

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

Vorstand: Prof. Dr. S. Massberg

„Telomerlängenanalysen bei Patienten mit Vorhofflimmern“

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

vorgelegt von Danny Kupka
aus Sömmerda
Jahr 2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Moritz Sinner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. C. Reithmann
Priv. Doz. Dr. M. Weigl
Priv. Doz. Dr. N. Sarafoff

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: Donnerstag, den 22.10.2020

Inhaltsangabe

	Inhaltsangabe.....	3 - 4
	Zusammenfassung	5 - 6
	Abkürzungen	7
1	Einleitung	8- 14
1.1	Vorhofflimmern	7
1.1.1	Allgemeine Aspekte	7
1.1.2	Diagnostik des Vorhofflimmerns	8
1.1.3	Therapie des Vorhofflimmerns9 - 12
1.2	Telomere und Kardiovaskuläre Erkrankungen	12 - 13
1.3	Telomere und Vorhofflimmern.....	13 - 14
2	Rationale der Studie.....	15
3	Material und Methoden	16 - 20
3.1	Beschreibung der Kohorten	16 - 17
3.2	DNA-Isolation und Präparation von DNA-Standards aus Blutproben	17
3.3	Quantitative Realtime-PCR	17 - 19
3.4	Statistische Analyse	19 - 20
4	Ergebnisse	21 - 33
4.1	Globale Analysen von KORA F4 und AFLMU	21 - 30
4.1.1	Baseline Charakteristika von KORA F4 und AFLMU	21 - 22
4.1.2	Plausibilitätsanalysen der Telomermessungen in KORA F4 und AFLMU	22 - 28
4.1.2.1	Analyse der Telomermessungen in KORA F4 mit kardiovaskulären Risikofaktoren	25 - 26
4.1.2.2	Subanalyse einer Gender Kohorte	27 - 28

4.1.3	Analyse der Telomermessungen für Vorhofflimmern in KORA F4 und AFLMU	28 - 30
4.2	Propensity Score gematchte Analyse der Telomermessungen für Vorhofflimmern in KORA F4 und AFLMU	30 - 33
4.2.1	Basischarakteristik der Propensity Score gematchten Kohorte ...	30 - 31
4.2.2	Telomeranalyse der Propensity Score gematchten Kohorte	31 - 33
5	Diskussion	34 - 39
5.1	Telomerlängen als Biomarker	35 - 36
5.2	Telomerlängen und kardiovaskuläre Erkrankungen	36 - 37
5.3	Telomerlängen und Vorhofflimmern	37
5.4	Limitationen der Studie	38
5.5	Ausblick	38 - 39
	Referenzen	40 - 42
	Lebenslauf	43

Zusammenfassung

Vorhofflimmern stellt die häufigste Herzrhythmusstörung der westlichen Welt dar und führt unbehandelt durch die Verursachung von Schlaganfällen zu erheblichen Gesundheitskosten. Neben kardiovaskulären Erkrankungen spielt das Lebensalter bei der Entwicklung von Vorhofflimmern eine entscheidende Rolle. Telomere sind neben dem numerischen Lebensalter ein anerkannter Biomarker für das Fortschreiten biologischer Seneszenzprozesse. Die Telomerdynamik und -länge ist bei Individuen mit Vorhofflimmern jedoch nur unzureichend in kleineren epidemiologischen Studien untersucht worden und die Ergebnisse bezüglich einer pathogenetischen Bedeutung der altersassoziierten Telomerverkürzung oder die Nutzung von Telomerlängen als Biomarker sind inkongruent.

In einer großen epidemiologischen Arbeit, analysierten wir Telomerlängen mittels quantitativer Real-Time PCR bei Patienten mit Vorhofflimmern (AFLMU, n = 2475) im Vergleich zu einer Bevölkerungs-basierten Referenzkohorte (KORA F4, n = 3077). Wir fanden kürzere Telomere bei Rauchern, bei Patienten mit arterieller Hypertonie oder nach Myokardinfarkt und bei Individuen mit männlichem Geschlecht. Patienten mit Vorhofflimmern wiesen signifikant kürzere Telomere auf als Vorhofflimmer-freie Kontrollprobanden (Telomerlänge KORA F4: 13,27 [11,94, 13,69] versus Telomerlänge AFLMU: 9,81 [5,98, 13,10], $p < 0,001$). Eine multivariabel adjustierte, logistische Regressionsanalyse identifizierte neben arterieller Hypertonie, männlichem Geschlecht, Body-Mass-Index und Diabetes mellitus eine signifikante Interaktion zwischen Telomerlänge und Vorhofflimmern (Odds Ratio pro Einheit höhere Telomerlänge: 0,77 [95% Konfidenzintervall 0,74 - 0,77], $p < 0,001$). Dieses Ergebnis war robust im Rahmen einer zusätzlichen Propensity Score - gematchten Analyse der AFLMU und KORA F4 Kohorten (Odds Ratio 0,75 [0,73, 0,60], $p < 0,001$).

Unsere Daten demonstrieren somit, dass kürzere Telomere, hypothesen-gemäß also ein höheres biologisches Alter, mit einer erhöhten Inzidenz von Vorhofflimmern einhergehen. Wir postulieren daher, dass die Telomerlänge einen Risikomarker für Vorhofflimmern darstellt, dessen Bestimmung möglicherweise zu einer verbesserten diagnostischen und therapeutischen Stratifizierbarkeit betroffener Patienten führen kann.

Abkürzungen

BMI... body mass index

CHA2DS2-VASc-Score ... Congestive Heart failure, hypertension, Age ≥ 75 , Diabetes, Stroke, Vascular disease, Age 65–74, and Sex (female)

CI ... Konfidenzintervall

CT ... cycle threshold

CVRF ... kardiovaskuläre Risikofaktoren

DOAC... Direkte orale Antikoagulantien

EKG ... Elektrokardiogramm

IQR ... Interquartilenrange

MRT ... Magnet Resonanz Tomographie

OAK ... orale Antikoagulation

PCR ... Polymerasekettenreaktion

qPCR ... quantitative Polymerasekettenreaktion

TL ... Telomerlänge

1 Einleitung

1.1 Vorhofflimmern

1.1.1 Allgemeine Aspekte

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung der westlichen Welt und angesichts einer steigenden Inzidenz und Prävalenz innerhalb der alternden Gesellschaft mit signifikant erhöhter kardiovaskulärer Mortalität ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem unserer Bevölkerung [1].

Das Risiko an Vorhofflimmern zu erkranken steigt mit dem Alter stark an. Zusätzlich wird es durch das Vorliegen bestimmter Komorbiditäten oder anderer physiologischer oder pathophysiologischer Bedingungen erhöht. Hierzu zählen signifikante Transformationsprozesse der extrazellulären Matrix im Sinne von fibrotischen Umbauprozessen oder inflammatorischen Erkrankungen, Myozytenapoptose sowie sympathischen Einflüssen des Nervensystems [2]. Eine Stratifizierung basierend auf solchen Einflussfaktoren könnte dazu beitragen, die zugrundeliegenden Ursachen des Vorhofflimmerns besser zu charakterisieren und in ein integriertes Therapiekonzept der Komorbiditäten und des Vorhofflimmerns selbst miteinzubeziehen.

Einen besonders starken Einfluss auf die pathophysiologischen Veränderungen und das Vorhofflimmern haben schwere Herzklappenvitien und hier insbesondere die Mitralklappenstenose. Definitionsgemäß sprechen wir dann von valvulärem Vorhofflimmern. Die Betrachtungen im Rahmen der Dissertation werden sich jedoch nur auf das epidemiologisch deutlich häufigere, nicht-valvuläre Vorhofflimmern beziehen. Auch die Dauer von Vorhofflimmern wird hat profibrotische Effekte, sodass Vorhofflimmern wird zusätzlich nach Länge der Vorhofflimmerepisode in paroxysmal,

persistierend und permanent eingeteilt wird [2, 3]. Auch die Dauer von Vorhofflimmern hat profibrotische Effekte.

1.1.2 Diagnostik des Vorhofflimmerns

Vorhofflimmern verursacht oft typische Symptome und geht mit einer absoluten Arrhythmie einher. Typische Symptome sowie der Nachweis einer absoluten Arrhythmie können daher diagnostische Hinweise geben, zur Sicherung der Diagnose ist jedoch ein EKG unerlässlich. Vorhofflimmern ist häufig vergesellschaftet mit anderen kardiovaskulären Erkrankungen. Insofern profitieren Vorhofflimmerpatienten initial und im Follow Up von einer umfassenden kardialen Diagnostik. Eine komplette Anamnese und körperliche Untersuchung mit Einschätzung des Schlaganfall- und Blutungsrisikos gehören neben apparativen Verfahren wie 12-Kanal-EKG und Echokardiographie zum Standard einer Patientenevaluation. Zusätzlich kann ein Langzeit-EKG Informationen zur adäquaten Herzfrequenzkontrolle geben [2, 4]. Die transösophageale Echokardiographie eignet sich, bestimmte Herzklappenfehler z.B. Mitralklappenstenosen oder -insuffizienzen festzustellen und zu graduieren. Ebenso können auch Thromben im Vorhof als Ursache und Risikofaktor für einen möglichen Schlaganfalls detektiert werden. Beim Verdacht, dass der Patient bereits einen Schlaganfall erlitten hat, führt typischerweise ein Schädel-MRT in der Diagnostik weiter [4].

