

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Kinderheilkunde III

**Untersuchungen zum Einfluss sportlicher Aktivitäten  
auf das humane Epigenom**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Oliver Swietek

aus Dortmund

2021

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/75494

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20220509-104850-5

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Jan Buer  
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Nils von Neuhoff  
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Frank Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2022

## **Publikationen:**

De Lazzari N<sup>§</sup>, Swietek O<sup>§</sup>, Klocke KS, Neuhoff NV, Kurpiers N (2022)  
[§ = geteilte Erstautorschaft] : Acute effects of endurance exercise on Global DNA methylation after a high intensity and moderate intensity intervention – A methodological study. J Med Case Rep Case Series 3(01): <https://doi.org/10.38207/JMCRCS/2022/JAN030106>

\* Publikation zum Zeitpunkt der Begutachtung noch in Progress (Veröffentlichung kurz vor der mündlichen Prüfung)

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG .....	8
1.1 Der Stellenwert von Sport und körperlicher Aktivität für die Gesundheit.....	9
1.2 Epigenetik.....	12
1.2.1 Epigenetische Regulationsmechanismen.....	14
1.2.2.1 DNA-Methylierung .....	15
1.2.2.2 Histonmodifikationen .....	18
1.2.2.3 Micro-RNA.....	18
1.2.2.4 Das Zusammenspiel der einzelnen Regulationsmechanismen .....	19
1.3 Der Stellenwert von Epigenetik für die Entstehung von Krankheiten .....	19
1.3.1 Beeinflussung der Karzinogenese durch epigenetische Regulation .....	20
1.4 Auswirkungen verschiedener Umweltbedingungen auf das humane Epigenom .....	21
1.4.1 DNA-Methylierung im Alter .....	21
1.4.2 Studienlage zur Auswirkung körperlicher Aktivität auf die epigenetischen Regulationsmechanismen am Beispiel der DNA-Methylierung .....	22
1.4.2.1 Langzeitstudien.....	23
1.4.2.2 Kurzzeitstudien.....	29
1.4.2.3 Das Problem der aktuellen Studienlage.....	31
2 FRAGESTELLUNGEN.....	32

3 MATERIAL UND METHODEN.....	34
3.1 Materialien.....	34
3.1.1 Technische Geräte.....	34
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	35
3.1.3 Kits.....	36
3.1.4 Reagenzen und Chemikalien.....	36
3.1.5 Oligonukleotid-Primer .....	37
3.1.6 Verwendete Software.....	37
3.2 Teilnehmer der Studie .....	38
3.2.1 Einschlusskriterien .....	39
3.2.2 Ausschlusskriterien .....	39
3.2.3 Ethikantrag und Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie und der genetischen Analyse gemäß des Gendiagnostikgesetzes .....	39
3.3 Studienprotokoll .....	40
3.3.1 Messung der Peak Power .....	41
3.3.2 Durchlaufen der Testinterventionen .....	42
3.3.3 Blutabnahme .....	42
3.4 Molekulargenetische Untersuchungen .....	43
3.4.1 DNA-Isolation.....	44
3.4.2 Qualitätskontrolle der extrahierten DNA.....	45
3.4.2.1 Spektrophotometrie .....	45
3.4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	47
3.4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	48
3.4.3 Bisulfitmodifizierung der DNA .....	49
3.4.4 Herstellung von methylierter DNA.....	50
3.4.5 Verfahren zur Beurteilung der Veränderungen in der DNA-Methylierung.....	51

3.4.5.1 Methyl-ELISA .....	51
3.4.5.2 Methylierungs-spezifische-PCR (MSP) .....	54
3.5 Statistische Methoden.....	56
3.5.1 Deskriptive Statistik.....	56
3.5.2 Statistische Datenanalyse .....	56
3.5.2.1 Test der Normalverteilung.....	56
3.5.2.2 Test für zwei abhängige Stichproben .....	56
3.5.2.3 Angabe der Effektstärke .....	57
4 ERGEBNISSE.....	58
4.1 Ergebnisse des Methylierungs-ELISAs - Veränderungen des DNA-Methylierungsgrades nach der sportlichen Intervention .....	58
4.1.1 Globale DNA-Methylierung .....	60
4.1.2 Veränderungen nach den unterschiedlichen Trainingsintensitäten.....	62
4.1.3 Kriterien zur Qualitätskontrolle eines einzeln durchgeführten ELISAs .....	66
4.1.3.1 Das Bestimmtheitsmaß $R^2$ .....	66
4.1.3.2 Intra-Assay des ELISAs .....	67
4.1.4 Umgang mit Ausreißern.....	68
4.2 Methylierungs-spezifische PCR .....	69
5 DISKUSSION .....	70
5.1 Interpretation und Integration der Ergebnisse in den bisherigen Wissensstand .....	70
5.2 Bewertung der Methodik .....	73
5.2.1 Stärken und Vorteile der Studie .....	73
5.2.2 Schwächen und Nachteile der Studie.....	74

5.3 Weitere Methoden zur Bestimmung der DNA-Methylierung.....	78
5.4 Empfehlung und offene Fragen zur Anpassung weiterer Forschungen zum Nachweis von akuten Veränderungen des Epigenoms in Folge von einzelnen Sportinterventionen .....	80
5.5 Bedeutung der Ergebnisse für die praktische Medizin und weitere Forschungen .....	82
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	84
7 LITERATURVERZEICHNIS .....	86
8 TABELLARISCHER ANHANG .....	95
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	96
10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	97
11 DANKSAGUNG .....	100
12 LEBENS LAUF .....	101

## 1 EINLEITUNG

In der Welt der Medizin gibt es kaum eine Behandlungsmethode, die im Vergleich zu körperlicher Aktivität derartig viele Erkrankungsbilder positiv beeinflussen kann und zudem ein sehr geringes Nebenwirkungsprofil aufweist. Insofern ist es nicht überraschend, dass die Ausübung von Sport zum einen in der Prävention als auch bei der Therapie vieler Krankheiten zunehmend etabliert und untersucht wird. Die sportliche Beübung des Körpers, z.B. in Form von Ausdauertraining, ist mit einer Vielzahl an positiven Effekten für diverse Organsysteme und die körperliche Fitness verbunden (s. Kap 1.1), die man für die Primär- und Sekundärprävention von Krankheiten nutzt. Auch in der Tertiärprävention wird Sport, z.B. in Form von Sportprogrammen bei Krebsüberlebenden in Ergänzung zur leitliniengerechten Therapie, eingesetzt. Hierbei macht man sich die direkten Wirkungen auf die Tumorentwicklung und das Tumorwachstum zunutze. In den letzten 20 Jahren erhielt das Themenfeld der Epigenetik (s. Kap. 1.2) fortlaufend Einzug in diesen Teilaspekt der medizinischen Forschung. Sie ist über verschiedene Regulationsmechanismen, wie die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen, an der Karzinogenese beteiligt (s. Kap. 1.3) und lässt sich durch Umweltfaktoren, wie Sport (s. Kap. 1.4.) beeinflussen. In Hinsicht auf Sportprogramme in der Prävention von Krankheiten stellt sich die Frage, welche Belastungsintensität und -dauer gewählt werden muss, um einen Effekt zu messen.

Die Epigenetik liefert eine neue Möglichkeit diesen Effekt auf molekulargenetischer Ebene zu messen und somit auch Sportprogramme im Rahmen einer Therapie objektiv zu bewerten.

Der Hauptteil der aktuellen Studienlage zum Zusammenhang von Sport und Epigenetik beruht auf regelmäßiger körperlicher Aktivität oder geplanten Interventionen über mehrere Wochen und Monate und lässt erste Aussagen zur gezielten Beeinflussung der epigenetischen Regulationsmechanismen vor dem Hintergrund verschiedener Krankheitsbilder zu (s. Kap. 1.4.1). Inwiefern einzelne Sportinterventionen, wie sie im Rahmen von Sportprogrammen bei Krebsüberlebenden zur Anwendung kommen könnten, positive epigenetische Effekte mit sich bringen, lässt sich schwer einschätzen, weil erst wenige Publikationen veröffentlicht wurden, die die Auswirkung von einzelnen akuten Interventionen auf das humane Epigenom untersucht haben (s. Kap. 1.4.2).

Diese Pilotstudie soll untersuchen, inwiefern eine einmalige Sportintervention auf dem Fahrradergometer zu Veränderungen der DNA-Methylierung führen kann und ob der Methyl-ELISA der Firma EpiGentek dazu geeignet ist, diese Veränderungen valide zu messen.

## 1.1 Der Stellenwert von Sport und körperlicher Aktivität für die Gesundheit

Körperliche Inaktivität hat weltweit erhebliche negative gesundheitliche Auswirkungen und zählt zu den Top 10 – Risikofaktoren aller Erkrankungen des Menschen (World Health, 2009). Es wird geschätzt, dass körperliche Inaktivität für 6-10% der nicht-übertragbaren Krankheitsbilder, wie beispielsweise die koronare Herzkrankheit (KHK), Diabetes mellitus Typ 2 oder verschiedene Tumorentitäten verantwortlich ist. Zusätzlich verursacht körperliche Inaktivität schätzungsweise 9% aller Todesfälle (Lee et al., 2012).

Körperliche Aktivität hat umgekehrt eine Reihe an positiven gesundheitlichen Effekten und trägt zu einem gesunden Lebensstil bei. Zu den nachweisbaren Effekten gehören unter anderem: Höhere kardiorespiratorische Fitness, gesündere Körperzusammensetzung mit niedrigerem BMI, ein niedrigeres Stresslevel, niedrigerer Blutdruck, verbesserte Insulinsensitivität, niedrigeres Inflammationslevel (Warburton et al., 2006). Diese Effekte führen folglich sowohl zu einer verbesserten Lebensqualität als auch zu einer Risikominderung und einer besseren Prognose von verschiedenen Krankheitsbildern, wie KHK, Bluthochdruck, Schlaganfall, Metabolisches Syndrom, Typ-2-Diabetes, verschiedene Karzinome (z.B. Brust- und Kolonkarzinom), Depression, Osteoporose und vielen weiteren. Körperliche Aktivität trägt somit zur Primär- und Sekundärprävention vieler chronischer Erkrankungen bei und erhöht dadurch die Lebenserwartung eines Menschen (Warburton et al., 2006).

Der menschliche Körper und seine Leistungsfähigkeit passen sich sportlicher Belastung an. Hierbei bestimmt die Schwerpunktsetzung (Kraft, Ausdauer, Geschwindigkeit, Koordination, etc.) des Trainings darüber, inwiefern sich die einzelnen Körpersysteme anpassen (Jones and Carter, 2000). Zur Erläuterung dient der Vergleich von Kraft- zu Ausdauertraining. Ausdauer bezeichnet die Fähigkeit eine bestimmte Kraft oder Geschwindigkeit möglichst lange aufrechtzuerhalten. Während Krafttraining aufgrund der stärkeren Muskelreize eher zur Hypertrophie der Skelettmuskulatur geeignet ist, zielt Ausdauertraining auf eine Verbesserung der aeroben Fitness ab, die vor allem mit dem kardiorespiratorischen System verknüpft ist.

Während Krafttraining im niedrigen Wiederholungsbereich abläuft, zielt Ausdauertraining auf eine besonders hohe Wiederholungsanzahl, bzw. den kontinuierlichen Ablauf, eines bestimmten Bewegungsablaufs über eine längere Zeit ab (Medicine, 2009). Die Anpassung des Körpers auf das Ausdauertraining zeigt sich durch die Verbesserung von verschiedenen Parametern der aeroben Fitness. Dazu zählen die maximale Sauerstoffaufnahme ( $VO_{2max}$ ), die Bewegungsökonomie, die Laktatschwelle und die kritische Leistung („critical power“), die die maximal mögliche Leistung über einen bestimmten Zeitraum angibt (Jones and Carter, 2000).

Diese Parameter bestimmen die Trainingskapazität und somit die Belastbarkeit eines Menschen. Myers et al. (2002) veröffentlichten Daten, die zeigten, dass ein niedriger  $VO_{2max}$  die Sterblichkeit um den Faktor 4,5 erhöht. Für sie stellt die Trainingskapazität einen aussagekräftigeren Prädiktor in Bezug auf die Sterblichkeit dar als andere Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (Myers et al., 2002). Die  $VO_{2max}$  wird durch den Sauerstofftransport in die Muskeln limitiert und schließt den Weg des Sauerstoffs aus der Atmosphäre über das kardiorespiratorische System (Luftwege, Lungen, Blutfluss ins Herz) bis in die Mitochondrien der Muskulatur, die für die stetige Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) zuständig sind. Ausdauertraining sorgt für eine gesteigerte Effizienz dieses Weges über verschiedene Stellgrößen, wie die vom Herzzeitvolumen und Hämoglobin abhängige Sauerstofftransportkapazität (Jones and Carter, 2000) und die Dichte und Aktivität der Mitochondrien in der Muskulatur (Walsh et al., 2001).

Aufgrund der vielen gesundheitsfördernden Auswirkungen und der Steigerung der Leistungsfähigkeit kann körperliche Aktivität als ein global verfügbares und kostengünstiges medizinisches Behandlungsverfahren angesehen werden, das allerdings noch von zu wenigen Menschen wahrgenommen wird. Vor über 30 Jahren wurde gezeigt, dass das relative Sterberisiko von Männern und Frauen, deren Lebensstil sich durch ein erhöhtes Fitnesslevel auszeichnet, deutlich sinkt (Blair et al., 1989).

Sporteinheiten werden aber nicht mehr nur in der Primär- und Sekundärprävention, sondern auch zunehmend in der Tertiärprävention angewendet. Insbesondere im Zusammenhang mit der Vorbeugung von Krebsrezidiven gewinnen ausgearbeitete Sportkonzepte immer mehr an Bedeutung, nachdem man von dem Irrtum, dass sich Krebskranke schonen müssen, abgekommen ist. Mittlerweile ist bekannt, dass Sport sich positiv auf die Krebsprävention (Orsini et al., 2008), die Tolerierung und Nebenwirkungen von Radiochemotherapie, das Rezidivrisiko, die Überlebenschancen und die Lebensqualität von Krebspatienten auswirkt (Rock et al., 2012). Diese Vorteile gehen auf viele Mechanismen zurück. Zum einen führt Sport über die Steigerung des allgemeinen Gesundheitszustands und der Fitness (Warburton et al., 2006) indirekt eher dazu, dass die Patienten belastbarer sind und somit wahrscheinlicher die Krebstherapie vertragen. Zum anderen beeinflusst Sport auch direkt die Tumorentwicklung, indem er Prokarzinogene, wie IGF-1 (Irwin et al., 2009), verändert oder im Rahmen der Epigenetik zu einer Hypermethylierung und Aktivierung von Tumorsuppressorgenen führt (s. Kap. 1.3.1).

Im Zusammenhang mit Sport als Behandlungsmethode stellen sich Fragen nach der optimalen Dosierung (Belastungsintensität, -dauer und -frequenz) und Art der körperlichen Aktivität. Es ist allgemein bekannt, dass sich die oben genannten Vorteile mit steigender Menge an körperlicher Aktivität wahrscheinlicher einstellen, solange man sich nicht überlastet. Hinzukommt, dass auch die Minimaldosis und die maximale sichere Dosis von körperlicher Aktivität, wie vergleichsweise bei Arzneimitteln, nicht gut verstanden sind (Lee, 2007).

Bislang gibt es nur allgemeine Empfehlungen hierzu: Die WHO empfiehlt Erwachsenen zwischen 18-64 Jahren zu mindestens 150 Minuten moderat-intensiver oder 75 Minuten hoch-intensiver körperlicher Aktivität in der Woche (World Health, 2010).

Zur Ausübung von Sport beim Vorliegen einer chronischen Erkrankung gibt es nur wenige Richtlinien. Dies kann am Beispiel der S3-Leitlinien zu den verschiedenen Tumorarten demonstriert werden. Durch die Aufzählung der vielen positiven Effekte von Sporttraining für Krebspatienten, wie verbesserte kardiovaskuläre Fitness und Muskelstärke, verringerte tumorassoziierte Fatigue, verbesserte Immunfunktion, niedrigeres Tumorstadium und vielen weiteren, wird der Stellenwert von Sport bei kranken Menschen eindrucksvoll untermauert. Dennoch werden zumeist keine detaillierten Angaben zur sportlichen Beübung genannt (Schumann et al., 2020)

Neben den Unklarheiten zur Dosierung körperlicher Aktivität in der Prävention und der Behandlung sind auch die Kenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen der vielen positiven Einflüsse auf die Gesundheit noch ausbaufähig.

Im Laufe der letzten 20 Jahre erhielt das Forschungsfeld der Epigenetik Einzug in die Wissenschaft. In diesem Zeitraum konnte gezeigt werden, dass auch Bewegung als wirksamer Regulator epigenetischer Veränderungen fungiert und dadurch die Genexpression beeinflussen kann. Im Hinblick auf die Generierung spezifischer epigenetischer Effekte, die durch sportliche Interventionen verursacht werden, ist noch offen, nach welchem Zeitraum sich diese einstellen, da sich aus der aktuellen Studienlage (s. Kap. 1.4.2) kein eindeutiger Konsens ziehen lässt.

## 1.2 Epigenetik

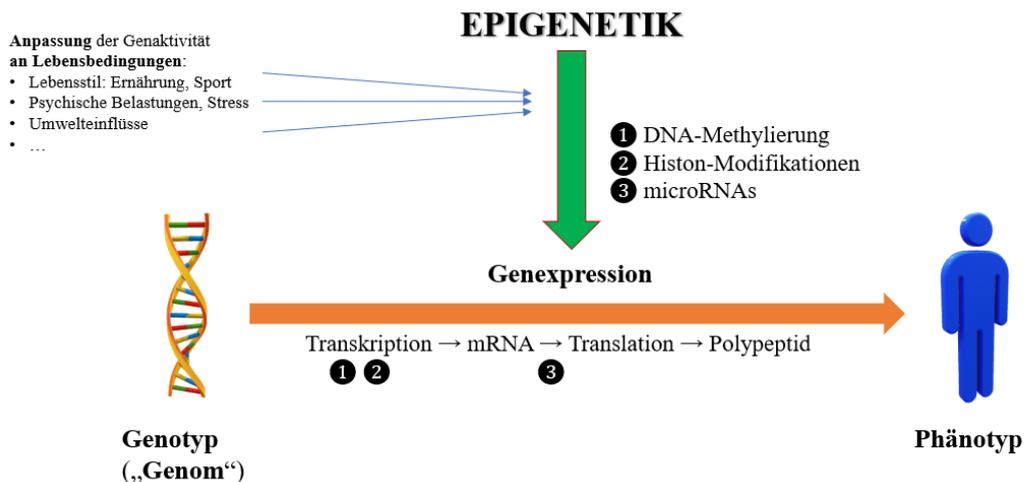
Erstmals wurde der Begriff „Epigenetik“ 1942, lange bevor das Genom entschlüsselt wurde und der Begriff molekularbiologisch geprägt werden konnte, von Conrad Waddington beschrieben. Er definierte ihn als „den Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, die den Phänotyp entstehen lassen“ (Waddington, 2011).

In den darauffolgenden Jahren nahm der Kenntnisstand zur Molekularbiologie und zur Genetik weiter zu und damit auch die Erkenntnis, dass viele Krankheiten eine genetische Ursache haben und somit teilweise über viele Generationen hinweg vererbbar sind. Nachdem das menschliche Genom im Zeitraum von 1990 bis 2004, als die Gesamtheit aller Gene eines Organismus, im Rahmen des „Human Genome Projects“ entschlüsselt werden konnte, gehören das Wissen um den Aufbau der Desoxyribonucleinsäure (DNA) und die Zusammensetzung aus den 4 Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin sowie der Vorgang der Proteinbiosynthese durch die zweiteilige Genexpression, bestehend aus Transkription (Übersetzung der DNA in mRNA) und Translation (Übersetzung der mRNA in eine primäre Aminosäuresequenz), seit Längerem zum biologischen Schulwissen.

Durch die besser werdenden Mittel zur Erforschung der Gene auf molekularer Ebene hat sich der Begriff der Epigenetik in den letzten Jahrzehnten mehrfach gewandelt. Die heute am häufigsten verwendete Definition nach Russo und Riggs beschreibt die Epigenetik als „die Untersuchung mitotisch und/oder meiotisch vererbbarer Veränderungen der Genfunktion, die nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz erklärt werden können“ (Russo et al., 1996).

Das Epigenom umfasst somit Modifikationen, die an bestimmten Stellen des Genoms ansetzen und das Ablesen bzw. die Umsetzung des Genoms stetig an die Umwelt und unsere Lebensbedingungen anpassen. Dies ist entscheidend dafür, wie sich ein Organismus entwickelt und wie er funktioniert. Die zurzeit am besten beschriebenen epigenetischen Prozesse sind die DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und microRNAs, die an verschiedenen Zeitpunkten der Genexpression wirken (s. Abb. 1).

Anders als bei Mutationen der DNA-Sequenz, die zufällig auftreten und nicht reversibel sind, sind diese epigenetische Veränderungen spezifisch und teilweise reversibel, weil sie durch Umwelteinflüsse und unseren Lebensstil beeinflusst werden. Somit besteht auch die Möglichkeit, diese Prozesse durch Medikamente zu beeinflussen.



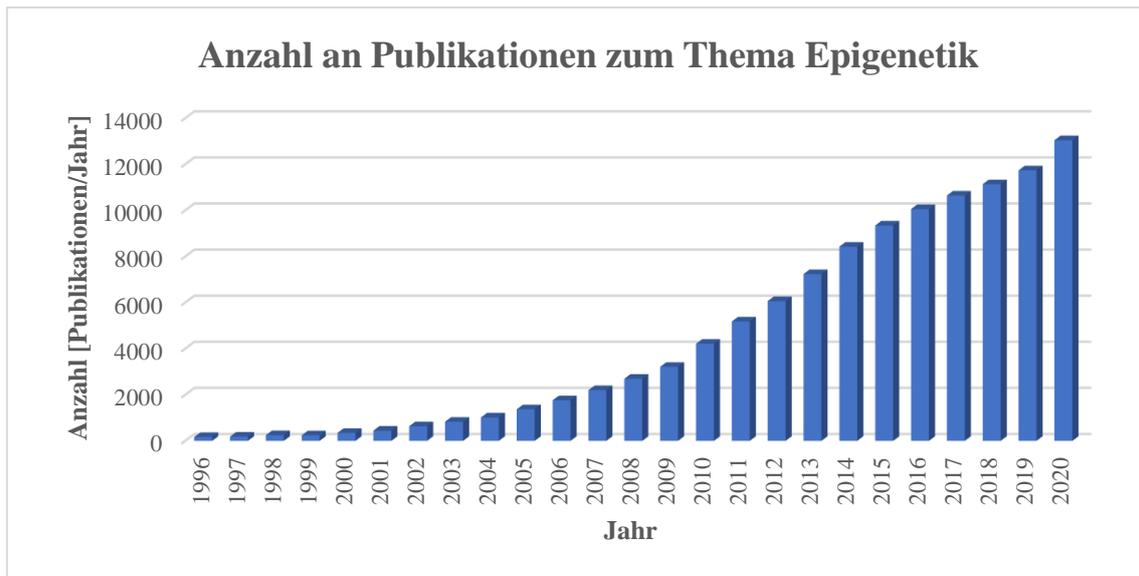
**Abbildung 1: Einfluss der Epigenetik auf die Genotyp → Phänotyp-Interaktion.**

Die Epigenetik untersucht, wie die Aktivität unserer Gene gesteuert wird. Dies beruht nicht auf einer Veränderung der DNA-Sequenz bzw. der Basenabfolge, sondern u.a. auf den 3 dargestellten Mechanismen, die über („epi“) den Genen „sitzen“ und auf diese einwirken: Sie beeinflussen, wie die DNA-Sequenz gelesen und in ihre Produkte (RNA und Proteine) umgesetzt wird.

Die Bedeutung der Epigenetik im Laufe eines Menschenlebens konnte durch die Zwillingsforschung verdeutlicht werden. Fraga et al. zeigten, dass eineiige Zwillinge, die ein völlig identisches Genom haben, bei getrenntem Aufwachsen im Laufe ihres Lebens, verschiedene Erscheinungsbilder annehmen und sich unterschiedlich empfindlich für Erkrankungen zeigen können (Fraga et al., 2005). Epigenetische Veränderungen sorgen beispielsweise dafür, dass aufgrund unterschiedlicher Lebensstile nur ein Zwilling anfälliger für Diabetes wird, obwohl dieselbe genetische Ausgangsinformation vorliegt.

Dies zeigt eindrucksvoll, dass die Ausprägung des Phänotyps nicht nur von der genetischen Information eines Menschen abhängig ist, sondern auch von den epigenetischen Regulationsmechanismen, die darüber hinausgehen und im Stande sind, die Genexpression individuell an die Lebensbedingungen eines Organismus anzupassen.

Die spannenden Ergebnisse aus der Zwillingsforschung, die Kenntnisse über die Beeinflussbarkeit der Epigenetik durch verschiedene Lebensstilfaktoren und darüber die Remodelierung von Erkrankungsrisiken und Ergänzung von Therapiestrategien führten dazu, dass das Themenfeld der Epigenetik für Forscher interessanter wurde. Diese Entwicklung spiegelt sich in dem Anstieg von Veröffentlichungen wider, die über die letzten 25 Jahre unter dem Begriff „epigenetic“ in der wissenschaftlichen Literatur zu finden sind (s. Abb. 2).



**Abbildung 2: Entwicklung der Publikationsanzahl zum Thema Epigenetik**

Während der letzten 25 Jahre ist die Zahl der Publikationen bei PUBMED zum Suchbegriff „epigenetic“ deutlich gestiegen (Eigene Darstellung auf Grundlage folgender Daten → PUBMED Insgesamt: 101,215 Ergebnisse von 1996-2020, Stand: 02.01.2021, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=epigenetic&timeline=expanded>).

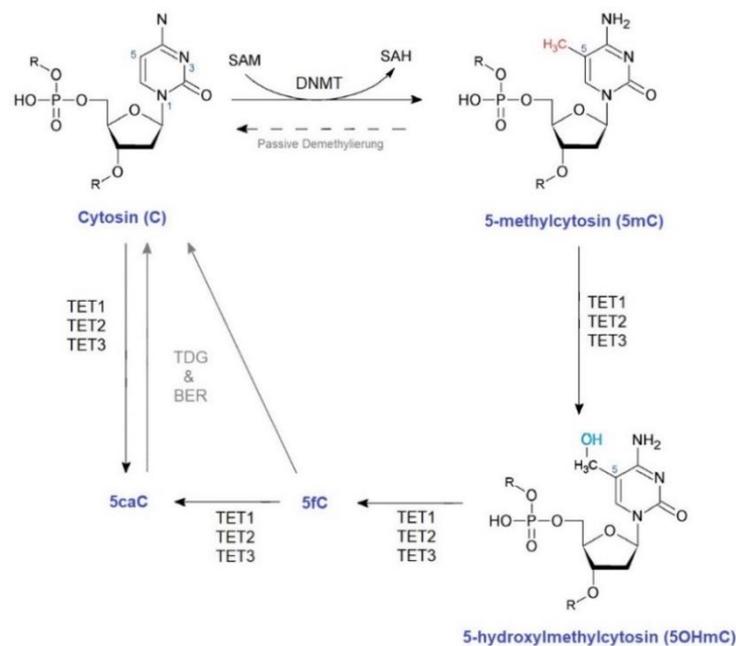
Dieser Entwicklung zufolge gibt es auch einen Anstieg der Studienzahl im Zusammenhang von Epigenetik und körperlicher Aktivität und sportlichen Intervention. Der Anteil dieser Untersuchungen an der Gesamtzahl aller Publikationen zum Themengebiet „Epigenetik“ liegt lediglich bei ungefähr 1% und lässt somit noch einen großen Spielraum für zukünftige Forschungen zu.

### 1.2.1 Epigenetische Regulationsmechanismen

Epigenetische Prozesse lassen die Informationen, die in der DNA und in der RNA in Form der Basenabfolge gespeichert sind, unberührt. Dennoch spielen sie für die Genexpression eine übergeordnete Rolle, da sie u.a. durch eine Veränderung der Chromosomenkonformation das Ausmaß beeinflussen, mit dem bestimmte Gene abgelesen werden (vgl. Abb.1). Als „Maßregler“ für die Aktivierung und Deaktivierung von Genen sind bisher die folgenden drei Mechanismen intensiver erforscht worden: DNA-Methylierung, verschiedene Histonmodifikationen (Acetylierung, Phosphorylierung, etc.) und microRNAs. Diese epigenetischen Änderungen sind dynamische und reversible Prozesse, d. h. sie können im Verlauf des Lebens z.B. durch die Einwirkung von Umweltfaktoren entstehen, sowie durch Therapien und Lebensstiländerungen rückgängig gemacht werden. Obwohl der Fokus dieser Dissertation auf der DNA-Methylierung liegt, werden die anderen Mechanismen dennoch in Kürze erläutert, da die verschiedenen Vorgänge nicht ganz unabhängig voneinander ablaufen.

### 1.2.1.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist der bis dato am besten erforschte Regulationsmechanismus. Hierbei handelt es sich um einen reversiblen epigenetischen Vorgang, der von der Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert wird. Diese Enzyme übertragen eine Methyl-Gruppe (CH<sub>3</sub>) von S-Adenosylmethionin (SAM) an das fünfte Kohlenstoff-Atom eines Cytosins, um 5-mC zu bilden (Bester, 1988).



**Abbildung 3: Ablauf der DNA-Methylierung und -Demethylierung;** Strukturformeln nach (Weseler, 2013), DNMT = DNA-Methyltransferasen, SAM = S-Adenosylmethionin, TET = Ten-eleven translocation - Proteine (Isoformen 1-3), 5fC = 5-Formylcytosin, 5caC = Carboxylcytosin, TDG = Thymin-DNA-Glykosylase, BER = Basenexzisionsreparatur

Cytosin ist die Base, die sehr anfällig für eine Methylierung ist, insbesondere wenn innerhalb der DNA-Sequenz in 5`-3`-Richtung Guanin folgt. Solche CpG-Dinukleotide kommen häufig in Clustern vor, die man als „CpG-Islands“ bezeichnet. Genauer gesagt, handelt es sich hierbei um DNA-Abschnitte mit einer Länge um die 1000 Basenpaare, die im Vergleich zu anderen Teilen des Genoms eine höhere CpG-Dichte vorweisen und oftmals unmethyliert vorliegen (Bird et al., 1985). Im Gegensatz zu den CpG-Inseln, die aufgrund dieser Eigenschaft zum Angriffsziel für eine DNA-Methylierung werden können, liegen über 70-80% der CpG-Dinukleotide des humanen Genoms im methylierten Zustand vor (Ziller et al., 2013). Die Mehrheit der Genpromotoren (ca. 70%), die den Startpunkt für die RNA-Polymerase im Zuge Transkription bilden, liegen innerhalb von CpG-Inseln (Saxonov et al., 2006).

Dieser Zusammenhang begründet die bedeutende Funktion der DNA-Methylierung als epigenetischer Regulationsmechanismus der Genexpression aufgrund der Beeinflussung verschiedener Transkriptionsfaktoren.

