

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Assoziation der leukozytären Telomerlänge mit
echokardiographischen Parametern der kardialen Struktur und
Funktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ingke Winther-Teichmann

aus Berlin

Datum der Promotion: 12.09.2014

Für Peter Martin

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (deutsch)	5
Abstract (english)	7
1. Einleitung	9
1.1 Biologie der Telomere.....	9
1.1.1 Struktur und Funktion der Telomere.....	9
1.1.2 Die Telomerlänge und ihre Regulation.....	11
1.2 Telomere und Altern.....	16
1.3 Telomere und altersabhängige Erkrankungen.....	18
1.4 Die Telomere und das menschliche Herz.....	19
1.5 Fragestellung der Studie.....	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Studienpopulation.....	22
2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	22
2.1.2 Datenerhebung.....	22
2.2 Messung der mittleren leukozytären Telomerlänge (LTL).....	24
2.2.1. Isolation der DNA.....	24
2.2.2 Qualitätsanalyse der DNA durch Spektrophotometrie.....	25
2.2.3 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	27
2.3 Qualitätsanalyse der Real Time PCR Methode.....	33
2.3.1 Reproduzierbarkeit der PCR Methode.....	33
2.3.2 Prüfung der Korrelation der PCR Methode mit der Terminal Restriction Fragment (TRF) – Methode.....	33
2.4 Statistische Analysen.....	37
3. Ergebnisse	39
3.1 Qualitätsanalyse der PCR Methode zur Bestimmung der mittleren LTL.....	39
3.2 Studienpopulation.....	41
3.3 Verteilung der Telomerlänge in der Population.....	44

3.4 Assoziation der mittleren LTL mit echokardiographischen Parametern.....	45
4. Diskussion.....	47
4.1 Real Time PCR Methode.....	48
4.2 Studienpopulation.....	49
4.3 Telomerlänge und chronologisches Alter.....	50
4.4 Telomerlänge und Herzfunktion.....	52
4.5 Telomere und Herzstruktur.....	56
4.6 Stärken und Grenzen der Studie.....	60
4.7 Schlussfolgerung.....	62
5. Abkürzungsverzeichnis.....	63
6. Literaturverzeichnis.....	66
7. Anhang.....	78
7.1 Lebenslauf.....	78
7.2 Publikationen.....	80
7.3 Danksagung.....	81
7.4 Eidesstattliche Versicherung	83

Abstrakt (deutsch)

Telomere sind DNA Strukturen, die sich an den Enden von eukaryotischen Chromosomen befinden. Sie bestehen beim Menschen aus einer sich immer wiederholenden Sequenz von Basen (TTAGGG)_n. Die Telomere schützen die freien Enden der Chromosomen vor enzymatischem Abbau und Degradation. Aufgrund des sogenannten Endreplikationsproblems verkürzen sich die Telomere in den meisten somatischen Zellen mit jeder Zellteilung. Die Länge der Telomere ist ein Indikator für die replikative Geschichte einer Zelle und wird somit auch als Maß für das biologische Altern verstanden. In verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang der Telomerlänge sowohl mit dem Alter an sich als auch mit verschiedenen altersabhängigen Erkrankungen nachgewiesen werden. Da das Altern einen Risikofaktor für Herz-Kreislauferkrankungen darstellt, ist der Zusammenhang zwischen Telomerlänge und kardiovaskulären Parametern von wissenschaftlichem Interesse.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang der mittleren leukozytären Telomerlänge (LTL) mit der kardialen Struktur und Funktion von Patienten mit Bluthochdruck untersucht werden. Die Population bestand aus 1106 Patienten, davon waren 921 Männer (83,3 %) und 185 Frauen (16,7 %) mit einem mittleren Alter von 57,9 +/- 9,8 Jahren. 901 Patienten (81,5 %) litten an koronarer Herzkrankheit (KHK) und 591 Patienten (53,4 %) hatten bereits einen Herzinfarkt erlitten, der zeitlich mindestens einen Monat vor Aufnahme in die Studie zurücklag. Somit wurde in Ergänzung zu bisherigen vergleichbaren Studien eine klinische Population mit einem hohen Anteil von manifesten kardiovaskulären Erkrankungen abgebildet.

Im Rahmen der Arbeit wurde eine von Cawthon beschriebene Methode zur Messung der LTL verwendet (Cawthon 2002). Dieses Verfahren ist für eine umfangreiche Probenanzahl einsetzbar und basiert auf der Technik der *Real Time Polymerase Kettenreaktion* (PCR). Diese Methode erlaubte es, die mittlere LTL aus einzelnen Blutproben anhand des Verlaufs des Fluoreszenzsignals während der Amplifikation zu vermessen. Bei der Qualitätsanalyse dieser Methode konnte die vorbeschriebene Korrelation mit der „*terminal restriction fragment*“ (TRF) Methode bestätigt werden (Cawthon 2002). Die TRF Methode beruht auf einem grundsätzlich anderen Prinzip,

nämlich der Southern-Blot Technik.

Nach der Bestimmung der mittleren LTL in den Blutproben von 1106 Patienten wurde die Beziehung der mittleren LTL Messwerte mit den echokardiographischen Parametern in einem multivariaten statistischen Modell untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der mittleren LTL und der Ejektionsfraktion (EF) als Maß für die Herzfunktion sowie dem linksventrikulären Massenindex (LVMI) und der interventrikulären Septumdicke (IVST) als Parameter für die Herzstruktur bestand. Hierbei war eine Verdopplung der mittleren LTL mit einer signifikanten relativen Zunahme der LVMI um 3,7 % (95 % KI = 0,1 % bis 7,3 %, $p = 0,044$), der IVST um 2,7 % (95 % KI = 0,4 % bis 5,0 %, $p = 0,021$) und einer absoluten Zunahme der EF um 0,99 % (95 % KI = 0,11 % bis 1,87 %, $p = 0,028$) assoziiert. Die Größenordnung dieser Effekte liegt im Bereich von Ergebnissen bei entsprechenden genetischen Assoziationsstudien zur mittleren LTL. Die vorliegenden Resultate unterstützen im Kontext der Ergebnisse anderer klinischer und experimenteller Studien die Annahme, dass die mittlere LTL für klinisch relevante Parameter der kardialen Struktur und Funktion von Bedeutung ist, auch wenn die biologischen Hintergründe der nachgewiesenen Zusammenhänge bislang noch nicht geklärt werden konnten.

Inwieweit die Telomere die Regenerationsfähigkeit von Geweben beeinflussen und für innovative Therapien bei Herzerkrankungen zugänglich sind, bleibt damit eine spannende Frage für die Zukunft.

Abstract (english)

Telomeres are DNA structures located at the end of eucariotic chromosomes. In humans they are composed of repetitive sequences of bases (TTAGGG)_n. They protect the end of the chromosomes from degradation. Due to the so called end-replication-problem the telomeres shorten with each cell division in most somatic cells. Consequently telomere length is an indicator of the replicative history of a cell and thus can also be considered as a marker for biological ageing.

Several studies showed an association of telomere length with ageing and also with age related diseases. As ageing is one of the main risk factors for cardiovascular diseases, the association between telomere length and different cardiovascular parameters is of scientific interest.

Against this background the present work sought to investigate the association of the mean leucocyte telomere length (LTL) with cardiac structure and function in patients with arterial hypertension. The population consisted of 1106 patients, thereof 921 men (83,3 %) and 185 women (16,7 %) with a mean age of 57,9 +/- 9,8 years. 81,5 % (901) had a history of coronary heart disease and 53,4 % (591) had suffered from a myocardial infarction which occurred at least 1 month before inclusion in this study. This data indicated that this cohort had a high rate of prevalent cardiovascular diseases which is in agreement with comparable studies investigating the role of mean LTL in the past.

For the present work a method for the measurement of mean LTL described by Cawthon (Cawthon, 2002) was used. This method is applicable for analysis of a high number of samples and is based on the *real time polymerase chain reaction* (PCR) technique. With this method it was possible to measure the mean LTL from different blood samples by analyzing the course of the fluorescent signal during amplification. The quality analysis confirmed the correlation with the „*terminal restriction fragment*“ (TRF) method that has also previously been described (Cawthon 2002). The TRF method is based on a different principle, namely the southern blotting technique.

After measuring the blood samples of 1106 patients, the association of mean LTL with echocardiographic parameters was analyzed with a multivariate statistical model.

The analysis revealed a significant statistical association between mean LTL and

ejection fraction (EF) as a parameter of heart function and left ventricular mass index (LVMI) and interventricular septum thickness (IVST) as parameters for heart structure. Thus a doubling of mean LTL was associated with a significant relative increase of LVMI of 3,7 % (95 % KI = 0,1 % to 7,3 %, $p = 0,044$), of IVST of 2,7 % (95 % KI = 0,4 % bis 5,0 %, $p = 0,021$) and an absolute increase of EF of 0,99 % (95 % KI = 0,11% bis 1,87%, $p = 0,028$), respectively.

The observed effect sizes correspond to those of genetic association studies between mean LTL and cardiovascular diseases.

In the context of other clinical and experimental studies the present results support the role of mean LTL for cardiac structure and function and thus heart disease. However the biological background of the shown associations could not yet be clarified.

If telomeres have an influence on the regeneration capacity of tissues and if they might be a target for innovative therapies in cardiac diseases remains an exciting question for the future.

1. Einleitung

1.1 Biologie der Telomere

1.1.1 Struktur und Funktion der Telomere

Telomere sind DNA Strukturen, die sich an den Enden von eukaryotischen Chromosomen befinden. Sie bestehen beim Menschen aus einer sich immer wiederholenden Sequenz von Basen (TTAGGG)_n, die sich typischerweise über 5 – 15 Kilobasenpaare (kbp) erstreckt (Moyzis et al. 1988). Ihr Vorhandensein wurde 1938 von Hermann Müller erstmals beschrieben. Müller hatte in den Chromosomen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* durch Röntgenstrahlen Brüche erzeugt und dabei entdeckt, dass es eine Struktur gibt, die die Enden der Chromosomen vor schädlichen Einflüssen schützt (Muller 1938). Für ebendiese Struktur prägte Müller den Begriff Telomer (griech: telos = Ende; meros = Teil). Drei Jahre später machte Barbara McClintock unabhängig davon ähnliche Beobachtungen bei ihren Experimenten mit Chromosomenbrüchen bei Maispflanzen (McClintock 1941).

Erst etwa 40 Jahre später entschlüsselten Elizabeth Blackburn und Joseph Gall im Jahr 1978 die erste Telomersequenz (TTGGG) bei dem Einzeller *Tetrahymena* (Blackburn & Gall 1978); 1988 dann erfolgte die Identifikation der charakteristischen Telomerbasensequenz TTAGGG beim Menschen durch Robert Moyzis (Moyzis et al. 1988).

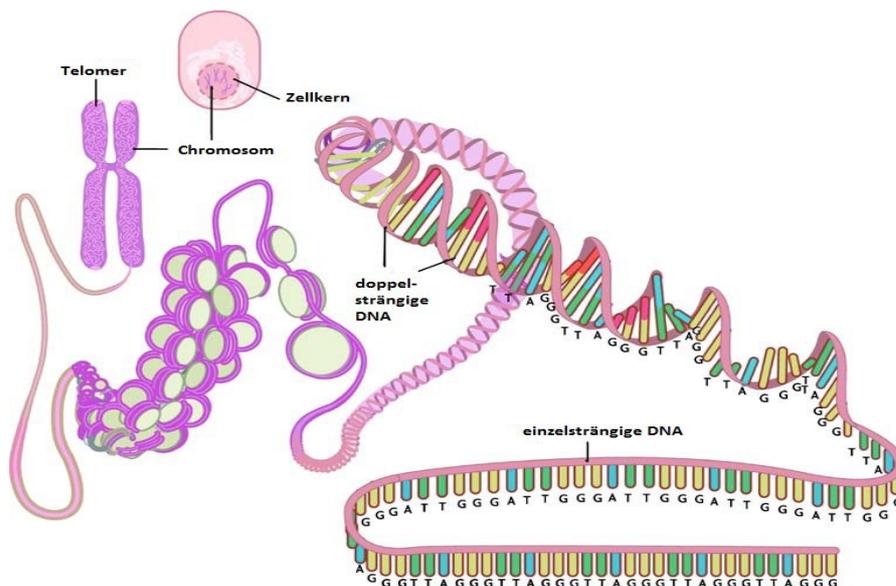


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Telomers am Ende eines Chromosoms: Der erste Abschnitt besteht aus doppelsträngiger DNA. Am Ende des Telomers befindet sich der einzelsträngige Überhang mit der charakteristischen repetitiven Sequenz. (Abb. modifiziert aus Oeseburg et al. 2010)

Die Telomere enden, wie in Abbildung (Abb.) 1 schematisch dargestellt, in einem einzelsträngigen Guanin(G)-reichen Überhang am 3'-Ende der DNA (Wright et al. 1997). Dieser Überhang ermöglicht die Formierung des Telomers zu einer doppelten Schleifenform, bestehend aus einer doppelsträngigen T-Schleife (telomer loop) und einer einzelsträngigen D-Schleife (displacement loop) (Griffith et al. 1999) (Abb. 2 und 3). An diese Schleifen sind verschiedene Proteine (z. B. die Telomere Repeat Binding Factors (TRF) 1 und TRF 2) gebunden, die unter anderem für die Telomerlängenregulation und den Schutz der Telomere wichtig sind. Gemeinsam werden die hier gebundenen Proteine als Shelterin-Komplex bezeichnet (de Lange 2005; Palm & de Lange 2008).

Sowohl die charakteristische Schleifenform als auch der Shelterin-Komplex schützen die freien Enden der Chromosomen vor enzymatischem Abbau und Degradation. Auch stellen diese beiden Elemente einen Schutz vor der irrtümlichen Erkennung als offene Bruchstelle in der DNA dar. Diese Verkennung hätte zur Folge, dass in der Zelle ein Reparaturversuch durch das *DNA Damage Response System* ablaufen würde. Dabei könnte eine End-zu-End-Fusion der angenommenen Bruchstellen zur Fusion von verschiedenen Chromosomen führen (de Lange et al. 2002). Diese Fusion würde in der Metaphase der Zellteilung ein Auseinanderreißen dieser Chromosomen an einer beliebigen Stelle zur Folge haben, was unter Umständen einen weitreichenden Verlust an Erbinformation nach sich ziehen könnte. Die Telomere stellen insofern einen wichtigen Schutz- und Stabilisationsmechanismus für das Erbgut dar.

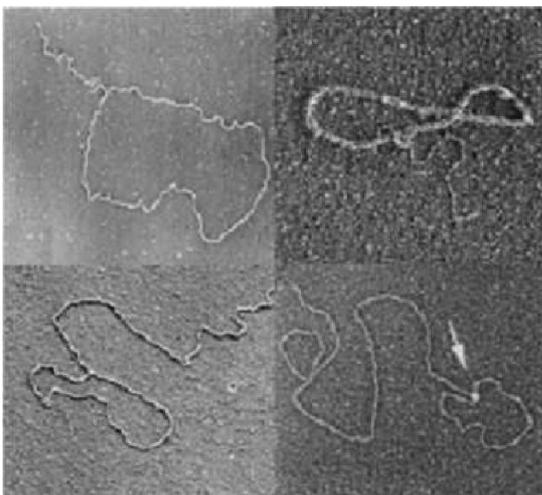


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Darstellung der schleifenförmigen Telomer-Enden an vier verschiedenen Chromosomen beispielhaft abgebildet: Der Pfeil in der Abbildung unten rechts weist auf die im Text beschriebene Schleifenform. (Abb. aus Griffith et al. 1999)

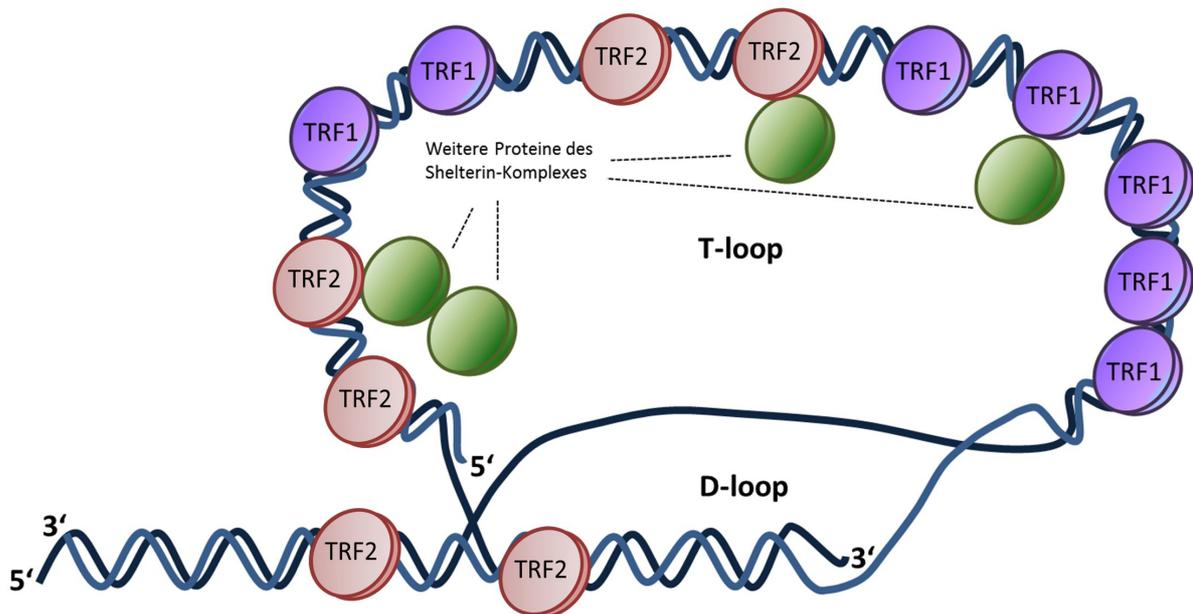


Abb. 3: Schematische Darstellung der Telomer-Enden: Die DNA bildet eine D-Schleife und eine T-Schleife (D-loop, T-loop). An die Telomer-DNA sind die Telomere Repeat Binding Factors (TRF) 1 und TRF 2 sowie weitere Proteine des Shelterin-Komplexes gebunden. (Abb. vereinfacht nach Butt et al. 2010)

1.1.2 Die Telomerlänge und ihre Regulation

Die Länge der Telomere ist variabel. Zwischen den verschiedenen Spezies (Cherif et al. 2003; Brümmendorf et al. 2002), aber auch innerhalb einer Spezies (Takubo et al. 2002; Coviello-McLaughlin & Prowse 1997; Hunt et al. 2008), zwischen den Organen einer einzelnen Person (Takubo et al. 2002) und sogar zwischen den einzelnen Chromsomen einer Zelle (Martens et al. 1998; Graakjaer et al. 2003) können Unterschiede in der Telomerlänge bestehen. Familienstudien legen die Vermutung nahe, dass diese Längenunterschiede mit genetisch determiniert sind (Slagboom et al. 1994; Njajou et al. 2007; Jeanclos et al. 2000; Vasa-Nicotera et al. 2005; Nawrot et al. 2004). Äußere Faktoren wie oxidativer Stress (Von Zglinicki 2002) oder ultraviolette Strahlung (Oikawa et al. 2001) spielen wahrscheinlich eine weitere Rolle in Bezug auf das Ausmaß der Telomerverkürzung im Laufe des Lebens.

Grundlegenden Einfluss auf die Telomerverkürzung hat der Prozess der DNA-Vervielfältigung, der bei allen sich teilenden Zellarten stattfindet.

Die normale DNA-Vervielfältigung erfolgt durch semikonservative Replikation, bei der jeweils ein Elternstrang von der DNA-Polymerase kopiert wird (Abb. 4).

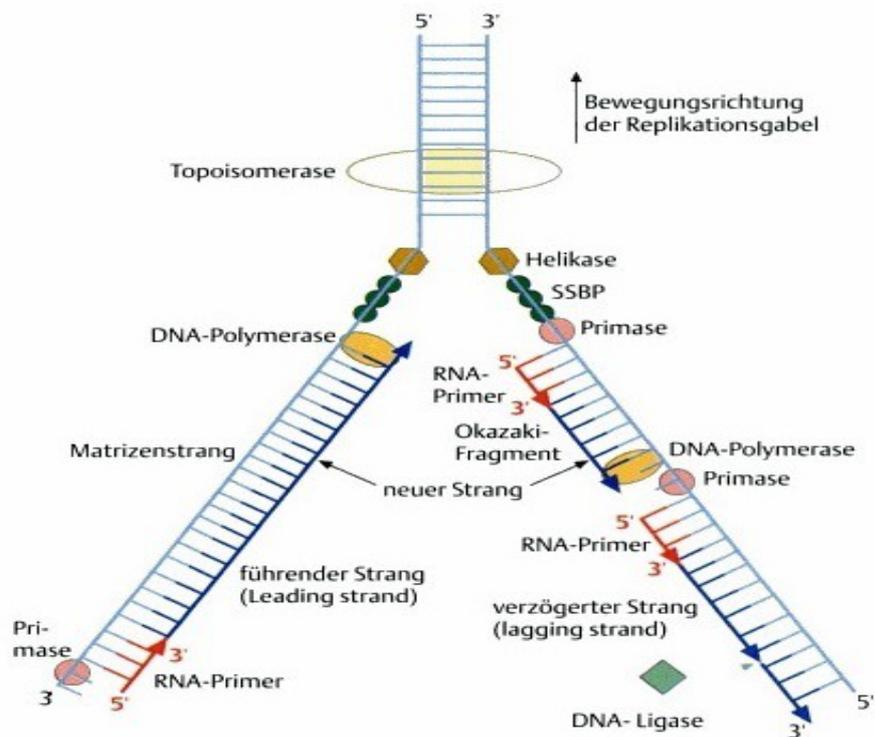


Abb. 4: Schematische Darstellung der semikonservativen DNA-Replikation: Die Ausgangs-DNA ist im Bild oben hell, die hinzugefügte DNA unten dunkel dargestellt. Die Topoisomerase entwindet die DNA, durch die Helikase werden die Doppelstränge voneinander getrennt und die Einzelstränge durch das Einzelstrangstabilisierende Protein (single strand binding protein SSBP) stabilisiert. Durch die Primase wird ein RNA-Primer angelagert, von dem aus die DNA-Polymerase den neuen Strang synthetisieren kann. Am verzögerten Strang erfolgt diese Synthese diskontinuierlich. Nachdem die RNA-Primer entfernt sind, schließt eine DNA-Ligase die Lücken zwischen den Okazaki-Fragmenten. (Abb. aus Janning & Knust 2004)

In eukaryotischen Zellen wird die Synthese von DNA durch die DNA-Polymerase immer nur in einer Richtung kontinuierlich vorgenommen, nämlich in 3'-5' Richtung. Die Synthese des anderen Stranges muss diskontinuierlich erfolgen, und zwar indem, ausgehend von mehreren RNA-Primern, die DNA-Synthetase entgegen der Öffnungsrichtung des Doppelstranges läuft und den Tochterstrang so stückweise synthetisiert (Abb. 5). Diese sogenannten Okazaki-Fragmente werden dann später von einer DNA-Ligase verbunden. Abhängig vom Anlagerungsort des am weitesten außen gelegenen Primers, kann jedoch das letzte Stück des Chromosoms nicht kopiert werden. So geht bei jeder Replikation ein Teil der telomerischen DNA verloren. Dies bezeichnet man auch als das Endreplikationsproblem (Janning & Knust 2004).