1.1.3 Therapie des Vorhofflimmerns

Ein strukturierter Ansatz ist grundlegend für die effektive Therapie von Vorhofflimmern. Neben der Prävention eines thrombembolischen Geschehens (Emboliekontrolle),

stehen die Herzfrequenzkontrolle (Frequenzkontrolle) und Wiederherstellung und Aufrechterhaltung eines Sinusrhythmus (Rhythmuskontrolle) im Vordergrund[5].

Eine suffiziente orale Antikoagulationstherapie (OAK) kann die Mehrzahl der ischämischen Schlaganfälle bei Patienten mit Vorhofflimmern verhindern und kann das Leben verlängern. Die OAK ist dabei einer reinen Thrombozytenhemmung mit Aspirin überlegen [2]. Auch wenn die orale Antikoagulation ein Blutungsrisiko darstellt, bedingt die Reduktion des erheblichen Schlaganfallrisiko ohne OAK - auch bei älteren Menschen - häufig einen klinischen Nettonutzen für den Patienten[6]. Als orale Antikoagulationen eignen sich zum einen konventionelle Vitamin K-Antagonisten wie Marcumar, insbesondere aber auch neuere Gerinnungshemmer (DOACs) wie der direkte Thrombininhibitor Dabigatran oder die Gerinnungsfaktor Xa-Inhibitoren Apixaban, Edoxaban oder und Rivaroxaban.

Etablierte klinische Risiko-Scores geben wichtige Hinweise, ob ein Patient mit Vorhofflimmern eine orale Antikoagulation einnehmen sollte. In der klinischen Praxis hat sich der CHA₂DS₂-VASc Score flächendeckend durchgesetzt (**Tabelle 1**):

Komponente	Kondition	Punkte
C... <i>congestive heart failure</i>	Herzinsuffizienz	+1
H... <i>hypertension</i>	Blutdruck zweimal > 140/80 mmHg oder antihypertensive Therapie	+1
A... <i>age</i>	> 75 Jahre	+2
D... <i>diabetes mellitus</i>	Diabetes Mellitus	+1
S... <i>stroke</i>	Schlaganfall, TIA, systemische Thrombembolie	+2
V... <i>vascular disease</i>	Myokardinfarkt, pAVK, Aortenplaque	+1
A... <i>age</i>	65-75 Jahre	+1
Sc... <i>sex category</i>	weibliches Geschlecht	+1

Tabelle 1: Klinische Risikofaktoren und Berechnung des CHA₂DS₂-VASc Scores. pAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit, TIA = transiente ischämische Attacke.

Im Allgemeinen benötigen Vorhofflimmerpatienten ohne klinische Schlaganfallrisikofaktoren keine antithrombotische Therapie, während Patienten mit Schlaganfallrisikofaktoren (d.h. CHA₂DS₂-VASc-Score ≥ 1 für Männer und ≥ 2 für Frauen) in vielen Fällen von oraler Antikoagulation profitieren[7].

Die Rhythmuskontrolle dient der Wiederherstellung eines Sinusrhythmus. Hiervor sollte eine ausreichend lange, suffiziente orale Antikoagulation sichergestellt sein; alternativ können mögliche Thromben im linken Vorhof oder Vorhof mittels transösophagealer Echokardiographie identifiziert werden. Akut kann ein Sinusrhythmus beispielsweise mit antiarrhythmischen Medikamenten wie Amiodaron und Flecainid wiederhergestellt werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die elektrische Kardioversion dar, bei der in Kurznarkose durch herzfrequenzsynchrone DC-Schockabgabe ein Sinusrhythmus erzeugt werden kann [8]. Im Anschluss an eine

Kardioversion ist auch bei Patienten ohne dauerhafte Indikation zur oralen Antikoagulation eine solche Therapie für mindestens vier Wochen notwendig.

Im Akutfall-, aber auch bei frustranen Versuchen den Patienten in den Sinusrhythmus zu konvertieren, kommt die Frequenzkontrolle als therapeutische Option zum Tragen[2]. Als initiale Medikamente bei ausreichendem Blutdruck kommen Betablocker und Calciumantagonisten wie Verapamil oder Diltiazem in Frage. Alternativ und additiv können auch Digoxin oder Digitoxin unter Beachtung der Kontraindikationen verabreicht werden. Auch Amiodaron kann in speziellen Situationen zur Frequenzkontrolle eingesetzt werden.

Neben der medikamentösen Therapie besteht seit vielen Jahren auch die Möglichkeit einer interventionellen Therapie mittels Katheterablation [9]. Im Vordergrund steht hierbei die Katheter-basierte Isolation der Pulmonalvenen als typischem Entstehungsort von Vorhofflimmertriggern. Die Ablation kann dabei mittels Radiofrequenzenergie, Kryoenergie oder anderen Energieformen durchgeführt werden. Bei fortgeschrittenen Formen von Vorhofflimmern können neben den Pulmonalvenen auch weitere strukturelle Ablationsziele in den Vorhöfen angegangen werden. Die Ablation dient typischerweise der Rhythmuskontrolle. Eine ultimative Möglichkeit der Frequenzkontrolle stellt die AV-Knoten-Ablation dar in Verbindung mit einer dann obligaten Schrittmacherversorgung dar [10].

1.2 Telomere und Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kürzlich wurde ein chromosomaler Mechanismus, die Verkürzung der Telomere, als wesentlicher Mechanismus beschrieben, durch genetische und Umweltfaktoren das biologische Altern und damit möglicherweise das Risiko für die Entwicklung von altersassoziierten Krankheiten zu erfassen [11]. Telomere sind aus

molekularbiologischer Sicht die äußersten Enden von Chromosomen und verkürzen sich während jedes Zellzyklus konsekutiv. Sie können daher als Indikator für das biologische Alter angesehen werden. So ist bei Herzinsuffizienz beispielsweise die Telomerlänge im Vergleich zu Gesunden stark reduziert [12].

Wenn verkürzte Telomere und verminderte Telomeraseaktivität tatsächlich eine Rolle bei der Pathogenese von Herz-Kreislauf-Erkrankungen spielen, bietet dies spezifische diagnostische Möglichkeiten und kann bei der pathophysiologischen Stratifizierung der Erkrankungen helfen. Telomerlängen sind sowohl im peripheren Blut aus weißen Blutzellen oder als auch aus Gewebe, also beispielsweise Herzmuskelzellen, messbar. Eine Verkürzung dieser Telomerlängen könnte also einen quantifizierbaren Marker für ein fortgeschrittenes biologisches Alter darstellen, in dessen Zuge es zum Auftreten einer kardiovaskulären Erkrankung kommt [11, 13]. Ein solcher molekularbiologischer Ansatz könnte dabei präziser sein als nur die reine Berechnung des kalendarischen Patientenalters. Der gängige CHA₂DS₂-VASc-Score, welcher das Kalender-Alter des Patienten erfasst, könnte so um ein biologisches Alter ergänzt werden. In Zukunft könnten so dann auch individualisierte therapeutische Strategien zum Tragen kommen und Patienten einer an ihr biologisches Alter angepassten Therapie zugeführt werden.

1.3 Vorhofflimmern und Telomere

Das Altern spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Vorhofflimmern, erhöht das Risiko von Komorbiditäten und steigert das Risiko für Komplikationen wie Schlaganfälle und Herzinsuffizienz [14]. Die Prävalenz von Vorhofflimmern nimmt mit steigendem Alter zu und erreicht circa 8% in der über 80-jährigen Bevölkerung [15, 16]. Ungefähr 70% der Vorhofflimmerpatienten sind zwischen 65-80 Jahre [17].

Vorhofflimmern tritt bei Männern häufiger auf als bei Frauen, wobei Männer gleichzeitig relativ kürzere Telomere haben [18].

Kürzere Telomerlängen sind mit Fibrose und Entzündungsprozessen assoziiert und könnten daher auch im atrialen Remodellingprozess bei der Entwicklung von Vorhofflimmern eine Rolle spielen [19]. Einen möglichen Pathomechanismus könnte oxidativer Stress darstellen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Dysregulationen des autonomen Nervensystems, die ebenso mit kürzeren Telomeren einhergehen einen begünstigenden Faktor für Vorhofflimmern darstellen [20]. Jedoch sind sowohl die Assoziation zwischen Telomerlänge und Vorhofflimmern als auch die möglicherweise zugrundeliegenden, pathophysiologischen Mechanismen nur unzureichend geklärt [21].

