Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
Campus Virchow Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Über den Einfluss von Gegenpulsationsverfahren, Laufbandtraining und PPARγ-Agonisten auf die leukozytäre Telomerbiologie und das arterielle Kollateralwachstum

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andreas Dieter Zietzer

aus Tübingen

Datum der Promotion: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung: 3
Abstrakt (Deutsch) 3
Abstract (English) 4
Einführung 5
Grundlagen der Arteriogenese und der Telomerbiologie 5
Die ISRT-Studien 6
Der PPARγ-Agonist Pioglitazon 6
Methodik 7
Studienpopulationen 7
Interventionen 8
Experimentelles Vorgehen 9
Zellisolation 9
Telomeraseaktivitätsmessung 9
Semi-quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion 11
Immunoblot 11
Tierpopulation 12
Tierexperimentelles Vorgehen 12
Histologische Analyse 13
Statistische Auswertung 13
Ethische Gesichtspunkte 14
Ergebnisse 14
Laufbandtraining steigert die leukozytäre Telomeraseaktivität 14
Die Langzeitanwendung von ISRT steigert die leukozytäre Telomeraseaktivität sowie die absolute Gehstrecke 14
Die Langzeitanwendung von ISRT steigert die leukozytäre TRF2-Expression 15
Laufbandtraining führt zu einer unmittelbaren Steigerung des CD14-Signals in peripheren Blutleukozyten 17
Pioglitazon hemmt die Endothelaktivierung und Monozytentransmigration bei induzierter Arteriogenese 18
Diskussion 19
Literaturverzeichnis 23
Eidesstattliche Versicherung 27

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen 28
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen 30
Publikation 1 31
Publikation 2 44
Publikation 3 53
Lebenslauf 53
Vollständige Publikationsliste 70
Danksagung 72

Zusammenfassung:

Abstrakt (Deutsch)

Hintergrund: Arteriogenese (arterielles Kollateralwachstum) ist ein effektiver endogener Kompensationsmechanismus für arterielle Gefäßstenosen und lässt sich therapeutisch durch Gefäßsport, Gegenpulsationsverfahren oder pharmakologische Stimulation steigern. Leukozyten und insbesondere mononukleäre Zellen steuern die lokalen Umbauvorgänge der Arteriogenese am Gefäß parakrin. Wird ihre Regeneration im Knochenmark oder ihre Einwanderung in den perivaskulären Raum gestört, so findet kein effektives Kollateralwachstum statt. Diese Arbeit untersucht die Effekte von Gegenpulsationstherapie (Individuelle Scherraten Therapie, kurz ISRT) und Laufbandtraining auf die leukozytäre Telomerbiologie als Parameter der zellulären Teilungs- und Regenerationsfähigkeit. Zudem wird tierexperimentell evaluiert, ob eine pharmakologische PPARγ-Aktivierung Auswirkungen auf grundlegende Mechanismen der Arteriogenese hat.

Methoden: In einer klinischen Studie (ISRT-1) wird der Effekt von 30 min Laufbandtraining sowie 45 min ISRT auf die Telomeraseaktivität mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) in 26 Probanden (Alter: 23,3 Jahre; m = 13, w = 13) ohne relevante Vorerkrankungen untersucht. Eine zweite Studie (ISRT-2) hat zum Ziel die Effekte von Kurz- (45 min) und Langzeit-ISRT (30 h) auf die PBMC Telomeraseaktivität sowie auf die Expression telomerprotektiver Gene in 14 pAVK-Patienten (Alter: 63,5 Jahre; m = 12, w = 2) zu beleuchten. Um den Effekt von Pioglitazon, einem PPARγ-Agonisten, auf das zerebrale Kollateralwachstum zu evaluieren, werden männliche Sprague-Dawley Ratten gemäß dem 3-Gefäßverschlussmodell (3-VO) operiert, mit Pioglitazon behandelt und anschließend histologisch untersucht.

Ergebnisse: In der ISRT-1 Studie konnte nach 30 min Laufbandtraining eine signifikante Steigerung der PBMC Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. In der ISRT-2 Studie kam es zu einer signifikanten Erhöhung der PBMC Telomeraseaktivität nach 30 h ISRT, sowie zu einer Steigerung der mRNA-Expression des telomerprotektiven Faktors TRF2. Zudem konnte nach 30 h ISRT eine signifikante Steigerung der absoluten Gehstrecke bei pAVK-Patienten beobachtet werden. Im Tierexperiment konnte eine Hemmung der zerebralen Arteriogenese durch Pioglitazon nachgewiesen werden. Insbesondere zeigte sich hier in der histologischen Auswertung eine verminderte Endothelaktivierung sowie eine verminderte Transmigration von Monozyten in den perivaskulären Raum.

Diskussion: Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass eine Steigerung der PBMC Telomeraseaktivität bereits durch eine einzige Einheit Laufbandtraining erreicht werden kann. Ebenso wird erstmalig eine Verbindung von Gegenpulsationsverfahren zur leukozytären Telomerbiologie hergestellt.

Gegenpulsationsverfahren haben langfristig neben der Induktion von Arteriogenese telomerprotektive Effekte. Die Modulation von Inflammationsprozessen durch PPARγ-Agonisten führt dagegen zu einer Inhibierung grundlegender Mechanismen der Arteriogenese. Hierbei kommt der fehlenden Aktivierung von Monozyten eine entscheidende Rolle zu.

Abstract (English)

Background: Arteriogenesis (collateral growth) constitutes an important biological mechanism to compensate for arterial stenoses and occlusions. Arteriogenesis can be induced therapeutically by exercise, counterpulsation therapy or by pharmacological stimulation. The underlying physiological processes are governed by leukocytes (in particular mononuclear cells), which invade the perivascular space and release growth hormones. Therefore, arteriogenesis depends on leukocyte regeneration in the bone marrow and leukocyte transmigration in the perivascular space. Consequently, arteriogenesis remains ineffective, if either of these two mechanisms is impaired. It is the aim of this work to evaluate how acute exercise and counterpulsation therapies influence leukocyte telomere biology, which is an emerging parameter of the regenerative potential of the immune system. Additionally, it will be investigated how the activation of PPARγ interferers with basic mechanism of arteriogenesis

Methods: In the first presented clinical study (ISRT-1) the effect of 30 min of treadmill exercise and of 45 min of adapted counterpulsation treatment (individual shear rate therapy, ISRT) on the telomerase activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) is evaluated in 26 apparently healthy individuals (Age 23,3 years; m = 13, f = 013). In the second trial (ISRT-2) the effect of short-term (45 min) and long-term (30 h) ISRT on PBMC telomerase activity and on the expression of telomere protective genes is investigated in 14 patients with peripheral artery disease (Age: 63,5 years; m = 12, f = 2). Male Sprague-Dawley rats are used to examine how the pharmacological activation of PPARγ by Pioglitazone interferes with cerebral arteriogenesis in the 3-vessel occlusion model (3-VO).

Results: In the young and healthy population of the ISRT-1 study, a significant augmentation of PBMC telomerase activity was observed already upon 30 min of treadmill exercise. In the ISRT-2 study, a significant augmentation of PBMC telomerase activity as well as of the mRNA Expression of TRF2 was detected upon 30 h of ISRT. Additionally, the absolute claudication distance increased significantly upon 30 h of ISRT in our patients with peripheral artery disease. The performed animal studies revealed an inhibition of cerebral arteriogenesis upon Pioglitazon treatment. Particularly endothelial activation as well as transmigration of monocytes into the perivascular space were impaired.

Discussion: This work shows for the first time, that a single exercise session is sufficient to increase leukocyte telomerase activity. Furthermore, first evidence for a link between counterpulsation therapy and leukocyte telomere biology is provided. Counterpulsation therapy not only enhances the peripheral perfusion by induction of arteriogenesis, but may upon long-term application improve parameters of telomere maintenance comparably to exercise training. The modulation of inflammatory processes by PPARγ agonists impairs basic mechanisms of arteriogenesis, for example the activation of monocytes.

Einführung

Grundlagen der Arteriogenese und der Telomerbiologie

Ischämische Gefäßerkrankungen, die das Herz oder das Gehirn betreffen, sind weltweit die häufigste Todesursache des Menschen.[1] Zu den ischämischen Gefäßerkrankungen zählt auch die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), die zwar mit einer vergleichsweise geringeren Mortalität verbunden ist, dafür jedoch häufig mit einer beachtlichen Morbidität einhergeht.[2] Der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit liegt folgender Mechanismus zugrunde: Eine chronische, meist arteriosklerosebedingte, Stenose führt zu einer Minderperfusion und in der Folge zu einer Mangelversorgung des betroffenen Organs. Um chronisch auftretender Minderperfusion entgegen zu wirken, bildet der Körper vaskuläre Kollateralkreisläufe durch Umbau kleiner, bereits vorhandener Arteriolen zu kräftigen Konduktanzarterien. Dieser Vorgang wird Arteriogenese genannt.[3] Nach Entstehung einer Stenose kommt es durch den gesteigerten Blutfluss in den Kollateralgefäßen zu einer Erhöhung der endovaskulären Schubspannung und damit zur Aktivierung von Endothelzellen.[4] In der Folge tritt eine gesteigerte endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 ein, wodurch die Einwanderung von Monozyten in den perivaskulären Raum ermöglicht wird.[5] Nach Migration in den perivaskulären Raum steuern Monozyten den Umbauprozess der glatten Gefäßmuskulatur und des Endothels parakrin.[6] Wird diese Steuerungsfunktion der Monozyten durch lokale oder systemische Prozesse gestört, ist die Arteriogenese nur eingeschränkt möglich.[7] Der regenerativen Kapazität des Immunsystems kommt daher eine entscheidende Bedeutung für das vaskuläre Remodelling zu. In diesem Zusammenhang wurde in tierexperimentellen Studien gezeigt, dass knochenmarkdefiziente Tiere keine effektive Arteriogenese durchführen können.[8] Um die Regenerationsfähigkeit des Immunsystems zu quantifizierten wurde in jüngerer Zeit die Telomerlänge peripherer Blutleukozyten als relevanter Parameter etabliert.[9] Zusammen mit der Telomeraseaktivität gibt die Telomerlänge einen Hinweis auf die Teilungsfähigkeit und das biologische Alter einer

Zellpopulation.[10] Zudem ist die Verkürzung leukozytärer Telomere mit multiplen kardiovaskulären Risikofaktoren und der Entstehung von Herzkreislauferkrankungen assoziiert.[9]

Die ISRT-Studien

Arteriogenese als natürlicher Kompensationsmechanismus von vaskulären Stenosen kann durch körperliches Training gesteigert werden.[11] Zudem kann Arteriogenese im koronaren Gefäßbett auch durch externe Gegenpulsation therapeutisch induziert werden.[12, 13] Bei der „enhanced external counterpulsation“ wird dazu durch pneumatische Kompression der unteren Extremität in der Diastole des Herzzyklus eine Erhöhung der endovaskulären Schubspannung in den Koronararterien erzielt.[12] Zur Induktion vergleichbarer peripherer Gefäßumbauvorgänge ist bei pAVK-Patienten Gehtraining zwar effektiv,[14] wird jedoch aufgrund von orthopädischen Begleiterkrankungen oder Claudicatiobeschwerden in der Praxis häufig nicht konsequent durchgeführt. Auch „enhanced external counterpulsation“ ist für pAVK-Patienten nicht geeignet, da die Kompression der unteren Extremität mit den bei „enhanced external counterpulsation“ angewendeten hohen Drücken von bis zu 300 mmHg die Perfusion der Beinarterien weiter verschlechtert.[15] Eine Anwendung der Gegenpulsation bei pAVK wurde nun mit der Entwicklung der Individuellen Scherraten Therapie ermöglicht (Individual shear rate therapy, kurz ISRT). Bei der ISRT handelt es sich um eine Anpassung des Gegenpulsationsprinzipes in zwei wesentlichen Punkten: Erstens wird auf die Kompression der Unterschenkel gänzlich verzichtet und zweitens werden die Therapiedrücke abgesenkt und individuell angepasst. Eine optimale Druckeinstellung sowie adäquate Fußperfusion wird ultraschall-gestützt kontrolliert.[16] Diese Modifikation basiert auf der Erkenntnis, dass die Erhöhung der endovaskulären Schubspannung und nicht die des endovaskulären Druckes die entscheidende Größe zur Steuerung der Arteriogenese darstellt.[17] Um die Effekte von ISRT sowohl klinisch als auch auf zellulärer und molekularer Ebene zu quantifizieren wurden zwei klinische Studien ins Leben gerufen. Die ISRT-1 Studie beschäftigt sich dabei mit den akuten Effekten von ISRT auf junge gesunde Probanden im Vergleich zu Laufbandtraining. In der ISRT-2 Studie wurde der Fokus auf die Effekte von Kurz- und Langzeit-ISRT bei pAVK-Patienten fortgeschrittenen Alters gelegt.