Der Effekt der DNA-Methylierung auf die Genexpression hängt von der Lokalisation innerhalb des Genoms ab: Im Zusammenhang mit den Gen-Promotorregionen verhält sich das Ausmaß der Methylierung entgegengesetzt zur Aktivität der Gentranskription. Die DNA-Methylierung der CpG-Inseln führt aufgrund einer sterischen Hinderung und einer Verdichtung des Chromatins dazu, dass die DNA erschwert abgelesen werden kann. Eine Hypermethylierung der CpGs geht demnach mit einer Unterdrückung der Transkription einher, d.h. sie fungiert hier als „Ausschalter“ der Genexpression. Liegen die Promotorregionen, bzw. die CpGs, hypomethyliert vor, wird die DNA zugänglicher für verschiedene DNA-bindende Proteine, wodurch es vermehrt zur Transkription kommen kann. Bei CpG-Dinukleotiden und CpG-Inseln, die sich innerhalb der Genkörper und somit außerhalb der Promotorregionen befinden, verhält sich der Zusammenhang zum Aktivitätsgrad der Transkription entgegengesetzt (Maunakea et al., 2010). Diese Bedeutung und Auswirkung der DNA-Methylierung auf die Genexpression zeigt sich anhand der Ausnahmen von der Regel, dass die mit den CpG-Inseln assoziierten Genpromoren meist unmethyliert sind. Beispiele hierfür sind zum einen die komplett methylierten CpG-Inseln, die mit vielen transkriptionsstummen Genen auf dem inaktiven X-Chromosom von Frauen assoziiert sind, sowie die stillgelegten Allele einiger sog. „imprinted genes“, die durch eine elterliche Prägung („genomic imprinting“) so programmiert werden, dass nur ein Allel eines Gens im Gewebe exprimiert wird (Li et al., 1993).

Es gibt verschiedene Gruppen von Enzymen, die die DNA-Methylierung beeinflussen können: Die DNA-Methyltransferasen (DNMTs) sind für die Übertragung von Methylgruppen verantwortlich. Insgesamt gibt es 5 menschliche DNMTs, von denen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B die größte Bedeutung spielen. DNMT1 muss von den beiden anderen aufgrund der Funktion unterschieden werden. Sie wird als sog. „maintenance methyltransferase“ angesehen, da sie nur halbmethylierte DNA an CpGs methyliert, wozu es u.a. während der DNA-Replikation kommt (Leonhardt et al., 1992). DNMT3A und 3B werden hingegen als „de-novo-Methyltransferasen“ bezeichnet, deren Ziel insbesondere Cytosine von zuvor noch nicht methylierten CpG-Dinukleotiden sind. Diese DNMT-Subtypen bevorzugen weder halbmethylierte noch unmethylierte DNA, was essenziell für ihre Rolle in der De-novo-Methylierung des Genoms während der Entwicklung ist. DNMT3 sind wesentlich für die Methylierung der CpG-Stellen verantwortlich (Okano et al., 1999).

Neben den DNMTs, die durch die DNA-Methylierung direkt Einfluss auf die Genexpression nehmen, gibt es noch eine zweite Gruppe von Proteinen, die die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität zu 5-mC behindern. Unter diesen „readers“ muss man 3 Familien unterscheiden, die die DNA-Methylierung erkennen können: Die „Methyl-CpG binding domain (MBD)“-Proteine (Jones et al., 1998), die „Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains (UHRF)“-Proteine (Hashimoto et al., 2008) und „Zink-Finger“-Proteine (Filion et al., 2006).

Über die MBD-Proteine besteht eine Verbindung zwischen den Regulationsmechanismen der DNA-Methylierung und der Histonmodifikation, da sie die HDACs aktivieren können (s. 1.2.1.2 und 1.2.1.4).

Die Prozesse um die DNA-Demethylierung als Gegenstück zur DNA-Methylierung können entweder passiv oder aktiv ablaufen. 5-mC-Anteile des Genoms können spontan verloren gehen, wenn Cytosine während der Replikation nicht methyliert werden oder wenn 5-mC zu Thymin desaminiert wird. Passive DNA-Demethylierung tritt vorwiegend in sich teilenden Zellen auf. Aus dem Wissen, dass DNMT1 die DNA-Methylierung während der Zellvermehrung aktiv aufrechterhält, kann man schlussfolgern, dass eine Hemmung oder Fehlfunktion des Enzyms dazu führt, dass neu eingebaute Cytosine unmethyliert bleiben und sich der Gesamtanteil der DNA-Methylierung mit jeder Zellteilung verringert würde. Die aktive DNA-Demethylierung kann sowohl in sich-teilenden als auch nicht-teilenden Zellen ablaufen und benötigt enzymatische Reaktionen, um 5-mC wieder in Cytosin umzuwandeln. Dies geschieht in mehreren Schritten, in denen die Methylgruppe eines Cytosins zuerst modifiziert und entfernt wird und durch eine DNA-Reparatur ersetzt wird. Die sog. „Ten-eleven translocation (TET)“-Proteine initiieren diese spezifische Demethylierung von 5-mC-Anhängseln. Die Familie der TET-Proteine beinhaltet die drei Subtypen TET 1-3, die alle eine ähnliche Aktivität haben und ähnliche Reaktionen katalysieren (Ito et al., 2010). TET-Enzyme fügen der Methylgruppe von 5-mC eine Hydroxylgruppe hinzu, wodurch 5-Hydroxylcytosin (5hmC) entsteht. Weiterhin können die Reaktionen der TETs zu weiteren Produkten, wie 5-Carboxylcytosin (5caC) und 5-Formylcytosin (5fC) führen (Ito et al., 2011) (s. Abb. 3). Diese Modifikationen werden von der „Thymin-DNA-Glykosylase (TDG)“ erkannt und entfernt, die anschließend Cytosin durch eine Basenexzisionsreparatur („linked deamination-base excision repair“) in die DNA einfügt (Cortellino et al., 2011). Die Expression der DNMTs und TETs variiert von Gewebe zu Gewebe. Beispielsweise sind die TET-Proteine im Gehirn im Allgemeinen stark exprimiert (Ito et al., 2010).

### 1.2.1.2 Histonmodifikationen

Histone sind alkalische Proteine, die aus vielen Aminosäuren mit basischen Seitenketten wie Lysin und Arginin bestehen. Sie spielen für die Verwahrung der DNA im Zellkern eine grundlegende Rolle. Die DNA wird aufgrund ihrer Länge von mehreren Metern in Form der Nukleosome verpackt. Sie bestehen, als fundamentale Einheit des Chromatins, jeweils aus einem 145-147 bp-langen Anteil DNA, der um ein Oktamer aus je 2 Kopien der Core-Histone H2A, H2B, H3, und H4 gewickelt ist. Das als „Linker-Protein“ bezeichnet H1-Histon befindet sich zwischen den Nukleosomen, nahe des Ein- und Austrittsortes der DNA innerhalb eines Nukleosoms, und dient dazu die DNA noch weiter zu komprimieren (Luger et al., 1997).

Epigenetische Modifikationen an Histonproteinen verändern dynamisch die Chromatinstruktur und sorgen dafür, dass die DNA trotz ihrer starken Kompaktheit für wichtige Prozesse, wie die Transkription, an bestimmten Zeitpunkten zugänglich ist. Je dichter das Chromatin gepackt ist, umso schlechter kann es in der Transkription abgelesen werden. Diese Modifikationen hängen vom Ort und der Art der epigenetischen Modifikation (Acetylierung, Phosphorylierung, etc.) oder dem Grad der Histonmethylierung ab. Die Wirkung einer Histonmodifikation auf den Chromatinzustand und die Auswirkung auf die Transkription wird am Beispiel der Histonacetylierung kurz demonstriert:

Histonproteine erhalten Acetylgruppen von den Histon-Acetyltransferasen (HATs) und diese Acetylgruppen können durch Histon-Deacetylasen (HDACs) entfernt werden. Eine Acetylierung führt dazu, dass die Histone ihre positive Ladung verlieren. Dadurch verringert sich die Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA, was zu einer entspannteren Chromatinstruktur führt und somit eine Transkription begünstigt, da die DNA zugänglicher wird. Eine Aktivitätserhöhung der HDACs hat den gegensätzlichen Effekt und führt somit zu einer Unterdrückung der Transkription (Wade, 2001).

### 1.2.1.3 Micro-RNA

Epigenetische Regulation wird auch durch nicht-codierende RNA, wie durch die microRNAs (miRNAs), vermittelt. Diese nehmen bei der posttranskriptionellen Stilllegung der Genaktivität eine Rolle ein. MicroRNAs bestehen aus ungefähr 21 Nukleotiden und regulieren die Genexpression, indem sie an die 30-UTR oder die 50-UTR („untranslated region“) der mRNA binden (Lytle et al., 2007). Durch die Bindung an die 30-UTR nimmt die Stabilität der mRNA ab. Dies kann dazu führen, dass die mRNA abgebaut wird oder die Translation der mRNA nicht durchgeführt wird. MiRNAs sind somit hauptsächlich für eine Hemmung der Genexpression verantwortlich. Jedoch weiß man inzwischen, dass die Translation einiger Zielgene im Gegensatz zum erklärten Mechanismus auch erhöht werden kann (Vasudevan et al., 2007).

#### 1.2.1.4 Das Zusammenspiel der einzelnen Regulationsmechanismen

Die angesprochenen epigenetischen Regulationsmechanismen laufen nicht getrennt voneinander ab, sondern wirken bei der Beeinflussung der Genexpression durch ihre Auswirkungen auf den Chromatinzustand (vgl. 1.2.1.2) meist zusammen und beeinflussen sich untereinander.

DNMTs können über die methyl-bindenden Proteine (MBD) Histondeacetylasen rekrutieren, was im Zusammenspiel über eine Kompaktierung des Chromatins zu einer Herunterregulierung der Transkription führt (Jones et al., 1998).

Ein weiteres Beispiel für das Zusammenspiel der DNA-Methylierung und der Histonmodifikation ist, dass DNMTs durch Histonmethyltransferasen rekrutiert werden können und an bestimmten Genomregionen zur Repression der Transkription führen (Fuks et al., 2003). miRNA ist auf verschiedenen Wegen ebenfalls am Zusammenspiel der einzelnen Regulationsmechanismen beteiligt. Ein Beispiel hierfür ist miRNA-143. Es führt zu einer Verminderung von DNMT3A, mRNA und den Proteinleveln in Zelllinien bei Kolonkarzinomen (Ng et al., 2009).

### 1.3 Der Stellenwert von Epigenetik für die Entstehung von Krankheiten

In den letzten 20 Jahren zeichnete sich die Erkenntnis ab, dass die Epigenetik für die moderne Medizin von hoher Bedeutung ist, da die epigenetischen Regulationsmechanismen auf verschiedene Arten an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind. Zu diesen Krankheiten gehören diverse Karzinome (z.B. Kolonkarzinom und Mammakarzinom), kardiovaskuläre Erkrankungen, metabolische Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes, neurologische Erkrankungen und viele weitere mehr.

Die Rolle der epigenetischen Mechanismen und deren Nutzung als Verlaufparameter ist am besten im Zusammenhang mit Neoplasien erforscht und wird nun am Beispiel der DNA-Methylierung sowohl auf genomweiter als auch auf genspezifischer Ebene verdeutlicht. Das darauffolgende Kapitel zur Beziehung von körperlicher Aktivität und Epigenetik zeigt anschließend zusätzlich, dass die Epigenetik verschiedene Krankheitskomplexe beeinflussen kann.

### 1.3.1 Beeinflussung der Karzinogenese durch epigenetische Regulation

Von allen epigenetischen Mechanismen beeinflusst die DNA-Methylierung die genomische Stabilität und die Balance von Tumorsuppressorgenen zu Onkogenen am eindrucksvollsten und spielt dadurch bei der Entstehung verschiedener Krebsarten eine bedeutende Rolle. Allgemein gilt, dass ein Abfall der globalen DNA-Methylierung (= Hypomethylierung) insbesondere an CpG-armen Regionen, in Kombination mit ortsspezifischer Hypermethylierung an CpG-Inseln von Promotorregionen, mit einer erhöhten Anfälligkeit für Tumorerkrankungen einhergeht.

Die globale Hypomethylierung konnte in vielen malignen Tumoren nachgewiesen werden. Diese Auffälligkeit wurde in den 1980er-Jahren im Zusammenhang mit Adenokarzinomen des Dickdarms und Lungenkarzinomen beschrieben (Feinberg et al., 1988). In den folgenden Jahren konnte nachgewiesen, dass eine genomweite Abnahme der DNA-Methylierung auf verschiedene Weisen zur Entstehung von Krebs beitragen kann: Zum einen führt die Hypomethylierung von Wiederholungssequenzen (repeat sequences), wie z.B. LINEs (long interspersed nuclear elements), die ungefähr die Hälfte des humanen Genoms ausmachen und normalerweise methyliert vorliegen, zu deren Aktivierung und über chromosomale Umlagerungsprozesse zu chromosomaler/genomischer Instabilität (Eden et al., 2003).

Neben der Zunahme der genomischen Instabilität geht die DNA-Hypomethylierung auch mit der Aktivierung von Onkogenen einher. CpG-Inseln liegen zwar zumeist demethyliert vor (vgl. 1.2.1) und bilden somit ein Ziel für DNMTs, die zu deren Methylierung führen. Allerdings liegen auch einige CpG-Inseln im somatischen Gewebe in methylierter Form vor (Strichman-Almashanu et al., 2002). Werden diese CpG hypomethyliert, können Onkogene, wie HRAS, aktiviert werden (Feinberg and Vogelstein, 1983).

Im Gegensatz hierzu kann die Methylierung der unmethylierten, promotorassoziierten CpG-Inseln zur Stilllegung von Genen führen. Durch diesen Mechanismus kann die Expression von Tumorsuppressorgenen unterdrückt werden, die für die Überwachung von Zellwachstum und Zellvermehrung zuständig sind. Dies konnte zunächst am Rb-Promotor, einem mit dem Retinoblastom assoziierten Tumorsuppressorgen, nachgewiesen werden (Greger et al., 1989). In den folgenden Jahren konnte die Stilllegung weiterer Tumorsuppressorgene, wie z.B. BRCA1 im Mammakarzinom (Esteller et al., 2000) und p16 beim Lungenkarzinom (Herman et al., 1995), im Zusammenhang mit der Hypermethylierung von CpG-Inseln nachgewiesen werden. Anhand dieser Erläuterung lässt sich abzeichnen, wie vielfältig und weitreichend epigenetische Regulationsmechanismen an der Krankheitsentstehung beteiligt sind.

## 1.4 Auswirkungen verschiedener Umweltbedingungen auf das humane Epigenom

Die Epigenetik umfasst dynamische und reversible Prozesse, die durch eine Vielzahl von Umweltbedingungen und Lifestyle-Faktoren (Ernährung, körperliche Aktivität, Tabak- und Alkoholkonsum sowie u.a. psychischer Stress) beeinflusst werden (Alegría-Torres et al., 2011). Sie kann darüber Aufschluss geben, inwiefern diese Faktoren über die unterschiedlichen Regulationsmechanismen mit der Entstehung von Krankheiten verbunden sind. Im Folgenden wird illustriert, wie sich die globale und genassoziierte DNA-Methylierung im Zuge des Alterungsprozess und im Rahmen von körperlicher Aktivität und gezielten sportlichen Interventionen verändert. Die Epigenetik liefert eine Begründung, warum sich Sport im Zuge eines „gesunden“ Lebensstils positiv auf die Entstehung vieler Krankheiten auswirken. Das Wissen hierüber könnte in Zukunft in Präventionsprogramme und Nachbehandlungen einfließen. Die Pharmaindustrie hat die Studienlage zur Epigenetik bereits genutzt und Medikamente, wie Azathioprin, auf den Markt gebracht, die die genannten Regulationsmechanismen beeinflussen.

### 1.4.1 DNA-Methylierung im Alter

Bevor man sich im Zuge einer Untersuchung mit der Beeinflussung der DNA-Methylierung am Menschen beschäftigt, sollte man wissen, wie sich dieser epigenetische Prozess im Zuge des nicht-beeinflussbaren Alters verändert.

Die Mehrheit des menschlichen Genoms liegt im methylierten Zustand vor (Li et al., 2010). Mit fortschreitendem Alter kommt es zum Abfall der DNA-Methylierung in Leukozyten (Fraga et al., 2005). Bollati et. al. stellten diesen Zusammenhang über einen Zeitraum von 8 Jahren, durch die Untersuchung von Blutproben erwachsener Personen im Alter zwischen 55 und 92, dar (Bollati et al., 2009). Heyn et. al. konnten diese Erkenntnis anhand ihrer Studie, die den Methylierungsstatus der DNA eines Neugeborenen mit der eines 103-Jährigen verglich, stützen (Heyn et al., 2012). Diese Erkenntnis ist insofern interessant, da seit Jahrzehnten bewiesen ist, dass der Mensch mit dem Alter anfälliger für verschiedene Erkrankungen wird. Tumorerkrankungen werden ebenfalls mit einer Hypomethylierung der DNA assoziiert (vgl. 1.3.1) und somit lässt sich anhand dieses konkreten Beispiels zeigen, wie die Epigenetik die seit Jahren bekannte Beziehungen von speziellen Einflussfaktoren zu einer bestimmten Erkrankung kausal begründen kann.

Einige Studien konnten zeigen, dass der altersassoziierte Methylierungsabfall von außerhalb beeinflusst werden kann. Körperliche Aktivität kann den Alterungsprozess verzögern, indem die Verlustrate der DNA-Methylierung reduziert wird (Nakajima et al., 2010) (vgl. auch 1.4.2).

#### 1.4.2 Studienlage zur Auswirkung körperlicher Aktivität auf epigenetische Regulationsmechanismen am Beispiel der DNA-Methylierung

Bevor die aktuelle Studienlage dargelegt wird, sollen die vielfach verwendeten Begrifflichkeiten „physical activity“ und „physical exercise“ erläutert werden, da viele Autoren diese Begriffe nicht voneinander abgrenzen. Körperliche Aktivität („physical activity“) ist jede Form von Bewegung, deren Energiebedarf über das Ruhelevel hinausgeht (Caspersen et al., 1985). Körperliche Beübung („physical exercise“), z.B. in Form von sportlichen Interventionen für Studien oder in Form von körperlichem Training, stellt hierbei eine Unterform dar und sollte nicht mit allgemeiner körperlicher Aktivität gleichgesetzt werden. Eine sportliche Intervention wird auf Grundlage von vorab definierten Kriterien, wie Belastungsart, -intensität, und -dauer, durchgeführt (Caspersen et al., 1985). Während regelmäßige körperliche Aktivität zur Primär- und Sekundärprävention von chronischen Erkrankungen dient, können ausgearbeitete Sporteinheiten auf ein bestimmtes Ziel ausgerichtet werden (s. Kap. 1.1). Zu diesen Zielen kann neben der Verbesserung der aeroben Fitness (s. Kap 1.1) auch die Umstrukturierung der Epigenetik gehören.

In den letzten 15 Jahren wuchs die Studienlage zum Zusammenhang von epigenetischen Prozessen und körperlicher Aktivität (u.a. Barres et al., 2012; Nakajima et al., 2010, Zeng et al. 2012). Durch das damit einhergehende Kenntniswachstum über die molekularen Abläufe könnte dieser gesundheitsfördernde Zusammenhang zukünftig besser für die Medizin genutzt werden. Die allgemeinen Richtlinien zu körperlicher Aktivität könnten angepasst werden und basierend auf den Forschungsergebnissen zu den verschiedenen verwendeten Gewebetypen, könnten speziell auf Patientenkollektive zugeschnittene Sportprogramme für diverse Krankheitsbilder entwickelt werden, die die medikamentöse Therapie unterstützen würden.

Insbesondere Studien, die längere Zeiträume abbilden, geben Aufschluss darüber, wie die epigenetischen Regulationsmechanismen, die bei den bedeutendsten Krankheiten modifiziert sein können, durch körperliche Aktivität positiv beeinflusst werden. Obwohl einige dieser Studien nützliche Informationen über die Dauer und Frequenz der körperlichen Aktivität im Zusammenhang mit der Prävention chronischer Erkrankungen liefern konnten, steht die Forschung zu diesem Untergebiet der Epigenetik noch am Anfang und bedarf weiterer Untersuchungen. Dieses Kapitel befasst sich mit den wichtigsten Studien am Menschen, die den Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und körperlicher Aktivität untersuchten. Diese werden im Hinblick auf den Untersuchungszeitraum in „Akut-Studien“, die sich mit alleinstehenden Sportinterventionen, und darüberhinausgehende „Langzeitstudien“ unterteilt.

#### 1.4.2.1 Langzeitstudien

Insbesondere körperliche Aktivität über einen längeren Zeitraum scheint das Epigenom so zu beeinflussen, dass das Erkrankungsrisiko und die Mortalitätsrate verschiedener Erkrankungen reduziert werden kann. Die Langzeitstudien zu diesem Zusammenhang müssen in Anlehnung an den oben dargelegten Unterschied zwischen „physical activity“ und „exercise“ in zwei Kategorien unterteilt werden.

Zum einen gibt es Studien, die sich mit einem erhöhten Ausmaß bzw. regelmäßiger körperlicher Aktivität über einen längeren Zeitraum beschäftigen. Die Studienteilnehmer wurden über diesen Zeitraum aufgrund des hohen Zeit- und Kostenaufwands lediglich beobachtet und das Ausmaß an körperlicher Aktivität wurde zumeist anhand von Fragebögen evaluiert.

Aufgrund der geringen Überprüfung der Studienteilnehmer und der fehlenden Randomisierung können äußere Faktoren, im Rahmen der unterschiedlichen Lebensstile (Ernährung, Nikotinkonsum, ...) nicht angeglichen werden und damit konnten sich die Teilnehmer in ihrer Lebensweise stark voneinander unterscheiden. Zudem sind die Teilnehmerangaben zur Dauer und Intensität der körperlichen Bewegung stets als subjektiv zu werten. Bei retrospektiven Angaben, z.B. zum sportlichen Aktivitätslevel in der Kindheit (vgl. White et al. 2013), können falsche Erinnerungen zu Verzerrungen (Bias) der Studienergebnisse führen. Es ist folglich nicht verwunderlich, dass solche Studien auf Grundlage von Teilnehmerangaben oftmals weder signifikante Ergebnisse nach sich ziehen noch einen eindeutigen Zusammenhang zwischen körperlicher Aktivität und der DNA-Methylierung zeigen. Dadurch ist es schwierig, aus den bisher durchgeführten Studien einen Konsens abzuleiten, der für zukünftige Studien und präventive Zwecke verwendet werden könnte. Diese beobachtenden Studien lassen sich also nur eingeschränkt auswerten.

Zum anderen gibt es Untersuchungen im Rahmen von geplanten sportlichen Interventionen, bei denen die Teilnehmer alle ein Studienprotokoll durchliefen, das Belastungstyp, -dauer, -frequenz, -intensität und weitere Rahmenbedingungen genau definierte, und zudem beaufsichtigt wurden. Aufgrund der Überwachung ist es nicht verwunderlich, dass Studien im Zuge eines Trainingsprogramms, eine höhere Wahrscheinlichkeit für signifikante und zusammenhängende Ergebnisse liefern, da die Möglichkeiten für Bias geringer ausfallen. Diese Interventionsstudien eignen sich somit besser um klare Aussagen, über ein bestimmtes Ausmaß an körperlicher Bewegung oder zumindest über die klar abgrenzbare Intervention zu liefern.

Zhang et al. (2011) waren die Ersten, die sich mit der Beziehung von körperlicher Aktivität zum Krebsrisiko befassten. Sie erfassten mittels Akzelerometer unterschiedliche Aktivitätslevel von 131 gesunden Menschen im Alter zwischen 45 und 75 Jahren über einem Zeitraum von 4 Tagen und untersuchten deren Blut auf die globale DNA-Methylierung von LINE-1-Retrotransposons. Die Teilnehmer, die zwischen 26-30 Minuten/Tag körperlich aktiv waren, wiesen höhere Methylierungsgrade auf als die Teilnehmer mit weniger körperlicher Aktivität (Zhang et al., 2011). Allerdings zeigten sich wiederum auch niedrigere Methylierungslevel bei den Personen, die mehr als 30 Minuten am Tag körperlich aktiv waren. Nach der Anpassung mehrerer Variablen, wie Alter, Geschlecht, Raucherstatus und BMI musste die positive Beziehung zwischen körperlicher Aktivität und globaler DNA-Methylierung in dieser Studie als nicht-signifikant gewertet werden. Da eine globale Hypomethylierung der DNA als ein Kennzeichen von Tumorerkrankungen gilt, liefert diese Studie erste Hinweise darüber, inwiefern körperliche Aktivität, als ein leicht im Alltag zu beeinflussender Lebensstilfaktor, über eine globale DNA-Hypermethylierung das Risiko für die Entstehung von Krebs senkt.

White et al. (2013) unterstützen diese Hypothese bezüglich des Zusammenhangs von körperlicher Aktivität und einem vermindertem Krebsrisiko durch eine ähnliche Untersuchung. Sie setzten die globale DNA-Methylierung in LINE-1-Sequenzen aus dem Blut von 647 gesunden Frauen, die zwischen 35 und 74 Jahren alt waren und zudem eine familiäre Vorgeschichte in Bezug auf Brustkrebs aufwiesen, in Beziehung zu der körperlichen Aktivität an verschiedenen Lebenszeitpunkten [Kindheit (5-12 Jahre), Teenager (13-19 Jahre) und vergangene 12 Monate]. Auch in dieser Studie wurde die körperliche Aktivität anhand von Fragebögen evaluiert. Die Frauen, die für alle drei Zeitpunkten überdurchschnittliche Aktivitätslevel angaben, wiesen erhöhte DNA-Methylierungslevel auf (White et al., 2013).

Die Studie von Morabia und Zhang et al. (2012) an 165 tumor-freien Teilnehmern im Alter zwischen 18 und 78 Jahren konnten anhand von Fragebögen zu verschiedenen freizeitbezogenen Aktivitäten keine Korrelation zwischen körperlicher Aktivität und LINE-1- sowie IL-6-Methylierung herstellen (Zhang et al., 2012)

Die Resultate von Luttrupp et al. (2013) an 509 älteren Schweden (70 Jahre) stehen hingegen in Kontrast zu den bisher getroffenen Aussagen. Verglichen mit einer körperlich aktiveren Gruppe, zeigte sich eine signifikant negative Beziehung zu der globalen DNA-Methylierung. Eine verminderte DNA-Methylierung war bei den Testkandidaten also mit weniger

körperlicher Aktivität assoziiert (Luttrupp et al., 2013). Die globale Methylierung wurde hier im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Studien, die ein Modell aus Bisulfitbehandlung und Pyrosequenzierung wählten, mittels LUMA (luminometric methylation assay) gemessen.

Diese auf Grundlage von Fragebögen veröffentlichten Ergebnisse ermöglichen also keine eindeutigen Aussagen über die Art der DNA-Methylierung in gesunden Personen. Es kann lediglich gesagt werden, dass regelmäßige körperliche Aktivität einen Einfluss auf die globale DNA-Methylierung hat.

Aufgrund dieser Erkenntnisse und den beschriebenen Fehlerquellen sollte zukünftig von Studien, in denen die Probanden ihre körperliche Aktivität selbst aufzeichnen, abgesehen werden. Studien, die die körperliche Aktivität im Rahmen von sportlichen Interventionen genauer abbilden, in denen die Teilnehmer instruiert und teilweise überwacht werden, konnten in Relation zu verschiedenen Erkrankungsbildern signifikantere und stärkere Resultate erzeugen. Bezogen auf den globalen Methylierungsstatus und verschiedene Gene, die in Verbindung mit einzelnen Tumorentitäten oder Entzündungsgeschehen stehen, gibt es mittlerweile einige Publikationen, die durch definierte sportliche Interventionen die Hypothese unterstützen, dass körperliche Aktivität in Form von Sportprogrammen, die mit der Tumorgenese verbundenen Kennzeichen und Entzündungskennzeichen bezüglich der DNA-Methylierung positiv beeinflussen kann. Weiterhin gibt es auch viele Studien, die sich mit dem Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und einer langfristigen Sportintervention bei metabolischen Erkrankungen, und kardiovaskulären Erkrankungen beschäftigen.

Zeng et al. veröffentlichten 2012 eine der bislang bedeutendsten Studien zum Zusammenhang zwischen Sport und der Prognose bei Tumorerkrankungen am Beispiel des Mammakarzinoms. Die randomisiert kontrollierte Studie (RCT) wurde im Folgenden an 12 körperlich inaktiven, postmenopausalen Frauen mit Mammakarzinom (Stadium 0-IIIa) durchgeführt. Die Frauen durchliefen pro Woche 150 Minuten einer moderat-intensiven Intervention auf dem Laufband. Nach 6 Monaten wurden im peripheren Blut der Teilnehmer die Veränderungen der DNA-Methylierung und Genexpression detektiert. Die Resultate wurden zunächst in Relation zu vorangegangenen Untersuchungen an Tumorproben von 348 Brustkrebspatientinnen gesetzt. Es fanden sich 43 Gene, deren Methylierung durch die sportliche Belastung reduziert wurde und die aufgrund der dadurch gesteigerten Expression mit einem besseren Überleben in Verbindung stehen. Besonders hervorzuheben ist L3MBTL1, ein Tumorsuppressorgen, dessen Expression mit low-grade Tumoren und einem geringeren Todesrisiko verbunden wird. In der

Übungsgruppe nahm die Methylierung dieses Gens um 1,48% ab, während die L3MBTL1-Methylierung in der Kontrollgruppe, deren Teilnehmer ihren regelmäßigen Aktivitäten weiter nachgingen, um 2,15% zunahm (Zeng et al., 2012). Am Beispiel dieses Gens schlussfolgerten Sie, dass sportliche Interventionen über eine im Blut nachweisbare Demethylierung die Expression von L3MBTL1 steigern kann und dadurch die Überlebensrate verbessert werden kann. Sie zeigten somit, dass das DNA-Methylierungslevel im Blut als klinisch-relevanter Biomarker fungieren kann und sich mit epigenetischen Veränderungen in anderen Gewebeproben in einen Zusammenhang setzen lässt.

Ähnliche Ergebnisse konnten an Speichelproben festgestellt werden. Bryan et. al. (2013) entnahmen das Probenmaterial aus 64 gesunden, körperlich inaktiven Probanden, die zufällig in eine Interventionsgruppe (mehrmals die Woche 30-50 Minuten Sport auf dem Laufband bei einer Belastung von 50-85% der maximalen Herzfrequenz für 36 Monate) und eine inaktivere Kontrollgruppe aufgeteilt wurden. Die Proben der körperlich aktiveren Probanden zeigten abschließend signifikant geringere Methylierungsgrade an 45 CpG-Inseln an verschiedenen mit dem Mammakarzinom-assoziierten Genen (Bryan et al., 2013).

Während Tumorerkrankungen (s. Kap. 1.3.1) mit einer globalen DNA-Hypomethylierung und genbezogener Hypermethylierung, vor allem an Tumorsuppressorgenen, einhergehen, zeigt die Mehrheit der Studien im Zusammenhang mit körperlicher Aktivität, dass diese den tumorspezifischen epigenetischen Veränderungen entgegenwirken kann. Körperliche Aktivität, insbesondere in Form von überwachten Sportinterventionen, führt demnach zu einer globalen Hypermethylierung der DNA und kann die Regulation der für die Karzinogenese-wichtigen Tumorsuppressor, am Beispiel von L3MBTL1, durch eine Demethylierung beeinflussen.

Allerdings gibt es viele Studien, die keine signifikanten Zusammenhänge feststellen konnten, sowie einige wenige Studien, die eine inverse Beziehung zwischen körperlicher Aktivität und der DNA-Methylierung feststellten. Zu diesen Studien gehört neben der Arbeit von Luttropp auch eine Arbeit von Dimauro et. al. (2016) Sie stellten zwar die positiven Einflüsse von körperlicher Aktivität auf die alterungsspezifischen Veränderungen dar, allerdings führte die von Ihnen durchgeführte 12-wöchige Intervention zu der Schlussfolgerung, dass moderates Training die globale DNA-Methylierung im peripheren Blut von älteren Menschen reduzieren kann (Dimauro et al., 2016).

Die Studien, die sich im Zusammenhang zwischen Sport und Epigenetik mit dem Entzündungsgeschehen beschäftigten, unterstützen den Verdacht, dass körperliche Aktivität die verantwortlichen Marker gegensätzlich beeinflusst.