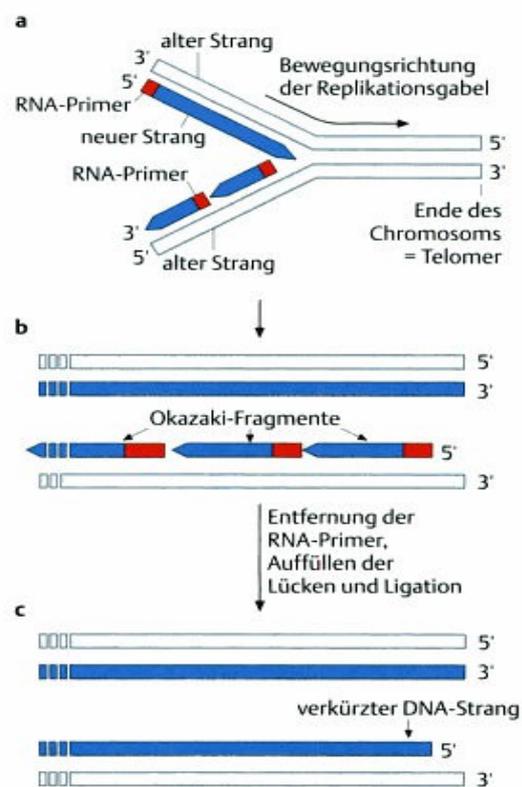


Abb. 5: Schematische Darstellung des Endreplikationsproblems: a) Die Replikationsgabel erreicht das Chromosomenende, der verzögerte Strang wird ausgehend von mehreren RNA-Primern (rot) diskontinuierlich synthetisiert; b/c) nach Entfernen der Primer und Verknüpfung der Okazaki-Fragmente resultiert ein verkürzter DNA-Strang (Abb. aus Janning & Knust 2004)

Als Konsequenz werden in den meisten Zellen des menschlichen Körpers die Telomere im Laufe des Lebens immer kürzer.

In manchen Zellen unterliegt die Telomerlänge jedoch einer physiologischen Regulation, die dem entgegen wirken kann. Diese wird durch die oben dargelegte Schleifenstruktur, durch die spezifisch gebundenen Proteine und vor allem durch das Enzym Telomerase bestimmt.

Die Telomerase wurde 1985 von Carol Greider und Elizabeth Blackburn entdeckt (Greider & Blackburn 1985). Sie ist eine reverse Transkriptase, die aus zwei Untereinheiten besteht: einer RNA Komponente, der *Telomerase RNA Component* (TERC), die die Vorlage für die DNA Synthese bildet, und der reversen Transkriptase *Telomerase Reverse Transcriptase* (TERT), die die Telomer-Verlängerung katalysiert (Cong et al. 2002). Die Telomerase verlängert das 3'-Ende der Telomere, indem sie die durch reverse Transkription ihrer RNA-Vorlage entstandenen Gegenstücke an den DNA-Strang anhängt (Greider & Blackburn 1989; Shippen-Lentz & Blackburn 1990). Auf diese Weise kommt auch die für Telomere spezifische TTAGGG-Sequenz zustande. Man nimmt an, dass die Synthese des anderen Stranges durch die normalen Komponenten des DNA-Replikations-Systems erfolgt (Collins & Mitchell 2002; Diede & Gottschling 1999).

Die Telomerase ist während der embryonischen Entwicklung aktiv, wird aber nach der Geburt in den meisten somatischen Zellen inaktiviert (Wright et al. 1996). Lediglich Zellpopulationen wie Keimzellen, aktivierte Lymphozyten, Stammzellen, bestimmte Haut- und Schleimhautzellen sowie Krebszellen weisen weiterhin Telomeraseaktivität auf, da diese Zellen einen erhöhten Zellteilungsbedarf haben (Flores et al. 2006; Kim et al. 1994).

Für die physiologische Regulation der Telomerlänge wird ein sogenanntes „Zwei-Zustände-Modell“ angenommen. Dieses Modell besagt, dass Telomere mit ihrer Schleifenform in zwei Zuständen vorkommen können: offen (uncapped) und geschlossen (capped) (Blackburn 2001). Welcher der beiden Zustände vorliegt, ist abhängig von dem Zusammenspiel des Systems aus Telomerkomplex und Telomerase. Kurze Telomere und/oder ein Verlust der assoziierten Proteine erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines offenen Zustands, da die Schleifenform nicht mehr gebildet werden kann (Blackburn 2000). Ist dies der Fall, so wird das freie Telomerende wie ein Chromosomenbruch erkannt und ein *DNA Damage Response Signal* ausgelöst. Dieses führt am Telomer jedoch nicht zu einer DNA Reparatur, sondern, sofern vorhanden, zur Anlagerung von Telomerase. Interessanterweise sind dieselben Proteine, die an der normalen *DNA Damage Response* beteiligt sind, am

Telomer sogar notwendig, um eine Anlagerung von Telomerase und damit eine Verlängerung der Telomere auszulösen (Blackburn 2000; Bertuch & Lundblad 1998; Ahmed & Hodgkin 2000). Durch die Verlängerung des Telomers erhöht sich wiederum die Auftretenswahrscheinlichkeit des geschlossenen Zustands (Blackburn 2000).

Ist in der Zelle keine Telomerase vorhanden, löst der geöffnete Zustand, welcher den Verlust des Telomer-Schutzes bedeutet, die normale *DNA Damage Response* aus. Am Ende der hierbei ablaufenden Signalkaskade steht unter anderem die Aktivierung des p53 Proteins (Blasco 2005). Dieses ist für einen Arrest des Zellzyklus oder für eine Induktion der Apoptose verantwortlich (Cong et al. 2002).

Für den Arrest des Zellzyklus, ein Zustand, in dem die Zelle lebensfähig, aber nicht weiter teilungsfähig ist, prägte der russische Forscher Olovnikov 1973 den Begriff der „zellulären Seneszenz“ (Chan & Blackburn 2004; Olovnikov 1973).

Die Bedeutung der physiologischen Regulation der Telomerlänge durch den Komplex aus Telomer und Telomerase lässt sich erkennen, wenn experimentell in seine verschiedenen Komponenten eingegriffen wird.

Hayflick und Moorhead (1961) zeigten, dass menschliche Fibroblasten in vitro nur eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen durchlaufen, bevor sie in den seneszenten Zustand übergehen (Hayflick & Moorhead 1961). Dies wird auch als das „Hayflick-Limit“ bezeichnet und ist durch das Endreplikationsproblem und die resultierende Telomerverkürzung begründet.

Es konnte gezeigt werden, dass eine experimentelle Überexpression der katalytischen Untereinheit der Telomerase TERT in vitro bei menschlichen Zellen dazu führte, dass diese ihre Teilungsfähigkeit länger als Kontrollzellen ohne Telomerase erhalten konnten (Bodnar et al. 1998; Vaziri & Benchimol 1998).

Die Bedeutung der assoziierten Proteine wie TRF 2 konnte dadurch hervorgehoben werden, dass in einer Zellpopulation, in der experimentell kein funktionsfähiges TRF 2 exprimiert wurde, selbst normal lange Telomere keinen Schutz vor einer Desintegration des genetischen Materials darstellten. Ein Stopp des Zellwachstums und vermehrte Apoptoseraten waren die Folge (Van Steensel et al. 1998; Karlseder et al. 1999). Innerhalb weniger Zellteilungen konnte eine Verkennung aller Telomere als

Chromosomenbruchstellen durch das *DNA Damage Response System* erfolgen. End-zu-End-Fusionen der Chromosomen und damit ein 'Chromosomen-Chaos' während der Metaphase waren das Resultat (O'Sullivan & Karlseder 2010). Die künstliche Überexpression von TRF 2 in Telomerase-defizienten Zellkulturen wiederum erlaubte es diesen Zellen, sich weit länger zu teilen als es Telomerase-defiziente Kontrollzellen ohne TRF 2-Überexpression können (Karlseder et al. 2002).

Im Tiermodell kann die Bedeutung der Telomerase an einem telomerasedefizienten Mausstamm (Telomerase-Knock-Out-Maus) veranschaulicht werden. Die Tiere dieses Mausstamms besitzen in keiner Zelle das Enzym Telomerase. Bei diesen Mäusen werden die Telomere im Laufe ihres Lebens und von Generation zu Generation kürzer, da keine Verlängerung durch die Telomerase stattfinden kann. Mäuse später Generationen werden so schon mit kurzen und funktionseingeschränkten Telomeren geboren und zeigen Anzeichen früher Alterung und entsprechender Krankheiten (Blasco et al. 1997; Rudolph et al. 1999).

Da mit jeder Zellteilung eine umschriebene Menge an telomerischer DNA verloren geht (Chan & Blackburn 2004), haben ältere Zellen ohne Telomerase auch kürzere Telomere. Nach einer begrenzten Zahl an Zellteilungen werden die Telomere dann so kurz, dass die oben beschriebenen Mechanismen greifen und die Zelle in einen seneszenten Zustand übergeht oder die Apoptose einleitet. Man kann die Telomere somit auch als eine Art „mitotische Uhr“ verstehen.

Die Telomerlänge kann also ein Maß für das biologische Alter, auch der menschlichen Zelle, sein. Die Frage nach ihrer Rolle im menschlichen Alterungsprozess mit all seinen Einschränkungen und Erkrankungen liegt deshalb nahe.

1.2 Telomere und Altern

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Telomerlänge mit dem chronologischen Alter assoziiert ist (Harley et al. 1990; Butler et al. 1998; Hastie et al. 1990; Lindsey et al. 1991). Bei humanen Fibroblasten in vitro war eine Abnahme der mittleren Telomerlänge mit dem Zellalter nachweisbar: Harley et al. konnten zeigen, dass sich die Chromosomenenden mit jeder Zellteilung um etwa 50 Basenpaare (bp) verkürzen (Harley et al. 1990). Auch in klinischen Studien konnte ein negativer

Zusammenhang der mittleren Telomerlänge in verschiedenen Geweben mit dem chronologischen Alter nachgewiesen werden (Butler et al. 1998; Hastie et al. 1990; Lindsey et al. 1991). Abb. 6 veranschaulicht die Abnahme der Telomerlänge mit dem Alter anhand der mittleren Granulozyten- und Lymphozytentelomerlänge bei 400 gesunden Menschen.

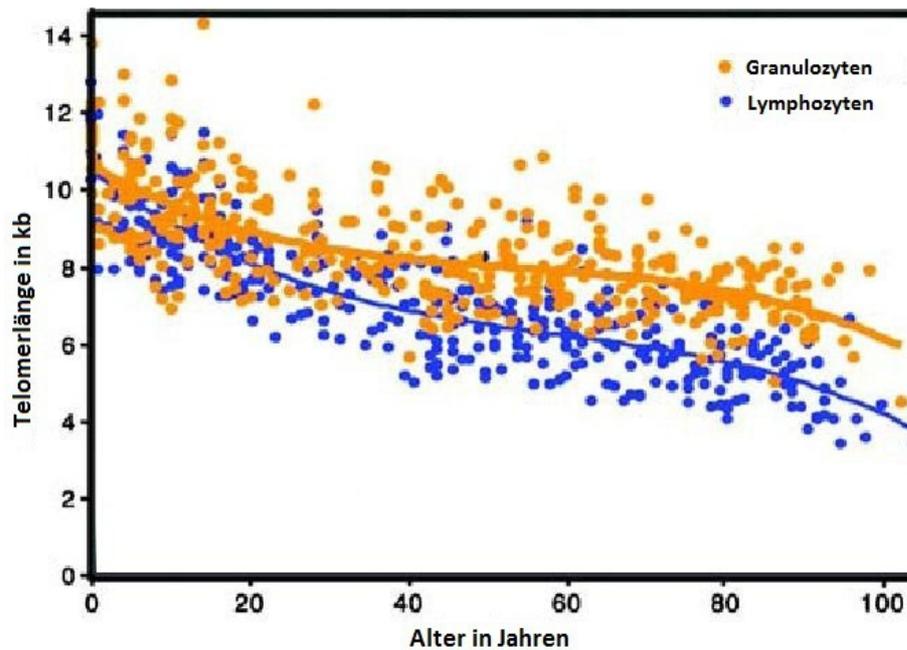


Abb. 6:
Verlauf der mittleren
Telomerlänge in
Lymphozyten und
Granulozyten während
der menschlichen
Lebensspanne: Auffällig
ist die hohe
interindividuelle
Variabilität der
Telomerlänge in allen
Altersgruppen.
(Abb. modifiziert aus
Aubert & Lansdorp 2008)

Anschauliche Hinweise auf eine kausale Beteiligung der Telomere an den phänotypischen Veränderungen des Alterns liefern Studien, die die sogenannten „Syndrome des vorzeitigen Alterns“ untersuchen, wie beispielsweise die Dyskeratosis Congenita (DC) (Mitchell et al. 1999; Vulliamy et al. 2001) oder das Werner-Syndrom (Crabbe et al. 2004; Du et al. 2004). Dies sind beim Menschen auftretende genetische Erkrankungen, die einen zum Teil schon im Kindes- und Jugendalter auftretenden starken Alterungsprozess des Körpers zur Folge haben. Betroffene haben oft ein greisenähnliches Erscheinungsbild und zeigen verschiedene Krankheiten, die auf eine Erschöpfung der Zellteilungsfähigkeit schließen lassen. In verschiedenen Studien konnte für mehrere dieser Erkrankungen ein direkter oder indirekter Zusammenhang zu der Telomerfunktion hergestellt werden. So nimmt man bei der DC eine Beeinträchtigung der Telomerase durch eine Mutation im TERC-Gen an (Vulliamy et al.

2001) und beim Werner-Syndrom die Mutation eines anderen für die Telomerreplikation wichtigen Gens (Crabbe et al. 2004). Interessanterweise ähnelt die Symptomatik der DC dem Phänotyp der schon erwähnten Telomerase-defizienten Maus (Terc^{-/-}) (Blasco et al. 1997), was die Hypothese der kausalen Beteiligung der Telomere an den körperlichen Erscheinungen des Alterungsprozesses weiter stützt.

1.3 Telomere und altersabhängige Erkrankungen

Das Altern führt nicht nur zu einer allgemein abnehmenden Zellteilungskapazität mit den daraus resultierenden körperlichen Einschränkungen, sondern bringt häufig auch bestimmte Krankheiten mit sich. Krankheiten, für die das Altern einen eigenständigen Risikofaktor darstellt, sind beispielsweise Diabetes (Fletcher et al. 2002), Bluthochdruck (Chobanian et al. 2003), Arteriosklerose (Lusis 2000), Herzinsuffizienz, Herzinfarkt oder Schlaganfall (Kannel 2000).

Die mögliche Beteiligung der Telomerfunktion am Alterungsprozess allgemein führt zu der Frage, ob auch beim Auftreten von diesen typischen Alterserkrankungen die Telomerfunktion eine eigenständige Rolle spielt, die über ihre bloße Beteiligung am Alterungsprozess an sich hinausgeht.

Im Versuch, Hinweise auf die Beantwortung dieser Frage zu finden, wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Studien angefertigt, die den Zusammenhang dieser Erkrankungen mit der Telomerlänge in verschiedenen Geweben untersuchen. In klinischen Studien wird häufig aus praktischen Gründen die mittlere LTL aus einer venösen Blutprobe bestimmt.

So konnte zum Beispiel das Vorhandensein von Diabetes in mehreren Studien mit einer kürzeren mittleren LTL in Zusammenhang gebracht werden. Das gilt sowohl für Diabetes Typ 1 (Jeanclos et al. 1998) als auch für Diabetes Typ 2 (Sampson et al. 2006; Adaikalakoteswari et al. 2005; Zee et al. 2010) und selbst für eine nur subklinische Präsenz von Insulinresistenz (Demissie et al. 2006; Gardner et al. 2005).

Auch zeigte sich in mehreren Studien, dass Patienten mit Bluthochdruck im Mittel eine kürzere mittlere LTL aufweisen als vergleichbare gesunde Probanden (Jeanclos et al. 2000; Benetos et al. 2001; Demissie et al. 2006; Lung et al. 2007; Fitzpatrick et al. 2007). In einer Studie zeigte sich zudem, dass nicht nur die mittlere LTL bei

Bluthochdruckpatienten verkürzt ist, sondern dass diese Verkürzung auch einen eigenständigen, vom Bluthochdruck unabhängigen, Risikofaktor für die Entwicklung von Arteriosklerose darstellt (Yang et al. 2009).

Ebenso existiert mittlerweile eine Vielzahl an Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Arteriosklerose (insbesondere der KHK) und der mittleren LTL belegen. Abgesehen von der Tatsache, dass Arteriosklerosepatienten eine kürzere mittlere LTL aufweisen (Mukherjee et al. 2009; Samani et al. 2001; Maubaret et al. 2010), scheint es einen Zusammenhang zwischen der mittleren LTL und der Mortalität zu geben (Cawthon et al. 2003; Farzaneh-Far et al. 2008). Patienten mit einer kürzeren mittleren LTL zeigten ein erhöhtes Risiko für einen Herzinfarkt (Fitzpatrick et al. 2007; Brouillette et al. 2003; Willeit et al. 2010) oder einen Schlaganfall (Fitzpatrick et al. 2007; Willeit et al. 2010). Auch fand man bei gesunden Nachkommen aus Familien mit arteriosklerotischen Erkrankungen eine kürzere mittlere LTL als bei Nachkommen aus Familien ohne solche Erkrankungen (Brouillette et al. 2008). Dies lässt vermuten, dass Telomere möglicherweise zu einem Teil für die Erblichkeit der Arteriosklerose verantwortlich sein könnten. In einigen dieser Studien konnte eine kürzere mittlere LTL nachgewiesen werden bevor die Krankheit überhaupt aufgetreten ist (Brouillette et al. 2007; Cawthon et al. 2003; Farzaneh-Far et al. 2008; Willeit et al. 2010). Das weist darauf hin, dass die Telomerlänge nicht einfach eine Konsequenz der Arteriosklerose ist. Hinzu kommt, dass auch nach statistischer Kontrolle der Risikofaktoren noch immer ein Zusammenhang von Arteriosklerose und mittlerer LTL bestand. Dies spricht für einen eigenständigen Einfluss der Telomerlänge auf die Erkrankung (Fitzpatrick et al. 2007; Brouillette et al. 2007; Brouillette et al. 2003).

1.4 Die Telomere und das menschliche Herz

Viele der oben genannten altersabhängigen Erkrankungen betreffen das Herz-Kreislauf-System und so auch das menschliche Herz.

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine weit verbreitete Krankheit, deren Inzidenz mit dem Alter zunimmt (Kannel 2000). Es gibt jedoch große interindividuelle Unterschiede was die Anfälligkeit für Herzinsuffizienz, das Alter des ersten Auftretens und das Fortschrittempo der Krankheit anbelangt. Die Ursachen hierfür sind bis heute nicht

vollständig bekannt. Auch hier wurde die Rolle der Telomere untersucht.

In einer Studie mit 89 gesunden Probanden des Geburtsjahrganges 1918, die zum Zeitpunkt der Studie 85 Jahre alt waren, wurde ein Zusammenhang der mittleren Telomerlänge von mononukleären peripheren Blutzellen mit der Ejektionsfraktion (EF) nachgewiesen. Hier korrelierte die Länge der Telomere positiv mit der Höhe der EF (Collerton et al. 2007).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die mittlere LTL bei Patienten mit bekannter Herzinsuffizienz gegenüber gesunden Kontroll-Probanden verkürzt ist. Hierbei war die mittlere LTL umso kürzer, je stärker die Ausprägung der Krankheit war (van der Harst et al. 2007). Es zeigte sich in einer weiteren Studie, dass die Kardiomyozyten in gealterten, insuffizienten Herzen eine kürzere mittlere Telomerlänge aufweisen. Es herrschte zudem insgesamt eine höhere Rate an seneszenten Zellen (Chimenti et al. 2003).

In eine ähnliche Richtung wiesen die Ergebnisse einer Studie, die kürzlich den Wert der mittleren LTL als Prädiktor für Mortalität oder Hospitalisierung bei Herzinsuffizienz untersuchte. Patienten mit einer kürzeren mittleren LTL hatten ein höheres Risiko für beide Endpunkte. Dieser Zusammenhang bestand auch noch nach statistischer Kontrolle anderer Risikofaktoren (van der Harst et al. 2010).

All diese Studien zusammen lassen vermuten, dass die Telomere an der Physiologie und Pathophysiologie der Herzfunktion und -struktur beteiligt sind.