Der PPARγ-Agonist Pioglitazon

Wie bereits eingangs erwähnt kann die Fähigkeit eines Organismus mittels Arteriogenese Kollateralkreisläufe auszubilden durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Nicht nur die adäquate Regeneration von Leukozyten, sondern auch deren Transmigration und Aktivierung spielen eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Arteriogenese, welche sich in einem pro-inflammatorischen Milieu abspielt.[18] Kommt es durch antiinflammatorische Wirkstoffe zur

Störung dieses Vorgangs, so beeinflusst dies das Kollateralwachstum negativ, wie beispielsweise für Acetylsalicylsäure nachgewiesen.[19, 20] Eine weitere Medikamentengruppe, die mit Inflammationsprozessen und Zellmigration interagiert sind Agonisten des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors gamma (PPARγ), wie beispielsweise das Thiazolidindion Pioglitazon,[21] das ursprünglich zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen wurde. Interessanterweise konnte für diese Wirkstoffgruppe zwar ein positiver Effekt auf den Glukosestoffwechsel nachgewiesen werden, in Bezug auf relevante kardiovaskuläre Endpunkte konnte ein positiver Effekt jedoch nicht zweifelsfrei belegt werden.[22] Um die Effekte von PPARγ-Aktivatoren auf das Kollateralwachstum und die Transmigration von mononukleären Zellen zu untersuchen, wurde eine tierexperimentelle Studie durchgeführt. Als Modell für eine induzierte zerebrale Arteriogenese wurde das gut etablierte 3-Gefäßverschluss (3-vessel occlusion, 3-VO) Modell in der Ratte gewählt.[23] Mit diesem Modell wurde der Einfluss von Pioglitazon auf das zerebrale Kollateralwachstum auf histologischer, zellulärer und molekularer Ebene untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es anhand molekularbiologischer und histologischer Methoden die Effekte verschiedener kardiovaskulärer Therapiekonzepte auf mononukleäre Zellen im Kontext des arteriellen Kollateralwachstums im klinischen und präklinischen Bereich zu untersuchen.

Methodik

Studienpopulationen

Für die ISRT-1 Studie wurden n = 26 Probanden (Alter 18-35 Jahren, 13 weiblich, 13 männlich) ohne Vorerkrankungen und ohne aktuelle medizinische Therapie als Zielpopulation definiert. Als Ausschlusskriterien wurden ein Body-Mass-Index über 30 kg/m², kardiovaskuläre Vorerkrankungen in der Anamnese, andere metabolische, endokrine oder psychiatrische Störungen, aktiver Nikotinabusus sowie Schwangerschaft festgelegt. Um eine paritätische Verteilung auf beide Geschlechter zu erreichen, wurden orale Kontrazeptiva als einzige Medikamentengruppe zugelassen. Für die ISRT-2 Studie wurden n = 14 pAVK-Patienten (Alter 50-85 Jahren) mit einer klinisch stabilen femoro-poplitealen Manifestation im Stadium IIb nach Fontaine als Zielpopulation definiert. Ausschlusskriterien waren: Herzrhythmusstörungen, eine Aortenklappeninsuffizienz, spastische Lähmungen, Gefäßbypässe an der unteren Extremität, eine akute Venenthrombose sowie ein fortgesetzter Nikotinabusus. Weitere Einzelheiten zur ISRT-1 und ISRT-2 Studienpopulation sind den Orginalpublikationen von Zietzer *et al.* und Buschmann *et al.* zu entnehmen.[16, 24]

Interventionen

Die ISRT basiert auf dem Gegenpulsationsprinzip. Wie bei der „enhanced external counterpulsation“ werden dabei die unteren Extremitäten des Patienten durch Druckluftmanschetten komprimiert. Dies erfolgt EKG-gesteuert in der frühen Diastole und führt zu einer Steigerung des peripheren Blutflusses.[16] Im Gegensatz zur externen Gegenpulsationstherapie wird die Wadenregion bei ISRT jedoch ausgespart. Zudem wird bei der ISRT der optimale Therapiedruck zu Beginn der Therapie erstens auf Basis der subjektiven Drucktoleranz des Patienten sowie zweitens auf Basis einer distal an der A. tibialis posterior bzw. A. tibialis anterior duplexsonographisch durchgeführten Perfusionskontrolle bestimmt. Für die Gegenpulsationstherapie wurde ein Cardioassist (Cardiomedics, USA) und für die Ultraschallanalysen ein HDX 11 (Philips, Netherlands) verwendet. In der ISRT-1 Studie unterzogen sich die Teilnehmer jeweils einer Trainingseinheit auf dem Laufband von moderater Intensität (30 Minuten, Zielherzfrequenz 120-130/min) und einer ISRT-Einheit (45 Minuten, Therapiedruck 160 bis 200 mmHg). Dabei wurden die Probanden zufällig auf zwei Gruppen wie folgt aufgeteilt: Die erste Gruppe begann mit einer Sitzung ISRT und die zweite Gruppe begann mit einer Sitzung Laufbandtraining. Nach einer Pause von mindestens 7 Tagen wechselte die erste Gruppe zum Laufbandtraining und vice versa die zweite Gruppe zur ISRT (Cross-Over-Studiendesign). Für das Laufbandtraining wurde ein Quasar med 4.0 (h/p/cosmos, Germany) verwendet. Unmittelbar vor und exakt 10 Minuten nach Laufband-Training oder ISRT wurden insgesamt 30 ml Blut über eine periphere Vene der oberen Extremität unter Standardbedingungen entnommen. In der ISRT-2 Studie wurden die Teilnehmer in 90-minütigen, 5-mal wöchentlich stattfindenden Sitzungen bis zu einer Gesamttherapiedauer von 30 Stunden mit ISRT behandelt. Dabei

Abbildung 1

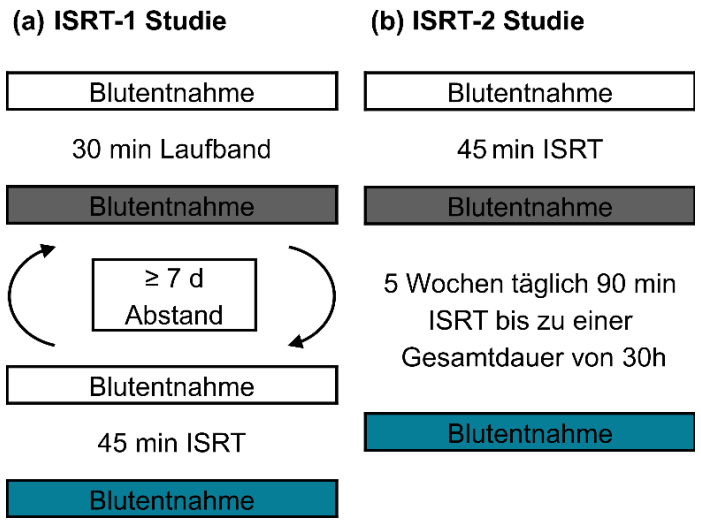

Abbildung 1: Studiendesign der ISRT Studien. (a) Die ISRT-1 Studie als Crossover-Design mit Messpunkten nach 30 min Laufbandtraining und 45 min ISRT an zwei Studienterminen in zufälliger Reihenfolge. (b) Die ISRT-2 Studie mit Messpunkten nach 45 min ISRT und 30 h ISRT kumulativ über 5 Wochen. Modifiziert nach Zietzer et *al.* [24]

kamen typischerweise Drücke von 120-160 mmHg zum Einsatz. Zur besseren Vergleichbarkeit mit der ISRT-1 Studie dauerte die erste und die letzte Sitzung in der ISRT-2 Studie ebenfalls 45 Minuten. Unmittelbar vor und 10 Minuten nach der ersten Therapieeinheit, sowie 10 Minuten nach der letzten Therapieeinheit in der ISRT-2 Studie wurden 30 ml Blut entnommen. In beiden Studien wurden 20 ml Blut zur Isolation von zirkulierenden mononukleären Zellen (PBMCs) verwendet und 10 ml zur Gewinnung von Blutplasma, wie von Brix *et al.* beschrieben.[25] Die Messung der Gehstrecke erfolgte auf einem Quasar med4.0 (h/p/cosmos, Germany) an separaten Studienvisiten. Weitere Einzelheiten zu ISRT und den ISRT-Studien sind den Orginalpublikationen [16, 24, 25] sowie der **Abb.1a+b** zu entnehmen.

Experimentelles Vorgehen

Zellisolation

Direkt nach der Blutentnahme wurden PBMCs aus 20 ml Vollblut mithilfe von Ficoll-Plaque Plus (GE Healthcare, USA) isoliert. Die Anzahl lebender Zellen wurde mithilfe von Trypanblau in einer Neubauerzählkammer bestimmt und jeweils $1x10^6$ Zellen als Pellet auf Trockeneis schockgefroren. Anschließend wurden die Zellen bei -80 °C bis zur Fortsetzung der Experimente gelagert.[24]

Telomeraseaktivitätsmessung

Zur Messung der Telomeraseaktivität wurde das kommerziell erhältliche TRAPeze – Telomerase detection Kit verwendet (Merck Millipore, USA). Das Vorgehen entsprach, bis auf wenige Anpassungen, den Vorgaben des Herstellers und ist in der Publikation von Zietzer *et al.* dokumentiert.[24] Zusammengefasst wurde das TRAPeze Kit wie folgt verwendet (Falls nicht weiter spezifiziert entstammen die verwendeten Reagenzien dem TRAPeze Kit): Pellets von 10^6 PBMCs wurden in CHAPS Lysepuffer aufgetaut und lysiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysates wurde mithilfe von Bradford Reagenz (Sigma-Aldrich Chemicals, USA) durchgeführt. 0,6 µg Protein wurde entsprechend der Vorgaben des TRAPeze- Herstellers für den Aktivitäts-Assay verwendet. Dazu wurde das Lysat zusammen mit Telomer-Primern, Desoxyribonukleinsäuretriphosphaten und Taq-Polymerase (Roboklon, Deutschland) zunächst für 30 Minuten bei 30°C inkubiert, um eine Verlängerung der Primer durch die Telomerase zu ermöglichen. Direkt darauf folgte die Hitze-inaktivierung der Telomerase, sowie 33 Zyklen einer 3-stufigen PCR zur Amplifikation der verlängerten Telomer-Primer mit anschließender Kühlung bei 4°C. Analog wurden zu jedem Patienten eine Puffer-Kontrolle (CHAPS-Puffer statt Lysat),