Nakajima et al. zeigten an 383 gesunden Erwachsenen unterschiedlichen Alters, dass ein 6-monatiges überwachtes Walkingprogramm der altersabhängigen DNA-Demethylierung des ASC-Gens entgegenwirkt. Über die signifikant erhöhte Methylierung dieses Gens führte die Sportintervention nachweislich aufgrund der damit verbundenen niedrigeren Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und IL-18 zu einer Abnahme der Entzündungsprozesse im Blut der Probanden (Nakajima et al., 2010) und liefert so eine mögliche Begründung für die bekannte antientzündliche Wirkung von körperlichem Training, das somit präventiv zur Vorbeugung chronischer Erkrankungen genutzt werden kann.

Eine 2018 veröffentlichte Studie, die an herzinsuffizienten Patienten durchgeführt wurde, lieferte mit einem etwas anderen Testverfahren ähnliche Ergebnisse. Die sportlich aktivere Gruppe wies nach 3 Monaten eine steigende ASC-Methylierung auf und zudem konnten niedrigere IL-1 $\beta$ -Spiegel im Plasma der Patienten nachgewiesen werden (Butts et al., 2018). Eine geringere ASC-Methylierung und eine damit verbundene IL-1 $\beta$ -Biosynthese ist mit einem schlechten Outcome von Herzinsuffizienzpatienten assoziiert und somit zeigen Butts et al. eindrucksvoll, inwiefern epigenetische Modifikationen an kardialen Erkrankungen beteiligt sind und das Sport diese Modifikationen kompensieren kann.

Es reicht bereits aus 60 Minuten bewegungsarme/sitzende Zeit am Tag durch niedrig-intensive Bewegung zu ersetzen, um die ASC-Methylierung durchschnittlich um den Faktor 1,17 zu erhöhen und dadurch einen im Blut messbaren potenziellen Biomarker für systemische Entzündungen positiv zu beeinflussen (Nishida et al., 2019).

Zhang et al. konnten in Anlehnung an die Intervention von Nakajima zudem an einem weiteren Entzündungsregulator veränderte Methylierungsmuster darlegen. Nach einem 6-monatigen Intervallwalking-Programm konnten sie mittels Pyrosequenzierung einen Anstieg der Promotormethylierung des NF $\kappa$ B2-Gens nachweisen (Zhang et al., 2015).

Dadurch, dass chronische Entzündungsprozesse als Risikofaktor für viele verschiedenen Krankheiten, einschließlich Tumorerkrankungen und kardiovaskuläre Krankheitsbilder, gelten, zeigen diese Studien, dass körperliche Aktivität wesentlich zur Prävention und Behandlung beitragen kann, indem sie die ursächlichen Prozesse unter anderem durch epigenetische Regulation reduziert.

Denham et al. ergänzen die Ergebnisse von Butts und Nakajima zu den Vorteilen von körperlicher Aktivität für das kardiovaskuläre System. Sie untersuchten die epigenetischen Auswirkungen eines vierwöchigen intervall-basierten Sprinttraining auf 12 gesunde junge

Männer im Alter von 18 bis 24 Jahren. Das Training verbesserte die kardiale Fitness der Teilnehmer und senkte die Konzentration des LDL-Cholesterins (low-density lipoprotein) in Verbindung mit genomweiten Veränderungen der DNA-Methylierung. Viele CpG-Inseln und Promotorregionen wurden demethyliert, wodurch es vermehrt zu Veränderungen der genomweiten Transkription kam (Denham et al., 2014). Diese Veränderungen waren mit einer daran angepassten Expression von Genen und miRNA verbunden, die für die kardiovaskuläre Funktion von Bedeutung sind. Darunter befanden sich neben miRNA-21 und miRNA-210 auch der epidermal growth factor (EGF).

Eine 2019 veröffentlichte Studie ergänzt die Aussagen zur Bedeutung epigenetischer Mechanismen bei der Verbesserung der kardiovaskulären Gesundheit durch körperliches Training. Die Studienergebnisse von Ferrari et al. weisen darauf hin, dass die DNA-Methylierung verschiedener Gene (EDN1 und NOS2) Einfluss auf die Blutdruckregulierung nimmt (Ferrari et al., 2019).

Auch in Assoziation mit metabolischen Erkrankungen, vornehmlich mit Diabetes mellitus, scheint körperliche Aktivität das Epigenom maßgeblich beeinflussen zu können. Für diese Studien fungierten oftmals Muskelbiopsien oder Fettgewebe anstelle von peripherem Blut als Ausgangsmaterial. Nitert und Rönn stellten durch eine genomweite Untersuchung desselben Patientenkollektivs eine signifikante Korrelation zwischen körperlicher Aktivität und der Methylierung von verschiedenen Markern, die mit Diabetes Mellitus Typ 2 und Übergewicht assoziiert werden, her. Diese beiden Publikationen demonstrieren außerdem, dass sich die DNA-Methylierung gewebsspezifisch unterschiedlich ändert. Während das angewendete sechsmonatige und überwachte Ausdauertraining (3 Stunden/Woche) im biopsierten Muskelgewebe (M. vastus lateralis) zu einer Hypomethylierung der meisten Gene führte (Nitert et al., 2012), zeigte sich im Fettgewebe im Gegensatz hierzu eine Hypermethylierung vieler Gene (Rönn et al., 2013). In den folgenden Jahren konnten weitere Studien diese Ergebnisse erhärten. Ein 16-wöchiges Ausdauertraining an 17 Patienten, die unter einem Typ2-Diabetes und Übergewicht litten, führte in Muskelbiopsien des M. vastus lateralis zur Hypomethylierung von Genen, die im Glukosestoffwechsel von Bedeutung sind (Rowlands et al., 2014).

#### 1.4.2.2 Kurzzeitstudien

Die Studienlage, die die Auswirkung von akuten Interventionen auf das humane Epigenom untersucht, ist deutlich kleiner als die zuvor besprochene Studienlage, die sich mit den Folgen mehrtägiger bis mehrmonatiger körperlicher Aktivität auf die epigenetische Regulation beschäftigt. Die meisten Kurzzeitstudien verwenden auch nicht peripheres Blut, sondern Muskelbiopsien als Ausgangsmaterial.

2012 wurden hierzu die ersten bedeutenden Ergebnisse veröffentlicht. In Muskelbiopsien von 14 untersuchten jungen, körperlich inaktiveren Erwachsenen (Männer und Frauen, Alter: 25 +/- 1 Jahr) zeigten sich nach einer akuten Sportintervention (ansteigende Belastung auf Fahrradergometer bis zur Ermüdung) eine verminderte genomweite Methylierung, die von der Intensität des Trainings abhing. Je höher die Belastung war, desto stärker zeigte sich der Abfall der DNA-Methylierung nach der Intervention. Zudem kam es ebenso an verschiedenen Genen (PGC-1 $\alpha$ , PDK4 und PPAR- $\delta$ ), die für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes von Bedeutung sind, bei hoher Intensität zu einer Hypomethylierung. Bei einer geringen Intensität zeigte sich an diesen Genen keine signifikante Veränderung der Methylierung (Barrès et al., 2012). Barres et al. zeigten somit als erstes, dass schon eine akute Sportintervention in Abhängigkeit von der Belastungsintensität im Muskelgewebe zu messbaren epigenetischen Modifikationen führen kann.

Eine Studie an 11 anderen jungen Männern steht in Einklang zu diesen Resultaten. Eine Einheit Radfahren, in diesem Falle bis zu einem Umsatz von 650 Kalorien, führte zu einer Hypomethylierung des PGC-1 $\alpha$ -Promotors im Skelettmuskel. Dadurch veränderten sich die nukleosomalen Strukturen um diese Stellen und dies schien mit einem Anstieg der PGC-1 $\alpha$ -Genexpression sowie einem postinterventionellen Abfall des intramuskulären Fettanteils einherzugehen (Bajpeyi et al., 2017).

Zusätzlich zu diesen Erkenntnissen, die sich auf ein Ausdauertraining beziehen, wurden an 19 jungen Männern nach einem akutem Krafttraining Veränderungen der DNA-Methylierung in Muskelbiopsien aus dem M. vastus lateralis nachgewiesen. Nach dem Programm, das sich aus Beinpresse und Beinstreckung zusammensetzte, kam es bei der Interventionsgruppe im Vergleich mit der inaktiveren Kontrollgruppe zu einer globalen Hypomethylierung (LINE-1) sowie der Hypermethylierung einiger metabolischer Gene (Bagley et al., 2020).

Epigenetische Modifikation scheint im Muskelgewebe somit sehr dynamisch abzulaufen, denn sowohl akute Sportinterventionen als auch eine 9-tägige andauernde körperliche Inaktivität (Alibegovic et al., 2010) beeinflusst die DNA-Methylierung und Genexpression im Muskel.

Während die Auswirkungen im Muskelgewebe unter anderem von der Belastungsintensität abhängen (vgl. Barres et al., 2012), liefert eine Studie an subkutanen Fettgewebssproben Hinweise, dass auch der Trainingsstatus eines Menschen die epigenetische Antwort auf Sport beeinflusst. Im trainiertem Zustand fielen die Änderungen des Methylierungsstatus nach einer akuten Intervention stärker aus (Fabre et al., 2018). Neben muskelspezifischen Genen scheinen somit auch fettgewebsspezifische Gene auf Ebene der Epigenetik und Transkription durch eine akute Sporeinheit beeinflussbar zu sein.

Die bisher einzige Studie, die sich mit der globalen DNA-Methylierung in Leukozyten in Folge einer akuten Sportintervention befasst, konnte weder direkt im Anschluss an die körperliche Belastung noch nach 24 Stunden Veränderungen des Methylierungsstatus nachweisen (Robson-Ansley et al., 2014). Dennoch konnten Sie eine signifikante Verbindung zwischen der IL-6-Konzentration im Plasma und der DNA-Methylierung von 11 Genen aufzeigen. Da lediglich 8 trainierte Männer getestet wurden, sollte man diese Publikation jedoch nicht zu viel Beachtung schenken. Demzufolge weisen auch die Autoren daraufhin, dass weitere Untersuchungen nötig sind, um die reaktiven Änderungen der DNA-Methylierung und der IL-6-Plasmakonzentration aufgrund von sportlicher Betätigung genauer zu erforschen.

Während es bereits grundlegende Mechanismen über die molekularen Abläufe der DNA-Methylierung und -Demethylierung gibt (vgl. Kap. 1.2.1), muss noch geprüft werden, welche Reaktionswege den Methylierungsstatus nach sportlicher Betätigung beeinflussen. Im Falle von isolierten Sporeinheiten, läuft die DNA-Hypomethylierung im Muskelgewebe schnell ab und scheint nur vorübergehend zu bestehen (Barrès et al., 2012). Es scheinen also aktive Demethylierungsvorgänge abzulaufen. Zudem sollte geprüft werden, inwiefern die verschiedenen epigenetischen Regulationsmechanismen in diesem Aspekt zusammenspielen. Die DNA-Methylierung scheint die Genexpression nur teilweise zu beeinflussen (Fabre et al., 2018). Weiterhin scheinen die Veränderungen der DNA-Methylierung von der Intensität der Trainingseinheit abzuhängen. Doch inwiefern der Effekt von der Dauer des Trainings abhängt, wurde noch nicht untersucht. Diese offenen Fragen, sowie die wenigen Arbeiten zu diesem Thema, die meist nur eine geringe Studienpopulation einschließen, führen zu dem Schluss, dass mehr Kurzzeitstudien durchgeführt werden sollten.

### 1.4.2.3 Das Problem der aktuellen Studienlage

Die aktuelle Studienlage zum Zusammenhang von Bewegung und den epigenetischen Modulationen wird von einem großen Problem geprägt, und zwar von der großen Heterogenität: Betrachtet man die einzelnen Publikationen, stellt man fest, dass die Studienprotokolle alle verschieden sind und teilweise sehr stark voneinander abweichen. Dies entsteht dadurch, dass eine Vielzahl an Variablen, bei der Planung solcher Studien berücksichtigt werden muss und somit veränderbar ist. Hierzu zählen vor allem:

- Die sportliche Intervention: Art der Intervention (Ausdauer versus Kraft), Frequenz, Dauer, Intensität, Überwachungsstatus
- Verwendete Gewebeproben: Blut, Muskelgewebe, Tumorgewebe, ...
- Die untersuchten Organsysteme mit verschiedenen Krankheitsbildern: Verschiedene Tumorentitäten, Diabetes mellitus, Entzündungsgeschehen, ...
- Messmethoden, etc.

Aufgrund dieser Heterogenität ist es kaum möglich die Studien untereinander zu vergleichen. Zudem werden die meist wenigen Studienteilnehmer nicht immer in Interventions- und Kontrollgruppe eingeteilt und auch die Überwachung der Patienten variiert.

Zusammenfassend kann man aktuell zwar erkennen, dass die epigenetischen Regulationsmechanismen einen erklärbaren Grund für den positiven Effekt von körperlicher Aktivität auf das Erkrankungsrisiko und den Verlauf vieler Krankheiten liefern. Um jedoch genauere Aussagen treffen zu können, müssen für alle Gewebeproben noch weitere Untersuchungen folgen, die sich möglichst nur in wenigen Variablen unterscheiden, damit man die Ergebnisse besser miteinander vergleichen und kombinieren kann. Bisher gelang dies lediglich in einigen wenigen Zusammenhängen, wie bei der Beeinflussung von Entzündungen durch die Beeinflussung des ASC-Gens im Rahmen von körperlicher Aktivität.

Durch eine Vielzahl an aufeinander abgestimmten Studien, die zudem größere Patientenkollektive einschließen, wäre es in den kommenden Jahren möglich, den epigenetischen Status von verschiedenen Geweben sowie deren Beeinflussungsmöglichkeiten zu entschlüsseln und anhand von evaluierten Sportprogrammen zu beeinflussen.

Durch diese neuen, auf Grundlage von epigenetischen Regulationsmechanismen basierenden, Erkenntnisse könnte man körperliche Aktivität entweder allein, als kostengünstiges Mittel, oder in Kombination mit anderen Therapieverfahren noch effektiver für die Behandlung und Prävention von Krankheiten einsetzen.

## 2 FRAGESTELLUNGEN

Die Epigenetik gewinnt in der modernen Medizin zunehmend an Bedeutung, sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie verschiedener Krankheitsbilder. Die epigenetischen Mechanismen, wie beispielsweise die DNA-Methylierung, werden im Laufe des Lebens durch eine Vielzahl an Lebensstilfaktoren angepasst und sind an der Regulation von Erkrankungsrisiken beteiligt.

Durch die Domäne der Epigenetik hat sich in den letzten Jahren ein neues Forschungsfeld aufgetan, mit dem diese Faktoren messbar gemacht werden können. Somit sollte sie auch für die Prävention und Nachbehandlung nutzbar gemacht werden.

Sport ist ein modulierender Lebensstilfaktor, dessen positive Auswirkung auf den menschlichen Körper seit Jahrzehnten bekannt ist und durch eine Vielzahl an Studien nachgewiesen werden konnte (vgl. Kap. 1). Die Anzahl der Publikationen, die dies jedoch im Zusammenhang mit der Epigenetik illustriert haben, ist vergleichsweise niedrig. Beim Vergleich der Studien, die sich mit epigenetischen Modulationen als Folge sportlicher Interventionen beschäftigen, kann eine große Heterogenität zwischen den Arbeiten beobachtet werden, weil sich die Untersuchungsverfahren, das Ausgangsmaterial, die Dauer wie auch die Belastungsintensität der sportlichen Interventionen unterscheiden. Aufgrund der leichten und schnellen Zugänglichkeit wurden oftmals Blutproben als Ausgangsmaterial verwendet. Durch die wachsende Studienanzahl gibt es immer mehr Beweise dafür, dass längere Sporteinheiten in mononukleären Zellen des peripheren Blutes zu epigenetischen Modifikationen führen können. Inwiefern sich Veränderungen der DNA-Methylierung in Folge von Akutinterventionen im Blut nachweisen lassen, ist nicht bekannt. Somit stellt sich die Frage, ob bereits einzelne Sporteinheiten zu messbaren Änderungen der epigenetischen Stellgrößen führen und welche Verfahren sich zur Darstellung dieser Wechselwirkung eignen.

Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob nach definierten kurzen Trainingseinheiten bei gesunden Probanden eine nachweisbare Veränderung der globalen und genspezifischen DNA-Methylierung auftritt.

Im Rahmen der vorliegenden Pilotstudie wurde der ELISA der Firma EpiGentek zur Messung der DNA-Methylierung verwendet. Im Zusammenhang mit sportlichen Interventionen kam der Test bislang noch nicht zur Anwendung.

Im Rahmen dieser Pilotstudie sollte demnach auch überprüft werden, ob sich der verwendete ELISA als schnell anzuwendender Test zur Beurteilung von akuten Änderungen der DNA-Methylierung bewähren könnte und wie genau er den globalen DNA-Methylierungsgrad der verschiedenen Blutproben angibt. Neben der Testung dieses Assays sollte geprüft werden, ob sich auch akute genspezifische Veränderungen, am Beispiel des ASC-Gens, einstellen.

Vergleichend wurde hierzu DNA aus dem Blut der Probanden, das jeweils vor- und nach einer von zwei unterschiedlichen intensiven Trainingseinheiten auf einem Fahrradergometer entnommen wurde, isoliert. Anschließend wurde mit Hilfe des zu erprobenden ELISAs der globale DNA-Methylierungsstatus evaluiert und mit einer methylierungs-spezifischen PCR im Anschluss an eine Bisulfitmodifizierung der DNA die ASC-spezifische Methylierung untersucht, um einen möglichen Effekt auf den DNA-Methylierungsgrad zu ermitteln.

Unter der Annahme, dass sich die genannten Labormethoden zur Darstellung von Veränderungen des DNA-Methylierungsgrades eignen würde, sollte zudem der Einfluss der unterschiedlichen intensiven Trainingseinheiten miteinander verglichen werden.

Die Ergebnisse zur Beeinflussbarkeit der DNA-Methylierung und zur Erprobung des ELISAs sollen als Grundlage für weitere Forschungen auf dem Themenfeld der Epigenetik in der Medizin dienen. Zum einen sollte die Bedeutung der DNA-Methylierung als Marker in der Entstehung verschiedener Tumorentitäten weiter untersucht werden. Zum anderen sollte die Messbarkeit und Bedeutung als Verlaufsparemeter in der Nachbehandlung und Therapie verschiedener Krankheitsbilder zukünftig evaluiert werden.

Aufgrund des thematischen Schwerpunktes dieser Arbeit sollen die Erkenntnisse auf der Ebene der Epigenetik in aller erster Linie dazu dienen, einen weiteren Schritt hin zur Etablierung und Vergleichbarkeit von krankheitsspezifischen Sportprogrammen in Prävention und Therapie von Krankheiten zu machen, um das Auftreten und die Prognose schwerwiegender Erkrankungen, wie zum Beispiel Krebs, zu verbessern.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Technische Geräte

**Tabelle 1:** Technische Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Elektronischer Dispenser	Multipette® E3	Eppendorf AG
Fahrradergometer	Polar ERGO-FIT 401	ERGO-FIT GmbH&Co. KG
Gelkammer	PerfectBlue™ horizontal minigelsystem, Mini L	peqlab Biotechnologie GmbH
Inkubator	Heraeus B6120 Inkubator	Heraeus
Kolbenhubpipetten (Einkanalpipetten)	Eppendorf Research® plus 0,1µL – 2,5µL, 0,5µL – 10µL, 2µL – 20µL, 10µL – 100µL, 20µL – 200µL, 100µL – 1000µL	Eppendorf AG
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research® plus 8-Kanal (30µL – 300µL)	Eppendorf
Mikroplatten-Reader	Infinite® 200 PRO	Tecan Trading AG
Mikrowelle	Mikrowelle M500	Philipps
Netzgerät und zugehörige Netzteil-Kabel	Netzgerät Consort Modell E 831, 300V, 1000 mA, 150 Watt	Thermo Fisher Scientific
PCR-Cycler	C1000™ Thermal Cycler Chassis (#1841000)	BIO-RAD
Pipitierhilfe	PIPETBOY acu 2	INTEGRA
Präzisionswaage	Vibra SJ-420 CE 420/0.01 g	VIBRA
Spektralphotometer	NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific

Transiluminator	BIOMETRA TI 1 (Gel Documentation System Bio DocAnalyze)	Biometra
Vortex	V-1 plus, Einzel-Vortex	SIA Biosan
Wasserbad	GFL, Typ 1004 (02)	GFL - Gesellschaft für Labortechnik - mbH
Zentrifuge	Color Sprout Mini- Zentrifuge	Biozym
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 40R Universalzentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	ROTIXA 50 RS	Hettich Lab Technology

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2:** Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Butterfly Venofix	B. Braun Melsungen AG
Gelkämme (1.0 mm, 25 Zähne, 11 µl)	peqlab Biotechnologie GmbH
Parafilm	Verschiedene Hersteller
PCR-Klebefolie (primaSeal-qPCR: hitzebeständige ultra-klare qPCR-Klebefolie)	Steinbrunner Laborsysteme GmbH
PCR-Platte (FrameStar® 96 Well Skirted PCR Plate)	Brooks Life Sciences
PCR-Röhrchen, 8er-Streifen	Axygen™
PCR-Verschlusskappen (8er)	Axygen™
Pipettenspitzen mit und ohne Filter in verschiedenen Größen	Eppendorf AG
Präzisionswischtuch (trocken und fuselfrei)	Kimberly Clark Professional
Reaktionsgefäße (Tubes: 0,2, 0,5, 1,5 ml)	Eppendorf AG
S-Monovetten 7,5 ml, 92 x 15 mm, Lithium- Heparin	Sarstedt AG & Co.
Schutzhandschuhe	Verschiedene Hersteller
Trockeneis	

### 3.1.3 Kits

Für die Isolierung der DNA aus den Blutproben wurde das QIAamp® DNA Blood Midi (4. Edition) von QIAGEN verwendet. Für die Messung des Methylierungsgrads der DNA-Proben wurde das MethylFlash™ Global DNA Methylation 5 mC ELISA Easy Kit (Calorimetric) von EpiGentek verwendet. Zur Bisulfitmodifizierung der DNA-Proben wurde das Methylamp™ DNA Modification Kit Base Catalog # P-1001 (EpiGentek) benutzt. Mit dem innuPREP DOUBLEpure Kit Issue 03/2017 (Analytik Jena AG, Jena, Germany) wurde die methylierte DNA vor der Bisulfitmodifizierung aufgereinigt. Die einzelnen Bestandteile der Kits wurden nach Vorgaben der Hersteller (s. jeweilige Versuchsanleitung) gelagert und die Reagenzien wurden nach den Vorgaben der Handbücher angesetzt. Auf die Methodik und die Verfahren, mit denen die Kits verbunden sind, wird im Folgenden eingegangen.

### 3.1.4 Reagenzien und Chemikalien

**Tabelle 3:** Reagenzien und Chemikalien (Reagenzien der Kits wurden nicht extra nochmals aufgezählt)

Bezeichnung	Hersteller/Herstellung
2xMyTaq Reaktionsmix (2x MyTaq HS Red Mix; Lot. No: MTHRX-617201)	Bioline GmbH
100 bp DNA-Größenmarker (Katalognummer: 15628-019)	Invitrogen life technologies
Agarose (my-Budget Universal-Agarose)	Bio-Budget Technologies GmbH
CpG-Methyltransferase (M.SssI)	New England BioLabs Inc., Component Nr.: M0226SVIAL
Destilliertes Wasser	
Ethanol $\geq 99,5$ %	Carl Roth GmbH, CAS Nr.: 64-17-5
Ethidiumbromid-Lösung 1%-ig (10mg/ml)	Carl Roth GmbH, CAS Nr.: 1239-45-8
NEBuffer™ 2 [Supplied Methyltransferase Reaction buffer 10X]	New England BioLabs Inc., Component Nr.: B7002SVIAL
S-adenosyl-methionine (SAM, 32mM)	New England BioLabs Inc., Component Nr.: B9003SVIAL
TAE-Puffer 1x (Tris-Acetat-EDTA – Puffer, 1fach konzentrierte wässrige Lösung)	Thermo Fisher Scientific Inc.

\* Die Reagenzien der angegebenen Kits werden hier nicht extra nochmals aufgelistet, sondern sind den einzelnen Versuchsprotokollen der Hersteller zu entnehmen.

## 3.1.5 Oligonukleotid-Primer

**Tabelle 4:** Verwendete Primer (Konzentration jeweils  $c = 10 \mu\text{M}$ )

<b>Zielgen + Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Hersteller</b>
FLT3 TKD Ex20 fw	5'-CCGGTACCTACTGAAGTTGAG-3'	Eurofins Genomics Germany GmbH
FLT3 TKD Ex20 rev	5'-GCACCACAGTGAGTGCAGTTG-3'	Eurofins Genomics Germany GmbH
ASC - Unmethylated Reaction 1 (UR1)	5'-GGTTGTAGTGGGGTGAGTGGT-3'	Eurofins Genomics Germany GmbH
ASC - Unmethylated Reaction 2 (UR2)	5'-CAAAACATCCATAAACAACAACA-3'	Eurofins Genomics Germany GmbH
ASC - Methylated Reaction 1 (MR1)	5'-TTGTAGCGGGGTGAGCGGC-3'	Eurofins Genomics Germany GmbH
ASC - Methylated Reaction 2 (MR2)	5'-AACGTCCATAAACAACAACGCG-3'	Eurofins Genomics Germany GmbH

## 3.1.6 Verwendete Software

<b>Programmbezeichnung + Version</b>	<b>Entwickler</b>
BioDoc Analyse Software 2.1	Biometra
Endnote X9.2	Clarivate Analytics
Excel 2010 + Word 2010	Microsoft
GIMP 2.10	Das GIMP-Team
NanoDrop 2000 / 2000c Operating Software, Version 1.6	Thermo Fisher Scientific
SPSS Statistics, Version 27	IBM
Tecan i-control, 1.11.1.0	Tecan Trading AG

### 3.2 Teilnehmer der Studie

An der Studie nahmen insgesamt 12 gesunde, trainierte Studenten im Alter zwischen 18 und 28 Jahren der Universität Hildesheim statt. Die 12 Probanden unterteilen sich in 6 Männer und 6 Frauen. Die Probanden wurden im Zeitraum vom November 2018 bis zum Januar 2019 rekrutiert. Alle Probanden unterschrieben vor Durchführung des Studienprotokolls je eine Einverständniserklärung zur freiwilligen Teilnahme und zur geplanten genetischen Analyse ihrer Blutproben gemäß der GenDG Voraussetzungen (GenDG Formblatt der Heliosklinik Hildesheim aus dem Jahr 2018). Alle Probanden wurden durch eine Kombination ihres Kürzels und einer Nummer pseudonymisiert.

**Tabelle 5:** Anthropometrische Daten zum Teilnehmerkollektiv (n = 12)

<b>Alter</b>	23,75 ± 2,56
<b>Körpergröße [cm]</b>	178,17 ± 9,20
<b>Körpergewicht [kg]</b>	73,46 ± 16,04
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	22,89 ± 2,94
<b>Sport/Woche in Minuten</b>	327,5 ± 144,4

**Tabelle 6:** Anthropometrische Daten der einzelnen Probanden

<b>Proband</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Größe [cm]</b>	<b>Gewicht [kg]</b>	<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	<b>Sport [min./Wo.]</b>	<b>Haupt-sportart</b>
<b>SM1</b>	Männlich	25	185	90	26,30	480	Fußball
<b>VL2</b>	Weiblich	28	170	58	20,07	180	Rennrad
<b>YK3</b>	Männlich	20	180	81	25	480	Volleyball
<b>CB4</b>	Weiblich	24	165	50	18,37	300	Handball
<b>BM5</b>	Männlich	25	199	107	27,02	480	Handball
<b>DS6</b>	Männlich	23	179	62	19,35	240	Fußball
<b>BE7</b>	Weiblich	20	173	66,5	22,22	300	Fußball
<b>JM8</b>	Männlich	23	185	74	21,62	240	Football
<b>MS9</b>	Männlich	23	184	90	26,58	240	Handball
<b>KV10</b>	Weiblich	28	175	67	21,88	240	Laufen
<b>AG11</b>	Weiblich	24	171	72	24,62	600	Bodybuilding
<b>AP12</b>	Weiblich	22	172	64	21,63	150	Joggen

\* Alle Probanden und deren Blutproben (s. 3.3.3) wurden an der Universität Hildesheim mit einer fortlaufenden Nummer und Kürzeln pseudonymisiert, sodass ich vor Abschluss der laborchemischen Versuche keine Informationen über die Probanden hatte.

Die folgenden Ein- und Ausschlusskriterien wurden in Zusammenarbeit mit dem Team des sportwissenschaftlichen Instituts der Universität Hildesheim ausgearbeitet.

### 3.2.1 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Teilnehmer, die nach den Vorgaben der WHO von 2010 als sportlich aktiv gelten und dementsprechend innerhalb einer Woche mindestens 150 Minuten Sport mit moderater Intensität (3-6 MET) oder 75 Minuten Sport (> 6 MET) mit starker Intensität betreiben (World Health, 2010). Die Stärke der Intensität wird über den sog. „metabolic equivalent (MET) score“ ermittelt, der die Energiekosten für eine physische Aktivität angibt. Nach Pate et. al. (1995) ist 1 MET, die Energie, die man benötigt, um in Ruhe zu sitzen. Eine Aktivität mit Energiekosten von 3-6 MET hat eine moderate Intensität. Energiekosten von mehr als 6 MET zeichnen eine Aktivität mit hoher Intensität aus. (Pate et al., 1995)

Weiterhin sollten die Teilnehmer möglichst jung sein, da sie so eine höhere genomische Stabilität aufweisen (Niedernhofer et al., 2018). Aufgrund dieser Tatsache erhofften wir uns den epigenetischen Effekt der sportlichen Intervention möglichst gut isoliert darstellen zu können.

### 3.2.2 Ausschlusskriterien

Folgende Kriterien schlossen eine Teilnahme an der Studie aus:

- × Chronische medizinische Erkrankungen (bspw.: Diabetes mellitus, Arterielle Hypertonie)
- × Akute oder chronische Verletzungen des Bewegungsapparats (bspw.: Bänderriss)
- × Regelmäßige Einnahme von Medikamenten, Drogen oder leistungsfördernden Substanzen
- × Rauchen
- × Schwangerschaft

### 3.2.3 Ethikantrag und Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie und der genetischen Analyse gemäß des Gendiagnostikgesetzes

Vor Beginn der Durchführung der Studie haben alle Teilnehmer gemäß den Ethikbestimmungen der Universität Hildesheim (Ethikantrag vom 14.08.2018) zum einen Einverständniserklärung über ihre freiwillige Teilnahme an dieser Pilotstudie und zum anderen eine Einverständniserklärung, durch die sie der genetischen Analyse gemäß des Gentestgesetzes (GenDG). Die Untersuchung wurde nach den Regeln der Deklaration von Helsinki (World Medical, 2013) durchgeführt. Die Unterlagen werden an der Universität Hildesheim verwahrt.

### 3.3 Studienprotokoll - Ablauf der sportlichen Intervention und anschließende Blutabnahme

Die sportliche Intervention wurde zusammen mit Nico de Lazzari und Prof. Dr. Nicolas Kurpiers aus dem Institut für Sportwissenschaft der Universität Hildesheim geplant. Die sportliche Intervention auf dem Fahrradergometer wurde an der Helios Klinik Hildesheim durchgeführt.

Das Studienprotokoll sah drei Messtage im Abstand von je sieben Tagen vor. Alle Trainingseinheiten wurden auf einem Fahrradergometer (Modell: Polar Ergofit 401 der ERGO-FIT GmbH) durchgeführt und die einzelnen Tage waren wie folgt strukturiert:

- Tag 1: Messung der Peak Power (PP) auf dem Fahrradergometer
- Tag 8: Trainingseinheit 1 bei 85% der Peak Power
- Tag 15: Trainingseinheit 2 bei 50% der Peak Power

Jeweils eine Stunde vor dem Beginn und nach dem Abschluss einer Trainingseinheit wurde den Probanden venöses Blut entnommen, dass als Ausgangsmaterial für die folgenden Untersuchungen der DNA diente.