1.5 Fragestellung der Studie

Ergebnisse aus experimentellen Studien weisen auf die Bedeutung der Telomere für pathophysiologische Abläufe hin (Chimenti et al. 2003; Oh et al. 2003; Leri et al. 2003). Daher wird in der klinischen Forschung gegenwärtig geprüft, ob die mittlere LTL ein Biomarker für Erkrankungen sein kann.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Fragestellung nachgegangen, inwiefern die mittlere LTL mit strukturellen und funktionellen echokardiographischen Parametern des Herzens bei Patienten mit arteriellem Hypertonus im statistischen Zusammenhang steht. Alle Patienten wurden gemäß der

Leitlinie der *European Society of Hypertension/European Society of Cardiology* (ESH/ESC) behandelt (Cifkova et al. 2003). Damit sollte die mittlere LTL erstmals unter realen klinischen Bedingungen in Bezug auf grundlegende kardiologische Parameter untersucht werden und so die Erkenntnisse aus Beobachtungsstudien mit gesunden Personen erweitert werden.

Für die vorliegende Arbeit konnten Daten eines Registers verwendet werden, welches zur Erforschung von **Endorganschäden**, **Therapie** und **Verlauf** bei Patienten mit arterieller Hypertonie (ESTher-Register) prospektiv angelegt wurde. Dieses Register beinhaltet Informationen von über 1400 Patienten mit arteriellem Hypertonus aus 15 Kliniken in Deutschland.

Zur Messung der mittleren LTL sollte eine von Cawthon beschriebene Methode der Telomerlängenmessung mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (PCR) in einer leicht modifizierten Variante genutzt werden (Cawthon 2002).

Als eine Voraussetzung zur Nutzung war es im ersten Schritt der Arbeit erforderlich, die Messungen anhand von Retest-Vergleichen sowie anhand von Vergleichen mit der ebenfalls zur Telomerlängenmessung verwendeten „*terminal restriction fragment*“ (TRF) Methode zu validieren. So wurde die Reliabilität und Validität der in unserer Arbeit genutzten Messungen überprüft.

Im zweiten Schritt sollte diese Methode zur Messung der mittleren LTL aus Blutproben von 1106 Patienten des ESTher-Registers angewandt werden und in einer multivariaten Analyse die Assoziation der mittleren LTL-Werte mit Parametern der kardialen Struktur und Funktion untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Studienpopulation wurde aus dem ESTher-Register rekrutiert. Einschlusskriterien für die Studienpopulation der vorliegenden Arbeit waren ein Alter von mindestens 18 Jahren, das Vorliegen einer arteriellen Hypertonie gemäß den Grenzwerten der *World Health Organization/International Society of Hypertension* (WHO/ISH) von mindestens 140 mmHg systolisch oder 90 mmHg diastolisch (1999 World Health Organization).

Der arterielle Hypertonus wurde gemäß den Kriterien der ESH/ESC behandelt (Cifkova et al. 2003). Akute Erkrankungen, wie z. B. ein Myokardinfarkt, lagen zeitlich mindestens einen Monat vor Studienaufnahme zurück. In der vorliegenden Studie wurden Patienten mit einer kardialen EF von unter 40 % oder mit deutlicher segmentaler linksventrikulärer Dysfunktion ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren die Unfähigkeit des Patienten zur Einwilligung, das Vorliegen einer Schwangerschaft und eine nicht-kaukasische Herkunft.

Von allen Teilnehmern wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin hat das Studienprotokoll anerkannt. Die Studie erfüllt die Auflagen der Deklaration von Helsinki.

2.1.2 Datenerhebung

Die zur Verfügung gestellten Studiendaten des ESTher-Registers wurden durch standardisierte Fragebögen, körperliche Untersuchungen sowie Labortests erhoben. Die Fragebögen enthielten Fragen nach demographischen Daten, bisheriger Anamnese und Medikation.

Mittels automatischer tragbarer Geräte fanden Messungen des 24-h-Blutdruckes statt. Diese registrierten den Blutdruck tagsüber (zwischen 0600 und 2200 Uhr) alle 15 Minuten und nachts alle 30 Minuten. Der Pulsdruck wurde als Differenz zwischen den systolischen und diastolischen Blutdruckwerten berechnet.

Die geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) in ml/min/1,73 m² wurde, wie von der National Kidney Foundation empfohlen, durch Verwendung der modifizierten

modification of diet in renal disease-Formel (MDRD) berechnet. Diese Formel lautet wie folgt: $eGFR \text{ in ml/min/1,73 m}^2 = 186 \times (S_{Cr})^{-1,145} \times (\text{Alter})^{-0,203} \times (0,742 \text{ für Frauen}) \times (1,210 \text{ für Afroamerikaner})$ (Levey et al. 2003).

Um die echokardiographischen Parameter zu bestimmen wurde eine zweidimensional geleitete M-Mode-Echokardiographie durchgeführt. Aus den M-Mode-Echokardiogrammen wurden nach den Empfehlungen der *American Society of Echocardiography* (ASE) der Durchmesser des linken Vorhofs (LA), der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVED), der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (LVES), die interventrikuläre Septumdicke (IVST) und die posteriore Wanddicke (PWT) bestimmt. Hierbei kommt die Leading Edge Methode zum Einsatz, bei der immer die dünnste durchgehende Linie als Grundlage für die Messung verwendet wird (Sahn et al. 1978). Die linksventrikuläre Masse (LVM) wurde nach den Empfehlungen der ASE (*Leading-Edge Methode*) in Gramm berechnet. Hierbei wird eine abgeplattete ellipsoide Form des normal konfigurierten linken Ventrikels angenommen, dessen Verhältnis der langen zur kurzen Achse 2:1 beträgt. Die zugrundeliegende Formel für die Berechnung der LVM lautet $1,04((IVST + LVED + PWT)^3 - LVED^3)$. Alle Werte wurden in der Enddiastole bestimmt. Da bei Verwendung dieser Formel die LVM meist als zu hoch eingeschätzt wird, kommt zudem die folgende Korrekturrechnung zur Anwendung: Anatomische LVM = $0,80 \text{ (LVM nach ASE)} + 0,6 \text{ g}$. Diese Formel wurde von Devereux et al. auf der Grundlage des Vergleichs mit autoptischen Befunden entwickelt (Devereux et al. 1986).

Weil bei der Bestimmung der LVM ein symmetrischer linker Ventrikel zugrunde gelegt wird, wurden Patienten mit deutlicher segmentaler linksventrikulärer Dysfunktion aus der Kohorte ausgeschlossen. Darunter fielen Akinesie oder Dyskinesie von zwei oder mehr Segmenten des 16-segmentigen Modells des linken Ventrikels.

Um die LVM zwischen den Patienten vergleichen zu können, wurde der linksventrikuläre Massenindex (LVMI) mit der Einheit $\text{g/m}^{2,7}$ verwendet. Wie de Simone et al. 2005 gezeigt haben, gibt dieser Index, im Vergleich mit anderen solchen Indices, eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) und das damit verbundene kardiovaskuläre Risiko am besten wieder (de Simone et al. 2005). Eine bestehende LVH wurde als ein LVMI von mehr als $47 \text{ g/m}^{2,7}$ bei Frauen und mehr als $50 \text{ g/m}^{2,7}$ bei Männern definiert

(de Simone et al. 1995).

Als Index für das geometrische Muster der konzentrischen Hypertrophie wurde die relative Wanddicke (RWT) mit der Formel $2 \times \text{PWT} / \text{LVED}$ bestimmt.

Die linksventrikuläre EF wurde durch zweidimensionale echokardiographische Bildgebung nach der Methode von Simpson bestimmt (Feigenbaum et al. 2005). Mittels Pulsed Wave Doppler wurde zudem das E/A Verhältnis (Verhältnis von early filling velocity (E) und peak late filling velocity (A)) bestimmt, welches ein Maß für die diastolische Funktion darstellt (Feigenbaum et al. 2005; Ashley & Niebauer 2004).

Die echokardiographischen Untersuchungen erfolgten verblindet gegenüber den übrigen Daten der Patienten.

2.2 Messung der mittleren leukozytären Telomerlänge (LTL)

2.2.1. Isolation der DNA

Für die vorliegende Arbeit wurden Blutproben genutzt, welche im Rahmen der oben beschriebenen Datenerhebung entnommen wurden. Die Isolation der DNA erfolgte mittels eines *PAXgene® Blood DNA Systems* (PreAnalytiX® GmbH, Hombrechtikon, Schweiz). Dieses System ermöglicht die Isolation von DNA aus 8,5 ml menschlichem Vollblut, wie in Abb. 7 schematisch dargestellt. Dazu wurde zunächst das Blut von den PAXgene® Blood DNA Abnahmegefäßen in die Reagenzgefäße des PAXgene® Blood DNA Kits, die mit 25 ml Lysierungspuffer gefüllt waren, transferiert. Durch kurzes Mischen wurden rote und weiße Zellen lysiert. Darauf erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 2500 g, die zur Folge hatte, dass sich unter anderem Zellkerne und Mitochondrien auf dem Boden des Röhrchens absetzten.

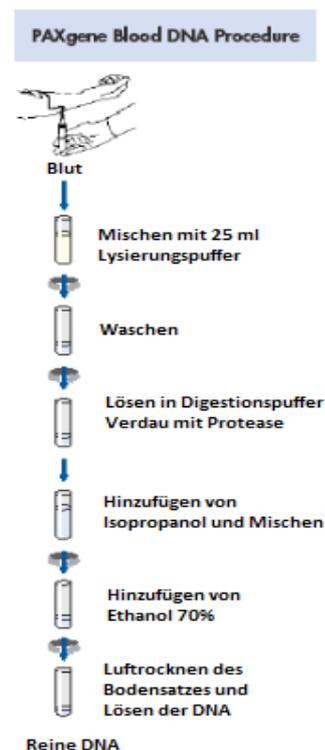


Abb. 7: Schematische Darstellung der DNA Isolation mit dem PAXgene® Blood DNA System (QIAGEN PAXgene Blood DNA Kit Handbook)

Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde der Bodensatz in 5 ml Waschpuffer (PaxGene® Puffer BG2) durch kräftiges Mischen wieder gelöst und für 3 min bei 2500 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand ein weiteres Mal entfernt wurde, erfolgte die Zugabe von 5 ml PreAnalytiX® Protease/Digestionspuffer 1:100 (PaxGene® Puffer BG3). Nach kräftigem Mischen wurde die Lösung für 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Die Farbe der Probe änderte sich dabei von hellrot zu hellgrün, was eine Veränderung des pH und damit den Verdau der Proteine anzeigt. Nun wurde die Probe ein weiteres Mal kräftig gemischt und es erfolgte die Zugabe von 5 ml 100%igem Isopropanol. Dies hatte zur Folge, dass die DNA in weißen Flocken ausfiel. Nach Abschluss dieses Prozesses wurde die Probe für 3 min bei 2500 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und der Bodensatz für 10 min getrocknet. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml Resuspensionspuffer (*PaxGene® Puffer BG4*) und eine Inkubation der Probe für 1 Stunde bei 65°C um die DNA wieder zu lösen. Damit war die DNA Isolation abgeschlossen (QIAGEN PAXgene Blood DNA Kit Handbook).

2.2.2 Qualitätsanalyse der DNA durch Spektrophotometrie

Unter Benutzung eines *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometers* (Peqlab, Erlangen, Germany) wurde der Gehalt und die Reinheit der DNA überprüft.

Das *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* ist ein Mikrovolumen-Spektrophotometer, welches ohne die Verwendung von Messküvetten auskommt.

Zur spektrophotometrischen Messung wurde eine geringe Menge (1-2 µl) der DNA-Probe auf die untere optische Messoberfläche (das Ende eines fiberoptischen Kabels) aufgetragen. Dann wurde diese Probe von oben mittels eines Schwenkarms mit einer zweiten optischen Messoberfläche in Kontakt gebracht, so dass durch die Oberflächenspannung eine Flüssigkeitssäule entstand (Abb. 8)



Abb. 8: Darstellung der Aufbringung der Probe auf die optische Oberfläche (links: Übersichtsaufnahme, mitte: vergrößerter Bildausschnitt) und Darstellung der entstehenden Flüssigkeitssäule (rechts) (Thermo Fisher Scientific Nanodrop 1000 Users Manual)

Nun wurde Licht einer bestimmten Wellenlänge (260 und 280 nm für die Messung der Konzentration von DNA) von oben nach unten durch die Flüssigkeitssäule geleitet und die Absorption dieses Lichts bestimmt. Die Länge der Säule und damit auch der Lichtweg war durch die Einstellung der Abstände der optischen Oberflächen variabel. Sie reichte von 0,2 mm bis 1 mm und wurde für jede Messung automatisch optimal eingestellt. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes nach der Formel $A = e \cdot b \cdot C$ bestimmt. Dabei war A die Extinktion des Lichts bei einer bestimmten Wellenlänge (hier 260 nm und 280 nm mit den entsprechenden Bezeichnungen A_{260} und A_{280}), e war der molare Extinktionskoeffizient des zu messenden Stoffes bei einer bestimmten Wellenlänge und b war der Lichtweg. Da der Extinktionskoeffizient für jeden Stoff spezifisch ist und der Lichtweg und die Lichtextinktion bekannt waren, ließ sich daraus die DNA-Konzentration C nach der umgestellten Formel $C = A/e \cdot b$ errechnen.

Aus dem Quotienten der gemessenen Absorption bei beiden Wellenlängen (A_{260}/A_{280}) lässt sich eine Aussage über die Reinheit der isolierten DNA treffen. Er sollte für DNA bei ca. 1,8 oder darüber liegen. Ein niedrigerer Wert kann auf eine Verunreinigung der Probe durch Proteine oder andere Stoffe, die das Licht bei 280 nm stark absorbieren, hinweisen (Desjardins & Conklin 2011; Thermo Fisher Scientific Nanodrop 1000 Users Manual).

Das PAXgene® Blood DNA System liefert üblicherweise Ausbeuten von 150-500 µg DNA und A_{260}/A_{280} Verhältnisse von 1,7-1,9. Die Ausbeute hängt jedoch von der

Anzahl der kernhaltigen Zellen in der Blutprobe ab, die interindividuell sehr unterschiedlich sein kann. Die so isolierte DNA hat eine Größe von bis zu 200 Kilobasen (kb), wobei Fragmente mit einer Größe von 50-150 kb vorherrschen (QIAGEN PAXgene Blood DNA Kit Handbook).

2.2.3 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt die Grundlage für die in der vorliegenden Studie verwendete Technik der Telomerlängenmessung dar.

Bei der in Abb. 9 schematisch dargestellten PCR erfolgt eine Vervielfältigung vorher festgelegter Abschnitte von einsträngiger oder doppelsträngiger DNA. Für die Reaktion werden zwei Oligonukleotid-Primer benötigt, die die zu vervielfältigende Stelle in der untersuchten DNA flankieren. Außerdem werden desoxy Nukleotid-triphosphate (dNTPs), ein Puffer, der Magnesiumionen enthält, und eine hitzestabile DNA-Polymerase eingesetzt. Die Reaktion erfolgt in Temperatur-Zyklen, bei denen zunächst die DNA bei hoher Temperatur (ca. 90°C) denaturiert wird. Dabei trennen sich die beiden DNA-Stränge voneinander.

Nun folgt eine Phase mit einer Temperatur, bei der sich die Primer optimal anlagern können (ca. 50°C), und

eine Phase mit einem Temperatur-Optimum für die Polymerase (ca. 72°C), die dann ausgehend von den Primern die Nukleotide komplementär zum Einzelstrang ergänzt

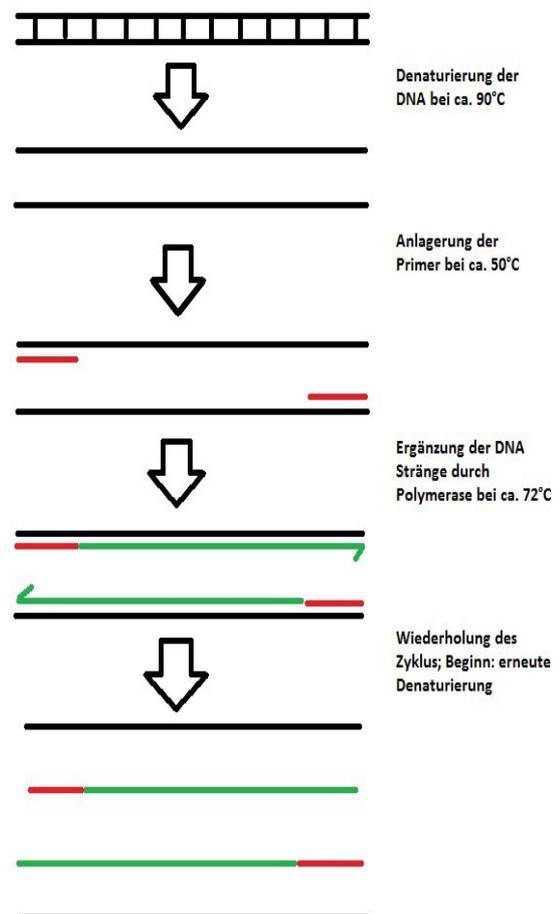


Abb. 9: Schematische Darstellung einer PCR Reaktion: Schwarz: Ausgangs-DNA, Rot: Primer, Grün: neu entstandene DNA, die grünen Pfeile symbolisieren die Polymerisationsrichtung

(vgl. (Kubista et al. 2006)). Die tatsächlichen Temperaturen variieren je nach verwendetem Programm, der Art der Polymerase und dem Schmelzpunkt der verwendeten Primer. Die Temperatur-Zyklen werden meist etwa 40 mal hintereinander wiederholt. Dabei erhöht sich die Menge des PCR-Produktes theoretisch mit jedem Durchgang exponentiell. Eine Weiterentwicklung der Methode stellt die sogenannte *Real Time quantitative PCR* dar, die im Folgenden beschrieben werden soll.

Die Messung der Telomerlänge in den DNA Proben erfolgte mittels einer quantitativen *Real Time PCR* Technik, nach der 2002 von Cawthon beschriebenen Methode (Cawthon 2002).

Bei der *Real Time quantitative PCR* wird ein Farbstoff (SYBR® Green) eingesetzt, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und nur dann ein Fluoreszenzsignal abgibt. So kann die Zunahme des doppelsträngigen PCR-Produktes mittels einer Kamera, die die Zunahme der Fluoreszenzintensität misst, verfolgt werden. Die graphische Auftragung dieser Fluoreszenzzunahme ergibt eine s-förmige Kurve in halblogarithmischer Darstellung, da die Entstehung des doppelsträngigen PCR-Produktes zunächst langsam, dann exponentiell und bei Erreichen einer Sättigung wieder langsamer verläuft. Die Software des PCR-Geräts ermittelt gemäß eines mathematischen Algorithmus diejenige Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz der Reaktion eine Intensität erreicht, die über das Hintergrundlevel hinausgeht. Diese Zykluszahl wird Cycle Threshold (Ct)-Wert genannt.

Die relative Bestimmung der Produktmenge erfolgt, indem bei jedem Ansatz die gleiche Standardreihe vermessen wird. Diese Standardreihe wird durch serielle Verdünnung einer für alle PCR-Ansätze identischen Referenzprobe erstellt, deren DNA Konzentration ($c[\text{DNA}]$) im Bereich der zu vermessenden Proben liegt. Durch das Auftragen der logarithmierten Ct-Werte dieser Standardreihe entsteht eine lineare Gerade (Ct vs. $\text{Log}(c[\text{DNA}])$). An dieser kann durch Auftragen der Ct-Werte der unbekannt Proben die im Verhältnis zur Standardgerade enthaltene Ausgangsmenge berechnet werden. Das Verfahren ist in Abb. 10 schematisch dargestellt.

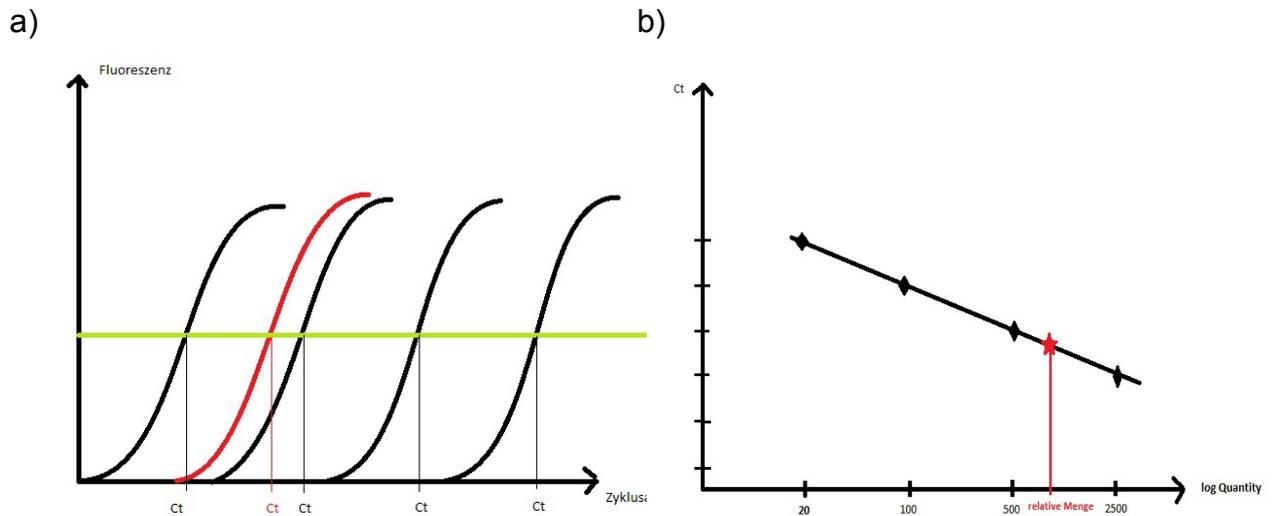


Abb. 10: a): Schematische Darstellung des Ergebnisses eines Messvorganges: x-Achse: Anzahl der PCR-Zyklen, y-Achse: Stärke der Fluoreszenz; die schwarzen Kurven symbolisieren die Messungen der Standardreihe von unverdünnt (links) bis stark verdünnt (rechts), die rote Kurve stellt beispielhaft eine Probenmessung dar, die grüne Linie symbolisiert die Schwelle für die Ct-Wert-Bestimmung, an der die Fluoreszenz einen Wert erreicht, der größer als das Hintergrundrauschen ist
 b): Die Ct-Werte der Standardreihe (Y-Achse) werden gegen die logarithmierte DNA-Konzentration (X-Achse; von stark verdünnt (links) bis unverdünnt (rechts)) aufgetragen und ergeben die schwarze Gerade. Der Ct-Wert der Probenmessung wird markiert und die korrespondierende DNA-Konzentration berechnet

Auf die genannte Weise finden jeweils sowohl für die Standardreihe als auch für die unbekanntes Proben zwei Messungen statt. Bei der einen wird ein für die Telomere spezifisches Primerpaar verwendet, bei der anderen kommt ein Primerpaar zum Einsatz, das spezifisch für ein Single Copy Gen ist. Während die Anzahl der Telomerrepeats je nach Telomerlänge unterschiedlich ist, kommt das Single Copy Gen pro Genom nur ein einziges Mal vor.