2 Rationale der Studie

Die Inzidenz von Vorhofflimmern nimmt mit dem Alter stark zu. Da Vorhofflimmern und kardiovaskuläre Erkrankungen häufig nebeneinander bestehen und beide Erkrankungen die Prognose des Patienten maßgeblich beeinflussen, ist ein tieferes Verständnis der molekularen Korrelate des Alterns bei Vorhofflimmern von besonderem Interesse. Die Telomerlänge ist ein wesentlicher Biomarker für das Altern in epidemiologischen Analysen zum Thema Altern. Mit zunehmendem Alter nimmt dabei die Telomerlänge kontinuierlich ab [11]. Es ist somit möglich, dass die individuelle Telomerlänge über das Kalender-Alter des Patienten hinaus ein Marker für das biologische Alter des Patienten ist. Über diese Verbindung könnte eine Assoziation von Telomerlängen und Vorhofflimmern bestehen. Die bisherigen Analysen zum Thema Vorhofflimmern und Telomerlängen sind inkonsistent. So gibt es Analysen, die eine Assoziation mit dem Alter zeigen [22, 23], und andere, die keine Assoziation darstellen können [24, 25]. Einschränkend ist festzustellen, dass in den meisten Analysen nur relativ wenige Patienten mit Vorhofflimmern untersucht wurden, sodass die statistische Aussagekraft nur eingeschränkt ist. In der vorliegenden Arbeit ist es daher unser Ziel, die Hypothese einer Assoziation zwischen Telomerlänge und Vorhofflimmern in einer ausreichend großen und unseres Wissens nach größten Kohorte von Individuen mit und ohne Vorhofflimmern zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Beschreibung der Kohorten

Patienten mit Vorhofflimmern entstammen der Arrhythmia Biobank LMU im Kontext der MED Biobank LMU (AFLMU). Hierbei handelt es sich um Patienten mit Vorhofflimmern, die seit 2005 prospektiv rekrutiert wurden. Präferentiell wurden solche Patienten eingeschlossen, die zum Erkrankungszeitpunkt ≤ 60 Jahre alt waren. Neben einer detaillierten klinischen Charakterisierung wurde allen Patienten eine Blutprobe zur Isolation von DNA entnommen. Alle Patienten haben sich zur Teilnahme an AFLMU einverstanden erklärt. Die Rekrutierung wurde von der Ethikkommission bei der LMU positiv bewertet.

Bei der KORA Studie (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) handelt es sich um eine prospektive, Bevölkerungsbasierte Erhebung in mehreren voneinander unabhängigen Surveys. Der Survey S4 erfolgte zwischen 1999 und 2001. Der F4-Survey stellt eine Follow-Up Untersuchung der S4-Teilnehmer dar und erfolgte zwischen 2006 und 2008. Alle Teilnehmer erhielten eine detaillierte Charakterisierung sozio-demographischer und krankheitsbasierter Faktoren. Weiterhin wurde von allen Teilnehmern eine Blutprobe zu Zwecken der molekulargenetischen Untersuchung erhoben. Die KORA-Studie und Ihre Teilstudien wurden von der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer positiv befürwortet.

Zu Zwecken der Standardisierung der Telomerlängenbestimmung wurden zusätzlich Standard-DNA Proben generiert. Hierzu wurden anonymisierte Vollblutproben aus dem Routinelabor des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München gepoolt. Die Richtlinien der Ethikkommission bei der Ludwig-Maximilians-Universität erfordern für diese anonymisierte Bearbeitung keine spezifische Ethikerklärung. Die Proben wurden am Tag der Entnahme nach Geschlecht und

Anzahl der weißen Blutkörperchen der Patienten zusammengefasst. Es entstanden 4 Pools von Männern und 4 Pools von Frauen, die nach erfolgter DNA-Isolation als Standard gepoolt wurden.

3.2 DNA-Isolation und Präparation von DNA-Standards aus Blutproben

In AFLMU und KORA-F4 lag zur Verwendung fertige DNA vor. Diese wurde jeweils aus Vollblut mit Hilfe einer publizierten Aussalzmethode generiert und bis zur Verwendung gelagert [26]. Für die anonymisierten Vollblutproben für die Standard-DNAs aus dem Routinelabor erfolgte die Aufbereitung genomischer DNA aus Citratblut. Die Proben wurden mit Lysepuffer aufgeschlossen, Propanol zugegeben und die Lysate auf die eine QIAamp-Spin-Säule (QiaGen) geladen. Zunächst wurde die Säule mit Waschpuffer versetzt und die reine, gebrauchsfertige DNA wurde dann in Wasser eluiert. Die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop (ThermoFisher) bestimmt. Hieraus wurden die DNA-Standards angefertigt, die in mehreren Konzentrationen (64 µg/µL, 32 µg/µL, 16 µg/µL, 8 µg/µL, 4 µg/µL, 2 µg/µL und 1 µg/µL) bei -80°C aufbewahrt wurden.

3.3 Quantitative PCR

Für die Telomerlängen (TL) -Messung wurde eine qPCR-basierte Methode aus dem von Cawthon et al. verwendeten Protokoll adaptiert [27]. Die Quantifizierung erfolgte mit dem SensiMix SYBR No-ROX Kit (Bioline) und die resultierenden CT-Werte wurden nach Pfaffl et al. berechnet [27, 28]. Die Daten wurden auf das Single-Copy-Gen (SCG) 36B4 normalisiert, das unter Verwendung bereits veröffentlichter Primer quantifiziert wurde. Die nachfolgende, x-fache Genexpression wurde entsprechend

berechnet. Alle qPCRs wurden in 384-Well-Platten auf einem ViiA7 Real-Time PCR Cycler (Life Technologies) durchgeführt. Es wurde ein TaqMan Multiplex-Assay zur gleichzeitigen Messung von TL und SCG in einem einzelnen Well erstellt. Zu diesem Zweck wurde eine Sonde mit 5'-LC610-Fluorophor und 3'-BHQ-2-Markierung (Eurofins-MWG) zum Nachweis des Einzelkopie-Gens verwendet. Die Sequenzen für Sonde und Primer waren wie folgt:

Tel1b: 5'- CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT -3';

Tel2b: 5'- GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT -3';

36B4 fwd: 5'- CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC -3';

36B4 rev: 5'- CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A -3';

36B4 probe: 5'- LC610-CGG ATT TCT TCA GCT TGT GCT TGT CTC CCT-BHQ2-3'.

Die Reaktionskomponenten sind in **Tabelle 2** dargestellt.

Komponente der qPCR	Molarität (nmol/L)	Volumen [μ L]
SensiMix SYBR (no ROX)	---	5.0
36B4 forward Primer	300	0.6
36B4 reverse Primer	500	1.0
36B4 Sonde	200	0.4
Tel1b primer	300	0.6
Tel2b primer	300	0.6
Wasser	---	1.8
Summe		10 μ L

Tabelle 2. TaqMan qPCR Komponenten.

Jede Probe wurde als Triplet ausgeführt. Standards befanden sich zufällig verteilt auf der 384-Well-Platte. Aufgrund der unterschiedlichen Lichtabsorptions- und Emissionsmaxima von SYBR green I (495 nm bzw. 520 nm) und LC610 (590 nm bzw.

610 nm) wurden Telomere und SCG gleichzeitig ohne Signalstörungen bei der Durchführung der qPCR erfasst. Das Reaktionsschema und die PCR Bedingungen sind in **Tabelle 3** zusammengefasst.

Temperatur	Zeit
95°C	10 min
40 Zyklen	
95°C	15 s
58°C	60 s
72°C	10 min
37-95°C	Schmelzkurve
4°C	unendlich

Tabelle 3. TaqMan PCR Parameter.

3.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Prism (Version 8), SPSS 26 und Microsoft Excel (Version 2016) durchgeführt. Die Auf Vorliegen einer Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test getestet. Der Vergleich zweier Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test für nicht normalverteilte Daten, oder dem Welch-t-Test oder bzw. dem Student-t-Test für normalverteilte Daten mit ungleichen oder bzw. gleichen Varianzen durchgeführt. Die DNA-Extraktionseffizienz wurde unter Verwendung einer linearen Regression getestet, wie in GraphPad PRISM (Version 8) bereitgestellt. Die

Δ CT- und $\Delta\Delta$ CT-Methoden wurden wie zuvor beschrieben berechnet [28-30]. Der CT-Wert gibt dabei die Anzahl an PCR-Zyklen an, ab dem ein qPCR-Produkt messbar wird. Je höher der CT-Wert ist, umso weniger Genaktivität ist im Versuchsansatz vorhanden. In unserem Fall bedeutet dies, dass ein höherer CT-Wert eine geringere Telomerlänge darstellt. Gleiches gilt für die Darstellung der Messungen als Δ CT. Targetgen (Telomer) und Housekeeping-Gen wurden parallel gemessen. Δ CT ist die Differenz von Targetgen und Housekeeping-Gen. Wir haben das Vorzeichen von Δ CT umgedreht, um in den graphischen Darstellungen mit der Bezeichnung „Telomerlänge bzw. -signal“ ein besseres Leserverständnis zu erreichen.

4 Ergebnisse

4.1 Globale Analysen in KORA F4 und AFLMU

4.1.1 Baseline Charakteristika in KORA F4 und der AFLMU

Wir analysierten zunächst die Basischarakteristika der Kohorten. Es waren insgesamt 3077 Individuen in KORA F4 und 2475 Individuen in AFLMU auswertbar. Demographische und klinische Daten der Kohorten werden in **Tabelle 4** gezeigt. Das Durchschnittsalter lag bei 56 Jahren in KORA F4 und bei 58 Jahren in AFLMU. In AFLMU fanden sich mit einem Anteil von 72,3% (n = 1796) mehr Männer. Der Body Mass Index (BMI) war bei beiden Kohorten ähnlich mit 27,6 kg/m² in KORA F4 und 27,8 kg/m² in AFLMU. Kardiovaskuläre Erkrankungen waren registerbedingt in AFLMU häufiger. Die Rate an Vorhofflimmern betrug 1.8% in KORA F4 und definitionsgemäß 100% in AFLMU Kohorte.