Abbildung 4: Zeitstrahl der Intervention (PP = Peak Power, B = Blutprobe)

Die Probanden hatten die Möglichkeit das Programm an zwei verschiedenen Zeiträumen durchzuführen (entweder 19./20.01.2019 + 26./27.01.2019 oder 23.02.2019 + 02.03.2019) und mussten an den Tagen der Intervention folgende Verhaltensregeln befolgen: Sie durften nur Wasser trinken und es war Ihnen untersagt sich an den Tagen vor der Trainingseinheit und bis zur zweiten Blutentnahme am jeweiligen Tag körperlich zu betätigen.

### 3.3.1 Messung der Peak Power

Die Ermittlung der Peak Power wurde durch einen 3-Minuten-Stufentest auf einem Fahrradergometer (Polar Ergofit 401) durchgeführt.

Bevor die Ermittlung der Peak Power begann, wurde den Probanden die Möglichkeit gegeben sich auf dem Fahrradergometer aufzuwärmen. Das Aufwärmen war auf fünf Minuten begrenzt, fand bei niedriger Wattzahl statt und gab dem Probanden Zeit sich an das Fahrradergometer zu gewöhnen und die Muskulatur durch Förderung der Durchblutung aufzuwärmen.

Der Maximaltest begann bei einer Intensität von 80 Watt mit einer Stufenzeit von drei Minuten. Nach drei absolvierten Minuten stieg die Wattzahl um 30. Die Umdrehungen pro Minuten sollten dabei von den Probanden konstant bei 80 Umdrehungen pro Minute gehalten werden. Sobald der Proband den Test abbrechen musste oder die Umdrehungszahl nicht mehr halten konnte, wurde die Peak Power (s. Tabelle 7) erreicht (Tschopp M., 2001).

Die Teilnehmer wurden angewiesen 48 Stunden vor den einzelnen Interventionen auf dem Ergometer keinerlei intensive körperliche Aktivität auszuführen.

**Tabelle 7:** Ergebnisse der Peak Power-Messung und Ableitung der Belastungsintensitäten

<b>Proband</b>	<b>Peak Power [Watt]</b>	<b>85% PP [Watt]</b>	<b>50% PP [Watt]</b>
<b>SM1</b>	320	270	160
<b>VL2</b>	230	195	115
<b>YK3</b>	260	220	130
<b>CB4</b>	170	145	85
<b>BM5</b>	290	245	145
<b>DS6</b>	260	220	130
<b>BE7</b>	230	195	115
<b>JM8</b>	260	220	130
<b>MS9</b>	260	220	130
<b>KV10</b>	200	170	100
<b>AG11</b>	230	195	115
<b>AP12</b>	200	170	100

### 3.3.2 Durchlaufen der Testinterventionen des Studienprotokolls

Sieben Tage nach der Messung der Peak Power haben alle Teilnehmer ein 6x3-minütiges Training mit 85% der individuellen Peak Power durchgeführt. Zwischen den hochintensiven Phasen hatten die Teilnehmer je 3 Minuten mit 25% der Peak Power zur Erholung verbracht. Insgesamt dauerte die erste Intervention (85%) also 33 Minuten.

Weitere sieben Tage später führten alle Teilnehmer den gleichen Test mit 50% ihrer Spitzenleistung durch.

Damit beiden Testinterventionen dieselbe Belastung abbilden und sich nur in der Intensität unterscheiden, wird vor Beginn die Belastung von 85% zu 50% umgerechnet (1. Errechnung Belastungszeit:  $18 \text{ min.} * 0,85 = 15,3 \text{ min} \rightarrow 15,3 \text{ min.} * 0,5 = 30,6 \text{ min}$

2. Einrechnung der Pausenzeiten:  $15 \text{ min} * 0,25 = 3,75 \text{ min.} \rightarrow 3,75 * 0,5 = 7,5 \text{ min.} \rightarrow$  Addiert ergibt sich eine Belastungszeit von 38,1 Minuten.)

Jeder Proband musste somit beim zweiten Testtermin 38,1 Minuten mit 50% der ermittelten Peak Power fahren, damit beide Belastungen identisch sind.

### 3.3.3 Blutabnahme

Aufgrund der leichten Zugänglichkeit zu peripherem Blut, wurde es als Ausgangsprobe für die Messungen verwendet. Die Blutabnahmen erfolgten nach der üblichen Art und Weise. Daher wird auf deren Durchführung als Standard vorausgesetzt und es wird nicht genauer darauf eingegangen.

Eine Stunde vor und nach der Belastung wurden Blutproben in ein 7,5-ml-Röhrchen Heparinblut entnommen. Insgesamt wurden vier Blutproben von jedem Teilnehmer entnommen (s. Abb. 4). Nach der Blutentnahme wurden die Blutproben bei  $-20^\circ \text{C}$  eingefroren. Für den Transport wurden die Proben in Trockeneis verpackt und durch ein Transportunternehmen an das Universitätsklinikum Essen geschickt. Die Kühlkette wurde nicht durchbrochen und die Proben wurden nach dem Transport bei  $-20^\circ \text{C}$  gelagert.

### 3.4 Molekulargenetische Untersuchungen

Die vier verschiedenen Blutproben der Probanden (s. oben) stellen das Ausgangsmaterial für die folgenden Laboruntersuchungen dar. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur im Labor der Kinderhämatologie und -onkologie im 3. OG der Kinderklinik durchgeführt.

Die Isolierung der DNA aus den Blutproben der Probanden wurde mithilfe des QIAamp® Midi Kits (DNA-Blut) der 4. Edition (Februar.2015) durchgeführt. Die DNA-Isolierung wurde entsprechend des Spin Protocols aus dem beiliegenden Handbuch durchgeführt. [QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook 02/2015 S.19-21: Protocol: Purification of DNA from Whole Blood using the QIAamp Blood Midi Kit (Spin Protocol)].

Im Anschluss an die DNA-Isolierung wurden die DNA-Konzentration der Proben mittels Spektrophotometrie bestimmt. Dafür wurde ein Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet.

Die Konzentration der eluierten DNA wurde im Folgenden durch eine Spektrometrie gemessen. Um die Reinheit der Proben zu gewährleisten, wurde diese zum einen durch eine spektrometrische Messung [Absorptionsverhältnisse (260/280 und 260/230)] und zum anderen in einem Agarose-Gel nach einer PCR mit Fms-like tyrosine kinase 3- Primern überprüft.

Die isolierte DNA diente als Ausgangsmaterial für die Messung der globalen DNA-Methylierung und deren Veränderung durch die sportliche Intervention. Für die Messung des DNA-Methylierungsgrades wurde das MethylFlash™ Global DNA methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric) [Base Catalog # P-1030, © EpiGentek Group Inc., Farmingdale, USA] verwendet.

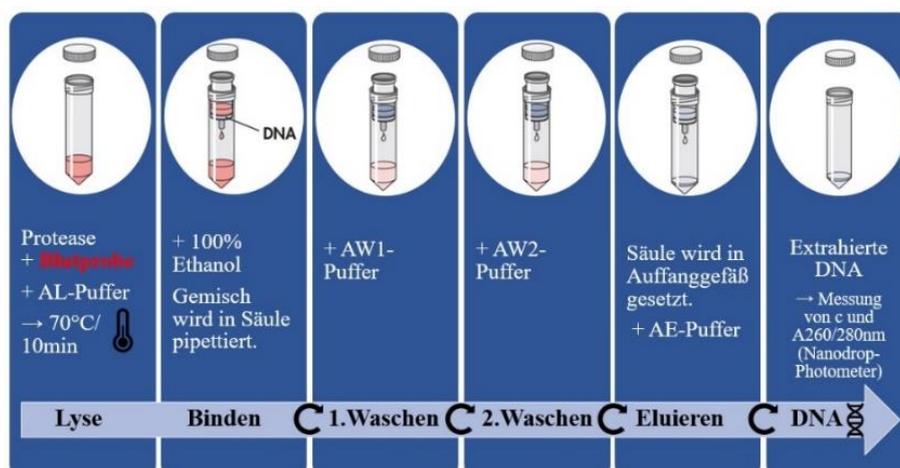
Weiterhin wurde die isolierte DNA mithilfe des Methylamp™ DNA Modification Kit Base Catalog # P-1001 (EpiGentek) bisulfitmodifiziert. Diese veränderte DNA wurde für die methylierungs-spezifische PCR benötigt, um den Methylierungsstatus des ASC-Gens zu untersuchen.

### 3.4.1 DNA-Isolierung

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung wurden je 2 ml einer Vollblutprobe verwendet. Vor dem Durchführungsstart wurden die Blutproben aus dem Kühlschrank genommen und unter Raumtemperatur so lange aufgetaut, bis sie homogen und flüssig wurden. Im Folgenden wird die Durchführung des Versuchs beschrieben:

Zunächst wurden die Blutproben lysiert, sodass die in den mononukleären Zellen enthaltene DNA aus den Blutzellen bzw. den Leukozyten austreten kann. Für die Lyse wurden 200 µl der QIAGEN Protease mit 2 ml Vollblut und 2,4 ml des AL-Puffers in einem Zentrifugenröhrchen zusammen pipettiert. Nach kurzem Mischen und Vortexen (1 min) des Reaktionsgefäßes wurden die Proben für 10 Minuten bei 70°C erhitzt.

Im Anschluss an die Lyse wurde die Lösung mit 2ml 100% (genauer: 99,8%) Ethanol homogenisiert. Nach kurzem Vortexen wurde die Lösung ( $V = 6,6$  ml) in 2 Schritten (mit je 3,3 ml) auf die Membran einer QIAamp Säule pipettiert. Die aus den Zellen lysierte DNA konnte so an die silicatbasierte Membran binden. Die Säulen wurden jeweils für 4 Minuten bei 1850 x g (3000 rpm) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Da die Membran der Säulen für andere Probenbestandteile mit Ausnahme von DNA durchlässig ist, wurde die Säule anschließend durch 2 Waschschrte mit je 2 ml AW1-/AW2-Waschpuffer und anschließender Zentrifugation bei 4500 x g (5000 rpm) [AW1: 3 Minuten, AW2: 17 Minuten] von Verunreinigungen befreit. Zum Schluss wurde die Säule in ein neues Collection Tube gesetzt. Durch Hinzugabe von 300 µl AE-Puffer auf die Membran und anschließender Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die DNA aus der Membran gelöst. Die DNA wurde mittels Zentrifugation bei 4500 x g (5000 rpm) für 4 Min. im Collection Tube aufgefangen. Um eine maximale DNA-Konzentration zu erreichen, wird das gesamte Eluat (300 µl) nochmals auf die Membran der Säule pipettiert und anzentrifugiert.



**Abbildung 5: DNA-Extraktion** (in Anlehnung an: S.8 QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook 02/2015)

### 3.4.2 Qualitätskontrolle der extrahierten DNA

Die nachfolgenden Untersuchungen können durch die Menge und die Reinheit der extrahierten DNA beeinflusst werden. Um sicherzustellen, dass die extrahierte DNA ausreichend konzentriert und rein war, wurden folgende Versuche bzw. Messungen durchgeführt:

- 1) Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration (Quantität der Probe) bei einer Absorption von 260nm und Ermittlung der Absorptionsverhältnisse  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$  zur qualitativen Beurteilung der DNA-Reinheit.
- 2) Elektrophoretische Auftrennung der extrahierten DNA im Agarose-Gel nach PCR-Amplifizierung zur Darstellung von unspezifischen Banden und Unterschieden in den Intensitäten der DNA-Banden, um Verschmutzung der DNA zu evaluieren.

#### 3.4.2.1 Spektrophotometrie

Im Anschluss an die DNA-Isolation wurde eine spektralphotometrische Messung mit dem NanoDrop 2000c [s. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual von Thermo Scientific] zur Ermittlung der DNA-Konzentration durchgeführt. Es wurde ein Probenvolumen von 1  $\mu\text{l}$  verwendet. Für eine reine DNA-Probe sind wir von folgende Werten ausgegangen:  $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$ ,  $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$  (Armbrecht and Eppendorf, 2013).

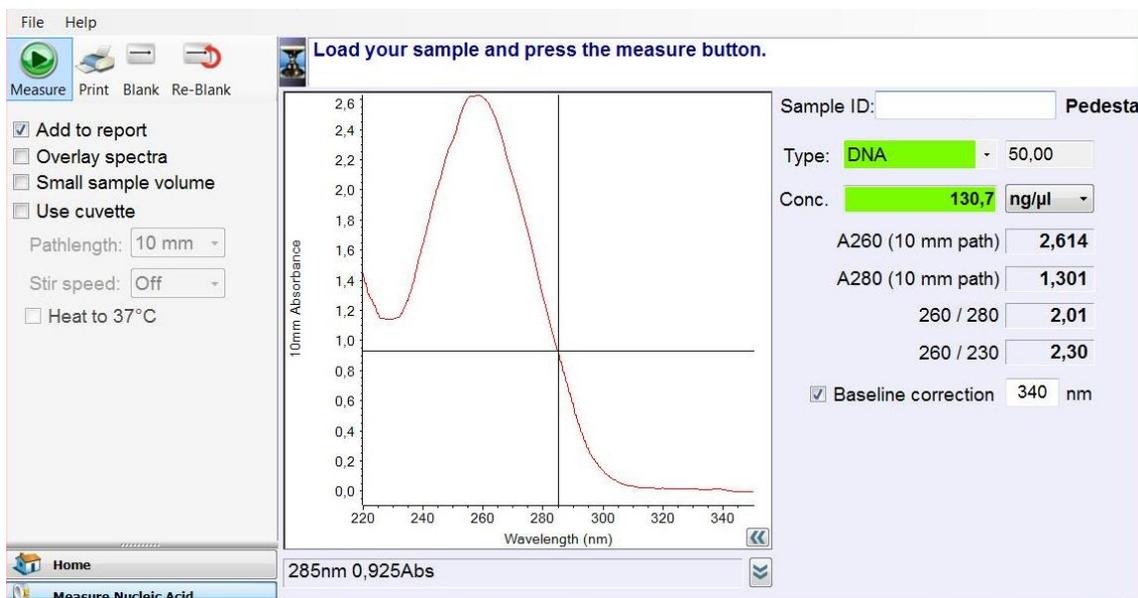


Abbildung 6: Beispielmessung mit dem NanoDrop 2000c

Folgende Werte aus der Messung (s. Abbildung 6) wurden in einer Excel-Datei dokumentiert: DNA-Konzentration, Quotient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , Quotient  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ .

**Tabelle 8:** Verwendete DNA-Proben der Probanden 1-12 (a-d stellen die 4 Blutabnahmezeitpunkte B1-B4 dar)

DNA-Probe	DNA-Konzentration [ng/µl]	A260nm/A280nm	A260nm/A230nm
SM1a	81,8	2,03	2,39
SM1b	106,6	1,99	2,42
SM1c	145,5	1,96	2,38
SM1d	119	1,99	2,33
VL2a	131,1	1,98	2,33
VL2b	72	2,02	2,44
VL2c	97,5	2	2,42
VL2d	102	2,01	2,34
YK3a	163,7	1,99	2,3
YK3b	97,1	2,03	2,42
YK3c	80,9	2,08	2,45
YK3d	104,9	2,03	2,31
CB4a	70,7	2,01	2,47
CB4b	68,7	2,04	2,5
CB4c	68,7	2,05	2,43
CB4d	129,2	1,99	2,35
BM5a	58,4	2,06	2,48
BM5b	156,3	1,97	2,38
BM5c	96,4	2	2,41
BM5d	99,3	1,98	2,33
DS6a	65,2	2,07	2,6
DS6b	84	2,04	2,5
DS6c	69,7	2,07	2,6
DS6d	163,3	1,99	2,36
BE7a	137,4	1,98	2,34
BE7b	150,7	1,97	2,37
BE7c	155	1,96	2,43
BE7d	126	1,97	2,36
JM8a	77,2	2,02	2,41
JM8b	72,9	2,04	2,32
JM8c	54,2	2,08	2,58
JM8d	107,6	1,99	2,33
MS9a	135,4	1,98	2,34
MS9b	101,5	2,01	2,34
MS9c	76	2,09	2,27
MS9d	126,7	2	2,3
KV10a	105,4	2,01	2,29
KV10b	182,7	1,97	2,27
KV10c	101,9	2,03	2,3
KV10d	130,7	2,01	2,3
AG11a	114,7	1,99	2,36
AG11b	70,8	2,02	2,41
AG11c	139,3	1,95	2,29
AG11d	127	1,97	2,36
AP12a	70,9	2,01	2,4
AP12b	81,5	1,99	2,28
AP12c	54,7	1,99	2,44
AP12d	70,5	2,01	2,41

Die extrahierten DNA-Proben zeigen eine ausreichende Reinheit, da die Absorptionsquotienten in etwa den oben genannten Vorgaben entsprachen: Nach Ansicht aller Ergebnisse zeigen sich folgende Bereich der Absorptionsquotienten: A260/280: 1,96-2,08; A260/230: 2,27-2,6 (> 2,0).

### 3.4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde durchgeführt, um die DNA-Reinheit mithilfe der anschließenden Gelelektrophorese qualitativ beurteilen zu können. Die PCR erlaubt eine Amplifikation von DNA im Rahmen einer in vitro DNA-Replikation. Die PCR wurde im Laufe dieser Studie für folgende Zwecke durchgeführt: Zum einen zur Sicherung der DNA-Reinheit und zum anderen zur Vermehrung von bisulfitmodifizierter DNA

Es wurde jeweils mit folgendem PCR-Ansatz ( $V = 10 \mu\text{l}$ ) gearbeitet:  $2 \mu\text{l}$  DNA-Verdünnung (Konzentration abhängig vom Zweck) +  $8 \mu\text{l}$  Mastermix [bestehend aus:  $5 \mu\text{l}$  2xMyTaq Reaktionsmix,  $0,5 \mu\text{l}$  Primer 1 ( $10 \mu\text{M}$ ),  $0,5 \mu\text{l}$  Primer 2 ( $10 \mu\text{M}$ ),  $2 \mu\text{l}$  dest. Wasser]

Da sich die verwendete Menge der extrahierten DNA, die verwendeten Primer und auch das zu durchlaufende PCR-Protokoll hinsichtlich der weiteren Verwendung der amplifizierten DNA unterschieden, wird in zwei separaten Kapiteln zwischen den Vorgehensweisen unterschieden.

Zur Ermittlung der DNA-Reinheit wurde mit einer  $c_{\text{DNA}} = 12,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $\rightarrow m_{\text{DNA}} = 25\text{ng}$ ) gearbeitet. Für die Verifizierung der DNA-Reinheit mittels Auftrennung im Agarose-Gel war die Bedeutung des Primers nicht von großer Bedeutung. Es ging nicht darum einen spezifischen DNA-Abschnitt zu vervielfachen, sondern darum bei der Amplifizierung der Proben denselben Primer zu verwenden, um Unterschiede in der Gelelektrophorese darzustellen und auszuwerten. Hierzu wurden Primer der Fms-like tyrosine kinase 3 (s. 3.1.5) verwendet.

Nach Vorbereitung der PCR-Ansätze in den Reaktionsgefäßen wurden diese für 1 Minute anzentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich das komplette Probenmaterial auf dem Boden der Stripes befindet. Nach Platzierung der PCR-Stripes in den PCR-Cycler (C1000™ Thermal Cycler Chassis (#1841000)) der Firma BIO-RAD wurde folgendes Programm durchlaufen:

- 1)  $95^{\circ}\text{C}$ : 3 Min. [Start der Denaturierung]
  - 2)  $95^{\circ}\text{C}$ : 10 Sek. [Denaturierung]
  - 3)  $59^{\circ}\text{C}$ : 20 Sek. [Annealing]
  - 4)  $72^{\circ}\text{C}$ : 30 Sek. [Elongation]
  - 5)  $72^{\circ}\text{C}$ : 10 Min [Elongation]
  - 6)  $4^{\circ}\text{C}$ : Ende
- x29 [insgesamt 30 Zyklen der Schritte 2) - 4)]
-

### 3.4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente nach ihrer Ladung und Größe aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet

Für die Elektrophorese wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet. Zur Herstellung des Agarosegels wurden in einem Erlenmeyerkolben 2g Agarose in 98ml TAE [1x] unter Erhitzung in einer Mikrowelle gelöst. Nach 10-15 Sekunden zur Abkühlung wurden 3 µl einer 1%-igen Ethidiumbromid-Lösung mit einer Pipette in das Gel pipettiert und zur Verteilung der Lösung wurde der Erlenmeyerkolben kurz geschwenkt. Das Ethidiumbromid diente aufgrund seiner interkalierenden Eigenschaften der späteren Anfärbung der DNA unter UV-Licht. Das Gel wurde auf einen Gelträger übertragen, der mit Gelkämmen zur Ausbildung von Geltaschen bestückt war.

Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden die Gelkämme vorsichtig entfernt und das Gel wurde in die mit TAE-gefüllte Gelkammer gelegt. Die Geltaschen wurden mit den Produkten der vorgegangenen PCR gefüllt und die Elektrophorese erfolgte im Anschluss horizontal bei einer Spannung von ungefähr 120 V und einer Stromstärke von ungefähr 100 mA für 45 Minuten.

Zur Größenabschätzung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde am Anfang jeder Gelreihe ein 100 bp DNA-Größenmarker verwendet, der aus 15 stumpfen Fragmenten mit einer Länge von 100 bis 1,500 bp, in 100 bp-Erhöschungsschritten, und einem zusätzlichen Fragment bei 2,072 bp besteht. (<https://www.fishersci.de/shop/products/invitrogen-100-bp-dna-ladder-2/11580916>, abgerufen 07.12.2020)

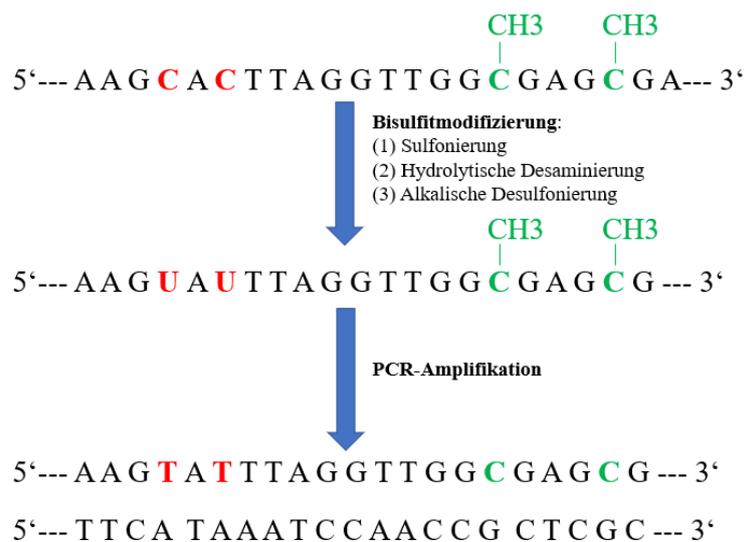
Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden unter UV-Licht im Transiluminator von Biometra sichtbar gemacht und mit einer Schwarz-Weiß-Videokamera unter Verwendung des Programms BioDocAnalyse Vers. 2.1 (Ser. No. 12190-0) fotografiert.

Mit dem Programm konnte die Belichtungsstärke reguliert werden.

Die Bilder wurden nach Einstellung der Bildschärfe und verschiedener Belichtungsstärken im TIFF-Format auf dem PC gespeichert und anschließend mit dem Programm GIMP (Version: 2.10) für die Auswertung bearbeitet.

### 3.4.3 Bisulfitmodifizierung der DNA

Für eine Vielzahl von Verfahren zur Ermittlung der DNA-Methylierung muss DNA zuvor mit Natriumbisulfit ( $\text{NaHSO}_3$ ) behandelt werden. Die Bisulfitmodifizierung der DNA ermöglicht es zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinen zu unterscheiden, weil die Aminogruppe dieser verschiedenen Cytosinformen sich bei diesem Verfahren unterschiedlich verhält. Während 5-mC nicht mit Natriumbisulfit reagiert, werden die unmethylierten Cytosine in 3 Schritten (Sulfonierung, Hydrolytische Desaminierung, Alkalische Desulfonierung) zu Uracil deaminiert. Alle unmethylierten Cytosine werden somit aus der Ursprungs-DNA eliminiert und durch Uracil ersetzt. Die nach der Bisulfitmodifizierung entstehende DNA-Sequenz zeichnet sich somit dadurch aus, dass alle noch vorhandenen Cytosine methyliert sind. Durch eine sich anschließende PCR können dann Abschnitte dieser bisulfitbehandelten DNA vervielfältigt werden. Diese amplifizierte DNA enthält Thymin statt Uracil, das zuvor aus unmethylierten Cytosinen entstanden ist, und Cytosin anstelle von 5-mC (Clark et al., 1994).



**Abbildung 7: Bisulfitsequenzierung - Ablauf am Beispiel eines einzelnen DNA-Stranges**  
 (Eigene Darstellung in Anlehnung an die Publikation von Clark et. al, 1994)

Die DNA-Proben wurden im Zuge der Versuchsvorbereitung auf  $c = 25 \text{ ng}/\mu\text{l}$  verdünnt und eine 90%-ige Ethanollösung wurde vorbereitet. Zudem wurde R5, der „final cleaning buffer“ vorbereitet, indem 7ml 100% Ethanol hinzu pipettiert wurden.

Von jeder verwendeten DNA-Probe wurden  $3 \mu\text{l}$  ( $m = 75 \text{ ng}$ ) verarbeitet, um am Ende bisulfitmodifizierte DNA mit einer Konzentration von  $c = 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  bei einem Volumen von  $15 \mu\text{l}$  zu erhalten. Bei höheren Konzentrationen zeigten sich in den vorangegangenen Testversuchen zu starke Banden in der Gelelektrophorese nach der MSP.

Die Bisulfitbehandlung wurde in Anlehnung an die Durchführungsanleitung des Base Catalog # P-1001 des MethyLamp™ DNA Modification Kit (S.4 und 5) der Firma EpiGentek durchgeführt: Zunächst wurden 21 µl destilliertes Wasser zur DNA hinzugegeben und unter Hinzunahme von 1 µl R1-Lösung (DNA Denature) bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. In dieser Zeit wurde die DNA durch R1 denaturiert, wodurch die DNA in Einzelstränge geteilt wurde. Mithilfe einer in dieser Zeit angesetzten Natriumbisulfit-Lösung (R1/R2/R3-Lösung) wurde die DNA modifiziert. Die DNA wurde mithilfe einer Spin-Säule gereinigt und aufgefangen. Abschließend wurde die mit Natriumbisulfit behandelte DNA mit der R6-Lösung des Kits auf ein Volumen von 15 µl eluiert.

Die bisulfitmodifizierte DNA wurde anschließend für die Methylierungs-spezifische PCR verwendet.

#### 3.4.4 Herstellung von methylierter DNA

Um den Erfolg der folgenden Methylierungs-spezifischen PCR bewerten zu können, musste zuvor eine Positivkontrolle für die M-Reaktion in Form von vitro-methylierte DNA hergestellt werden, die sich durch eine fast vollständige Methylierung der CpG-Dinukleotide auszeichnete. Dazu wurden 1µg an Probanden-DNA in einem Gemisch mit einem Gesamt-Volumen von 50µl zusammen mit nukleasefreiem Wasser, 5µl NEBuffer™2 (Supplied Methyltransferase Reaction Buffer, 10X), 5µl S-Adenosylmethionin (1600 uM), als Methylgruppendonator, und 1µl Methyltransferase (M. SssI) (NEB #M0226) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch ein Erhitzen auf 65°C für 20 Minuten gestoppt (New England Biolabs, 2018).

Anschließend erfolgte mit Hilfe von Spin-Säulen die Aufreinigung der methylierten DNA mit 40µl Elutionspuffer (c = 25ng/ µl), die anschließend vor Durchführung der MSP ebenfalls mit Natriumbisulfit behandelt wurde. Die Aufreinigung erfolgt in Anlehnung an das Spin-Protokoll „Standard protocol: Purification and concentration of PCR products from PCR reactions up to 50µl“ mit dem innuPREP DOUBLEpure Kit Issue 03/2017 (Analytik Jena AG, Jena, Germany)

### 3.4.5 Verfahren zur Beurteilung der Veränderungen der DNA-Methylierung

#### 3.4.5.1 Methyl-ELISA

Nach der Isolation der DNA aus den Blutproben der Probanden und der Sicherstellung deren Reinheit wurde nun das MethylFlash™ Global DNA methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric) [Base Catalog # P-1030, © EpiGentek Group Inc., Farmingdale, USA] benutzt, um den Grad der globalen DNA-Methylierung der einzelnen Proben zu bestimmen. Für die Bestimmung des Methylierungsgrades der DNA-Proben wurden mehrere ELISAs, in Anlehnung an die Vorgaben des beiliegenden Handbuchs des Herstellers, durchgeführt.

Die Ausgangs-DNA der Probanden wurde vor der Durchführung der Messungen mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von  $c = 25\text{ng}/\mu\text{l}$ . Der ELISA wurde anschließend mit der vorgegebenen Idealmenge von 100ng Probanden-DNA durchgeführt.

Weiterhin wurde vor der Untersuchung der Proben entsprechend der Angaben des Handbuchs von EpiGentek der Waschpuffer verdünnt und unter Hinzunahme der Negativ (NC)- und Positivkontrolle (PC) eine Verdünnungsreihe mit 6 Konzentrationspunkten vorbereitet (s. Tab. 9). Die spektrophotometrisch ermittelten Messwerte dieser Standardreihe dienten im Anschluss zur Ermittlung einer Standardkurve, die für die Berechnung der einzelnen DNA-Methylierungsgrad benötigt wurde (s. Kap. 4.1).

**Tabelle 9:** Erstellung der Standardreihe (aus: Base Catalog # P-1030 der Firma EpiGentek)

Kontrolle		PC (5,0%)		Diluted PC (0,5%)		NC
0,1% PC/well	=	0,0 $\mu\text{l}$	+	1,0 $\mu\text{l}$	+	9,0 $\mu\text{l}$
0,2% PC/well	=	0,0 $\mu\text{l}$	+	1,0 $\mu\text{l}$	+	4,0 $\mu\text{l}$
0,5% PC/well	=	0,0 $\mu\text{l}$	+	3,0 $\mu\text{l}$	+	3,0 $\mu\text{l}$
1,0% PC/well	=	1,0 $\mu\text{l}$	+	0,0 $\mu\text{l}$	+	9,0 $\mu\text{l}$
2,0% PC/well	=	1,0 $\mu\text{l}$	+	0,0 $\mu\text{l}$	+	4,0 $\mu\text{l}$
5,0% PC/well	=	3,0 $\mu\text{l}$	+	0,0 $\mu\text{l}$	+	3,0 $\mu\text{l}$

Für jeden durchgeführten ELISA wurde eine neue Standardreihe angelegt. Alle Proben wurden doppelt gemessen (vgl. Abb. 8), um fehlerhafte Messungen eines einzelnen Wells abschätzen zu können.

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	1%	1A	2A	...							
B	NC	1%	1A	2A								
C	0,1%	2%	1B	2B								
D	0,1%	2%	1B	2B								
E	0,2%	5%	1C	2C								
F	0,2%	5%	1C	2C								
G	0,5%		1D	2D								
H	0,5%		1D	2D								

**Abbildung 8: Pipettierschema Methyl-ELISA** (0,1 -5% sind die PC-Kontrollreihe, 1A – 12D die Proben)

Durch die Zugabe von je 100  $\mu\text{l}$  der Bindungslösung in einzelnen Wells, erhielten diese eine hohe DNA-Affinität. Anschließend wurden die 100ng DNA der zum Well gehörenden Probe hinzu pipettiert (2  $\mu\text{l}$  NC mit  $c= 50\text{ng}/\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$  PC mit  $c= 50\text{ng}/\mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{l}$  Proben-DNA mit  $c= 25\text{ng}/\mu\text{l}$ ). Folgend wurden die Platten nach kurzem Schwenken für 60 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  gelagert. Nach Ablauf der 60-minütigen Inkubationszeit wurden die Wells mithilfe einer 8-Kanal-Pipette dreimal mit je 150  $\mu\text{l}$  des verdünnten Waschpuffers vertikal durch ein- und auspipettieren gewaschen.

