vom DNAm-Alter auf das chronologische Alter unter Adjustierung für die spezifische Verteilung der Leukozyten in Monozyten, Lymphozyten, Neutrophile und Eosinophile (Vetter et al. 2019). Die DNAmAA beschreibt den

Anteil des DNA-Methylierungsalters, welcher nicht durch das chronologische Alter und die Verteilung der Leukozyten bestimmt wird (Lemke et al. 2022).

Für die Follow-up-Erhebung wurde das DNAm-Alder und die DNAmAA von Christian Kalies im Rahmen seiner Promotionsarbeit analog zur Bestimmung in der Ersterhebung bestimmt (Vetter et al. 2021).

2.5 Statistische Analyse

Alle statistischen Berechnungen wurden mit IBM SPSS Statistics für Windows, Version 25.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit GraphPad Prism Version 8.2.1 (279) und Microsoft PowerPoint für Mac Version 16.67 erstellt. Aus der statistischen Berechnung wurden alle Proband*innen mit fehlenden Werten für einen der LS7-Parameter, eine der FRS Komponenten, das DNAm-Alder oder für die DNAmAA ausgeschlossen (Abbildung S1). Für 11 % der Gesamtstichprobe der Baseline-Erhebung und für 13 % der Gesamtstichprobe in der Follow-up-Erhebung konnte der LS7 aufgrund fehlender Daten nicht berechnet werden. Es besteht kein Grund zu der Annahme, dass sich die aus diesem Grund von den Analysen ausgeschlossenen Teilnehmer*innen signifikant von der untersuchten Stichprobe unterscheiden. Die Berechnung des FRS konnte in der Baseline-Erhebung auf Grund von fehlenden Daten und Ausschluss der Proband*innen aufgrund von bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen für 15% und im Follow-up für 30% der Proband*innen nicht erfolgen. Es besteht Grund zur Annahme, dass sich die von der Analyse ausgeschlossenen Proband*innen bezüglich der kardiovaskulären Risikofaktoren von der untersuchten Stichprobe unterscheiden, da sie eine kardiovaskuläre Erkrankung haben. Die Gesamtmorbidität der Proband*innen unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten (Spieker et al. 2022).

Zur Analyse von Unterschieden in der Verteilung von metrischen gleichverteilten Variablen wurde der t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Für die Untersuchung von Unterschieden in der Verteilung kategorialer Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Zur Beurteilung von Unterschieden in der Verteilung von ordinalskalierten Variablen bei abhängigen Stichproben wurde der Wilcoxon-Test angewendet. Um die Unterschiede in der Verteilung von metrischen gleichverteilten Variablen bei abhängigen Stichproben zu analysieren, wurde der t-Test für abhängige Stichproben verwendet.

Für alle Berechnungen, welche den LS7-Score beinhalten, wurden die Variable verwendet, welche die drei LS7-Kategorien beinhaltet: optimal (10-14 Punkte), durchschnittlich (5-9 Punkte) und in-

adäquat (0-4 Punkte). Graphiken, die den LS7-Wert enthalten (Abbildungen S3/S4 im Supplementary Material, Lemke et al. 2022), wurden zur besseren Darstellung der Verteilung des LS7 Scores unter Verwendung der LS7-Score-Punkte (0-14) für die Publikation erstellt (Lemke et al. 2022). Für die Regressions- und Korrelationsanalysen wurden die Summenpunkte des FRS verwendet. Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho wurden berechnet, um die Beziehung zwischen den beiden kardiovaskulären Risikorechnern und den beiden epigenetischen Parametern darzustellen. Für die Korrelationen zwischen den metrischen kardiovaskulären Risikofaktoren und den epigenetischen Biomarkern wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson errechnet. Anschließend wurde eine lineare Regressionsanalyse mit der DNAmAA als abhängiger Variable und dem LS7 Score als unabhängiger Variable unter Adjustierung für das Geschlecht durchgeführt. Das chronologische Alter wurde nicht als Kovariable in die Analyse mit eingeschlossen, da die Korrelationen zwischen dem chronologischen Alter und dem LS7 ($r=0.007$, $n=1396$) und der DNAmAA ($r=-0.045$, $n=1395$) marginal waren (Lemke et al. 2022). In den linearen Regressionsanalysen mit dem FRS als abhängiger Variable wurden Geschlecht und chronologisches Alter nicht als Kovariablen in die Analysen mit eingeschlossen, da beide Parameter bereits im FRS enthalten sind. Weiterhin wurden geschlechtergetrennte Analysen für die Regression zwischen dem FRS und der DNAmAA durchgeführt, um zu untersuchen, ob die unterschiedliche Punktevergabe im FRS für Männer und Frauen einen signifikanten Unterschied in den Analysen ausmacht. Um herauszufinden, ob eine spezifische Komponente der kardiovaskulären Risikorechner für die Assoziation zwischen den Risikoscores und der DNAmAA verantwortlich ist, wurde eine multivariate Regressionsanalyse mit DNAmAA als abhängiger Variable und allen LS7-Komponenten als unabhängigen Variablen berechnet (Tabelle 5, Modell 1). In diesem Fall wurde der paarweise Fallausschluss für die Regressionsanalyse angewandt, um keine Fälle aus der multivariaten Regressionsanalyse ausschließen zu müssen, weil für eine Komponente des Scores ein Einzelwert fehlt. Auf dieselbe Weise wurde eine multivariate Regressionsanalyse mit den FRS-Komponenten als unabhängige Variablen durchgeführt (Tabelle 6).

3. Ergebnisse

Im vorliegenden Manteltext liegt der Fokus auf dem LS7 Score, da der FRS für 30% der Teilnehmenden aufgrund der im Verlauf zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten gestiegenen Anzahl kardiovaskulärer Erkrankungen zum Zeitpunkt des Follow-ups nicht berechnet werden konnte, da bereits vorliegende kardiovaskuläre Erkrankungen ein Ausschlusskriterium für die Berechnung des Framingham Risk Scores darstellen.

3.1 Kardiovaskuläre Gesundheit zu beiden Untersuchungszeitpunkten

3.1.1 Charakteristika der Kohorte und der kardiovaskulären Risikoscores

Bei der Folgerhebung im Rahmen der GendAge-Studie hatten die Teilnehmenden im Durchschnitt ein chronologisches Alter von $75,6 \pm 3,8$ Jahren. Damit waren sie 7,3 Jahre älter als bei der Baseline-Erhebung in der BASE-II-Studie (Tabelle 1). Das errechnete epigenetische Alter lag bei der Folgeuntersuchung im Mittel bei $71,2 \pm 7,1$ Jahren ($p < 0,001$, Tabelle 1), was eine mittlere Differenz von 5,4 Jahren im Vergleich zur Baseline bedeutet. Demgegenüber gab es in der DNAmAA keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Erhebungszeitpunkten ($p = 0,449$, Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleich demographischer, klinischer und epigenetischer Charakteristika zu beiden Untersuchungszeitpunkten.

Variablen	BASE-II (2010-2014)	n	GendAge (2018-2020)	n	p-Wert*	n***
Chronologisches Alter (Jahre)	$68,3 \pm 3,5$	1083	$75,6 \pm 3,8$	1100	$<0,001^*$	1083
DNAm age (Jahre)	$65,8 \pm 7,4$	971	$71,2 \pm 7,1$	1055	$<0,001^*$	949
DNAm age acceleration (Jahre)	$-0,1 \pm 6,8$	922	$0,05 \pm 6,4$	1055	$0,449^*$	902
LS7 Summenpunkte	$8,59 \pm 1,9$	933	$8,46 \pm 1,8$	946	$0,020^*$	820
Framingham Score Punkte	$15,49 \pm 3,4$	965	$15,51 \pm 5,2$	756	$<0,001^*$	697
Systolischer Blutdruck (mmHg)	$143 \pm 18,8$	1079	$135 \pm 15,7$	1082	$<0,001^*$	1079
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	$83,2 \pm 11$	1079	$79,2 \pm 9$	1082	$<0,001^*$	1078
Body-Mass-Index (kg/m^2)	$26,8 \pm 4,1$	1040	$27 \pm 4,2$	1081	$<0,001^*$	1038
HDL-Cholesterin (mg/dl)	$62,3 \pm 16,9$	1049	$63,07 \pm 17,2$	1060	$0,009^*$	1027
Gesamtcholesterin (mg/dl)	$214,7 \pm 39,5$	1072	$207,2 \pm 42$	1075	$<0,001^*$	1064
HbA1c (%)	$5,6 \pm 0,5$	1052	$5,7 \pm 0,5$	1071	$<0,001^*$	1041
Diabetes mellitus Typ 2	86 (8,4%)	1026	185 (17,1%)	1080	$<0,001^{**}$	1024
Raucher***	93 (8,6%)	1079	73 (6,8%)	1081	$<0,001^{**}$	1077
Einnahme Antihypertensiva	448 (41,4%)	1083	618 (57,1%)	1083	0,007	1083

Eigene Darstellung: Elisa Lemke

*Wilcoxon Test für abhängige Stichproben

** McNemar Test für abhängige Stichproben

***Ausschließlich Verwendung der Fälle für die p-Wert Berechnung, welche jeweils in BASE-II und in GendAge vertreten sind.

Laut des LS7 Scores wiesen in der Ersterhebung 33% der Teilnehmenden eine optimale kardiovaskuläre Gesundheit auf, zum Zeitpunkt der Folgeuntersuchung waren es noch 29%. Zum Zeitpunkt der Ersterhebung hatten 65% der Teilnehmenden eine durchschnittliche kardiovaskuläre

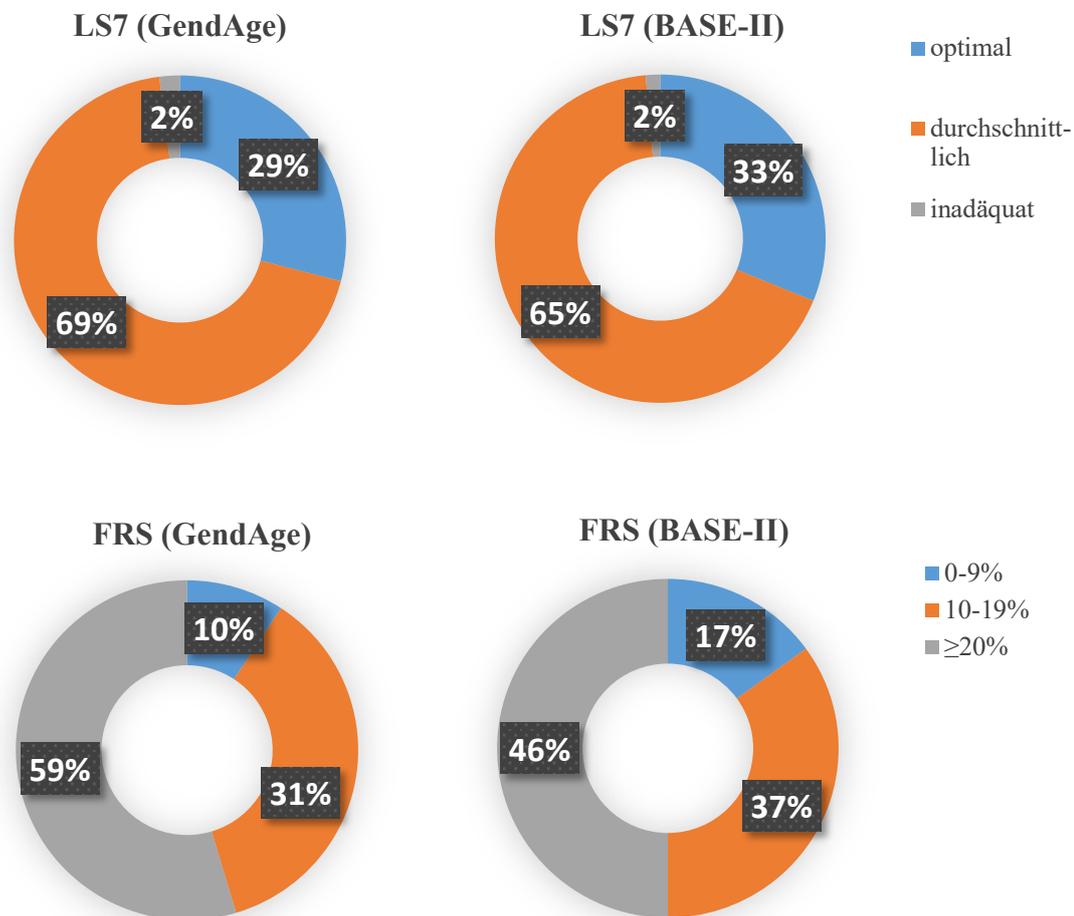


Abbildung 1: Der LS7 und FRS zu beiden Erhebungszeitpunkten.

Die oberen beiden Donut-Diagramme vergleichen den Zustand der kardiovaskulären Gesundheit, gemessen mit dem LS7 zum Zeitpunkt der Ersterhebung (BASE-II) und zum Zeitpunkt der Folgeerhebung (GendAge). Die kardiovaskuläre Gesundheit wird unterteilt in optimal, durchschnittlich und inadäquat. Die unteren beiden Donut-Diagramme vergleichen das Risiko des Auftretens eines kardiovaskulären Ereignisses in den nächsten zehn Jahren, gemessen mit dem FRS zu beiden Erhebungszeitpunkten. Das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses in den nächsten zehn Jahren wird unterteilt in: 0-9%, 10-19% und $\geq 20\%$.

n für FRS (GendAge)=756, n für FRS (BASE-II)= 946
n für LS7 (GendAge)= 956, n für LS7 (BASE-II)= 941

LS7= Life's simple 7 Score, FRS= Framingham Risk Score, BASE-II= Berliner Altersstudie-II

Eigene Darstellung: Elisa Lemke

Gesundheit, nach 7 Jahren waren es 69%. Nur 2 % zeigten zum ersten und zum zweiten Untersuchungszeitpunkt eine unzureichende kardiovaskuläre Gesundheit (Tabelle 2, Abbildung 1).

Tabelle 2: Vergleich des Life's simple 7 zwischen Ersterhebung und Folgeuntersuchung.

Life's simple 7	Score	Häufigkeiten		Häufigkeiten		n*	p-Wert**
		n	in % BASE-II (2010-2014)	n	in % GendAge (2018-2020)		
Blutdruck, mmHg							
<120/80, unbehandelt	2		4,2		6,6		
120-139/80-89, unbehandelt/ behandelt	1	1079	38,5	1099	57,3	1078	<0,001
≥140/90	0		57,4		36,0		
Gesamtcholesterin, mg/dL							
<200 mg/dL, unbehandelt	2		35,7		22,4		
200–239 mg/dL oder behandelt bis <200 mg/dL	1	1072	39,1	1091	53,1	1064	<0,001
≥240 mg/dL	0		25,2		24,6		
Glykosyliertes Hämoglobin A1C, %							
<5,7%, unbehandelt	2		62,4		53,7		
5,7- 6,3 oder behandelt bis <5,7%	1	1052	31,2	1086	37,8	1041	<0,001
≥6,4%	0		6,5		8,5		
Raucher							
Nie oder Nichtraucher seit >12 Monaten	2		90,8		93,3		
Nichtraucher seit <12 Monaten	1	1079	0,6	1097	1,1	1018	<0,001
aktuell Raucher	0		8,6		5,7		
Body-Mass-Index, kg/m²							
<25	2		36,0		34,5		
25 to 29,9	1	1040	45,7	1098	44,7	1038	0,008
≥30	0		18,4		20,8		
Körperliche Aktivität (A.) nach RAPA							
Mittelstarke A. (≥30 min./d, mind. ≥5 d/W) oder Starke A. (≥ 20 min./d, mind. ≥3 d/W)	2						
	1	1069	49,4	1097	23,7	1066	<0,001
Leichte A, oder Mittelstarke A. (<30 min./d, mind. <5 d/W) oder Starke A. (<20 min./d, mind. <3 d/W)	0		42,4		61,4		
selten/nie A.			8,2		12,2		
Gesunde Ernährung							
Ernährungsscore 5-6/6 Punkten	2		23,2		23,7		
Ernährungsscore 3-4/6 Punkten	1	979	57,7	966	61,4	865	0,191
Ernährungsscore 0-2/6 Punkten	0		19,1		14,9		
Kardiovaskuläre Gesundheit							
Optimal	10-14	941	32,9	956	28,9	826	0,062
Durschnitt	5-9		65,2		69,1		
Inadäquat	0-4		1,8		2,0		
Mittelwert und Standardabweichung							
Median		941	8,59± 1,9	956	8,46±1,8	826	0,020
Minimum			9,0		8,0		
Maximum			2,0		3,0		
			14,0		14,0		

Eigene Darstellung: Elisa Lemke

*n= Fallzahl für alle Fälle, die in beiden Erhebungen für den statistischen Test verfügbar waren

**Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben

Der LS7 war in beiden Datenerhebungen normal verteilt. Der Durchschnitt des LS7 war in der Folgerhebung ($8,46 \pm 1,8$) im Vergleich zur Baseline ($8,59 \pm 1,9$, $p=0,02$, Tabelle 1 und 2) geringfügig niedriger. Die Verteilung innerhalb der LS7-Kategorien im Vergleich zwischen den beiden Erhebungen hat sich nicht signifikant verändert ($p=0,062$, Tabelle 2).

Der Blutdruck ist von im Durchschnitt $143/83\text{mmHg}$ in der Ersterhebung auf $135/79\text{mmHg}$ im Follow-up signifikant gesunken ($p<0,001$, Tabelle 1). Zudem hatten in der Folgeuntersuchung signifikant weniger Proband*innen Blutdruckwerte von über $140/90\text{mmHg}$ (36% vs. 58%, $p<0,001$, Tabelle 2) und mehr Teilnehmende ideale Blutdruckwerte von unbehandelt $<120/80\text{mmHg}$ (6,6% vs. 4,2%, $p<0,001$, Tabelle 2). Das Gesamtcholesterin ist von $214,7 \pm 39,5$ mg/dl auf $207,2 \pm 42\text{mg/dl}$ signifikant gesunken ($p=0,009$, Tabelle 1). Es waren jedoch deutlich weniger Teilnehmende in der idealen Kategorie mit einem unbehandelten Gesamtcholesterin von weniger als 200mg/dl (22,4% v.s. 35,7%, Tabelle 2). Dafür waren weniger Proband*innen im Follow-up in der Kategorie mit den höchsten Gesamtcholesterinwerten (22,4% vs. 26,3%, Tabelle 2) und mehr in der mittleren Kategorie (53,1% vs. 38%, Tabelle 2). Das glykosylierte Hämoglobin A1C (HbA1c) war in der Folgerhebung signifikant höher als in der Ersterhebung (Tabelle 1). Es waren auch signifikant mehr Proband*innen in der Gruppe mit den höchsten HbA1c-Werten (8,5% vs. 7,3%) und weniger Proband*innen in der Kategorie mit den niedrigsten Werten (53,7% vs. 60,6%, $p<0,001$, Tabelle 2). In der Folgeuntersuchung erhöhte sich der Anteil der an Diabetes mellitus Typ 2 Erkrankten um 30% und die Einnahme von Antihypertensiva um fast 20%. ($p<0,001$, Tabelle 1). In der Folgerhebung gab es rund 30% weniger Raucher ($p<0,001$, Tabelle 1). Der Body-Mass-Index (BMI) ist von der Ersterhebung zum Follow-up signifikant gestiegen ($p<0,001$, Tabelle 1). Die körperliche Aktivität hat zwischen der Ersterhebung und der Folgerhebung stark nachgelassen. In der Ersterhebung waren noch 49,4% „oft oder immer“ körperlich aktiv, im Follow-up waren es nur 23,7% (Tabelle 2). 42,4% der Probandinnen und Probanden bei Ersterhebung und 61,4% der Proband*innen beim Follow-up waren „manchmal“ körperlich aktiv. Zum Zeitpunkt der Ersterhebung waren mit 12,2% mehr Proband*innen „selten oder nie“ körperlich aktiv, im Vergleich zu 8,2% bei der Ersterhebung ($p<0,001$, Tabelle 2). Das Ernährungsverhalten der Teilnehmenden hat sich zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten nicht signifikant verändert ($p=0,191$, Tabelle 2).