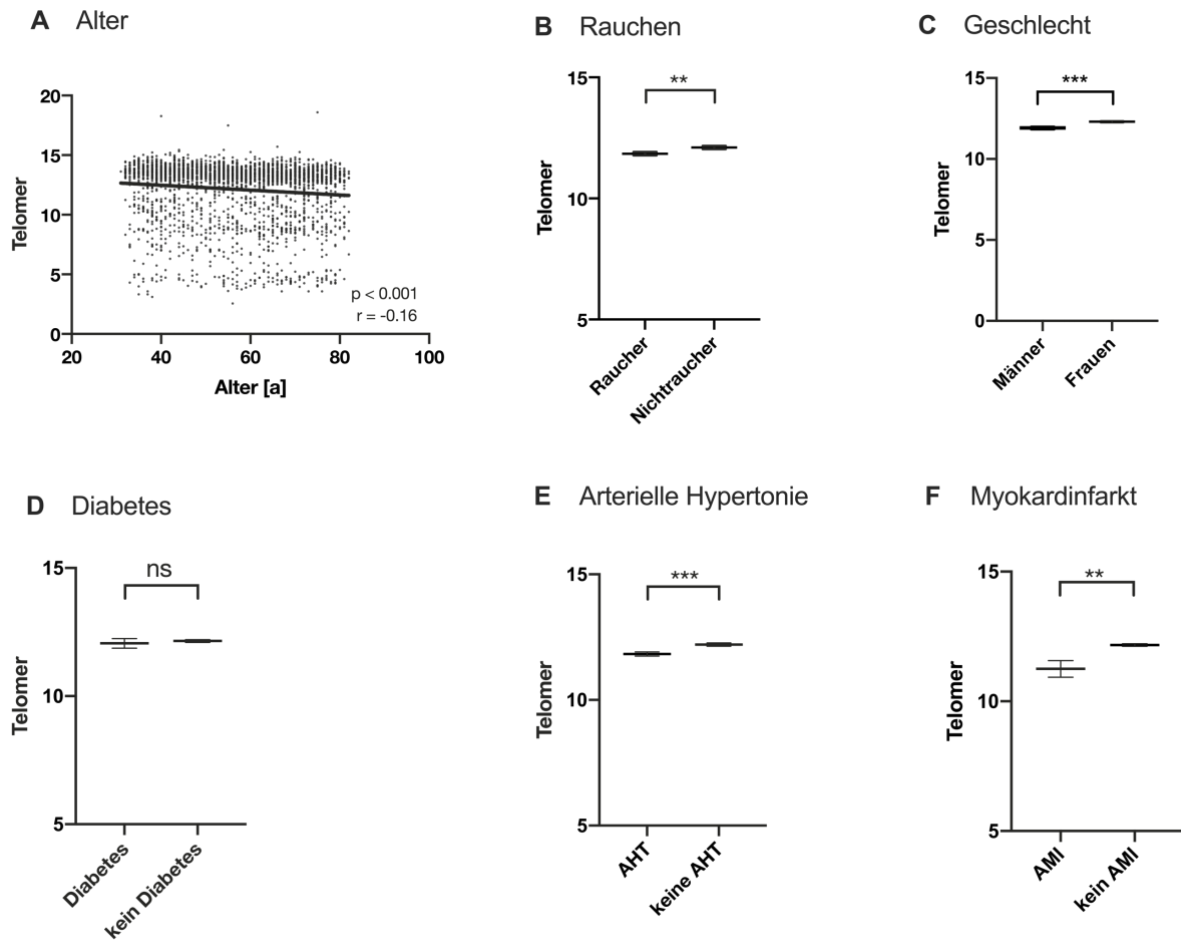
Charakteristik	KORA F4 (n = 3077)	AFLMU (n = 2475)	p Werte
Alter (Mean ± SD) – a	56 ± 13,2	58 ± 10,5	p < 0,001
Männliches Geschlecht – n (%)	1592 (51,7)	1798 (72,3)	p < 0,001
BMI (Mean ± SD) – kg/m²	27,6 ± 4,8	27,8 ± 4,8	p = 0,33
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Rauchen – n (%)	1277 (41,6)	1188 (48,0)	p < 0,001
Arterielle Hypertonie – n (%)	1175 (38,2)	1285 (57,1)	p < 0,001
Diabetes mellitus – n (%)	214 (7,0)	282 (11,4)	p < 0,001
Kardiovaskuläre Erkrankungen			
Schlaganfall - n (%)	64 (2,1)	91 (9,8)	p = 0,001
Herzinfarkt – n (%)	99 (3,2)	151 (6,8)	p < 0,001
Herzinsuffizienz – n (%)	n.a.	593 (39,2)	
Vorhofflimmern – n (%)	54 (1,8)	2475 (100)	p < 0,001

Tabelle 4. Die Charakteristika bei Baseline (Probenentnahme) in KORA F4 und AFLMU. SD = Standardabweichung, BMI = body mass index, n = Anzahl, n.a. = nicht verfügbar.

4.1.2 Plausibilitätsanalysen der Telomerlängenmessungen in KORA F4

Wir führten zunächst Plausibilitätsanalysen der Telomerlängen-Bestimmung in KORA F4 durch, indem wir bekannte Zusammenhänge zwischen Telomerlängen und Outcome an mehreren bekannten Parametern nachvollzogen. Hierzu verglichen wir Δ CT Werte der Telomerlängen-Messungen. Wie erwartet korrelierte das Alter mit

Telomerverkürzung (Pearson $r = -0,16$, $p < 0,001$); **Figur 1A**). Ebenso konnten wir positive, teilweise statistisch signifikante Korrelationen mit Rauchen (13,06 vs. 13,26, $p = 0,009$), mit arterieller Hypertonie (13,12 vs. 13,32, $p = 0,001$) und mit Myokardinfarkt (12,83 vs. 13,27, $p = 0,001$) nachweisen (**Figur 1B und E-F**). Frauen hatten wie erwartet in KORA F4 signifikant längere Telomere als Männer (13,34 vs. 13,16, $p = 0,001$). Im Vergleich dazu ergab sich beim Body Mass Index (BMI) eine schwache Korrelation mit dem Telomersignale ohne statistische Signifikanz (Pearson $r = -0,02$, $p = 0,08$). Bei Diabetikern versus Nichtdiabetikern zeigte sich kein Unterschied in den Telomerlängen (13,18 vs. 13,27, $p = 0,64$, **Figur 1D**). Zusammenfassend erscheint die angewendete Methode insgesamt plausibel. Wir halten es daher für gerechtfertigt, die hier generierten Daten für die Analyse der Telomerlängen in Bezug auf Vorhofflimmern zu verwenden.



Figur 1. Plausibilitätsanalysen der Telomermessung in KORA F4. (A) Korrelation der Telomerlänge mit dem Alter, (B) Telomerlängen bei Rauchern und Nichtrauchern, (C) Telomerlängen bei Männern und Frauen, (D) Telomerlängen bei Diabetikern und Nichtdiabetikern, (E) Telomerlängen bei Individuen mit arterieller Hypertonie (AHT) und ohne arterielle Hypertonie, (F) Telomerlängen bei Individuen mit und ohne Myokardinfarkt (AMI). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), ns = nicht signifikant.

Charakteristik	Telomer	p Wert
Global (n = 3077) - Median [IQR]	13,27 [11,98, 13,69]	
keine CVRF (n = 737) - Median [IQR]	13,30 [11,56, 13,74]	
alle CVRF (n = 108) - Median [IQR]	13,14 [10,33, 13,56]	p = 0,037
Rauchen (n = 1277) - Median [IQR]	13,06 [10,69, 13,63]	p = 0,009
Arterielle Hypertonie (n = 1175) - Median [IQR]	13,12 [10,61, 13,60]	p = 0,001
Diabetes mellitus (n = 214) - Median [IQR]	13,21 [11,52, 13,64]	p = 0,64
Myokardinfarkt (n = 103) – Median [IQR]	12,83 [9,68, 13,36]	p = 0,001
Männliches Geschlecht (n = 1592) - Median [IQR]	13,11 [11,21, 13,34]	p < 0,001

Tabelle 5. Analyse zu Telomerlängen bei Individuen mit kardiovaskulären Risikofaktoren in KORA F4. Angegeben ist die globale Telomerlänge in KORA F4, die Telomerlänge bei KORA F4 Teilnehmern ohne erfassbare kardiovaskuläre Risikofaktoren und die Telomerlänge bei Teilnehmern vom KORA F4 und jeweils dem Vorliegen der kardiovaskulären Risikofaktoren Rauchen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus bzw. stattgehabter Myokardinfarkt und mit männlichem Geschlecht. Weiterhin ist die Telomerlänge angegeben für Teilnehmer, die alle abgefragten kardiovaskulären Risikofaktoren aufwiesen. In Klammern ist angegeben, auf wie viele Teilnehmer der jeweilige kardiovaskuläre Risikofaktor zutrifft. CVRF = kardiovaskuläre Risikofaktoren