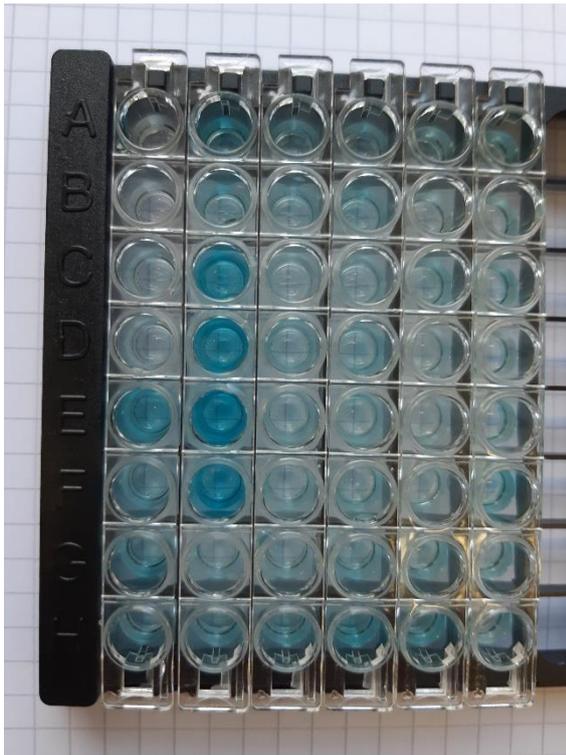
Nach dem ersten Waschschrift wurden je 50  $\mu\text{l}$  der „5-mC Detection Complex Solution“ pro Well hinzugeben, der der Darstellung bzw. der Aufsuchung der methylierten DNA-Anteile diene. Dieser Lösungskomplex ist während der letzten 10 Minuten der vorangegangenen Inkubationszeit angesetzt worden. Dafür wurden 1 $\mu\text{l}$  des gelieferten 5-mC-Antikörpers (1000X), 1  $\mu\text{l}$  SI (Signal Indicator, 1000X) und 0,5  $\mu\text{l}$  ES (Enhancer Solution) zu 1ml des verdünnten Waschpuffers hinzugegeben und gemischt.

Es folgte eine Inkubation für 50 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend ein Verwerfen der Lösung aus den Wells und ein zweiter Waschdurchgang, bei dem alle Wells fünfmal mit je 150  $\mu\text{l}$  des verdünnten Waschpuffers gewaschen wurden.

Nach Erkennung der methylierten Anteile der DNA wurde diese durch 2 aufeinanderfolgende Reaktionen farblich dargestellt:

Zunächst wurden je Well 100  $\mu\text{l}$  der Developer Solution (DS) mit einer Multipipette hinzugegeben, wodurch sich die Wells innerhalb von ca. 5 Minuten je nach Anteil der methylierten DNA-Anteile unterschiedlich stark blau färbten (s. Abb. 9). Nachdem das Well mit der 5,0% Positivkontrolle, nach eigenem subjektivem Ermessen, „tief-blau“ wurde, wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von je 100  $\mu\text{l}$  der Stop Solution (SS) beendet. Die Wells färbten sich abschließend gelblich (s. Abb. 10).

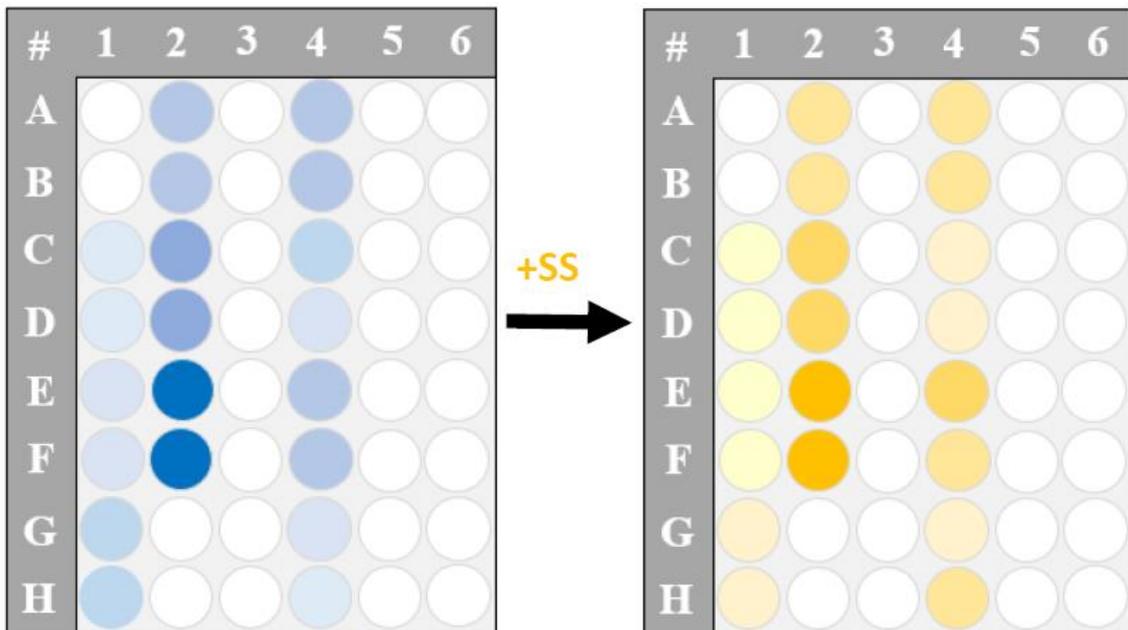
Eine erste Erfolgskontrolle des ELISAs lässt sich unter Betrachtung der PC-Reihe in den Spalten 1+2 begutachten, da die Farbintensität dort normalerweise zunehmen sollte (s. Abb.11)



**Abbildung 9: Farbreaktion DS:** Blaufärbung nach Hinzugabe der Developer Solution (DS)



**Abbildung 10: Farbreaktion SS:** Gelbfärbung nach Hinzugabe der Stop Solution (SS)



**Abbildung 11: Farbreaktion der Kontrollreihe (Spalte 1 + 2) sowie eines Farbverlaufbeispiels (4) beim Methyl-ELISA nach Hinzugabe von: DS (links) und SS (rechts)**

Nach weiteren 2-5 Minuten wurden die unterschiedlich stark ausgeprägten Farbreaktionen der einzelnen Wells gemessen. Dafür wurde die Lichtabsorption der Wells in einem Infinite 200 PRO Mikroplattenlesegerät (Tecan Group Ltd., Schweiz) bei 450nm gemessen.

Zur Auswertung und Errechnung des Methylierungsgrades der DNA siehe Ergebnissteil.

### 3.4.5.2 Methylierungs-spezifische PCR (MSP)

Die methylierungs-spezifische PCR (MSP) ist eine sensitive Methode zum Nachweis von genspezifischer Methylierung (Herman et al., 1996). Das Prinzip und der Ablauf gleichen einer Standard-PCR. Im Vergleich hierzu wird allerdings zuvor bisulfitmodifizierte DNA als Ausgangsmaterial verwendet, die durch zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen mit speziellen Primern vervielfältigt wird. Die Primer wurden so angefertigt, dass sie methylierte von unmethylierter DNA unterscheiden können.

Für beide Reaktionen wurden Primer-Paare verwendet, die dieselbe Genregion als Ziel haben. Während das Primer-Paar in der „Methylated“ (M)-Reaktion die methylierten Sequenzen der DNA zum Ziel hatte, wurden mithilfe des anderen Primer-Paares in der „Unmethylated“ (U)-Reaktion die unmethylierten Anteile vermehrt. Die PCR-Produkte konnten abschließend durch eine Gelelektrophorese (s. Kap. 3.4.2.3) ausgewertet werden.

Die verwendeten Primer (vgl. Kap. 3.1.5) zielten auf Methylierungsveränderungen des ASC-Gens ab. Das ASC-Gen (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) spielt bei der Herstellung und Aktivierung verschiedener Zytokine eine wichtige Rolle. Beispielfhaft können IL-1 $\beta$  and IL-18 genannt werden, die durch die Procaspase-1 aktiviert werden können, die zuvor selbst durch Einfluss des ASC-Gens aktiviert werden muss. Das ASC-Gen ist über verschiedene Wege an der Initiierung der angeborenen Immunantwort beteiligt. Durch eine Methylierung der CpG-Inseln wird die Expression dieses Gens herunterreguliert (Nakajima et al., 2010).

Wie vorab in der Einleitung dargelegt werden konnte, zeigte sich nach längeren Untersuchungen ein Abfall der ASC-Methylierung. Im Zusammenhang mit kurzfristigen Sportinterventionen gibt es allerdings bis heute noch keine Ergebnisse.

Die Primer wurden der Arbeit von Conway et al. entnommen, die den Methylierungsstatus dieses Gens im Zusammenhang mit dem Mammakarzinom untersuchten. „Um eine maximale Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA zu gewährleisten, wurden die Primer so angelegt, dass sich 3 potenzielle Methylierungsstellen überlappen. Das methylierte Produkt hat eine Länge von 191 bp und das unmethylierte Produkt ist 196 bp lang.(Conway et al., 2000)“. Conway et al. schlossen aus den Daten ihrer Studien, dass TMS1 (Synonym für ASC) für die Caspase-abhängige Apoptose von Bedeutung ist und dass eine Überexpression das Wachstum von Brustkrebszellen hemmt.

Die Primer wurden im lyophilisierten Zustand geliefert. Vor dem Öffnen der Aliquots wurden diese anzentrifugiert und mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt. Als Ausgangsprobe für die MSP dienten die zuvor bisulfitmodifizierten DNA-Proben. Der Methylierungszustand wurde mithilfe einer U-Reaktion (unmethylierte Reaktion) und einer M-Reaktion (methylierte Reaktion) evaluiert.

Für beide Reaktionen wurde mit dem folgenden MSP-Ansatz ( $V = 30 \mu\text{l}$ ) gearbeitet: 6 µl bisulfitmodifizierte DNA ( $c = 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) wurden zu 24 µl Mastermix M oder U pipettiert. Die beiden unterschiedlichen Mastermixe unterschieden sich lediglich durch die verwendeten Primer und setzten sich wie folgt zusammen. Pro Reaktion wurden folgende Volumina benötigt: 15µl 2xMyTaq Reaktionsmix, 1,5µl Primer U1 oder M1 (10µM), 1,5µl Primer U2 oder M2 (10µM), 6µl dest. Wasser.

Nach Vorbereitung der MSP-Ansätze in den PCR-Stripes wurden diese für 1 Minute anzentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich das komplette Probenmaterial auf dem Boden der Stripes befindet. Nach Platzierung der PCR-Stripes in den PCR-Cycler wurde in Anlehnung an die Publikation von Conway et al. folgendes Programm durchlaufen:

- 1) 95°C: 5 Min. [Start der Denaturierung]
  - 2) 95°C: 30 Sek. [Denaturierung]
  - 3) 58°C: 30 Sek. [Annealing]
  - 4) 72°C: 30 Sek. [Elongation]
  - 5) 72°C: 10 Min [Elongation]
  - 6) 4°C: Ende
- x34 [insgesamt 35 Zyklen der Schritte 2) - 4)]
- 

Im Anschluss an die MSP wurden 6 µl der MSP-Lösung mithilfe einer Gelelektrophorese in Anlehnung an das Protokoll aus Kapitel 3.4.2.3 für 60 Minuten durchgeführt.

Um die Qualität der Bisulfitmodifizierung zu bestimmen und verfälschende Artefakte in der abschließenden Gelelektrophorese abgrenzen zu können, war eine Kontrollprobe unabdinglich. Als Negativkontrolle für beide Reaktionen wurde DNA-freies aqua ad injectabilia verwendet. Als Positivkontrolle für die M-Reaktion der MSP diente die zuvor hergestellte in vitro-methylierte DNA.

### 3.5 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Software IBM SPSS Statistics Version 27 (IBM, NY, USA) durchgeführt.

#### 3.5.1 Deskriptive Statistik

Da der Methylierungsgrad der DNA und seine Veränderung durch die 2 Interventionen in Prozent angegeben wird, handelt es sich hierbei um ein metrisches Merkmal. Zur Beschreibung dieser Daten werden in Kap. 4 folgende Maßzahlen verwendet: Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum, Maximum, Spannweite. Die Abbildung der durch SPSS errechneten Maßzahlen erfolgt in Form von Boxplots (s. Abb.: 14 und 16).

#### 3.5.2 Statistische (bzw. Explorative) Datenanalyse

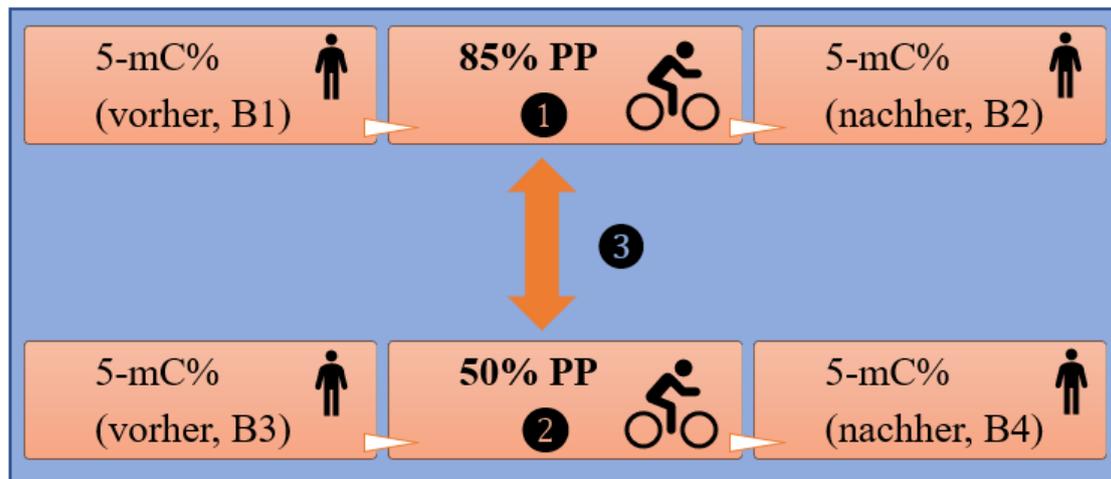
##### 3.5.2.1 Test der Normalverteilung

Zu den Tests, mit denen die Normalverteilung in SPSS ermittelt werden kann, zählen unter anderem der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest sowie der Shapiro-Wilk-Test. Da der zuerst genannte Test eine geringere power aufweist und Abweichungen in den äußeren Bereichen nicht ausreichend erkennt, wurde der Shapiro-Wilk-Test (Shapiro and Wilk, 1965) für die Prüfung der Normalverteilung ausgewählt. [S.218, Kap. 6.5.2. (Cleff, 2019)]

Unsere Nullhypothese  $H_0$  geht davon aus, dass unsere Daten normalverteilt sind. Bei einem signifikanten Shapiro-Wilk-Test ( $p\text{-Wert} \leq 0,05$ ) wird  $H_0$  verworfen und unsere Alternativhypothese  $H_1$ , nach der keine Normalverteilung vorliegt, wird angenommen.

##### 3.5.2.2 Test für zwei abhängige Stichproben

Die Fragestellung dieser Arbeit bezieht sich auf die Vergleiche des DNA-Methylierungsgrades (5mC% = Variable) vor und nach den beiden verschiedenen Interventionen sowie den Vergleich der beiden unterschiedlich starken Interventionen. Es wurden also mehrere Messwerte (= Stichproben) im Rahmen einer Messwiederholung derselben metrischen Variable, zu den verschiedenen Zeitpunkten B1-B4, am selben Probandenkollektiv ( $n = 12$ ) erhoben. Daher handelt es sich um zueinander abhängige Stichproben. Es werden also stets **2 abhängigen Stichproben** miteinander verglichen.



**Abbildung 12: Studiendesign mit Darstellung der zueinander abhängigen Stichproben, die im t-Test miteinander verglichen werden:**

- (1) Einfluss der sportlichen Intervention bei PP85% auf die DNA-Methylierung,
- (2) Einfluss der sportlichen Intervention bei PP50% auf die DNA-Methylierung,
- (3) Vergleich der verschiedenen intensiven sportlichen Intervention

Folgende Testvarianten für zwei abhängige metrische Stichproben bieten sich an:

- t-Test für abhängige Stichproben (parametrisch)
- Wilcoxon-Test (nicht-parametrisch)

Die Auswahl hängt davon ab, ob die Differenzen der beiden zu vergleichenden Stichproben normalverteilt sind. Das Vorliegen einer Normalverteilung ist eine Voraussetzung für die Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben [S.159 und S161, Kap.: 6.2.1 (Cleff, 2019)]. Ist keine Normalverteilung gegeben, eignet sich der Wilcoxon-Test besser zum Vergleich von Mittelwerten zwischen zwei Messreihen [S.164, Kap.: 6.2.2 (Cleff, 2019)].

### 3.5.2.3 Angabe der Effektstärke

Um zu untersuchen, ob und wie stark die Interventionen die DNA-Methylierung beeinflusst haben, wurde die Effektstärke nach Cohen's  $d_z$  berechnet:  $d_z = M/SD$

Die Effektstärke  $d$  wird wie folgt interpretiert (Cohen, 1988):

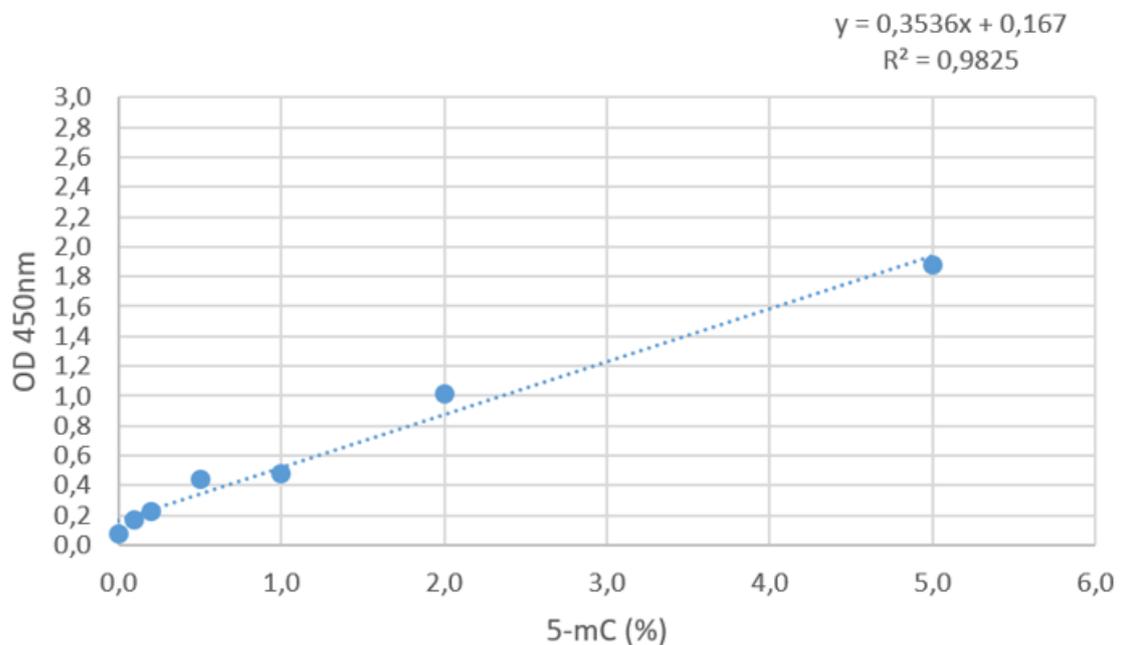
- kleiner Effekt  $|d| = 0,2$
- mittlerer Effekt  $|d| = 0,5$
- großer Effekt  $|d| = 0,8$

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Ergebnisse des Methylierungs-ELISAs – Veränderungen des DNA-Methylierungsgrades nach der sportlichen Intervention

Der fertigen ELISA-Platten wurden im Anschluss an die durchgeführte Methylierungsreaktion und die Anfärbung (s. 3.4.2) in ein Infinite 200 PRO Mikropplattenlesegerät (Tecan Group Ltd., Schweiz) gelegt. Das Gerät hat die Lichtabsorption der Wells bei 450nm gemessen und die Ergebnisse in Form einer Excel-Tabelle entsprechend der Anordnung der Wells dokumentiert.

Basierend auf der gemessenen optischen Dichte (OD) der einzelnen Proben konnte der Prozentsatz an methylierter DNA berechnet werden. Die OD-Werte der Negativkontrolle und der Positivkontroll-Reihe dienten dabei als Grundlage für die Erstellung einer Standardkurve. In dieser Standardkurve wurden die gemessenen OD-Werte für die bekannten Konzentrationspunkte an 5-Methylcytosin (NC = 0%; PC-Reihe 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2% und 5%) aufgetragen. Da jeder Konzentrationspunkt doppelt gemessen wurde, wurde jeweils der Durchschnitt der gemessenen OD verwendet.



**Abbildung 13: Beispiel einer Standardkurve der Positivkontrollreihe**  
(ermittelt aus den Messwerten der optischen Dichte für die Konzentration 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2% und 5%)

Im Anschluss an die Erstellung der Standardkurve wurde eine Regressionsgerade ( $y = mx + n$ ) angelegt. Diese Gerade beschreibt linear bestmöglich den Zusammenhang zwischen der gemessenen optischen Dichte und der DNA-Methylierung der verschiedenen Messpunkte dar und ist für die Berechnung des Methylierungsgrades der einzelnen DNA-Proben erforderlich. Die folgende Gleichung wurde verwendet, um den Prozentsatz an methylierter DNA zu berechnen:

$$5mc\% = \frac{\text{Proben OD} - \text{NC OD (Durchschnitt)}}{m * S} \times 100\%$$

$m$  = Steigung der linearen Regression,  $S$  = 100 ng (= Masse der verwendeten DNA)

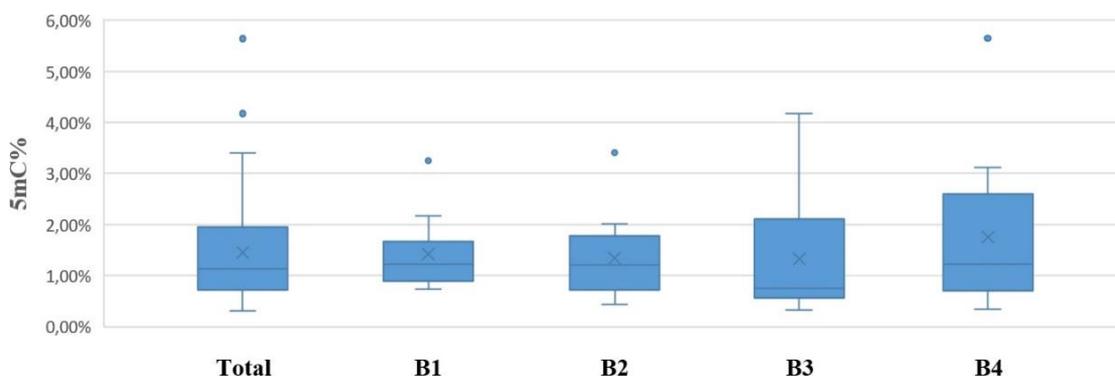
Die errechneten Werten aller einzelnen Proben wurden in Excel-Tabellen gespeichert. Da alle Werte doppelt gemessen wurden, wird der Mittelwert der Duplikate jeder Probandenprobe als endgültiges Ergebnis angesehen.

Da die Messwerte durch mehrere ELISA-Messungen an unterschiedlichen Tagen ermittelt wurden, musste vor Einbeziehung der Ergebnisse der jeweils einzelnen Messungen die Qualität der Daten eruiert werden, damit die Ergebnisse möglichst gut vergleichbar sind. Hierzu siehe Kapitel 4.2.3.

Bei der Auswertung wird nun zunächst auf den globalen DNA-Methylierungsgrad der Grundgesamtheit geblickt. Im Anschluss wird die Veränderung der DNA-Methylierung durch die verschiedenen Trainingsintensitäten betrachtet. Die Ergebnisse für die Zeitpunkte B1 und B2 werden in Bezug auf das Training bei 85% der Peak Power mit B3 und B4 bei 50% Peak Power miteinander verglichen.

#### 4.1.1 Globale DNA-Methylierung

Die globale DNA-Methylierung wurde in peripherer Blut-DNA aus Leukozyten von 12 Individuen bewertet. Die ermittelten globalen Methylierungsniveaus [5-mc%] betragen im Mittelwert 1,46 bei einer Standardabweichung von  $\pm 1,09$ . Die kleinste gemessene 5-mc-Konzentration aller einzelnen Proben (Minimum) lag bei 0,25% (gemessen an B3 von Proband YK3), der höchste gemessene einzelne Wert (Maximum) betrug 5,81% (gemessen an B4 von Proband AP12). Aus diesen beiden Werten ergibt sich eine totale Spannweite von 5,56%, wenn man die einzelnen Werte und nicht mit den Mittelwerten (vgl. Tab. 10) rechnet. Als Ausreißer zeigen sich die ermittelten Werte für die Messung B3 und B4 des Probanden AP12, der generell die höchsten DNA-Methylierungslevel aufwies. In Abbildung 14 wird die Verteilung dieser Daten im Boxplot „Total“ graphisch dargestellt.



**Abbildung 14: Graphische Datenverteilung in Form von Box Plots.**

illustrieren die Verteilung der DNA-Methylierungslevels in der Gesamtheit aller 48 Proben und zu jedem einzelnen Zeitpunkt der Intervention. [erstellt mit Microsoft Excel und zusammengefügt mit Paint (.jpg)]

Weiterhin bildet die Darstellung die Verteilung der deskriptiven Daten für die einzelnen Messzeitpunkte ab. Obwohl die Daten für die Messungen zu den Zeitpunkten B3 und B4 deutlich größere Spannweiten im Vergleich zu den Messungen B2 und B1 zeigen, liegt der Mittelwert des DNA-Methylierungsgrades für die einzelnen Zeitpunkte in einem ähnlichen Bereich (Mittelwerte:  $B1_{\text{mean}} = 1,42$ ;  $B2_{\text{mean}} = 1,34$ ;  $B3_{\text{mean}} = 1,33$ ;  $B4_{\text{mean}} = 1,75$ ). Die unterschiedlich großen Spannweiten für die einzelnen Messpunkte kommen vor allem durch die unterschiedlichen Maximalwerte zustande. Die Minima liegen für alle 4 Zeitpunkte nah beieinander (Minima:  $B1_{\text{min}} = 0,73$ ;  $B2_{\text{min}} = 0,44$ ;  $B3_{\text{min}} = 0,32$ ;  $B4_{\text{min}} = 0,35$ )

Tabelle 10 zeigt die errechneten globalen DNA-Methylierungslevel der einzelnen 12 Studienteilnehmer zu den vorab definierten Blutabnahmezeitpunkten B1-B4 (s. Kap.: 3.3, Abb. 4). Alle Werte stellen den Mittelwert aus der Duplikatmessung der jeweiligen Probe dar. Die mit einem \* gekennzeichneten Werte beziehen sich nur auf einen der zwei gemessenen Werte, da der 2. Wert am ehesten einen Messfehler darstellte und daher nicht in die Auswertung miteinbezogen wurde.

**Tabelle 10:** 5mc%-Mittelwerte (48) aller Studienteilnehmer (n = 12).

<b><u>5mc%-means</u></b>	<b>B1</b>	<b>B2 (85%)</b>	<b>B3</b>	<b>B4 (50%)</b>
<b>SM1</b>	0,83%	0,44%	0,40%	0,72%
<b>VL2</b>	0,91%	0,79%	0,70%	1,28%
<b>YK3</b>	0,73%*	0,49%	0,32%	1,16%
<b>CB4</b>	0,79%	1,07%	0,76%	1,41%
<b>BM5</b>	1,18%	0,88%	0,90%	0,83%
<b>DS6</b>	1,12%	1,46%	0,76%	0,65%
<b>BE7</b>	1,68%	1,72%	0,60%	0,62%
<b>JM8</b>	1,28%*	0,54%	0,47%	0,35%
<b>MS9</b>	1,66%	1,94%	2,54%	2,66%
<b>KV10</b>	2,17%	1,35%	2,05%	2,57%
<b>AG11</b>	1,47%	2,02%	2,28%	3,12%*
<b>AP12</b>	3,25%	3,41%	4,18%	5,65%

\* YK3 B1 nur ein Wert, da zweiter Wert [0,10%] aufgrund der fehlenden Farbreaktion wohl ein Messfehler war;

\* JM8 B1 nur ein Wert, da der zweite Wert [5,83%] als Ausreißer vermutlich ein Messfehler war,

\* AG11 B4 nur ein Wert, weil der zweite Wert [5,93%] als Ausreißer vermutlich ein Messfehler war

Beachtet man die gemessenen Methylierungslevel der einzelnen Studienteilnehmer, erkennt man, dass die Methylome individuell ausfallen. Während der DNA-Methylierungsgrad bei Proband SM1 bei allen 4 Messungen unter einem 1% lag, lagen die Messwerte für die Probanden 9-12 alle über 1%. Insbesondere bei Proband AP12 ließen sich sehr hohe Methylierungswerte feststellen.

**Tabelle 11:** Tests auf Normalverteilung für die einzelnen Interventionen (Berechnung mit SPSS);  
df = Freiheitsgrade (degrees of freedom)

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
B1	,193	12	,200*	,845	12	,032
B2	,145	12	,200*	,890	12	,119
B3	,309	12	,002	,795	12	,008
B4	,255	12	,030	,810	12	,012

\*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Nach dem Shapiro-Wilk-Test zeigte sich keine Normalverteilung für drei der vier Ansätze. Lediglich der Ansatz B2 zeigt eine Normalverteilung, da  $0,119 > p = 0,05$ .

#### 4.1.2 Veränderungen nach den unterschiedlichen Trainingsintensitäten und Vergleich der beiden Trainingsintensitäten

Anhand der gemessenen DNA-Methylierungslevel (Tab. 10) wurden die Veränderungen durch die beiden verschieden intensiven Trainingsbelastungen verglichen und es sollte die Frage beantwortet werden, ob jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten zum Zeitpunkt B1 (pre-Workout 85% PP) und B2 (post-Workout 85% PP) sowie zwischen B3 und B4 (für Training bei 50% PP) existiert. Zudem sollten die Veränderungen durch die unterschiedlich starken Trainingseinheiten miteinander verglichen werden (s. Abb.15).

Tabelle 12 zeigt die Differenz zwischen den 2 abhängigen Mittelwerten für jeden einzelnen Probanden. Die Trainingseinheit bei der ersten Intensitätsstufe (85% PP) führte bei 6 Probanden zum Abfall der DNA-Methylierung im Bereich von 0,12% - 0,82% und bei 6 Probanden zu einem Anstieg der DNA-Methylierung im Bereich von 0,04% - 0,55% (vgl. auch Abbildung 15). Im Mittel zeigte sich bei dem Training mit 85% der Peak Power ein Abfall des DNA-Methylierungsgrades um 0,08% (s. Abb. 15), bei einer Standardabweichung von  $\pm 0,43\%$ .

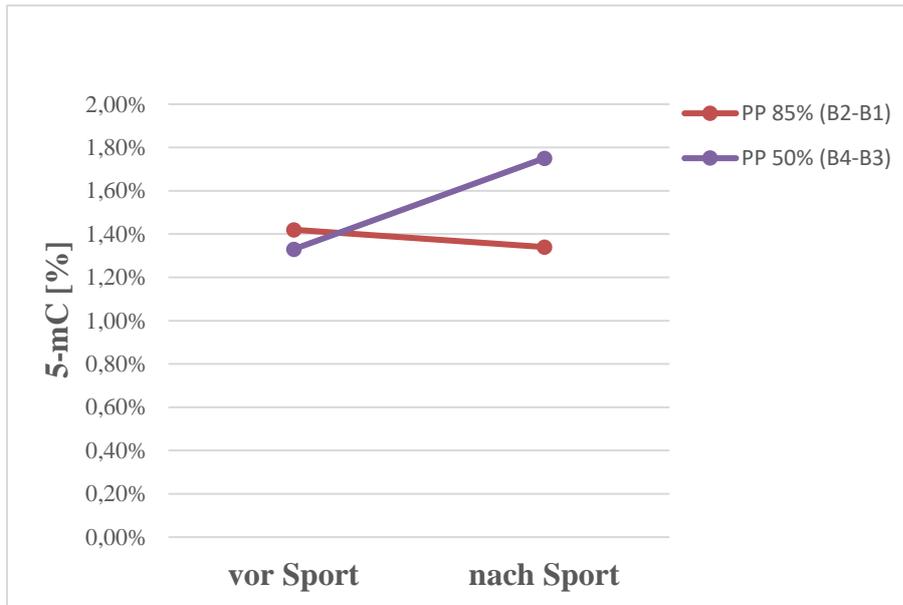
Die zweite Trainingseinheit (50% PP), die 1 Woche im Anschluss durchgeführt wurde, führte bei 3 Probanden zu einem Abfall der DNA-Methylierung von 0,07% - 0,12% während es bei 9 Probanden zu einem Anstieg im Bereich von 0,02% - 0,84% kam. Im Mittel zeigte sich bei

dem Training mit 50% der Peak Power ein Anstieg des DNA-Methylierungsgrades um 0,42 %, bei einer Standardabweichung von  $\pm 0,48\%$ .

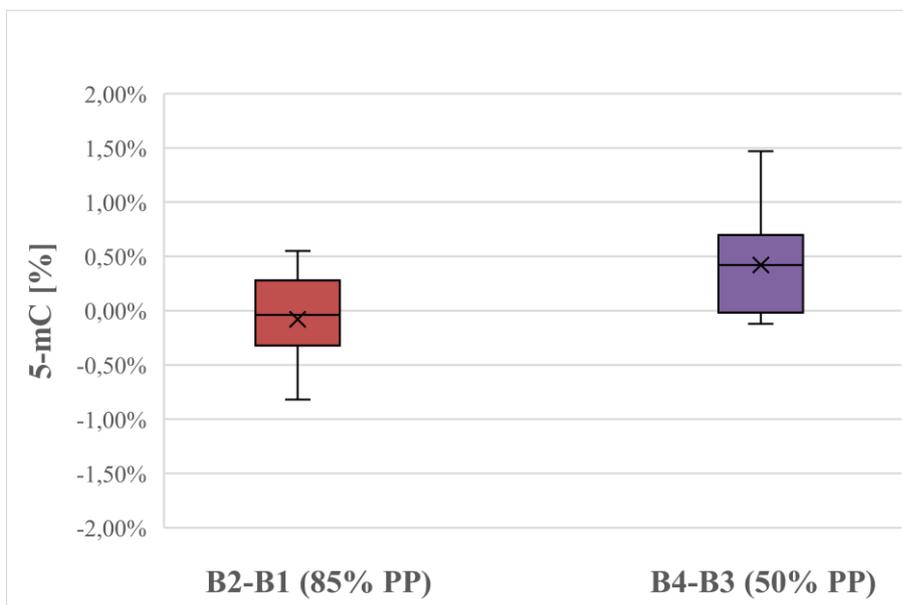
Vergleicht man die beiden verschiedenen Trainingseinheiten miteinander, zeigt sich, dass die niedrige Belastungsintensität bei 9 der 12 Probanden sowie im Durchschnitt einen stärker methylierenden Einfluss auf die DNA hatte.

**Tabelle 12:** Veränderung des DNA-Methylierungslevel durch die unterschiedlich intensiven Trainingsintensitäten (85% und 50% Peak Power)

<b>5mc%-means</b>	<b>B2 -B1</b> [85% Peak Power]	<b>B4 -B3</b> [50% Peak Power]	<b>Differenz</b> <b>50% PP – 85% PP</b>
<b>SM1</b>	- 0,39%	+ 0,32%	+ 0,71%
<b>VL2</b>	- 0,12%	+ 0,58%	+ 0,70%
<b>YK3</b>	- 0,24%	+ 0,84%	+ 1,08%
<b>CB4</b>	+ 0,28%	+ 0,65%	+ 0,37%
<b>BM5</b>	- 0,30%	- 0,07%	+ 0,23%
<b>DS6</b>	+ 0,34%	- 0,11%	- 0,45%
<b>BE7</b>	+0,04%	+ 0,02%	- 0,02%
<b>JM8</b>	- 0,74%	- 0,12%	+ 0,62%
<b>MS9</b>	+ 0,28%	+ 0,12%	- 0,16%
<b>KV10</b>	- 0,82%	+ 0,52%	+ 1,34%
<b>AG11</b>	+ 0,55%	+ 0,84%	+ 0,29%
<b>AP12</b>	+ 0,16%	+ 1,47%	+ 1,31%
<b>Gesamt</b> <b>(Differenz der</b> <b>Mittelwerte)</b>	(1,34% - 1,42% =) -0,08%	(1,75% - 1,33% =) + 0,42%	+ 0,34%



**Abbildung 15:**  
Vergleich der prozentualen Veränderung des durchschnittlichen DNA-Methylierungsgrades vor und nach sportlicher Intervention



**Abbildung 16:**  
Verteilung der Differenzen der DNA-Methylierungslevel vor und nach der jeweiligen Trainingsbelastung.

Für die beiden Differenzen B2-B1 (85% PP) und B4-B3 (50% PP), die die Auswirkung der unterschiedlich intensiven Trainings widerspiegeln, zeigen sich jeweils als normalverteilt, da beide Signifikanzwerte  $> 0,05$  sind (s. Tab. 13: 85% PP:  $= 0,668 > 0,05$ ; 50% PP:  $0,258 > 0,05$ ). Für die Differenz der Differenzen  $[(B4-B3) - (B2-B1)]$ , die den Vergleich der beiden Belastungsintensitäten darstellt, zeigt sich ebenfalls eine Normalverteilung, da  $0,859 > 0,05$ .

**Tabelle 13:** Tests auf Normalverteilung für die Differenzen (Berechnung mit SPSS);  
df = Freiheitsgrade (degrees of freedom)

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
B2-B1 (85%PP)	,131	12	,200*	,952	12	<b>,668</b>
B4-B3 (50%PP)	,149	12	,200*	,916	12	<b>,258</b>
50%PP- 85%PP	,107	12	,200*	,966	12	<b>,859</b>

\*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Es ist zwar keine Normalverteilung für die einzelnen Messpunkte B1-B4 gegeben, da sich aber bei den Differenzen „B2-B1“ (85% PP), „B4-B3“ (85% PP), „50% PP-85%PP“ eine Normalverteilung zeigt und keine Ausreißer vorhanden sind, wird zur Auswertung der Ergebnisse der t-Test für abhängige Stichproben (s. Tab 14) verwendet. Zur Auswahl der Tests wird auf Kap 3.5 verwiesen.

Folgende Hypothesen wurden für den zweiseitigen Test zum Vergleich der Differenzen formuliert und am Beispiel der Wirkung bei 85% PP, also dem Vergleich der Werte zum Zeitpunkt B2 und B1, erörtert:

Unsere Nullhypothese H<sub>0</sub> besagt, dass es keinen Unterschied zwischen der Differenz der zu vergleichenden Stichproben gibt; Beispiel: H<sub>0</sub>: B<sub>2</sub>-B<sub>1</sub> = 0. Die Alternativhypothese H<sub>1</sub> besagt, dass sich beide Stichproben voneinander unterscheiden; Beispiel: B<sub>2</sub>-B<sub>1</sub> ≠ 0.

Bei einem  $p < 0,05$  wird von signifikanten Unterschieden ausgegangen.

**Tabelle 14:** Test bei gepaarten Stichproben

	Gepaarte Differenzen					T	df	Signifikanz (2-seitig)
	MW	SD	Standard- fehler des MW	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Unterer Wert	Oberer Wert			
(1) B2 – B1	-,0800	,4327	,1249	-,3549	,1949	<b>-,640</b>	<b>11</b>	<b>,535</b>
(2) B4 – B3	,4217	,4877	,1408	,1118	,7315	<b>2,995</b>	<b>11</b>	<b>,012</b>
(3) (2) – (1)	,5017	,5672	,1637	,1413	,8621	<b>3,064</b>	<b>11</b>	<b>,011</b>

Aus dem Test und der zusätzlichen Berechnung der Effektstärke  $d$  lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- (1) Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten für den DNA-Methylierungsgrad vor und nach dem Ergometer-Workout bei 85% der Peak Power,  $t(11) = -0,640$ ,  $p = 0,535$ . ( $d = -0,1849$ ).
- (2) Die Werte für den DNA-Methylierungsgrad waren nach dem Workout bei 50% signifikant höher als vorher,  $t(11) = 2,995$ ,  $p = 0,012$ ,  $d = 0,8647$ . Nach Cohens zeigt sich ein starker Effekt der moderaten Belastung auf die DNA-Methylierung.
- (3) Die Werte für den DNA-Methylierungsgrad sind nach einem Workout bei 50% PP im Vergleich zum Workout bei 85% PP signifikant höher,  $t(11) = 3,064$ ,  $p = 0,011$ ,  $d = 0,8845$

#### 4.1.3 Kriterien zur Qualitätskontrolle eines einzeln durchgeführten ELISAs

##### 4.1.3.1 Das Bestimmtheitsmaß $R^2$

Die einzelnen Proben wurden durch mehrere ELISAs gemessen, da ein ELISA maximal 41 Proben im Duplikat messen kann. Allerdings wurden nicht alle durchgeführten ELISA-Messungen in die Auswertung miteinbezogen. Da jeder einzeln durchgeführte ELISA für sich genommen von den anderen Messungen unabhängig zu werten ist und sich daher auch unterschiedlich hohe Werte für dieselbe Probe bei mehrfacher Durchführung eines ELISA-Versuches zeigten, musste ein Parameter gefunden werden, der die Qualität eines einzeln durchgeführten ELISAs beurteilt und somit die Wertigkeit der Messungen prüft.

Ein Parameter, der bei allen ELISA-Messungen aus denselben „genormten“ Proben abgeleitet wurde und somit verglichen werden konnte, war das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ . Es wurde mithilfe von Microsoft Excel ermittelt, indem man eine Regressionsgerade zu den Werten der Standardreihe erstellt hat und diese an die Standardkurve angelegt hat (vgl. Abb.: 13).

Das Bestimmtheitsmaß liegt immer im Bereich zwischen 0 und 1 und stellt das Gütemaß für die Regressionsgerade und damit auch für die Messung unserer Standardreihe dar, die bei der Berechnung der Methylierungslevel für die einzelnen Proben als Vergleich fungiert.

Da die gemessene optische Dichte mit steigendem DNA-Methylierungsgrad der Positivkontrollreihe linear zunehmen sollte, ergibt sich für das Bestimmtheitsmaß und die Qualität der Messung der Standardreihe folgendes: Je größer der Wert des Bestimmtheitsmaßes, desto besser bildet der durchgeführte ELISA die DNA-Methylierung der gemessenen Proben ab (vgl. auch Kap. 4.1.3.2). Abbildung 13 demonstriert daher aufgrund des  $R^2$  von 0,9825 eine fast ideale Regression.

Aufgrund dieser Tatsache und um die repräsentativste Entwicklung der DNA-Methylierung in Zusammenhang mit der sportlichen Intervention sicherzustellen, wurden nur Messwerte zur Auswertung verwendet, die aus einem ELISA stammten, indem  $R^2 \geq 0,8$  war.

#### 4.1.3.2 Intra-Assay des ELISAs

Um zu überprüfen, ob und inwiefern die Ergebnisse einer Probe in verschiedenen Wells vergleichbar sind, wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Zur Durchführung dieser Messung wurde eine vorher zufällig ausgewählte Probe innerhalb eines ELISAs achtmal anstatt nur zweimal gemessen. Da bei der Erhebung der ersten Intra-Assay-Messung das  $R^2 < 0,8$  war, wurde ein zweiter Intra-Assay bei einem anderen ELISA mit einer anderen zufällig ausgewählten Probe angelegt. Für diese Messung war die Voraussetzung von  $R^2 \geq 0,8$  gegeben. Die Ergebnisse dieser beiden Intra-Assay-Messungen aus je achtmal derselben Probe werden in Tabelle 12 angegeben. Um die Wertigkeit eines einzelnen Intra-Assays anzugeben, betrachtet man die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten.

Vergleicht man die 2 Intra-Assay-Messungen miteinander, zeigt sich, dass die SD und der CV% in der 2. Messung ungefähr nur halb so groß sind, während das Bestimmtheitsmaß mehr als doppelt so hoch ist. Je näher das Bestimmtheitsmaß gegen 1 geht, desto kleiner scheint der Variationskoeffizient als Ausdruck für die relative Standardabweichung zu sein und umso präziser ist die ELISA-Messung. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Grund dafür, warum nur Messungen mit einem hohen  $R^2$  als repräsentativ angesehen wurden.

**Tabelle 15:** Intra-Assay-Messungen aus je 8 Messungen zweier Proben in unterschiedlichen ELISAs

	Intra-Assay 1	Intra-Assay 2
<b>Bestimmtheitsmaß (R<sup>2</sup>)</b>	<b>0,4769</b>	<b>0,9825</b>
Mittelwert (5-mC%)	2,68%	3,04%
<b>Standardabweichung (SD)</b>	<b>0,498%</b>	<b>0,289%</b>
<b>Variationskoeffizient (CV%)</b>	<b>18,61%</b>	<b>9,484%</b>

#### 4.1.4 Umgang mit Ausreißern

Bei der Auswertung dieser Ergebnisse galt es zwei unterschiedliche Formen von Ausreißern voneinander abzugrenzen und den Umgang mit ihnen zu bestimmen:

Zunächst gab es die Ausreißer betrachtet auf jeden einzelnen Probanden, d.h. die gemessenen Werte, die nicht zu den anderen Werten des Patienten passen.

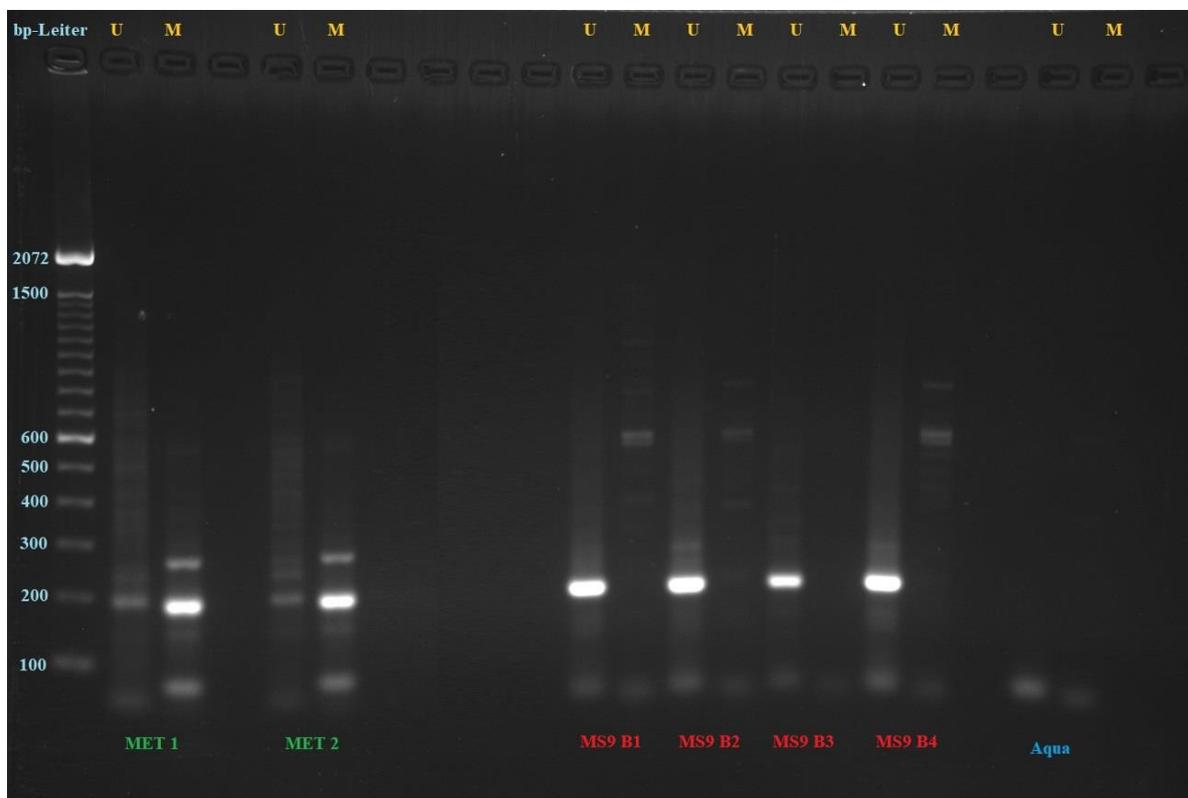
Ausgeschlossen wurden Werte aus zwei Gründen:

- 1) Werte, die eine Abweichung von  $\geq 2 \text{ SD}_{\text{total}}$  ( $\pm 1,09$ ) vom zweithöchsten gemessenen Wert zeigten, wurden verworfen und als Messfehler gedeutet. Dies fand statt bei den folgenden 2 Werten (vgl. Tab.: 10):
  - Der Wert 5,83% für die Probe B1 des Probanden JM8 wurde als Messfehler angesehen, da dieser Wert  $\geq 1,28\% + 2 \text{ SD}$ .
  - Der Wert 5,93% für die Probe B1 des Probanden AG11 wurde als Messfehler angesehen, da dieser Wert  $\geq 3,12\% + 2 \text{ SD}$ .
- 2) Da der gemessene Methylierungsgrad nicht negativ werden kann, lässt sich der Umgang aus 1) nicht für niedrige Werte anwenden. Niedrige Werte wurden ausgeschlossen, wenn keine Farbreaktion im Well stattgefunden hat.
  - Der Wert 0,10% für die Probe B1 des Probanden YK3 wurde als Messfehler angesehen, da in dem Well keinerlei Farbreaktion stattgefunden.

Zum anderen gab es noch die Ausreißer, die sich ergaben, wenn man alle Messungen zu den einzelnen Interventionszeitpunkten in Relation setzt (vgl.: Abb.: 14). Da sich die unterschiedlichen DNA-Methylierungsgrade zwischen den einzelnen Proben teilweise sehr stark unterschieden, wurden einzelne Werte von Auswertung nicht ausgeschlossen, nur weil sie in Relation zu den anderen Probanden als Ausreißer angesehen werden mussten.

## 4.2 Methylierungs-spezifische PCR

Durch die MSP und die anschließende Auswertung mithilfe eines Agarose-Gels konnten keine Veränderungen der ASC-Methylierung durch die Sportinterventionen dargestellt werden. Die Positivkontrolle in Form der in-vitro-methylierten DNA zeigte nach Conway et al. vor allem die zu erwartende Bande bei ca. 200 bp (nach Conway et al. bei 191 bp). Im Vergleich hierzu zeigten die untersuchten Probandenproben (in Abb. 17 am Beispiel des Probanden MS9) kein methyliertes Produkt nach den beiden unterschiedlichen Intensitäten. Die MSP zeigte an den Probandenproben insbesondere ein unmethyliertes Produkt mit einer Länge von ca. 200 bp (nach Conway et al. ist das unmethylierte Produkt dieser Reaktion 191 bp lang).



**Abbildung 17: Beispiel einer Gelelektrophorese im Anschluss an eine Methylierungs-spezifische PCR.** Von links nach rechts: 100 bp DNA Ladder (in türkis), es folgen 2 Messungen der Positivkontrolle mit in-vitro-methylierter DNA (MET 1 und 2 in grün), im Anschluss (in rot) die Proben des Probanden MS9 mit den 4 Blutabnahmen und abschließend die Kontrolle mit Aqua ad aqua ad injectabilia (in blau). Jede Probe wurde als Paar gemessen (U = unmethylierte Reaktion, M = Methylierte Reaktion)

Die weiterhin auftauchenden unspezifischen Banden wurden nicht weiter untersucht, da sich diese Untersuchung auf das ASC-Gen nach den Angaben von Conway et al. konzentrierte.

## 5 DISKUSSION

Die Messergebnisse zeigen, dass die durchgeführte Intervention akut zu einer Veränderung des globalen Methylierungsstatus in den Leukozyten der Teilnehmer geführt hat. Bezogen auf das Teilnehmerkollektiv zeigte die intensivere Belastungsstufe (85% PP) keine signifikanten Änderungen des Methylierungsstatus, wohingegen in den Leukozyten der 12 Probanden nach der moderaten Belastung (50% PP) eine signifikante Veränderung mithilfe des ELISAs gemessen werden konnte. Bei 75% der Probanden wurde ein Anstieg des Methylierungsgrades nachgewiesen. Die gemessenen Unterschiede der DNA-Methylierung fielen beim Vergleich der einzelnen Studienteilnehmer unterschiedlich stark aus. Diese Individualität der Studienergebnisse zeigt sich anhand der großen Spannweite der Methylierungsgrade wenn man alle verschiedenen Proben betrachtet. Die globale DNA-Methylierung zeigte Werte von 0,25% - 5,81%. Im Gegensatz dazu konnte die MSP keine Veränderungen am ASC-Gen nachweisen.

### 5.1 Interpretation und Integration der Ergebnisse in den bisherigen Wissensstand

Auch wenn aufgrund der geringen Stichprobenanzahl und der Selektion des Probandenkollektivs keine repräsentativen Schlussfolgerungen für die Gesamtpopulation gezogen werden können und diese Pilotstudie eher als Trend betrachtet werden sollte, kann man unter Einbeziehung des theoretischen Hintergrunds einige Hinweise zur akuten Anpassung der DNA-Methylierung in Leukozyten nach einer sportlichen Intervention finden. Zudem lassen sich Verbesserungsvorschläge für zukünftige Forschungen zu diesem Zusammenhang ableiten.

Der ermittelte Anstieg der globalen DNA-Methylierung im Zuge der moderaten Belastung könnte ein Hinweis dafür sein, dass bereits eine akute Trainingseinheit auf molekularer Ebene krebspräventiv wirkt, da eine globale Hypomethylierung als Marker in der Tumorgenese (vgl. Kap 1.3.1) und im Alterungsprozess (vgl. Fraga et al., 2005) bekannt ist.

Diese Aussage kann aktuell nicht durch den Vergleich zu anderen Studien bekräftigt werden, da die einzige vergleichbare Arbeit von Robson-Ansley (2014) an 8 jungen erwachsenen Männern konnte im Rahmen einer akuten Ausdauerintervention keine signifikanten Veränderungen des Methyloms zeigen (Robson-Ansley et al., 2014). Während es bezüglich der DNA-Methylierung noch keine signifikanten Ergebnisse gibt, konnten Radom-Aizek et al. Veränderungen an mehreren micro-RNAs nach einer 20-minütigen Intervention auf dem Fahrradergometer zeigen (Radom-Aizik et al., 2012). Diese Pilotstudie liefert somit einen weiteren Hinweis dafür, dass eine alleinige akute Intervention das humane Epigenom verändert.

Man sollte sowohl die nicht-signifikanten Ergebnisse anderer Studien als auch die hier dargestellte nicht signifikante Veränderung der DNA-Methylierung in Folge der hoch-intensiven Belastungsstufe nicht ausblenden, weil aufgrund der geringeren Teilnehmerzahlen in allen Kurzzeitstudien die Möglichkeit eines  $\beta$ -Fehlers besteht. Die Annahme, dass auch eine Belastung von 85% PP signifikant messbare Ergebnisse liefert, darf vor diesem Hintergrund nicht verworfen werden. Um in Zukunft repräsentativere Ergebnisse zu erzielen, müssen Studien an einer deutlich größeren Stichprobe durchgeführt werden.

Im Vergleich schien die moderate Belastungsstufe einen geringfügig stärkeren Einfluss auf die DNA-Methylierung zu haben (vgl. Abb. 15). Dies bestärkt die aktuelle Hypothese der Wissenschaft, dass auch die Intensität der körperlichen Aktivität eine Rolle bei der Beeinflussung epigenetischer Regulation zu spielen scheint. In der Arbeit von Barres et al. (2012) wurde zwar postuliert, dass die Veränderung der DNA-Methylierung in einem proportionalen Verhältnis zur Belastungsintensität steht (Barres et al., 2012). Allerdings gehen ihre Studien auf die Untersuchung von Muskelgewebe zurück. Aufgrund des unterschiedlichen Ausgangsgewebes kann man die Veränderungen der DNA-Methylierung nicht vergleichen, nachdem erläutert wurde, dass die Adaptation der DNA-Methylierung je nach Gewebe unterschiedlich ausfällt.

Die Ausprägung der Veränderungen stellte sich an jedem Probanden anders dar, was sich an den unterschiedlich hohen Ausgangsniveaus der DNA-Methylierung zeigte (vgl. Tab. 10). Dementsprechend schwankten auch die absoluten Veränderungen der Prozentangaben. Am deutlichsten hebt sich Proband AP12 ab. Sein Ausgangsstand (3,25% 5-mC) war höher als die gemessenen Werte der anderen Probanden zu allen 4 Blutabnahmezeiten.

Auch in anderen Studien, die den hier verwendeten ELISA mit Blut als Ausgangsstoff für die DNA-Isolierung verwendet haben, konnten derart große Unterschiede ermittelt werden.

In einer Studie zum Prader-Willi-Syndrom an 91 Erwachsenen wurden globale DNA-Methylierungslevel von 0.06–5.6% ( $2.2 \pm 1.1\%$ ) angegeben (Manzardo and Butler, 2016). Toghil et al. (2018) untersuchten mit dem ELISA die globale DNA-Methylierung in aus Blut isolierter DNA von 185 Personen (Patienten mit einem abdominalen Aortenaneurysma und Kontrollen). Unter Einbeziehung aller Proben (Kontrolle, kleine AAA und große AAA) bestimmten Sie globale DNA-Methylierungsniveaus von  $\approx 0,1 - 3,5\%$  und zeigten eine lineare Beziehung zwischen AAA-Größe und globaler DNA-Methylierung (Toghil et al., 2018).

Dementsprechend scheint nicht der verwendete Methyl-ELISA für die große Spannweite der gemessenen DNA-Methylierungslevel verantwortlich zu sein.

Ein Problem aller Studien zum Zusammenhang zwischen Sport und körperlicher Aktivität besteht durch die Vielzahl an Confoundern, wie z.B. Geschlecht, Alter, BMI, Lebensstilfaktoren (Nikotinkonsum, Ernährung, etc.) und verschiedene Umweltfaktoren, die ebenfalls einen Effekt auf das Epigenom zu scheinen haben (Alegría-Torres et al., 2011).

Anhand der Ein- und Ausschlussfaktoren (vgl. Kap. 3.2.1 + 3.2.2) konnten einige Faktoren wie das Alter angeglichen werden. Jedoch gibt es aufgrund der unterschiedlichen Lebensweisen zahlreiche weitere Faktoren, die die DNA-Methylierung beeinflussen könnten und somit die Auswertung der Ergebnisse behindern. Insbesondere die unterschiedliche Ernährung (Anderson et al., 2012) kann die globale DNA-Methylierung verändern und so den Effekt von körperlicher Aktivität verschleiern. Um den Einfluss der Lebensstilfaktoren zu minimieren, müssten die Tagesabläufe der Studienteilnehmer angeglichen werden. Diese Maßnahme ist schwer umsetzbar, da ein größerer Interventionszeitraum mit einer sinkenden Compliance der Teilnehmer einhergehen würde. Es ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Ausgangswerte aufgrund der Individualität jedes Studienteilnehmers zustande kommen. Da aber keiner der Probanden seinen Lebensstil innerhalb des Interventionszeitraums maßgeblich verändert hat, kann man den Einfluss dieses Faktors im Hinblick auf die nachgewiesenen Veränderungen der Methylierungslevel ausklammern.

Die Ergebnisse dieser Pilotstudie unterstützen die bis dato bestehenden Hinweisen der aktuellen Forschungslage, nach der neben längerer körperlicher Aktivität, für die die Studienlage ausgereifter ist, auch akute Sportinterventionen das humane Epigenom verändern können. Vor dem Hintergrund einiger Schwächen, wie die kleine Probandenanzahl (s. Kap 5.2.), die sowohl diese Pilotstudie als auch die anderen veröffentlichten Kurzzeitstudien auszeichnet, müssen alle bisher getroffenen Aussagen über die Auswirkungen einzelner sportlicher Interventionen auf epigenetische Modifikationen mit Vorsicht betrachtet werden. Um die vermuteten positiven Einflüsse auf die Prävention von Tumorerkrankungen und den Alterungsprozess zu verifizieren, werden weitere Studien benötigt, die die bisher ermittelten Limitationen und eine möglichst große Anzahl an Confoundern ausschließen. Im Anschluss an die Methodenkritik folgt hierzu ein kurzes Kapitel, das Empfehlungen für zukünftige Arbeiten erörtert.

## 5.2 Bewertung der Methodik

In der vorliegenden Pilotstudie wurde unter Einbeziehung von sportlichen Studenten die Veränderung der globalen DNA-Methylierung in Leukozyten in Folge einer akuten Sportintervention bei zwei verschiedenen Belastungsintensitäten untersucht. Das hierfür Blut wurde den Probanden jeweils eine Stunde vor und nach der jeweiligen Intervention entnommen.

### 5.2.1 Stärken und Vorteile der Studie

Während im Muskelgewebe, aber auch im Fettgewebe, erste Veränderungen der DNA-Methylierung aufgrund einer akuten sportlichen Belastung nachgewiesen wurden, gibt es momentan keine signifikanten Beobachtungen im peripheren Blut. Vor dem Hintergrund der aktuell kleinen Studienlage stellt diese Untersuchung einen Versuch dar, einen Einblick über die akuten Anpassungsmöglichkeiten des humanen Epigenoms in Leukozyten zu gewinnen.

Der zur Messung der DNA-Methylierung verwendete Methyl-ELISA der Firma EpiGentek wurde in diesem Zusammenhang das erste Mal verwendet. Die Vorteile des Untersuchungsverfahrens sind zum einen, dass er innerhalb von wenigen Stunden vergleichbare Ergebnisse liefert und zum anderen, dass er keine Kreuzreaktion mit Hydroxymethylcytosin zeigt und somit sehr spezifisch ist. Des Weiteren lässt der Intra-Assay, unter der Voraussetzung eines Regressionsgrades nahe 1, auf eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse schließen, da der Variationskoeffizient dann unter 10% lag (vgl. Tab. 15) und die Wahrscheinlichkeit für Messfehler durch die Duplikatmessung jeder einzelnen Probe vermindert wurde. Die vorherige Qualitätskontrolle der DNA mittels Spektrophotometrie und Gelelektrophorese verhinderte, dass es aufgrund von zu geringen DNA-Konzentrationen oder durch eine DNA-Fragmentierung zu einer Verfälschung der ELISA-Untersuchung kam.

Mit der MSP wurde die Untersuchung des globalen Methylierungsstatus zudem durch eine hoch-sensitive und genspezifische Untersuchung ergänzt (Herman et al., 1996).

Neben dem verwendeten ELISA stellt auch das von uns entwickelte Studienprotokoll und die Einstellung der Belastungsintensität anhand der Peak Power eine Neuerung im Zusammenhang mit epigenetischer Forschung dar. Bislang wurde die Belastung insbesondere in Relation zur maximalen Sauerstoffaufnahme oder der maximalen Herzfrequenz eingestellt. Mit dem hier verwendeten Prinzip lässt sich die Belastung für ein Training auf einem Fahrradergometer individuell anpassen. Denn neben der kardiovaskulären Ausdauer, die maßgebend für die  $VO_{2max}$  und die  $HF_{max}$  ist, spielt auch die persönliche Performance und die Art der Belastung

eine wichtige Rolle und wird durch die Messung der Peak Power speziell für das Radfahren abgebildet, das vor allem die untere Extremität belastet. Da die eingeschlossenen Probanden zum Teil unterschiedliche Hauptsportarten betreiben, hilft diese Methodik dabei die darauf zurückführende unterschiedliche, sportartspezifische Ausdauerkapazität der Beinmuskulatur miteinzubeziehen.

Diese Pilotstudie unterscheidet sich deutlich von den bislang durchgeführten Untersuchungen, da sowohl ein anderer Parameter zur Evaluierung der Belastungsintensität als auch ein anderer Test zur Beurteilung des globalen Methylierungsstatus verwendet wurde.

### 5.2.2 Schwächen und Nachteile der Studie

Auch wenn das hier dargestellte Studiendesign innovativ ist und im Vorfeld einige Stärken aufwies, zeigten sich nach der Durchführung und Auswertung aller Studienergebnisse auch einige Schwächen. Aufgrund dieser Limitationen dürfen die Studienergebnisse und der Einfluss der sportlichen Intervention auf die DNA-Methylierung in den Leukozyten nicht überinterpretiert werden, da man davon ausgehen muss, dass die nachgewiesenen Veränderungen des Methyloms nicht allein auf die akute Belastung zurückzuführen ist.

Die Aussagefähigkeit dieser Pilotstudie und auch der zuvor veröffentlichten Kurzzeitstudien, die alle weniger als 20 Probanden eingeschlossen haben, ist aufgrund der kleinen Fallzahl eingeschränkt, weil hieraus Auswertungsfehler resultieren könnten. Die kleine Studienpopulation wurde aus verschiedenen Gründen toleriert. Zunächst zielte diese Pilotstudie auf die Etablierung und Prüfung des Methyl-ELISAs im Zusammenhang mit sportlichen Interventionen ab. Desweiteren reichte das finanzielle Budget nicht aus, um den Studienteilnehmern eine Aufwandsentschädigung auszuzahlen. Dies führte dazu, dass sich trotz des großen Interesses an diesem Pilotprojekt nur wenige Studenten an der Durchführung beteiligen wollten. Zudem reicht die geringe Fallzahl aus um größere Effekte ( $d > 0,8$ ) nachzuweisen. Für den Nachweis kleiner Effekte ( $d < 0,2$ ) bestand zu diesem Zeitpunkt noch nicht die Notwendigkeit und hierfür hätte deutlich mehr Probanden rekrutieren müssen. Sowohl der Aufwand als auch die Kosten stehen vor dem Hintergrund, dass man die Aussagekraft des ELISAs im Anschluss ein akute Sporttrainings vorab nicht einschätzen konnte, in einem Missverhältnis.

Hinzu kommt, dass zwar alle Probanden mit einem Sportpensum von über 150 Minuten pro Woche als sportlich zu definieren sind, aber im Vergleich untereinander teilweise große Differenzen aufwiesen. Probandin 11 macht durchschnittlich 600 Minuten Sport und hebt sich deutlich vom Durchschnitt (MW: 327,5 Min./Woche) ab. Sie zeigt zwar die zweithöchsten DNA-Methylierungslevel, aber da Probandin 12 (150 Min. Sport/Woche) noch höhere Werte aufweist, lässt sich erstmal kein positiver Zusammenhang zwischen der Menge an Sport und dem DNA-Methylierungsgrad vermuten. Um eine Korrelation zwischen Sportdauer pro Woche und DNA-Methylierungslevel herzustellen, könnte man in einer folgenden Studie Blutproben von Teilnehmern untersuchen, die optimalerweise alle dieselbe Sportart betreiben und sich lediglich anhand der durchschnittlichen Wochenzeit in verschiedene Gruppen einteilen lassen.

Ein weiterer Schwachpunkt dieser Untersuchung ist, dass keine Kontrollgruppe, in Form von untrainierten (< 150 Minuten Sport/Woche) jungen Erwachsenen, miteinbezogen wurde. Es bietet sich an, dieselbe Intervention an einer solchen Gruppe nach Optimierung des Verfahrens durchzuführen. Denn in Messungen am subkutanen Fettgewebe (vgl. Fabre et al. 2018) wurde gezeigt, dass auch der Trainingszustand der Probanden eine Auswirkung auf die Anpassung der DNA-Methylierung zu haben scheint. Daher wären weitere Untersuchungen an nicht trainierten Probanden interessant, um darzustellen, in welchem Ausmaß sich die ungewohnte sportliche Belastung bei Ihnen auf die Methylierungslevel der DNA auswirkt. Diese Probandengruppe hätte keine bereits vorhandene Anpassung an sportliche Betätigung und man kann erwarten, dass der akute Effekt durch die Intervention stärker ausfällt als an den hier eingeschlossenen sportlichen Probanden.

Bezüglich der Laborverfahren muss zunächst auf Ungenauigkeiten bei der Durchführung und der Auswertung des Methyl-ELISAs eingegangen werden, wodurch die Methylierungswerte von Messung zu Messung leicht variierten. In aller erster Linie ist die Vorbereitung und Messung der Positivkontrollreihe zu nennen, die über die Steigung der linearen Regression ihrer Standardkurve (vgl. Abb. 13) einen Anteil der Formel zur Berechnung des DNA-Methylierungsgrades (s. Kap. 4.1.) ausmacht. Zudem ist die Präzision eines ELISAs, die auf den Intra-Assay zurückgeht (s. Kap. 4.1.3.), von Bestimmungskoeffizienten  $R^2$  und somit auch von der Kontrollreihe abhängig. Mit einem  $R^2 > 0,8$  wurde zwar ein Maßstab für möglichst präzise ELISA-Messungen gesetzt, dennoch besteht in dem erlaubten Bereich von 0,8-1 noch ein Spielraum für kleine Abweichungen der Genauigkeit der Methylierungsangaben.

Folgender Punkt kommt hinzu: Selbst bei einer annähernd perfekten Standardkurve ( $R^2$  nahe 1) weichen Messungen von den gleichen Proben um ca. 10% ( $CV\% = 9,484\%$  bei  $R^2$  von 0,9825, s. Tab. 15) ab. Kleine Veränderungen, wie sie insbesondere bei Proband BE7 festzustellen sind (B1: 1,68% → 85% PP → B2: 1,72% | B3: 0,60% → 50% PP → B4: 0,62%), lassen sich aufgrund des bestehenden Variationsgrades nicht bewerten.

Ein weiterer Kritikpunkt war die Farbreaktion des ELISAs in den Wells: Die Blaufärbung der Wells (Enzymreaktion durch die Developer Solution, vgl. Abb. 9) sollte durch die Zugabe der Stop Solution an dem Zeitpunkt gestoppt werden, „wenn die Farbe in den 5% PC-Vertiefungen tiefblau wird“ (Schritt 4e, Seite 8 „MethylFlash™ Globale DNA-Methylierung 5 mC ELISA Easy Kit [Basiskatalog # P-1030]). Diese Anweisung ist nicht spezifisch, da die Zeit zum Stoppen der Enzymreaktionen mit der Stopplösung von der Schätzung der Farbentwicklung (blau) in der 5% PC-Vertiefung abhängt. Die Aufgabe für den Untersucher besteht darin, abzuschätzen, wann die 5% PC-Vertiefungen tiefblau sind. Diese subjektive Bewertung ist also untersucherabhängig und kann zu Abweichungen im Interassay führen. Wir fügten die Stopplösung 5 Minuten +/- 30 Sekunden nach Zugabe der Entwicklerlösung hinzu.

Die ergänzende MSP in Bezug auf das ASC-Gen ist zwar eine sehr sensitive Methode, aber lässt nur qualitative und keine quantitativen Aussagen zur Methylierung der Zielregion zu. Dies schränkt die Aussagekraft der Ergebnisse ein. Es kann zu geringfügigen Veränderungen der ASC-Methylierung durch die akute sportliche Belastung gekommen sein. Um diese kleinen möglichen Veränderungen nachzuweisen, hätte ein anderes Untersuchungsverfahren, wie z.B. eine Pyrosequenzierung (vgl. Kap.: 5.3.), ausgewählt werden müssen.

Der letzte Kritikpunkt bezieht sich nicht nur auf diese Pilotstudie, sondern auch auf die meisten veröffentlichten Studien. Vor dem Hintergrund aller zuvor genannten Ergebnisse und Aussagen zur Beeinflussung der DNA-Methylierung in Folge von körperlicher Aktivität, sollte die Untersuchung von Leukozyten kritisch hinterfragt werden.

Leukozyten oder PBMCs bieten sich auf den ersten Blick aufgrund ihrer leichten und unkomplizierten Zugänglichkeit als Ausgangsmaterial für die epigenetische Forschung an. Jedoch weisen Blutproben ein Problem auf: Im Gegensatz zu anderen Ausgangsgeweben, wie Muskel- oder Fettgewebe, setzen sich die Leukozyten aus mehreren Subgruppen an Zellen zusammen, deren Anzahl sich in Folge einer sportlichen Intervention verändert.

Während der körperlichen Belastung neigen alle Leukozyten-Untergruppen aufgrund der hämodynamischen Scherbelastung sowie des Katecholamin- und Cortisolanstiegs zu einem Anstieg. Die Phase nach der Belastung zeichnet sich dagegen durch einen gegenteiligen Effekt auf die Neutrophilen und Lymphozyten aus. Während die Neutrophilen, die größte Subgruppe, meist bis zu 6 Stunden nach der Belastung ansteigen, zeichnen sich die Lymphozyten innerhalb der ersten 30 Minuten durch einen postinterventionellen Abfall aus. Die Neutrophilen brauchen im Anschluss ungefähr 24 Stunden, um ihre Ausgangszahl wieder zu erreichen und die Lymphozyten erreichen ihr normales Level nach ungefähr 4-6 Stunden Erholung. Bei den Lymphozyten zeigt sich also im Gegensatz zu den Neutrophilen ein biphasischer Verlauf. Auf den Lymphozytenanstieg während des Sports folgt ein schneller Abfall in den ersten Phasen der Regeneration, bevor sich die Anzahl nach einigen Stunden wieder einpendelt. Die Veränderungen sind hierbei neben der Dauer vor allem von der Belastungsintensität abhängig. Eine sportliche Intervention beeinflusst somit nicht nur die DNA-Methylierung der Leukozyten, sondern verändert auch ihre Anzahl je nach Subpopulation unterschiedlich. Da die Neutrophilen den größten Anteil ausmachen, steigt die Gesamtleukozytenzahl insgesamt (Peake et al., 2016).

Wie vorab angesprochen, konnte ein Einfluss auf epigenetische Regulationsmechanismen mittlerweile in verschiedenen Geweben in Folge von sowohl einzelnen sportlichen Interventionen als auch nach längerfristigen Interventionen nachgewiesen werden. Im Hinblick auf Leukozyten bzw. PBMCs konnten verschiedene Autoren nach einem längeren Interventionszeitraum sowohl Veränderungen der globalen DNA-Methylierung (Dimauro et al. 2016) als auch genspezifische Veränderungen (Nakajima et al. 2010 sowie Butts et al. 2018 zum ASC-Gen) aufweisen. Bezogen auf die Auswirkung einer akuten Sportinterventionen auf die DNA-Methylierung in PBMCs konnte bislang kein Effekt nachgewiesen werden (Robson-Ansley et al. 2012).

Die getroffenen quantitativen Aussagen zur prozentuellen Veränderung der globalen DNA-Methylierung wurden allerdings oftmals nicht mit der Veränderung der Blutwerte, insbesondere der Leukozytenzahl, verglichen. Um die individuellen Veränderungen der DNA-Methylierung im Blut zu relativieren, hätte man zusätzlich die Gesamtleukozytenzahl sowie die verschiedenen Untergruppen, optimalerweise an mehreren Zeitpunkten über 24 Stunden, mitbestimmen sollen. Da dies, wie auch in den vorangegangenen Studien, im Rahmen dieser Pilotstudie nicht erfolgt ist, kann man nicht abgrenzen, ob die festgestellten Änderungen des Epigenoms nicht nur auf die Änderungen der Anzahl und der Anteile der verschiedenen Leukozyten-Untergruppen zurückzuführen sind.

Zusammenfassend können die hier nachgewiesenen Veränderungen der DNA-Methylierung erstmal nur auf gesunde und trainierte junge Erwachsene angewendet werden. Aufgrund der geringen Teilnehmerzahl, den verschiedenen Störfaktoren sowie der Einschränkung, die Leukozyten als Ausgangsmaterial mit sich bringen, sind diese Ergebnisse eher als Hinweis als eine signifikante Schlussfolgerung zu betrachten.

Neben den angesprochenen Stärken dieser Pilotstudie sind auch die Schwächen, die sich teilweise erst im Nachhinein herausstellten, nicht unwichtig. Die besprochenen Aspekte dieser ausführlichen Methodenkritik stellen, neben der neuartigen sportlichen Intervention und der Evaluierung der molekulargenetischen Methoden, einen bedeutenden Erkenntnisgewinn für die Planung und Durchführung von folgenden Studien dar, da viele der zuvor besprochenen Punkte auch in den vorangegangenen Publikationen zum Zusammenhang von Sport und Epigenetik nicht berücksichtigt wurden.

Unter der Berücksichtigung der diskutierten Aspekte sind weitere Forschungen an einem größeren Probandenkollektiv nötig, um diese Resultate zu erhärten. Des Weiteren sollte man unспортlicheren Probanden als Kontrollgruppe miteinbeziehen.

### 5.3 Weitere Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung

Mit dem Methyl-ELISA wurde zum einen die globale DNA-Methylierung untersucht und mit der Methylierungs-spezifischen PCR wurde eine sensitive Methode zum Nachweis der genspezifischen DNA-Methylierung demonstriert.

Die Möglichkeiten zur Analyse der DNA-Methylierung sind in den vergangenen Jahren vielfältiger geworden und umfassen inzwischen Methoden zur Ermittlung der globalen, genspezifischen und genomweiten DNA-Methylierung. Alle Verfahren haben ihre Vor- und Nachteile. Ihr Gebrauch hängt insbesondere von der Fragestellung einer Arbeit ab.

Im Folgenden wird diskutiert, welche alternativen Methoden zur Auswahl gestanden haben und durch welche Methoden man offen gebliebene Fragen beantworten könnte.

Zur Bestimmung der globalen DNA-Methylierung eignen sich neben ELISA-gestützten Verfahren beispielsweise noch der LUMA (LUMinometric Methylation Assay) und die Untersuchung von sich wiederholenden Sequenzen, wie Alu-Wiederholungen oder LINE-Wiederholungen, die durch eine PCR-Amplifikation im Anschluss an eine Bisulfitbehandlung untersucht werden (Yang et al., 2004). Der LUMA basiert auf einer DNA-Spaltung mithilfe von methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen gefolgt von einer anschließenden Pyrosequenzierung, um die globale DNA-Methylierung zu quantifizieren (Karimi et al., 2006).

Beide Verfahren bieten im Vergleich zum Methyl-ELISA keine Vorteile. Der ELISA bildet das gesamte Genom ab, benötigt eine geringere Menge an Proben-DNA und ist im Vergleich zur Untersuchung der „Repeat-Sequences“ nicht auf die Bisulfitmodifizierung angewiesen.

Die MSP stellt lediglich ein qualitatives Verfahren in Bezug auf die genspezifische DNA-Methylierung dar. Zur Quantifizierung eignen sich die Pyrosequenzierung und die MALDI-TOF MS („matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry“), die sich genauso wie die MSP an eine Bisulfitmodifizierung der DNA anschließen. Die Pyrosequenzierung basiert auf dem Nachweis von Pyrophosphat mittels des Enzyms Luciferase. Das Pyrophosphat wird zuvor durch die Eingliederung eines Nukleotids in eine „template-DNA“ freigesetzt. Die Luciferase-Reaktion produziert ein messbares Lichtsignal und nimmt mit der Anzahl an freigesetztem Pyrophosphat zu. Dadurch kann der Anteil an nicht-verändertem Cytosin und den umgewandelten Thymin-Basen an den CpG-Stellen quantifiziert werden (Colella et al., 2003). Mithilfe dieser Methode kann eine quantitative Aussage über viele CpG-Stellen gemacht werden. Allerdings eignet sich dieses Verfahren eher zur Analysierung von kleineren PCR-Produkten. Somit ist die Anzahl an CpG-Stellen, die in einem Assay untersucht werden können, limitiert.

Bei der MALDI-TOF MS werden interessierte Regionen von bisulfitmodifizierter DNA mittels einer PCR durch den Gebrauch einer T7 RNA-Polymerase amplifiziert. Die PCR-Produkte werden in Einzel-Strang-RNA übersetzt und spezifisch durch eine Endoribonuclease geschnitten. Als Folge der vorherigen Umwandlung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil durch die Bisulfitbehandlung kommt es zu unterschiedlichen basenspezifischen Schnittfragmenten. Diese werden anhand des Massenunterschiedes mittels Massenspektrometrie ausgewertet (Ehrich et al., 2005). Mit der MALDI-TOF MS lassen sich verglichen mit der Pyrosequenzierung größere PCR-Produkte untersuchen. Allerdings ist das Verfahren schwieriger durchzuführen und setzt eine höhere technische Expertise voraus.

Bei den bisherigen Publikationen, die auf kein bestimmtes Gen abzielen, kommen seit Jahren vermehrt chip-basierte Microarrays zur Analyse der genomweiten DNA-Methylierung zum Einsatz. Der IlluminaMethylationEPIC BeadChip-Microarray stellt als Erweiterung vorheriger Microarrays, wie dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip derselben Firma, eine zuverlässige und robuste Methode dar (Pidsley et al., 2016). Zudem handelt es sich hierbei um eine zeit- und kosteneffektive Methode. Im Vergleich zu den anderen Methoden, mit denen

man die genomweite DNA-Methylierung untersucht, deckt dieser Microarray zwar die meisten CpG-Insel-Promotorregionen ab, ist allerdings nicht in der Lage alle einzelnen CpG-Dinukleotide des Genoms zu untersuchen (Stirzaker et al., 2014). Um dies zu gewährleisten müsste man den Goldstandard in Form einer „Whole-genome bisulfite sequencing (WGBS)“ durchführen, die deutlich komplexer und teurer ist. Mit dieser Methode können zusätzlich Regionen mit einer geringen CpG-Dichte abgebildet werden (Stirzaker et al., 2014).

In den verschiedenen Arbeiten zum Zusammenhang von sportlichen Interventionen und Veränderungen des Methyloms wurden insbesondere die angesprochen Methoden verwendet. Es gibt allerdings noch eine Vielzahl an weiteren Methoden, wie beispielsweise das „Methylated DNA Immunoprecipitation and High-Throughput Sequencing (MeDIP-seq)“ (Zhao et al., 2014) als „Next-Generation Sequencing (NGS)“-Technik.

Zusammenfassend hängt die Wahl des Verfahrens von der Fragestellung und der Zielsetzung einer Untersuchung und von verschiedenen Faktoren, wie dem finanziellen Budget und der technischen Expertise eines Teams ab. Alle Methoden zur Erfassung der DNA-Methylierung bieten Vor- und Nachteile und sollten vor Beginn einer Studie abgewogen werden.

In dieser Arbeit wurde auf Verfahren gesetzt, die keine hohe technische Vorerfahrung des Anwenders voraussetzen und somit in Zukunft auch für den allgemeinen klinischen Gebrauch genutzt werden könnten.

#### 5.4 Empfehlungen zur Anpassung weiterer Forschungen zum Nachweis von akuten Veränderungen des Epigenoms in Folge von einzelnen Sportinterventionen

Das Design der sportlichen Intervention und die erstmalige Verwendung des Methylierungs-ELISAs der Firma EpiGentek im besprochenen Zusammenhang stellen zweifelsfrei neue methodische Ansätze im Rahmen der Forschung dar. Dennoch wies das Studiendesign auch einige Schwächen auf, was die Tätigkeit einer klaren Aussage der Ergebnisse verhindert. Im Rahmen der vorangegangenen Aufarbeitung dieser Schwächen wurde mit dem Aspekt der unterschiedlichen Leukozytensubgruppen und deren unterschiedliche Anpassung auf akute Sportreize ein Punkt angesprochen, der in den bisher veröffentlichten Publikationen oftmals vernachlässigt wurde.

Schenk et al. gehören zu den ersten Autoren, die diesen Kritikpunkt 2019 in einem Paper erwähnten. Auch Sie führten eine akute Sportintervention auf einem Fahrradergometer durch. Ihre epigenetischen Untersuchungen zur genomweiten DNA-Methylierung führten sie nicht an PBMCs durch, sondern an isolierten natürlichen Killerzellen, in denen sich an 25 Genen Veränderungen feststellen ließen (Schenk et al., 2019). Mit ihren Erkenntnissen haben sie das Feld für zellspezifische Untersuchungen geöffnet. Horsburgh et al. wählten zuvor einen anderen Weg, um die Fehlerquellen, die PBMCs bzw. Leukozyten als Ausgangsmaterial mit sich bringen, zu umgehen. Sie untersuchten keine zellspezifischen Veränderungen, sondern inwiefern sich die DNA-Methyltransferasen, als beteiligte Enzyme, nach einer Sportintervention verändern (Horsburgh et al., 2015).

Die Mehrzahl an Autoren, die sich mit dem Zusammenhang von Epigenetik und Sport befassen, sprechen einige Limitationen ihrer Untersuchung zwar häufig an, dennoch vermeiden es viele Autoren aufgrund eines begrenzten Aussagewertes Empfehlungen für weitere Untersuchungen abzugeben. Zumeist wird lediglich darauf hingewiesen, dass weitere Studien notwendig seien. Daher möchte ich hier in Kürze, bezogen auf die für diese Studie gewählten Schwerpunkte, einige Empfehlungen für zukünftige Arbeiten erörtern.

Die zukünftigen Studien, die peripheres Blut als Ausgangsmaterial verwenden, sollten sich zukünftig isoliert mit einzelnen Subgruppen an Leukozyten beschäftigen und deren epigenetische Anpassungen, z.B. im Rahmen einer akuten sportlichen Intervention, mit der Veränderung der jeweiligen Zellzahl und ihrer Funktion in Verbindung setzen, wie dies von Schenk et al. an natürlichen Killerzellen getan wurde.

Muskel- und Fettgewebe sind nach peripherem Blut bezogen auf körperliche Aktivität die am häufigsten verwendeten Ausgangsgewebe in der epigenetischen Forschung. Sie bringen zwar den Nachteil mit sich, dass sie nur mittels Biopsie zugänglich sind, allerdings haben diese Gewebe den Vorteil aus den gleichen Zellen zu bestehen. Für diese Ausgangsmaterialien lassen sich somit eher eindeutige Aussagen ableiten.

Neben der Auswahl des zu untersuchenden Materials sollte man sich zukünftig mehr Gedanken zu den Zeitpunkten der Probesammlung machen. Zusätzlich zu der Ausgangsprobe zum Zeitpunkt t0 könnte, sollte man neben einer Probe t1 im Anschluss an die sportliche Betätigung auch nach einer Regenerationsphase von 24 Stunden eine Probe t2 abnehmen. In diesem Zeitraum normalisiert sich die Anzahl der Leukozyten und durch den Vergleich von t1 und t2 könnte man eine Aussage darüber treffen, inwiefern die Veränderung der weißen Blutzellen die

Ergebnisse bezogen auf die DNA-Methylierung beeinflusst. Durch eine weitere Probe (t3), nach 7 Tagen ohne sportliche Intervention, könnte man zusätzlich zeigen, ob eine Einheit Sport ausreicht, um die Spiegel der DNA-Methylierung gesenkt zu halten.

Insofern es sich ethisch umsetzen lässt, wären akute Untersuchungen sowohl zum globalen als auch zum genspezifischen Methylierungsstatus an erkrankten Personen der nächste Schritt. Alle angesprochenen Studien, die unabhängig vom Ausgangsmaterial die Auswirkung von akuten körperlichen Belastungen untersuchten, wurden meist an jungen und gesunden Probanden durchgeführt. Die bisher in Langzeitstudien gewonnen Erkenntnisse über die Veränderungen an Genen wie ASC (Nakajima et al., 2010) und dem Tumorsuppressorgen L3MBTL1 (Zeng et al., 2012) sollten dabei miteingeschlossen werden.

Zusammenfassend besteht noch viel Spielraum in der Ausarbeitung der Studien zur Auswirkung von akuten sportlichen Interventionen auf epigenetische Regulationsmechanismen. Die hier angesprochenen Neuerungen, die Darstellung der Limitationen sowie die vorgeschlagenen Anpassungen könnten dazu beitragen, den Informationsgehalt über die Anpassung der DNA-Methylierung in zukünftigen Studien deutlich zu erhöhen.

### 5.5 Bedeutung der Ergebnisse für die praktische Medizin und weitere Forschungen

Durch die Auswertung der Ergebnisse konnte sich zeigen lassen, dass der verwendete Methylierungs-ELISA unter bestimmten Voraussetzungen zur Darstellung von Veränderungen des DNA-Methylierungsgrades geeignet ist. Trotz der Limitationen dieser Pilotstudie ergaben sich unter Anwendung dieses Testverfahrens Hinweise darauf, dass akute Trainingseinheiten, insbesondere bei moderater Intensität, zu positiven Veränderungen der DNA-Methylierung führen.

Die Ergebnisse zum hier verwendeten Trainingsprotokoll reichen allerdings noch nicht aus, um klare Empfehlungen für individualisierte Trainingsprogramme zu liefern, mit denen man die konservative Therapie von beispielsweise Tumorpatienten, bei denen die DNA-Methylierung als nachgewiesene Hallmark gilt, unterstützen könnte.

Der Hinweis, dass die Ergebnisse je nach Belastungsintensität variieren sollte zukünftig noch genauer untersucht werden. Sollte sich der Hinweis, dass einzelne Sporteinheiten bei moderater

Intensität zur positiven Veränderung der DNA-Methylierung führen, bewahrheiten, könnte man solche Sporteinheiten zukünftig in ein multimodales Therapiekonzept einbauen, da eine moderate Intensitätsstufe für die Erkrankten eher umsetzbar wäre als eine hoch-intensive Belastung.

Neben dem langfristigen Nutzen dieser Studienergebnisse, wurden mit dem neuartigen Interventionsdesign und der Erprobung des ELISAs bezüglich dieser Thematik neue Methoden erläutert und geprüft, die man zukünftig auch voneinander getrennt, vielseitig verwenden kann.

Der ELISA könnte beispielsweise auch als schneller Test zur Überprüfung der Wirksamkeit von Azathioprin verwendet werden, das als erstes Medikament im Sinne eines epigenetischen Therapieansatz, unter anderem zur Behandlung des myelodysplastischen Syndroms oder der Akuten Myeloischen Leukämie, zugelassen wurde. Die Zulassung basierte auf den Ergebnissen der zentralen AZA-001-Studie, einer großen internationalen randomisierten Phase-III-Studie, die an Hochrisiko-MDS-Patienten durchgeführt wurde (Fenaux et al., 2009). Eine abnormale DNA-Hypomethylierung spielt bei der Entwicklung eines Myelodysplastischen Syndroms eine Rolle und Medikamente, wie Azathioprin (Vidaza®), machen die Hypomethylierung rückgängig und stellen so wieder ein normales Transkriptionsmaß der beteiligten Tumorsuppressorgene her (Raj et al., 2007).

Azathioprin beeinflusst also nachweislich die DNA-Methylierung und somit könnte die Wirksamkeit dieses Medikamentes in Blutproben von Patienten mithilfe des ELISAs nachgewiesen werden. Ob sich die im Vergleich von Kosten- und Nutzen lohnt, müsste in anderen Arbeiten gezeigt werden.

Im Hinblick auf die Ausarbeitung eines multimodalen Therapiekonzepts, das durch sportliche Interventionen ergänzt wird, könnte man irgendwann die Therapie von Azathioprin allein gegen die Kombination aus Medikament und gelegentlichen Sporteinheiten über einen längeren Zeitraum miteinander vergleichen. Die mit dem ELISA messbare globale DNA-Methylierung würde dabei neben dem subjektiven empfundenen Empfinden des Patienten hinsichtlich des Therapieerfolgs einen objektivierbaren Parameter liefern.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Epigenetik beschäftigt sich mit der Beeinflussung der Genfunktion und -expression, ohne dass dabei die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenz in ihrer Basenabfolge verändert wird. Die DNA-Methylierung stellt den bisher am besten untersuchten Regulationsmechanismus dar und ist an der Entstehung verschiedener Krankheitsbilder, darunter mehrere Tumorentitäten, beteiligt. Epigenetische Prozesse lassen sich durch Lebensstilfaktoren, wie Sport, positiv verändern und eröffnen ein neues Themenfeld für die Prävention von Krankheiten.

Ziel dieser Pilotstudie war die Untersuchung der Wirksamkeit von akuten Sportinterventionen auf die globale DNA-Methylierung und die ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) -Methylierung von Leukozyten. Zur Evaluierung dieses Zusammenhangs absolvierte eine Gruppe von 12 gesunden, jungen Probanden (Alter:  $23,75 \pm 2,56$  Jahre) zwei unterschiedlich intensive Trainingseinheiten auf einem Fahrradergometer. Nach der Ermittlung eines individuellen Peak Power-Wertes absolvierten die Teilnehmer im Abstand von einer Woche eine hoch-intensive (85% Peak Power) und eine moderat-intensive (50% Peak Power) Einheit. Im Zuge der beiden Trainingstage wurde den Probanden jeweils eine Stunde vor und nach der jeweiligen Belastungsstufe peripher venöses Blut entnommen. Im Labor wurde die DNA aus den Leukozyten isoliert. Die DNA diente, nach einer Qualitätskontrolle mittels Spektrophotometrie und elektrophoretischer Auftrennung, als Ausgangsmaterial für einen Methyl-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) [#P-1030, EpiGentek<sup>®</sup>], mit dem der globale Methylierungsstatus untersucht wurde. Für die zusätzliche Untersuchung des ASC-Gens wurde die DNA mit Natriumbisulfit behandelt und der Methylierungsstatus mittels methylierungs-spezifischer Polymerasekettenreaktion (msPCR) ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen einen Anstieg der globalen DNA-Methylierung in Folge der sportlichen Intervention. Diese Veränderungen fielen je nach Studienteilnehmer unterschiedlich aus. Im Vergleich der beiden vorgegebenen Belastungsintensitäten führte die moderate Einheit zu einer stärkeren Methylierung der DNA als die hoch-intensive Einheit.

Diese Pilotstudie liefert weitere Hinweise, dass bereits eine akute Sporeinheit epigenetische Regulationsmechanismen, wie die DNA-Methylierung, beeinflussen kann. Es sollten weitere Studien mit größeren Fallzahlen zur Bestätigung dieser Hinweise folgen, da sowohl diese Studie als auch die bislang durchgeführten Untersuchungen zu diesem Zusammenhang verschiedene limitierende Faktoren aufweisen. Weiterhin sollten derartige Untersuchungen zukünftig auch kranke Menschen einbeziehen, da die bis heute veröffentlichten Studien nur auf gesunde Individuen zurückgreifen.

## CONCLUSION

Epigenetics influences gene function and gene expression without changing the base sequence of the deoxyribonucleic acid (DNA). DNA methylation is currently the most examined epigenetic modification and is involved in the development of various diseases like several cancers. Epigenetic processes can be positively influenced by lifestyle factors such as sports. This opens a new topic for the prevention of diseases. This pilot study aims to investigate the effectiveness of physical endurance training on global DNA methylation and ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) methylation in leukocytes. To evaluate this relationship, a group of 12 healthy young subjects (age:  $23.75 \pm 2.56$  years) completed two interventions of different intensity on a bicycle ergometer.

After determining an individual peak power, the participants completed a intervention with high intensity (85% peak power) and moderate intensity (50% peak power) at an interval of one week. During these two training days, peripheral venous blood was taken from the test subjects one hour before and one hour after the intervention. The DNA was isolated from the leukocytes in the laboratory. After a quality control consisting of spectrophotometry and electrophoretic separation, the DNA was examined by a Methyl-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) [# P-1030, EpiGentek<sup>®</sup>] to prove the global methylation status. For the additional investigation of the ASC gene, the DNA was treated with sodium bisulfite and the methylation status was evaluated using methylation-specific polymerase chain reaction (msPCR).

The results show an increase in global DNA methylation as a result of the intervention. Depending on the study participant these changes turned out differently. In comparison to the two specified exercise intensities, the moderate unit led to greater methylation of the DNA than the high-intensity unit.

This pilot study provides further evidence that even an acute exercise session can influence epigenetic regulatory mechanisms such as DNA methylation. Further studies with larger case numbers should follow to confirm these indications, since this study and many other investigations show various limiting factors. Furthermore, such studies should also include sick people in the future, since the studies published to date only refer to healthy individuals.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Alegría-Torres, J.A., Baccarelli, A., and Bollati, V. (2011). Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics* 3, 267-277.
2. Alibegovic, A.C., Sonne, M.P., Højbjerg, L., Bork-Jensen, J., Jacobsen, S., Nilsson, E., Færch, K., Hiscock, N., Mortensen, B., Friedrichsen, M., Stallknecht, B., Dela, F., Vaag, A. (2010). Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 299, E752-E763.
3. Anderson, O.S., Sant, K.E., and Dolinoy, D.C. (2012). Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 853-859.
4. Armbrecht, M., and Eppendorf, A. (2013). Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen. Eppendorf AG Hamburg (Application Note, 279) Online verfügbar unter [https://online-shop.eppendorf.de/eshopdownload/downloadbykey/59828\\_1](https://online-shop.eppendorf.de/eshopdownload/downloadbykey/59828_1), zuletzt geprüft am 18. 2015.
5. Bagley, J.R., Burghardt, K.J., McManus, R., Howlett, B., Costa, P.B., Coburn, J.W., Arevalo, J.A., Malek, M.H., and Galpin, A.J. (2020). Epigenetic Responses to Acute Resistance Exercise in Trained vs. Sedentary Men. *The Journal of Strength & Conditioning Research* 34.
6. Bajpeyi, S., Covington, J.D., Taylor, E.M., Stewart, L.K., Galgani, J.E., and Henagan, T.M. (2017). Skeletal Muscle PGC1 $\alpha$  -1 Nucleosome Position and -260 nt DNA Methylation Determine Exercise Response and Prevent Ectopic Lipid Accumulation in Men. *Endocrinology* 158, 2190-2199.
7. Barrès, R., Yan, J., Egan, B., Treebak, Jonas T., Rasmussen, M., Fritz, T., Caidahl, K., Krook, A., O'Gorman, Donal J., and Zierath, Juleen R. (2012). Acute Exercise Remodels Promoter Methylation in Human Skeletal Muscle. *Cell Metabolism* 15, 405-411.
8. Bester, T.H. (1988). Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene* 74, 9-12.
9. Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J., and Macleod, D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40, 91-99.
10. Blair, S.N., Kohl, H.W., III, Paffenbarger, R.S., Jr., Clark, D.G., Cooper, K.H., and Gibbons, L.W. (1989). Physical Fitness and All-Cause Mortality: A Prospective Study of Healthy Men and Women. *JAMA* 262, 2395-2401.
11. Bollati, V., Schwartz, J., Wright, R., Litonjua, A., Tarantini, L., Suh, H., Sparrow, D., Vokonas, P., and Baccarelli, A. (2009). Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mechanisms of Ageing and Development* 130, 234-239.
12. Bryan, A.D., Mangan, R.E., Hooper, A.E.C., Harlaar, N., and Hutchison, K.E. (2013). Physical Activity and Differential Methylation of Breast Cancer Genes Assayed from Saliva: A Preliminary Investigation. *Annals of Behavioral Medicine* 45, 89-98.

13. Butts, B., Butler, J., Dunbar, S.B., Corwin, E., and Gary, R.A. (2018). Effects of Exercise on ASC Methylation and IL-1 Cytokines in Heart Failure. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 50.
14. Caspersen, C.J., Powell, K.E., and Christenson, G.M. (1985). Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* 100, 126-131.
15. Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L., and Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic acids research* 22, 2990-2997.
16. Cleff, T. (2019). *Angewandte Induktive Statistik und Statistische Testverfahren* (Springer).
17. Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates).
18. Colella, S., Shen, L., Baggerly, K.A., Issa, J.P.J., and Krahe, R. (2003). Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing<sup>TM</sup> methylation analysis of CpG sites. *BioTechniques* 35, 146-150.
19. Conway, K.E., McConnell, B.B., Bowring, C.E., Donald, C.D., Warren, S.T., and Vertino, P.M. (2000). TMS1, a Novel Proapoptotic Caspase Recruitment Domain Protein, Is a Target of Methylation-induced Gene Silencing in Human Breast Cancers. *Cancer Research* 60, 6236.
20. Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., Abramowitz, L.K., Bartolomei, M.S., Rambow, F., Bassi M.R., Bruno, T., Fanciulli, M., Renner, C., Klein-Szanto, A.J., Matsumoto, Y., Kobi, D., Davidson, I., Alberti, C., Larue, L., Bellacosa, A. (2011). Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair. *Cell* 146, 67-79.
21. Denham, J., O'Brien, B.J., Marques, F.Z., and Charchar, F.J. (2014). Changes in the leukocyte methylome and its effect on cardiovascular-related genes after exercise. *Journal of Applied Physiology* 118, 475-488.
22. Dimauro, I., Scalabrin, M., Fantini, C., Grazioli, E., Beltran Valls, M.R., Mercatelli, N., Parisi, A., Sabatini, S., Di Luigi, L., and Caporossi, D. (2016). Resistance training and redox homeostasis: Correlation with age-associated genomic changes. *Redox Biology* 10, 34-44.
23. Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., and Jaenisch, R. (2003). Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science* 300, 455.
24. Ehrich, M., Nelson, M.R., Stanssens, P., Zabeau, M., Liloglou, T., Xinarianos, G., Cantor, C.R., Field, J.K., and van den Boom, D. (2005). Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15785.
25. Esteller, M., Silva, J.M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes, I.C., Repasky, E.A., Gabrielson, E., Schutte, M., Baylin, S.B.,

- Herman, J.G. (2000). Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 92, 564-569.
26. Fabre, O., Ingerslev, L.R., Garde, C., Donkin, I., Simar, D., and Barrès, R. (2018). Exercise training alters the genomic response to acute exercise in human adipose tissue. *Epigenomics* 10, 1033-1050.
27. Feinberg, A.P., Gehrke, C.W., Kuo, K.C., and Ehrlich, M. (1988). Reduced Genomic 5-Methylcytosine Content in Human Colonic Neoplasia. *Cancer Research* 48, 1159.
28. Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 111, 47-54.
29. Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., Gore, S.D., Seymour, J.F., Bennett, J.M., Byrd, J., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C.L., Silverman, L.R., (2009). Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology* 10, 223-232.
30. Ferrari, L., Vicenzi, M., Tarantini, L., Barretta, F., Sironi, S., Baccarelli, A.A., Guazzi, M., and Bollati, V. (2019). Effects of Physical Exercise on Endothelial Function and DNA Methylation. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16.
31. Filion, G.J.P., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E., and Defossez, P.-A. (2006). A Family of Human Zinc Finger Proteins That Bind Methylated DNA and Repress Transcription. *Molecular and Cellular Biology* 26, 169.
32. Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T.D., Wu, Y.Z., Plass, C., Esteller, M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10604-10609.
33. Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R., and Kouzarides, T. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Research* 31, 2305-2312.
34. Greger, V., Passarge, E., Höpping, W., Messmer, E., and Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Human Genetics* 83, 155-158.
35. Hashimoto, H., Horton, J.R., Zhang, X., Bostick, M., Jacobsen, S.E., and Cheng, X. (2008). The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* 455, 826-829.
36. Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 9821.

37. Herman, J.G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R.G., Issa, J.-P.J., Davidson, N.E., Sidransky, D., and Baylin, S.B. (1995). Inactivation of the *CDKN2/p16/MTS1* Gene Is Frequently Associated with Aberrant DNA Methylation in All Common Human Cancers. *Cancer Research* 55, 4525.
38. Heyn, H., Li, N., Ferreira, H.J., Moran, S., Pisano, D.G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J.V., Setien, F., Carmona, F.J., Puca, A.A., Sayols, S., Pujana, M.A., Serra-Musach, J., Iglesias-Platas, I., Formiga, F., Fernandez, A.F., Fraga, M.F., Heath, S.C., Valencia, A., Gut, I.G., Wang, J., Esteller, M. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 10522.
39. Horsburgh, S., Todryk, S., Toms, C., Moran, C.N., and Ansley, L. (2015). Exercise-conditioned plasma attenuates nuclear concentrations of DNA methyltransferase 3B in human peripheral blood mononuclear cells. *Physiological Reports* 3, e12621.
40. Irwin, M.L., Varma, K., Alvarez-Reeves, M., Cadmus, L., Wiley, A., Chung, G.G., DiPietro, L., Mayne, S.T., and Yu, H. (2009). Randomized Controlled Trial of Aerobic Exercise on Insulin and Insulin-like Growth Factors in Breast Cancer Survivors: The Yale Exercise and Survivorship Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 18, 306.
41. Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C., and Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466, 1129-1133.
42. Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* 333, 1300.
43. Jones, A.M., and Carter, H. (2000). The Effect of Endurance Training on Parameters of Aerobic Fitness. *Sports Medicine* 29, 373-386.
44. Jones, P.L., Veenstra, G.J.C., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics* 19, 187-191.
45. Karimi, M., Johansson, S., Stach, D., Corcoran, M., Grandér, D., Schalling, M., Bakalkin, G., Lyko, F., Larsson, C., and Ekström, T.J. (2006). LUMA (LUMinometric Methylation Assay)—A high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Experimental Cell Research* 312, 1989-1995.
46. Lee, I.M. (2007). Dose-Response Relation Between Physical Activity and Fitness Even a Little Is Good; More Is Better. *JAMA* 297, 2137-2139.
47. Lee, I.M., Shiroma, E.J., Lobelo, F., Puska, P., Blair, S.N., and Katzmarzyk, P.T. (2012). Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *The Lancet* 380, 219-229.
48. Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.-U., and Bestor, T.H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71, 865-873.

49. Li, E., Beard, C., and Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366, 362-365.
50. Li, Y., Zhu, J., Tian, G., Li, N., Li, Q., Ye, M., Zheng, H., Yu, J., Wu, H., Sun, J., Zhang, H., Chen, Q., Luo, R., Chen, M., He, Y., Jin, X., Zhang, Q., Yu, C., Zhou, G., Sun, J., Huang, Y., Zheng, H., Cao, H., Zhou, X., Guo, S., Hu, X., Li, X., Kristiansen, K., Bolund, L., Xu, J., Wang, W., Yang, H., Wang, J., Li, R., Beck, S., Wang, J., Zhang, X. (2010). The DNA Methylome of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *PLOS Biology* 8, e1000533.
51. Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
52. Luttrupp, K., Nordfors, L., Ekström, T.J., and Lind, L. (2013). Physical activity is associated with decreased global DNA methylation in Swedish older individuals. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 73, 184-185.
53. Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 9667.
54. Manzardo, A.M., and Butler, M.G. (2016). Examination of Global Methylation and Targeted Imprinted Genes in Prader-Willi Syndrome. *J Clin Epigenet* 2, 26.
55. Maunakea, A.K., Nagarajan, R.P., Bilenky, M., Ballinger, T.J., D'Souza, C., Fouse, S.D., Johnson, B.E., Hong, C., Nielsen, C., Zhao, Y., Turecki, G., Delaney, A., Varhol, R., Thiessen, N., Shchors, K., Heine, V.M., Rowitch, D.H., Xing, X., Fiore, C., Schillebeeckx, M., Jones, S.J.M., Haussler, D., Marra, M.A., Hirst, M., Wang, T., Costello, J.F. (2010). Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466, 253-257.
56. Medicine, A.C.o.S. (2009). American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Medicine and science in sports and exercise* 41, 687-708.
57. Myers, J., Prakash, M., Froelicher, V., Do, D., Partington, S., and Atwood, J.E. (2002). Exercise Capacity and Mortality among Men Referred for Exercise Testing. *New England Journal of Medicine* 346, 793-801.
58. Nakajima, K., Takeoka, M., Mori, M., Hashimoto, S., Sakurai, A., Nose, H., Higuchi, K., Itano, N., Shiohara, M., Oh, T., Taniguchi, S. (2010). Exercise Effects on Methylation of ASC Gene. *Int J Sports Med* 31, 671-675.
59. New England Biolabs. (2018). Recommended Protocol for Methylation of Genomic DNA. Online-Publikation; <https://international.neb.com/protocols/2018/09/12/recommended-protocol-for-methylation-of-genomic-dna>
60. Ng, E.K.O., Tsang, W.P., Ng, S.S.M., Jin, H.C., Yu, J., Li, J.J., Röcken, C., Ebert, M.P.A., Kwok, T.T., and Sung, J.J.Y. (2009). MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 101, 699-706.

61. Niedernhofer, L.J., Gurkar, A.U., Wang, Y., Vijg, J., Hoeijmakers, J.H.J., and Robbins, P.D. (2018). Nuclear Genomic Instability and Aging. *Annu Rev Biochem* 87, 295-322.
62. Nishida, Y., Hara, M., Higaki, Y., Taguchi, N., Nakamura, K., Nanri, H., Horita, M., Shimano, C., Yasukata, J., Miyoshi, N., Yamada, Y., Higashimoto, K., Soejima, H., Tanaka, K. (2019). Habitual Light-intensity Physical Activity and ASC Methylation in a Middle-aged Population. *Int J Sports Med* 40, 670-677.
63. Nitert, M.D., Dayeh, T., Volkov, P., Elgzyri, T., Hall, E., Nilsson, E., Yang, B.T., Lang, S., Parikh, H., Wessman, Y., Weishaupt, H., Attema, J., Abels, M., Wierup, N., Almgren, P., Jansson, P.-A., Rönn, T., Hansson, O., Eriksson, K.-F., Groop, L., Ling, C. (2012). Impact of an Exercise Intervention on DNA Methylation in Skeletal Muscle From First-Degree Relatives of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 61, 3322.
64. Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* 99, 247-257.
65. Orsini, N., Mantzoros, C.S., and Wolk, A. (2008). Association of physical activity with cancer incidence, mortality, and survival: a population-based study of men. *British Journal of Cancer* 98, 1864-1869.
66. Pate, R.R., Pratt, M., Blair, S.N., Haskell, W.L., Macera, C.A., Bouchard, C., Buchner, D., Ettinger, W., Heath, G.W., King, A.C., Kriska, A., Leon, A.S., Marcus, B.H., Morris, J., Paffenbarger, R.S.-Jr., Patrick, K., Pollock, M.L., Rippe, J.M., Sallis, J., Wilmore, J.H. (1995). Physical Activity and Public Health: A Recommendation From the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA* 273, 402-407.
67. Peake, J.M., Neubauer, O., Walsh, N.P., and Simpson, R.J. (2016). Recovery of the immune system after exercise. *Journal of Applied Physiology* 122, 1077-1087.
68. Pidsley, R., Zotenko, E., Peters, T.J., Lawrence, M.G., Risbridger, G.P., Molloy, P., Van Dijk, S., Muhlhäuser, B., Stirzaker, C., and Clark, S.J. (2016). Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biology* 17, 208.
69. Radom-Aizik, S., Zaldivar Jr, F., Leu, S.-Y., Adams, G.R., Oliver, S., and Cooper, D.M. (2012). Effects of Exercise on microRNA Expression in Young Males Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Clinical and Translational Science* 5, 32-38.
70. Raj, K., John, A., Ho, A., Chronis, C., Khan, S., Samuel, J., Pomplun, S., Thomas, N.S.B., and Mufti, G.J. (2007). CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacytidine. *Leukemia* 21, 1937-1944.
71. Robson-Ansley, P.J., Saini, A., Toms, C., Ansley, L., Walshe, I.H., Nimmo, M.A., and Curtin, J.A. (2014). Dynamic changes in dna methylation status in peripheral blood Mononuclear cells following an acute bout of exercise: Potential impact of exercise-induced elevations in interleukin-6 concentration. *J Biol Regul Homeost Agents* 28, 407-417.

72. Rock, C.L., Doyle, C., Demark-Wahnefried, W., Meyerhardt, J., Courneya, K.S., Schwartz, A.L., Bandera, E.V., Hamilton, K.K., Grant, B., McCullough, M., Byers, T., Gansler, T. (2012). Nutrition and physical activity guidelines for cancer survivors. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 62, 242-274.
73. Rönn, T., Volkov, P., Davegårdh, C., Dayeh, T., Hall, E., Olsson, A.H., Nilsson, E., Tornberg, Å., Dekker Nitert, M., Eriksson, K.-F., Jones, H.A., Groop, L., Ling, C. (2013). A Six Months Exercise Intervention Influences the Genome-wide DNA Methylation Pattern in Human Adipose Tissue. *PLOS Genetics* 9, e1003572.
74. Rowlands, D.S., Page, R.A., Sukala, W.R., Giri, M., Ghimbovschi, S.D., Hayat, I., Cheema, B.S., Lys, I., Leikis, M., Sheard, P.W., Wakefield, St.J., Breier, B., Hathout, Y., Brown, K., Marathi, R., Orkunoglu-Suer, F.E., Devaney, J.M., Leiken, B., Many, G., Krebs, J., Hopkins, W.G., Hoffman, E.P. (2014). Multi-omic integrated networks connect DNA methylation and miRNA with skeletal muscle plasticity to chronic exercise in Type 2 diabetic obesity. *Physiological Genomics* 46, 747-765.
75. Russo, V.E., Martienssen, R.A., and Riggs, A.D. (1996). Epigenetic mechanisms of gene regulation (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
76. Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 1412.
77. Schenk, A., Koliymitra, C., Bauer, C.J., Schier, R., Schweiger, M.R., Bloch, W., and Zimmer, P. (2019). Impact of Acute Aerobic Exercise on Genome-Wide DNA-Methylation in Natural Killer Cells—A Pilot Study. *Genes* 10.
78. Schumann, M., Freitag, N., and Bloch, W. (2020). Advanced Exercise Prescription for Cancer Patients and its Application in Germany. *Journal of Science in Sport and Exercise* 2, 201-214.
79. Shapiro, S.S., and Wilk, M.B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples)†. *Biometrika* 52, 591-611.
80. Stirzaker, C., Taberlay, P.C., Statham, A.L., and Clark, S.J. (2014). Mining cancer methylomes: prospects and challenges. *Trends in Genetics* 30, 75-84.
81. Strichman-Almashanu, L.Z., Lee, R.S., Onyango, P.O., Perlman, E., Flam, F., Frieman, M.B., and Feinberg, A.P. (2002). A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Genome Res* 12, 543-554.
82. Toghiani, B.J., Saratzis, A., Freeman, P.J., Sylvius, N., Pathak, R., Brooks, M.J., Hayes, P., Imray, C.H., Quarmby, J., Choksy, S.A., Earnshaw, J.J., Shearman, C.P., Grocott, E., Rix, T., Chetter, I.C., Tennant, W., Libertiny, G., Sykes, T., Dayer, M., Pike, L., Pherwani, A., Nice, C., Browning, N., McCollum, C.N., Yusuf, S.W., Gannon, M., Barwell, J., Baker, S., Vallabhaneni, S.R., Smyth, J.V., Davies, A.H., Lees, T., Fligelstone, L., Sayers, R., Samani, N.J., Sweeting, M.J., Thompson, J., Bown, M.J., Ukags collaborators (2018). SMYD2 promoter DNA methylation is associated with abdominal aortic aneurysm (AAA) and SMYD2 expression in vascular smooth muscle cells. *Clinical Epigenetics* 10, 29.

83. Tschopp M., H.T., Villiger B., Marti B. (2001). Qualitätsstandards in der Ausdauerleistungsdiagnostik. *Schweizerische Zeitschrift für «Sportmedizin und Sporttraumatologie* 49, 57-66.
84. Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* 318, 1931.
85. Waddington, C.H. (2011). The Epigenotype. *International Journal of Epidemiology* 41, 10-13.
86. Wade, P.A. (2001). Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Human Molecular Genetics* 10, 693-698.
87. Walsh, B., Tonkonogi, M., and Sahlin, K. (2001). Effect of endurance training on oxidative and antioxidative function in human permeabilized muscle fibres. *Pflügers Archiv* 442, 420-425.
88. Warburton, D.E.R., Nicol, C.W., and Bredin, S.S.D. (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *Canadian Medical Association Journal* 174, 801.
89. Weseler, A. (2013). Über den Genen: Epigenetik - Teil 1. *Apothekenmagazin*.
90. White, A.J., Sandler, D.P., Bolick, S.C.E., Xu, Z., Taylor, J.A., and DeRoo, L.A. (2013). Recreational and household physical activity at different time points and DNA global methylation. *European Journal of Cancer* 49, 2199-2206.
91. World Health, O. (2009). *Global health risks : mortality and burden of disease attributable to selected major risks* (Geneva: World Health Organization).
92. World Health, O. (2010). *Global recommendations on physical activity for health* (Geneva: World Health Organization).
93. World Medical, A. (2013). *World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*. *JAMA* 310, 2191-2194.
94. Yang, A.S., Estécio, M.R.H., Doshi, K., Kondo, Y., Tajara, E.H., and Issa, J.P.J. (2004). A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research* 32, e38-e38.
95. Zeng, H., Irwin, M.L., Lu, L., Risch, H., Mayne, S., Mu, L., Deng, Q., Scarampi, L., Mitidieri, M., Katsaros, D., Yu, H. (2012). Physical activity and breast cancer survival: an epigenetic link through reduced methylation of a tumor suppressor gene L3MBTL1. *Breast Cancer Research and Treatment* 133, 127-135.
96. Zhang, F.F., Cardarelli, R., Carroll, J., Zhang, S., Fulda, K.G., Gonzalez, K., Vishwanatha, J.K., Morabia, A., and Santella, R.M. (2011). Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. *Epigenetics* 6, 293-299.

97. Zhang, F.F., Santella, R.M., Wolff, M., Kappil, M.A., Markowitz, S.B., and Morabia, A. (2012). White blood cell global methylation and IL-6 promoter methylation in association with diet and lifestyle risk factors in a cancer-free population. *Epigenetics* 7, 606-614.
98. Zhang, Y., Hashimoto, S., Fujii, C., Hida, S., Ito, K., Matsumura, T., Sakaizawa, T., Morikawa, M., Masuki, S., Nose, H., Higuchi, K., Nakajima, K., Taniguchi, S. (2015). NFκB2 Gene as a Novel Candidate that Epigenetically Responds to Interval Walking Training. *Int J Sports Med* 36, 769-775.
99. Zhao, M.-T., Whyte, J.J., Hopkins, G.M., Kirk, M.D., and Prather, R.S. (2014). Methylated DNA Immunoprecipitation and High-Throughput Sequencing (MeDIP-seq) Using Low Amounts of Genomic DNA. *Cellular Reprogramming* 16, 175-184.
100. Ziller, M.J., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, L.T.Y., Kohlbacher, O., De Jager, P.L., Rosen, E.D., Bennett, D.A., Bernstein, B.E., Gnirke, A., Meissner, A. (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500, 477-481.

## 8 TABELLARISCHER ANHANG

<b>Tabelle 1:</b> Technische Geräte .....	34
<b>Tabelle 2:</b> Verbrauchsmaterialien.....	35
<b>Tabelle 3:</b> Reagenzien und Chemikalien .....	36
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Primer .....	37
<b>Tabelle 5:</b> Anthropometrische Daten zum Teilnehmerkollektiv (n = 12) .....	38
<b>Tabelle 6:</b> Anthropometrische Daten der einzelnen Probanden .....	38
<b>Tabelle 7:</b> Ergebnisse der Peak Power-Messung und Ableitung der Belastungsintensitäten..	41
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete DNA-Proben der Probanden 1-12 .....	46
<b>Tabelle 9:</b> Erstellung der Standardreihe .....	51
<b>Tabelle 10:</b> 5mc%-Mittelwerte (48) aller Studienteilnehmer (n = 12).....	61
<b>Tabelle 11:</b> Tests auf Normalverteilung für die einzelnen Interventionen .....	62
<b>Tabelle 12:</b> Veränderung des DNA-Methylierungslevel durch die unterschiedlich intensiven Trainingsintensitäten (85% und 50% Peak Power).....	63
<b>Tabelle 13:</b> Tests auf Normalverteilung für die Differenzen.....	65
<b>Tabelle 14:</b> Test bei gepaarten Stichproben .....	65
<b>Tabelle 15:</b> Intra-Assay-Messungen aus je 8 Messungen zweier Proben in unterschiedlichen ELISAs .....	68

---

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Einfluss der Epigenetik auf die Genotyp → Phänotyp-Interaktion .....	13
<b>Abbildung 2:</b> Entwicklung der Publikationsanzahl zum Thema Epigenetik .....	14
<b>Abbildung 3:</b> Ablauf der DNA-Methylierung und -Demethylierung; .....	15
<b>Abbildung 4:</b> Zeitstrahl der Intervention (PP = Peak Power, B = Blutprobe) .....	40
<b>Abbildung 5:</b> DNA-Extraktion.....	44
<b>Abbildung 6:</b> Beispielmessung mit dem NanoDrop 2000c.....	45
<b>Abbildung 7:</b> Bisulfitequenzierung - Ablauf am Beispiel eines einzelnen DNA-Stranges...	49
<b>Abbildung 8:</b> Pipettierschema Methyl-ELISA.....	52
<b>Abbildung 9:</b> Farbreaktion DS .....	53
<b>Abbildung 10:</b> Farbreaktion SS.....	53
<b>Abbildung 11:</b> Farbreaktion der Kontrollreihe sowie eines Farbverlaufbeispiels beim Methyl-ELISA nach Hinzugabe von: DS und SS .....	53
<b>Abbildung 12:</b> Studiendesign mit Darstellung der zueinander abhängigen Stichproben, die im t-Test miteinander verglichen werden .....	57
<b>Abbildung 13:</b> Beispiel einer Standardkurve der Positivkontrollreihe .....	58
<b>Abbildung 14:</b> Graphische Datenverteilung in Form von Box Plots .....	60
<b>Abbildung 15:</b> Vergleich der prozentualen Veränderung des durchschnittlichen DNA-Methylierungsgrades vor und nach sportlicher Intervention.....	64
<b>Abbildung 16:</b> Verteilung der Differenzen der DNA-Methylierungslevel .....	64
<b>Abbildung 17:</b> Beispiel einer Gelelektrophorese im Anschluss an eine Methylierungsspezifische PCR.....	69

## 10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5caC	5-Carboxylecytosin
5fC	5-Formylcytosin
5hmC	5-Hydroxylecytosin
5mC	5-Methylcytosin
A	Adenin
AAA	Abdominelle Aortale Aneurysmen
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
AZA	Azathioprin
B1 – B4	Blutproben, nummeriert von 1-4
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
BRCA1	Breast Cancer Gene, isoform 1
C	Cytosin
CH <sub>3</sub>	Methyl-Gruppe
CpG	5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'
CV%	coefficient of variation (Variationskoeffizient)
d	Effektstärke
df	Freiheitsgrade (degrees of freedom)
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DS	Developer Solution
EDN1	Endothelin, isoform 1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
ES	Enhancer Solution
FLT3	FMS-like Tyrosine Kinase 3
fw	forward
g	Gramm
G	Guanin

GenDG	Gendiagnostikgesetz
GSTP1	Glutathion-S-Transferase, isoform 1
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HF	Herzfrequenz
HRAS	Harvey-Ras Gen (Ras = Rat sarcoma)
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit
L3MBTL1	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein, isoform 1
LDL	low-density lipoprotein
LINE	long interspersed nuclear elements
LUMA	luminometric methylation assay
m	Masse
M.	Musculus
M-Reaktion	Methylierte Reaktion (im Zuge der MSP)
MW	Mittelwert
MBD	Methyl-CpG binding domain
MET	metabolic equivalent
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
MSP	Methylierungs-spezifische PCR
M. SssI	verwendete Methyltransferase
NaHSO <sub>3</sub>	Natriumbisulfit
NC	Negativkontrolle
NGS	Next-Generation-Sequencing
NFκB2	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer, isoform 2
NOS2	NO-Synthase, isoform 2 [NO = Stickstoffmonoxid]
OD	Optische Dichte
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PC	Positivkontrolle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK-4	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4
PGC-1α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

---

PP	Peak Power
PPAR- $\delta$	peroxisome proliferator-activated receptor-delta
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
Rb	Retinoblastom
RCT	randomisiert kontrollierte Studie
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Standardabweichung
SI	Signal Inductor
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TDG	Thymin-DNA-Glykosylase
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
TET	Ten-eleven translocation
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U-Reaktion	Unmethylierte Reaktion (im Zuge der MSP)
UHRF	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains
UTR	untranslated region
UV	ultraviolett
WHO	World Health Organisation
VO <sub>2max</sub>	maximale Sauerstoffaufnahme

## 11 DANKSAGUNG

Aufgrund meiner jahrelangen Erfahrung als Fußballtrainer hatte ich vor Beginn des Medizinstudiums eine große Leidenschaft für die Orthopädie und Sportmedizin entwickelt. Bei der Suche nach einem geeigneten Thema für meine Dissertation stand dieses Interesse für mich im Vordergrund, um stets motiviert und zielstrebig an der Doktorarbeit zu arbeiten.

Obwohl ich mit Beginn des klinischen Abschnittes nach einer passenden Stelle als Doktorand gesucht habe, hat es über ein Jahr Zeit, mehrere Absagen und viel Hartnäckigkeit gebraucht, bevor ich über Umwege zu dem Thema dieser Dissertation gekommen bin.

Der Weg von der Formulierung des Themas über die Rekrutierung der Probanden, der Absolvierung des Sportprogramms, der Laborarbeit bis hin zum endgültigen Verfassen der Dissertation hat im Sommer 2018 begonnen. In diesen knapp 3 Jahren gab es viele Menschen, die an mich glaubten und mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Nils von Neuhoff, für seine Betreuung, Geduld und die Möglichkeit, zu diesem innovativen Themengebiet zu forschen. Dadurch war es mir möglich meine Leidenschaft für die Sportmedizin auch in meiner Doktorarbeit zu integrieren und zusätzlich viel Methodisches zu lernen. Herrn Prof. Dr. med. Dirk Reinhardt möchte ich dafür danken, dass ich meine Dissertation in der Kinderklinik III des Universitätsklinikums Essen verfassen durfte und dass er den Kontakt zu Prof. von Neuhoff hergestellt hat.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Nicolas Kurpiers, Kalonike Klocke und ganz besonders Nico de Lazzari als Kooperationspartner der Sportwissenschaft der Universität Hildesheim.

Für die Einführung, die Tipps und die Unterstützung im Labor möchte ich mich herzlichst bei den Mitarbeitern des AML-BFM Referenzlabors und des Hämatologie-Labors in der Kinderklinik III bedanken. Hervorzuheben sind dabei Frau Anja Rieb und Dr. rer. nat. Markus Schneider, die meine Arbeit im Labor durch ihre ausgezeichnete Betreuung bestmöglich förderten. Prof. Dr. rer. medic. Ivo Bendix möchte ich für die Einweisung und die Zugangsmöglichkeit zum Micro Plate Reader danken.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie und meinen Freunden, die für mich während des gesamten Studiums und insbesondere im Laufe des Promotionsverfahrens die größte moralische Stütze darstellten und mir immer die Zuversicht gaben, alle Ziele zu erreichen, die ich mir gesetzt habe.

## 12 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.