Durch die Messungen ergeben sich die Messgrößen T und S. T spiegelt die Gesamttelomerlänge und S die Anzahl des Single Copy Gens in einer Probe wider. Diese beiden Werte werden zueinander ins Verhältnis gesetzt (T/S), um so die Messgröße T einer Probe auf das Messsignal S zu normieren. Insofern wird der Quotient T/S zu einer Größe für die Gesamttelomerlänge, die vergleichbar wird zu anderen Proben, auch wenn diese eine unterschiedliche Anzahl von Genomen

beinhalten. T/S ist = 1, wenn die unbekannte Probe im Verhältnis ihrer Gesamtelomerlänge zur Menge des Single Copy Gens mit der Referenzprobe übereinstimmt.

Für die Standardkurve wurde eine DNA Probe mit einer Ausgangskonzentration von 10 ng/ μ l im Verhältnis 1:5 seriell in Wasser verdünnt, so dass sich 5 Konzentrationen zwischen 10 ng/ μ l und 0,016 ng/ μ l ergaben. Bei einer Versuchsmessung wurde jeder Verdünnungsschritt dreifach auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Zufällig ausgewählte Proben befanden sich zudem im Bereich der Standardreihe, so dass diese für alle weiteren Messungen verwandt wurde.

Für die Vermessung der Proben wurde zunächst ein Grundansatz erstellt, der dann wie in Abb. 11 dargestellt auf die einzelnen Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte verteilt wurde. Damit wurde die Homogenität der Ansätze einer Platte erhöht.

Für jede Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde folgender Ansatz berücksichtigt: 12,5 μ l *Power SYBR® Green Mastermix* (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), 11,92 μ l Wasser und je 0,125 μ l des Forward- und des Reverse-Primers (je nach Messung Telomerprimer „Tel-F“ bzw. „Tel-R“ oder Single-Copy-Primer „SC-F“ bzw. „SC-R“). Der so für 100 Wells berechnete Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 2467 μ l wurde auf 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt. Dabei war für jede zu messende Probe ein Eppendorfgefäß vorhanden. Für die Standardreihe betrug das aliquotierte Volumen des Ansatzes 72 μ l, für die unbekanntes Proben betrug es 74 μ l. Es folgte die Zugabe von je 3 μ l der DNA-Lösung der Standardreihe und je 1 μ l der unbekanntes DNA-Lösungen zu den entsprechenden Eppendorfgefäßen. Die Konzentration der unbekanntes DNA-Proben war einheitlich bei 10 ng/ μ l, die Konzentrationen der Standardreihe waren wie im Text beschrieben. Aus den so vorbereiteten Messlösungen wurden je 23 μ l in drei aufeinander folgende Wells gegeben. Auf diese Weise erfolgte für jede Probe eine Dreifachmessung mit einer finalen Primerkonzentration von 500 nM. Zusätzlich wurde bei jedem Assay eine Kontrollprobe, in der sich keine DNA befand, dreifach auf die Mikrotiterplatten aufgetragen, um fehlerhafte Messergebnisse durch beispielsweise eine Amplifikation von Verunreinigungen der Messreagenzien auszuschließen.

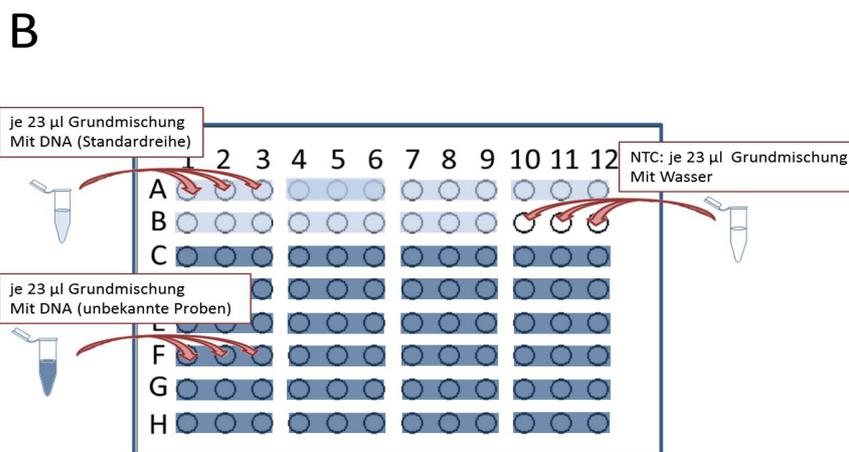
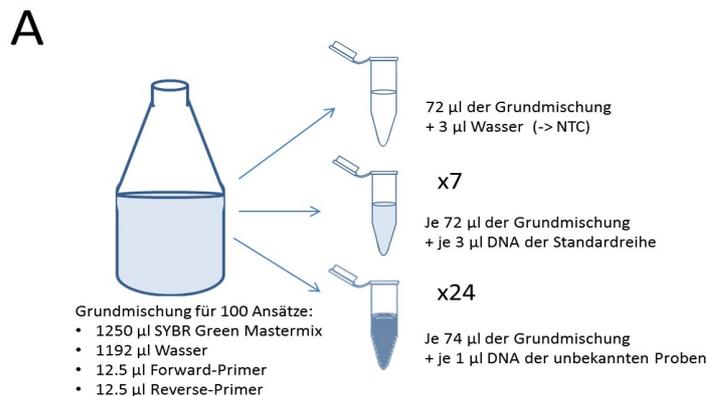


Abb. 11: a) Grundmischung für 100 Ansätze wird verteilt auf die jeweiligen Eppendorfgefäße wie im Text beschrieben. b) Die Mischung je eines Eppendorfgefäßes wird auf je 3 Vertiefungen der 96-Well-Mikrotiterplatte verteilt. Die Anordnung der Standardreihe und der unbekanntes Proben ist schematisch dargestellt.

Alle Assays wurden mit dem *ABI Prism 7000 SDS Instrument* (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Dieses Gerät misst die Zunahme der Fluoreszenz während einer PCR-Reaktion in Echtzeit und berechnet automatisch den Ct-Wert jeder Probe. Als Fluoreszenzmarker wurde der *Power SybrGreen Master Mix®* (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) verwendet. Der Ablauf der Reaktion verlief nach dem Standard PCR-Programm, das vom Hersteller empfohlen wurde: 50°C für 2 min; 95°C für 10 min; dann 40 Zyklen mit 94°C für 15 s und 58°C für 1 min.

Die Sequenz der verwendeten telomerspezifischen Primer lautete wie folgt: Tel-F: GGGTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT und Tel-R: TCCCGACTA

TCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA. Als Single Copy Referenz wurde das 36B4 Gen verwendet, welches auf Chromosom 12 lokalisiert ist und für saures ribosomales Phosphoprotein PO kodiert. Die Sequenz der hierfür spezifischen Primer lautete: SC-F: CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC und SC-R: CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA.

Die Sequenz der Telomer-Primer wurde von Cawthon (Cawthon 2002) speziell entwickelt um die Bildung von Primerdimeren zu minimieren (Abb. 12). Die Wahrscheinlichkeit der Anlagerung eines Primers an den DNA-Strang ist dabei höher als die Wahrscheinlichkeit der Anlagerung eines Primers an einen anderen Primer. Grund dafür ist die größere Komplementarität der Primer zum DNA Strang verglichen zu den Primern untereinander: Lagern sich die Primer an den DNA Strang an, so ist jede sechste Base nicht komplementär zur DNA Vorlage. Die letzten fünf Basen des 3'-Endes der Primer bilden jedoch einen passenden Abschluss. Hier kann die Polymerase ansetzen und mit der Replikation beginnen. Sollten sich die Primer aneinander lagern, so besteht das am besten passende Muster aus nur je vier passenden Basenpaaren, gefolgt von zwei unpassenden Basenpaaren. Das 3'-Ende kann zudem nicht stabil angelagert werden und so kann die Polymerase nicht ansetzen (Cawthon 2002).

Die Messung der mittleren LTL erfolgte verblindet gegenüber allen übrigen Daten der Probanden. Die Ergebnisse wurden mittels einer Identifikationsnummer markiert und erst nach dem Abschluss der Messungen zugeordnet.

Telomere Length Assay Kit® der Firma Roche® entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet. Die TRF-Methode basiert auf der Telomerlängenermittlung durch Southern Blotting und umfasst im Wesentlichen drei Arbeitsabschnitte: Zunächst erfolgt der Verdau der verwendeten DNA, wobei Telomer- und subtelomerische Region bestehen bleibt und der Rest der DNA durch Restriktionsenzyme zu kleinen Fragmenten gespalten wird. Es folgt die Auftrennung der DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese sowie die Übertragung und Fixierung der aufgetrennten Spaltprodukte auf eine Nylonmembran mittels Southern Blotting. Im letzten Arbeitsschritt wird die aufgetrennte DNA auf der Membran durch Gensonden markiert und sichtbar gemacht. Die durchschnittliche Länge der Telomerfragmente kann durch den Vergleich mit einem DNA-Längenstandard ermittelt werden.

DNA-Verdau

Zunächst wurde ein Ansatz erstellt, der zu gleichen Teilen aus den Enzymen *Hinf I* und *Rsa I* bestand. Die finale Enzymkonzentration betrug jeweils 20 U/µl. Jeweils 1 µg der Proben-DNA wurde mit Wasser auf ein Volumen von 17 µl aufgefüllt. Jeder dieser Proben wurde 1 µl des Enzymansatzes und 2 µl des vorgefertigten Digestionspuffers (10x) hinzugefügt. Im Anschluss wurden sie für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Um den Restriktionsvorgang zu beenden wurde jeweils 5 µl des vorgefertigten 5 x Gel-Lade-Puffers hinzugegeben und die Proben wurden kurz zentrifugiert. Als Kontroll-DNA wurde eine Standard-DNA Probe verwendet.

Abgesehen von der Inkubation, wurden sämtliche Arbeitsschritte des DNA-Verdaus auf Eis durchgeführt.

Gelelektrophorese und Southern blotting

Für die Gelelektrophorese wurde ein 0,8 %iges Agarosegel von 11 x 14 cm Größe und 1 cm Dicke gegossen. Dazu wurde 1,1 g Agarose in 140 ml 1 x TAE-Puffer gelöst. Der 1 x TAE-Puffer wurde zudem als Elektrophorese-Flüssigkeit eingesetzt.

Als Referenz wurden 4 µl eines *DIG molecular weight Markers* mit 12 µl nukleasefreiem Wasser und 4 µl Gel-Lade-Puffer gemischt. Jeweils 10 µl wurden in die äußersten Taschen des Gels eingebracht. Dazwischen wurden in jede Bahn des Gels jeweils 20 µl

der verdauten DNA-Proben pipettiert. Pro Agarosegel wurden fünf Proben jeweils doppelt gemessen und analysiert. Bei einer Spannung von 75 V lief das Gel für etwa 3 Stunden.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel auf eine Vakuum-Blot-Apparatur übertragen. Nach Anlage eines Unterdrucks wurde 0,25 M HCl-Lösung auf das Gel gegeben und gewartet bis ein Farbumschlag der Bromphenolblau-Färbung des Gel-Lade-Puffers nach gelb erfolgt ist. Nach Absaugen der HCl-Lösung wurde nun 0,5 M NaOH-Lösung auf das Gel gegeben und wiederum gewartet bis ein Farbumschlag zurück nach blau erfolgt ist. Nach Absaugen der NaOH-Lösung wurde 20 x SSC Lösung als Transfer-Puffer auf das Gel gegeben und 2 Stunden geblottet. Hierdurch erfolgte die Übertragung der DNA vom Gel auf die Nylon-Membran. Nach erfolgtem Blotting wurde die Nylon-Membran in einem *UV-Crosslinker* zwei mal für 60 Sekunden bestrahlt, um die transferierte DNA auf der Membran zu fixieren, und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

Hybridisierung und Detektion

Zunächst wurden 28 ml der für den Hybridisierungsvorgang vorgesehenen *DIG Easy Hyb Lösung* auf 42 °C vorgewärmt. Für die Prähybridisierung wurde die Membran in 18 ml der vorgewärmten Lösung eingetaucht und 30-60 Minuten bei 42°C bei leichter Bewegung inkubiert. Zur Herstellung der Hybridisierungslösung wurden weitere 7 ml der vorgewärmten *DIG Easy Hyb Lösung* mit 1,4 µl der Telomer-Sonde vermischt. Die *DIG Easy Hyb Lösung* enthält Digoxigenin, welches bei diesem Vorgang spezifisch an die Telomer-Sonde gebunden wird. Nach Verwerfen der Prähybridisierungslösung wurden sofort 6,5 ml der erstellten Hybridisierungslösung auf die Membran gegeben, welche dann drei Stunden bei 42 °C und bei leichter Bewegung inkubiert wurde. Hierbei bindet die mit Digoxigenin markierte Telomer-Sonde an die telomerspezifischen Sequenzen der DNA. Nach Verwerfen der Hybridisierungslösung wurde die Membran für zweimal fünf Minuten bei Raumtemperatur mit Waschpuffer I (2 x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen und anschließend noch zweimal für jeweils 20 Minuten mit auf 50 °C vorgewärmtem Waschpuffer II (0,2 x SSC, 0,1 % SDS) im Wasserbad bei 50°C gewaschen.

Es erfolgte ein weiterer Waschvorgang in 100 ml Waschpuffer III (vorgefertigter 1x

Waschpuffer) für fünf Minuten. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten in 100 ml vorgefertigter 1x Blocklösung inkubiert. Währenddessen wurde die *Anti-DIG-AP-Lösung* hergestellt, indem der polyklonale Antikörper zunächst fünf Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert und dann 1 : 10000 mit 1 x Blocklösung verdünnt wurde. Der hier genutzte Antikörper ist an alkalische Phosphatase gebunden und richtet sich gegen Digoxigenin. In 100 ml der *Anti-DIG-AP-Lösung* wurde die Membran für weitere 30 Minuten inkubiert. Während der Inkubation mit der Antikörperlösung binden die Fab-Fragmente des Antikörpers spezifisch an die mit Digoxigenin markierte Telomer-Sonde, die im Hybridisierungsvorgang aufgebracht wurde.

Anschließend wurde die Membran noch zweimal für jeweils 15 Minuten in 200 ml Waschpuffer III gewaschen und fünf Minuten in 100 ml 1 x Detektionspuffer inkubiert. Die Inkubations- und Waschvorgänge erfolgten jeweils bei Raumtemperatur und unter leichter Bewegung.

Nach vollständigem Entfernen des Detektionspuffers wurde die Membran in einen offenen Hybridisierungsbeutel gelegt, mit ca. 3 ml einer Substratlösung gleichmäßig bedeckt und nach einer fünfminütigen Inkubationszeit luftblasenfrei eingeschweißt. Die genutzte Substratlösung enthält *CDP-Star*, ein hochsensitives Chemilumineszenz-Substrat. Dieses wird durch die an den DIG-Antikörper gebundene alkalische Phosphatase metabolisiert. Die dabei freiwerdende Energie kann mittels einer Kamera als Licht sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise lässt sich die Größe des so markierten telomerspezifischen Restriktionsfragments im Vergleich zu einem spezifischen Molekulargewicht-Standard ermitteln. (Abb. 13)

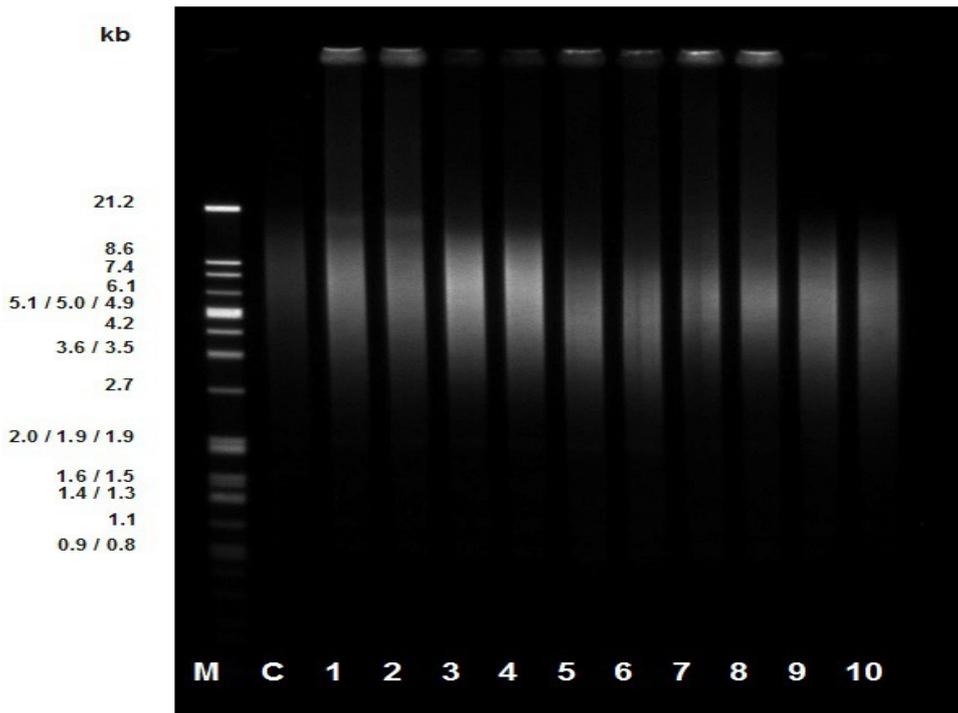


Abb. 13: Repräsentatives Agarosegel nach TRF-Längen-Messung durch Southern Blot: Fünf Proben wurden auf einem Agarosegel jeweils doppelt gemessen (benachbarte Bahnen 1-10) und analysiert. M: Marker für das Molekulargewicht, C: Kontroll-DNA. Die Ergebnisse der hier beispielhaft dargestellten einzelnen Bahnen waren wie folgt: Bahn 1: 6.98 kb, Bahn 2: 6.97 kb, Bahn 3: 6.34 kb, Bahn 4: 6.22 kb, Bahn 5: 5.07 kb, Bahn 6: 5.10 kb, Bahn 7: 6.4 kb, Bahn 8: 6.5 kb, Bahn 9: 5.5 kb, Bahn 10: 5.6 kb

2.4 Statistische Analysen

Die statistische Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. K. Wegscheider am Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Hamburg-Eppendorf. Vor der Analyse wurden die Daten geprüft und falls keine Normalverteilung bestand, wurden sie logarithmisch umgewandelt, um eine Normalverteilung zu erreichen.

Mit Hilfe von Regressionsmodellen wurde der Einfluss der mittleren LTL auf die verschiedenen echokardiographischen Parameter berechnet. Potentielle Confounder wurden dabei jeweils identifiziert und als Kovariaten im statistischen Modell eingefügt.

In den schrittweisen multivariaten Regressionsanalysen wurden Regressoren

blockweise in das Modell integriert. Zuerst wurden die demographischen Variablen Alter, Geschlecht (und wenn signifikant deren Interaktion) eingefügt. Danach wurden in drei Blöcken verschiedene Variablen integriert. Die Variablen in Block 1 (kardialer Status) waren: BMI, Körpergröße, Rauchen, Pulsdruck, Diabetes, Herzinfarkt, Mittelwert des 24 h systolischen Blutdrucks, Mittelwert des 24 h diastolischen Blutdrucks, Mittelwert der 24 h Herzfrequenz, eGFR, KHK; in Block 2 (Pharmakologische Behandlung): Behandlung mit ACE-Inhibitoren, Angiotensin Typ 1 (AT1)-Rezeptorblockern, Kalziumantagonisten, Betablockern, Diuretika, Statinen, Fibraten, anderen Lipidsenkern, Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, oralen Antikoagulantien; in Block 3 (Laborbefunde): Low Density Lipoprotein (LDL) im Serum, High Density Lipoprotein (HDL) im Serum, Triglyceride im Serum, Mikroalbuminurie, Hyperlipidämie.

Nach Hinzunahme jedes Blockes wurde für alle einzelnen Variablen eine Rückwärtsselektion durchgeführt, bei der die Variablen mit nicht signifikantem Einfluss eliminiert wurden. Für die verbliebenen Variablen des letzten Schrittes wurde in der finalen Regressionsanalyse adjustiert. Somit konnte in der multivariaten adjustierten Analyse der Einfluss der mittleren LTL auf den entsprechenden echokardiographischen Parameter geschätzt werden, der nicht auf die hier erfassten Confounder zurückzuführen ist.

Um zu untersuchen, ob das Vorliegen einer KHK oder eines Herzinfarktes den Zusammenhang zwischen mittlerer LTL und echokardiographischen Parametern beeinflusst, wurden statistische Interaktionstests durchgeführt (Wang et al. 2007).