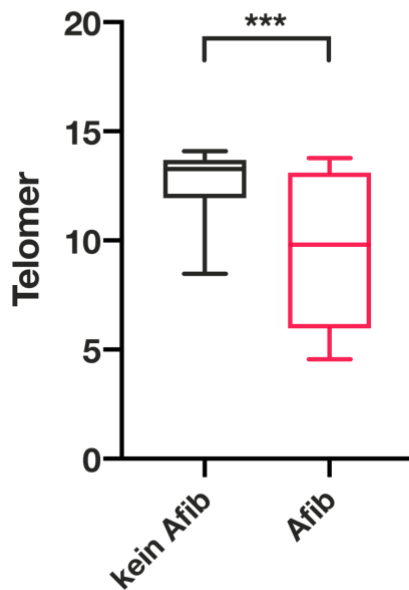
4.1.2.1 Analyse der Telomerlängen bei Vorhofflimmern in KORA F4 und AFLMU

Wir analysierten im nächsten Schritt TL Δ CT Werte in KORA F4 (n = 3077) und AFLMU (n = 2475) [30]. Wir verglichen dabei global die Δ CT Werte der Telomermessungen der Vorhofflimmerpatienten aus AFLMU mit den Kontrollindividuen aus KORA F4. Patienten mit Vorhofflimmern in KORA F4 (1,8%, n = 54) wurden der AFLMU Kohorte hinzugeführt (**Figur 2**). Bei Individuen ohne Vorhofflimmern (kein Afib) zeigte sich eine signifikant höhere mediane Expression der Telomere im Vergleich zu den Patienten mit Vorhofflimmern (13,27 [11,94, 13,69] versus 9,81 [5,98, 13,10], p < 0,001, **Figur 2A**). Patienten mit Vorhofflimmern hatten mithin eine verkürzte Telomerlänge.

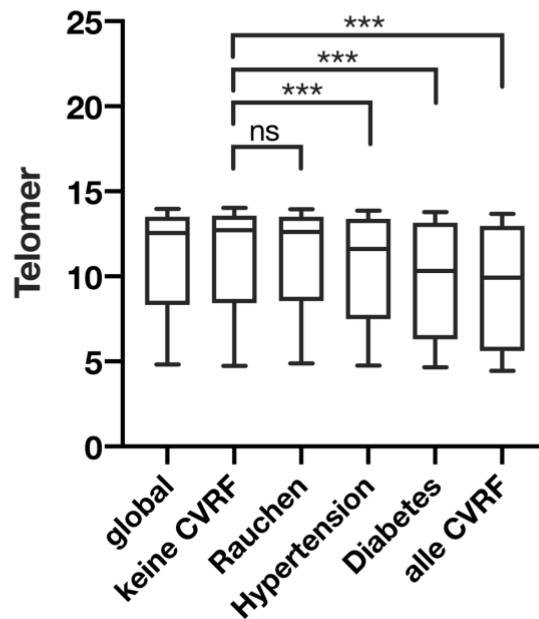
Im Vergleich zwischen Individuen mit und ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren in beiden Kohorten zeigten sich signifikante kürzere Telomere bei Diabetikern und bei

Patienten mit arterieller Hypertonie. Raucher hatten in den gemischten Kohorten interessanterweise keine signifikant verkürzten Telomere (**Figur 2B, Tabelle 6**).

A Telomere bei Vorhofflimmern



B Telomere bei CVRF



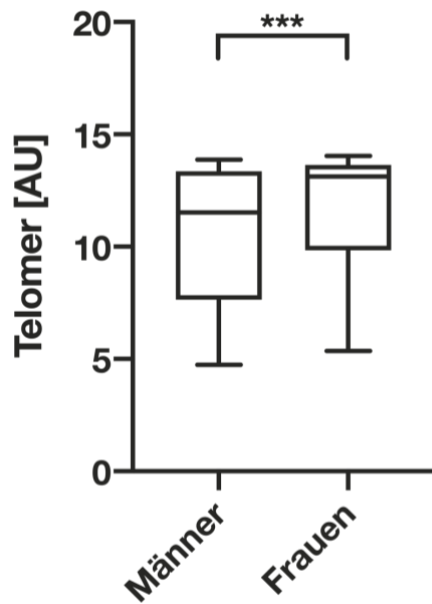
Figur 2. Telomermessung bei Patienten mit und ohne Vorhofflimmern und bei Patienten mit und ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren. (A) Telomerlänge in KORA F4 ohne AFLMU, **(B)** Telomere der Individuen in KORA F4 und AFLMU mit kardiovaskulären Risikofaktoren (Rauchen, Hypertension, Diabetes mellitus, Myokardinfarkt). Afib = Vorhofflimmern, CVRF = kardiovaskuläre Risikofaktoren. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), ns = nicht signifikant

Charakteristik	Telomer	p Wert
Global (n = 5552) - Median [IQR]	12,56 [8,33, 13,51]	
keine CVRF (n = 1236) - Median [IQR]	12,72 [8,42, 13,58]	
alle CVRF (n = 218) - Median [IQR]	9,921 [5,62, 12,97]	p < 0,001
Rauchen (n = 2465) - Median [IQR]	12,61 [8,54, 13,50]	p = 0,64
Arterielle Hypertonie (n = 2460) - Median [IQR]	11,62 [7,48, 13,39]	p = 0,001
Diabetes mellitus (n = 498) - Median [IQR]	10,32 [6,30, 13,16]	p < 0,001

Tabelle 6. Analyse zu Telomerlängen bei Individuen mit kardiovaskulären Risikofaktoren in der Gesamtkohorte aus KORA F4 und AFLMU. Telomerlängen der Gesamtkohorte und Telomerlängen isoliert bei Individuen mit dem jeweiligen kardiovaskulären Risikofaktor Rauchen, arterielle Hypertonie oder Diabetes mellitus oder mit allen kardiovaskulären Risikofaktoren. CVRF = kardiovaskuläre Risikofaktoren

4.1.2.2 Subanalyse einer Gender Kohorte

Wir führten eine Subgruppenanalyse der Telomerlänge mit Fokus auf das Geschlecht durch. Insgesamt befanden sich in der Gesamtkohorte aus KORA F4 und AFLMU 3230 Männer und 2247 Frauen. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied der Telomerlängen zwischen Männern und Frauen. Frauen wiesen dabei signifikant längere Telomere auf als Männer (13,12 versus 11,53, p < 0,001; **Figur 3, Tabelle 7**).



Figur 3. Subgruppenanalyse nach Geschlecht. Telomersignale gemeinsam für KORA F4 und AFLMU, aufgeschlüsselt nach Männern und Frauen. $p < 0.001$ (***)

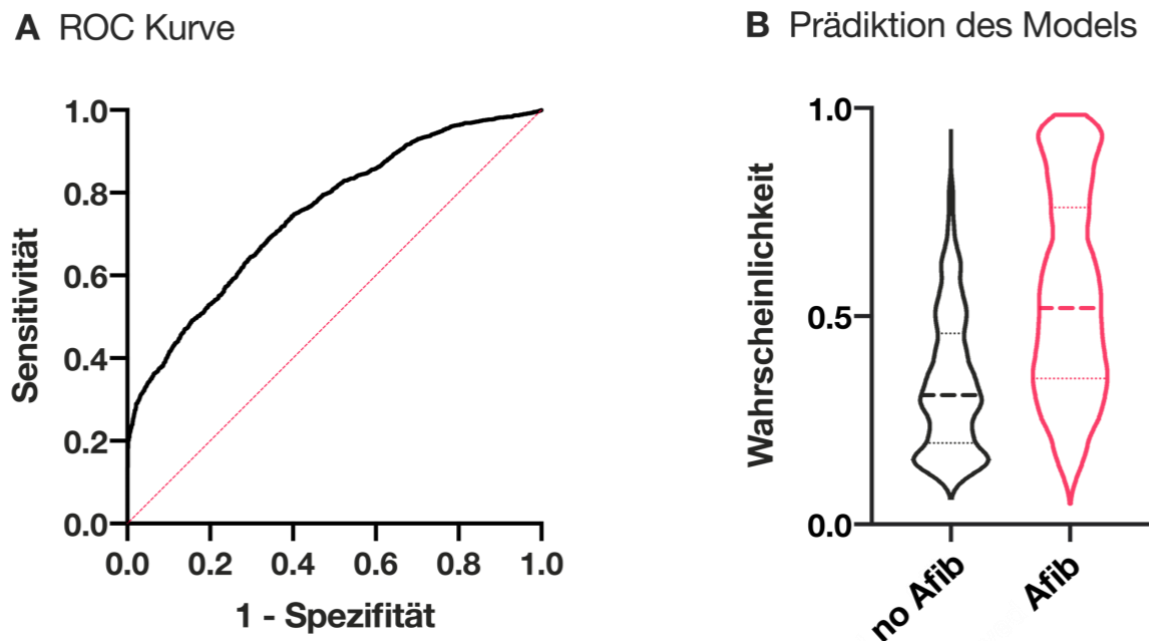
Variable	Telomer - Median [IQR]	p Wert
Global - Median [IQR]	12,56 [8,33, 13,51]	
Männliches Geschlecht - Median [IQR]	11,53 [7,63, 13,36]	$p < 0,001$
Weibliches Geschlecht - Median [IQR]	13,12 [9,84, 16,64]	

Tabelle 7. Vergleich der Telomerlängen bei Frauen und Männern.