Abbildung 2

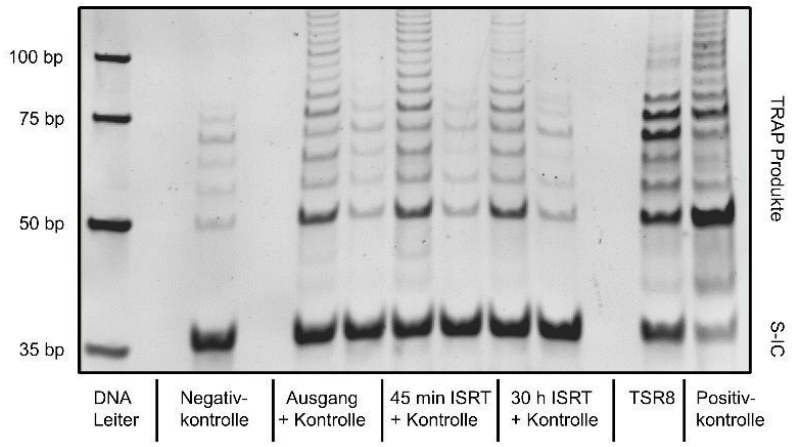

Abbildung 2: Repräsentative Darstellung der TRAP-Assay-Produkte eines Patienten aus der ISRT-2 Studie. Beladung der Gelbanden: 1. DNA Leiter, 2. Puffer Kontrolle (CHAPS), 3.+ 4. Ausgangswert, 5. + 6. nach 45 min ISRT, 7. + 8. nach 30 h ISRT, jeweils mit entsprechender Hitze-inaktivierter Kontrolle, 9. TSR8-Standard zur Quantifizierung, 10. Telomerase positive Kontrolle, S-IC: „Standard internal control“ Bande

eine externe Quantifizierungskontrolle mit 5 mmol TSR8, eine Kontrolle mit einem Telomerase-positiven Lysat, sowie für jede Probe eine Negativkontrolle (nach Hitze-denaturierung der Telomerase) angefertigt. Die PCR Produkte, die den drei bzw. vier Messpunkten der Studien entsprachen, wurden mit den korrespondierenden Kontrollen in einem 12,5-prozentigen, nicht-denaturierenden Polyacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mithilfe von SYBR Green I Gel Staining Solution (Lumiprobe, USA) gefärbt und ein digitales Abbild auf einem GeneGenius Gel Imaging System (Syngene, UK) angefertigt, wie in **Abb.2** repräsentativ dargestellt. Die Analyse der optischen Dichte der TRAP-Produkt-Leitern erfolgte digital mit der Software ImageJ, Version 1.48, bereitgestellt vom National Insitute of Health (USA). Hierbei wurden die Probenprodukte zunächst auf die entsprechende interne Standardbande (I-SC) bezogen. Die relative Telomerase-Aktivität ergab sich dann aus der Differenz von Probe und Hitze-inaktivierter Kontrolle bezogen auf die Differenz von externer Kontrollbande (TSR8) und Puffer-Kontrolle. Überstieg bei der Messung die optische Dichte der Hitze-inaktivierten Kontrolle den Wert der intakten Bande, wurde der Assay für den entsprechenden Messpunkt wiederholt. Nach der zweiten Wiederholung wurde der Teilnehmer aus der Analyse ausgeschlossen. Die relative Telomerase-Aktivität wird in „Total Product Generated“ Einheiten angegeben, wobei 1 TPG hier einem Wert der Probe von einem Prozent der externen Quantifizierungskontrolle entspricht .[24]

Semi-quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Eine ausführliche Beschreibung der mRNA-Expressionsanalyse ist in der Orginalpublikation von Zietzer *et al.* dargestellt.[24] Zur Durchführung der semi-quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde zunächst aus $4x10^6$ PBMCs mithilfe des kommerziell erhältlichen Quick-RNA MiniPrep Kits (Zymo Research, Germany) gemäß den Herstellerangaben RNA extrahiert. Die RNA wurde anschließend mittels eines NanoDrop ND-1000 Photospektrometers (Thermo Fisher Scientific, USA) auf Verunreinigungen untersucht und ihre Konzentration bestimmt. Mithilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA) wurde anschließend unter Einsatz von 0,5 µg RNA gemäß den Empfehlungen des Herstellers cDNA synthetisiert. Zur folgenden qPCR wurde pro Ansatz neben der cDNA-Lösung das entsprechende Primerpaar in 1,1-µmolarer Konzentration sowie 2X SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) und DNAse/RNAse freies Wasser eingesetzt. Jede Probe wurde als Triplikat auf einer 96-Well-Platte in einem Mx3000P™ Real-Time PCR System (Stratagene, USA) analysiert. Die Rohwerte wurden gegen RPLP0 normalisiert und die Expressionsdaten als ΔΔCT-Werte dargestellt. Alle verwendeten Primer wurden vor der Analyse in einer Konzentrationsreihe auf Effektivität getestet. Durch Analyse der Dissoziationskurven wurde sichergestellt, dass jeweils nur ein einziges PCR-Produkt gebildet wurde. Die Sequenzen der einzelnen verwendeten Primer sind in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer

Name des Primers	Sequenz	Referenz
RPLP0 vorwärts	5'-ACGGGTACAAACGAGTCCTG-'3,	[26]
RPLP0 rückwärts	5'-AGCCACAAAGGCAGATGGAT-'3,	[26]
TRF1 vorwärts	5′-CGAGTGCCAGGTGCAGGTGG-3′	[27]
TRF1 rückwärts	5′-ATAATAGCCTCTGCGCTGTTGCGG-3′	[27]
TRF2 vorwärts	5'-GTCTGTCGCGGATTGAAGA-'3,	Eigendesign [24]
TRF2 rückwärts	5'-ACTGGATTCGACCACTGCTT-'3	Eigendesign [24]
KU70 vorwärts	5′-GCGCCAAAGTGAGCAGTAGCCA-3′	[27]
KU70 rückwärts	5′-CTGCTTCTTCATCGCCCTCGGT-3′	[27]
KU80 vorwärts	5'-GGTGAAGATGGGTTGGATGA-'3,	Eigendesign [24]
KU80 rückwärts	5'-ATTGGAGCCAATGGTCAGTC-'3.	Eigendesign [24]

Immunoblot

Durch körperliche Aktivität kommt es zu einer Änderung der leukozytären Subpopulationen im peripheren Blut.[28] Um die Steigerung der Telomeraseaktivität durch Laufbandtraining und Langzeit-ISRT besser zu charakterisieren wurde untersucht, ob sich durch die Interventionen der

ISRT-Studien eine Änderung der leukozytären Subpopulationen ergeben hatte. Diese könnte bei differierender Telomeraseaktivität der Subpopulationen eine Änderung der Telomeraseaktivität der Gesamtpopulation erklären. Hierzu wurden spezifische Markerproteine der drei relevantesten Subpopulationen in den PBMC Proteinlysaten per Immunoblot analysiert: T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD20) und Monozyten/Makrophagen (CD14). Es wurden Proben mit einer mindestens zweifachen Steigerung der Telomeraseaktivität von jeweils 5 Probanden pro Studie analysiert. Zunächst wurden $1x10^6$ PBMCs wie von Kappert et al. beschrieben lysiert und die Proteinkonzentration der Lysate mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) bestimmt.[29] 20 µg Protein wurden über einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran (Biorad, USA) transferiert. Nach Blockierung unspezifischer Proteinbindung mit 5-prozentiger Magermilch wurde die Membran zunächst mit den entsprechenden primären Antikörpern inkubiert: Anti-CD3 (BD Pharmigen, USA), Anti-CD14, Anti-CD20 (beide von Proteintech, USA) und Anti-GAPDH (Abcam, UK). Es folgte die Inkubation mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern: Anti-Kaninchen IgG (GE Healthcare, United Kingdom) für CD14 und CD20 und Anti-Maus IgG (Jackson Immuno Research, USA) für CD3 und GAPDH sowie ECL Western Blotting Detection Reagenz (Sigma-Aldrich, USA). Mithilfe eines Crurix 60 (Agfa-Gevaert, Belgium) und einem CanoScan 5600F (Canon, Japan) wurde ein digitales Abbild der Membranen erstellt. Auf diesem Abbild erfolgte die Messung der relativen Bandenintensität im Verhältnis zu GAPDH mit der Software ImageJ 1.48, bereitgestellt vom National Insitute of Health (USA).[24]

Tierpopulation

Die im Folgenden beschriebenen Tierversuche wurden im Einklang mit nationalen und internationalen Tierschutzgesetzen und Bestimmungen durchgeführt; genaueres ist dazu dem Abschnitt „ethische Gesichtspunkte“ und der Orginalpublikation von Dülsner *et al.* zu entnehmen.[30] Für die Tierversuche wurden insgesamt 152 männliche Sprague-Dawley Ratten (Harlan-Winkelmann, Brochen, Deutschland) mit einem Gewicht von 300 bis 350 g herangezogen.

Tierexperimentelles Vorgehen

Beim 3-VO-Modell handelt es sich um ein etabliertes Modell der zerebralen Arteriogenese in der Ratte. Die Tiere wurden dazu wie von Busch *et al.* beschrieben operiert, um eine zerebrale Hypoperfusion zu generieren.[23] Kurz zusammengefasst werden dabei die beiden Aa. vertebrales kauterisiert und die linke A. carotis durch Ligatur verschlossen. Der Eingriff erfolgt in Totalanästhesie auf Basis von Ketamin und Isofluran, zudem wird Ropivacain zur Analgesie lokal subkutan injiziert.[30] Die Tiere wurden für das hier dargestellte Experiment in folgende Gruppen

aufgeteilt: 3-VO + Methylcellulose als reine 3-VO Kontrolle, 3-VO + G-CSF (40 µg / kg jeden zweiten Tag) als Positivkontrolle für die Arteriogenese und 3-VO + G-CSF (40 µg / kg jeden zweiten Tag) + Pioglitazon (2,8 mg / kg täglich) als Interventionsgruppe. Die medikamentöse Behandlung startete dabei 4 Tage vor der 3-VO Operation und wurde 7 Tage postoperativ fortgesetzt.

Histologische Analyse

Zur histologischen Analyse wurden den Tieren am siebten post-operativen Tag die Gehirne entnommen und in Paraffin eingebettet. Der relevante Bereich um die A. cerebri posterior wurde in sagittaler Richtung 5 µm dick geschnitten und auf Objektträger verbracht. Der Entparaffinisierung mit Xylol und Ethanol folgte die Antigendemaskierung mit Zitratpuffer. Die Blockierung unspezifischer Proteinbindung erfolgte anschließend mit normalem Ziegenserum (Sigma-Aldrich, USA). Um Endothelproliferation und Monozytenmigration ins perivaskuläre Gewebe nachweisen zu können, wurden Anti-Ki67 und Anti-CD68 als primäre Antikörper eingesetzt (Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki67 Antibody Clone MIB-5, Dako, Deutschland) bzw. (Monoclonal Mouse Anti-Rat CD68 Antibody, AbD Serotec, UK). Als sekundärer Antikörper diente ein Alexafluor555-gekoppelter Anti-Maus IgG Antikörper aus der Ziege (Life Technologies, USA). Im Weiteren wurde glattmuskuläres α-Aktin mit einem Fluorescein-isothiocyanat-konjugierten Antikörper dargestellt (Monoclonal Anti-Actin, α-Smooth Muscle-FITC clone 1A4, Sigma-Aldrich, USA). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA). Die Hämatoxylin/Eosin Färbungen wurden gemäß einem Standard-Protokoll von Fischer *et al.* wie folgt durchgeführt:[31] Nach der Entparaffinisierung erfolgte zunächst die Färbung in Hämalaunlösung sauer nach Mayer (Carl Roth GmbH, Deutschland) und anschließend mit Eosin (Carl Roth GmbH, Deutschland). Im Weiteren wurde das Präparat mit Ethanol und Xylol entwässert und mit Entellan (Merck Millipore, USA) eingedeckelt. Die Erstellung repräsentativer Aufnahmen erfolgte mit einem Olympus IX81 Mikroskop (Olympus Europa, Deutschland).[30]

Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der ISRT-1 und ISRT-2 Studie wurde SPSS Version 22 (IBM, USA) verwendet. Die Telomerase-Aktivitätsdaten waren normalverteilt und wurden mithilfe eines t-Tests für verbundene Stichproben analysiert. Die mRNA-Expressionsdaten waren nicht normalverteilt, daher erfolgte die Analyse mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Für die tierexperimentelle Studie wurden Gruppenunterschiede mit einem ANOVA-Test mit „False discovery rate correction“ aus SPSS Version 20 (IBM, USA) auf Signifikanz getestet.