Zweiseitige p-Werte von unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen wurden mit SAS 9.1.3 und SPSS 17 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Qualitätsanalyse der PCR Methode zur Bestimmung der mittleren LTL

Die Anwendbarkeit der von Cawthon beschriebenen PCR Methode zur Bestimmung der mittleren LTL für die vorliegende Studie wurde überprüft. Dazu wurden 105 Proben an zwei verschiedenen Tagen gemessen. Zwischen den beiden Messungen zeigte sich eine signifikante Korrelation von $r = 0,94$ ($p < 0,001$). Der Interassaykoeffizient dieser Messungen betrug 9,2 % (Abb. 14).

Zwischen den jeweiligen Dreifachmessungen aller Proben errechnete sich ein Intraassaykoeffizient von 5,8 %. Dieser Koeffizient lag bei allen Messungen zwischen 3,8 % (Minimum) und 8,2 % (Maximum). Beide Variationskoeffizienten liegen unter dem Cut-Off Wert von 15 %, bei dem von einer akzeptablen Präzision der Daten ausgegangen wird (EMA Guideline on Bioanalytical Method Validation).

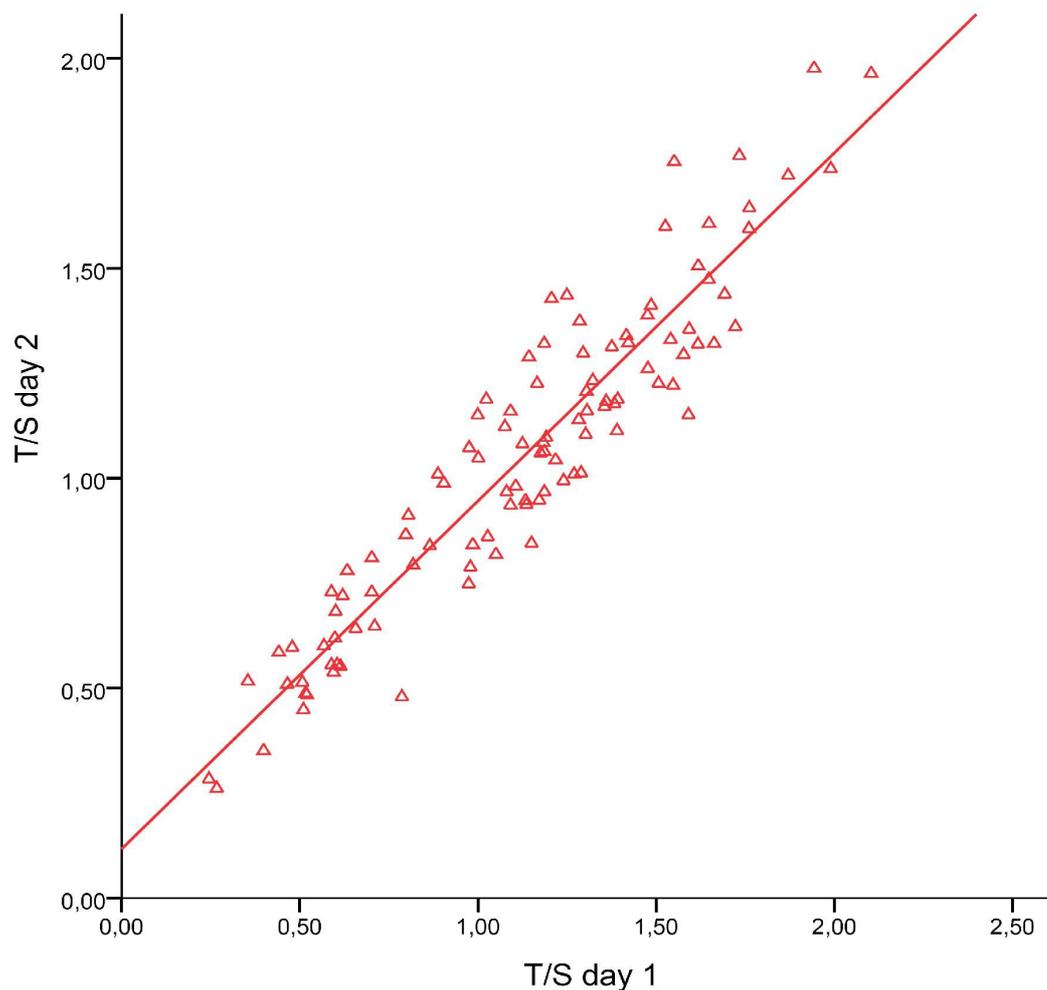


Abb. 14: Korrelation der T/S Verhältnisse, die mit der quantitativen PCR Methode an jeweils zwei verschiedenen Tagen ermittelt wurden ($r = 0,94$, $p < 0,001$): Es wurden insgesamt 105 Proben an zwei verschiedenen Tagen untersucht. X-Achse: Gemessene T/S Verhältnisse an Tag 1, Y-Achse: Gemessene T/S Verhältnisse an Tag 2.

Die T/S Verhältnisse gemessen mit der PCR Methode korrelierten signifikant mit den Messwerten der TRF Methode ($r=0.64$, $p<0.001$) (Abb. 15). Die Korrelation ist analog zu den von Cawthon beschriebenen Ergebnissen (Cawthon 2002) welche somit bestätigt wurden.

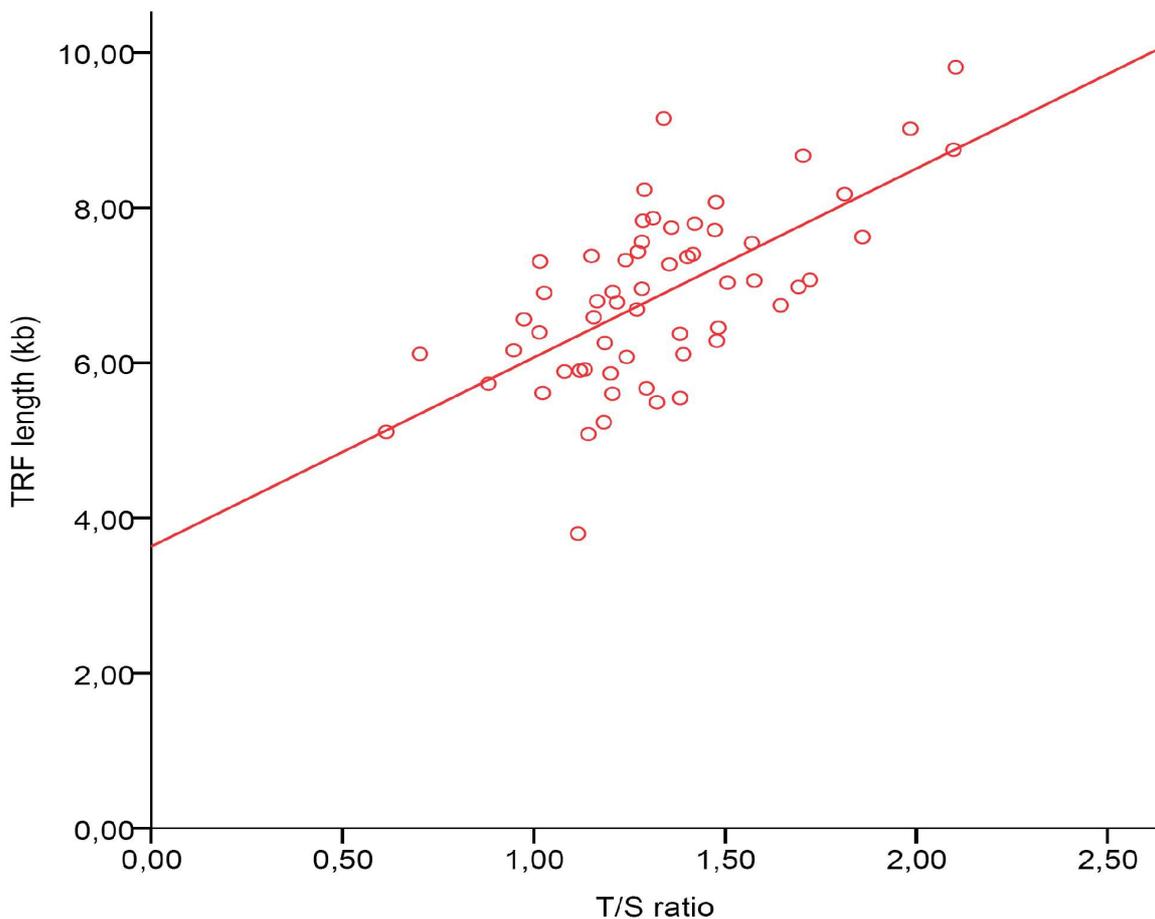


Abb. 15: Vergleich der Ergebnisse der quantitativen PCR Methode (T/S Verhältnisse, X-Achse) mit den Ergebnissen der Terminal Restriction Fragment (TRF)-Methode (TRF-Länge in kb, Y-Achse): Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen beiden Methoden ($r = 0,64$, $p < 0,001$) in Übereinstimmung mit Cawthon (2002).

3.2 Studienpopulation

In die Studie wurden 1106 Patienten eingeschlossen. Davon waren 921 Männer (83,3 %) und 185 Frauen (16,7 %) mit einem mittleren Alter von $57,9 \pm 9,8$ Jahren (Minimum: 28 Jahre, 25ste Perzentile: 51 Jahre, 75ste Perzentile: 65 Jahre, Maximum: 83 Jahre).

Von allen 1106 untersuchten Patienten waren 284 (25,7 %) Raucher. Einen Diabetes mellitus wiesen 286 (26,8 %) der Patienten auf. 901 Patienten (81,5 %) litten an KHK und 591 Patienten (53,4 %) hatten bereits einen Herzinfarkt erlitten. Die Patienten hatten im Mittel einen BMI (Quotient aus Körpergewicht und Körpergröße zum Quadrat)

von $28,9 \pm 4,7 \text{ kg/m}^2$, was einem leichten Übergewicht entspricht (Normalwerte nach WHO Global Database on BMI: $18,5 - 24,99 \text{ kg/m}^2$ (WHO Global Database on BMI)). Die mittleren systolischen und diastolischen Blutdruckwerte in der 24-h-Blutdruckmessung betragen $125 \pm 14,7$ und $73,9 \pm 9,5 \text{ mmHg}$. Die eGFR betrug in der Studienpopulation $78,5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times 1,73 \text{ m}^2$ ($\pm 20,9 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times 1,73 \text{ m}^2$). Bei 146 (13,2%) Patienten war die eGFR bereits deutlich eingeschränkt ($<60 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times 1,73 \text{ m}^2$). Die antihypertensive Medikation der Patienten ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Antihypertensive Medikation in der Studienpopulation (n = 1106)		
ACE Hemmer	808	(73,1%)
AT1-Antagonisten	167	(15,1%)
Betablocker	972	(87,9%)
Calciumantagonisten	159	(14,4%)
Diuretika	475	(42,9%)
andere Medikamente	59	(5,3%)

Die absolute Anzahl mit prozentuaalem Anteil in Klammern ist angegeben; ACE = angiotensin converting enzyme; AT1 = Angiotensin Typ 1 Rezeptor

Die echokardiographischen Daten der Studienpopulation sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Der mittlere LVMI betrug $51,8 \pm 21,0 \text{ g/m}^{2,7}$. Bei 522 (47,2 %) Patienten fand sich eine LVH. Eine bestehende LVH wurde als ein LVMI von mehr als $47 \text{ g/m}^{2,7}$ bei Frauen und mehr als $50 \text{ g/m}^{2,7}$ bei Männern definiert, gemäß den Vorgaben von de Simone et al. (de Simone et al. 1995).

Die linksventrikuläre systolische Funktion war insgesamt in der Population gut erhalten (Dickstein et al. 2008): Die mittlere EF betrug $61,1 \pm 9,6 \%$ (minimum 40 %, maximum 80 %, Quartilen jeweils 55 %, 60 % und 66 %).

Tabelle 2**Echokardiographische Daten der Studienpopulation**

Parameter			
LVMI* (g/H ^{2,7})	insgesamt	51,8	± 21
	Männer	51,7	± 21,2
	Frauen	52,3	± 20,2
LVH**	insgesamt	522	(47,2%)
	Männer	421	(38,1%)
	Frauen	101	(9,1%)
EF (%)		61,1	± 9,6
LA (mm)		39,4	± 5
LVED (mm)		47,5	± 6,7
LVES (mm)		30,7	± 6,3
E/A		1,1	± 0,43
IVST (mm)		11,1	± 2,9
PWT (mm)		10,6	± 2,9
RWT		0,46	± 0,18

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung oder als absolute Anzahl mit prozentualem Anteil von der Gesamtzahl 1106 in Klammern; *LVMI = linksventrikulärer Massenindex nach Baessler et al. (Baessler et al. 2006); **LVH = linksventrikuläre Hypertrophie nach de Simone et al. (de Simone et al. 1995), definiert als LVMI ≥ 50 g/m^{2,7} bei Männern und ≥ 47 g/m^{2,7} bei Frauen; LA = linksatrialer Durchmesser; LVED = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVES = linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser; EF = Ejektionsfraktion; E/A = Verhältnis von early filling velocity (E) und peak late filling velocity (A); IVST = interventrikuläre Septumdicke; PWT = posteriore Wanddicke; RWT = relative Wanddicke

3.3 Verteilung der Telomerlänge in der Population

T/S Verhältnisse wurden in logarithmierter Form analysiert. Basierend auf den Daten aller Individuen, zeigte die Regressionslinie eine absolute Abnahme der In T/S von -0,009 (95 % KI = 0,0326 bis 0,0158) pro Lebensjahrzehnt. Dies war jedoch nicht signifikant ($p = 0,481$). Die Verteilung von In T/S in Abhängigkeit des chronologischen Alters in der Gesamtkohorte wird in Abb. 16 gezeigt.

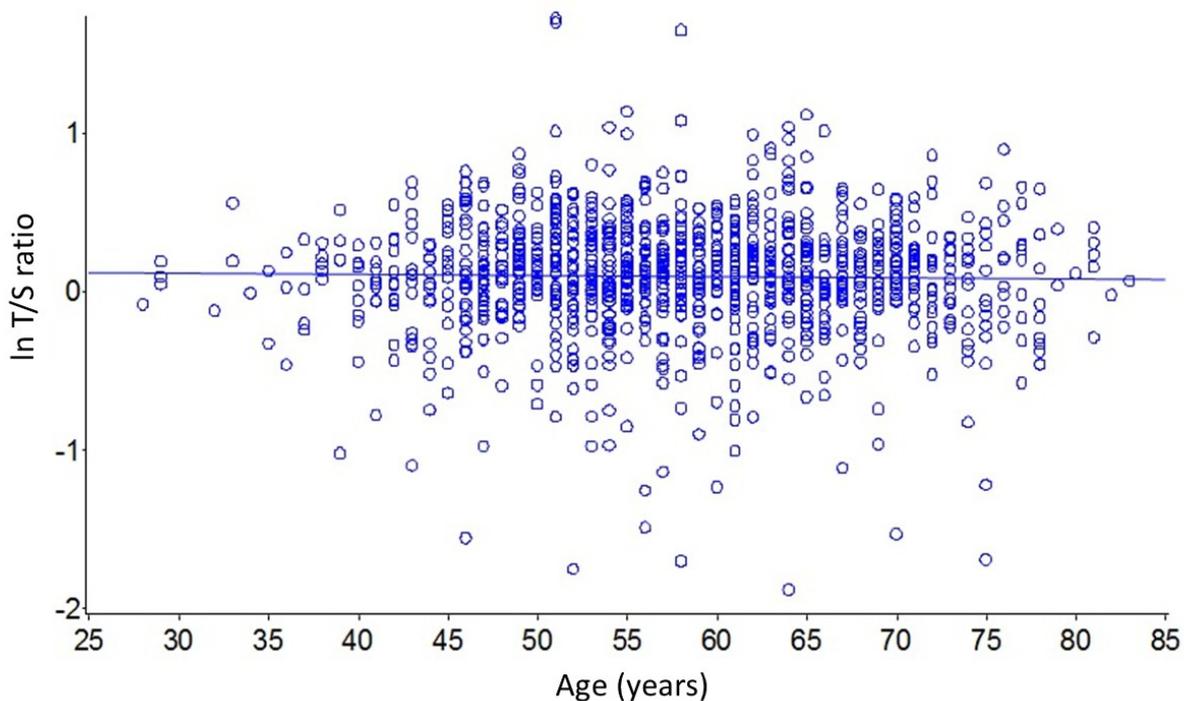


Abb. 16: Darstellung der Telomerlänge als eine Funktion des Alters ($n = 1106$):

Die Telomerlänge wurde als logarithmiertes T/S Verhältnis aufgetragen. Der Mittelwert des logarithmierten T/S Verhältnis war 0,092 (95 % KI = 0,068 bis 0,116). Die Regressionslinie zeigte eine absolute Abnahme des logarithmierten T/S Verhältnis von - 0,009 (95 % KI = 0,0326 bis 0,0158) pro Lebensjahrzehnt. Dies war jedoch nicht signifikant ($p = 0,481$). Die T/S Werte wurden zur Basis e logarithmisch umgewandelt.

Das mittlere T/S Verhältnis in der Population betrug $1,096 \pm 0,456$. Der Median des T/S Verhältnisses befand sich bei 1,132 mit einem interquartilen Bereich von 0,930 bis 1,352. Ausgehend von der Korrelation mit der TRF-Methode (Abb. 15) entsprach dies einem mittleren TRF-Wert (\pm Standardabweichung) von $6,3 \pm 4,7$ Kilobasen (kb), einem TRF Median von 6,4 kb mit einem interquartilen Bereich von 5,9 kb bis 6,9 kb.

3.4 Assoziation der mittleren LTL mit echokardiographischen Parametern

In der multivariaten adjustierten Analyse zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang der mittleren LTL mit den strukturellen Parametern IVST und LVMI sowie mit dem funktionalen Parameter EF ($p < 0,05$, Tabelle 3).

Hierbei war eine Verdopplung der mittleren LTL mit einer signifikanten Zunahme der IVST um 2,7 % (95 % KI = 0,4 % bis 5,0 %, $p = 0,021$) assoziiert.

Des Weiteren hing eine Verdopplung der mittleren LTL mit einer Zunahme des LVMI um 3,7 % (95 % KI = 0,1 % bis 7,3 %, $p = 0,044$) zusammen. Zusätzlich fand sich ein Zusammenhang zwischen der Verdopplung der mittleren LTL und einer absoluten Zunahme der EF um 0,99 % (95 % KI = 0,11 % bis 1,87 %, $p = 0,028$)

Die jeweiligen als signifikant identifizierten Kovariaten wurden im statistischen Modell berücksichtigt und sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Durch zusätzliche statistische Interaktionstests konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von mittlerer LTL und echokardiographischen Parametern nicht signifikant vom Vorhandensein oder Fehlen eines abgelaufenen Myokardinfarktes oder der KHK beeinflusst wurde ($p > 0,05$).

Tabelle 3**Verhältnis der echokardiographischen Parameter und der mittleren LTL bei multivariater adjustierter Analyse**

Echokardiographische Parameter	Veränderung %	[95% KI]	p
IVST ^A	2,70	[0,40-5,00]	0,021
EF ^{*B}	0,99	[0,11-1,87]	0,028
LVMIC ^C	3,70	[0,10-7,30]	0,044
LVES ^{*D}	-33,7	[-58,4-5,6]	0,083
PWT ^E	1,70	[-0,50-4,10]	0,135
E/A ^F	2,20	[-0,20-5,60]	0,204
RWT ^G	1,20	[-1,60-4,00]	0,418
LVED ^{*H}	46,0	[-27,1-81,5]	0,546
LA ^{*I}	-0,80	[-30,3-41,1]	0,962

*diese Variable wurde in der nicht-logarithmischen Form analysiert, in diesem Fall bedeutet die Veränderung eine absolute Veränderung der Variablen bei der Verdopplung der mittleren LTL, z.B. für EF eine absolute Zunahme von 0,99%; Variablen ohne * wurden in der logarithmischen Form analysiert, in diesem Fall bedeutet die Veränderung eine relative Veränderung der Variablen, z.B. die IVST ändert sich um 2,7% wenn die mittlere LTL verdoppelt wird; [95% KI] = 95 % Konfidenzintervall; weitere Abkürzungserläuterungen siehe Fußnote von Tabelle 2;

- A adjustiert für: Geschlecht, Alter, Geschlecht*Alter Interaktion, Größe, 24h mittlerer diastolischer Blutdruck, LDL-, HDL-, Triglyceridwerte
- B adjustiert für: Geschlecht, Alter, Pulsdruck, Diabetes, Herzinfarkt, 24h mittlerer diastolischer Blutdruck, eGFR, koronare Herzkrankheit, Calciumantagonisten, Diuretika, Aspirin, LDL-Werte, Mikroalbuminurie
- C adjustiert für: Geschlecht, Alter, Geschlecht*Alter Interaktion, BMI, Größe, GFR, koronare Herzkrankheit, LDL- und Triglyceridwerte
- D adjustiert für: Geschlecht, Alter, BMI, Größe, Rauchen, Pulsdruck, koronare Herzkrankheit, Clopidogrel, Diuretika, Triglyceridwerte
- E adjustiert für: Geschlecht, Alter, Geschlecht*Alter Interaktion, orale Antikoagulation, LDL-, HDL- und Triglyceridwerte
- F adjustiert für: Geschlecht, Alter, Pulsdruck, Diabetes, 24h mittlere diastolische Herzfrequenz, 24h mittlerer systolischer Blutdruck, Triglyceridwerte
- G adjustiert für: Geschlecht, Alter, Geschlecht*Alter Interaktion, Infarkt, 24h mittlerer diastolischer Blutdruck, koronare Herzkrankheit, orale Antikoagulation, HDL- und Triglyceridwerte, Mikroalbuminurie
- H adjustiert für: Geschlecht, Alter, BMI, Größe, Infarkt, Mikroalbuminurie
- I adjustiert für: Geschlecht, Alter, BMI, Größe, 24h mittlerer diastolische Herzfrequenz, Statine, Clopidogrel, orale Antikoagulation, Triglyceridwerte

4. Diskussion

Das Alter und der Prozess des Älter-Werdens ist nicht nur Bestandteil des täglichen Lebens, sondern auch ein nicht vermeidbarer Risikofaktor für viele Erkrankungen. Das Alter wird in klinischen Studien chronologisch als Zeitspanne seit Geburt angegeben (Demissie et al. 2006; van der Harst et al. 2007; Oeseburg et al. 2010). Damit wird man jedoch dem individuellen Verlauf des Alterns kaum gerecht. Deswegen sind weiterreichende Parameter von Interesse, die biologische Alterungsprozesse unabhängig von der Zahl der Lebensjahre beschreiben können. Auf der Grundlage der Experimente von Hayflick im Jahre 1961 (Hayflick & Moorhead 1961) kann die Telomerlänge, gestützt durch experimentelle (Harley et al. 1990) und klinische Studien (Butler et al. 1998; Hastie et al. 1990; Lindsey et al. 1991), als quantifizierbare Größe für das biologische Altern betrachtet werden. Deren Bedeutung für Erkrankungen und Organveränderungen (Oeseburg et al. 2010; Blasco 2005), auch des kardiovaskulären Systems (Fuster & Andres 2006), wird gegenwärtig kontrovers diskutiert.