4.1.3 Multivariabel adjustierte, logistische Regressionsanalyse der Telomerlänge bei Patienten mit und ohne Vorhofflimmern

Wir analysierten im nächsten Schritt bei Individuen mit und ohne Vorhofflimmern, ob ein Zusammenhang zwischen Vorhofflimmern und der Telomerlänge bestehen bleibt, wenn für wesentliche Einflussfaktoren adjustiert wird. Diese weiteren, unabhängigen

Variablen der logistischen Regressionsanalyse waren Geschlecht, BMI, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus. In dem adjustierten Modell blieb das Telomersignal hierbei ein unabhängiger Prädiktor für Vorhofflimmern (Odds Ratio je eine Einheit längerem Telomersignal: 0,77 [95% Konfidenzintervall 0,74, 0,77], $p < 0,001$; **Figur 4** und **Tabelle 8**). Auch die übrigen Variablen blieben signifikante Prädiktoren von Vorhofflimmern.



Figur 4. Multivariabel adjustierte, logistische Regressionsanalyse der Telomerlänge für Individuen ohne Vorhofflimmern (schwarz) versus mit Vorhofflimmern (rot). (A) ROC Kurve der multivariabel adjustierten, logistischen Regression, (B) Vorhergesagte Wahrscheinlichkeit für Vorhofflimmern. Hosmer-Lemeshow 60,3 ($p < 0,001$); Tjur's $R^2 = 0,28$. CI = Konfidenzintervall, Afib = Vorhofflimmern, no Afib = kein Vorhofflimmern.

Prädiktor	Odds Ratio (95% CI)	p Wert
Telomerlänge	0,77 [0,74 – 0,77]	p < 0,001
Männliches Geschlecht	0,33 [0,28 – 0,37]	p < 0,001
BMI (kg/m ²)	0,98 [0,97 – 0,99]	p = 0,007
Arterielle Hypertonie	2,10 [1,82 – 2,44]	p < 0,001
Diabetes mellitus	1,50 [1,11 – 1,89]	p = 0,001

Tabelle 8. Multivariabel adjustierte, logistische Regressionsanalyse der Telomerlängen der Gesamtkohorte. Hosmer-Lemeshow 60,3 (p < 0,001); Tjur's R² = 0,28. CI = Konfidenzintervall, Afib = Vorhofflimmern, no Afib = kein Vorhofflimmern.

4.2 Propensity Score gematchte Analyse in KORA F4 und AFLMU

Die bisherigen Auswertungen bezogen sich auf die Gesamtkohorten von Patienten mit und ohne Vorhofflimmern. Um den Effekt der Telomereexpression bezüglich der Verteilung relevanter Kovariable in besser harmonisierten Gruppen zu betrachten, führten wir ein Propensity Score Matching von KORA F4 und AFLMU durch, indem wir für Geschlecht, Rauchen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und BMI adjustierten.

4.2.1 Basischarakteristika der gematchten Kohorte

Nach Propensity Score matching befanden sich insgesamt 2017 Patienten in der Gruppe ohne Vorhofflimmern und 2017 in der Gruppe mit Vorhofflimmern. Das mittlere Alter der gematchten Gruppen betrug 58,5 Jahre in der Vorhofflimmergruppe und 58,0 Jahre in der Gruppe ohne Vorhofflimmern. In der Vorhofflimmergruppe waren signifikant mehr Männer, außerdem lag der BMI höher. Arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus waren gut ausgeglichen (**Tabelle 9**).

Charakteristik	Kein AFib (n = 2017)	AFib (n = 2017)	p Wert
Alter (Mittelwert, SD) – a	58 ± 13,2	58 ± 11,0	p = 0,20
Männliches Geschlecht – n (%)	1311 (65,0)	1803 (89,4)	p < 0,001
BMI (Mittelwert ± SD) – kg/m²	28,2 ± 4,75	27,5 ± 4,68	p < 0,001
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Raucher – n (%)	794 (39,4)	882 (43,7)	p = 0,0250
Arterielle Hypertonie – n (%)	1074 (53,2)	1041 (49,2)	p = 0,15
Diabetes Mellitus – n (%)	210 (10,4)	239 (11,8)	p = 0,15

Tabelle 9. Basischarakteristika in KORA F4 und AFLMU nach Propensity Score Matching.

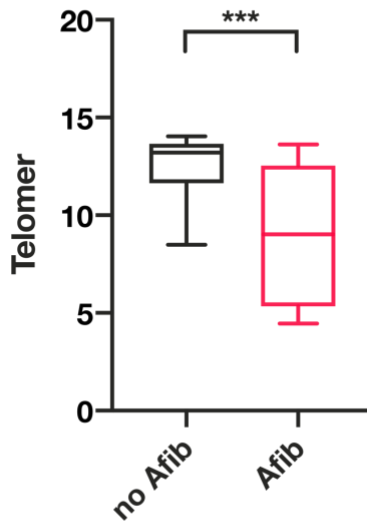
Propensity Score Matching für Geschlecht, Rauchen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und BMI.

SD = Standardabweichung, BMI = body mass index, n = Anzahl. Afib = Vorhofflimmern.

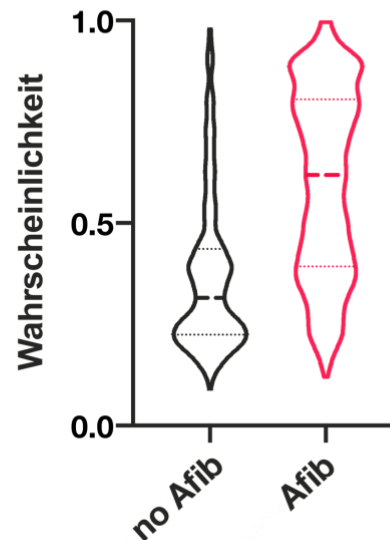
4.2.2 Telomeranalyse für Vorhofflimmern in der Propensity Score gematchten Kohorte

Wir analysierten im nächsten Schritt die Telomerlängen der Propensity Score gematchten Gruppen mit und ohne Vorhofflimmern [30]. Wir verglichen dabei global die Telomere der Vorhofflimmerpatienten gegen die der Teilnehmer ohne Vorhofflimmern (**Figur 5A**). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied der Telomerlängen zwischen den Gruppen ohne und mit Vorhofflimmern (13,21 [11,65, 13,67] versus 9,03 [5,35, 12,54], p < 0,001) mit längeren Telomeren bei Individuen ohne Vorhofflimmern.

A Telomere bei Vorhofflimmern



B Prädiktion des Models



Figur 5. (A) Δ CT Werte von Kontrollen (no Afib) und Vorhofflimmerpatienten (Afib), (B) Multivariate logistische Regression mit adjustierten kardiovaskulären Risikofaktoren (Alter, BMI, Rauchen, AHT, Diabetes). Afib = Vorhofflimmern, BMI = body mass index. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), ns = nicht signifikant

Die Individuen mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen und Diabetes mellitus hatten ein signifikant erniedrigtes Telomersignal, während Individuen mit arterieller Hypertonie ein lediglich numerisch geringeres Telomersignal aufwiesen (**Tabelle 10**). Auch für die gematchte Kohorte ergab sich eine signifikante Assoziation zwischen Telomerlänge und Vorhofflimmern (Odds Ratio 0,75 [0,73, 0,60], $p < 0,0001$, **Figur 5B, Tabelle 10**)

Variable	Odds Ratio (95% CI)	p Wert
Telomer	0,75 [0,73 – 0,76]	p < 0,001
Gender	0,83 [0,71 – 0,97]	p = 0,020
BMI (kg/m ²)	0,97 [0,95 – 0,98]	p = 0,001
Rauchen	0,45 [0,38 – 0,52]	p < 0,001
Arterielle Hypertonie	0,93 [0,79 – 1,10]	p = 0,40
Diabetes mellitus	1,81 [0,98 – 1,68]	p = 0,07

Tabelle 10. Multivariabel adjustierte logistische Regressionsanalyse der Telomersignale in der Propensity Score gematchten Kohorte. Hosmer Lemeshow 42,96 (p<0,001); Tjur's R² = 0,23. CI = Konfidenzintervall, BMI = body mass index.