Der FRS ist von der Ersterhebung zur Folgerhebung signifikant ($p<0,001$, Tabelle 1) um 0,02 Punkte gestiegen, was für ein stabiles bis minimal erhöhtes kardiovaskuläres Risiko spricht. Dem FRS zufolge hatten zum Zeitpunkt der Ersterhebung 17% und zum Zeitpunkt der Folgerhebung 10% ein niedriges kardiovaskuläres Risiko von 0-9% ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten 10 Jahren zu erleiden. Zum Ersterhebungszeitpunkt hatten 37% der Teilnehmenden ein Risiko

von 10-19% ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten 10 Jahren zu erleiden. Sieben Jahre später waren es nur 31%. 46% der Teilnehmenden zeigten zum Zeitpunkt der Ersterhebung ein sehr hohes kardiovaskuläres Risiko. In der Nachbeobachtung hatten sogar 59% ein sehr hohes kardiovaskuläres Risiko (Abbildung 1). In der Folgerhebung haben die Teilnehmenden für die meisten Komponenten des FRS signifikant weniger Punkte, also ein niedrigeres kardiovaskuläres Risiko, als in der Ersterhebung erreicht. Dies gilt für folgende Komponenten des FRS: HDL-Cholesterin ($p=0,005$), Gesamtcholesterin ($p=0,015$), Rauchen ($p=0,038$) und systolischer Blutdruck ($<0,001$). Lediglich für folgende zwei Komponenten zeigten sich in der Folgerhebung signifikant höhere Werte, also ein höheres kardiovaskuläres Risiko: Alter ($p<0,001$) und Diabetes mellitus ($p<0,001$).

3.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen im chronologischen Alter ($p=0,259$, Tabelle 3). Jedoch war sowohl in der Ersterhebung (Lemke et al. 2022) als auch in der

Tabelle 3: Vergleich zwischen den Geschlechtern in der Folgeuntersuchung (2018-2020).

Variablen	Männer	n	Frauen	n	Gesamt	n	p-Wert	LS7-Gruppe	n
Chronologisches Alter (Jahre)	75,4± 4,0	458	75,7 ± 3,5	488	75,5 ± 3,8	956	0,259*	75,5± 3,8	618
DNAm Alter (Jahre)	72,4 ± 6,9	447	70 ± 6,8	480	71,1 ± 6,9	937	<0,001*	71,1 ± 6,8	620
DNAmAA (Jahre)	1,2 ± 6,1	447	-1,0 ± 6,2	480	-0,008 ± 6,4	937	<0,001*	-0,1 ± 6,1	620
LS7 Summenpunkte	8,3 ± 2	458	8,6 ± 1,8	488	8,5 ± 1,8	956	0,012*	8,26 ± 1,9	635
Framingham Score Punkte	16,6 ± 5,5	308	14,5 ± 4,9	354	15,5 ± 5,2	671	<0,001*	15,5 ± 5,5	441
Systolischer Blutdruck (mmHg)	136 ± 14,9	458	134 ± 16,4	488	135 ± 15,7	956	0,775*	135 ± 16	635
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	79 ± 9	458	79 ± 9	488	79 ± 9	956	0,047*	79 ± 9	635
Body-Mass-Index (kg/m ²)	27,3 ± 3,6	458	26,6 ± 4,7	488	27 ± 4,2	956	0,007*	27 ± 4,4	635
HDL-Cholesterin (mg/dl)	55,7 ± 14,6	453	70,4 ± 17	480	63,3 ± 17,6	943	<0,001*	63,2 ± 17,6	628
Gesamtcholesterin (mg/dl)	193,9 ± 40	458	221,4 ± 40	488	208,3 ± 42	956	<0,001*	206,8 ± 42,6	635
HbA1c (%)	5,8 ± 0,6	458	5,7 ± 0,4	488	5,7 ± 0,5	956	0,049*	5,8 ± 0,6	635
Diabetes mellitus Typ 2	100 (21,8%)	458	61 (12,5%)	488	161 (16,8%)	956	0,001**	128 (20,2%)	635
Raucher***	33 (7,2%)	458	31 (6,4%)	488	65 (6,8%)	956	0,996**	50 (7,9%)	635
Einnahme Antihypertensiva	280 (61,1%)	458	264 (54,1%)	488	550 (57,5%)	956	0,018**	261 (41,1%)	635

Eigene Darstellung: Elisa Lemke

Tabelle 3: Deskriptive Statistik, für alle Teilnehmenden, für welche der LS7 Score berechenbar war.

HDL= High Density Lipoprotein, HbA1c= Hämoglobin Typ A1c

LS7-Gruppe: nur die Proband*innen, die in der gleichen LS7 Gruppe geblieben sind von der BASE-II Erhebung bis zur GendAge Erhebung.

* T-Test für unabhängige Stichproben, ** Chi-Quadrat Test, *** Raucher oder vor <12 Monaten aufgehört

Folgeuntersuchung ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen im epigenetischen Alter und in der DNAmAA zu sehen. In beiden Erhebungen zeigten Frauen eine durchschnittlich zwei Jahre niedrigere DNAmAA als Männer. In der Ersterhebung hatten sie ein 2,7 Jahre (Lemke et al. 2022) und in der Folgeuntersuchung ein 2,4 Jahre jüngeres DNAm-Alter als Männer.

Im Follow-up gab es bei jedem Parameter, aus welchem die kardiovaskulären Scores gebildet werden, einen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen mit Ausnahme der systolischen Blutdruckwerte und der Anzahl an Rauchern (Tabelle 3).

Im Durchschnitt hatten in der Ersterhebung (Frauen: $8,8 \pm 2$, Männer: $8,2 \pm 2$, $p < 0,001$, (Lemke et al. 2022)) und im Follow-up (Frauen: $8,6 \pm 1,8$, Männer: $8,3 \pm 2$, $p = 0,012$, Tabelle 3) Frauen einen höheren, d. h. günstigeren LS7-Wert als Männer. In der Erstuntersuchung befanden sich 32,6 % ($n=231$) der Frauen, aber nur 29,4% ($n=204$) der Männer im optimalen Bereich. In der Folgeuntersuchung waren insgesamt weniger Personen im optimalen Bereich, jedoch trotzdem mehr Frauen (30,7%, $n=150$) als Männer (27,1%, $n=124$). Die Mehrheit sowohl der Männer als auch der Frauen in der Ersterhebung und in der Folgeuntersuchung wurde in den durchschnittlichen Bereich des LS7 eingestuft. Die kardiovaskuläre Gesundheit wurde für signifikant mehr Männern als Frauen laut LS7 in der Ersterhebung (Männer: 2,9%, $n=20$; Frauen: 1,4%, $n=10$ Frauen, $p=0,003$) als auch in der Folgerhebung (Männer: 3,3%, $n=15$; Frauen: 0,8%, $n=4$, $p=0,012$) als inadäquat eingestuft. Auch beim FRS gab es einen signifikanten Unterschied in der Verteilung zwischen Männern (Ersterhebung: $16,8 \pm 3,1$, Follow-up: $16,6 \pm 5,5$) und Frauen (Ersterhebung: $14,8 \pm 3,5$, Folgerhebung: $14,5 \pm 4,9$) in beiden Erhebungen ($p < 0,001$, Tabelle 3).

3.2 Querschnittsanalyse von Ersterhebungsdaten: Zusammenhänge der kardiovaskulären Risikoscores mit der DNAmAA

3.2.1 Korrelationen zwischen LS7, FRS und DNAmAA

In der Ersterhebung war der LS7 schwach mit der DNAmAA korreliert ($r = -0,078$, $n = 1243$, Abbildung S4, Tabelle S1, Supplementary Material, Lemke et al. 2022) (Lemke et al. 2022). Der FRS war ebenfalls sehr schwach mit der DNAmAA korreliert ($r = 0,060$, $n=1232$, Abbildung S5, Tabelle S1, Supplementary Material, Lemke et al. 2022). In den geschlechtsspezifischen Analysen in der Baseline Erhebung gab es ebenfalls schwache Korrelationen zwischen dem FRS und der DNAmAA bei Männern ($r = -0,049$, $n=612$, Tabelle S2, Supplementary Material, Lemke et al. 2022) und bei Frauen ($r = 0,084$, $n=620$, Tabelle S3, Supplementary Material, Lemke et al. 2022).

Des Weiteren wurden schwache Korrelationen zwischen dem LS7 und der DNAmAA bei Männern ($r = -0,076$, $n = 633$, Tabelle S2, Supplementary Material, Lemke et al. 2022) und Frauen ($r = -0,049$, $n = 610$, Tabelle S3, Supplementary Material, Lemke et al. 2022) gefunden. In der Erstuntersuchung waren der LS7-Score und der FRS moderat korreliert ($r = -0,473$, $n = 1240$). Jedoch korrelierte das chronologische Alter nicht mit dem LS7 ($r = 0,007$, $n = 1396$) und nur sehr geringfügig mit der DNAmAA ($r = -0,045$, $n = 1395$). Weitere Informationen zu den Korrelationen zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren, LS7-Items und den Parametern der epigenetischen Uhr sind in Tabelle S1 im Supplementary Material von Lemke et al. 2022 zu finden.

3.2.2 Lineare Regressionsanalyse von DNAmAA und dem LS7

Um den Zusammenhang zwischen dem LS7-Score und der DNAmAA zum Baseline-Zeitpunkt näher zu untersuchen, wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt (Tabelle 4) (Lemke et al. 2022). Um ein Confounding durch das Geschlecht zu vermeiden, wurde im zweiten Regressionsmodell für das Geschlecht adjustiert. In beiden Modellen konnte gezeigt werden, dass der LS7-Score negativ mit der DNAmAA assoziiert war (Modell 1: $\beta = -0,984$, $p = 0,009$ und Modell 2: $\beta = -0,804$, $p = 0,032$, Tabelle 4) (Lemke et al. 2022). Das Ergebnis der linearen Regression bedeutet, dass sich pro Erhöhung des LS7 um eine Kategorie (z.B. von inadäquat auf durchschnittlich) die epigenetische Alterungsgeschwindigkeit um fast ein Jahr verlangsamt.

Tabelle 4: Lineare Regressionsanalyse von DNAmAA und den kardiovaskulären Risikoprognoseinstrumenten in der Ersterhebung.				
Lineare Regressionsanalyse von DNAmAA und dem LS7				
	β	SER	p -Wert	R^2
Modell 1	-0,984	0,375	0,009	0,005
Modell 2	-0,804	0,374	0,032	0,020
Lineare Regressionsanalyse von DNAmAA und dem FRS				
Gesamt	0,122	0,055	0,028	0,003
Frauen	0,138	0,074	0,064	0,004
Männer	-0,079	0,091	0,385	0,000

Modifiziert nach Lemke et al. 2022.

β = Regressionskoeffizient, **SER** = Standardfehler der Regression, R^2 = Bestimmtheitsmaß, R^2 wurde als adjustiertes R^2 berechnet.
 Adjustierungen in der Regressionsanalyse: Modell 1: keine, Modell 2: Geschlecht
 Stichprobenumfang der linearen Regressionsanalyse von DNAmAA mit dem FRS: gesamte Stichprobe: $n = 1232$, Frauen: $n = 620$, Männer: $n = 612$

3.2.3 Multivariate lineare Regression mit DNAmAA und den LS7 Komponenten

Im nächsten Schritt wurde eine multivariate lineare Regressionsanalyse mit DNAmAA als abhängiger Variable und allen einzelnen LS7 Komponenten (Ernährung, körperliche Aktivität, BMI,

HbA1c, Cholesterin, Raucher, Blutdruck) als unabhängigen Variablen berechnet, um herauszufin-

Tabelle 5: Multivariable lineare Regressionsanalyse mit DNAmAA als abhängiger Variable und den LS7 Komponenten als unabhängigen Variablen in der Ersterhebung.

Kovariablen	Modell 1**			Modell 2***		
	β	SER	p- Wert	β	SER	p- Wert
Gesunde Ernährung*	0,231	0,300	0,440	0,590	0,305	0,053
Körperliche Aktivität*	-0,566	0,236	0,016	-0,461	0,235	0,050
BMI*	-0,454	0,279	0,104	-0,411	0,276	0,138
HbA1c*	-0,177	0,316	0,575	-0,123	0,313	0,695
Gesamtcholesterin*	0,151	0,249	0,545	-0,182	0,255	0,477
Rauchen*	-0,024	0,334	0,943	0,061	0,331	0,853
Blutdruck*	-0,503	0,340	0,139	-0,312	0,339	0,357
Geschlecht	-	-	-	-2,090	0,414	<0,001

Modifiziert nach Lemke et al. 2022.

β = Regressionskoeffizient, SER= Standardfehler der Regression, R^2 = Bestimmtheitsmaß, R^2 wurde als adjustiertes R^2 berechnet.

BMI= Body-Mass-Index, HbA1c= Glykosyliertes Hämoglobin Typ A1C * Komponenten des LS7 ** adjustiertes R^2 für Modell 1: 0,006. *** adjustiertes R^2 für Modell 2: 0,023

den, welche Bestandteile des LS7-Scores für den Zusammenhang zwischen dem LS7 und der epigenetischen Altersbeschleunigung verantwortlich waren. Diese Berechnung wurde einmal ohne (Tabelle 5, Modell 1) und einmal mit (Tabelle 5, Modell 2) Adjustierung für das Geschlecht durchgeführt (Lemke et al. 2022). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die Komponente „körperliche Aktivität“ des LS7 am stärksten mit der DNAmAA assoziiert war (Tabelle 5, Modell 2: $\beta = -0,461$, $p = 0,05$). Für alle anderen LS7 Komponenten konnte keine Assoziation mit der DNAmAA nachgewiesen werden (Tabelle 5, Modell 1 und 2). Lediglich bei der Ernährungskomponente deutete sich eine positive Assoziation an ($\beta = 0,590$, $p = 0,053$, Tabelle 5, Modell 2). Das Geschlecht war in der multivariaten Regressionsanalyse stark mit der DNAmAA assoziiert ($\beta = -2,090$, $p < 0,001$, Tabelle 5, Modell 2).

3.2.4 Lineare Regression von DNAmAA und dem FRS

In dem dieser Dissertation zugrunde liegenden Originalartikel (Lemke et al. 2022) wurde eine Regressionsanalyse mit DNAmAA als abhängiger Variable und dem FRS (FRS) als unabhängiger Variable beschrieben. Der FRS war wie der LS7 Score ebenfalls signifikant mit der DNAmAA assoziiert ($\beta = 0,122$, $p = 0,028$, Tabelle 4) (Lemke et al. 2022). Das bedeutet, dass die Teilnehmenden mit einem zehn Punkte niedrigeren FRS eine um ein Jahr verlangsamte DNAmAA aufwiesen.

Des Weiteren wurde die Interaktion zwischen dem FRS und dem Geschlecht überprüft, indem ein Interaktionsterm verwendet wurde. Der Likelihood-Ratio-Test lieferte keinen Hinweis auf eine relevante Auswirkung einer Interaktion zwischen dem FRS und dem Geschlecht auf die DNAmAA ($p = 0,685$) (Lemke et al. 2022). Trotz dessen wurden geschlechtergetrennte Regressionsanalysen durchgeführt. Diese lieferten sehr schwache Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem FRS und der DNAmAA bei den Probandinnen ($\beta = 0,138$, $p = 0,064$), aber keinen Hinweis auf eine Assoziation zwischen dem FRS und den männlichen Probanden ($\beta = -0,079$, $p = 0,385$, Tabelle 4).

Tabelle 6: Multivariate lineare Regressionsanalyse von DNAmAA mit den FRS Komponenten in der Ersterhebung.			
DNA-Methylierungs-Altersbeschleunigung *			
Kovariablen (Komponenten des FRS)	β	SER	p - Wert
Alter	0,090	0,120	0,455
HDL-Cholesterin	0,343	0,158	0,030
Gesamtcholesterin	-0,364	0,116	0,002
Diabetes mellitus	0,117	0,202	0,561
Systolischer Blutdruck	0,082	0,090	0,362
Rauchen	-0,149	0,186	0,422

Modifiziert nach Lemke et al. 2022

β = Regressionskoeffizient, SER= Standardfehler der Regression, HDL= High density lipoprotein * adjustiertes Bestimmtheitsmaß (R^2): 0,011

3.2.5 Multivariate lineare Regression von DNAmAA mit den FRS Komponenten

Eine multivariate lineare Regressionsanalyse mit der DNAmAA aus der Ersterhebung als abhängige Variable und allen FRS Komponenten (Alter, HDL-Cholesterin, Gesamtcholesterin, systolischer Blutdruck, Blutdruckmedikation (ja/nein), Raucher (ja/nein), Diabetes (ja/nein) als unabhängige Variablen wurde durchgeführt, um zu sehen, welcher Parameter für die Verbindung zwischen der DNAmAA und dem FRS hauptsächlich verantwortlich war. Die DNAmAA war positiv mit der HDL-Cholesterin Komponente des FRS ($\beta = 0,343$, $p = 0,030$, Tabelle 6) und negativ mit der Gesamtcholesterin Komponente des FRS ($\beta = -0,364$, $p = 0,002$, Tabelle 6) assoziiert (Lemke et al. 2022).

3.3 Längsschnittanalyse: Zusammenhang zwischen dem LS7 aus der Ersterhebung und der DNAmAA aus der Folgerhebung

Es wurde eine Korrelationsanalyse zwischen dem LS7 aus der Erstuntersuchung und der 7,4 Jahre später erhobenen DNAmAA aus der Folgerhebung durchgeführt. Diese Korrelationsanalyse

wurde nur für die Teilnehmenden berechnet, welche von der Erstuntersuchung bis zur Folgeuntersuchung anhaltend in der gleichen Kategorie innerhalb des LS7 geblieben waren. Diese Untergruppe von Proband*innen wird im Folgenden als LS7-stabil bezeichnet. Mit der Korrelationsanalyse wurde geprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der DNAmAA aus dem Follow-up und dem LS7-Score aus der Baseline gibt. Es konnte lediglich eine sehr schwache Korrelation gefunden werden ($R= 0.036$, $n=620$).

Im Anschluss wurde eine lineare Regressionsanalyse mit der DNAmAA als abhängige Variable und dem LS7 als unabhängige Variable unter Adjustierung für das Geschlecht durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, ob sich durch das Verbleiben in einer der Kategorien des LS7 die epigenetische Altersbeschleunigung prognostizieren lässt. Wie nach der Korrelation zu erwarten, war der Betakoeffizient in der Regression für den LS7-Score nicht signifikant ($\beta= 0,434$, $p= 0,397$). Jedoch wurde in der Regressionsanalyse die Kovariable Geschlecht signifikant ($\beta= -2,082$, $p<0,001$).

4. Diskussion

4.1 Kardiovaskuläre Gesundheit

4.1.1 Kardiovaskuläre Gesundheit in der Baseline und im Follow-up

Der LS7-Score und der FRS haben sich zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten nur geringfügig verändert. Dies spricht dafür, dass sich ebenfalls das gesundheitliche Verhalten in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko der Teilnehmenden nur geringfügig verschlechtert hat. Das ist bemerkenswert, da die Proband*innen zum Zeitpunkt der Folgeuntersuchung im Mittel sieben Jahre älter waren, und zu vermuten gewesen wäre, dass sich der kardiovaskuläre Gesundheitszustand in dieser Zeit verschlechtert.

In vier der sieben LS7-Komponenten haben die Teilnehmenden ihr kardiovaskulär gesundes Verhalten von der Ersterhebung zur Folgerhebung verbessert: Blutdruck, Cholesterin, Raucher, gesunde Ernährung. Lediglich für die LS7-Komponenten: HbA1c, BMI und körperliche Aktivität wurde das Verhalten kardiovaskulär ungesünder.

Passend hierzu konnten die Teilnehmenden in den meisten einzelnen Kategorien des FRS (HDL-Cholesterin, Gesamtcholesterin, Rauchen und systolischer Blutdruck) ihre kardiovaskuläre Gesundheit von der Erst- zur Zweiterhebung signifikant verbessern. Lediglich in den Komponenten Alter und Diabetes mellitus wurden ungünstigere Ergebnisse für die kardiovaskuläre Gesundheit erzielt.

Eine Ursache für die besseren Durchschnittswerte in den einzelnen Kategorien ist, dass jene Proband*innen, die einen ungünstigen Score-Wert (höheres kardiovaskuläres Risiko) bei der Ersterhebung hatten, inzwischen aus der Berechnung für den FRS im Follow-up ausgeschlossen wurden, da sie bereits ein kardiovaskuläres Ereignis hatten.

4.1.2 Vergleich des FRS aus der Baseline mit dem FRS aus anderen Kohortenstudien

Die BASE-II war die erste Studie, die den FRS an Teilnehmenden mit einem Durchschnittsalter von fast 70 Jahren in Deutschland ermittelt hat. Daher konnten die Ergebnisse des FRS nur mit deutschen Studien mit einem jüngeren Durchschnittsalter verglichen werden. Im Vergleich zur Heinz Nixdorf Recall Studie (Geisel et al. 2017) mit 3108 Proband*innen (mittleres Alter $59,2 \pm 7,7$ Jahre, 47,1% männlich) war das durch den FRS vorhergesagte kardiovaskuläre Risiko in der BASE-II Kohorte deutlich höher (Abbildung 1). 54,5 % der Teilnehmer*innen der Heinz-Nixdorf-Recall-Studie wiesen ein kardiovaskuläres Risiko von <10 % auf, 32,9 % hatten ein mittelhohes

Risiko zwischen 10 und 20 % und nur 12,6 % ein sehr hohes kardiovaskuläres Risiko von >20 %. Jedoch zeigten die BASE-II Proband*innen in Bezug auf die einzelnen kardiovaskulären Risikofaktoren teilweise bessere Ergebnisse als die Proband*innen der Heinz-Nixdorf-Recall Studie. Das wesentlich höher prognostizierte kardiovaskuläre Risiko für die Teilnehmenden innerhalb der Ersterhebung ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass die BASE-II Proband*innen im Durchschnitt 10 Jahre älter waren ($68,8 \pm 3,7$) als die Teilnehmenden der Heinz-Nixdorf-Recall-Studie.

Im Vergleich zur DEGS1-Studie (=Deutscher Gesundheits-Survey für Erwachsene) (Truthmann et al. 2015) mit 5101 Proband*innen (Durchschnittsalter 57 Jahre, 52% weiblich) zeigten die BASE II-Proband*innen bei den meisten kardiovaskulären Risikofaktoren für die kardiovaskuläre Gesundheit günstigere Ergebnisse. So gab es in der Ersterhebung im Rahmen der BASE-II im Vergleich zur DEGS1-Studie (Truthmann et al. 2015) und zur Heinz Nixdorf Recall-Studie (Geisel et al. 2017) weniger Raucher, weniger Personen mit hohen Gesamtcholesterinwerten und weniger Teilnehmende mit einem hohen BMI. Allerdings hatte mehr als die Hälfte der BASE-II-Teilnehmenden einen Blutdruck >140/90 mmHg. Dies ist ein deutlich höherer Anteil als in DEGS1 und der Heinz-Nixdorf-Recall Studie. In der Ersterhebung (BASE-II) gab es weniger Fälle von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und weniger Teilnehmer*innen waren körperlich inaktiv als in DEGS1. Außerdem waren in der BASE-II die HDL-Cholesterinwerte der Proband*innen und die Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 1 und 2 etwas höher als in der Heinz-Nixdorf-Recall-Studie.

4.1.3 Vergleich des LS7 aus der Ersterhebung mit dem LS7 aus anderen Kohortenstudien

Der INVADE-trial (Intervention Project on Cerebrovascular Disease and Dementia in the District of Ebersberg) ist eine prospektive deutsche Kohortenstudie mit Beginn im Jahr 2001 mit 3547 Teilnehmenden (mittleres Alter= $67,28 \pm 7,57$ Jahre, 59,2% weiblich) (Hessler et al. 2016). Sie untersuchte den Zusammenhang zwischen kardiovaskulärer Gesundheit (gemessen mit dem LS7) und dem Auftreten von Demenzerkrankungen. Im Unterschied zu dieser Studie berechnete sie den LS7 nur mit sechs Kriterien: Rauchen, körperliche Aktivität, BMI, Blutdruck, Gesamtcholesterin und Nüchtern glukose, ohne gesunde Ernährung. Im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit zeigten die Teilnehmenden der anderen Studien einen deutlich niedrigeren LS7-Score. Nur 21% der Teilnehmenden hatten ein optimales kardiovaskuläres Risikoprofil, 69% zeigten ein durchschnittliches kardiovaskuläres Verhalten und kardiovaskuläre Risikoparameter und 9,5% wiesen ein inadäquates kardiovaskuläres Risiko auf (Hessler et al. 2016). Bei fast allen LS7-Komponenten schnitten

die Teilnehmenden innerhalb der Ersterhebung deutlich besser ab, als die Teilnehmenden der INVADE-trial-Studie. Lediglich beim Blutdruck waren die Teilnehmenden der anderen Studien, mit 5,1% der Proband*innen in der optimalen Kategorie, etwas besser als die Teilnehmenden von BASE-II (4,2%). Bei der körperlichen Aktivität schnitten die Studienteilnehmer*innen bei beiden Studien mit 47% in der optimalen Kategorie gleich ab.

Zudem können die Ergebnisse des LS7 mit denen der Northern Manhattan Study verglichen werden. Bei der Northern Manhattan Study (Dong et al. 2012) (n= 2981, Durchschnittsalter= 69± 10 Jahre, Frauen: 63,7%) handelt es sich um eine Studie mit einem Follow-up nach 11 Jahren. Zu Beginn der Studie waren alle Teilnehmenden frei von kardiovaskulären Erkrankungen. In BASE-II ist die Anzahl an Teilnehmenden mit bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen höher (n=148, 9,3%). Jedoch ist sie immer noch deutlich niedriger als die Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen in Deutschland (Truthmann et al. 2015). Keiner der Teilnehmenden erreichte in allen sieben Gesundheitskomponenten des LS7 die ideale Kategorie und nur 4,4 % erreichten in fünf oder sechs der LS7-Komponenten die ideale Stufe, was vergleichbar ist mit einem optimalen Ergebnis des LS7 in dieser Studie. Die Mehrheit (51 %) hatte eine inadäquate kardiovaskuläre Gesundheit mit null bis zwei idealen Gesundheitskomponenten und 44,7 % wiesen eine durchschnittliche kardiovaskuläre Gesundheit mit drei bis vier idealen Ergebnissen in den Komponenten des LS7 auf. Diese Einteilung entspricht nicht genau der Einteilung des LS7 in der vorliegenden Studie in optimal, durchschnittlich und inadäquat. Jedoch ist sie sehr ähnlich. In der Northern Manhattan Study wurden die drei Stufen des LS7 durch das Erreichen von idealen Werten in einer bestimmten Anzahl von Kategorien definiert. Vergibt man für die idealen Werte innerhalb einer Kategorie zwei Punkte, so wie in dieser Studie und rechnet diese zusammen, so kommt man auf die gleichen Punktwerte wie für die Einteilung der Stufen des LS7 in dieser Studie. Der einzige Unterschied ist, dass man in dieser Studie auch einen Punkt pro Kategorie für durchschnittliche Ergebnisse in dieser Kategorie erreicht.

Zusammenfassend zeigen die Teilnehmenden der Ersterhebung von BASE-II insgesamt bessere Ergebnisse im LS7-Score als die Teilnehmenden der Northern Manhattan Study. Zudem hatten die BASE-II-Proband*innen bessere Ergebnisse in den Kategorien: Rauchen, BMI, körperliche Aktivität und Ernährung. Lediglich bei den Messgrößen Blutdruck, Gesamtcholesterin und Plasmaglukose hatten die Teilnehmenden der Northern Manhattan Study niedrigere Werte.

4.2 Assoziationen von kardiovaskulärer Gesundheit und DNAmAA

4.2.1 Zusammenhänge zwischen kardiovaskulärem Risiko, Lifestyle und DNAmAA

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt, dass eine schlechte kardiovaskuläre Gesundheit mit einer Beschleunigung des DNA-Methylierungsalters einhergeht (Lemke et al. 2022). Dies stimmt mit vielen Ergebnissen früherer Studien, die den Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und epigenetischen Uhren untersucht haben, überein (Horvath et al. 2016, Nevalainen et al. 2017, Quach 2017, Levine et al. 2018, Roetker et al. 2018, Fiorito et al. 2019, Ryan et al. 2019, Banszerus et al. 2020). In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Inzidenz und Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Lind et al. 2018, Roetker et al. 2018, Lu et al. 2019, Banszerus et al. 2020), der Herz-Kreislauf-Mortalität (Perna et al. 2016) und der

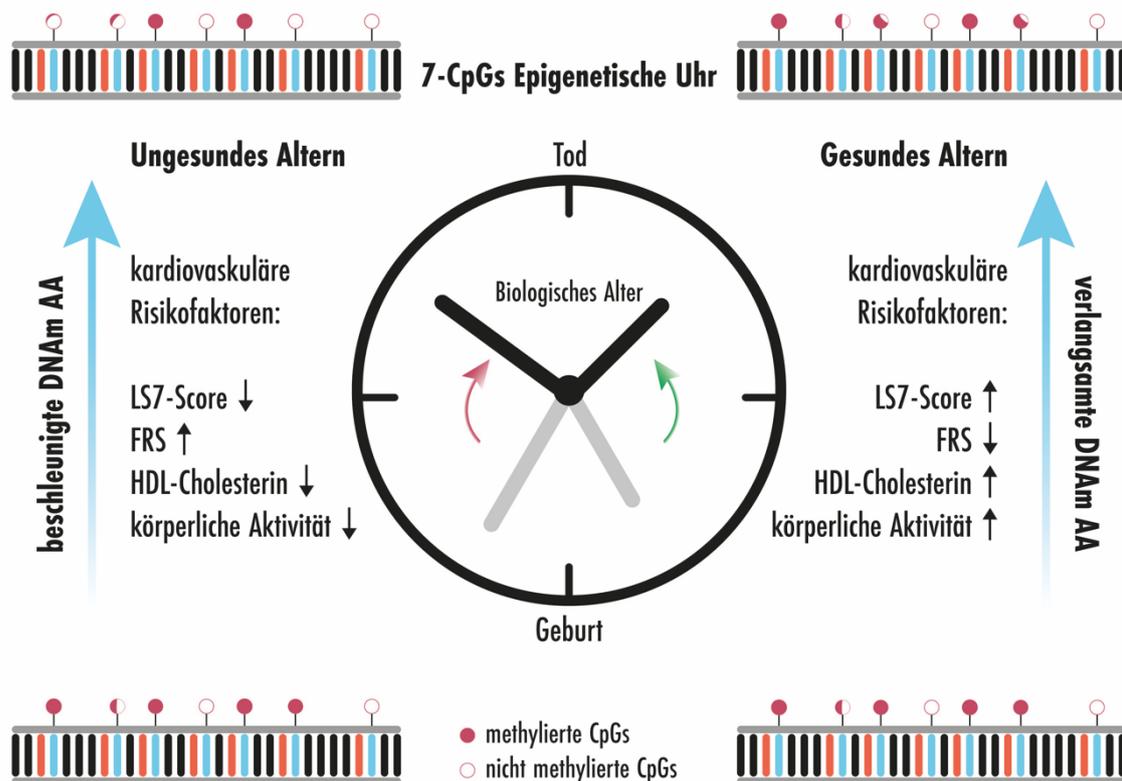


Abbildung 2: Die 7-CpG epigenetische Uhr

Die Abbildung zeigt in der Mitte die 7-CpG epigenetische Uhr. Auf der rechten Seite befindet sich ein grüner Pfeil, welcher für verlangsamtes epigenetisches Altern steht. Der rote Pfeil auf der linken Seite beschreibt das beschleunigte epigenetische Altern. Für die Berechnung der epigenetischen Uhren werden verschiedene CpG Stellen betrachtet, die mit zunehmendem Alter entweder stärker oder schwächer methyliert werden. Kardiovaskuläre Risikoparameter, welche die DNAmAA signifikant beschleunigen sind in dieser Studie: ein niedriger (=ungesunder) LS7-Score, ein hoher (=ungesunder) FRS, ein niedriges HDL-Cholesterin und eine niedrige körperliche Aktivität gemessen mit dem Baecke-Fragebogen. Kardiovaskuläre Risikofaktoren, welche die DNAmAA signifikant verlangsamen sind: ein hoher (=gesunder) LS7-Score, ein niedriger (=gesunder) FRS, ein hohes HDL-Cholesterin und eine hohe körperliche Aktivität gemessen mit dem Baecke-Fragebogen.

CpGs= Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinucleotide, DNAmAA= DNA-Methylierungs-Altersbeschleunigung LS7-Score= Life's simple 7 Score, FRS= Framingham Risk Score, HDL= High density lipoprotein,

Idee und Inhalt: Elisa Lemke, Erstellt durch: Natalie Popovic Garcia

DNAmAA nachgewiesen werden. Eine Studie von Lind et al. fand einen Zusammenhang zwischen

dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen und der epigenetischen Uhr von Horvath, nicht aber der DNAmAA von Hannum (Lind et al. 2018).

Viele Studien konnten einen Zusammenhang zwischen erhöhten kardiovaskulären Risikofaktoren/ ungesundem Lebensstil und beschleunigter DNAmAA gemessen mit epigenetischen Uhren der „*Ersten Generation*“ feststellen. Hierbei handelt es sich um folgende kardiovaskuläre Risikofaktoren: Rauchen (Roetker et al. 2018, Fiorito et al. 2019), das Auftreten von Diabetes mellitus (Horvath et al. 2016, Quach 2017, Roetker et al. 2018), niedrige HDL-Cholesterinwerte (Roetker et al. 2018), Übergewicht (Horvath et al. 2014, Li et al. 2019), erhöhter BMI (Nevalainen et al. 2017, Quach 2017, Fiorito et al. 2019, Ryan et al. 2019) und Bluthochdruck (Quach 2017, Lind et al. 2018, McCartney et al. 2018, Banszerus et al. 2019) und Lifestylefaktoren wie ungesunde Ernährung (Quach 2017) und geringe oder keine körperliche Aktivität (Roetker et al. 2018).

Es fällt auf, dass die „*second generation clocks*“ konsistenter mit Lifestylefaktoren und kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert sind als die „*first generation clocks*“. So sind GrimAge und PhenoAge mit vielen kardiovaskulären Risikomarkern wie körperliche Aktivität, Obst- und Gemüseverzehr, verschiedenen Ernährungsbiomarkern (z.B. Carotinoide), Nüchtern glukosewerten, BMI, systolischem Blutdruck und Rauchen assoziiert (Levine et al. 2018, Lu et al. 2019, McCrory et al. 2021). Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass zur Erstellung dieser Uhren Lebensstilfaktoren und Laborparameter in die multivariaten Regressionsanalysen mit einbezogen wurden.

Jedoch sind die Ergebnisse bezüglich der Zusammenhänge zwischen schlechter kardiovaskulärer Gesundheit und beschleunigtem epigenetischem Altern inkonsistent. Einige Studien fanden keine Hinweise auf eine Assoziation zwischen dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen und der DNAmAA (Horvath et al. 2016, Dugue et al. 2018). Ebenso konnten einige Studien keinen Zusammenhang zwischen der DNAmAA und kardiovaskulären Risiko- oder Schutzfaktoren wie Bluthochdruck (McCartney et al. 2018, Roetker et al. 2018) gesunder Ernährung (Simons et al. 2016, Dugue et al. 2018) Gesamtcholesterin (Roetker et al. 2018), Rauchen (Ryan et al. 2019) und körperlicher Aktivität (Simons et al. 2016, Dugue et al. 2018, Banszerus et al. 2020) nachweisen. Daher kann angenommen werden, dass einige epigenetische Uhren, wie die hier verwendete sieben CpGs umfassende epigenetische Uhr und z.B. „*Second Generation clocks*“, den kardiovaskulären Gesundheitszustand, sowie Marker der kardiovaskulären Gesundheit, wie körperliche Aktivität, Ernährung, BMI, systolischen Blutdruck, Rauchen, HDL-Cholesterin und Gesamtcholesterin besser darstellen können als andere epigenetische Uhren (Liu et al. 2020).

4.2.2 Körperliche Aktivität und DNAmAA

Basierend auf BASE-II-Ersterhebungsdaten konnte gezeigt werden, dass die Assoziation zwischen dem LS7 und der DNAmAA hauptsächlich durch die Variable der körperlichen Aktivität getrieben war (Tabelle 5, Modelle 1 und 2). Körperlich inaktive Teilnehmende alterten epigenetisch durchschnittlich ein Jahr schneller als Teilnehmende, die häufig oder immer körperlich aktiv waren.

Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem Zusammenhang zwischen höherer körperlicher Aktivität und verlangsamer DNAm PhenoAge Altersbeschleunigung, einer „*second generation*“ epigenetischen Uhr, welche von Levine et al. beschrieben wurde (Levine et al. 2018). Des Weiteren konnte McCrory et al. zeigen, dass sowohl die DNAm GrimAge Altersbeschleunigung als auch die DNAm PhenoAge Altersbeschleunigung mit körperlicher Aktivität, gemessen durch Gehgeschwindigkeit und den „*International Physical Activity Questionnaire*“, assoziiert sind (McCrory et al. 2021).

In zwei Studien wurde eine Beziehung zwischen extrinsischer epigenetischer Altersbeschleunigung (EEAA, eine Variante der epigenetischen Uhr nach Hannum) und körperlicher Aktivität gefunden (Quach 2017, Roetker et al. 2018). Jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen körperlicher Aktivität und intrinsischer epigenetischer Altersbeschleunigung (IEAA, eine Variante der epigenetischen Uhr nach Horvath) gezeigt werden (Quach 2017, Roetker et al. 2018). Es könnte also sein, dass die Variante der Hannum-Uhr die Beziehung zwischen körperlicher Aktivität und DNAmAA besser widerspiegelt als die Variante der Horvath Uhr.

Eine weitere Studie fand keine Zusammenhänge zwischen einer beschleunigten DNAmAA der Horvath Uhr oder der Hannum Uhr und verminderter körperlicher Aktivität (Dugue et al. 2018). Ein Grund hierfür könnte sein, dass diese Studie einen Aktivitätsscore genutzt hat, der auf Metaboliten für körperliche Aktivität basiert und nicht auf einem Fragebogen über körperliche Aktivität, wie in den anderen Studien.

In einer Analyse aus unserer Arbeitsgruppe konnte im Datensatz der LipidCardio-Studie und mit der gleichen 7-CpG epigenetischen Uhr, die hier verwendet wurde, ebenfalls keine Assoziation zwischen erhöhter körperlicher Aktivität, gemessen mit dem RAPA-Fragebogen (Rapid Assessment of Physical Activity questionnaire) und verlangsamer epigenetischer Altersbeschleunigung nachgewiesen werden (Banszerus et al. 2020). Jedoch wurde in dieser Analyse von Banszerus et al. ein anderer Score für körperlicher Aktivität verwendet als bei der BASE-II-Ersterhebung. Für die längsschnittliche Untersuchung zwischen dem LS7 aus der BASE-II-Ersterhebung und der DNAmAA der Folgerhebung wurde für die im Manteltext beschriebenen Analysen ebenfalls der RAPA-Fragebogen anstatt des BAECKE-Fragebogens für körperliche Aktivität für den LS7 verwendet. Auch hier zeigten sich keine Assoziationen zwischen der LS7 Variable für körperliche

Aktivität nach RAPA und der DNAmAA für die Daten der Folgerhebung und auch nicht für die Daten der Ersterhebung.

4.2.3 HDL-Cholesterin, Gesamtcholesterin und ihre Assoziation mit DNAmAA

In der Ersterhebung von BASE-II konnte gezeigt werden, dass die HDL-Cholesterin Komponente des FRS mit einer Beschleunigung der DNAmAA verbunden war (Tabelle 6). Die epigenetische Altersbeschleunigung ist bei Teilnehmenden mit höheren HDL-Cholesterinwerten, z. B. zwischen 45-49 mg/dl, um 0,34 Jahre verlangsamt, im Vergleich zu Teilnehmer*innen mit niedrigeren HDL-Cholesterinwerten zwischen 35-44 mg/dl. Diese Ergebnisse passen zu dem Zusammenhang zwischen hohen HDL-Cholesterinwerten und verlangsamer DNAmAA, welcher in mehreren Studien für „*first generation*“ epigenetische Uhren nach Horvath (Quach 2017, Levine et al. 2018, McCartney et al. 2018, Roetker et al. 2018) und nach Hannum (9, 29, 34) und „*second generation*“ epigenetische Uhren (Levine et al. 2018, Lu et al. 2019) beschrieben wird.

Des Weiteren fiel auf, dass die Gesamtcholesterin-Komponente des FRS negativ mit der DNAmAA assoziiert war (Tabelle 6). Das bedeutet, dass Teilnehmende mit einem Gesamtcholesterinspiegel von z. B. 280 mg/dl im Durchschnitt um 0,36 Jahre langsamer epigenetisch altern, als Teilnehmende mit einem niedrigeren Gesamtcholesterinspiegel von 240 mg/dl.

In einer Studie von Levine et al. war das Gesamtcholesterin ebenfalls negativ mit der „*second generation*“ Uhr, DNAm PhenoAge, assoziiert (Levine et al. 2018). DNAm GrimAge, eine weitere „*second generation*“ Uhr war nicht mit dem Gesamtcholesterin assoziiert (Lu et al. 2019).

Diese Ergebnisse sind schwer zu interpretieren. Es muss berücksichtigt werden, dass verschiedene Lipidparameter zum Gesamtcholesterin beitragen. LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin bilden gemeinsam in Verbindung mit anderen Lipoproteinen das gemessene Gesamtcholesterin.

Der beobachtete Zusammenhang zwischen dem Gesamtcholesterin und der DNAmAA könnte allein dadurch erklärt werden, dass das Gesamtcholesterin auch HDL-Cholesterin enthält. Denn in der vorliegenden Arbeit waren hohe HDL-Cholesterinwerte mit einer geringeren DNAmAA verbunden.

Darüber hinaus weisen andere Studien darauf hin, dass höhere LDL-Cholesterinwerte im Hinblick auf die Mortalität und Morbidität im Alter von Vorteil sein können. So ergab eine systematische Übersichtsarbeit, die 19 Kohortenstudien mit 68 094 älteren Menschen berücksichtigte, dass der LDL-Cholesterinspiegel in umgekehrtem Zusammenhang zur Mortalität steht (Ravnskov et al.

2016). Zudem konnte eine weitere Studie zeigen, dass bei 3567 Frauen der Women's Health Initiative Studie ein positiver Zusammenhang zwischen höheren LDL-Cholesterinwerten und einer guten Mobilität bis zum Alter von 90 Jahren bestand (Maihofer et al. 2020).

Jedoch berichten andere Studien mit „*first generation*“ epigenetischen Uhren über eine positive Assoziationen von Gesamtcholesterin und IEAA (intrinsische epigenetische Altersbeschleunigung, basierend auf der epigenetischen Uhr von Horvath), was bedeutet, dass in diesen Studien die Proband*innen mit höheren Gesamtcholesterinwerten eine schnellere epigenetische Alterungsrate aufwiesen (Quach 2017, McCartney et al. 2018). In denselben Studien konnte kein Zusammenhang zwischen Gesamtcholesterin und EEAA (extrinsische epigenetische Altersbeschleunigung, basierend auf der epigenetischen Uhr von Hannum) gefunden werden. Eine weitere Studie von Roetker et al. konnte ebenso keinen Zusammenhang aufzeigen, weder für IEAA noch für EEAA (Roetker et al. 2018).

4.2.4 Keine Assoziation von LS7 aus der Ersterhebung mit DNAmAA aus der Folgerhebung

In der längsschnittlichen Untersuchung konnte keine signifikante Assoziation zwischen dem LS7 aus der Ersterhebung und der DNAmAA aus der Folgerhebung innerhalb der Proband*innen, die über den Zeitraum von 7,4 Jahren in der gleichen Einstufung des LS7 geblieben waren, festgestellt werden. Die DNAmAA ließ sich in dieser Studie nicht dadurch prognostizieren, dass die Teilnehmenden über die 7,4 Jahre dieselbe kardiovaskuläre Gesundheit beibehalten haben. Passend hierzu gab es keinen signifikanten Unterschied in der DNAmAA zwischen der Ersterhebung und der Folgerhebung. Das keine Assoziation gezeigt werden konnte, könnte auch daran liegen, dass die Stichprobengröße für die Analyse innerhalb der LS7-stabil Gruppe deutlich kleiner war (n=618) als die gesamte Stichprobe (n=956).

4.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten wiesen Frauen durchschnittlich, wie aus den beiden verwendeten kardiovaskulären Scores hervorgeht, ein geringeres kardiovaskuläres Risiko auf als Männer. Zudem wiesen Frauen zu beiden Untersuchungszeitpunkten ein im Durchschnitt jüngeres epigenetisches Alter auf und hatten eine um zwei Jahre geringere DNAmAA als Männer. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen die Studien von Horvath et al. 2016 (Horvath et al. 2016) und Banszerus et al. 2019 (Banszerus et al. 2019), welche zeigen konnten, dass Frauen eine langsamere DNAmAA haben. Banszerus et al. verwendeten für die LipidCardio-Kohorte nahezu die gleiche epigenetische

Uhr wie sie in der vorliegenden Studie verwendet wurde. Sie unterschied sich nur in Bezug auf eine CpG Stelle und basierte ebenfalls auf einer 7-CpG epigenetischen Uhr (Banszerus et al. 2019). Des Weiteren wurde keine Korrelation und keine signifikante Assoziation in den nach Geschlechtern getrennten linearen Regressionsanalysen zwischen der DNAmAA und dem FRS bei Männern gefunden (Tabelle 4).

Allerdings konnten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der DNAmAA und dem FRS in der Gruppe der Frauen gefunden werden ($\beta = 0,138$, $p = 0,064$, Tabelle 4). Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass Frauen (im Alter zwischen 60 und 64 Jahren) mit der höchstmöglichen Punktzahl im FRS im Vergleich zu Frauen mit der am niedrigsten möglichen Punktzahl, eine durchschnittlich zwei Jahre langsamere DNAmAA aufwiesen (Tabelle 4).

Dieses Ergebnis könnte auf die geringere Stichprobengröße bei der geschlechtergetrennten Analyse zurückzuführen sein. Eine weitere Ursache dafür, dass der FRS nicht mit der DNAmAA in der Männer Gruppe assoziiert war, könnte darin bestehen, dass der FRS den Geschlechtern unterschiedliche Punktwerte für die selben Ergebnisse innerhalb einer FRS-Komponente zuteilt. So wird Männern für die gleichen Werte innerhalb eines kardiovaskulären Risikofaktors des FRS ein prozentual gesehen deutlich höheres kardiovaskuläres Risiko zugeteilt als Frauen. Es könnte aber auch sein, dass der FRS die kardiovaskuläre Gesundheit der Frauen besser widerspiegelt als die der Männer. Passend hierzu zeigte eine kanadische Studie von 2022 ($n=71.000$), dass der FRS das kardiovaskuläre Risiko bei Frauen deutlich weniger überschätzt als bei Männern (Sud 2022).

Es wurden keine signifikanten Korrelationen zwischen dem LS7 und der DNAmAA in den geschlechtsstratifizierten Analysen gefunden (Tabelle S2/S3, Supplementary Material, Lemke et al. 2022, (Lemke et al. 2022)). Dies könnte jedoch auf den geringeren Stichprobenumfang zurückzuführen sein. Nach Adjustierung der linearen Regression des LS7 mit der DNAmAA für das Geschlecht wurde dennoch eine Assoziation gefunden (Tabelle 4, Modell 2).

4.4 Stärken und Schwächen

Die Stärken dieser Dissertation sind vielfältig. Zuerst ist positiv hervorzuheben, dass beide Geschlechter zu gleichen Maßen in der Studie vertreten sind. Des Weiteren waren durch das Follow-up längsschnittliche Analysen und Vergleiche zwischen der kardiovaskulären Gesundheit zu beiden Untersuchungszeitpunkten möglich.

Erstmals wurden der LS7 und der FRS für die gleiche Kohorte berechnet, was einen Vergleich der mit beiden Instrumenten gemessenen kardiovaskulären Gesundheit erlaubt. Besonders hervorzuheben ist, dass die vorliegende Arbeit als Erste einen Zusammenhang zwischen epigenetischer

Altersbeschleunigung und den beiden kardiovaskulären Risikoprognoseinstrumenten (LS7 und FRS) untersucht hat. Darüber hinaus ist die in dieser Dissertation angewandte epigenetische Uhr eine innovative und kostengünstige Alternative mit nur sieben CpGs im Vergleich zu den größeren deutlich mehr CpGs umfassenden epigenetischen Uhren, wie z.B. die von Horvath oder Hannum. Es muss erwähnt werden, dass in den Datensätzen aus der Erst- und der Folgerhebung zur Erstellung der Ernährungskomponente des LS7 Daten in der Größenordnung von etwa 10% fehlten, sodass der LS7 für diese 10% nicht erstellt werden konnte. Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass sich die Proband*innen mit fehlenden Werten für die Variable „gesunde Ernährung“ des LS7 signifikant von den anderen Teilnehmer*innen unterscheiden. Dennoch könnten die fehlenden Werte innerhalb der Ernährungskomponente zu einer Verzerrung geführt haben. Der FRS konnte zu einem geringen Anteil aufgrund von fehlenden Daten, aber hauptsächlich aufgrund des Ausschlusses der Proband*innen wegen bestehender kardiovaskulärer Erkrankungen für 15% bzw. 30% der Proband*innen (Ersterhebung bzw. Follow-up) nicht berechnet werden.

Zur Definition von Bluthochdruck wird in den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) empfohlen, den Mittelwert von drei Messungen an zwei verschiedenen Tagen zu ermitteln (Narkiewicz 2013). Für die BASE-II-Ersterhebung standen nur zwei Blutdruckmessungen vom selben Tag zur Verfügung.

Bei den Variablen Ernährung, Aktivität und Raucherstatus handelt es sich um selbstberichtete Lebensgewohnheiten, so dass Ungenauigkeiten, Messfehler und sozialer Bias bei diesen Variablen zu Fehlklassifizierungen und verzerrten Ergebnissen führen können. Folglich könnten diese Verzerrungen zu einer Abschwächung des Zusammenhangs zwischen den kardiovaskulären Risikoprognoseinstrumenten und DNAmAA führen.

Für die Berechnung des LS7 wurden innerhalb der Ersterhebung für die LS7-Komponenten „gesunde Ernährung“ und „körperliche Aktivität“ im Vergleich zum originalen LS7-Score der AHA leicht veränderte Komponenten verwendet. Für die Folgerhebung wurde lediglich die Ernährungskomponente etwas verändert. Daher ist die Vergleichbarkeit mit anderen Studien, die den LS7 verwenden, etwas erschwert. Außerdem kann bei der multivariaten Regressionsanalyse zwischen DNAmAA und den LS7-Komponenten, sowie zwischen der DNAmAA und allen Bestandteilen des FRS die Möglichkeit eines Rest-Confoundings nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus sind die Teilnehmer*innen der BASE-II-Kohorte gesünder als die Teilnehmer*innen ähnlicher Kohortenstudien (Bertram et al. 2014, Berger 2019). Dies könnte im Hinblick auf die Verallgemeinerbarkeit der Studienergebnisse problematisch sein.

4.5 Ausblick/ Implikationen für zukünftige Forschung

Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zur Validierung der sieben CpGs umfassenden epigenetischen Uhr im Kontext der kardiovaskulären Gesundheit dar. In der Zukunft ist weitere Forschung nötig, um zu zeigen, welche epigenetischen Uhren am besten mit welchen Risikofaktoren korrelieren und dies auch über verschiedene Kohorten hinweg, sodass eine Implementierung in die Risikoabschätzung im klinischen Umfeld möglich wird.

5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigte sich in Daten aus der BASE-II-Ersterhebung, dass günstigere Ergebnisse im kardiovaskulären Risikoscore FRS und im Lebensstilscore LS7 mit einer langsameren DNAmAA assoziiert sind. Somit konnte die erste Hypothese, dass die 7-CpG epigenetische Uhr mit kardiovaskulären Risikoprognoseinstrumenten assoziiert ist, bestätigt werden. Darüber hinaus konnte die zweite Hypothese, dass der LS7 möglicherweise stärker als der FRS mit der DNAmAA assoziiert ist, da er körperliche Aktivität und Ernährung mitberücksichtigt, zumindest in Teilen bestätigt werden. Hier erwies sich die körperliche Aktivität als treibende Kraft bei der Assoziation zwischen der DNAmAA und dem LS7. Teilnehmende mit einer besseren körperlichen Aktivität hatten durchschnittlich eine geringere epigenetische Altersbeschleunigung als Teilnehmende, die angaben, nie körperlich aktiv zu sein.

Bei der Assoziation zwischen dem FRS und der DNAmAA war die treibende Kraft das HDL-Cholesterin. So hatten Teilnehmende mit höheren HDL-Cholesterinwerten durchschnittlich eine langsamere DNAmAA als Teilnehmende mit niedrigeren Werten.

Die Vermutung, dass sich die kardiovaskulären Risikoscores verschlechtern würden, da die Proband*innen im Durchschnitt siebeneinhalb Jahre älter geworden waren, konnte bestätigt werden. Die Teilnehmenden verschlechterten sich im FRS und im LS7 statistisch signifikant, jedoch war die Differenz nur geringfügig.

Die letzte Hypothese konnte nicht bestätigt werden. Bei Teilnehmenden, welche von der Erstuntersuchung bis zur Folgeuntersuchung in der gleichen LS7-Kategorie geblieben waren, bestand kein Zusammenhang zwischen dem LS7-Wert aus der Erstuntersuchung und der DNAmAA aus der Folgeuntersuchung. Wie erwartet, zeigten Frauen zu beiden Untersuchungszeitpunkten günstigere Ergebnisse bei den kardiovaskulären Risikoscores und hatten eine deutlich geringere epigenetische Altersbeschleunigung als Männer.

Literaturverzeichnis

Anderson, K. M., P. M. Odell, P. W. Wilson and W. B. Kannel (1991). "Cardiovascular disease risk profiles." Am Heart J **121**(1 Pt 2): 293-298.

Angelow, A., C. Klotzer, N. Donner-Banzhoff, J. Haasenritter, C. O. Schmidt, M. Dorr and J. F. Chenot (2022). "Validation of Cardiovascular Risk Prediction by the arriba Instrument-an Analysis Based on Data From the Study of Health in Pomerania." Dtsch Arztebl Int(Forthcoming).

Baecke, J. A., J. Burema and J. E. Frijters (1982). "A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies." Am J Clin Nutr **36**(5): 936-942.

Banszerus, V. L., V. M. Vetter, M. Koenig, U. Landmesser and I. Demuth (2020). "Evidence of accelerated epigenetic aging in patients diagnosed with coronary artery disease: Results of the LipidCardio study."

Banszerus, V. L., V. M. Vetter, B. Salewsky, M. Konig and I. Demuth (2019). "Exploring the Relationship of Relative Telomere Length and the Epigenetic Clock in the LipidCardio Cohort." Int J Mol Sci **20**(12).

Berger, N. J. (2019). "Geschlechterunterschiede in kardiovaskulärem Risiko und leitliniengerechter Kontrolle modifizierbarer kardiovaskulärer Risikofaktoren bei Probanden der Berliner Altersstudie II."

Bertram, L., A. Bockenhoff, I. Demuth, S. Duzel, R. Eckardt, S. C. Li, U. Lindenberg, G. Pawelec, T. Siedler, G. G. Wagner and E. Steinhagen-Thiessen (2014). "Cohort profile: The Berlin Aging Study II (BASE-II)." Int J Epidemiol **43**(3): 703-712.

D'Agostino, R. B., Sr., R. S. Vasan, M. J. Pencina, P. A. Wolf, M. Cobain, J. M. Massaro and W. B. Kannel (2008). "General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study." Circulation **117**(6): 743-753.

Demuth, I., V. Banszerus, J. Drewelies, S. Duzel, U. Seeland, D. Spira, E. Tse, J. Braun, E. Steinhagen-Thiessen, L. Bertram, A. Thiel, U. Lindenberg, V. Regitz-Zagrosek, D. Gerstorf and B.-I. I. G. i. Additional (2021). "Cohort profile: follow-up of a Berlin Aging Study II (BASE-II) subsample as part of the GendAge study." BMJ Open **11**(6): e045576.

Diener, A. C. n.-H., S.; Wegscheider, K.; Kolpatzik, K.; Tomaschko, K.; Altiner, A.; Donner-Banzhoff, N.; and Haasenritter, J. (2013). "In-vivo-validation of a cardiovascular risk prediction tool: the arriba-pro study." BMC Family Practice **14**.

Dong, C., T. Rundek, C. B. Wright, Z. Anwar, M. S. Elkind and R. L. Sacco (2012). "Ideal cardiovascular health predicts lower risks of myocardial infarction, stroke, and vascular death across whites, blacks, and hispanics: the northern Manhattan study." Circulation **125**(24): 2975-2984.

Dugue, P. A., J. K. Bassett, J. E. Joo, L. Baglietto, C. H. Jung, E. M. Wong, G. Fiorito, D. Schmidt, E. Makalic, S. Li, M. Moreno-Betancur, D. D. Buchanan, P. Vineis, D. R. English, J. L. Hopper, G. Severi, M. C. Southey, G. G. Giles and R. L. Milne (2018). "Association of DNA Methylation-

Based Biological Age With Health Risk Factors and Overall and Cause-Specific Mortality." Am J Epidemiol **187**(3): 529-538.

Ferrucci, L., M. Gonzalez-Freire, E. Fabbri, E. Simonsick, T. Tanaka, Z. Moore, S. Salimi, F. Sierra and R. de Cabo (2020). "Measuring biological aging in humans: A quest." Aging Cell **19**(2): e13080.

Fiorito, G., C. McCrory, O. Robinson, C. Carmeli, C. O. Rosales, Y. Zhang, E. Colicino, P. A. Dugue, F. Artaud, G. J. McKay, A. Jeong, P. P. Mishra, T. H. Nost, V. Krogh, S. Panico, C. Sacerdote, R. Tumino, D. Palli, G. Matullo, S. Guarrera, M. Gandini, M. Bochud, E. Dermitzakis, T. Muka, J. Schwartz, P. S. Vokonas, A. Just, A. M. Hodge, G. G. Giles, M. C. Southey, M. A. Hurme, I. Young, A. J. McKnight, S. Kunze, M. Waldenberger, A. Peters, L. Schwettmann, E. Lund, A. Baccarelli, R. L. Milne, R. A. Kenny, A. Elbaz, H. Brenner, F. Kee, T. Voortman, N. Probst-Hensch, T. Lehtimaki, P. Elliot, S. Stringhini, P. Vineis, S. Polidoro, B. Consortium and c. Lifepath (2019). "Socioeconomic position, lifestyle habits and biomarkers of epigenetic aging: a multi-cohort analysis." Aging (Albany NY) **11**(7): 2045-2070.

Ford, E. S., W. H. Giles and A. H. Mokdad (2004). "The distribution of 10-Year risk for coronary heart disease among US adults: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III." J Am Coll Cardiol **43**(10): 1791-1796.

Garg, N., S. K. Muduli, A. Kapoor, S. Tewari, S. Kumar, R. Khanna and P. K. Goel (2017). "Comparison of different cardiovascular risk score calculators for cardiovascular risk prediction and guideline recommended statin uses." Indian Heart J **69**(4): 458-463.

Geisel, M. H., M. Bauer, F. Hennig, B. Hoffmann, N. Lehmann, S. Mohlenkamp, K. Kroger, K. Kara, T. Muller, S. Moebus, R. Erbel, A. Scherag, K. H. Jockel, A. A. Mahabadi and s. Heinz Nixdorf Recall (2017). "Comparison of coronary artery calcification, carotid intima-media thickness and ankle-brachial index for predicting 10-year incident cardiovascular events in the general population." Eur Heart J **38**(23): 1815-1822.

Hannum, G., J. Guinney, L. Zhao, L. Zhang, G. Hughes, S. Sada, B. Klotzle, M. Bibikova, J. B. Fan, Y. Gao, R. Deconde, M. Chen, I. Rajapakse, S. Friend, T. Ideker and K. Zhang (2013). "Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates." Mol Cell **49**(2): 359-367.

Hessler, J. B., K. H. Ander, M. Bronner, T. Etgen, H. Forstl, H. Poppert, D. Sander and H. Bickel (2016). "Predicting dementia in primary care patients with a cardiovascular health metric: a prospective population-based study." BMC Neurol **16**: 116.

Horvath, S. (2013). "DNA methylation age of human tissues and cell types." Genome Biology **14**(10): 3156.

Horvath, S., W. Erhart, M. Brosch, O. Ammerpohl, W. von Schonfels, M. Ahrens, N. Heits, J. T. Bell, P. C. Tsai, T. D. Spector, P. Deloukas, R. Siebert, B. Sipos, T. Becker, C. Rocken, C. Schafmayer and J. Hampe (2014). "Obesity accelerates epigenetic aging of human liver." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(43): 15538-15543.

Horvath, S., M. Gurven, M. E. Levine, B. C. Trumble, H. Kaplan, H. Allayee, B. R. Ritz, B. Chen, A. T. Lu, T. M. Rickabaugh, B. D. Jamieson, D. Sun, S. Li, W. Chen, L. Quintana-Murci, M.

- Fagny, M. S. Kobor, P. S. Tsao, A. P. Reiner, K. L. Edlefsen, D. Absher and T. L. Assimes (2016). "An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex, and coronary heart disease." Genome Biol **17**(1): 171.
- Horvath, S. and K. Raj (2018). "DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing." Nat Rev Genet **19**(6): 371-384.
- Jousilahti, P., E. Vartiainen, J. Tuomilehto and P. Puska (1999). "Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland." Circulation **99**(9): 1165-1172.
- Lemke, E., V. M. Vetter, N. Berger, V. L. Banszerus, M. König and I. Demuth (2022). "Cardiovascular health is associated with the epigenetic clock in the Berlin Aging Study II (BASE-II)" Mechanisms of Ageing and Development.
- Levine, M. E., A. T. Lu, A. Quach, B. H. Chen, T. L. Assimes, S. Bandinelli, L. Hou, A. A. Baccarelli, J. D. Stewart, Y. Li, E. A. Whitsel, J. G. Wilson, A. P. Reiner, A. Aviv, K. Lohman, Y. Liu, L. Ferrucci and S. Horvath (2018). "An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan." Aging (Albany NY) **10**(4): 573-591.
- Li, C., Z. Wang, T. Hardy, Y. Huang, Q. Hui, C. A. Crusto, M. L. Wright, J. Y. Taylor and Y. V. Sun (2019). "Association of Obesity with DNA Methylation Age Acceleration in African American Mothers from the InterGEN Study." Int J Mol Sci **20**(17).
- Lind, L., E. Ingelsson, J. Sundstrom, A. Siegbahn and E. Lampa (2018). "Methylation-based estimated biological age and cardiovascular disease." Eur J Clin Invest **48**(2).
- Liu, Z., D. Leung, K. Thrush, W. Zhao, S. Ratliff, T. Tanaka, L. L. Schmitz, J. A. Smith, L. Ferrucci and M. E. Levine (2020). "Underlying features of epigenetic aging clocks in vivo and in vitro." Aging Cell **19**(10): e13229.
- Lloyd-Jones, D. M., Y. Hong, D. Labarthe, D. Mozaffarian, L. J. Appel, L. Van Horn, K. Greenlund, S. Daniels, G. Nichol, G. F. Tomaselli, D. K. Arnett, G. C. Fonarow, P. M. Ho, M. S. Lauer, F. A. Masoudi, R. M. Robertson, V. Roger, L. H. Schwamm, P. Sorlie, C. W. Yancy, W. D. Rosamond, F. American Heart Association Strategic Planning Task and C. Statistics (2010). "Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond." Circulation **121**(4): 586-613.
- Lu, A. T., A. Quach, J. G. Wilson, A. P. Reiner, A. Aviv, K. Raj, L. Hou, A. Baccarelli, Y. Li, J. D. Stewart, E. A. Whitsel, T. Assimes, L. Ferrucci and S. Horvath (2019). "DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan." Aging (Albany NY) **11**: 303-327.
- Maihofer, A. X., A. H. Shadyab, R. A. Wild and A. Z. LaCroix (2020). "Associations between Serum Levels of Cholesterol and Survival to Age 90 in Postmenopausal Women." J Am Geriatr Soc **68**(2): 288-296.
- McCartney, D. L., A. J. Stevenson, R. M. Walker, J. Gibson, S. W. Morris, A. Campbell, A. D. Murray, H. C. Whalley, D. J. Porteous, A. M. McIntosh, K. L. Evans, I. J. Deary and R. E. Marioni

- (2018). "Investigating the relationship between DNA methylation age acceleration and risk factors for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement (Amst) **10**: 429-437.
- McCrary, C., G. Fiorito, B. Hernandez, S. Polidoro, A. M. O'Halloran, A. Hever, C. Ni Cheallaigh, A. T. Lu, S. Horvath, P. Vineis and R. A. Kenny (2021). "GrimAge Outperforms Other Epigenetic Clocks in the Prediction of Age-Related Clinical Phenotypes and All-Cause Mortality." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **76**(5): 741-749.
- Narkiewicz, K., Redon, J., Zanchetti A., Böhm, M. (2013). "2013 ESH/ESC Pocket Guidelines for the management of arterial hypertension." ESC Pocket Guidelines. Retrieved 25.10.2019, 2019.
- Nevalainen, T., L. Kananen, S. Marttila, J. Jylhava, N. Mononen, M. Kahonen, O. T. Raitakari, A. Hervonen, M. Jylha, T. Lehtimaki and M. Hurme (2017). "Obesity accelerates epigenetic aging in middle-aged but not in elderly individuals." Clin Epigenetics **9**: 20.
- Nothlings, U., K. Hoffmann, M. M. Bergmann and H. Boeing (2007). "Fitting portion sizes in a self-administered food frequency questionnaire." J Nutr **137**(12): 2781-2786.
- Ogunmoroti, O., E. Oni, E. D. Michos, E. S. Spatz, N. B. Allen, J. S. Rana, S. S. Virani, R. Blankstein, K. N. Aronis, R. S. Blumenthal, E. Veledar, M. Szklo, M. J. Blaha and K. Nasir (2017). "Life's Simple 7 and Incident Heart Failure: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis." J Am Heart Assoc **6**(6).
- Pal, S. T., J.K. (2016). "Epigenetics and aging." ScienceAdvances **2**(7).
- Peng, Y. and Z. Wang (2017). "Association of Life's Simple 7 and presence of cardiovascular disease in general Australians." Open Heart **4**(2): e000622.
- Perna, L., Y. Zhang, U. Mons, B. Holleczeck, K. U. Saum and H. Brenner (2016). "Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort." Clin Epigenetics **8**: 64.
- Quach, A. L., M. E.; Toshiko Tanaka, T.; Horvath, S. et al. (2017). "Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors." Aging (Albany NY).
- Ravnskov, U., D. M. Diamond, R. Hama, T. Hamazaki, B. Hammarskjöld, N. Hynes, M. Kendrick, P. H. Langsjoen, A. Malhotra, L. Mascitelli, K. S. McCully, Y. Ogushi, H. Okuyama, P. J. Rosch, T. Schersten, S. Sultan and R. Sundberg (2016). "Lack of an association or an inverse association between low-density-lipoprotein cholesterol and mortality in the elderly: a systematic review." BMJ Open **6**(6).
- Roetker, N. S., J. S. Pankow, J. Bressler, A. C. Morrison and E. Boerwinkle (2018). "Prospective Study of Epigenetic Age Acceleration and Incidence of Cardiovascular Disease Outcomes in the ARIC Study (Atherosclerosis Risk in Communities)." Circ Genom Precis Med **11**(3): e001937.
- Ryan, J., J. Wrigglesworth, J. Loong, P. D. Fransquet and R. L. Woods (2019). "A systematic review and meta-analysis of environmental, lifestyle and health factors associated with DNA methylation age." J Gerontol A Biol Sci Med Sci.

- Simons, R. L., M. K. Lei, S. R. Beach, R. A. Philibert, C. E. Cutrona, F. X. Gibbons and A. Barr (2016). "Economic hardship and biological weathering: The epigenetics of aging in a U.S. sample of black women." Soc Sci Med **150**: 192-200.
- Spieker, J., V. M. Vetter, J. Drewelies, D. Spira, E. Steinhagen-Thiessen, V. Regitz-Zagrosek, N. Buchmann and I. Demuth (2022). "Diabetes Type 2 in the Berlin Aging Study II: Prevalence, Incidence and Severity Over up to Ten Years of Follow-up."
- Spinelli, R., L. Parrillo, M. Longo, P. Florese, A. Desiderio, F. Zatterale, C. Miele, G. A. Raciti and F. Beguinot (2020). "Molecular basis of ageing in chronic metabolic diseases." J Endocrinol Invest **43**(10): 1373-1389.
- Sud, M. S., A.; Chu, A.; Austin, P. C.; Anderson, T. J.; Naimark, D. M. J.; Farkouh, M. E.; Douglas, S.L.; Roifman, I.; Thanassoulis, G. (2022). "Population-Based Recalibration of the Framingham Risk Score and Pooled Cohort Equations." Journal of the American College of Cardiology **80**(14): 1330-1342.
- Topolski, T. D. L., J.; Patrick, D.L.; Williams, B.; Walwick, J.; Patrick, M.B. and (2006). "The Rapid Assessment of Physical Activity (RAPA) Among Older Adults." Preventing chronic disease **3**.
- Truthmann, J., M. A. Busch, C. Scheidt-Nave, G. B. Mensink, A. Gosswald, M. Endres and H. Neuhauser (2015). "Modifiable cardiovascular risk factors in adults aged 40-79 years in Germany with and without prior coronary heart disease or stroke." BMC Public Health **15**: 701.
- Vetter, V. M., C. H. Kalies, Y. Sommerer, L. Bertram and I. Demuth (2021). "Seven-CpG DNA Methylation Age Determined by Single Nucleotide Primer Extension and Illumina's Infinium MethylationEPIC Array Provide Highly Comparable Results." Front Genet **12**: 759357.
- Vetter, V. M., A. Meyer, M. Karbasiyan, E. Steinhagen-Thiessen, W. Hopfenmuller and I. Demuth (2019). "Epigenetic Clock and Relative Telomere Length Represent Largely Different Aspects of Aging in the Berlin Aging Study II (BASE-II)." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **74**(1): 27-32.
- Vetter, V. M., D. Spira, V. L. Banszerus and I. Demuth (2020). "Epigenetic Clock and Leukocyte Telomere Length Are Associated with Vitamin D Status but not with Functional Assessments and Frailty in the Berlin Aging Study II." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **75**(11): 2056-2063.
- Vidal-Bralo, L., Y. Lopez-Golan and A. Gonzalez (2016). "Simplified Assay for Epigenetic Age Estimation in Whole Blood of Adults." Front Genet **7**: 126.
- Vidal-Bralo, L., Y. Lopez-Golan and A. Gonzalez (2017). "Corrigendum: Simplified Assay for Epigenetic Age Estimation in Whole Blood of Adults." Front Genet **8**: 51.
- Yang, Q., B. Zhang, P. Deng, L. Chen, J. R. Wang and D. S. Fan (2015). "Assessing Cardiovascular Health Using Life's Simple 7 in a Chinese Population Undergoing Stroke Prevention." Chin Med J (Engl) **128**(18): 2450-2456.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elisa Kubala, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Assoziation von kardiovaskulärer Gesundheit und einer 7-CpG epigenetischen Uhr in der Berliner Altersstudie II“

„Association of cardiovascular health with a 7-CpG epigenetic clock in the Berlin Aging Study II“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Elisa Kubala hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Elisa Lemke, Valentin Max Vetter, Nora Berger, Verena Laura Banszerus, Maximilian König, Ilja Demuth: “Cardiovascular health is associated with the epigenetic clock in the Berlin Aging Study II (BASE-II)”, *Mechanisms of Ageing and Development*, 01/2022.

Beitrag im Einzelnen:

Die Promovendin, Elisa Kubala, entwickelte auf Grundlage einer umfangreichen Literaturrecherche und zusammen mit Dr. Maximilian König und Prof. Dr. Ilja Demuth die Fragestellung und das Konzept der vorliegenden Arbeit. Die statistische Auswertung der Studiendaten, Erstellung aller Tabellen, Zusammenstellung der Daten für Abbildungen und die inhaltliche Auswertung der Literatur erfolgte durch die Promovendin weitgehend selbstständig und im Austausch mit den Koautoren. Das Manuskript wurde von Elisa Kubala (erster Entwurf) gemeinsam mit Dr. Maximilian König und Prof. Dr. Ilja Demuth verfasst. Frau Kubala beteiligte sich aktiv an der Datenerhebung der Folgeuntersuchungen von BASE-II im Rahmen der GendAge-Studie. Dies beinhaltete 1:1-Interviews und die Durchführung verschiedener medizinischer Testverfahren (incl. Dateneingabe).

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions:
 SCIE,SSCI Selected Categories: **“GERIATRICS and GERONTOLOGY”** Se-
 lected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 53 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle	5,908	12.910	0.009440
2	AGEING RESEARCH REVIEWS	10,264	10.895	0.013510
3	AGE AND AGEING	17,130	10.668	0.016810
4	AGING CELL	13,890	9.304	0.017950
5	GeroScience	1,597	7.713	0.002430
6	Aging and Disease	4,050	6.745	0.005350
7	Immunity & Ageing	1,468	6.400	0.001750
8	JOURNALS OF GERONTOLOGY SERIES A-BIOLOGICAL SCIENCES AND MEDICAL SCIENCES	26,686	6.053	0.020770
9	Frontiers in Aging Neuroscience	13,654	5.750	0.025540
10	Aging-US	13,864	5.682	0.019820
11	JOURNAL OF THE AMERICAN GERIATRICS SOCIETY	42,003	5.562	0.032990
12	MECHANISMS OF AGEING AND DEVELOPMENT	7,302	5.432	0.004510
13	GERONTOLOGY	5,721	5.140	0.005220
14	NEUROBIOLOGY OF AGING	27,226	4.673	0.026480
15	Journal of the American Medical Directors Association	13,307	4.669	0.018730

Druckexemplar der Originalpublikation

Mechanisms of Ageing and Development 201 (2022) 111616



Contents lists available at ScienceDirect

Mechanisms of Ageing and Development

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mechagedev



Cardiovascular health is associated with the epigenetic clock in the Berlin Aging Study II (BASE-II)

Elisa Lemke^a, Valentin Max Vetter^{a,b}, Nora Berger^a, Verena Laura Banszerus^a, Maximilian König^{a,1}, Ilja Demuth^{a,c,*}

^a Charité – Universitätsmedizin Berlin, Department of Endocrinology and Metabolic Diseases (including Division of Lipid Metabolism), Biology of Aging Working Group, Augustenburger Platz 1, 13353, Berlin, Germany

^b Department of Psychology, Humboldt University Berlin, Berlin, Germany

^c Berlin Institute of Health at Charité – Universitätsmedizin Berlin, BCRT - Berlin Institute of Health Center for Regenerative Therapies, Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Epigenetic clock
DNA methylation (DNAm) age
DNAm age acceleration
Berlin Aging Study II (BASE-II)
Life's simple 7 (LS7)
Framingham Risk Score

ABSTRACT

The epigenetic clock parameter DNAm age acceleration is a promising biomarker of aging. We have recently described an epigenetic clock based on only seven cytosine-phosphate-guanine sites, which is highly associated with chronological age. The aim of this study was to examine this epigenetic clock with respect to its relationship with cardiovascular health (CVH) in older adults.

We used data from the Berlin Aging Study II (BASE-II; 1,671 participants; 68.8 ± 3.7 years old). CVH was operationalized using two different CVH scores, the Framingham Risk Score (FRS), and the Life's simple 7 (LS7). To adjust for potential confounding, e.g. by sex, we performed regression analyses.

The LS7 score was higher, i.e. more favorable, in woman than in men (8.8 ± 2 vs. 8.2 ± 2 , $p < 0.001$). DNAm age acceleration was associated with the FRS ($\beta = 0.122$, $p = 0.028$) and with the LS7 ($\beta = -0.804$, $p = 0.032$). In more detail, physical activity ($\beta = -0.461$, $p = 0.05$), HDL-cholesterol ($\beta = 0.343$, $p = 0.03$) and total cholesterol ($\beta = -0.364$, $p = 0.002$) were associated with epigenetic age acceleration. We present evidence suggesting that better CVH is associated with decelerated biological aging measured by the epigenetic clock.