Das Ziel der vorliegenden Studie war, den Zusammenhang zwischen der mittleren LTL und der kardialen Struktur und Funktion zu untersuchen. Dazu wurde eine von Cawthon beschriebene Methode der Telomerlängenmessung mittels quantitativer PCR angewandt (Cawthon et al. 2002). Diese Methode wurde anhand von Retest-Vergleichen, sowie anhand von Vergleichen mit der TRF-Methode, einer anderen Methode der Telomerlängenmessung, in ihrer Aussagekraft überprüft.

Inhaltlich wurde der Fokus auf die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs der mittleren LTL mit dem LVMI und mit der EF gesetzt. Diese beiden Hauptzielgrößen wurden ausgewählt, da sie objektiv messbare Parameter der Herzstruktur und -funktion sind und zudem klinische Bedeutung zur Einschätzung der Schwere von Krankheiten wie Herzinsuffizienz oder Linksherzhypertrophie haben. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der mittleren LTL und den echokardiographisch ermittelten Parametern EF und LVMI nachgewiesen werden. Dabei war eine längere mittlere LTL sowohl mit einer höheren EF als auch mit einem höheren LVMI assoziiert.

4.1 Real Time PCR Methode

Zur Messung der mittleren LTL wurde ein von Cawthon beschriebenes Verfahren angewandt, welches auf der *Real Time PCR* basiert (Cawthon 2002). Diese Methode ermöglicht die Messung einer großen Probenanzahl, wie es bei klinischen Studien häufig erforderlich ist. Sie basiert auf der Messung der Fluoreszenzzunahme in Echtzeit während der PCR. Die Fluoreszenzzunahme entsteht durch Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes in die doppelsträngige DNA. Ein in das Gerät integriertes Computerprogramm ermittelt für jede Probe die Amplifikationszyklenzahl, bei dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Durch den Vergleich mit einer Standardreihe kann die relative Menge des Amplifikats bestimmt werden. Da Telomere repetitive Sequenzen sind, ist ein Vergleich mit der Expression eines Single Copy Gens notwendig, welches in jedem Genom nur ein einziges Mal vorkommt. Zwischen zwei Messungen an zwei verschiedenen Tagen zeigte sich eine signifikante Korrelation von $r = 0,94$ ($p < 0,001$). Der Interassaykoeffizient dieser Messungen betrug 9,2 %, der Intraassaykoeffizient 5,8 %. Die Präzision der Methode war vergleichbar mit den Angaben in anderen Studien dieser Art (Lee et al. 2011; Wong et al. 2009; Wong et al. 2010; Risques et al. 2011; Prescott et al. 2010; Hou et al. 2009).

Um die Verlässlichkeit der Messergebnisse weiter zu überprüfen, wurde die mittlere LTL von 59 zufällig ausgewählten Proben sowohl mit der quantitativen PCR Methode als auch mit der TRF Methode bestimmt. Die TRF Methode ist ein anderes Verfahren zur Telomerlängenmessung. Bei dieser Methode wird die Telomer- und Subtelomerregion mittels Restriktionsenzymen von der übrigen DNA isoliert. Die DNA-Fragmente werden dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Länge der Telomerfragmente durch Vergleich mit einem spezifischen Längenmarker für DNA bestimmt. Somit wird die LTL bei der TRF Methode in Kilobasen angegeben, während die LTL bei der PCR Methode eine dimensionslose relative Größe darstellt. Der Korrelationskoeffizient r der beiden Methoden betrug $r = 0,64$ ($p < 0,001$). Auch dieses Ergebnis deckt sich mit dem anderer Studien (Brouillette et al. 2007; Pavesi et al. 2009). Der Unterschied zwischen diesen beiden Messmethoden könnte dadurch bedingt sein, dass nicht exakt die gleiche Struktur bestimmt wird. Bei der TRF-Methode wird je nach Restriktionsenzym ein gewisser Teil der subtelomerischen Region mit erfasst. Durch Polymorphismen oder

Längenunterschiede im subtelomerischen Bereich könnten somit zwei Individuen, die die gleiche relative Telomerlänge in der PCR aufweisen, mit der TRF-Methode unterschiedliche gemessene Telomerlängen aufweisen (Cawthon 2002). Dennoch ist ein Vergleich der beiden Methoden zur Qualitätsanalyse gerechtfertigt, da davon auszugehen ist, dass bei beiden Methoden hauptsächlich die Telomerlänge selbst erfasst wird, wofür auch die gute Korrelation zwischen den beiden Methoden spricht.

4.2 Studienpopulation

Die Population bestand aus 1106 Patienten mit arteriellem Hypertonus gemäß den Kriterien der WHO/ISH (1999 World Health Organization). Der arterielle Hypertonus wurde bei den Patienten gemäß der ESH/ESC Leitlinie behandelt (Cifkova et al. 2003). Das Durchschnittsalter in der Kohorte betrug 57,9 Jahre und der überwiegende Anteil der Patienten (83,3 %) war männlich. Bei 81,5 % aller Studienteilnehmer lag eine KHK vor, etwa die Hälfte aller Patienten (53,4 %) hatte einen Herzinfarkt, der mindestens einen Monat vor der Aufnahme in die Studie zurücklag. Die mittlere EF betrug sowohl bei Patienten mit früherem Herzinfarkt als auch bei denen ohne Herzinfarkt etwa 60 %. Statistische Interaktionstests zeigten, dass die signifikanten Assoziationen der mittleren LTL mit der EF bzw. mit dem LVMI nicht durch das Vorhandensein oder Fehlen eines Myokardinfarktes oder einer KHK beeinflusst wurden.

Untersuchungen über den Zusammenhang der LTL mit kardialen Parametern wurden bisher an unterschiedlichen Populationen durchgeführt. So bestand die Population in der Studie von Collerton et al. ausschließlich aus Teilnehmern, die zum Zeitpunkt der Studie 85 Jahre alt waren oder wurden (Collerton et al. 2007). Diese Altersgruppe wurde gewählt, da man davon ausging, dass die klinische Pathophysiologie der in dieser Gruppe vorherrschenden Herzerkrankungen eine andere sein würde als bei jüngeren Probanden. Die Teilnehmer der Studien von Vasan et al. (Vasan et al. 2009) und Kuznetsova et al. (Kuznetsova et al. 2010), die ebenfalls beide den Zusammenhang zwischen mittlerer LTL und echokardiographischen Parametern untersuchten, wurden aus der Bevölkerung rekrutiert und wiesen kein spezielles Erkrankungsprofil auf. In diesen zwei Studien wurden jeweils Personen mit Herzinfarkt

oder Herzinsuffizienz ausgeschlossen, ein Bluthochdruck lag bei jeweils nur einem Teil der Teilnehmer vor.

Es erscheint zunächst durchaus sinnvoll, schwer erkrankte Probanden auszuschließen, da so die Anzahl potentieller Einflussfaktoren im Allgemeinen minimiert wird. Durch die Untersuchung der Assoziation von mittlerer LTL und echokardiographischen Parametern in einem kardiovaskulären Risikokollektiv lassen sich jedoch möglicherweise andere Rückschlüsse bezüglich der Rolle der Telomere ziehen als es bei einer vergleichbaren Stichprobe aus der Normalbevölkerung möglich wäre.

Die vorliegende Studie konzentrierte sich auf die Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges zwischen LTL und echokardiographischen Parametern bei standardisiert behandelten hypertensiven Patienten. Ungefähr vier von fünf Patienten hatten zusätzlich eine KHK und ca. jeder zweite Patient einen mindestens einen Monat zurückliegenden Herzinfarkt. Zudem waren Risikofaktoren wie Rauchen oder Diabetes bei etwa einem Viertel der Patienten vorhanden. Auf diese Weise wurde in der vorliegenden Studie der Zusammenhang zwischen LTL und echokardiographischen Parametern unter alltäglichen klinischen Bedingungen abgebildet, was bisher in diesem Ausmaß in keiner anderen Studie der Fall war.

4.3 Telomerlänge und chronologisches Alter

In der vorliegenden Studie zeigte die mittlere LTL eine breite Streuung (Abb. 16). Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von anderen Studien (Brouillette et al. 2007; Codd et al. 2010) und unterstreicht, dass die mittlere LTL von verschiedenen Faktoren determiniert wird und nicht ausschließlich vom chronologischen Alter. Auch genetische Faktoren (Slagboom et al. 1994; Njajou et al. 2007; Jeanclos et al. 2000; Vasa-Nicotera et al. 2005; Nawrot et al. 2004), sowie Umweltfaktoren (Von Zglinicki 2002; Oikawa et al. 2001) haben sich in verschiedenen Studien als Einflussgrößen gezeigt.

In einigen Studien war eine signifikante Abnahme der mittleren LTL mit dem chronologischen Alter zu erkennen (Brouillette et al. 2007; Codd et al. 2010; Brouillette et al. 2003; Farzaneh-Far et al. 2008). Dies war in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall. Was könnten die Ursachen dafür sein?

Zunächst einmal liefert eine Querschnittsstudie immer nur eine Momentaufnahme der Situation. Es wäre also durchaus möglich, dass die individuelle Telomerlänge mit dem Alter abnimmt, aber der Vergleich zwischen den einzelnen Individuen untereinander diese Aussage nicht zulässt. Um eine Aussage über die individuelle Entwicklung der Telomerlänge machen zu können, wäre eine weitere Telomerlängenmessung nach Ablauf einer gewissen Zeit im Sinne einer Longitudinaluntersuchung erforderlich.

Weiterhin war die vorliegende Population in Bezug auf vorhandene Erkrankungen relativ heterogen. Krankheiten wie KHK (Samani et al. 2001), Herzinfarkt (Brouillette et al. 2003; Maubaret et al. 2010), Diabetes (Sampson et al. 2006; Zee et al. 2010) und Fettleibigkeit (Valdes et al. 2005; Zannolli et al. 2008) wiesen in verschiedenen Studien eine Assoziation mit einer verminderten mittleren LTL auf. So wäre es denkbar, dass selbst bei relativ jungen Patienten eine geringe mittlere LTL vorliegt, wenn sie die soeben genannten Erkrankungen aufweisen und eine höhere mittlere LTL bei älteren Patienten, die im Verhältnis gesünder sind. Dadurch könnte es sein, dass die beschriebene Assoziation der mittleren LTL mit dem Alter nicht mehr nachweisbar wird.

Für diese Sichtweise sprechen auch die Ergebnisse einer Studie mit mehr als 1500 Teilnehmern von Brouillette et al. (Brouillette et al. 2003), die eine signifikante Abnahme der mittleren LTL mit dem Alter nur bei den gesunden Kontroll-Probanden und nicht bei den Fällen, die einen Herzinfarkt in einem Lebensalter unter 50 Jahren erlitten hatten, nachweisen konnte. Dies ist ein Anhaltspunkt dafür, dass auch die in unserem Fall nachgewiesene schwache Assoziation der Telomerlänge mit dem Alter darauf zurückzuführen sein könnte, dass ausschließlich herzkranken Probanden untersucht wurden.

Die Studie von Farzaneh-Far et al. (Farzaneh-Far et al. 2010) wirft ebenso ein neues Licht auf den Zusammenhang von mittlerer LTL und dem chronologischen Alter.

In dieser Studie wurde die Verteilung der Telomerlänge in einer Population von 608 Patienten mit stabiler KHK bei Rekrutierung und nach Ablauf von fünf Jahren untersucht. Es zeigte sich, dass nur in 45 % der Fälle die Telomerlänge mit den Jahren abgenommen hatte. Bei 32 % war sie gleichgeblieben und bei 23 % hatten sich die Telomere sogar verlängert. In anderen Studien konnte unter anderem auch bei Gesunden eine ähnliche Verteilung des Telomerlängenverlaufs über die Zeit

nachgewiesen werden (Kuznetsova et al. 2010; Aviv et al. 2009; Nordfjäll et al. 2009; Epel et al. 2008). Dies beweist, dass die Telomerlänge mit den Jahren nicht zwangsläufig abnehmen muss. Vielmehr scheint eine Entwicklung in beide Richtungen möglich zu sein und zwar im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus. Je länger die Telomere zum Ausgangszeitpunkt waren, desto höher war die Wahrscheinlichkeit, dass sie sich mit der Zeit verkürzten und andersherum. Diese These wird durch die Tatsache gestützt, dass in allen genannten Studien die Telomerlänge am Ausgangspunkt der stärkste Prädiktor für die weitere Entwicklung der Telomerlänge war (Farzaneh-Far et al. 2010; Aviv et al. 2009; Nordfjäll et al. 2009; Epel et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Studien lassen das Zwei-Zustände-Modell der offenen (uncapped) und geschlossenen (capped) Telomere wahrscheinlich erscheinen (Blackburn 2000). Dieses besagt, dass kurze Telomere mit größerer Wahrscheinlichkeit keine Schleife am Ende bilden können, also offen sind, und damit einen Angriffspunkt für die Telomerase bilden. Diese verlängert dann die Telomere und führt sie wieder in den geschlossenen Zustand über.

Wie bereits oben erwähnt, konnten derlei Hypothesen in der vorliegenden Studie wegen ihres Querschnittsdesigns nicht direkt überprüft werden. Die Tatsache, dass keine signifikante Korrelation zwischen Telomerlänge und chronologischem Alter gefunden wurde, zeigt jedoch, dass sich der Effekt des chronologischen Alters nicht zwangsläufig direkt in der Telomerlänge widerspiegeln muss. Dies lässt die oben diskutierten Prozesse und Einflussfaktoren wahrscheinlich erscheinen.

Derlei Befunde legen abermals nahe, zwischen chronologischem und biologischem Altern im Sinne einer „mitotischen Uhr“ zu unterscheiden, da eben dieses „biologische Altern“ ein komplexeres und individuelleres Maß für körperliche Alterungsprozesse zu sein scheint als das chronologische Alter.

4.4 Telomerlänge und Herzfunktion

Ein wichtiges Ergebnis unserer Studie war, dass die EF, als Maß für die Herzfunktion, positiv mit der mittleren LTL assoziiert war ($p < 0,05$, Tabelle 3). Dabei konnte eine absolute Zunahme der EF um 0,99 % bei Verdopplung der mittleren LTL beobachtet

werden (95 % KI 0,108-1,866; $p = 0,028$).

Dieses Ergebnis lässt die Frage aufkommen, ob es einen direkten physiologischen Zusammenhang der Telomerlänge mit der EF als Maß für die Herzfunktion gibt. In der aktuellen Literatur existieren unterschiedliche Studien, die ebenfalls diesen möglichen Zusammenhang beleuchtet haben.

Eine positive Assoziation der Telomerlänge mit der EF konnte in der Studie von Collerton et al. nachgewiesen werden (Collerton et al. 2007). Hier zeigte sich, dass das Vorhandensein von um eine Standardabweichung längeren Telomeren mit einer Erhöhung der EF um 5% einherging. 12% der gesamten Varianz der EF konnte statistisch auf die Variation in der Telomerlänge zurückgeführt werden. Auch wenn das hier genutzte statistische Modell nicht direkt mit dem in der vorliegenden Studie angewandten Modell vergleichbar ist, weisen die Ergebnisse in die gleiche Richtung. Dies stützt die Ergebnisse der vorliegenden Studie.

Eine Studie von Spyridopoulos et al. (Spyridopoulos et al. 2009) zeigte ebenfalls einen positiven Zusammenhang zwischen der Telomerlänge verschiedener Leukozytenpopulationen und der EF von 25 Patienten mit KHK, stattgehabtem Herzinfarkt und eingeschränkter Ventrikelfunktion. Auch Farzaneh-Far et al., die 2008 in einer Population von Patienten mit stabiler KHK einen Zusammenhang zwischen der Mortalität und der Telomerlänge nachwiesen, haben gezeigt, dass eine kurze Telomerlänge mit einer niedrigeren EF einhergeht (Farzaneh-Far et al. 2008).

Eine niedrige EF ist Ausdruck einer eingeschränkten Herzfunktion und somit das Hauptcharakteristikum einer Herzinsuffizienz. Van der Harst et al. zeigten 2007, dass die Telomerlänge von Patienten mit Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verkürzt ist (van der Harst et al. 2007). Hierbei war zudem die Kürze der Leukozytentelomere mit der Schwere der Krankheit (NYHA II-IV) vergesellschaftet. In einer weiteren Studie konnte van der Harst kürzlich zeigen, dass kurze Telomere bei herzinsuffizienten Patienten mit einem höheren Risiko für Hospitalisierung oder Tod zusammenhängen (van der Harst et al. 2010).

Einen weiteren Hinweis für diesen Zusammenhang lieferten die Ergebnisse einer

aktuellen Studie von Wong et al. Hier wurde die Telomerlänge verschiedener Leukozytensubpopulationen bei Patienten mit Herzinsuffizienz und ihren Nachkommen sowie bei entsprechenden Kontroll-Patienten untersucht. Es zeigte sich eine verkürzte mittlere LTL bei den Patienten mit Herzinsuffizienz sowie bei deren Nachkommen im Vergleich zur jeweiligen Kontroll-Gruppe (Wong et al. 2011). Dieses Ergebnis könnte einen Hinweis auf eine moderierende Funktion der mittleren LTL bei der Erblichkeit der Herzinsuffizienz bzw. auf ihre Ursächlichkeit bei der Entstehung der Herzinsuffizienz darstellen. Um hier weitere Erkenntnisse zu gewinnen, wäre eine prospektive Beobachtung der jeweiligen Nachkommen im Hinblick auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine interessante Ergänzung.

Eine aktuelle Studie von Raymond et al. zeigte Ergebnisse, die Anlass zu weiter differenzierterer Betrachtung geben. Es wurde die mittlere LTL von Patienten mit Herzinsuffizienz aufgrund einer idiopathischen Kardiomyopathie mit der von gesunden Probanden verglichen (Raymond et al. 2013). In keiner der beiden Gruppen konnte ein Zusammenhang zwischen der mittleren LTL und der EF nachgewiesen werden. Dies steht zunächst im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und der anderen genannten Studien. Es ist es jedoch notwendig, die Auswahl der Patienten in der Untersuchung von Raymond et al. zu betrachten. Im Gegensatz zu den vorher diskutierten Studien wurden Patienten gewählt, die ausdrücklich keine ischämische Kardiomyopathie aufwiesen. Vor diesem Hintergrund wäre eine mögliche Erklärung, dass in den anderen Studien, in denen Patienten mit KHK untersucht wurden, der Zusammenhang unter anderem dadurch entsteht, dass die mittlere LTL Ausdruck dieser Grunderkrankung und der assoziierten Risikofaktoren ist, welche dann kumulativ zu einer Herzinsuffizienz führen. Weitere Unterschiede der Studien bestanden darin, dass Patienten mit Bluthochdruck oder einer anderen Herz-Kreislauf-Erkrankung in der Vorgeschichte in der Arbeit von Raymond et al. ausgeschlossen wurden. In der Fallgruppe musste eine isolierte idiopathische dilatative Kardiomyopathie mit einer niedrigen EF (<45%) vorliegen. Denkbar wäre, dass der in den übrigen Studien gefundene Effekt in diesem EF-Bereich nicht nachweisbar ist. Zusätzlich wurden ausschließlich Menschen schwarzafrikanischer Herkunft untersucht, während bei allen anderen Studien zu diesem Thema nur Menschen kaukasischer Herkunft

eingeschlossen wurden. Dass die mittlere LTL zwischen den beiden Bevölkerungsgruppen unterschiedlich ist, wurde bereits nachgewiesen (Hunt et al. 2008). Es ist es daher auch möglich, dass die Ergebnisse der Studien aufgrund der Unterschiedlichkeit der Populationen einfach nicht direkt vergleichbar sind.

Alle soeben genannten Studien, wie auch die hier vorliegende Arbeit, untersuchten die Telomerlänge in peripheren Blutzellen. Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob auch im insuffizienten Herzen selbst Veränderungen dieser Art beobachtet werden können. Aufschluss darüber gibt unter anderem eine Studie, in der die Telomerlänge in kardialem Gewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie mit dem gesunder Herzen verglichen wurde (Oh et al. 2003). Die Telomerlänge war in den insuffizienten Herzen um 25 % kürzer. Eine weitere Studie zeigte verkürzte Telomere in den Myozyten alternder Herzen mit ventrikulärer Dysfunktion (Chimenti et al. 2003). In dieser Studie wurden die Herzzellen zudem auf den Seneszenz-Marker p16^{INK4a} getestet. Es zeigte sich, dass die Zellen mit besonders stark verkürzten Telomeren (< 2,5 kbp) häufiger positiv für p16^{INK4a} waren und dass solche Zellen in den alternden, kranken Herzen häufiger vorkamen, als in gesunden Kontroll-Herzen.