5 Diskussion

Wir analysierten die Telomerlängen bei Individuen mit Vorhofflimmern in der AFLMU Kohorte und der epidemiologisch Bevölkerungs-basierten Kontrollkohorte KORA F4. Eine Vorerkrankung mit Vorhofflimmern war assoziiert mit kürzeren Telomerlängen in Leukozyten. Alter ist ein anerkannter Risikofaktor zur Entwicklung von Vorhofflimmern in vielen Studien [2]. Auch nach Adjustierung für kardiovaskuläre Risikofaktoren und Geschlecht blieb die signifikante Interaktion von Vorhofflimmern und Telomerlängen erhalten. Telomerlänge war ebenfalls signifikant mit dem Alter assoziiert. Alter ist auch ein anerkannter Risikofaktor zur Entwicklung von Vorhofflimmern in vielen Studien [2]. Telomerlängen sind damit ein direkter, alters-assoziierter Risikofaktor für die Entwicklung von Vorhofflimmern. Atriale Kardiomyozyten teilen sich im Laufe des Lebens nur wenig. Telomerverkürzungen in atrialen Kardiomyozyten versus Leukozyten könnten sich in diesem Effekt signifikant unterscheiden. So beobachtete Roberts et al. eine signifikante Interaktion zwischen Telomerlängen in atrialen Myozyten [24]. Dabei waren die Telomerlängen der Myozyten signifikant länger als die der Leukozyten. Dennoch könnte Telomerbiologie in Leukozyten des peripheren Blutes auch allein eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Vorhofflimmern spielen, beispielsweise und als Surrogat von Entzündungs- und Seneszenzprozessen[21]. Vorzeitige Apoptose von Kardiomyozyten durch unzureichend lange Telomere trägt zu einer bindegewebigen fibrotischen Umwandlung des linken Vorhofs bei und erleichtert somit Re-Entry Kreisläufe, die wesentlich für die Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern sind. Darüber hinaus könnten die erhöhten Inzidenzen von Sinusknotendysfunktion und atrialer Extrasystolie mit verkürzten Telomeren einhergehen[31, 32]. Ähnlich verhält es sich in Untersuchungen von zur Telomerlängen im Ventrikelmyokard, bei denen sich ein

signifikanter, positiver Zusammenhang zwischen Defibrillatortherapien und Telomerverkürzungen zeigte [33].

Unsere Analyse bestätigt einige bereits publizierte Studien zur Interaktion von Telomerlänge und Vorhofflimmern [22, 23, 34]. Andere Studien konnten keine solche Interaktion feststellen [21, 24, 25]. Verglichen mit diesen Studien war unser Gesamtkollektiv im Mittel jünger; die Mehrzahl der Vorhofflimmerpatienten war männlich. Alle Studien bestätigen konsistent die Assoziation von chronologischem Alter und Vorhofflimmern. Im Gegensatz zu anderen longitudinalen Analysen können wir wie Carlquist et al. eine positive Assoziation zwischen Telomerverkürzung und Vorhofflimmern nachweisen. Der größte Unterschied in der Reduktion der Telomerlängen war dabei bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern zu verzeichnen [34].

Die vorherigen Arbeiten von Staerk [25] und Roberts [24], die keine signifikanten Assoziationen zwischen Vorhofflimmern und Telomerlänge zeigen konnten, haben deutlich geringere Fallzahlen mit 476 bzw. 184 eingeschlossenen Patienten. Sie verfolgten vorhofflimmerfreie Teilnehmer nach und haben die Telomerlängen der bei Patienten mit inzidentem Vorhofflimmern gemessen, während wir eine Querschnittsanalyse der Telomerlängeverkürzung bei Patienten mit prävalentem Vorhofflimmern durchführten. Auch unter den insgesamt 3575 Patienten der Intermountain Heart Collaborative Studie, einer Studie zu prävalentem Vorhofflimmern und Telomerverkürzung, waren nur 379 erkrankte Patienten. Die negativen Ergebnisse der zitierten Vorarbeiten könnten begründen sich vermutlich daher zumindest teilweise aus der möglicherweise unzureichenden Studiengröße und geringen Anzahl an erkrankten Vorhofflimmerpatienten begründen.

5.1 Telomerlängen als Biomarker

Die Interaktion von Telomerlängen und Vorhofflimmern in unserer Studie impliziert eine Nutzung als Biomarker. Kürzere Telomere oder defekte Reparatur induzieren eine zellspezifische Antwort auf DNA-Schäden, die zu mitochondrialer Dysfunktion und Entwicklung von reaktiven Sauerstoffmolekülen führt [19]. Das könnte ein zusätzlicher Trigger für Vorhofflimmern sein. Insofern spiegelt die Telomerlänge zumindest teilweise das biologische Alter wider, das möglicherweise ein besserer Marker für die Entwicklung von Vorhofflimmern darstellt als herkömmliches Kalenderalter [21]. Unklar bleibt, welcher Zelltyp der weißen Blutzellpopulation das beste Surrogat für den Telomerverkürzungseffekt darstellt. Entsprechend den Vorarbeiten zur Immunseneszenz könnten langlebigere, seneszente T-Lymphozyten eine gut zu analysierende Zellpopulation zur Telomerlängenbestimmung ex vivo sein [35]. Diese Hypothese sollte mit Telomeranalysen aus atrialen Myozyten näher untersucht werden. Generell scheinen die Telomerlängen von atrialen Myozyten relativ länger und stabiler verglichen zu denen aus peripheren, weißen Blutzellen zu sein [24]. Auf der einen Seite repräsentieren weiße Blutzellen den Seneszenzgrad bzw. das biologische Alter des Gesamtorganismus aufgrund ihrer höheren Dynamik vielleicht besser. Andererseits könnten Telomerverkürzungen in atrialen Myozyten mögliche toxische Schäden im Zielorgan selbst darstellen, die zur Induktion von Vorhofflimmern führen. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die Telomerlängen aus dem peripheren Blut zumindest ein möglicher Biomarker für Vorhofflimmern sein könnten.

5.2 Telomerlängen und kardiovaskuläre Erkrankungen

Die Bedeutung von Telomerlängen bei kardiovaskulären Erkrankungen ist sehr divers [36]. Sie wurde im Rahmen einer großen Metaanalyse erhoben. Es zeigte sich eine inverse Assoziation von Telomerlängen und dem Risiko einer Koronaren

Herzerkrankung, unabhängig von den konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren. Die Assoziation mit zerebrovaskulären Erkrankungen war nicht sicher [19]. Obwohl Telomere eine wichtige Rolle bei zellulärer Seneszenz und Apoptose spielen, konnten einige Studien keine Interaktion von Telomerlängen und kardiovaskulären Erkrankungen nachweisen [25]. In unserer Analyse zeigte sich jedoch eine signifikante Interaktion zwischen Vorhofflimmern und kürzeren Telomeren. Auch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen und Bluthochdruck hatten additive Effekte auf Telomerverkürzung in unserer Studie. Ähnliche Beobachtungen ergeben sich bei Analysen zu Telomerlängen und kardioembolischem Schlaganfall und Herzschwäche [37, 38]. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Beobachtung ist jedoch nicht geklärt und bleibt eher hypothetisch. Die meisten Analysen postulieren eine Assoziation der Telomerverkürzung mit Gewebsinflammation und oxidativem Stress. So konnte in einem Tiermodell zur Hyperglykämie neben einer Gewebsentzündung eine Reduktion der Telomerlängen in weißen Blutzellen und die gleichzeitige Entwicklung arteriosklerotischer Plaques nachgewiesen werden [36, 39].

5.3 Telomerlängen und Vorhofflimmern

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Telomerlänge und Vorhofflimmern invers miteinander korrelieren durch einen Mechanismus unabhängig vom chronologischen Altern. Die Untersuchung einer potentiellen Rolle der Telomerbiologie bei der Pathogenese von Vorhofflimmern ist wichtig, um eine Grundlage für weitere Studien zum Pathomechanismus der Telomerverkürzung und Vorhofflimmern zu schaffen. Die Telomerlänge wird generell als Marker für biologisches Altern gesehen [11, 40]. Insofern repräsentiert könnte die Telomerlänge

besser das biologische Alter des Körpers widerspiegeln als dies durch das reine Lebensalter allein der Fall ist. Ob Dass andere, in der Studie nicht erfasste Komorbiditäten oder Risikofaktoren die Assoziation von Vorhofflimmern und Telomerlänge in unserer Analyse beeinflusst haben, ist denkbar.

5.4 Limitationen

Stärken unserer Analyse sind die gut charakterisierten, großen KORA F4 und AFLMU Kohorten. Unsere Studie hat allerdings auch mehrere Einschränkungen. Insbesondere in der KORA Kohorte können wir nicht ausschließen, dass mehr Patienten an Vorhofflimmern erkrankt waren, die mittels der eingesetzten EKGs nicht diagnostiziert wurden. Es sind auch keine validen Aussagen zum Zusammenhang zwischen paroxysmale, persistierendem oder permanentem Vorhofflimmern und Telomerlängen möglich, da hierzu die Datenauflösung nicht ausreichend ist. Darüber hinaus können zusätzliche, nicht erfasste altersbedingte und kardiovaskuläre Erkrankungen die Ergebnisse beeinflusst haben. Telomerlänge wurden in Leukozyten und nicht in atrialen Kardiomyozyten gemessen. Womöglich bestehen hier signifikante Unterschiede. Ein anderer Schwachpunkt ist der korrelative Charakter. Wir können keine Rückschlüsse auf den in unserer Analyse zugrundeliegenden Pathomechanismus vornehmen. Vorhofflimmern selbst könnte auf die Telomerlänge Einfluss nehmen. Möglicherweise hat auch die Probenlagerung einen Einfluss auf die Telomerlänge, wobei alle DNA-Proben nach bestem Wissen sachgerecht gelagert wurden. Telomerlänge weist bis zu einem gewissen Grad eine erbliche Komponente auf. Es ist daher festzuhalten, dass unseren Ergebnissen vorwiegend Individuen mit kaukasischem Hintergrund zugrundeliegen.

5.5 Ausblick

Es wurde gezeigt, dass Telomere und Telomeraseaktivität mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen und ihren Risikofaktoren in engem Zusammenhang stehen. Kritisch kurze Telomere, Veränderungen der Telomerbindungsproteine und eine verminderte Telomeraseaktivität haben sich alle auf die Aktivierung von Zellschädigung und möglicherweise auf zelluläre Dysfunktion, Seneszenz und Apoptose ausgewirkt. Es ist zu klären, ob die häufig bei Koronarer Herzerkrankung und nun auch bei Vorhofflimmern beobachtete Verkürzung der Telomere aus peripheren Leukozyten Ursache oder Folge der Erkrankung ist. Zukünftige experimentelle und epidemiologische Studien sollten sich mit der Frage der Telomerlängen in atrialen Kardiomyozyten beschäftigen. Trotz unserer hohen Teilnehmerzahl ist es denkbar, dass unsere Analysen durch eine mangelnde statistische Power falsch-negative oder falsch-positive Ergebnisse generiert haben, die entsprechend abgeklärt werden sollten. Deshalb erscheint es sinnvoll, die Teilnehmerzahl für zukünftige Analysen weiter zu erhöhen. Darüber hinaus wäre es sinnvoll auch Rezidive von Vorhofflimmern nach erfolgter Therapie, z.B. nach Kardioversion oder nach Pulmonalvenenisolation, im Zusammenhang mit Telomerlängen zu analysieren.

Referenzen

1. Staerk, L., et al., *Atrial Fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes*. *Circ Res*, 2017. **120**(9): p. 1501-1517.
2. Kirchhof, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(38): p. 2893-2962.
3. Nattel, S. and D. Dobrev, *Electrophysiological and molecular mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation*. *Nat Rev Cardiol*, 2016. **13**(10): p. 575-90.
4. Kotecha, D., et al., *Integrating new approaches to atrial fibrillation management: the 6th AFNET/EHRA Consensus Conference*. *Europace*, 2018. **20**(3): p. 395-407.
5. January, C.T., et al., *2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **64**(21): p. e1-76.
6. Bhatt, D.L., *Antithrombotic therapy in 2017: Advances in atherosclerosis, atrial fibrillation, and valvular disease*. *Nat Rev Cardiol*, 2018. **15**(2): p. 71-72.
7. Alkhouli, M. and P.A. Friedman, *Ischemic Stroke Risk in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation: JACC Review Topic of the Week*. *J Am Coll Cardiol*, 2019. **74**(24): p. 3050-3065.
8. Rottner, L., et al., *Catheter Ablation of Atrial Fibrillation: State of the Art and Future Perspectives*. *Cardiol Ther*, 2020.
9. Packer, D.L., et al., *Effect of Catheter Ablation vs Antiarrhythmic Drug Therapy on Mortality, Stroke, Bleeding, and Cardiac Arrest Among Patients With Atrial Fibrillation: The CABANA Randomized Clinical Trial*. *JAMA*, 2019. **321**(13): p. 1261-1274.
10. Van Gelder, I.C., et al., *Rate control in atrial fibrillation*. *The Lancet*, 2016. **388**(10046): p. 818-828.
11. Martinez, P. and M.A. Blasco, *Heart-Breaking Telomeres*. *Circ Res*, 2018. **123**(7): p. 787-802.
12. Fyhrquist, F., O. Saijonmaa, and T. Strandberg, *The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease*. *Nat Rev Cardiol*, 2013. **10**(5): p. 274-83.
13. Tian, Y., et al., *Telomere Length: A Potential Biomarker for the Risk and Prognosis of Stroke*. *Front Neurol*, 2019. **10**: p. 624.
14. Dzeshka, M.S., et al., *Cardiac Fibrosis in Patients With Atrial Fibrillation: Mechanisms and Clinical Implications*. *J Am Coll Cardiol*, 2015. **66**(8): p. 943-59.
15. Flegel KM, S.M., Rose G., *Risk of stroke in non-rheumatic atrial fibrillation*. *Lancet*, 1987. **1**(8532): p. 526-9.
16. Vermond, R.A., et al., *Incidence of Atrial Fibrillation and Relationship With Cardiovascular Events, Heart Failure, and Mortality: A Community-Based Study From the Netherlands*. *J Am Coll Cardiol*, 2015. **66**(9): p. 1000-7.
17. Go AS, H.E., Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, Singer DE., *Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study*. *JAMA*, 2001. **285**(18): p. 2370-5.
18. Gardner, M., et al., *Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis*. *Exp Gerontol*, 2014. **51**: p. 15-27.
19. Haycock, P.C., et al., *Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis*. *BMJ*, 2014. **349**: p. g4227.

20. Shen, M.J., et al., *Neural mechanisms of atrial arrhythmias*. Nat Rev Cardiol, 2011. **9**(1): p. 30-9.
21. Zhang, N., et al., *Telomere length: A newly marker for predicting atrial fibrillation?* Int J Cardiol, 2017. **239**: p. 21.
22. Fried L.P., B.N.O., Enright P., Furberg C.D., Gardin J.M., Kronmal R.A., Kuller L.H., Manolio T.A., Mittelmark M.B., Newman A., *The Cardiovascular Health Study: design and rationale*. Ann Epidemiol, 1991. **1**(3): p. 263-76.
23. Su, C., et al., *Study on the relationship between telomere length changes and recurrence of atrial fibrillation after radiofrequency catheter ablation*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2019. **30**(7): p. 1117-1124.
24. Roberts, J.D., et al., *Telomere length and the risk of atrial fibrillation: insights into the role of biological versus chronological aging*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2014. **7**(6): p. 1026-32.
25. Staerk, L., et al., *Association Between Leukocyte Telomere Length and the Risk of Incident Atrial Fibrillation: The Framingham Heart Study*. J Am Heart Assoc, 2017. **6**(11).
26. Huth, C., et al., *Protein markers and risk of type 2 diabetes and prediabetes: a targeted proteomics approach in the KORA F4/FF4 study*. Eur J Epidemiol, 2019. **34**(4): p. 409-422.
27. Cawthon, R.M., *Telomere measurement by quantitative PCR*. Nucleic Acids Res., 2002. **30**(10): p. e47.
28. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Research, 2001. **29**(9): p. 2002-7.
29. Tolios, A., D. Teupser, and L.M. Holdt, *Preanalytical Conditions and DNA Isolation Methods Affect Telomere Length Quantification in Whole Blood*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0143889.
30. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
31. Dewland TA, V.E., Mandyam MC, Heckbert SR, Siscovick DS, Stein PK, *Atrial Ectopy as a Predictor of Incident Atrial Fibrillation*. Ann Intern Med, 2013. **159**(11): p. 721-728.
32. Jones, S.A., M.R. Boyett, and M.K. Lancaster, *Declining into failure: the age-dependent loss of the L-type calcium channel within the sinoatrial node*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1183-90.
33. Sawhney, V., et al., *Telomere shortening and telomerase activity in ischaemic cardiomyopathy patients - Potential markers of ventricular arrhythmia*. Int J Cardiol, 2016. **207**: p. 157-63.
34. Carlquist, J.F., et al., *Shortened telomere length is associated with paroxysmal atrial fibrillation among cardiovascular patients enrolled in the Intermountain Heart Collaborative Study*. Heart Rhythm, 2016. **13**(1): p. 21-7.
35. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, *Mechanisms underlying T cell ageing*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(9): p. 573-583.
36. Yeh, J.K. and C.Y. Wang, *Telomeres and Telomerase in Cardiovascular Diseases*. Genes (Basel), 2016. **7**(9).
37. Allende, M., et al., *Short Leukocyte Telomere Length Is Associated With Cardioembolic Stroke Risk in Patients With Atrial Fibrillation*. Stroke, 2016. **47**(3): p. 863-5.
38. Sharifi-Sanjani, M., et al., *Cardiomyocyte-Specific Telomere Shortening is a Distinct Signature of Heart Failure in Humans*. J Am Heart Assoc, 2017. **6**(9).

39. Hiroyuki S, et al., *Receptors for proteins modified by advanced glycation endproducts (AGE)—their functional role in atherosclerosis*. Mech Ageing Dev, 1999. **107**(3): p. 333-346.
40. Artandi S.E., *Telomeres, Telomerase, and Human Disease*. N Engl J Med, 2006. **355**(12): p. 1195-1197.

Eidesstattliche Erklärung

München, den 23.10.2020

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
„Telomerlängenanalysen bei Patienten mit Vorhofflimmern“

Selbstständig verfasst, mich keiner außer der angegebenen Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als sollte kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre darüber hinaus, dass die hier vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

(Danny Kupka)