Ethische Gesichtspunkte

Die ISRT-1 und ISRT-2 Studie wurden in Einklang mit nationalem und internationalem Recht sowie der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Studienteilnehmer wurden über mögliche Gefahren und Risiken der Studien eingehend informiert und gaben vor der Teilnahme ihr schriftliches Einverständnis. Die Studienprotokolle wurden durch die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin – Campus Virchow Klinikum eingesehen und bewilligt (Referenz: EA2/108/13 bzw. EA2/140/13). Die Studien wurden beim „International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN) Registry" gemeldet (Referenz: ISRCTN88693704 bzw. ISRCTN19661956). Die Durchführung aller Tierversuche erfolgte in Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz. Ein entsprechender Tierversuchsantrag wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Referenz: G 0225/07). Ebenso wurden die EU Direktive 2010/63/EU, die ARRIVE Leitlinien zur Veröffentlichung von *in vivo* Experimenten sowie die „Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals" des National Institutes of Health der USA beachtet.[24, 30]

Ergebnisse

Laufbandtraining steigert die leukozytäre Telomeraseaktivität

In die ISRT-1 Studie schlossen wir 26 Probanden (13 männlich und 13 weiblich) mit einem Durchschnittsalter von 23,3 ± 1,8 Jahren und einem Durchschnitts-BMI von 22,22 ± 2,25 kg/m^2 ein. Bei 4 Probanden war die PBMC Telomeraseaktivität, gemäß den oben beschriebenen Kriterien, an mindestens einem Messpunkt nicht bestimmbar. Die übrigen 22 Probanden wurden in die finale Analyse einbezogen. Nach einer Einheit Laufbandtraining zeigte sich in der ISRT-1 Studie eine signifikante Steigerung der PBMC Telomeraseaktivität von 39,84 ± 6,15 TPG auf 58,10 ± 10,46 TPG ($p \leq 0,05$) (**Abb.3a**). Nach einer einzigen ISRT-Einheit konnte jedoch keine signifikante Änderung nachgewiesen werden: 40,22 ± 7,65 TPG, zu 47,77 ± 9,73 TPG, nicht signifikant (n.s.) (**Abb.3a**).[24]

Die Langzeitanwendung von ISRT steigert die leukozytäre Telomeraseaktivität sowie die absolute Gehstrecke

Für die ISRT-2 Studie wurden 12 männliche und 2 weibliche pAVK-Patienten im Alter von 63,5 ± 8,2 Jahren mit einem Durchschnitts-BMI von 28,95 ± 3,27 kg/m^2 rekrutiert. Von 14 Teilnehmern konnten 12 Teilnehmer in die finale Auswertung aufgenommen werden, da ein Patient die Studie nicht beendete und bei einem zweiten Patienten die Telomeraseaktivität nicht an allen

Messpunkten bestimmbar war. In der ISRT-2 Studie zeigte sich, wie auch in der ISRT-1 Studie, keine signifikante Änderung der Telomeraseaktivität nach einer einzigen ISRT-Einheit: 40,87 ± 4,45 TPG gegenüber 39,00 ± 5,05 TPG (n.s.). Nach 30 kumulativen Stunden ISRT konnte jedoch eine deutliche Steigerung der PBMC Telomeraseaktivität nachgewiesen werden: 40,87 ± 4,45 TPG zu Beginn und 60,98 ± 6,83 TPG nach 30 h ISRT ($p \leq 0,05$) (**Abb.3b**). Interessant ist dabei, dass auch zwischen dem Wert nach der ersten Einheit und dem Wert nach 30 h ISRT ein signifikanter Unterschied besteht (39,00 ± 5,05 TPG und 60,98 ± 6,83 TPG, $p \leq 0,05$) (**Abb.3b**). In der ISRT-2 Studie wurde zudem eine signifikante Steigerung der absoluten Gehstrecke von initial 167,82 m ± 18,04 auf 446,72 m ± 133,31 ($p \leq 0,05$) nach 30 h ISRT nachgewiesen.[16] *(Hauptverantwortlich für die Datenverarbeitung der Gehstrecke ist Michèle Brix)*

Abbildung 3

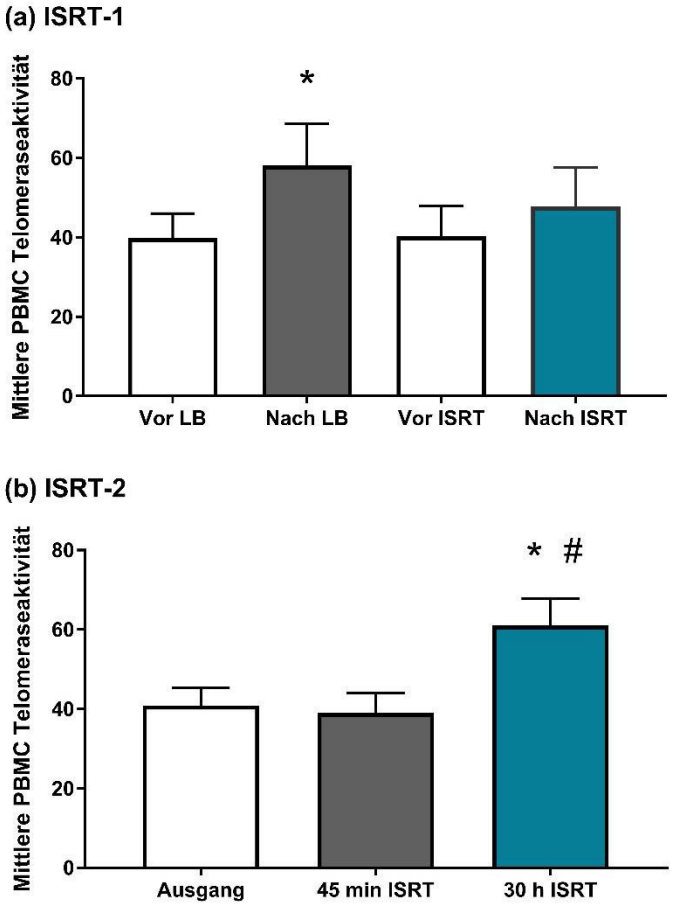

Abbildung 3: Mittlere PBMC Telomeraseaktivität in den ISRT Studien. (a) In der ISRT-1 Studie vor und nach 30 min Laufbandtraining (LB) sowie vor und nach 45 min ISRT. (b) In der ISRT-2 Studie vor und nach 45 min ISRT sowie nach 30 h ISRT. Die Daten sind als Mittelwerte dargestellt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. *p-Wert ≤ 0.05 gegenüber dem Ausgangswert, #p-Wert ≤ 0.05 gegenüber dem Wert nach 45 min ISRT (zweiseitige Signifikanz, t-Test für verbundene Stichproben). Modifiziert nach Zietzer *et al.* [24]

Die Langzeitanwendung von ISRT steigert die leukozytäre TRF2-Expression

Um die telomerprotektiven Effekte der ISRT weiter zu charakterisieren, wurde die mRNA-Expression der Shelterin-Untereinheiten TRF1 und TRF2 untersucht. Bei der relativen TRF1-mRNA-Expression ergab sich keine signifikante Änderung in der ISRT-2 Studie: ΔΔCT: 0,76 ± 0,22 (n.s.) bzw. 1,00 ± 0,36 (n.s.) nach 45 min bzw. 30 h ISRT (**Abb.4a**). Auch für TRF2 konnte zunächst keine signifikante Änderung der mRNA-

Expression nach einer ISRT-Einheit nachgewiesen werden: ΔΔCT 1,94 ± 0,53, (n.s.). Nach 30 h ISRT ergab sich jedoch eine mehr als zweifache Steigerung der mRNA-Expression von TRF2 in der ISRT-2 Studie: ΔΔCT 2,10 ± 0,40 ($p \leq 0,05$) (**Abb.4b**). Als nächster Schritt folgte die Analyse der mRNA-Expression des Heterodimers KU70/80, dem ebenfalls eine wichtige Rolle in der Telomer-Instandhaltung zukommt.[32] Weder für KU70 noch für KU80 konnte eine signifikante Expressionsänderung nach ISRT nachgewiesen werden: KU70 mit ΔΔCT 1,36 ± 0,17 (n.s.) nach 45 min ISRT und 1,50 ± 0,25 (n.s.) nach 30 h ISRT und KU80 mit ΔΔCT 1,44 ± 0,36 (n.s.) nach 45 min ISRT und 1,31 ± 0,18 (n.s.) nach 30 h ISRT (**Abb.4c+d**).

Abbildung 4

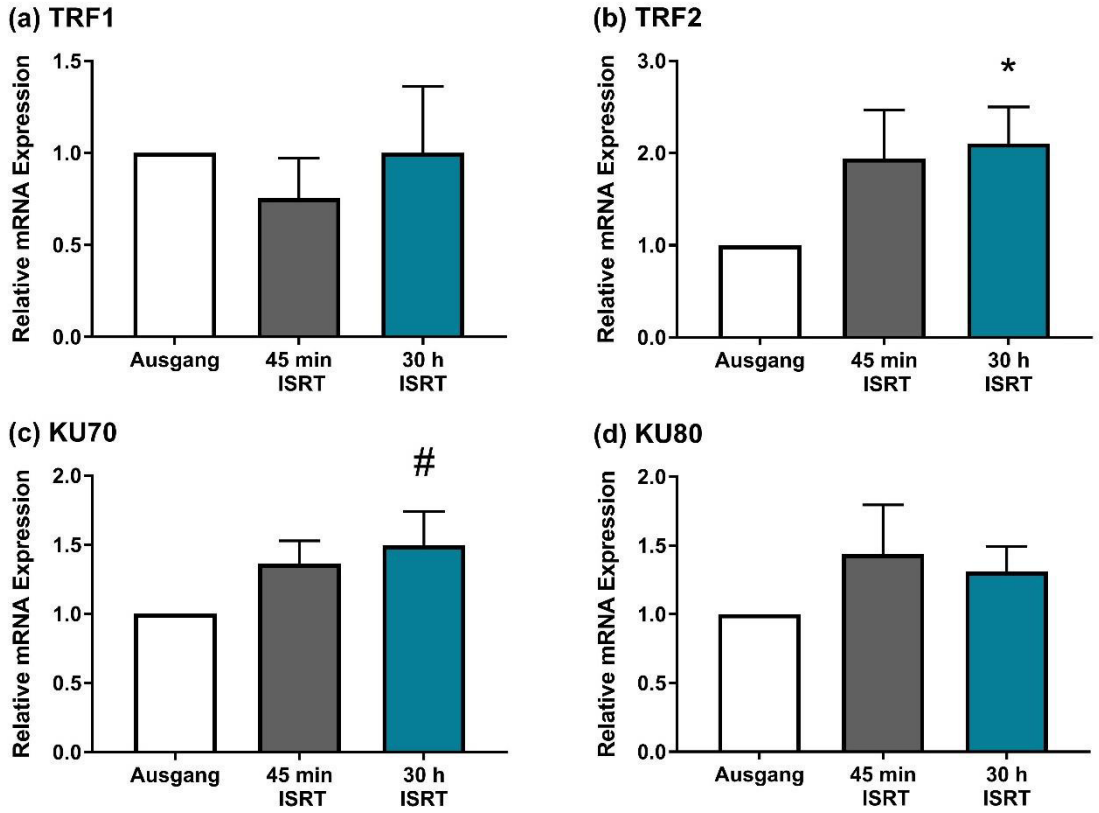

Abbildung 4: mRNA-Expressionsdaten telomerprotektiver Gene aus der ISRT-2 Studie nach 45 min und 30 h ISRT gemessen mittels qPCR (a) TRF1 (b) TRF2 (c) KU70 (d) KU80. Die Daten sind als mittlere ΔΔCT-Werte dargestellt, bezogen auf den Ausgangswert und RPLP0. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. *p-Wert ≤ 0.05 gegenüber dem Ausgangswert, #p-Wert 0,054 gegenüber dem Ausgangswert (zweiseitige asymptotische Signifikanz, Wilcoxon Signed Rank Test für verbundene Stichproben). Modifiziert nach Zietzer *et al.* [24]

Laufbandtraining führt zu einer unmittelbaren Steigerung des CD14-Signals in peripheren Blutleukozyten

Da körperliche Aktivität (und möglicherweise auch ISRT) zu einer Rekrutierung von Leukozyten ins periphere Blut führen und damit potentiell die gemessene Telomeraseaktivität in PBMCs beeinflussen,[33] erfolgte die Untersuchung der PBMC Lysate auf Änderung des Proteingehalts spezifischer Marker für Leukozytensubpopulationen. In der ISRT-1 Studie ließ sich so eine beinahe Verdoppelung des CD14-Signals nach einmaligem Laufbandtraining nachweisen: 32,10 ± 14,54 zu 63,25 ± 12,05 in % relativ zu GAPDH ($p \leq 0{,}05$) (**Abb.5a**). Für CD3 und CD20 zeigte sich in der ISRT-1 Studie keine signifikante Änderung nach einmaligem Laufbandtraining: CD3 mit 26,35 ± 5,32 zu 34,58 ± 7,37 (n.s.) und CD20 mit 36,77 ± 11,50 zu 47,65 ±16,49 (n.s.) alle in % relativ zu GAPDH (**Abb.5a**). Für die ISRT-2 Studie ließen sich keine signifikanten Änderungen der Markersignale in den PBMC-Lysaten nach 30 h ISRT im Vergleich zum Ausgangswert nachweisen: CD3 mit 34,92 ± 7,48 zu 39,70 ± 3,11 (n.s.), CD14 mit 82,31 ± 13,17 zu 76,13 ± 14,54 (n.s.) und CD20 mit 61,53 ± 31,53 zu 37,42 ± 11,77 (n.s.) alle in % relativ zu GAPDH (**Abb.5b**).

Abbildung 5

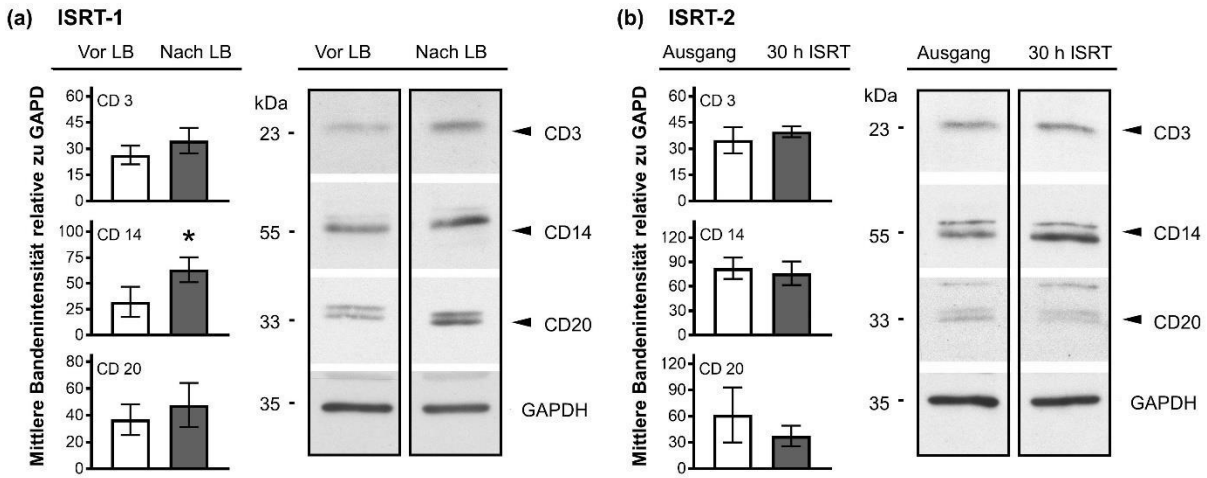

Abbildung 5: Immunoblot Zellmarkerproteinanalyse für CD3, CD14 und CD20 aus der ISRT-1 und ISRT-2 Studie an 5 Probanden mit mindestens zweifacher Steigerung der Telomeraseaktivität post interventionem. (a) ISRT-1 Studie (b) ISRT-2 Studie. Die linke Säule stellt die mittlere Signalintensität relativ zu GAPDH dar. Die rechte Säule zeigt repräsentative Banden eines Teilnehmers aus jeder Studie. *p-Wert ≤ 0.05 gegenüber dem Ausgangswert (zweiseitige Signifikanz, t-Test für verbundene Stichproben). Modifiziert nach Zietzer *et al.* [24]

Pioglitazon hemmt die Endothelaktivierung und Monozytentransmigration bei induzierter Arteriogenese

In unseren tierexperimentellen Versuchen konnten wir zunächst eine Reduktion der endothelialen Aktivierung durch Pioglitazon im 3-VO Modell der zerebralen Arteriogenese zeigen. Histomorphologisch lässt sich die Endothelaktivierung an einer Schwellung und Protusion der Endothelzellen ins Gefäßlumen erkennen. Wie in **Abb.6** repräsentativ dargestellt, wird die Endothelaktivierung bei G-CSF-induzierter therapeutischer Stimulation der Arteriogenese durch Pioglitazon vermindert. Ein weiterer entscheidender Schritt der Artriogenese besteht in der Einwanderung von Monozyten in den perivaskulären Raum, die sich immunhistologisch durch eine Anti-CD68 Färbung darstellen lässt. Hier konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon die monozytäre Migration in den perivaskulären Raum auch bei gleichzeitiger G-CSF Stimulation hemmt, wie in **Abb.7a** repräsentativ dargestellt.[30] Durch die lokale Sekretion von Wachstumsfaktoren um das Kollateralgefäß kommt es bei der Arteriogenese zu einer Proliferation von vaskulären Zellen, die durch eine Färbung gegen Ki67 sichtbar gemacht werden kann. Hier

Abbildung 6

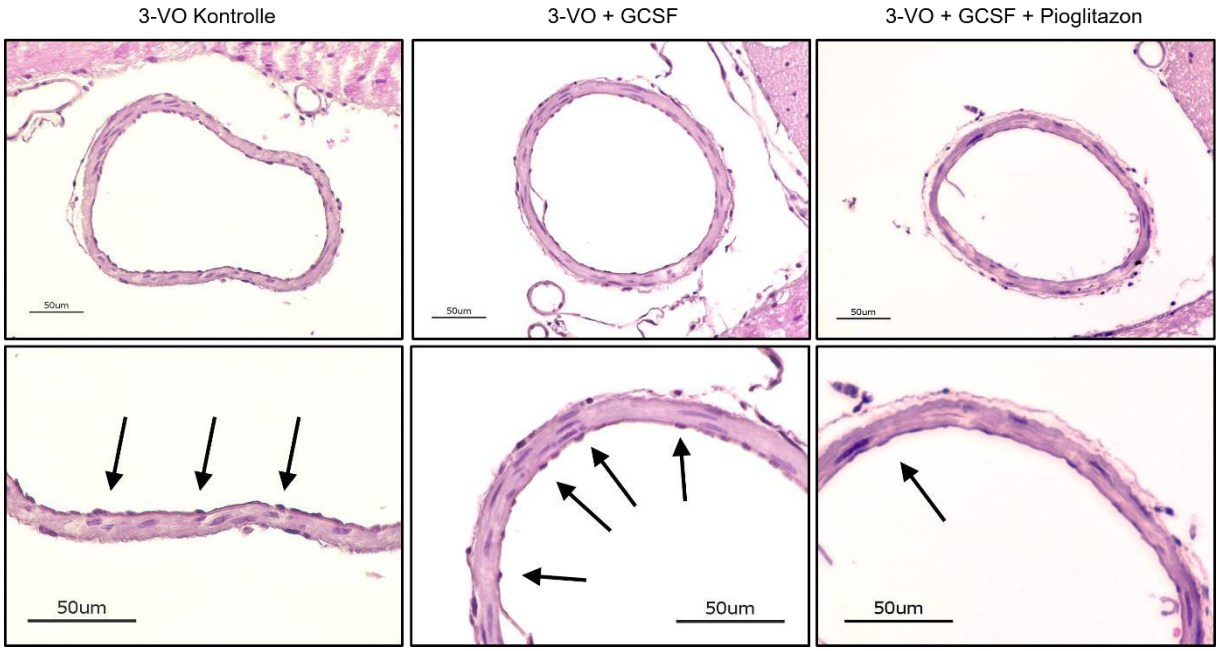

Abbildung 6: Repräsentative Darstellung der Effekte von Pioglitazon auf die Endothelaktivierung. Linke Spalte: unbehandelte 3-VO Kontrolle; mittlere Spalte: G-CSF behandelte 3-VO Tiere, rechte Spalte: G-CSF- und Pioglitazon behandelte 3-VO Tiere. Darstellung von sagittalen Gehirnschnitten im Areal der Arteria cerebralis posterior nach HE-Färbung 7 Tage postoperativ. Die Pfeile zeigen beispielhaft aktivierte Endothelzellen an. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 µm. Modifiziert nach Dülsner *et al.* [30]

ließen sich zwischen den rein G-CSF-behandelten und den G-CSF + Pioglitazon-behandelten Tieren keine relevanten Unterschiede nachweisen (**Abb.7b**).[30]