Eine Erklärung, die davon ausgeht, dass kurze Telomere im Herzen mit einer erhöhten Fraktion an seneszenten Zellen einhergehen, deren Funktion eingeschränkt ist und die somit möglicherweise die Entwicklung von Herzinsuffizienz begünstigen, erscheint durch diese Ergebnisse plausibel.

Weiterhin ungeklärt ist die Frage, inwiefern kurze Telomere biologisch ursächlich für die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind, oder ob es sich hier nur um einen rein statistischen Zusammenhang handelt. Hinweise auf die Beantwortung dieser Frage gaben tierexperimentelle und in vitro zelluläre Studien. Die Telomerase-Knock-Out-Maus, die in späten Generationen stark verkürzte Telomere aufweist, entwickelt ab der fünften Generation eine schwere Herzinsuffizienz, die mit der dilatativen Kardiomyopathie des Menschen vergleichbar ist. Hier führen die funktionseingeschränkten Telomere zu einer Verminderung der Zellteilung, verstärkter Apoptose aufgrund höherer p53-Level und Hypertrophie der Kardiomyozyten (Leri et al.

2003). Selektive in vivo Expression von TERT in Myozyten von Mäusen führte zum Erhalt der Telomerlänge und schützte das Myokard vor Schäden durch eine koronare Ischämie (Oh et al. 2001). Durch experimentelle Studien auf zellulärer Ebene ergaben sich weitere Hinweise auf die Rolle der Telomere. Es wurde beschrieben, dass eine Suppression der Funktion von TRF 2 in kultivierten Kardiomyozyten zu Apoptose und Telomer-Verlust führte, während eine exogene Expression von TRF 2 vor Schäden durch oxidativen Stress schützte und eine vorzeitige Apoptoseentwicklung verhinderte (Oh et al. 2003). In der gleichen Studie konnte in vivo ein Zusammenhang zwischen mechanischem Stress am Herzen (vergleichbar mit erhöhter Druckbelastung) und der *Down-Regulation* von TRF 2, Telomerverkürzung und Aktivierung des *DNA Damage Response Systems* gezeigt werden. Exogene TRF 2-Expression konnte auch hier die genannten Effekte wieder aufheben (Oh et al. 2003).

In Studien wie diesen wird deutlich, dass Telomere in der Herzphysiologie eine wichtige Rolle spielen und möglicherweise an der Entwicklung von Krankheiten maßgeblich mit beteiligt sein könnten. Aussagekräftige Studien am Menschen hierzu fehlen jedoch bisher. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass die Telomerlänge ein Parameter ist, der genetische Faktoren und Umweltfaktoren in sich vereint. Das heißt verkürzte Telomere begünstigen wahrscheinlich die Entstehung einer Herzerkrankung. Dieser Effekt kann jedoch auf verschiedenen Wegen zustande kommen, nämlich einerseits durch erblich kurze Telomere und andererseits dadurch, dass Faktoren wie oxidativer Stress die Telomere verkürzen und diese somit deren schädlichen Einfluss vermitteln.

4.5 Telomere und Herzstruktur

Ein Ergebnis der vorliegenden Studie war, dass der LVMI und die IVST ebenfalls positiv mit der mittleren LTL assoziiert waren. Dabei war bei verdoppelter mittlerer LTL die IVST um den Faktor 1,027 (95 % KI 1,004-1,050; $p = 0,021$) und der LVMI um den Faktor 1,037 (95 % KI 1,001-1,073; $p = 0,044$) vervielfacht. Beide Parameter sind Ausdruck einer Massenzunahme des Herzens.

Ähnliche Resultate wurden bereits in zwei weiteren Studien gesehen. 2009 fanden Vasan et al. in einer Studie mit 850 aus der Normalbevölkerung rekrutierten

Teilnehmern einen positiven Zusammenhang zwischen der mittleren LTL und der LVM. Dabei war eine Zunahme der LVM um eine Standardabweichung mit einer Zunahme der mittleren LTL um 69-72 bp assoziiert. Dieser Effekt war bei hypertensiven Patienten signifikant (Zunahme der mittleren LTL um 100 bp; $p = 0,003$). Bei normotensiven Patienten zeigte sich lediglich ein Trend (Zunahme der mittleren LTL um 49 bp; $p = 0,09$) (Vasan et al. 2009).

Kuznetsova et al. zeigten 2010, dass in einer Kohorte von 334 aus der Normalbevölkerung rekrutierten Probanden ebenfalls ein solcher positiver Zusammenhang bestand. In dieser Studie wurde zu zwei Zeitpunkten die mittlere LTL bestimmt und zum zweiten Zeitpunkt außerdem die echokardiographischen Daten erhoben. In der longitudinalen Betrachtung war dabei eine um eine Standardabweichung größere mittlere LTL zum ersten Messzeitpunkt mit einer Zunahme der LVM um 5,20 g ($p = 0,003$) und des LVMI um 2,70 g/m² ($p = 0,004$) assoziiert. Anders als bei Vasan et al. war hier der Effekt jedoch bei normotensiven Probanden besonders ausgeprägt. Die Zunahme der LVM betrug in dieser Gruppe 8,03 g ($p = 0,0001$) und die des LVMI 3,74 g/m² ($p = 0,0007$). In der Gruppe der hypertensiven Probanden dagegen war der Effekt nicht signifikant. In der Querschnittsbetrachtung zeigten sich abgeschwächte Ergebnisse, die jedoch in dieselbe Richtung wiesen (Kuznetsova et al. 2010).

Da die LVH ein Indikator für Herzorganschäden ist (Devereux et al. 1992) und mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einhergeht (Levy et al. 1988), scheint es bemerkenswert, dass in nunmehr drei Studien die Herzhypertrophie mit längeren und nicht mit kürzeren Telomeren assoziiert ist.

Eine mechanistische Erklärung kann von der Herzphysiologie abgeleitet werden. Entgegen früherer Annahmen ist es offenbar nicht so, dass das Herz aus einem Verband postmitotischer Zellen besteht. Vielmehr findet im Laufe des Lebens ein kontinuierlicher, wenn auch geringer, Zellumsatz statt, bei dem alte oder beschädigte Zellen durch die Differenzierung von kardialen Stammzellen ersetzt werden (Beltrami et al. 2003; Bergmann et al. 2009). Es gibt tierexperimentelle Anhaltspunkte dafür, dass dieser Umsatz deutlich zunimmt, wenn z. B. im Rahmen eines Infarktes Herzgewebe

regeneriert werden muss (Hsieh et al. 2007). Als Vorläuferzellen gelten sogenannte kardiale Progenitorzellen (CPCs), deren Herkunft bisher noch nicht abschließend geklärt ist. Als mögliche Quelle gilt das Knochenmark, in welchem die hämatopoetischen Stammzellen residieren und aus dem auch verschiedene andere Progenitorzellen, wie endotheliale Progenitorzellen (EPCs) oder mesenchymale Stammzellen (MSCs) entstehen können (Dimmeler & Leri 2008; Wong et al. 2010).

Entgegen früherer Annahmen sind auch all diese Stammzelltypen einem Alterungsprozess unterworfen. So konnten Gonzalez et al. zeigen, dass CPCs mit zunehmendem Alter eine Telomerverkürzung aufweisen und einen seneszenten Phänotyp annehmen, wodurch auch ihre Funktion beeinträchtigt wird (Gonzalez et al. 2008).

Ceselli et al. verglichen in einer 2011 erschienenen Studie den Zustand von humanen kardialen Stammzellen aus chronisch insuffizienten Herzen mit denen aus gesunden Herzen. Sie konnten zeigen, dass das chronologische Alter in allen Herzen ein starker Prädiktor für die Zellalterung, ausgedrückt durch verschiedene Seneszenzmarker, und die Telomerlänge der kardialen Stammzellen war. Zudem traten in den kardialen Stammzellen der insuffizienten Herzen deutlich kürzere Telomere sowie eine größere Anzahl anderer Seneszenzmarker auf als in den gesunden Herzen (Ceselli et al. 2011). Die Hypothese besagt, dass diese verstärkte Zellalterung und damit die Funktionsbeeinträchtigung kardialer Stammzellen eine Rolle bei der Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz spielt.

Das Ausmaß der Funktionsbeeinträchtigung lässt sich am Beispiel anderer am kardialen Remodeling beteiligten Stammzellen demonstrieren. Eine tierexperimentelle Studie, bei der zur Regeneration von Infarktgewebe MSCs von jungen und alten Spenderratten in Rattenherzen injiziert wurden, zeigte, dass durch die Injektion der jungen MSCs die Infarktgröße abnahm, während die alten MSCs keinen Effekt hatten. Die Herzfunktion konnte durch junge MSCs besser aufrecht erhalten werden als durch alte MSCs (Jiang et al. 2008).

Eine mögliche Schlussfolgerung daraus wäre, dass kurze Telomere mit seneszenten Stammzellen einhergehen, die dadurch in ihrer regenerativen Kapazität eingeschränkt sind: Die Herzzellmasse kann deshalb nicht aufrechterhalten werden, die Herzfunktion

lässt nach und es kann sich eine Herzinsuffizienz entwickeln. Zudem ist vorstellbar, dass im Falle einer Ischämie die Regeneration erschwert ist, da der Pool an funktionalen Stammzellen reduziert ist.

Im Umkehrschluss ergibt sich aus dieser Hypothese zudem eine Erklärungsmöglichkeit für das in den oben beschriebenen Studien unerwartete Ergebnis der positiven Assoziation zwischen langen Telomeren und der Linksherzhypertrophie: Die Stammzellkapazität bei langen Telomeren ist besser als bei kurzen Telomeren. Die Herzzelldichte und damit auch die Masse kann dadurch erhalten werden (Wong et al. 2010). Um diese Hypothese besser zu verstehen, ist es wichtig, den Unterschied zwischen physiologischer und pathologischer Herzhypertrophie zu unterstreichen.

Bei der pathologischen Linksherzhypertrophie, die durch kontinuierliche mechanische Überlastung entsteht, lässt sich histologisch eine Myozytenvergrößerung und eine Zunahme der Apoptoserate beobachten. Zusätzlich entwickelt sich eine interstitielle Fibrose und die Herzfunktion ist langfristig beeinträchtigt (McMullen & Jennings 2007). Diese Form der Hypertrophie ist es, die einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität darstellt (Devereux et al. 1992; Levy et al. 1988). Die physiologische Herzhypertrophie hingegen, die vor allem durch sportliches Training entsteht, zeigt keine Fibrose und keine erhöhte Apoptoserate. Die Herzfunktion ist ebenfalls nicht beeinträchtigt, manchmal sogar verbessert (McMullen & Jennings 2007). Eine mögliche Erklärung für die überraschend positive Assoziation zwischen Linksherzhypertrophie und längerer mittlerer LTL könnte also sein, dass es sich hierbei um physiologische und nicht um pathologische Linksherzhypertrophie handelt.

In einer tierexperimentellen Studie von Oh et al. konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen, bei denen die Expression von TERT im Herzmuskel selektiv aktiviert worden war, die Telomerlänge im Herzen erhalten blieb und das Ende der Teilungsfähigkeit und die Apoptoseentwicklung hinausgezögert werden konnten. Bei diesen Mäusen wurde im Alter von 12 Wochen eine zelluläre Hypertrophie beobachtet, die jedoch ohne Anzeichen von Fibrose oder Funktionsverlust war (Oh et al. 2001). Dieses Ergebnis liefert weitere Evidenz dafür, dass lange Telomere mit einer physiologischen, also „guten“ Herzhypertrophie einhergehen.

Die Kausalität ist damit aber weiterhin ungeklärt. Es ist durchaus denkbar, dass ein weiterer Faktor, wie z. B. physische Aktivität sowohl die Telomerlänge (Cherkas et al. 2008) als auch die Herzhypertrophie (McMullen & Jennings 2007) beeinflusst und auf diese Weise den beschriebenen Effekt hervorruft (Wong et al. 2010)

4.6 Stärken und Grenzen der Studie

Eine wesentliche Stärke der vorliegenden Studie ist die Größe der Kohorte im Vergleich mit anderen Studien dieser Art (Collerton et al. 2007; van der Harst et al. 2007; Vasan et al. 2009; Kuznetsova et al. 2010).

Die Population ist insofern relativ heterogen aufgebaut, als die Gemeinsamkeit aller Teilnehmer darin bestand, dass als Hauptmerkmal ein Hypertonus vorlag. Die Art und das Ausmaß der Herz-Kreislauf-Erkrankungen waren verschieden, die Geschlechtsverteilung war ungleichmäßig und es bestanden Begleiterkrankungen, wie z. B. Diabetes oder Adipositas. Diese Heterogenität spiegelt weitgehend die Verhältnisse der klinischen Praxis wider. Auf diese Weise werden die Einflussgrößen, die bei kardiovaskulären Risikopatienten unter realen klinischen Bedingungen ebenfalls gehäuft auftreten, auf möglichst repräsentative Weise abgebildet.

Ein Nachteil dieser heterogenen Zusammensetzung ist, dass der Nachweis von Effekten erschwert ist, da verschiedene Confounder eine Rolle spielen können. Die Tatsache, dass trotz dieser erschwerenden Umstände ein signifikanter Effekt nachweisbar ist, welcher im Einklang mit den Ergebnissen vergleichbarer Studien mit homogeneren Stichproben steht, spricht jedoch dafür, dass dieser Effekt robust ist.

Aufgrund des Querschnittsdesigns war eine Verlaufsbeobachtung der mittleren LTL in der Studie wie bei Farzaneh-Far et al. (Farzaneh-Far et al. 2010) oder Kuznetsova et al. (Kuznetsova et al. 2010) nicht möglich. Außerdem beziehen sich die Ergebnisse ausschließlich auf die ethnische Gruppe von weißen Menschen kaukasischer Herkunft. Dies könnte insofern von Bedeutung sein, als Menschen mit schwarzer Hautfarbe an sich längere Telomere als weiße Menschen haben (Hunt et al. 2008). Zudem wurde ein erhöhtes Vorkommen einer LVH bei schwarzen Menschen im Vergleich zu weißen Menschen gefunden (Drazner et al. 2005). Die Generalisierbarkeit der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse und möglichen Hypothesen ist somit

eingeschränkt.

Was die Methode der Telomerlängenmessung anbelangt, so ist die verwendete quantitative PCR Methode eine weit verbreitete etablierte Methode, da mit ihr eine umfangreiche Probenanzahl gemessen werden kann. Ihre Korrelation mit der traditionell zur Telomerlängenmessung verwendeten Southern Blot Methode konnte in unserer und in anderen Studien gezeigt werden (Brouillette et al. 2007; Cawthon 2002). Ein Nachteil dieser Methode besteht dennoch darin, dass mit ihr nur die durchschnittliche Telomerlänge in den kernhaltigen Zellen der Blutprobe gemessen wird. Es kann somit nicht zwischen verschiedenen Leukozytenuntergruppen, zwischen verschiedenen Zellen einer Zellgruppe und auch nicht zwischen den verschiedenen Chromosomen eines Kerns differenziert werden. Dies könnte insofern wichtig sein, da es Hinweise aus Untersuchungen bei Nagetieren gibt, dass das Chromosom mit den jeweils kürzesten Telomeren ausschlaggebend für die Lebensfähigkeit der Zelle ist (Hemann et al. 2001). Die Länge des kürzesten Telomers kann aber mit der quantitativen PCR Methode nicht identifiziert werden. Um den Einfluss der Telomerlänge einzelner Chromosomen zu überprüfen, wäre ein Fluoreszenz In Situ Hybridisierungs (FISH) Verfahren zur Telomerlängenmessung an sich differenzierter, aber gegenwärtig in einer so großen Patientenzahl nicht praktikabel. Ein weiterer Nachteil der quantitativen PCR Methode ist die nur eingeschränkte Vergleichbarkeit von Messwerten in unterschiedlichen Kohorten weshalb Weiterentwicklungen mit dem Ziel einer absoluten und standardisierten Telomerlängenmessung eventuell in Zukunft auch in der klinischen Forschung Eingang finden (O'Callaghan et al. 2008).

Die gemessene leukozytäre Telomerlänge ist nicht identisch mit der Telomerlänge in anderen Geweben. Einige Studien konnten zwar eine Korrelation der Telomerlängen verschiedener Gewebearten des Körpers nachweisen (Takubo et al. 2002; Wilson et al. 2008), ein Nachweis einer solchen Korrelation zwischen kardiomyozytärer und leukozytärer Telomerlänge fehlt jedoch bisher und erfordert zukünftige Abklärung. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass die zellulären Bestandteile der Blutprobe, aus der die mittlere LTL bestimmt wird, unterschiedlich zusammengesetzt sein können, abhängig von äußeren Umständen, wie z. B. bei Infektionen. Die Telomerlänge ist eine Größe, die auch von der Telomeraseaktivität oder auch TRF-Expression bestimmt wird.

Insofern würde bei Berücksichtigung dieser Regulationsmechanismen ein umfassenderer Einblick in den Zusammenhang von Telomerenbiologie und Herz-Kreislauf-Erkrankungen entstehen.

Auch wenn die Echokardiographie zur Messung der Herzstruktur und -funktion eine etablierte Methode darstellt (Verdecchia et al. 2007), so unterliegt sie einer begrenzten Genauigkeit, besonders in einem multizentrischen Studiendesign. Dennoch waren die Qualitätskriterien in der hier vorliegenden Studie vergleichbar mit denen in bereits durchgeführten Untersuchungen dieser Art. Ein anderes bildgebendes Verfahren, wie zum Beispiel die Magnet Resonanz Tomographie des Herzens zur Erhebung der Daten über die Herzfunktion und die Herzstruktur, würde genauere Ergebnisse liefern (Alfakih et al. 2004), war jedoch in einer so großen Stichprobe wie der vorliegenden nicht praktikabel.

4.7 Schlussfolgerung

In dieser Studie konnte eine statistisch signifikante Assoziation der mittleren LTL mit der EF als Maß für die Herzfunktion und dem LVMI sowie der IVST als Parameter für die Herzstruktur gezeigt werden. Wenn die Effekte auch klein sind, so wurde erstmalig ein Zusammenhang der Telomerlänge mit der kardialen Funktion und Struktur in einer kardialen Hochrisikopopulation gezeigt. Dies könnte als ein weiterer Hinweis auf die biologische Bedeutung der Telomere für die beständige zelluläre Regeneration am Herzen verstanden werden. Damit verbunden werden die Telomere als potentielle Strukturen zur Abbildung des biologische Alterns weiter in den Vordergrund gerückt. Inwieweit die Telomere für innovative Therapien bei Herzerkrankungen zugänglich sind, wird damit zur spannenden Frage für die Zukunft.

5. Abkürzungsverzeichnis

°C – Grad Celsius

µl – Mikroliter

A – Adenin

A – Lichtabsorption

Abb. – Abbildung

ACE-Hemmer – Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer

ASE – American Society of Echocardiography

AT1-Rezeptor-Antagonisten – Angiotensin II Rezeptor, Typ 1- Antagonisten

b – Lichtweg

BMI – Body Mass Index

bp – Basenpaare

C – Cytosin

C – DNA-Konzentration

C – Kontroll-DNA

c[DNA] – DNA-Konzentration

CPCs – cardial progenitor cells (kardiale Progenitorzellen)

CT-Wert – Cycle Threshold-Wert

DC – Dyskeratosis Congenita

DNA – desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

dNTPs – desoxy Nukleotidtriphosphate

e – molarer Extinktionskoeffizient

E/A Verhältnis – Verhältnis von early filling velocity (E) und peak late filling velocity (A)

EF – Ejektionsfraktion

eGFR – estimated glomerular filtration rate (geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate)
nach (Levey et al. 2003)

EMA – European Medicines Agency

EPCs – endothelial progenitor cells (endotheliale Progenitorzellen)

ESH/ESC – European Society of Hypertension/European Society of Cardiology

g – Gramm

g – Erdbeschleunigung

G – Guanin
h – Stunde
HCl – Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HDL – High Density Lipoprotein
ISH – International Society of Hypertension
IVST – Interventricular Septum Thickness (interventrikuläre Septumdicke)
kb – Kilobasen
kbp – Kilobasenpaare
KHK – koronare Herzkrankheit
KI – Konfidenzintervall
LA – left atrium (linker Vorhof)
LDL – Low Density Lipoprotein
ln – natürlicher Logarithmus
Log – Logarithmus
LTL – leukozytäre Telomerlänge
LVED – linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVES – der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser
LVH – linksventrikuläre Hypertrophie
LVM – linksventrikuläre Masse
LVMI – linksventrikulärer Massenindex
m – Meter
M – Marker für Molekulargewicht-Standard
MDRD – modification of diet in renal disease
min – Minute
ml – Milliliter
mm - Millimeter
mmHg – Millimeter Quecksilbersäule
MI – Myokardinfarkt
MSCs – mesenchymal stem cells (mesenchymale Stammzellen)
nm – Nanometer
nM – nanomolar

NaOH – Natriumhydroxid
NYHA – New York Heart Association
p – p-Wert
pAVK – periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR – Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pH – pH-Wert
PW-Doppler – Pulsed Wave Doppler
PWT – Posterior Wall Thickness (posteriore Wanddicke)
r – Korrelation
RNA – ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RWT – Relative Wall Thickness (relative Wanddicke)
s – Sekunde
SDS – sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSBP – single strand binding protein (Einzelstrangstabilisierendes Protein)
SSC – saline-sodium citrate (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer)
T – Thymin
T/S – relatives Maß für die mittlere leukozytäre Telomerlänge
TAE-Puffer – Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TERC – Telomerase RNA Component
TERT – Telomerase Reverse Transcriptase
TRF 1/2 – Telomere Repeat Binding Factor 1/2
TRF-Methode – Terminal Restriction Fragment-Methode
U – Units (Einheiten)
V – Volt
vgl. – vergleiche
WHO – World Health Organization

6. Literaturverzeichnis

- 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens* 1999;17(2):151–83.
- Adaikalakoteswari A, Balasubramanyam M, Mohan V. Telomere shortening occurs in Asian Indian Type 2 diabetic patients. *Diabet Med J Br Diabet Assoc* 2005;22(9):1151–6.
- Ahmed S, Hodgkin J. MRT-2 checkpoint protein is required for germline immortality and telomere replication in *C. elegans*. *Nature* 2000;403(6766):159–64.
- Alfakih K, Reid S, Jones T, Sivananthan M. Assessment of ventricular function and mass by cardiac magnetic resonance imaging. *Eur Radiol* 2004;14(10):1813–22.
- Ashley EA, Niebauer J. *Cardiology explained*. London: Remedica; 2004; 39–40.
- Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and Aging. *Physiol Rev* 2008;88(2):557–79.
- Aviv A, Chen W, Gardner JP, et al. Leukocyte Telomere Dynamics: Longitudinal Findings Among Young Adults in the Bogalusa Heart Study. *Am J Epidemiol* 2009;169(3):323–9.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell* 2003;114(6):763–76.
- Benetos A, Okuda K, Lajemi M, et al. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 2001;37(2):381.
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science* 2009;324(5923):98–102.
- Bertuch A, Lundblad V. Telomeres and double-strand breaks: trying to make ends meet. *Trends Cell Biol* 1998;8(9):339–42.
- Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 1978;120(1):33–53.
- Blackburn EH. Switching and Signaling at the Telomere. *Cell* 2001;106(6):661–73.
- Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature* 2000;408(6808):53–6.
- Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*

2005;6(8):611–22.