1. Introduction

Age is the paramount risk factor for cardiovascular disease. However, biological ageing occurs at different rates in different persons (Ferrucci et al., 2020). Therefore, chronological age is not a perfectly adequate marker of individual biological aging. Biomarkers of aging are required to determine an individual's biological age and to better understand aging processes. Furthermore, accurate biomarkers of aging are important to measure the success of new anti-aging and regenerative medical interventions (Horvath and Raj, 2018). A promising biomarker is epigenetic age, i.e. the DNA methylation age (DNAm age). Epigenetic clocks estimate age with high accuracy on the basis of DNA methylation fractions (Horvath and Raj, 2018). DNAm age is computed by the DNA

methylation level of a specified number of cytosine-phosphate-guanine nucleotides, selected by a stepwise penalized regression analysis (elastic net or lasso) (Hui and Hastie, 2005). Many different epigenetic clocks, using different selections and numbers of cytosine-phosphate-guanine sites (CpGs), like the original Horvath clock with 353 CpGs and the Hannum clock with 71 CpGs, have been described (Horvath, 2013; Hannum et al., 2013).

Tightly linked to DNAm age, DNAm age acceleration represents the deviation of DNAm age from the chronological age. An individual's DNAm age may be higher or lower than its chronological age, resulting in a positive or negative value for the DNAm age acceleration (Horvath and Raj, 2018). A negative DNAm age acceleration indicates a slower epigenetic aging rate, whereas a positive DNAm age acceleration reflects

Abbreviations: CpGs, cytosine-phosphate-guanine sites; BASE- II, Berlin Aging study II; DNAm, DNA methylation; LS7, Life's simple 7 score; FRS, Framingham Risk Score; CVH, cardiovascular health; EEAA, extrinsic epigenetic age acceleration; IEAA, intrinsic epigenetic age acceleration; HbA1c, glycosylated hemoglobin, type A1C; Total-c, total cholesterol; HDL-c, high density lipoprotein cholesterol; BP, blood pressure; BMI, body mass index.

* Corresponding author at: Charité - Universitätsmedizin Berlin, Lipid Clinic at the Interdisciplinary Metabolism Center, Biology of Aging Group, Augustenburger Platz 1, 13353, Berlin, Germany.

E-mail address: ilja.demuth@charite.de (I. Demuth).

¹ Joint last authors.

<https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111616>

Received 18 August 2021; Received in revised form 11 November 2021; Accepted 2 December 2021

Available online 5 December 2021

0047-6374/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

faster epigenetic aging. There are different methods to determine DNAm age acceleration (Horvath and Raj, 2018). A common approach is to calculate the residuals of a linear regression analysis of the DNAm age on chronological age, adjusted for leukocytes cell composition (Vetter et al., 2019), thus yielding the proportion of the epigenetic age, which cannot be explained by chronological age and leukocytes cell distribution. Consequently, DNAm age acceleration can be interpreted as an estimate of the pace of biological aging (Horvath and Raj, 2018).

Findings regarding the association between cardiovascular disease (CVD) and DNAm age acceleration are inconsistent. While Roetker et al. (2018), Banszerus et al. (2020), Lu et al. (2019) and Perna et al. (2016) found CVD to be associated with an accelerated DNAm age, Horvath et al. (2016), and Dugue et al. (2018) reported no association between DNAm age acceleration and incident CVD. Lind et al. found CVD to be associated with DNAm age acceleration according to Horvath's epigenetic clock, but not according to Hannum's clock (Lind et al., 2018). Furthermore, reports on the association of DNAm age acceleration with lifestyle factors and cardiovascular risk factors are inconsistent. Associations between DNAm age acceleration and cardiovascular risk factors, like hypertension (Lind et al., 2018; Quach et al., 2017; McCartney et al., 2018), diabetes (Roetker et al., 2018; Horvath et al., 2016; Quach et al., 2017), low high density lipoprotein (HDL) cholesterol (Roetker et al., 2018), obesity (Horvath et al., 2014; Li et al., 2019), increased BMI (Quach et al., 2017; Fiorito et al., 2019; Ryan et al., 2019; Nevalainen et al., 2017), and smoking (Roetker et al., 2018; Fiorito et al., 2019) have been described. Moreover, lower education (Fiorito et al., 2019; Ryan et al., 2019), frailty (Breitling et al., 2016; Gale et al., 2018; McCrory et al., 2021), unhealthy diet (Quach et al., 2017), insufficient levels of Vitamin D (Vetter et al., 2020) and low physical activity (Roetker et al., 2018; Quach et al., 2017; Fiorito et al., 2019; McCrory et al., 2021) have been associated with accelerated DNAm age. Though, there were other studies, which found no association between DNAm age acceleration and cardiovascular risk factors, e.g. hypertension (for the Horvath clock estimate) (McCartney et al., 2018), unhealthy diet (Dugue et al., 2018; Simons et al., 2016) physical inactivity (Dugue et al., 2018; Simons et al., 2016). Also, a meta-analysis by Ryan et al. (2019) found no association between DNAm age acceleration and smoking.

Here we examined the association between DNAm age acceleration measured by the 7-CpG epigenetic clock and cardiovascular health, using the Life's simple 7 (LS7) and the Framingham risk score (FRS) to operationalize CVH. The FRS is based on age, sex, systolic blood pressure, HDL cholesterol, total cholesterol, and diabetes mellitus to estimate the ten-year cardiovascular risk (D'Agostino et al., 2008), and has been previously computed for the BASE-II cohort by Berger et al. (Berger, 2019). The LS7 was developed by the American Heart Association (AHA) in 2010 (Lloyd-Jones et al., 2010). This score takes the following seven items into account: smoking, body mass index (BMI), physical activity, diet, blood pressure, glucose and total cholesterol. Different studies have shown that a LS7 score in the optimal range (ranging from 10 to 14), is associated with a lower risk of cardiovascular disease (Peng and Wang, 2017; Ogunmoroti et al., 2017). While the LS7 is a lifestyle score and includes only modifiable factors, the FRS is a clinical risk prognosis instrument, which also includes the non-modifiable factors age and sex.

We hypothesized that more favorable results in the LS7 and FRS scores are associated with a lower biological age, estimated by DNAm age acceleration. Moreover, we hypothesized that the LS7 maybe associated more strongly with DNAm age acceleration than the FRS, because it includes physical activity and diet, which are believed to strongly impact epigenetic aging (Roetker et al., 2018; Quach et al., 2017; Fiorito et al., 2019; Levine et al., 2018).

2. Materials and methods

2.1. The Berlin Aging Study II

The aim of the multidisciplinary Berlin Aging Study II (BASE-II) is to explore factors impacting healthy aging positively and negatively. Between 2009 and 2014 the medical examination of 2,171 residents of the greater Berlin metropolitan area (~75 % aged 60–84 years, and ~25 % aged 20–37 years) was conducted. For the current analysis, we only used data from the older group of participants aged 60 and over (N = 1,671).

Participants were included after providing written informed consent. BASE-II was approved by the Ethics Committee of the Charité-Universitätsmedizin Berlin, approval number EA2/029/09. During the two-day medical investigation, the objective and subjective health of the participants was assessed. For further details on the BASE-II study, refer to Bertram et al., Demuth et al. and Gerstorf et al. (Demuth et al., 2019; Bertram et al., 2014; Gerstorf et al., 2016).

2.2. Life's simple 7 (LS7)

We calculated the Life's simple 7 according to the American Heart Association (AHA) (Lloyd-Jones et al., 2010) with minor adaptations (Konig et al., 2018). Accordingly, we adjusted the measurement of diet (see below) and physical activity. We used glycosylated hemoglobin, type A1C (=HbA1c) instead of fasting plasma glucose. The score used in this study includes the following items: BMI, systolic and diastolic blood pressure, HbA1c, total cholesterol, smoking, physical activity and diet. The items were structured in the following way: poor results (0 points), intermediate results (1 point) and ideal results (2 points), resulting in a total score ranging between 0–14 points. The total score was categorized into three groups reflecting the degree of cardiovascular health (CVH): inadequate (0–4 points), average (5–9 points), and optimal (10–14 points) (Table 2).

Body weight was measured in kg with a precision limited to one decimal digit, and height was determined to the nearest 0.1 cm by using an electronic weighing and measuring station (seca 764, seca, Hamburg, Germany). The BMI was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared. The blood pressure was measured in a seating position on both arms with an electronic sphygmomanometer (bosomedicus memory, Jung Willingen, Germany). The mean of the two measurements was used in the analysis. The smoking status (never or quit >12 months ago, quit <12 months ago or current smoker) and the medication were assessed by a study physician. The physical activity item was quantified according to the Baecke physical activity questionnaire (Baecke et al., 1982). The physical activity item was categorized into never/seldom (0 points), sometimes (1 point) and often/always (2 points). Finally, the healthy diet item was divided into 6 components:

- 1 fruits \geq 1 serving per day,
- 2 vegetables \geq 1 serving per day,
- 3 fish \geq 2 servings per week,
- 4 sugar sweetened beverages \leq 1 per week,
- 5 processed meat \leq 1.5 servings per week,
- 6 unprocessed red meat \leq 1.5 servings per week.

The applicability of five to six components was defined as *ideal* healthy diet (2 points), three to four components were considered as *intermediate* (1 point), and zero to two components were rated as *poor* (0 points). The diet item was retrieved from data collected by the EPIC-food frequency questionnaire (Nothlings et al., 2007). The original diet score by the AHA for the LS7 included following items: fiber-rich whole

grains, sodium intake, saturated fat intake and the intake of nuts, legumes, and seeds, but does not include the intake of unprocessed red meats.

2.3. Framingham Risk Score (FRS)

The current Framingham Risk Score was published 2008 by D'Agostino et al. (2008). This established cardiovascular risk score is based on longitudinal data from the population of Framingham (Massachusetts) (Anderson et al., 1991a, b). The score estimates the risk of developing cardiovascular disease (coronary heart disease, cerebrovascular events, peripheral artery disease and heart failure) within the upcoming decade. It is applicable for both sexes and for persons between 30 and 75 years. The score considers seven items: age, smoking, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, diabetes mellitus, and treated or non-treated systolic hypertension. Moreover, the score controls for biological sex by awarding different values for each component ranging from -3 to 12 points for women and -2 to 15 points for men. The final sum of added points from the different categories defines the cardiovascular disease risk within the next ten years in percent. For women a sum of ≤ -2 points corresponds to the lowest cardiovascular risk of $<1\%$ and a sum of ≥ 21 points implies a cardiovascular risk of $>30\%$. For men a sum of ≤ -3 points corresponds to the lowest cardiovascular risk of $<1\%$ and a sum of ≥ 18 points corresponds to the highest cardiovascular risk of $>30\%$. The FRSs for the BASE-II dataset investigated here, were previously reported (Berger, 2019).

2.4. DNA methylation age and DNAm age acceleration

The epigenetic clock parameters, DNAm age and DNAm age acceleration, were determined in our laboratory (Vetter et al., 2019). Briefly, we employed a slightly adapted version of the DNA methylation protocol from Vidal-Bralo et al. (2016, 2017) to determine the methylation fraction at eight CpG sites. After a stepwise multiple linear regression analysis, one CpG site (cg10917602) was excluded from the DNAm age calculation, because it did not improve the model of chronological age prediction, resulting in a seven-CpG epigenetic clock (Vetter et al., 2019).

We defined DNAm age acceleration as the proportion of the DNAm age, which is not explained by the chronological age or the leukocytes cell distribution. Therefore, the DNAm age acceleration was calculated as the residual from a linear regression analysis of DNAm age on chronological age and leukocyte cell distribution (monocytes, lymphocytes, neutrophils and eosinophils) (Vetter et al., 2019). The DNAm age acceleration calculated here employs a slightly modified version of the intrinsic epigenetic age acceleration (IEAA) proposed by Quach et al. (Vetter et al., 2019; Quach et al., 2017). In brief, individuals with a higher epigenetic age than chronological age have a positive value for DNAm age acceleration, whereas persons whose epigenetic age is lower than their chronological age, have a negative value for DNAm age acceleration (Horvath and Raj, 2018).

2.5. Statistical analysis

All statistical calculations were conducted using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. (IBM Corp., Armonk, USA). All figures were created with GraphPad Prism Version 8.2.1 (Graphpad Software Inc., San Diego, USA). All participants with missing values for one of the LS7 metrics, one of the FRS components, DNAm age, or for DNAm age acceleration were excluded (Fig. S1). For 11 % of the total sample the LS7 could not be calculated due to missing data. We have, however, no reason to assume that participants excluded from the analyses for this reason differed significantly from the final sample studied here. To assess differences in the distribution of normally distributed variables, the *t*-test for independent samples was conducted, and the χ^2 -test was used where appropriate. For all calculations including the LS7 score we

used the three LS7 categories: optimal (10–14 points), average (5–9 points), and inadequate (0–4 points). For better visualization, figures including the LS7 (Figs. S3/S4) were generated using the LS7 points (0–14). For both the analyses and the histogram (Fig. S2) Framingham Risk Score (FRS) sumpoints were used. To study the relationship between the two scores on the one hand and DNAm age acceleration on the other hand, we first conducted Spearman Rho correlation analyses. For the correlations between the metric cardiovascular risk factors and the epigenetic clock parameters, we calculated the Pearson correlation coefficient. Subsequently, we performed linear regression analyses with DNAm age acceleration as the dependent variable and the LS7 score as the independent variable with adjustment for sex. We did not adjust for chronological age, because the correlations between chronological age and the LS7 ($r = 0.007$, $N = 1396$) and DNAm age acceleration ($r = -0.045$, $N = 1395$) were marginal, and conceptually chronological age cannot be a confounder in the relationship between CVH and DNAm age acceleration. We did not adjust for sex and chronological age in the linear regression analyses with the FRS as explanatory variable, because both parameters are already included within the FRS. To assess interaction by sex, we also conducted linear regression analyses stratified by sex. Furthermore, to examine which item of the cardiovascular risk/health scores is driving the association between CVH and epigenetic age acceleration, we calculated a regression model (Table 4, Model 1), in which we regressed DNAm age acceleration on all LS7 items and, in this case, we used the pairwise deletion method for missing values. Similarly, we regressed DNAm age acceleration on the FRS components (Table 5). We used the pairwise deletion method, so we would not have to exclude cases from the multivariable regression analysis, because of one missing variable in the analysis.

3. Results

3.1. Characteristics of the studied BASE-II dataset

Data from 1,671 participants (51.6 % women) with a mean age of 68.8 ± 3.7 were available. Women were on average 0.5 years younger than men ($p = 0.004$), while their estimated epigenetic age was on average 2.7 years lower than the average men's epigenetic age ($p < 0.001$) (Table 1). There was also evidence of a difference between the DNAm age acceleration in women (-1.0 ± 6.6 years) and in men (1.0 ± 7.0 years) ($p < 0.001$) (Table 1).

One hundred and forty-eight participants (9.3 %) had evidence of CVD, including coronary artery disease, history of myocardial infarction, peripheral arterial disease, stroke or other diseases of brain supplying vessels. The prevalence of CVD was significantly lower in women than in men (7.5 % vs. 11.2 %, $p = 0.009$). The mean systolic blood pressure was comparable in men (144.5 ± 17.9 mmHg) and women (142.8 ± 19.6 mmHg, $p = 0.061$) (Table 1), while the prevalence of diabetes mellitus type II was significantly lower in women than in men (Table 1). The body mass index was significantly higher in men than in women (Table 1), while the HDL-cholesterol levels and total cholesterol levels were significantly higher in women than in men (Table 1). Overall, there were 170 (10.2 %) active smokers among the studied BASE-II participants.

3.2. Framingham Risk Score (FRS) and Life's simple 7 (LS7)

The FRS was normally distributed among men and women (Fig. S2). The mean FRS was significantly lower in women (14.8 ± 3.5 , $p < 0.001$) compared to men (16.8 ± 3.1) (Table 1, Fig. 1). One hundred and ninety-eight (26.7 %) women had a low predicted ten-year cardiovascular (CV) risk between 0% and 9%, whereas only 15 (2.2 %) men had a predicted CV risk within this range (Fig. 1). Nearly half of the women ($n = 367$, 49.5 %), but only 136 men (20.1 %) had a CV risk between 10 % and 19 %. One hundred and seventy-six women (23.8 %) and the majority of men ($n = 527$, 77.7 %) had a high CV risk (20 % and higher).

Table 1
Characteristics of the BASE-II participants.

Variables	Men	n	Women	n	Total	n	p-value
Chronological age (years)	69.0 ± 3.8	809	68.5 ± 3.6	862	68.8 ± 3.7	1671	0.004*
DNAm age (years)	67.6 ± 7.7	745	64.9 ± 7.3	726	66.3 ± 7.6	1471	<0.001*
DNAm age acceleration (years)	1.0 ± 7.0	707	-1.0 ± 6.6	688	0.02 ± 6.9	1395	<0.001*
LS7 sum points	8.2 ± 2.0	702	8.8 ± 2.0	694	8.5 ± 2.0	1396	<0.001*
Framingham Score points	16.8 ± 3.1	678	14.8 ± 3.5	741	15.7 ± 3.4	1419	<0.001*
BP systolic (mmHg)	144.5 ± 17.9	804	142.8 ± 19.6	857	143.7 ± 18.8	1661	0.061*
BP diastolic (mmHg)	84.2 ± 10.4	804	82.2 ± 11.2	857	83.1 ± 10.9	1661	<0.001*
Body mass index (kg/m ²)	27.2 ± 3.6	789	26.4 ± 4.7	789	26.83 ± 4.2	1578	<0.001*
HDL-cholesterol (mg/dl)	55.3 ± 14.4	778	69.4 ± 16.2	816	62.52 ± 16.9	1594	<0.001*
Total cholesterol (mg/dl)	203.2 ± 37.8	796	226.0 ± 38.6	835	214.9 ± 39.9	1631	<0.001*
HbA1c (%)	5.7 ± 0.6	783	5.6 ± 0.5	820	5.6 ± 0.6	1603	0.005*
Diabetes mellitus type 2	123 (15.8 %)	778	70 (8.6 %)	816	193 (12.1 %)	1594	<0.001**
Smoker***	96 (11.9 %)	804	74 (8.6 %)	856	170 (10.2 %)	1660	0.027**
BP treatment	368 (47.3 %)	778	343 (42.0 %)	816	711 (44.6 %)	1594	0.034**

BP = blood pressure, HDL = high density lipoprotein, LS7 = Life's simple 7, DNAm age = DNA methylation age, HbA1c = glycosylated hemoglobin type A1c.

* t-test for independent samples.

** χ^2 -test.

*** Current smoking or stopped smoking <12 months ago.

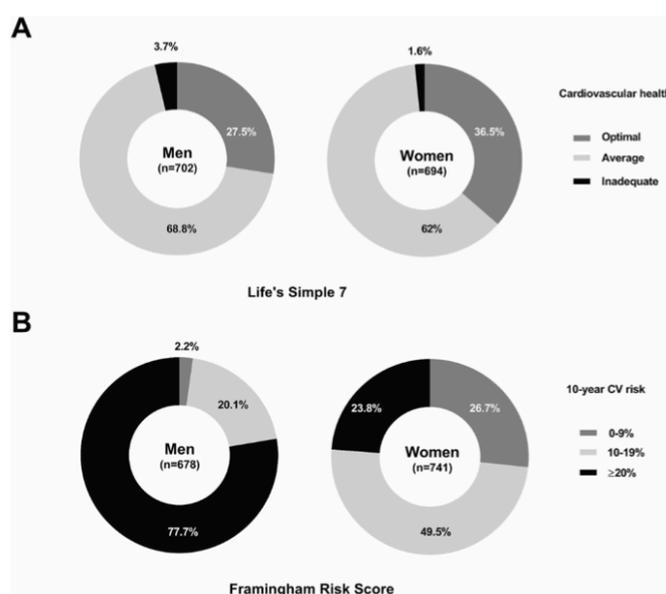


Fig. 1. Cardiovascular health and risk in men and women of the BASE-II cohort.

A) Percentage of men and women meeting the criteria for inadequate (black), average (light grey) or optimal (medium grey) cardiovascular health (CVH), according to the concept of the Life's Simple 7.

B) Percentage of men and women having a ten year cardiovascular risk of 0–9 % (medium grey), 10–19 % (light grey) and higher than 20 % (black).

The LS7 was normally distributed among the participants (Fig. S3). On average women had a higher, i.e. more favorable, LS7 score (8.8 ± 2.0) than men (8.2 ± 2.0 , $p < 0.001$, Table 1). Two hundred and fifty-three women (36.5 %) and 193 men (27.5 %) were in the optimal range (Table 2, Fig. 1). The majority of both men ($n = 483$, 68.8 %) and women ($n = 430$, 62 %) were categorized in the average range. The CVH of 11 women (1.6 %) and 26 men (3.7 %) was classified as inadequate. An overview of the classification of the participants with respect to the LS7 categories is shown in Table 2.

3.3. Correlations between the cardiovascular scores and DNAm age acceleration

We found the LS7 to be weakly and inversely correlated with DNAm age acceleration ($r = -0.078$, $N = 1243$, Fig. S4, Table S1). The FRS was likewise weakly correlated with DNAm age acceleration ($r = 0.060$, $N =$

1232, Fig. S5, Table S1). Also in the sex-stratified analyses, there was very weak evidence of a correlation between the FRS and DNAm age acceleration among men ($r = -0.049$, $N = 612$, Table S2) and weak evidence for women ($r = 0.084$, $N = 620$, Table S3). We also found weak correlations between the LS7 and the epigenetic age acceleration for men ($r = -0.076$, $N = 633$, Table S2) and very weak correlations for women ($r = -0.049$, $N = 610$, Table S3). The LS7 score and the FRS were moderately correlated ($r = -0.473$, $N = 1240$). Chronological age was only marginally correlated with the LS7 ($r = 0.007$, $N = 1396$) and with DNAm age acceleration ($r = -0.045$, $N = 1395$). For further information concerning correlations between cardiovascular risk factors, LS7 items and the epigenetic clock parameters see Table S1.

Table 2
The Life's simple 7 in BASE-II (N = 1396).

Life's simple 7 (LS7)	Score	Relative frequencies
Blood pressure, mmHg		
<120/80, unmedicated	2	4.2 %
120–139/80–89 or treated to goal	1	37.4 %
>140/90	0	58.4 %
Total serum cholesterol, mg/dL		
<200 mg/dL, unmedicated	2	35.7 %
200–239 mg/dL or treated to <200 mg/dL	1	38.0 %
>240 mg/dL	0	26.3 %
Glycosylated Hemoglobin A1C, %		
<5.7 %, unmedicated	2	60.6 %
5.7–6.4 or treated to <5.7 %	1	32.1 %
>6.4 %	0	7.3 %
Smoking		
Never or quit >12 months ago	2	89.8 %
quit <12 months	1	0.9 %
Current smoker	0	9.3 %
Body mass index, kg/m²		
<25	2	36.1 %
25–29.9	1	45.4 %
> =30	0	18.6 %
Physical activity		
often/always	2	58.3 %
sometimes	1	18.5 %
seldom/never	0	23.3 %
Healthy diet		
Healthy diet score 5–6/6	2	23.2 %
Healthy diet score 3–4/6	1	57.4 %
Healthy diet score 0–2/6	0	19.4 %
Cardiovascular health		
Optimal	10–14	31.9 %
Average	5–9	65.4 %
Inadequate	0–4	2.7 %
Mean and standard deviation		8.47 ± 2
Median		9.00
Minimum		2.00
Maximum		14.00

Table 3
Linear Regression analysis of DNAm age acceleration on Life's simple 7 and Framingham Risk Score.

	β	SE	p-Value	R ² *
Linear regression analyses of DNAm age acceleration on LS7				
Model 1	-0.984	0.375	0.009	0.005
Model 2	-0.804	0.374	0.032	0.020
Linear regression analyses of DNAm age acceleration on FRS				
Total sample	0.122	0.055	0.028	0.003
Women	0.138	0.074	0.064	0.004
Men	-0.079	0.091	0.385	0.000

* R² is indicated as adjusted R², Adjustment: Model 1: none, Model 2: sex, sample size for linear regression analyses of DNAm age acceleration on FRS: full sample n = 1232, women: n = 620, men: n = 612.

3.4. Linear regression analysis of DNAm age acceleration on the Life's simple 7 score and the Life's simple 7 score items

To further explore the association between the LS7 score and DNAm age acceleration and to adjust for potential confounding by sex we calculated linear regression models (Table 3). According to the unadjusted model there was evidence that the LS7 score was inversely associated with DNAm age acceleration (Model 1: $\beta = -0.984$, $p = 0.009$), an

association which persisted after adjustment for sex (Table 3, Model 1–2). Per one category increase in the LS7, DNAm age acceleration decreased by 0.8 years, e.g. from participants with only average CVH to participants with optimal CVH (Table 3, Model 2). There was no evidence of effect modification by sex in the association between the LS7 and DNAm age acceleration.

In order to examine which items of the LS7 score were driving the association between the LS7 and DNAm age acceleration, we computed a multivariable linear regression analysis of the DNAm age acceleration on all single LS7 components (diet, activity, BMI, HbA1c, cholesterol, smoking status, blood pressure), without (Table 4, Model 1) and with (Table 4, Model 2) adjustment for sex. This revealed that the physical activity component of the LS7 was most strongly associated with DNAm age acceleration (Table 4, Model 2: $\beta = -0.461$, $p = 0.05$).

3.5. Linear regression analysis of epigenetic age acceleration on the Framingham Risk score and the Framingham Risk score items

According to linear regression analysis, the Framingham risk score (FRS) was significantly associated with DNAm age acceleration ($\beta = 0.122$, $p = 0.028$). Per ten points lower FRS participants showed on average a one year decelerated epigenetic age acceleration (Table 3). We also tested interaction between FRS and sex by including an interaction term. The likelihood-ratio test provided no evidence of important interaction between the effects of FRS and sex on DNAm age acceleration ($p = 0.685$).

Again, we were interested to see which of the score's items were driving the detected association with the FRS. DNAm age acceleration was positively associated with the HDL-cholesterol component ($\beta = 0.343$, $p = 0.030$, Table 5) and negatively associated with the total cholesterol item ($\beta = -0.364$, $p = 0.002$, Table 5). That means that there was evidence that the HDL-cholesterol component was in parts driving the positive association between DNAm age acceleration and the FRS.

4. Discussion

The main finding of this study was that individuals with more favorable results in two different scores reflecting cardiovascular health, the Framingham Risk Score and the Life's simple 7, showed lower DNAm age acceleration compared to participants with less favorable score results.

4.1. CVH scores and DNAm age acceleration

Our finding that CVH is associated with DNAm age acceleration is in

Table 4
Multivariable Linear Regression analysis of DNAm age acceleration on LS7 components.

Covariates	DNAm age acceleration			DNAm age acceleration		
	Model 1**			Model 2***		
	β	SE	p-Value	β	SE	p-Value
Diet*	0.231	0.300	0.440	0.590	0.305	0.053
Activity*	-0.566	0.236	0.016	-0.461	0.235	0.050
BMI*	-0.454	0.279	0.104	-0.411	0.276	0.138
HbA1c*	-0.177	0.316	0.575	-0.123	0.313	0.695
Total-C*	0.151	0.249	0.545	-0.182	0.255	0.477
Smoking*	-0.024	0.334	0.943	0.061	0.331	0.853
BP*	-0.503	0.340	0.139	-0.312	0.339	0.357
sex	-	-	-	-2.090	0.414	<0.001

BMI = body mass index, Total-c: total cholesterol, BP = blood pressure, HbA1c = glycosylated hemoglobin, type A1C.

* LS7 items.

** Adjusted R² for Model 1: 0.006.

*** Adjusted R² for Model 2: 0.023.

Table 5
Multivariable Linear Regression analysis of DNAm age acceleration on the FRS items.

DNAm Age Acceleration*			
Covariates (FRS items)	β	SE	p- Value
Age	0.090	0.120	0.455
HDL-C	0.343	0.158	0.030
Total-C	-0.364	0.116	0.002
Diabetes mellitus	0.117	0.202	0.561
Systolic BP	0.082	0.090	0.362
Smoking	-0.149	0.186	0.422

Total-C = total cholesterol; HDL-C = High density lipoprotein cholesterol; BP = blood pressure.

* Adjusted R^2 is 0.011.

line with previous studies, which have investigated the association between cardiovascular risk factors and epigenetic clocks (Roetker et al., 2018; Horvath et al., 2016; Quach et al., 2017; Fiorito et al., 2019; Ryan et al., 2019; Nevalainen et al., 2017; Levine et al., 2018). Several studies found an association between the incidence and prevalence of CVD (Roetker et al., 2018; Lu et al., 2019), CVD mortality (Perna et al., 2016) and DNAm age acceleration. Lind et al., found CVD to be associated with Horvath's, but not with Hannum's DNAm age acceleration (Lind et al., 2018). Furthermore, some studies found no evidence for an association between incidence of CVD and DNAm age acceleration (Horvath et al., 2016; Dugue et al., 2018). Likewise, a number of studies did not find associations between DNAm age acceleration and cardiovascular risk or protective factors such as hypertension (McCartney et al., 2018), healthy diet (Dugue et al., 2018; Simons et al., 2016), total cholesterol (Roetker et al., 2018) and smoking (e.g. meta-analysis by Ryan et al. Ryan et al. (2019)).

Therefore, we and others suppose that some epigenetic clocks, like the one with seven CpG sites employed here, may reflect CVH and single indicators of CVH, such as physical activity, HDL cholesterol and total cholesterol, better than others (Liu et al., 2020).

4.2. Differences between the sexes

As expected, according to both the LS7 and the FRS women had on average better CVH than men. Likewise, women's estimated epigenetic age was on average 2.7 years lower than men's. Furthermore, women had a two-year lower DNAm age acceleration than men. These results are consistent with findings made by Horvath et al. (2016) and replicate findings from the LipidCardio study, where a nearly identical epigenetic clock as in the current study was used (Banszerus et al., 2019). We did not find evidence of important effect modification in the association between the FRS and epigenetic age acceleration.

4.3. Physical activity and epigenetic age acceleration

We could show that the association of LS7 and DNAm age acceleration was mainly driven by the physical activity component (Table 4, Models 1 and 2). This result is comparable to the association between another epigenetic clock (DNAm PhenoAge age acceleration) and exercise reported by Levine et al. (N = 9926) and McCrory et al. (McCrory et al., 2021; Levine et al., 2018). Moreover, GrimAge age acceleration and PhenoAge age acceleration have been both shown to be associated with physical activity (according to the international physical activity questionnaire-short form) and walking speed (McCrory et al., 2021). Likewise, Quach et al. (N = 4173), and Roetker et al. (N = 2543) found associations between extrinsic epigenetic age acceleration (EEAA, a version of the Hannum clock estimate) and physical activity, while they could not show an association between physical activity and intrinsic epigenetic age acceleration (IEAA, a Horvath clock estimate) (Roetker

et al., 2018; Quach et al., 2017). Thus, again, the Hannum clock may reflect the relationship between physical activity and DNAm age acceleration better than the Horvath clock.

It should be mentioned that some studies did not find evidence of an association between DNAm age acceleration and physical activity (Banszerus et al., 2020; Dugue et al., 2018; Simons et al., 2016). A possible reason could be that they have used different assessment methods for physical activity e.g. the RAPA (Rapid assessment for physical activity) questionnaire (Banszerus et al., 2020), a metabolic equivalent for physical activity (Dugue et al., 2018) and a self-created physical activity score (Simons et al., 2016). Besides, the study by Simons et al. had a rather small sample size (N = 100) and therefore had low statistical power to detect an association (Simons et al., 2016).

4.4. HDL-cholesterol, total cholesterol and DNAm age acceleration

We found evidence that the HDL-cholesterol item of the FRS was associated with DNAm age acceleration (Table 5). Epigenetic aging was decelerated by 0.34 years in participants with higher HDL-cholesterol levels, e.g. between 50–59 mg/dl compared to participants with HDL-cholesterol levels between 40–49 mg/dl. This was in line with the observed association between HDL-cholesterol and epigenetic age acceleration (Hannum and Horvath clock estimate) reported by Levine et al. (2018) and Roetker et al. (2018). Also some other studies have reported significant correlations between HDL-cholesterol and epigenetic age acceleration (Quach et al., 2017; McCartney et al., 2018).

Further, the total cholesterol item of the FRS was negatively associated with DNAm age acceleration, i.e. that participants with total serum cholesterol levels of e.g. 240 mg/dl appeared to be aging epigenetically at a lower rate than participants with lower total cholesterol levels of 200 mg/dl. This finding is difficult to interpret without considering other lipid parameters, namely LDL-cholesterol and HDL-cholesterol, which both and in conjunction with other lipoproteins contribute to the measured total cholesterol. Indeed, the observed association between the total cholesterol item and DNAm age acceleration could be explained by the fact, that total cholesterol includes HDL-cholesterol and in the current study high HDL-cholesterol levels were associated with lower DNAm age acceleration. Furthermore, previous studies have suggested that higher LDL-cholesterol levels may be beneficial with respect to mortality and morbidity in older age. E.g. a systematic review including 19 cohort studies with 68,094 elderly people, found LDL-cholesterol levels to be inversely associated with mortality (Ravnskov et al., 2016). In addition, Maihofer et al. found higher LDL-cholesterol levels to be positively associated with intact mobility to the age of 90 years in 3567 women of the Women's Health Initiative Study (Maihofer et al., 2020). In contrast, some studies reported total cholesterol to be positively associated with IEAA (Quach et al., 2017; McCartney et al., 2018), while they did not find evidence of an association between total cholesterol and EEAA (Roetker et al., 2018; Quach et al., 2017; McCartney et al., 2018) or IEAA (Roetker et al., 2018).

5. Conclusions

In conclusion, our results provide evidence of a weak association of the epigenetic clock (DNAm age acceleration) with cardiovascular health in the BASE-II cohort. We were able to confirm our initial hypothesis that more favorable results in the Life's simple 7 (LS7) and the Framingham Risk Score (FRS) would be associated with a lower DNAm age acceleration. The DNAm age acceleration of participants with more favorable scores in the well-established instruments FRS and LS7 resulted to be lower compared to participants with less favorable score results. Moreover, we found our hypothesis that the LS7 maybe associated more strongly with DNAm age acceleration than the FRS because it includes physical activity and diet at least partially confirmed. Physical activity resulted to be the driving force in the association between

DNAm age acceleration and the Life's simple 7. As expected, women displayed more favorable results in the CVH scores and had significantly lower epigenetic age acceleration than men. The above findings add to the growing body of evidence supporting the epigenetic clock's potential as a biomarker of aging in the context of CVH and lifestyle factors.

Author contributions

E.L. computed the LS7 score, performed the statistical analysis, and wrote the original draft of the manuscript; V.M.V. generated the epigenetic clock data used in the current project; N. B. computed the Framingham Risk Score; V.L.B. validation; M.K. supervision and project administration. I.D. funding acquisition, conceptualization, methodology, project administration and supervision of the study; all authors contributed to revision and editing.

Funding

The BASE-II research project (Co-PIs are Lars Bertram, Ilja Demuth, Denis Gerstorf, Ulman Lindenberger, Graham Pawelec, Elisabeth Steinhagen-Thiessen, and Gert G. Wagner) is supported by the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF) under grant numbers #16SV5536K, #16SV5537, #16SV5538, #16SV5837, #01UW0808, 01GL1716A and 01GL1716B. Another source of funding is the Max Planck Institute for Human Development, Berlin, Germany. Additional contributions (e.g., equipment, logistics, personnel) are made from each of the other participating sites. This work was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant number DE 842/7-1)

Institutional review board statement

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Charité-Universitätsmedizin Berlin, approval number EA2/029/09.

Informed consent statement

Participants were included in the study after providing written informed consent.

Data availability statement

Due to concerns for participant privacy, data are available only upon reasonable request. External scientists may apply to the Steering Committee of BASE-II for data access. Please refer to the BASE-II website (<https://www.base2.mpg.de/7549/data-documentation>) for additional information.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111616>.

References

- Anderson, K.M., et al., 1991a. Cardiovascular disease risk profiles. *Am. Heart J.* 121 (1 Pt 2), 293–298.
- Anderson, K.M., et al., 1991b. An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation* 83 (1), 356–362.

- Baecke, J.A., Burema, J., Frijters, J.E., 1982. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 36 (5), 936–942.
- Banszerus, V.L., et al., 2019. Exploring the relationship of relative telomere length and the epigenetic clock in the LipidCardio cohort. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (12).
- Banszerus, V.L., et al., 2020. Evidence of Accelerated Epigenetic Aging in Patients Diagnosed with Coronary Artery Disease: Results of the LipidCardio Study medRxiv 2020.2002.2023.20026906.
- Berger, N.J., 2019. Sex differences in cardiovascular risk and control of cardiovascular risk factors in participants of the Berliner Altersstudie II dissertation. <https://doi.org/10.17169/refubium-25958>.
- Bertram, L., et al., 2014. Cohort profile: the Berlin Aging Study II (BASE-II). *Int. J. Epidemiol.* 43 (3), 703–712.
- Breitling, L.P., et al., 2016. Frailty is associated with the epigenetic clock but not with telomere length in a German cohort. *Clin. Epigenetics* 8, 21.
- D'Agostino Sr., R.B., et al., 2008. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* 117 (6), 743–753.
- Demuth, I., et al., 2019. Berlin Aging Study II (BASE-II). In: Gu, D., Dupre, M.E. (Eds.), *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–8.
- Dugue, P.A., et al., 2018. Association of DNA methylation-based biological age with health risk factors and overall and cause-specific mortality. *Am. J. Epidemiol.* 187 (3), 529–538.
- Ferrucci, L., et al., 2020. Measuring biological aging in humans: a quest. *Aging Cell* 19 (2) p. e13080.
- Florito, G., et al., 2019. Socioeconomic position, lifestyle habits and biomarkers of epigenetic aging: a multi-cohort analysis. *Aging (Albany NY)* 11 (7), 2045–2070.
- Gale, C.R., et al., 2018. DNA methylation and the epigenetic clock in relation to physical frailty in older people: the Lothian Birth Cohort 1936. *Clin. Epigenetics* 10 (1), 101.
- Gerstorf, D., et al., 2016. Editorial. *Gerontology* 62 (3), 311–315.
- Hannum, G., et al., 2013. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol. Cell* 49 (2), 359–367.
- Horvath, S., 2013. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 14 (10), 3156.
- Horvath, S., Raj, K., 2018. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat. Rev. Genet.* 19 (6), 371–384.
- Horvath, S., et al., 2014. Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (43), 15538–15543.
- Horvath, S., et al., 2016. An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex, and coronary heart disease. *Genome Biol.* 17 (1), 171.
- Hui, Z., Hastie, T., 2005. Regularization and variable selection via the elastic net. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.*
- König, M., et al., 2018. Historical trends in modifiable indicators of cardiovascular health and self-rated health among older adults: Cohort differences over 20 years between the Berlin Aging Study (BASE) and the Berlin Aging Study II (BASE-II). *PLoS One* 13 (1) p. e0191699.
- Lewne, M.E., et al., 2018. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)* 10 (4), 573–591.
- Li, C., et al., 2019. Association of obesity with DNA methylation age acceleration in African American mothers from the InterGEN study. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (17).
- Lind, L., et al., 2018. Methylation-based estimated biological age and cardiovascular disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 48 (2).
- Liu, Z., et al., 2020. Underlying features of epigenetic aging clocks in vivo and in vitro. *Aging Cell* 19 (10), e13229.
- Lloyd-Jones, D.M., et al., 2010. Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic impact goal through 2020 and beyond. *Circulation* 121 (4), 586–613.
- Lu, A.T., et al., 2019. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)* 11, 303–327.
- Maihofer, A.X., et al., 2020. Associations between serum levels of cholesterol and survival to age 90 in postmenopausal women. *J. Am. Geriatr. Soc.* 68 (2), 288–296.
- McCartney, D.L., et al., 2018. Investigating the relationship between DNA methylation age acceleration and risk factors for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* 10, 429–437.
- McCrorry, C., et al., 2021. GrimAge outperforms other epigenetic clocks in the prediction of age-related clinical phenotypes and all-cause mortality. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 76 (5), 741–749.
- Nevalainen, T., et al., 2017. Obesity accelerates epigenetic aging in middle-aged but not in elderly individuals. *Clin. Epigenetics* 9, 20.
- Nothlings, U., et al., 2007. Fitting portion sizes in a self-administered food frequency questionnaire. *J. Nutr.* 137 (12), 2781–2786.
- Ogunmoroti, O., et al., 2017. Life's simple 7 and incident heart failure: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc.* 6 (6).
- Peng, Y., Wang, Z., 2017. Association of Life's Simple 7 and presence of cardiovascular disease in general Australians. *Open Heart* 4 (2) p. e000622.
- Perna, L., et al., 2016. Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort. *Clin. Epigenetics* 8, 64.
- Quach, A.L., M. E. Toshiko Tanaka, T., Horvath, S., et al., 2017. Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors. *Aging (Albany NY)*.
- Ravnskov, U., et al., 2016. Lack of an association or an inverse association between low-density-lipoprotein cholesterol and mortality in the elderly: a systematic review. *BMJ Open* 6 (6).
- Roetker, N.S., et al., 2018. Prospective study of epigenetic age acceleration and incidence of cardiovascular disease outcomes in the ARIC study (Atherosclerosis risk in communities). *Circ. Genom. Precis. Med.* 11 (3) p. e001937.

E. Lemke et al.

- Ryan, J., et al., 2019. A systematic review and meta-analysis of environmental, lifestyle and health factors associated with DNA methylation age. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*
- Simons, R.L., et al., 2016. Economic hardship and biological weathering: the epigenetics of aging in a U.S. sample of black women. *Soc. Sci. Med.* 150, 192-200.
- Vetter, V.M., et al., 2019. Epigenetic clock and relative telomere length represent largely different aspects of aging in the Berlin Aging Study II (BASE-II). *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 74 (1), 27-32.

Mechanisms of Ageing and Development 201 (2022) 111616

- Vetter, V.M., et al., 2020. Epigenetic clock and leukocyte telomere length are associated with vitamin d status but not with functional assessments and frailty in the Berlin Aging Study II. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 75 (11), 2056-2063.
- Vidal-Bralo, L., Lopez-Golan, Y., Gonzalez, A., 2016. Simplified assay for epigenetic age estimation in whole blood of adults. *Front. Genet.* 7, 126.
- Vidal-Bralo, L., Lopez-Golan, Y., Gonzalez, A., 2017. Corrigendum: simplified assay for epigenetic age estimation in whole blood of adults. *Front. Genet.* 8, 51.

Supplementary Material der Originalpublikation: “Cardiovascular health is associated with the epigenetic clock in the Berlin Aging Study II (BASE-II)”

Supplementary Tables and Figures

Elisa Lemke¹, Valentin Max Vetter¹, Nora Berger¹, Verena Laura Banszerus¹, Maximilian König^{1*}, Ilja Demuth^{1,2*}

¹Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Department of Endocrinology and Metabolic Diseases (including Division of Lipid Metabolism), Biology of Aging working group, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

² Berlin Institute of Health at Charité – Universitätsmedizin Berlin, BCRT - Berlin Institute of Health Center for Regenerative Therapies, Berlin, Germany

*Joint last authors

Table S1: Correlations.

Variables		DNAm age	DNAm age acceleration
1. Framingham Score points	R^*	0.193	0.060
	n	1282	1232
2. LS7 Score	R^*	-0.062	-0.078
	n	1295	1243
3. chronological age	R^{**}	0.352	-0.045
	n	1471	1395
4. LS7-diet points	R^*	0.000	0.004
	n	1358	1287
5. LS7- physical activity points	R^*	-0.087	-0.071
	n	1427	1352
6. HbA 1c (%)	R^*	0.079	0.068
	n	1446	1393
7. total cholesterol	R^*	-0.037	-0.019
	n	1465	1395
8. BP_diastolic	R^*	-0.002	0.031
	n	1467	1391
9. BP_systolic	R^*	0.060*	0.03
	n	1467	1391
10. HDL- cholestesterol	R^*	-0.079	-0.104
	n	1435	1365

R^* = Spearman Rho correlation coefficient, n = case number, R^{**} = Pearson correlation coefficient, DNAm age= DNA methylation age, LS7= Life's simple 7, HbA1c= glycosylated hemoglobin, type A1C, BP= blood pressure, HDL= high density lipoprotein

Table S2: Correlations for men.

		1.	2.	3.	4.
1. Framingham Score points	<i>R</i>	1**	-0.397**	0.126**	-0.049**
	<i>n</i>	678	615	636	612
2. LS7 Score	<i>R</i>	-0.397**	1**	-0.062**	-0.076**
	<i>n</i>	615	702	658	633
3. DNAm age	<i>R</i>	0.126**	-0.062**	1*	0.900*
	<i>n</i>	636	658	745	707
4. DNAm age acceleration	<i>R</i>	-0.049**	-0.076**	0.900*	1*
	<i>n</i>	612	633	707	707

*Pearson correlation coefficient, ** Spearman-Rho correlation coefficient

Table S3: Correlations for women.

		1.	2.	3.	4.
1. Framingham Score points	<i>R</i>	1**	-0.532**	0.172**	0.084**
	<i>n</i>	741	625	646	620
2. LS7 Score	<i>R</i>	-0.532**	1**	-0.026**	-0.049**
	<i>n</i>	625	694	637	610
3. DNAm age	<i>R</i>	0.172**	-0.026**	1*	0.881*
	<i>n</i>	646	637	726	688
4. DNAm age acceleration	<i>R</i>	0.084**	-0.049**	0.881*	1*
	<i>n</i>	620	610	688	688

*Pearson correlation coefficient, ** Spearman-Rho correlation coefficient

Tables S4: Overview of Epigenetic clocks and their associations cited in the research article.
Table S4.1: Association with incidents of Cardiovascular disease.

Epigenetic clock	Number of CpG sites	Found association	No association	
First-generation clocks	Horvath clock → IEAA	353	(Lind et al. 2018) (Roetker et al. 2018) (Perna et al. 2016)	(Horvath et al. 2016)
	Hannum clock → EEAA	71	(Roetker et al. 2018) (Perna et al. 2016)	(Dugue et al. 2018) (Lind et al. 2018)
	7-CpG site clock → IEAA (modified Vidal-Bralo clock and modified IEAA by Quach et al.)	7	(Banszerus et al. 2020)	
Second-generation clocks = including DNAm correlates of morbidity and mortality by using clinical characteristics	Levine clock → DNAm PhenoAge acceleration	513		
	Lu clock → DNAm GrimAge acceleration	1030	(Lu et al. 2019)	

IEAA= Intrinsic epigenetic age acceleration, EEAA= Extrinsic epigenetic age acceleration

Table S4.2: Association with Physical activity.

Epigenetic clock	Number of CpG sites	Found association	No association	
First-generation clocks	Horvath clock → IEAA	353	(Fiorito et al. 2019)	(Quach 2017) (Roetker et al. 2018) (Dugue et al. 2018)
	Hannum clock → EEAA	71	(Quach 2017) (Roetker et al. 2018)	(Dugue et al. 2018) (Simons et al. 2016)
	7-CpG site clock → IEAA (modified Vidal-Bralo clock and modified IEAA by Quach et al.)	7	(Lemke et al. 2021)	(Banszerus et al. 2020)
Second-generation clocks	Levine clock → DNAm PhenoAge acceleration	513	(Levine et al. 2018) (McCrary et al. 2021)	
	DNAm GrimAge acceleration	1030	(McCrary et al. 2021) (Lu et al. 2019)	

IEAA= Intrinsic epigenetic age acceleration, EEAA= Extrinsic epigenetic age acceleration

Table S4.3: Association with HDL (high density lipoprotein)-cholesterol levels.

	Epigenetic clock	Number of CpG sites	Found association	No association
First-generation clocks	Horvath clock → IEAA	353	(Roetker et al. 2018) (Levine et al. 2018) (McCartney et al. 2018) (Quach 2017)	
	Hannum clock → EEAA	71	(Roetker et al. 2018) (Levine et al. 2018) (Quach 2017)	(McCartney et al. 2018)
	7-CpG site clock → IEAA (modified Vidal-Bralo clock and modified IEAA by Quach et al.)	7	(Lemke et al. 2021)	
Second-generation clocks	Levine clock → DNAm PhenoAge acceleration	513	(Levine et al. 2018)	
	Lu clock → DNAm GrimAge acceleration	1030	(Lu et al. 2019)	

IEAA= Intrinsic epigenetic age acceleration, EEAA= Extrinsic epigenetic age acceleration

Table S4.4: Association with total cholesterol levels.

	Epigenetic clock	Number of CpG sites	Found association	No association
First-generation clocks	Horvath clock → IEAA	353	(Quach 2017) (McCartney et al. 2018)	(Roetker et al. 2018)
	Hannum clock → EEAA	71		(Quach 2017) (Roetker et al. 2018)
	7-CpG site clock → IEAA (modified Vidal-Bralo clock and modified IEAA by Quach et al.)	7	(Lemke et al. 2021) →negatively correlated	
Second-generation clocks	Levine clock → DNAm PhenoAge acceleration	513	(Levine et al. 2018) →negatively correlated	
	Lu clock → DNAm GrimAge acceleration	1030		(Lu et al. 2019)

IEAA= Intrinsic epigenetic age acceleration, EEAA= Extrinsic epigenetic age acceleration

Figure S1. Flowchart of the samples included in the statistical analysis.

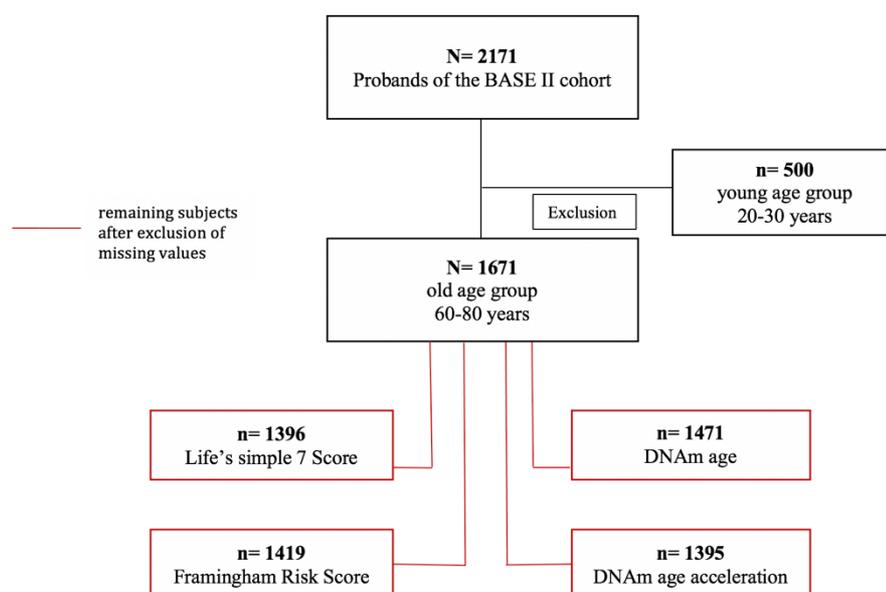


Figure S2. Histogram Framingham Risk Score (men and women).

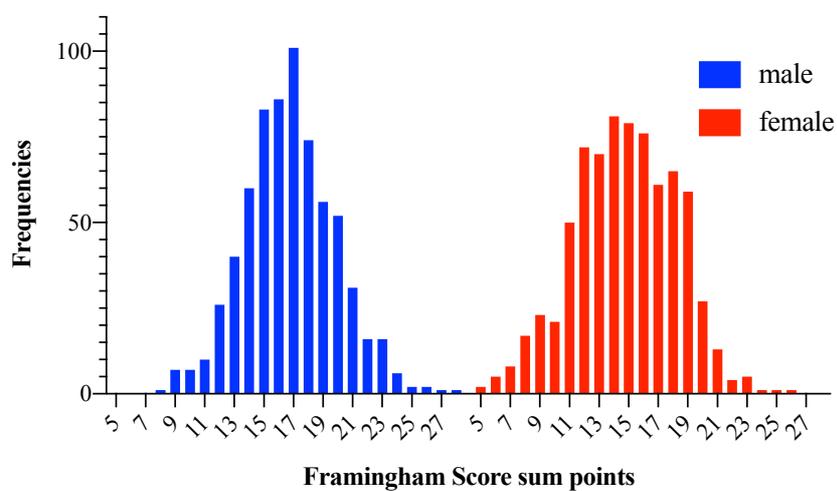
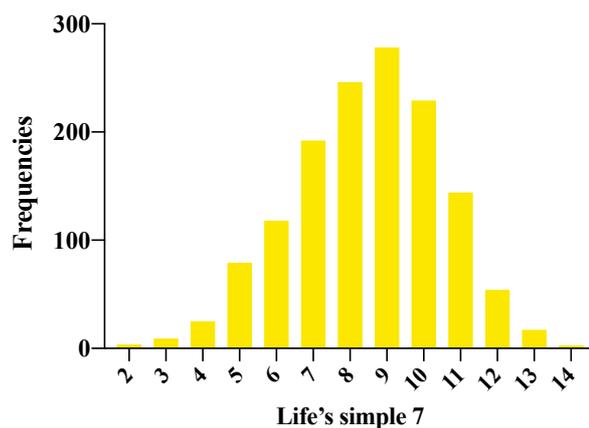
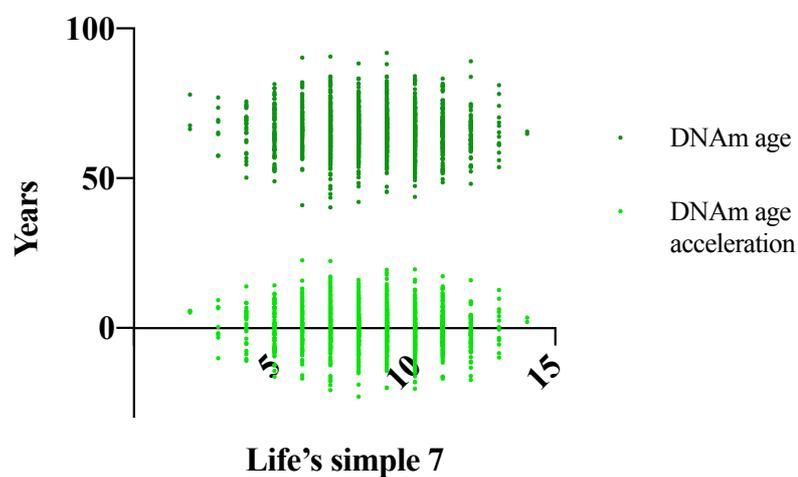
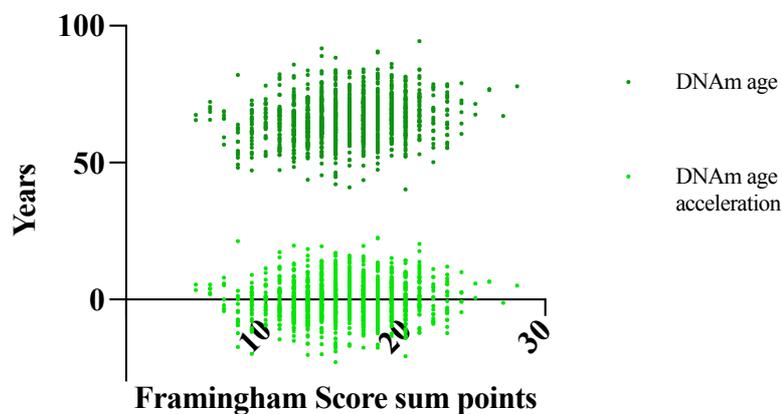


Figure S3. Histogram Life's simple 7.**Figure S4.** Scattered plot illustrating the linear correlations of DNAm age (dark green) and DNAm age acceleration (light green) with the Life's simple 7 (LS7).**Figure S5.** Scattered plot showing the linear correlations of DNAm age (dark green) and DNAm age acceleration (light green) with the Framingham Risk Score (FRS).

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Publikation 1: Elisa Lemke, Valentin Max Vetter, Nora Berger, Verena Laura Banszerus, Maximilian König, Ilja Demuth: “Cardiovascular health is associated with the epigenetic clock in the Berlin Aging Study II (BASE-II)”, *Mechanisms of Ageing and Development*, 01/2022.

Impact Faktor: 5,498

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Erstbetreuer Ilja Demuth und meinem Zweitbetreuer Maximilian König. Ohne die beiden wäre die Publikation und diese Dissertation insgesamt nicht möglich gewesen. Ich habe sehr viel Glück solche kompetenten Betreuer zu haben. Ich konnte in den letzten Jahren viel von Ihnen lernen. Bei Fragen waren sie immer ansprechbar und standen mit gutem Rat zur Seite. Insbesondere möchte ich mich bei Ilja Demuth für die Vergabe des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Ohne seine ständige Motivation, Inspiration und Hilfestellungen hätte ich diese Dissertationsarbeit nicht fertigstellen können.

Ich möchte mich außerdem bei meinen weiteren Ko-Autor*innen: Valentin Max Vetter, Nora Berger und Verena Banzerus bedanken, die mich ebenfalls durch meine Dissertation begleitet haben und mir mit vielen Hilfestellungen zur Seite standen. Ganz besonders möchte ich mich bei Valentin Vetter dafür bedanken, dass ich seine im Labor erhobenen Daten der epigenetischen Uhr für meine Arbeit verwenden durfte. Und bei Nora Berger, welche mir erlaubte ihren berechneten FRS von der Ersterhebung für meine Statistik zu verwenden.

Vielen Dank an meine Familie, Freunde und meinen Partner, die immer für mich da waren, mich stets motivierten und sich meine Probleme und Sorgen anhörten. Ohne sie hätte ich es nicht bis zum Ende geschafft.