Abbildung 7

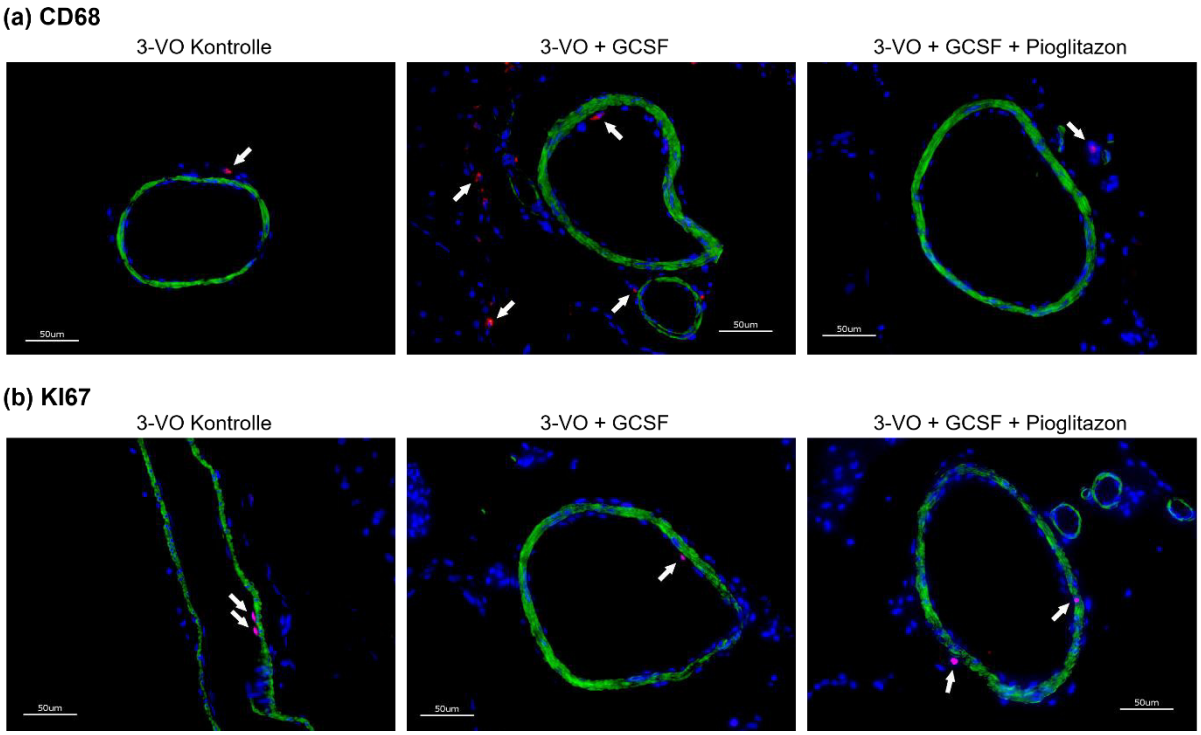

Abbildung 7: Repräsentative Abbildung immunhistologischer Fluoreszenzfärbungen zur Darstellung der Effekte von Pioglitazon auf die Monozytenmigration sowie die Gefäßzellproliferation. Darstellung von sagittalen Gehirnschnitten im Areal der Arteria cerebralis posterior. Linke Abbildung: reine 3-VO Kontrolle; mittlere Abbildung: G-CSF behandelte 3-VO Tiere; rechte Abbildung: G-CSF- und Pioglitazon behandelte 3-VO Tiere. (a) CD68-Färbung (rot), die Pfeile zeigen beispielhaft CD68 positive Zellen. (b) Ki67-Färbung (rot), die Pfeile zeigen beispielhaft Ki67 positive Zellen. Weitere Färbungen: Glattmuskuläres α-Aktin (grün), Kernfärbung (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 50 µm. Modifiziert nach Dülsner *et al.* [30]

Diskussion

Die regenerative Wirkung mononukleärer Zellen und deren parakrine, inflammatorische Prozesse bilden den Grundmechanismus für das arterielle Kollateralwachstum. In dieser Arbeit wurden in klinischen Studien die Effekte von unterschiedlichen Gefäßtherapieformen auf die Telomerbiologie mononukleärer Zellen untersucht. Zudem wurden in einer präklinischen Studie die Auswirkungen einer Behandlung mit Pioglitazon auf mononukleäre Effektorzellen der Arteriogenese beleuchtet. Zunächst konnte zum ersten Mal ein direkter Effekt von moderater

körperliche Aktivität auf die Telomeraseaktivität zirkulierender mononukleärer Zellen nachgewiesen werden. Bekannt ist, dass körperliche Aktivität besonders auf lange Sicht eine positive Wirkung auf die PBMC Telomerlänge hat. Werner *et al.* wiesen in diesem Zusammenhang nach, dass regelmäßig trainierende Ausdauersportler in höherem Alter über deutlich längere Telomere verfügen als entsprechende nicht aktive Kontrollen.[34] Nicht nur die Telomerlänge, auch die PBMC Telomeraseaktivität lässt sich über längere Zeiträume (mehreren Wochen) durch körperliche Aktivität steigern.[35] Ein direkter Effekt von körperlichem Training auf die Telomeraseaktivität, wie er sich in Zeiträumen von wenigen Stunden abspielt, wurde jedoch bislang uneinheitlich betrachtet und konnte bis dato nicht nachgewiesen werden.[36] Laye *et al.* konnten bei Probanden nach einem Ultra-Marathon keine signifikante Steigerung der PBMC Telomeraseaktivität zeigen,[27] während Chilton *et al.* zumindest eine Steigerung der mRNA-Expression der Telomerase-Untereinheit TERT (telomerase reverse transcriptase) unmittelbar nach körperlicher Aktivität dokumentieren konnten.[37] Einige Hauptfaktoren zur Erklärung dieser widersprüchlichen Ergebnisse offenbaren sich beim Vergleich der Studienpopulationen und Studienprotokolle. Es finden sich gravierende Unterschiede insbesondere beim Trainingszustand der Teilnehmer, bei der Intensität des Trainingsstimulus sowie bei technischen Abläufen, wie beispielsweise dem Blutentnahmezeitpunkt. Dies schränkt die Vergleichbarkeit der Studien stark ein.[24] Insbesondere der extreme Trainings-Stimulus aus der Studie von Laye *et al.* weicht von anderen Studien, die sich mit fortgesetzter, moderater körperlicher Aktivität beschäftigen, ab. Grundsätzlich scheint jedoch gerade moderates und kontinuierliches Training auf Dauer einen positiven Effekt auf die leukozytäre Telomerbiologie zu haben.[38, 39] Da in dieser Arbeit eine Steigerung der PBMC Telomeraseaktivität direkt nach einer körperlichen Trainingseinheit nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass hierin der Schlüssel zum Verständnis der Langzeiteffekte von körperlicher Aktivität auf die PBMC Telomerlänge liegt. Die in dieser Arbeit gezeigte Steigerung der Telomeraseaktivität könnte durch wiederholte einzelne Trainingseinheiten auf lange Sicht kumulieren und so zu den vielfach beschriebenen Telomerlängendifferenzen von Athleten und Nichtathleten höheren Alters führen.[24, 34]

Anhand der vorgestellten Ergebnisse lässt sich ebenfalls eine Hypothese formulieren, wie eine akute Telomeraseaktivitätssteigerung durch Laufbandtraining entstehen kann. Nach Laufbandtraining zeigt sich bei Probanden mit einer signifikant gesteigerten PBMC Telomeraseaktivität, dass dies mit einem ebenfalls gesteigerten CD14-Signal in der peripheren Leukozytenpopulation einhergeht.[24] Körperliche Aktivität führt bekanntermaßen zu einer Rekrutierung von Leukozyten und damit zu einer relevanten Änderung der Anteile einzelner Subgruppen an der peripheren Leukozytenpopulation.[28] Epel *et al.* haben in diesem Kontext

gezeigt, dass akuter psychologischer Stress ebenfalls zu einer kurzfristigen Steigerung der Telomeraseaktivität in Zusammenhang mit einer Rekrutierung von Monozyten führt.[40] Es ist daher denkbar, dass körperliche Aktivität auf vergleichbare Weise unmittelbar über eine Rekrutierung von CD14 positiven Zellen, mit höherer Telomeraseaktivität, eine Steigerung der messbaren PBMC Telomeraseaktivität bewirkt.[24, 41]

ISRT ist eine neue Behandlungsalternative für pAVK-Patienten, die auf dem Gegenpulsationsprinzip basiert. ISRT steigert die periphere Durchblutung durch Kompression der Hüft- und Oberschenkelregion und führt so zu einer signifikanten Verbesserung der absoluten Gehstrecke von pAVK-Patienten, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Die ISRT bewirkt folglich eine periphere Perfusionsverbesserung, die potentiell über eine lokale Induktion von Arteriogenese erreicht wird.[16] In Analogie hierzu konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass Gegenpulsationstherapie bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung die Perfusion im koronaren Gefäßbett positiv moduliert und die myokardiale Arteriogenese aktiviert.[12, 13] In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig die Auswirkungen einer adaptierten Form der Gegenpulsationstherapie auf die Telomerbiologie zirkulierender Leukozyten untersucht. Zunächst ließ sich nach nur einmaliger ISRT sowohl in der ISRT-1 (bei gesunden Probanden) als auch in der ISRT-2 Studie (bei pAVK-Patienten) keine signifikante Steigerung der PBMC Telomeraseaktivität nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Langzeitversuch, dass die ISRT neben den klinischen Effekten eine deutliche Steigerung der PBMC Telomeraseaktivität bewirkt. Diese Steigerung ist vergleichbar mit der durch einmaliges Laufbandtraining in jungen gesunden Probanden erzielten Steigerung der leukozytären Telomeraseaktivität.[24] Daraus lässt sich schließen, dass erst die Langzeitanwendung von ISRT einen hinreichend großen Stimulus für eine Telomeraseaktivitätsänderung darstellt.

Um die Mechanismen wie ISRT die PBMC Telomeraseaktivität beeinflusst weiter zu untersuchen, führten wir eine Zellmarkeranalyse der PBMC Subpopulationen in der ISRT-2 Studie analog zur ISRT-1 Studie durch. Hier konnte keine Änderung der Zellmarkerproteine nach Langzeit-ISRT in der ISRT-2 Studie festgestellt werden. Eine Steigerung der Telomeraseaktivität nach ISRT über die überproportionale Rekrutierung von bestimmten Leukozytenpopulationen ist damit unwahrscheinlich.[24]

Zusätzlich erfolgte in der ISRT-2 Studie die Untersuchung der PBMC mRNA-Expression zweier wichtiger Untereinheiten des Shelterin-Komplexes. Beim Shelterin-Komplex handelt es sich um einen Proteinkomplex aus sechs Untereinheiten, der sich der Telomer-DNA direkt anlagert und damit das Telomer schützt aber auch gleichzeitig die Interaktion mit dem Telomerase-Enzym

reguliert.[42, 43] Die Shelterin Untereinheiten TRF1 und TRF2 sind hierbei für die Verankerung des weiteren Komplexes an der Telomer Doppelstrang-DNA zuständig und damit unverzichtbar für die Shelterin-Rekrutierung.[43] Eine weitere Schlüsselrolle bei der Protektion der Telomere übernimmt das Proteinheterodimer KU70/80.[44] KU70/80 ist zudem an der Translokation von Telomerase-Untereinheiten in den Zellkern beteiligt.[32] In der ISRT-2 Studie konnte eine gesteigerte TRF2-mRNA-Expression nach ISRT nachgewiesen werden. In Zusammenschau mit der langfristig gesteigerten Telomerase Aktivität lässt sich so ein relevanter telomerprotektiver Effekt von ISRT konstatieren. Die Telomeraseaktivität zirkulierender Leukozyten ist neben der Telomerlänge einer der am besten etablierten Marker für kardiovaskuläre und immunologische Alterungsprozesse.[41, 45] Die Optimierung telomerprotektiver Parameter stellt ein für die Gegenpulsationstherapie bis dato unbekanntes Wirkprinzip dar, das mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Anteil an den vorbeschriebenen Therapieerfolgen der Gegenpulsationstherapie hat.[24]
Welchen Einfluss die Steigerung der Telomeraseaktivität sowie der TRF2-Expression schlussendlich auf die Arteriogenese und das klinische Outcome der pAVK-Patienten haben wird, kann im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit nicht abschließend evaluiert werden und bedarf weiterer Forschung. Dabei gilt es insbesondere Effekte von ISRT auf die leukozytäre Telomerlänge zu untersuchen, die in dem präsentierten Setting aufgrund der kurzen Interventionsdauer und der geringen Probandenzahl nicht statistisch valide zu untersuchen war.

Arteriogenese hängt direkt von der Einwanderung von Monozyten in den perivaskulären Raum ab, die dort ein pro-inflammatorisches Milieu schaffen und dadurch Remodellingprozesse steuern.[6] In der vorgestellten Arbeit konnten wir zeigen, dass der PPARγ-Agonist Pioglitazon sowohl die endotheliale Aktivierung als auch die Migration von CD68 positiven Zellen hemmt.[30] Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Sheu *et al.*, die *in vitro* zeigen konnten, dass eine PPARγ-Aktivierung mit der Monozytenmigration interagiert.[46] Als möglicher Mechanismus kommt eine Hemmung des MAP-Kinase Signalweges in Betracht, welcher von großer Bedeutung für die Arteriogenese ist.[7, 47] Dies legt auch die vorliegende Originalpublikation von Dülsner *et al.* nahe. Hier konnte *in vitro* eine dosisabhängige Abnahme der Phosphorylierung und damit eine Inaktivierung des MAP-Kinase Signalweges in THP-1 Zellen durch Pioglitazon nachgewiesen werden.[30]
Zusammenfassend zeigen die zuletzt präsentierten Ergebnisse, dass sich eine PPARγ-Aktivierung hemmend auf wichtige Prozesse der Arteriogenese auswirkt. Eine Inaktivierung von parakrinen inflammatorischen Prozessen mononukleärer Zellen ist hierbei erkennbar. Dies führt zu einer Interaktion mit einem der wichtigsten endogenen Protektionsmechanismen zur Kompensation

arterieller Stenose. Wie durch Dülsner *et al.* beschrieben könnte die Inhibierung der Arteriogenese erklären, warum PPARγ-Agonisten zwar gute Ergebnisse bei der Verbesserung kardiovaskulärer Risikofaktoren erzielen, jedoch keine deutliche Reduktion therapierelevanter Endpunkte bewirken.[22, 30]

Literaturverzeichnis

1. WHO: The top 10 causes of death Fact sheet N°310. (Accessed March 20, 2017. at http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html.)

2. Reinecke, H, Unrath, M, Freisinger, E, Bunzemeier, H, Meyborg, M, Lüders, F, Gebauer, K, Roeder, N, Berger, K, Malyar, NM: Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence. *Eur Heart J,* 36**:** 932-938, 2015.

3. Buschmann, I, Katzer, E, Bode, C: Arteriogenesis - is this terminology necessary? *Basic Res Cardiol,* 98**:** 1-5, 2003.

4. Schaper, W, Buschmann, I: Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovasc Res,* 43**:** 835-837, 1999.

5. Hoefer, IE, van Royen, N, Rectenwald, JE, Deindl, E, Hua, J, Jost, M, Grundmann, S, Voskuil, M, Ozaki, CK, Piek, JJ, Buschmann, IR: Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1- mediated mechanisms. *Circ Res,* 94**:** 1179-1185, 2004.

6. Buschmann, I, Heil, M, Jost, M, Schaper, W: Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis. *Microcirculation,* 10**:** 371-379, 2003.

7. Schaper, W: Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol,* 104**:** 5-21, 2009.

8. Bergmann, CE, Hoefer, IE, Meder, B, Roth, H, van Royen, N, Breit, SM, Jost, MM, Aharinejad, S, Hartmann, S, Buschmann, IR: Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *J Leukoc Biol,* 80**:** 59-65, 2006.

9. Zietzer, A, Hillmeister, P: Leucocyte telomere length as marker for cardiovascular ageing. *Acta Physiol (Oxf),* 211**:** 251-256, 2014.

10. Blackburn, EH: Telomere states and cell fates. *Nature,* 408**:** 53-56, 2000.

11. Schirmer, SH, Millenaar, DN, Werner, C, Schuh, L, Degen, A, Bettink, SI, Lipp, P, van Rooijen, N, Meyer, T, Böhm, M, Laufs, U: Exercise promotes collateral artery growth mediated by monocytic nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 35**:** 1862-1871, 2015.

12. Buschmann, EE, Utz, W, Pagonas, N, Schulz-Menger, J, Busjahn, A, Monti, J, Maerz, W, le Noble, F, Thierfelder, L, Dietz, R, Klauss, V, Gross, M, Buschmann, IR, Net.), ANA: Improvement of fractional flow reserve and collateral flow by treatment with external counterpulsation (Art.Net.-2 Trial). *Eur J Clin Invest,* 39**:** 866-875, 2009.

13. Gloekler, S, Meier, P, de Marchi, SF, Rutz, T, Traupe, T, Rimoldi, SF, Wustmann, K, Steck, H, Cook, S, Vogel, R, Togni, M, Seiler, C: Coronary collateral growth by external counterpulsation: a randomised controlled trial. *Heart,* 96**:** 202-207, 2010.

14. Murphy, TP, Cutlip, DE, Regensteiner, JG, Mohler, ER, Cohen, DJ, Reynolds, MR, Massaro, JM, Lewis, BA, Cerezo, J, Oldenburg, NC, Thum, CC, Jaff, MR, Comerota, AJ, Steffes, MW, Abrahamsen, IH, Goldberg, S, Hirsch, AT: Supervised exercise, stent revascularization, or medical therapy for claudication due to aortoiliac peripheral artery disease: the CLEVER study. *J Am Coll Cardiol,* 65**:** 999-1009, 2015.

15. Werner, D, Michalk, F, Hinz, B, Werner, U, Voigt, JU, Daniel, WG: Impact of enhanced external counterpulsation on peripheral circulation. *Angiology,* 58**:** 185-190, 2007.

16. Buschmann, EE, Brix, M, Li, L, Doreen, J, Zietzer, A, Li, M, Buschmann, I, Hillmeister, P: Adaptation of external counterpulsation based on individual shear rate therapy improves endothelial function and claudication distance in peripheral artery disease. *Vasa,* 45**:** 317-324, 2016.

17. Buschmann, I, Pries, A, Styp-Rekowska, B, Hillmeister, P, Loufrani, L, Henrion, D, Shi, Y, Duelsner, A, Hoefer, I, Gatzke, N, Wang, H, Lehmann, K, Ulm, L, Ritter, Z, Hauff, P, Hlushchuk, R, Djonov, V, van Veen, T, le Noble, F: Pulsatile shear and Gja5 modulate arterial identity and remodeling events during flow-driven arteriogenesis. *Development,* 137**:** 2187-2196, 2010.

18. Heil, M, Ziegelhoeffer, T, Pipp, F, Kostin, S, Martin, S, Clauss, M, Schaper, W: Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 283**:** H2411-2419, 2002.

19. Hoefer, IE, Grundmann, S, Schirmer, S, van Royen, N, Meder, B, Bode, C, Piek, JJ, Buschmann, IR: Aspirin, but not clopidogrel, reduces collateral conductance in a rabbit model of femoral artery occlusion. *J Am Coll Cardiol,* 46**:** 994-1001, 2005.

20. Duelsner, A, Gatzke, N, Glaser, J, Hillmeister, P, Li, M, Lee, EJ, Lehmann, K, Urban, D, Meyborg, H, Stawowy, P, Busjahn, A, Nagorka, S, Persson, AB, Buschmann, IR: Acetylsalicylic acid, but not clopidogrel, inhibits therapeutically induced cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab,* 32**:** 105-114, 2012.

21. Hsueh, WA, Law, RE: PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 21**:** 1891-1895, 2001.

22. Friedland, SN, Leong, A, Filion, KB, Genest, J, Lega, IC, Mottillo, S, Poirier, P, Reoch, J, Eisenberg, MJ: The cardiovascular effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Am J Med,* 125**:** 126-133, 2012.

23. Busch, HJ, Buschmann, IR, Mies, G, Bode, C, Hossmann, KA: Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab,* 23**:** 621-628, 2003.

24. Zietzer, A, Buschmann, EE, Janke, D, Li, L, Brix, M, Meyborg, H, Stawowy, P, Jungk, C, Buschmann, I, Hillmeister, P: Acute physical exercise and long-term individual shear rate therapy increase telomerase activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Physiol (Oxf)*, 2016.

25. Brix, M, Buschmann, EE, Zietzer, A, Jaurigue, JA, Li, L, Jungk, C, Buschmann, I, Janke, D, Hillmeister, P: Long-term individual shear rate therapy counterpulsation enhances plasma nitrite release in patients with PAD. *Vasa*: 1-9, 2016.

26. Janke, D, Jankowski, J, Rüth, M, Buschmann, I, Lemke, HD, Jacobi, D, Knaus, P, Spindler, E, Zidek, W, Lehmann, K, Jankowski, V: The "artificial artery" as in vitro perfusion model. *PLoS One,* 8: e57227, 2013.

27. Laye, MJ, Solomon, TP, Karstoft, K, Pedersen, KK, Nielsen, SD, Pedersen, BK: Increased shelterin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells and skeletal muscle following an ultra-long-distance running event. *J Appl Physiol (1985),* 112: 773-781, 2012.

28. Fry, RW, Morton, AR, Crawford, GP, Keast, D: Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol,* 64: 218-227, 1992.

29. Kappert, K, Meyborg, H, Fritzsche, J, Urban, D, Krüger, J, Wellnhofer, E, Kintscher, U, Fleck, E, Stawowy, P: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 3 promotes adipose tissue-driven macrophage chemotaxis and is increased in obesity. *PLoS One,* 8: e70542, 2013.

30. Duelsner, A, Gatzke, N, Hillmeister, P, Glaser, J, Zietzer, A, Nagorka, S, Janke, D, Pfitzner, J, Stawowy, P, Meyborg, H, Urban, D, Persson, AB, Buschmann, IR: PPARγ Activation Inhibits Cerebral Arteriogenesis in the Hypoperfused Rat Brain. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013.

31. Fischer, AH, Jacobson, KA, Rose, J, Zeller, R: Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc,* 2008: pdb.prot4986, 2008.

32. Pfingsten, JS, Goodrich, KJ, Taabazuing, C, Ouenzar, F, Chartrand, P, Cech, TR: Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model. *Cell,* 148: 922-932, 2012.

33. Mignini, F, Traini, E, Tomassoni, D, Vitali, M, Streccioni, V: Leucocyte subset redistribution in a human model of physical stress. *Clin Exp Hypertens,* 30: 720-731, 2008.

34. Werner, C, Fürster, T, Widmann, T, Pöss, J, Roggia, C, Hanhoun, M, Scharhag, J, Büchner, N, Meyer, T, Kindermann, W, Haendeler, J, Böhm, M, Laufs, U: Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation,* 120: 2438-2447, 2009.

35. Ornish, D, Lin, J, Daubenmier, J, Weidner, G, Epel, E, Kemp, C, Magbanua, MJ, Marlin, R, Yglecias, L, Carroll, PR, Blackburn, EH: Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol,* 9: 1048-1057, 2008.

36. Mundstock, E, Zatti, H, Louzada, FM, Oliveira, SG, Guma, FT, Paris, MM, Rueda, AB, Machado, DG, Stein, RT, Jones, MH, Sarria, EE, Barbé-Tuana, FM, Mattiello, R: Effects of physical activity in telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev,* 22: 72-80, 2015.

37. Chilton, WL, Marques, FZ, West, J, Kannourakis, G, Berzins, SP, O'Brien, BJ, Charchar, FJ: Acute Exercise Leads to Regulation of Telomere-Associated Genes and MicroRNA Expression in Immune Cells. *PLoS One,* 9**:** e92088, 2014.

38. Ludlow, AT, Zimmerman, JB, Witkowski, S, Hearn, JW, Hatfield, BD, Roth, SM: Relationship between physical activity level, telomere length, and telomerase activity. *Med Sci Sports Exerc,* 40**:** 1764-1771, 2008.

39. Borghini, A, Giardini, G, Tonacci, A, Mastorci, F, Mercuri, A, Sposta, SM, Moretti, S, Andreassi, MG, Pratali, L: Chronic and acute effects of endurance training on telomere length. *Mutagenesis*, 2015.

40. Epel, ES, Lin, J, Dhabhar, FS, Wolkowitz, OM, Puterman, E, Karan, L, Blackburn, EH: Dynamics of telomerase activity in response to acute psychological stress. *Brain Behav Immun,* 24**:** 531-539, 2010.

41. Lin, J, Epel, E, Cheon, J, Kroenke, C, Sinclair, E, Bigos, M, Wolkowitz, O, Mellon, S, Blackburn, E: Analyses and comparisons of telomerase activity and telomere length in human T and B cells: insights for epidemiology of telomere maintenance. *J Immunol Methods,* 352**:** 71-80, 2010.

42. Sfeir, A, de Lange, T: Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science,* 336**:** 593-597, 2012.

43. Hockemeyer, D, Collins, K: Control of telomerase action at human telomeres. *Nat Struct Mol Biol,* 22**:** 848-852, 2015.

44. Wang, Y, Ghosh, G, Hendrickson, EA: Ku86 represses lethal telomere deletion events in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106**:** 12430-12435, 2009.

45. Balistreri, CR, Pisano, C, Martorana, A, Triolo, OF, Lio, D, Candore, G, Ruvolo, G: Are the leukocyte telomere length attrition and telomerase activity alteration potential predictor biomarkers for sporadic TAA in aged individuals? *Age (Dordr),* 36**:** 9700, 2014.

46. Sheu, WH, Ou, HC, Chou, FP, Lin, TM, Yang, CH: Rosiglitazone inhibits endothelial proliferation and angiogenesis. *Life Sci,* 78**:** 1520-1528, 2006.

47. Eitenmüller, I, Volger, O, Kluge, A, Troidl, K, Barancik, M, Cai, WJ, Heil, M, Pipp, F, Fischer, S, Horrevoets, AJ, Schmitz-Rixen, T, Schaper, W: The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res,* 99**:** 656-662, 2006.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Andreas Zietzer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Über den Einfluss von Gegenpulsationsverfahren, Laufbandtraining und PPARγ-Agonisten auf die leukozytäre Telomerbiologie und das arterielle Kollateralwachstum“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

_____

Datum Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Andreas Zietzer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Zietzer A, Buschmann EE, Janke D, Li L, Brix M, Meyborg H, Stawowy P, Jungk C, Buschmann I, Hillmeister P. Acute physical exercise and long-term individual shear rate therapy increase telomerase activity in human peripheral blood mononuclear cells. Acta Physiol (Oxf). 2016 Oct 22. Epub ahead of print.

Beitrag im Einzelnen:

Herr Zietzer ist hauptverantwortlich für die Publikation 1. Herr Zietzer war direkt an der Initiierung und Planung der ISRT-Studien beteiligt, wobei er bei der ISRT-1 Studie federführend für das Studiendesign sowie für die Erstellung des Ethikantrages verantwortlich war. Im Weiteren war Herr Zietzer unmittelbar an der Etablierung einer eigens für die Studien erstellten Laborumgebung beteiligt. Für die Durchführung der ISRT-2 Studie war Herr Zietzer neben Frau Michèle Brix (Hauptverantwortlich ISRT-2 Studie) mitverantwortlich. Im klinischen Teil der ISRT Studien war Herr Zietzer für den Probandeneinschluss, die direkte Durchführung der ISR Therapie inklusive der in Publikation 2 veröffentlichten Messungen mitverantwortlich.

Eine weitere Hauptaufgabe stellt die Etablierung sowie die Durchführung der Isolation mononukleärer Zellen dar sowie die Etablierung der Isolation von Blutplasma zusammen mit Michèle Brix. In Bezug auf die Messung der Telomeraseaktivität war Herr Zietzer für sämtliche Schritte von der Etablierung bis zur Auswertung hauptverantwortlich. Hierzu zählen insbesondere die Etablierung und Durchführung des TRAP-Assays, die Messungen der Proteinkonzentration, die Herstellung der Polyacrylamidgele, die Färbung und Analyse der Gele, inklusive statistischer Auswertung und Erstellung der Graphen. Bei der Expressionsanalyse aller für die Telomerbiologie relevanten Gene war Herr Zietzer federführend für die Planung und Auswahl der Zielgene verantwortlich sowie an allen Schritten von RNA-Isolierung, Messung von Konzentration und Reinheit der RNA, Transkription in cDNA, Durchführung der qPCR hauptverantwortlich. Die statistische Auswertung und Analyse der Ergebnisse wurde ebenfalls durch Herrn Zietzer durchgeführt. Bei den Immunoblotuntersuchungen war Herr Zietzer für die Planung und Auswahl der Zielproteine maßgeblich verantwortlich. Ebenso führte Herr Zietzer die Auswertung und statistische Analyse der Immunoblotuntersuchungen durch. In Bezug auf das Manuskript erstellte Herr Zietzer bereits den ersten Entwurf und war auch danach in jeden Schritt der Revision hauptverantwortlich involviert. Insbesondere zählt hierzu

auch die Erstellung sämtlicher in der Publikation enthaltener Abbildungen und Tabellen.
Publikation 2: Buschmann EE, Brix M, Li L, Doreen J, Zietzer A, Li M, Buschmann I, Hillmeister P. Adaptation of external counterpulsation based on individual shear rate therapy improves endothelial function and claudication distance in peripheral artery disease. Vasa. 2016;45(4):317-24.
Beitrag im Einzelnen:
Herr Zietzer war an der Initiierung und Planung der ISRT-2 Studie beteiligt. Außerdem führte er klinische Messungen von Gehstrecke, FMD sowie des ABI durch. Ebenso war er für die Planung und Durchführung der ISR Therapie mitverantwortlich. Herr Zietzer war ebenfalls an der Revision und Korrektur des Manuskriptes beteiligt.

Publikation 3: Duelsner A, Gatzke N, Hillmeister P, Glaser J, Zietzer A, Nagorka S, Janke D, Pfitzner J, Stawowy P, Meyborg H, Urban D, Bondke Persson A, Buschmann IR. PPARγ activation inhibits cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. Acta Physiol (Oxf). 2014 Feb;210(2):354-68
Beitrag im Einzelnen:
Herr Zietzer war hier maßgeblich an der Anfertigung immunhistologischer Färbungen gegen CD68, Ki67, glattmuskuläres α-Aktin sowie an HE-Färbungen beteiligt, die er selbständig durchführte. Des Weiteren war er hauptverantwortlich für die Erstellung repräsentativer Aufnahmen und ist damit Urheber der Abbildungen 4 a, c sowie 5 a. Herr Zietzer war ebenfalls an der Revision und Korrektur des Manuskriptes beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

_____

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

_____

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

1. *Zietzer A, Buschmann EE, Janke D, Li L, Brix M, Meyborg H, Stawowy P, Jungk C, Buschmann I, Hillmeister P.* Acute physical exercise and long-term individual shear rate therapy increase telomerase activity in human peripheral blood mononuclear cells. Acta Physiol (Oxf). 2017 Jun;220(2):251-262.

2. *Buschmann EE, Brix M, Li L, Doreen J, Zietzer A, Li M, Buschmann I, Hillmeister P.* Adaptation of external counterpulsation based on individual shear rate therapy improves endothelial function and claudication distance in peripheral artery disease. Vasa. 2016;45(4):317-24.

3. *Duelsner A, Gatzke N, Hillmeister P, Glaser J, Zietzer A, Nagorka S, Janke D, Pfitzner J, Stawowy P, Meyborg H, Urban D, Bondke Persson A, Buschmann IR.* PPARγ activation inhibits cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. Acta Physiol (Oxf). 2014 Feb;210(2):354-68

Publikation 1

http://dx.doi.org/10.1024/0301-1526/a000544

Seiten 32 - 43

Publikation 2

http://dx.doi.org/10.1024/0301-1526/a000544

Seiten 45 - 52

Publikation 3

http://dx.doi.org/10.1111/apha.12179

Seiten 54 – 68

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen hier nicht einsehbar

Vollständige Publikationsliste

Peer-reviewed Artikel

Zietzer A, Buschmann EE, Janke D, Li L, Brix M, Meyborg H, Stawowy P, Jungk C, Buschmann I, Hillmeister P. Acute physical exercise and long-term individual shear rate therapy increase telomerase activity in human peripheral blood mononuclear cells. Acta Physiol (Oxf). 2016 Oct 22. Epub ahead of print.

Brix M, Buschmann EE, Zietzer A, Jaurigue JA, Li L, Jungk C, Buschmann I, Janke D, Hillmeister P. Long-term individual shear rate therapy counterpulsation enhances plasma nitrite release in patients with PAD. Vasa. 2017 Jan;46(1):37-45.

Buschmann EE, Brix M, Li L, Doreen J, Zietzer A, Li M, Buschmann I, Hillmeister P. Adaptation of external counterpulsation based on individual shear rate therapy improves endothelial function and claudication distance in peripheral artery disease. Vasa. 2016;45(4):317-24.

Zietzer A, Hillmeister P. Leucocyte telomere length as marker for cardiovascular ageing. Acta Physiol (Oxf). 2014 Jun;211(2):251-6.

Duelsner A, Gatzke N, Hillmeister P, Glaser J, Zietzer A, Nagorka S, Janke D, Pfitzner J, Stawowy P, Meyborg H, Urban D, Bondke Persson A, Buschmann IR. PPARγ activation inhibits cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. Acta Physiol (Oxf). 2014 Feb;210(2):354-68

Kongress-Präsentationen

2016 Poster Präsentation Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie:

Individuelle Scherratentherapie (ISRT) und körperliches Training steigern die leukozytäre Telomerase Aktivität. Neue diagnostische und therapeutische Optionen für PAVK-Patienten. *Zietzer A, Brix M, Janke D, Meyborg H, Stawowy P, Ritter O, Buschmann I, Buschmann EE, Hillmeister P*

2015 Vortrag Jahrestagung der Deutschen Angiologischen Gesellschaft:
Direct evidence for the effect of treadmill running and individual shear rate therapy (ISRT) on leukocyte telomere biology. *Zietzer A, Brix M, Li L, Jungk C, Buschmann I, Buschmann EE, Hillmeister P*.

2014 Poster-Präsentationen Jahrestagung der Deutschen Angiologischen Gesellschaft:

- The molecular effect of personal shear rate therapy on vascular biology: *Zietzer A, Brix M, Jungk C, Buschmann I, Buschmann EE, Hillmeister P*.
- Personal Shear Rate Therapy in patients with PAD. *Brix M, Zietzer A, Li L Janke D, Buschmann I, Hillmeister P. Buschmann EE.*

Danksagung

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. med. Ivo Buschmann sowie Dr. rer. nat. Philipp Hillmeister für die Überlassung des Themas zu dieser Promotion und für die in allen Belangen exzellente Betreuung. Hier soll ausdrücklich auch das mir eingeräumte hohe Maß an wissenschaftlicher Freiheit und der weite Gestaltungsspielraum genannt werden, die für die Entstehung dieser Arbeit aber auch für meine grundlagenwissenschaftliche Ausbildung entscheidend waren. Ebenso möchte ich Dr. rer. nat. Doreen Janke, Dr. med., Dr. med. univ. Eva Buschmann und Dr. med. vet. André Dülsner für ihre praktisch experimentelle und wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung danken. Michèle Brix, Jonnel Jaurigue, Lulu Li und Constantin Jungk danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit. Besonderer Dank gebührt außerdem der Deutschen Herzstiftung e.V., die mich im Rahmen des Kaltenbach-Promotionsstipendiums unterstütz hat. Weiter danke ich meinen Eltern Christa Zietzer und Dr med. vet. Alexander Zietzer dafür, dass sie mir eine universitäre Ausbildung und eine Promotion ermöglicht haben. Zuletzt möchte ich Julia Weber für ihre alltägliche Unterstützung danken.