Blasco MA, Lee H-W, Hande MP, et al. Telomere Shortening and Tumor Formation by Mouse Cells Lacking Telomerase RNA. *Cell* 1997;91(1):25–34.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* 1998;279(5349):349–52.

Brouillette SW, Whittaker A, Stevens SE, van der Harst P, Goodall AH, Samani NJ. Telomere length is shorter in healthy offspring of subjects with coronary artery disease: support for the telomere hypothesis. *Heart Br Card Soc* 2008;94(4):422–5.

Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. White Cell Telomere Length and Risk of Premature Myocardial Infarction. *Arter. Thromb Vasc Biol* 2003;23(5):842–6.

Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* 2007;369(9556):107–14.

Brümmendorf TH, Mak J, Sabo KM, et al. Longitudinal studies of telomere length in feline blood cells: implications for hematopoietic stem cell turnover in vivo. *Exp Hematol* 2002;30(10):1147–52.

Butler MG, Tilburt J, DeVries A, et al. Comparison of Chromosome Telomere Integrity in Multiple Tissues from Subjects at Different Ages. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;105(2):138–44.

Butt HZ, Atturu G, London NJ, Sayers RD, Bown MJ. Telomere Length Dynamics in Vascular Disease: A Review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;40(1):17–26.

Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003;361(9355):393–5.

Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30(10):e47–e47.

Cesselli D, Beltrami AP, D'Aurizio F, et al. Effects of Age and Heart Failure on Human Cardiac Stem Cell Function. *Am J Pathol* 2011;179(1):349–66.

Chan SRWL, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2004;359(1441):109–21.

Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN. Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Res* 2003;31(5):1576–83.

- Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, et al. The Association Between Physical Activity in Leisure Time and Leukocyte Telomere Length. *Arch Intern Med* 2008;168(2):154–8.
- Chimenti C, Kajstura J, Torella D, et al. Senescence and Death of Primitive Cells and Myocytes Lead to Premature Cardiac Aging and Heart Failure. *Circ Res* 2003;93(7):604–13.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003;42(6):1206–52.
- Cifkova R, Erdine S, Fagard R, et al. Practice guidelines for primary care physicians: 2003 ESH/ESC hypertension guidelines. *J Hypertens* 2003;21(10):1779–86.
- Codd V, Mangino M, van der Harst P, et al. Common variants near TERC are associated with mean telomere length. *Nat Genet* 2010;42(3):197–9.
- Collerton J, Martin-Ruiz C, Kenny A, et al. Telomere length is associated with left ventricular function in the oldest old: the Newcastle 85+ study. *Eur Heart J* 2007;28(2):172–6.
- Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 2002;21(4):564–79.
- Cong Y-S, Wright WE, Shay JW. Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66(3):407–25.
- Coviello-McLaughlin GM, Prowse KR. Telomere length regulation during postnatal development and ageing in *Mus spretus*. *Nucleic Acids Res* 1997;25(15):3051 – 3058.
- Crabbe L, Verdun RE, Haggblom CI, Karlseder J. Defective Telomere Lagging Strand Synthesis in Cells Lacking WRN Helicase Activity. *Science* 2004;306(5703):1951–3.
- Demissie S, Levy D, Benjamin EJ, et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* 2006;5(4):325–30.
- Desjardins PR, Conklin DS. Microvolume quantitation of nucleic acids. *Curr Protoc Mol Biol Ed Frederick M Ausubel Al* 2011;Appendix 3:3J.
- Devereux RB, Koren MJ, de Simone G, Roman MJ, Laragh JH. Left ventricular mass as a measure of preclinical hypertensive disease. *Am J Hypertens* 1992;5(6 Pt 2):175S–181S.
- Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, et al. Echocardiographic assessment of left

- ventricular hypertrophy: Comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986;57(6):450–8.
- Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail J Work Group Heart Fail Eur Soc Cardiol* 2008;10(10):933–89.
- Diede SJ, Gottschling DE. Telomerase-Mediated Telomere Addition In Vivo Requires DNA Primase and DNA Polymerases [alpha] and [delta]. *Cell* 1999;99(7):723–33.
- Dimmeler S, Leri A. Aging and Disease as Modifiers of Efficacy of Cell Therapy. *Circ Res* 2008;102(11):1319–30.
- Drazner MH, Dries DL, Peshock RM, et al. Left ventricular hypertrophy is more prevalent in blacks than whites in the general population: the Dallas Heart Study. *Hypertension* 2005;46(1):124–9.
- Du X, Shen J, Kugan N, et al. Telomere Shortening Exposes Functions for the Mouse Werner and Bloom Syndrome Genes. *Mol Cell Biol* 2004;24(19):8437–46.
- EMA Guideline on Bioanalytical Method Validation. (Accessed Feb 14, 2013, at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)
- Epel ES, Merkin SS, Cawthon R, et al. The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men. *Aging* 2008;1(1):81–8.
- Farzaneh-Far R, Cawthon RM, Na B, Browner WS, Schiller NB, Whooley MA. Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(7):1379–84.
- Farzaneh-Far R, Lin J, Epel E, Lapham K, Blackburn E, Whooley MA. Telomere Length Trajectory and Its Determinants in Persons with Coronary Artery Disease: Longitudinal Findings from the Heart and Soul Study. *Plos One* 2010;5(1):e8612.
- Feigenbaum H, Armstrong WF, Ryan T. Feigenbaum's echocardiography / Harvey Feigenbaum, William Armstrong, Thomas Ryan [Internet]. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins; 2005; 141-6, 171-4 (Accessed Dec 21, 2010, at: http://platon.serbi.ula.ve/librum/librum_ula/ver.php?ndoc=245299)
- Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, et al. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol*

2007;165(1):14.

Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs* 2002;16(2):17–23.

Flores I, Benetti R, Blasco MA. Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18(3):254–60.

Fuster JJ, Andres V. Telomere Biology and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2006;99(11):1167–80.

Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, et al. Rise in Insulin Resistance Is Associated With Escalated Telomere Attrition. *Circulation* 2005;111(17):2171–7.

Gonzalez A, Rota M, Nurzynska D, et al. Activation of Cardiac Progenitor Cells Reverses the Failing Heart Senescent Phenotype and Prolongs Lifespan. *Circ Res* 2008;102(5):597–606.

Gottdiener JS, Bednarz J, Devereux R, et al. American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials: A report from the american society of echocardiography's guidelines and standards committee and the task force on echocardiography in clinical trials. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17(10):1086–119.

Graakjaer J, Bischoff C, Korsholm L, et al. The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans is determined by inherited, telomere-near factors and is maintained throughout life. *Mech Ageing Dev* 2003;124(5):629–40.

Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 1989;337(6205):331–7.

Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *tetrahymena* extracts. *Cell* 1985;43(2, Part 1):405–13.

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* 1999;97(4):503–14.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;345(6274):458–60.

Van der Harst P, de Boer RA, Samani NJ, et al. Telomere length and outcome in heart failure. *Ann Med* 2010;42(1):36–44.

Van der Harst P, van der Steege G, de Boer RA, et al. Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(13):1459–64.

- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990;346(6287):866–8.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25(3):585–621.
- Hemann MT, Strong MA, Hao L-Y, Greider CW. The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability. *Cell* 2001;107(1):67–77.
- Hornsby PJ. Short telomeres: cause or consequence of aging? *Aging Cell* 2006;5(6):577–8.
- Hou L, Savage SA, Blaser MJ, et al. Telomere Length in Peripheral Leukocyte DNA and Gastric Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Publ. Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2009;18(11):3103–9.
- Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 2007;13(8):970–4.
- Hunt SC, Chen W, Gardner JP, et al. Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study and the Bogalusa Heart Study. *Aging Cell* 2008;7(4):451–8.
- Janning W, Knust E. *Genetik: allgemeine Genetik, molekulare Genetik, Entwicklungsgenetik*. Georg Thieme Verlag; 2004. S. 146
- Jeanclous E, Krolewski A, Skurnick J, et al. Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes* 1998;47(3):482–6.
- Jeanclous E, Schork NJ, Kyvik KO, Kimura M, Skurnick JH, Aviv A. Telomere Length Inversely Correlates With Pulse Pressure and Is Highly Familial. *Hypertension* 2000;36(2):195–200.
- Jiang S, Kh Haider H, Ahmed RPH, Idris NM, Salim A, Ashraf M. Transcriptional profiling of young and old mesenchymal stem cells in response to oxygen deprivation and reparability of the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(3):582–96.
- Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev* 2000;5(2):167–73.
- Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-Dependent Apoptosis Induced by Telomeres Lacking TRF2. *Science* 1999;283(5406):1321–5.
- Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T. Senescence Induced by Altered Telomere

- State, Not Telomere Loss. *Science* 2002;295(5564):2446–9.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266(5193):2011–5.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):95–125.
- Kuznetsova T, Codd V, Brouillette S, et al. Association Between Left Ventricular Mass and Telomere Length in a Population Study. *Am J Epidemiol* 2010;172(4):440 – 450.
- De Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 2002;21(4):532–40.
- De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005;19(18):2100–10.
- Lee M, Martin H, Firpo MA, Demerath EW. Inverse association between adiposity and telomere length: The Fels Longitudinal Study. *Am J Hum Biol Off J Hum Biol Counc* 2011;23(1):100–6.
- Leri A, Franco S, Zacheo A, et al. Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. *Embo J* 2003;22(1):131–9.
- Levey AS, Coresh J, Balk E, et al. National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Ann Intern Med* 2003;139(2):137 –147.
- Levy D, Anderson KM, Savage DD, Kannel WB, Christiansen JC, Castelli WP. Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 1988;108(1):7–13.
- Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA, Green DK, Cooke HJ. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res* 1991;256(1):45–8.
- Lung F-W, Ku C-S, Kao W-T. Telomere length may be associated with hypertension. *J Hum Hypertens* 2007;22(3):230–2.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233–41.
- Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, et al. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet* 1998;18(1):76–80.
- Maubaret CG, Salpea KD, Jain A, et al. Telomeres are shorter in myocardial infarction patients compared to healthy subjects: correlation with environmental risk factors. *J Mol Med Berl Ger* 2010;88(8):785–94.

- McClintock B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* 1941;26(2):234–82.
- McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34(4):255–62.
- Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999;402(6761):551–5.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A Highly Conserved Repetitive DNA Sequence, (TTAGGG)_n, Present at the Telomeres of Human Chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(18):6622–6.
- Mukherjee M, Brouillette S, Stevens S, Shetty KR, Samani NJ. Association of shorter telomeres with coronary artery disease in Indian subjects. *Heart Br Card Soc* 2009;95(8):669–73.
- Muller HJ. The remaking of chromosomes. *Collect Net* 1938;13(198):181–95.
- Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, Aviv PA. Telomere length and possible link to X chromosome. *The Lancet* 2004;363(9408):507–10.
- Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, et al. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(29):12135–9.
- Nordfjäll K, Svenson U, Norrback K-F, Adolfsson R, Lenner P, Roos G. The individual blood cell telomere attrition rate is Telomere Length Dependent. *Plos Genet* 2009;5(2).
- O’Callaghan N, Dhillon V, Thomas P, Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *BioTechniques* 2008;44(6):807–9.
- O’Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(3):171–81.
- Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH, van der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch* 2010;459(2):259–68.
- Oh H, Taffet GE, Youker KA, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(18):10308–13.
- Oh H, Wang SC, Prahash A, et al. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(9):5378–5383.
- Oikawa S, Tada-Oikawa S, Kawanishi S. Site-Specific DNA Damage at the GGG

- Sequence by UVA Involves Acceleration of Telomere Shortening. *Biochemistry (Mosc.)* 2001;40(15):4763–8.
- Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 1973;41(1):181–90.
- Palm W, de Lange T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annu Rev Genet* 2008;42(1):301–34.
- Pavesi E, Avondo F, Aspesi A, et al. Analysis of telomeres in peripheral blood cells from patients with bone marrow failure. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53(3):411–6.
- Prescott J, McGrath M, Lee I-M, Buring JE, De Vivo I. Telomere length and genetic analyses in population-based studies of endometrial cancer risk. *Cancer* 2010;116(18):4275–82.
- QIAGEN. PAXgene Blood DNA Kit Handbook (Accessed May 9, 2013, at <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Genomic-DNA/PAXgene-Blood-DNA-Kit#resources>)
- Raymond AR, Norton GR, Sareli P, Woodiwiss AJ, Brooksbank RL. Relationship between average leucocyte telomere length and the presence or severity of idiopathic dilated cardiomyopathy in black Africans. *Eur J Heart Fail* 2013;15(1):54–60.
- Risques RA, Lai LA, Himmetoglu C, et al. Ulcerative Colitis–Associated Colorectal Cancer Arises in a Field of Short Telomeres, Senescence, and Inflammation. *Cancer Res* 2011;71(5):1669.
- Rodier F, Kim S-H, Nijjar T, Yaswen P, Campisi J. Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(5):977–90.
- Rudolph KL, Chang S, Lee H-W, et al. Longevity, Stress Response, and Cancer in Aging Telomerase-Deficient Mice. *Cell* 1999;96(5):701–12.
- Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978;58(6):1072–83.
- Samani NJ, Boulby R, Butler R, Thompson JR, Goodall AH. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 2001;358(9280):472–3.
- Sampson MJ, Winterbone MS, Hughes JC, Dozio N, Hughes DA. Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(2):283–9.
- Shay J, Wright W. Hallmarks of telomeres in ageing research. *J Pathol* Januar

- 2007;211(2):114–23.
- Shay JW, Wright WE. Telomerase: A target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2(4):257–65.
- Shippen-Lentz D, Blackburn EH. Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 1990;247(4942):546–52.
- De Simone G, Devereux RB, Daniels SR, Koren MJ, Meyer RA, Laragh JH. Effect of growth on variability of left ventricular mass: Assessment of allometric signals in adults and children and their capacity to predict cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 1995;25(5):1056–62.
- De Simone G, Kizer JR, Chinali M, Roman MJ, Bella JN, Best LG, et al. Normalization for body size and population-attributable risk of left ventricular hypertrophy[ast]. *Am J Hypertens* 2005;18(2):191–6.
- Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 1994;55(5):876–82.
- Spyridopoulos I, Hoffmann J, Aicher A, et al. Accelerated Telomere Shortening in Leukocyte Subpopulations of Patients With Coronary Heart Disease: Role of Cytomegalovirus Seropositivity. *Circulation* 2009;120(14):1364–72.
- Van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell* 1998;92(3):401–13.
- Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, et al. Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol* 2002;37(4):523–31.
- Thermo Fisher Scientific. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. (Accessed May 9, 2013, at: <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>)
- Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005;366(9486):662–4.
- Vasan RS, Demissie S, Kimura M, et al. Association of Leukocyte Telomere Length With Echocardiographic Left Ventricular Mass: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2009;120(13):1195–202.
- Vasa-Nicotera M, Brouillette S, Mangino M, et al. Mapping of a major locus that determines telomere length in humans. *Am J Hum Genet* 2005;76(1):147–51.
- Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 1998;8(5):279–82.

- Verdecchia P, Angeli F, Achilli P, et al. Echocardiographic left ventricular hypertrophy in hypertension: marker for future events or mediator of events? *Curr Opin Cardiol* 2007;22(4):329–34.
- Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* 2001;413(6854):432–5.
- Wang R, Lagakos SW, Ware JH, Hunter DJ, Drazen JM. Statistics in medicine--reporting of subgroup analyses in clinical trials. *N Engl J Med* 2007;357(21):2189–94.
- WHO Global Database on Body Mass Index. (Accessed April 20, 2011, at: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp>)
- Willeit P, Willeit J, Brandstätter A, et al. Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(8):1649–56.
- Wilson WRW, Herbert KE, Mistry Y, et al. Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J* 2008;29(21):2689–94.
- Wong LSM, van der Harst P, de Boer RA, Huzen J, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Aging, telomeres and heart failure. *Heart Fail Rev* 2010;15(5):479–86.
- Wong LSM, Huzen J, van der Harst P, et al. Anaemia is associated with shorter leucocyte telomere length in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail J Work Group Heart Fail Eur Soc Cardiol* 2010;12(4):348–53.
- Wong LSM, van der Harst P, de Boer RA, et al. Renal dysfunction is associated with shorter telomere length in heart failure. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc* 2009;98(10):629–34.
- Wong LSM, Huzen J, de Boer RA, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ, van der Harst P. Telomere Length of Circulating Leukocyte Subpopulations and Buccal Cells in Patients with Ischemic Heart Failure and Their Offspring. *Plos One* 2011;6(8):e23118.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996;18(2):173–9.
- Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 1997;11(21):2801–9.
- Yang Z, Huang X, Jiang H, et al. Short telomeres and prognosis of hypertension in a chinese population. *Hypertension* 2009;53(4):639–45.

Zannolli R, Mohn A, Buoni S, et al. Telomere length and obesity. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. Juli 2008;97(7):952–4.

Zee RYL, Castonguay AJ, Barton NS, Germer S, Martin M. Mean leukocyte telomere length shortening and type 2 diabetes mellitus: a case-control study. *Transl Res J Lab Clin Med* 2010;155(4):166–9.

Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002;27(7):339–44.

7. Anhang

7.1 Lebenslauf

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

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

7.2 Publikationen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Poster: **Telomere length and left ventricular structure in hypertensive patients under pharmacotherapy according to guidelines.** Huber M., *Winther I.*, Reibis R., Do V., Bolbrinker J., Wehland M., Wegscheider K., Völler H., Kreutz R. 11. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, 22-24. Oktober 2009 Heidelberg

Poster: **Telomere length as a parameter of biological ageing associates with cardiac mass and function in hypertensive patients** Huber M., Treszl A., Wehland M., *Winther I.*, Reibis R., Bolbrinker J., Stoll M., Wegscheider K., Völler H., Kreutz R. 34. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga, 9.-11. Dezember 2010 Berlin

Originalarbeit: **Genetic variants implicated in telomere length associated with left ventricular function in patients with hypertension and cardiac organ damage.** Huber M, Treszl A, Wehland M, *Winther I*, Zergibel I, Reibis R, Bolbrinker J, Stoll M, Schönfelder G, Wegscheider K, Völler H, Kreutz R. *J Mol Med.* September 2012; 90(9): 1059-67.

7.3 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Kreutz für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung der Durchführung und Vollendung dieser Arbeit.

Ich möchte Dr. med. Matthias Huber sehr herzlich für die wissenschaftliche Betreuung, konstruktive Kritik und Unterstützung bei der Planung, Ausführung und Verfassung dieser Arbeit danken. Er war immer für mich erreichbar und ansprechbar.

Für die Hilfe beim Erlernen sowie der Durchführung der Methodik möchte ich besonders Katrin Kossatz danken, die mir mit Rat und Tat stets geduldig zur Seite stand.

Auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für klinische Pharmakologie und Toxikologie die mich auf meinem Weg begleitet haben möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Ich danke ebenso meinen Eltern und Chris, die mich von Anbeginn bis zum Ende des langen Weges zur Vollendung dieser Arbeit begleitet haben. Sie hatten auch bei der größten Frustration stets ein aufmunterndes Wort für mich übrig und haben mich immer wieder neu motiviert.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Schwester Gesche danken, die mich während des Endspurts durch geduldiges Korrekturlesen immer wieder unheimlich unterstützt hat und eine Menge ihrer knappen Zeit für mich geopfert hat, selbst noch über Kontinente hinweg. Ich hoffe du weißt wie dankbar ich dafür bin.

Ohne euch wäre diese Arbeit niemals fertig geworden.

7.4 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ingke Winther-Teichmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Assoziation der leukozytären Telomerlänge mit echokardiographischen Parametern der kardialen Struktur und Funktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie** 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation 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

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Ingke Winther-Teichmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Poster: Huber M., *Winther I.*, Reibis R., Do V., Bolbrinker J., Wehland M., Wegscheider K., Völler H., Kreutz R., **Telomere length and left ventricular structure in hypertensive patients under pharmacotherapy according to guidelines**, 11. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, 22-24. Oktober 2009 Heidelberg
Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung und Dateninterpretation

Poster: Huber M., Treszl A., Wehland M., *Winther I.*, Reibis R., Bolbrinker J., Stoll M., Wegscheider K., Völler H., Kreutz R., **Telomere length as a parameter of biological ageing associates with cardiac mass and function in hypertensive patients**, 34. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga, 9.-11. Dezember 2010 Berlin
Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung und Dateninterpretation

Zeitschriftenbeitrag: Huber M., Treszl A., Wehland M., *Winther I.*, Zergibel I., Reibis R., Bolbrinker J., Stoll M., Schönfelder G., Wegscheider K., Völler H., Kreutz R., **Genetic variants implicated in telomere length associated with left ventricular function in patients with hypertension and cardiac organ damage**, J. Mol. Med. September 2012;90(9):1059–67.
Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung und Dateninterpretation

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin