

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Kinetik frei zirkulierender DNA aus akuten und chronischen Sportinterventionen bei  
Systemischen Lupus erythematoses- Patienten

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Katrin Kluge  
aus Otterndorf

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann  
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Julia Weinmann-Menke  
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Perikles Simon  
  
Tag der Promotion: 14.05.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>II</b>
<b>III.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURDISKUSSION</b> .....	<b>4</b>
2.1	SYSTEMISCHER LUPUS ERYTHEMATODES .....	4
2.1.1	<i>Pathogenese</i> .....	5
2.1.2	<i>Klinik und Diagnostik</i> .....	8
2.1.3	<i>Therapie</i> .....	10
2.2	FREIZIRKULIERENDE NUKLEINSÄUREN (cfDNA) .....	11
2.2.1	<i>Methoden zur Detektion der cfDNA</i> .....	12
2.2.2	<i>Apoptose</i> .....	14
2.2.3	<i>Nekrose</i> .....	15
2.2.4	<i>NETose</i> .....	16
2.2.5	<i>Pyroptose</i> .....	16
2.2.6	<i>Gebundene cfDNA an Transportproteinen</i> .....	17
2.2.7	<i>Oxidativer Status der cfDNA</i> .....	17
2.2.8	<i>Elimination von Zelltrümmern</i> .....	18
2.2.9	<i>cfDNA unter körperlicher Belastung</i> .....	20
2.3	KÖRPERLICHE AKTIVITÄT BEI SLE.....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>25</b>
3.1	VERBRAUCHSMATERIAL .....	25
3.2	CHEMIKALIEN UND PCR-KOMPONENTEN .....	25
3.3	GERÄTE UND SOFTWARE.....	26
<b>4</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>28</b>
4.1	ETHIK .....	28
4.2	PROBANDENREKRUTIERUNG .....	28
4.3	RAHMENBEDINGUNGEN UND ABLAUF .....	29
4.3.1	<i>Ablauf des Stufentest</i> .....	30
4.3.2	<i>Ablauf der Sportintervention</i> .....	33
4.4	PROBENVERARBEITUNG .....	34
4.5	cfDNA MESSUNG UND AUSWERTUNG .....	35
4.5.1	<i>Vorbereitungen und qPCR</i> .....	35
4.5.2	<i>Material zur Assay-Validierung</i> .....	37
4.5.3	<i>In-silico-Berechnung der L1PA2-Kopienzahl pro Genom</i> .....	37
4.5.4	<i>Berechnung der cfDNA-Konzentration in Plasmaproben</i> .....	38
4.5.5	<i>qPCR-Kalibrierung</i> .....	38
4.5.6	<i>Bestimmung der Assay-Leistung und -Ungenauigkeit</i> .....	39

4.5.7	<i>Direktquantifizierung im Vergleich zur Kit-Isolierung</i> .....	40
4.5.8	<i>Reanalysen und Lagerstabilität der Proben</i> .....	41
4.5.9	<i>Datenanalyse</i> .....	41
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>43</b>
5.1	ANTHROPOMETRISCHE UND PHYSIOLOGISCHE DATEN DER PROBANDEN .....	43
5.2	STUFENTEST.....	45
5.3	NACHWEIS DER EIGNUNG DES ASSAYS .....	46
5.4	CFDNA KINETIK.....	51
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>58</b>
6.1	ETABLIERUNG EINES QPCR-ASSAYS.....	58
6.2	KOLLEKTIV.....	62
6.3	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE .....	64
6.3.1	<i>Akute Sportintervention</i> .....	64
6.3.2	<i>Chronische Sportintervention</i> .....	66
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>TABELLARISCHER LEBENSLAUF</b> .....	<b>89</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
AK	Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BLys	B-Lymphocyte stimulator
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
bpm	Herzfrequenz; beats per minute
cfDNA	zellfreie DNA
CRP	C-reaktives Protein
CV	Variationskoeffizient
DAMP	damage-associated molecular pattern
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dPCR	digitale Polymerasekettenreaktion
dsDNA	doppelsträngige DNA
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EULAR	European Alliance of Associations for Rheumatology
GE	Genomäquivalente
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HDL	high density lipoprotein

HWZ	Halbwertszeit
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KI	Konfidenzintervall
mtDNA	mitochondriale DNA
MTX	Methotrexat
NETs	neutrophile extrazelluläre Fallen
NETose	Sonderform des Zelltods bei neutrophilen Granulozyten
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
LINE	long interspersed nuclear element
LN	Lupus-Nephritis
LOB	Leerwertgrenze; limit of blank
LOD	Nachweisgrenze; limit of detection
LOQ	Quantifizierungsgrenze; limit of quantification
NTC	Negativkontrolle; no template control
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
qPCR	quantitative real-time polymerase-chain-reaction, quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RA	rheumatoider Arthritis
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
RQ	respiratorischer Quotient
ROS	reactive oxygen species
SD	Standardabweichung; standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat; sodium dodecyl sulfate

SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SL	systemischer Lupus
SLEEP-Studie	Systemic Lupus Erythematosus Exercise Program
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
ssDNA	Einzelstrang DNA
TAU	Kontrollgruppe; treatment as usual
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
VO <sub>2</sub>	Sauerstoff-Aufnahme
VO <sub>2</sub> peak	maximale Sauerstoff-Aufnahme

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verbrauchsmaterial .....	25
Tabelle 2 Chemikalien und PCR-Komponenten.....	25
Tabelle 3 Geräte und Software .....	26
Tabelle 4 Ein- und Ausschlusskriterien Studie .....	28
Tabelle 5 Walking-Protokoll .....	30
Tabelle 6 Sequenz des angefertigten L1PA2 DNA-Fragment .....	36
Tabelle 7 Primersequenzen .....	36
Tabelle 8 Ausgewählte anthropometrische und physiologische Parameter der Probanden .....	43
Tabelle 9 Immunsuppressive Medikamenten der Probanden .....	43
Tabelle 10 Parameter des Stufentests .....	46
Tabelle 11 Beispielhafter Auszug aus den Daten der Studienteilnehmer .....	82
Tabelle 12 PRE-cfDNA 90bp venös bei Eingangs- und Ausgangstest .....	82
Tabelle 13 Varianzanalyse- Berechnung mittels dem Tukey post-hoc Test .....	83
Tabelle 14 Varianzanalyse- Berechnung mittels dem Tukey post-hoc Test, Vergleich von Eingangs- und Ausgangstest .....	83
Tabelle 15 Vorausgesagte Targets aus der UCSC In-Silico PCR (Länge und Anzahl) für das L1PA2_fw und L1PA2_222bp_rv Primerpaar in GRCh38/hg38.....	85
Tabelle 16 Ergebnisse der Post-hoc-Vergleiche zwischen kapillären und venösen Proben, bezogen auf die Anpassung des linearen gemischten Modells durch REML ['lmer-Mod'] .....	87
Tabelle 17 Ergebnisse der Post-hoc-Vergleiche zwischen Kapillärproben zu allen Zeitpunkten, bezogen auf die Anpassung des linearen gemischten Modells durch REML ['lmer-Mod'].....	88

### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Arten des Lupus erythematoses.....	5
Abbildung 2 Mögliche Auslöser des systemischen Lupus erythematoses.....	5
Abbildung 3 Verlauf einer Ausbelastung von gesunden Probanden auf einem Fahrradergometer vor, direkt nach und 90 Minuten nach der Ausbelastung. ....	23
Abbildung 4 Studiendesign .....	29
Abbildung 5 Borg-Skala zur Schätzung des Anstrengungsempfindens .....	32
Abbildung 6 Beispielhafter Ablauf eines Ausbelastungstest. ....	33
Abbildung 7 Ablauf der Probenverarbeitung.....	35
Abbildung 8 Typische Amplifikations- und Schmelzkurven.....	39
Abbildung 9 Korrelationsplot der secondary outcomes.....	45
Abbildung 10 Standardkurven und Unpräzisionsprofile für das L1PA2_90bp-Assay (a, b) und das L1PA2_222bp-Assay (c, d). ....	47
Abbildung 11 Präzision des L1PA2_90bp-Tests .....	48
Abbildung 12 CfDNA Konzentrationen nach längerer Lagerung des Vollblutes. ....	49
Abbildung 13 Direkte Quantifizierung von cfDNA im Vergleich zur DNA-Isolierung und Einfluss von Zentrifugationsgeschwindigkeit und Temperatur auf die cfDNA- Konzentration.....	50
Abbildung 14 Kinetik der venösen und kapillären cfDNA des Eingangstests, gemessen mit dem L1PA2_90bp-Assay vor und nach dem Training.....	52
Abbildung 15 Korrelation venöser zu kapillärer cfDNA. ....	53
Abbildung 16 cfDNA-Zerfall und Fragmentierungsindex für den Eingangstest.....	54
Abbildung 17 Fragmentierungsindex 222bp/90bp Vergleich Eingangstest zu Ausgangstest in den verschiedenen Interventionsgruppen. ....	55
Abbildung 18 Kinetik der venösen cfDNA bei den verschiedenen Studiengruppen.....	55
Abbildung 19 Kinetik der kapillären cfDNA (90bp) in den verschiedenen Interventionsgruppen.....	56
Abbildung 20 kapilläre und venöse PRE-Werte der cfDNA im Vergleich zwischen Eingangs- und Ausgangstest bei den verschiedenen Interventionsgruppen. ....	57
Abbildung 21 Verteilung der Treffer pro Chromosom im menschlichen Genom (GRCh38/hg38). ....	84

Das in dieser Arbeit gewählte generische Maskulinum bezieht sich zugleich auf männliche, weibliche und andere Geschlechteridentitäten.

## 1 Einleitung

Der Systemische Lupus erythematoses (SLE) zählt zu den chronisch entzündlichen Autoimmunkrankheiten. Charakteristisch für den SLE ist die Produktion von Auto-Antikörper (AK) gegen Bestandteile des Zellkerns (antinukleäre Antikörper, ANA), die Schäden in verschiedenen Geweben und Organen verursachen (Kuhn et al., 2015). Klinische Symptome betreffen Haut, Gelenke, Nieren und das Zentralnervensystem (Kuhn et al., 2015). In Deutschland liegt die SLE-Prävalenz bei 36,7/100 000. An der multifaktoriellen Pathogenese sind eine genetische Disposition, multiple Stressfaktoren und epigenetische Mechanismen beteiligt (Finzel et al., 2018). Eine große Rolle spielen auch Mutationen in Regulatoren der Apoptose und Proteine zur Beseitigung von Zelldetritus, durch die sich die Konzentration frei zirkulierender (cell free Desoxyribonukleinsäure cfDNA) im Körper erhöht (Lood and Duvvuri, 2019). Schon 1966 wiesen Tan et al. erhöhte cfDNA-Werte im Plasma von SLE-Patienten nach. Inzwischen wurde die Bedeutung der cfDNA auch für andere Autoimmunerkrankungen (Lood and Duvvuri, 2019), Traumata (Rainer, 2001), Sepsis (Rhodes et al., 2006) und für die Tumordiagnostik (Stroun et al., 1987) erkannt.

Erhöhte cfDNA-Werte treten aber nicht nur im Rahmen pathologischer Prozesse auf, sondern auch bei gesunden Individuen nach erschöpfender, physischer Aktivität (Atamaniuk et al., 2004). Studien belegen, dass sportliche Aktivitäten bei Patienten mit SLE positive Effekte besitzen (O'Dwyer et al., 2017). Die cfDNA-Kinetik wurde bislang jedoch noch nicht untersucht.

Messungen der cfDNA im Plasma von SLE-Patienten erfolgen aktuell mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) (Lood and Duvvuri, 2019), wobei standardisierte Verfahren fehlen (Meddeb et al., 2019).

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse des Einflusses von akuten und/oder chronischen Sportintervention auf die cfDNA-Kinetik bei SLE-Patienten. Untersucht werden sollte, ob sich die cfDNA-Werte nach aeroben und anaeroben Sportinterventionen unterscheiden und ob sich die cfDNA-Kinetik während einer akuten Sportintervention bei SLE-Patienten verändert. Um die erhobenen Werte beurteilen zu können, erfolgte eine ausführliche Literaturrecherche zu publizierten cfDNA-Daten bei gesunden Individuen und SLE-Patienten.

Weiter sollten im Rahmen der Dissertation die verschiedenen Methoden zur cfDNA-Messung standardisiert werden.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Systemischer Lupus erythematoses

Für den zu den chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen gehörenden SLE sind ANA charakteristisch, die zu Schäden in verschiedenen Geweben und Organen führen (Kuhn et al., 2015). Weltweit leiden etwa ca. 5 Millionen Menschen an einem SLE, wobei über 90 % der Patienten weiblich sind (Arneth, 2019). Die 10-Jahres Überlebensrate ist durch eine adäquate Behandlung der Komorbiditäten und Symptome seit den 1950er Jahren von knapp über 50 % auf aktuell über 90 % gestiegen (Boedecker et al., 2020). Im Rahmen der multifaktoriellen Pathogenese spielen eine genetische Disposition, multiple Stressfaktoren und epigenetische Mechanismen eine Rolle (Kuhn et al., 2015). Von besonderer Bedeutung sind Mutationen in Proteinen, die in die Apoptose und Beseitigung von Zelldetritus involviert sind (Kuhn et al., 2015).

Zu den identifizierten, pathogenetisch relevanten Genen zählen das Gen für die Exonuklease 1 (TREX1), sowie das Gen für die Desoxyribonuklease I (DNase I). Die DNase I ist über die Degradierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) in apoptotische Prozesse involviert (Teruel and Alarcón-Riquelme, 2016).

Kritisch beim SLE ist die Entstehung von Zellnekrosen, durch die Kernbestandteile (Chromatin, DNA und Nukleoproteine) in die Blutbahn gelangen (Finzel et al., 2018). Die Folge ist die Produktion von ANA, die eine systemische Autoimmunantwort auslösen (Finzel et al., 2018). Im Rahmen der resultierenden Entzündung werden verschiedene inflammatorische Proteine produziert (Finzel et al., 2018). Diese führen zur Manifestation der Erkrankung in unterschiedlichen Organen und zu einem individuellen Krankheitsbild, was die endgültige Diagnose erschwert (Finzel et al., 2018). Zu dem stark fluktuierenden Krankheitsbild gehören dermatologische und nephrotische Manifestationen, Synovitiden, Serositiden, hämolytische Anämien, Leukopenien und Thrombozytopenien (Kuhn et al., 2015).

Der SLE ist von dem kutanen Lupus erythematoses abzugrenzen, der akut, subakut, intermittierend und chronisch auftreten kann (s. Abb. 1). Eine Besonderheit ist der medikamenteninduzierte Lupus erythematoses, der durch Antiarrhythmika, Antihypertensiva und anderen Medikamente ausgelöst werden kann (Herold et al., 2012). Im Folgenden wird nur auf den SLE eingegangen.

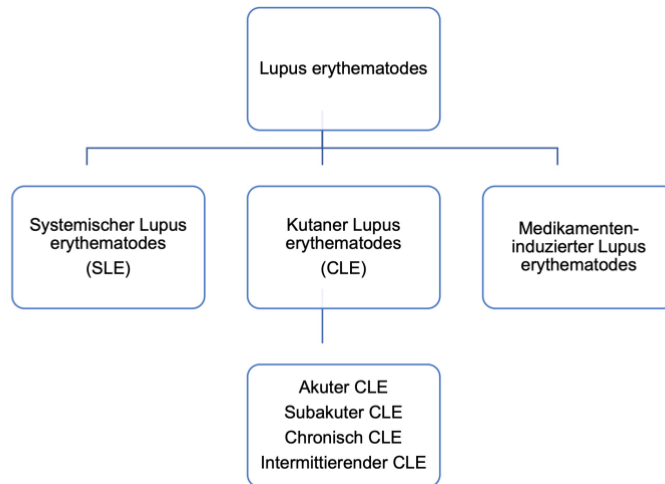


Abbildung 1: Formen des Lupus erythematoses

### 2.1.1 Pathogenese

Die Pathogenese beim SLE ist multifaktoriell (s. Abb. 2). Eine genetische Prädisposition und Umweltfaktoren wurden als Hauptakteure in der SLE-Entwicklung identifiziert (Finzel et al., 2018) (Tsokos, 2011). Aufgrund der variablen Krankheitsverläufe, Manifestationen und genetischen Risikofaktoren wird der SLE auch als Syndrom bezeichnet (Finzel et al., 2018).

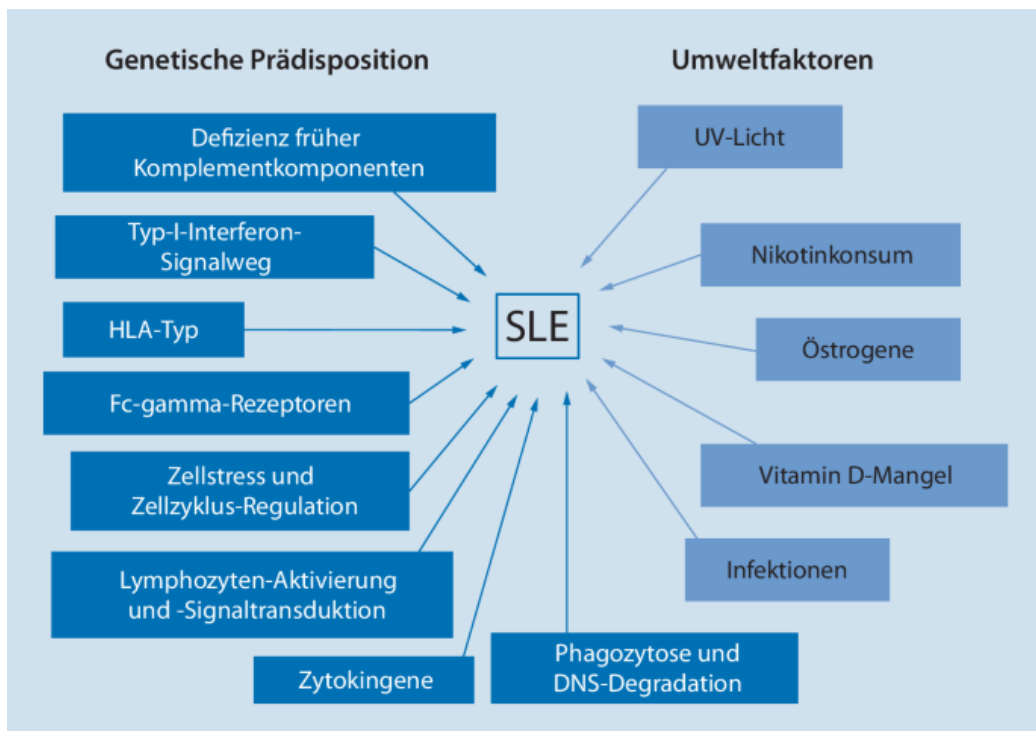


Abbildung 2: Mögliche Auslöser des systemischen Lupus erythematoses (Finzel et al., 2018)

Somit gibt es eine Vielzahl von Pathomechanismen, die am Krankheitsausbruch beteiligt sind. Im Folgenden werden die wichtigsten Mechanismen kurz beschrieben.

#### 2.1.1.1 Genetische Prädisposition

Genomanalysen bei erwachsenen SLE-Patienten weisen auf polygenetische Ursachen hin, bei denen eine Veranlagung für Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielt (Tsokos, 2011). Beispielsweise sind Genloci betroffen (z. B. Human Leukocyte Antigen (HLA) -DR<sub>2</sub> und -DR<sub>3</sub>), die für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems eine Rolle spielen (Tsokos, 2011). Weiter wurden Gene, die das Interferon-(IFN)-System, den NF- $\kappa$ B-Signalweg, DNA-Abbauwege, die Phagozytose und die Apoptose beeinflussen, als krankheitsfördernd identifiziert (Finzel et al., 2018). Beim kindlichen SLE lassen Analysen eine monogenetische Pathogenese (C1q-Defizienz) vermuten, die zu einer Akkumulation von Auto-AK führt (Finzel et al., 2018).

#### 2.1.1.2 Umweltfaktoren

Zwillingsstudien belegen neben der genetischen Prädisposition einen Einfluss von Umweltfaktoren auf die SLE-Pathogenese, wobei bislang nur wenige Umweltfaktoren eindeutig identifiziert wurden (Finzel et al., 2018).

Hierzu zählt eine ausgeprägte Lichtexposition, da Sonnenbrände zur Entstehung von Zelldetritus und Aktivierung von Entzündungskaskaden beitragen (Tsokos, 2011). Auch Infektionen, die eine Apoptose, Nekrose und/oder NETose (Sonderform des Zelltodes bei neutrophilen Granulozyten) auslösen, können Autoimmunreaktion hervorrufen (Tsokos, 2011). Bei den Viruserkrankungen steht das Epstein-Barr Virus (EBV) als möglicher SLE-Trigger im Fokus, da Bestandteile des Virus Ähnlichkeiten mit Lupus-Autoantigenen aufweisen (Tsokos, 2011).

Weiter wurde Östrogen in Fall-Kontroll-Studien bei Frauen mit postmenopausaler Hormonersatztherapie als Risikofaktor identifiziert. Frauen zeigten nach einer zweijährigen Therapie mit Östrogen-Präparaten ein 2,8-fach erhöhtes Risiko an SLE zu erkranken (Finzel et al., 2018). Das Risiko war bei Einnahme von Östrogen alleine größer als bei der kombinierten Einnahme mit Progesteron (Finzel et al., 2018). Bei Frauen im gebärfähigen Alter mit SLE erhöhten triphasische Antikonzeptiva das

Risiko für Schübe oder eine Thrombose nicht. Kritisch scheint dagegen der Einsatz von monophasischen Östrogen-Präparaten zu sein, auch vor dem Hintergrund, dass Frauen im gebärfähigen Alter am häufigsten an einem SLE erkranken (Finzel et al., 2018).

Ein weiterer Risikofaktor für die SLE-Manifestation ist ein Vitamin D-Mangel (Finzel et al., 2018). Im Autoimmunsystem spielt Vitamin D eine wichtige Rolle, da es die Differenzierung und Funktion von regulatorischen T-Zellen reguliert und die Aktivierung des pro-inflammatorischen NF- $\kappa$ B hemmt (Finzel et al., 2018). Studien belegen eine inverse Korrelation zwischen der SLE-Krankheitsaktivität und dem Vitamin D-Spiegel. Afroamerikaner besitzen durch einen stärkeren Vitamin-D Mangel und eine genetische Prädisposition ein erhöhtes Risiko an einem SLE zu erkranken (Finzel et al., 2018). Daher ist die Vitamin D-Substitution ein essenzieller Bestandteil der SLE-Therapie (Kuhn et al., 2015).

Ein weiterer Risikofaktor für einen SLE ist wie für andere Autoimmunerkrankungen das Rauchen, da die inhalierten Noxen Autoimmunreaktionen aktivieren (Tsokos, 2011).

### 2.1.1.3 Pathogenese auf zellulärer Ebene

Generell tragen verschiedene Zellen und Mediatoren zur Entstehung eines SLE bei. Hierzu zählen folliculäre dendritische Zellen, folliculäre T-Helferzellen, Zytokine, Hormone sowie Auto-AK (Finzel et al., 2018). Insbesondere scheinen eine Phagozytose-Defizienz und die NETose an der SLE-Entstehung beteiligt zu sein (Tsokos, 2011). Diese Mechanismen entsprechen den Freisetzungsmechanismen der cfDNA (s. Kap. 2.2). Das Verständnis der Pathomechanismen eröffnet neue Möglichkeiten für innovative Therapien.

Weiter scheint beim SLE eine Überaktivität von T-Helferzellen, die für die Differenzierung von B-Zellen in den Keimzentren verantwortlich sind, entscheidend für die Pathogenese zu sein (Finzel et al., 2018). Im Mausmodell entwickelten Tiere mit einer erhöhten T-Helferzell-Aktivität SLE-ähnliche Symptome (Jacquemin et al., 2015). Eine mögliche Ursache für diese Überaktivierung der T-Helferzellen ist eine gesteigerte Expression von OX40-Liganden in myeloiden dendritischen Zellen. Eine solche Expressionssteigerung wurde bei Kindern und Erwachsenen mit SLE

nachgewiesen. In der untersuchten Patientenkohorte korrelierte die OX40-Ligand-Expression mit der Krankheitsaktivität (Jacquemin et al., 2015).

Zytokine und Hormone bieten verschiedene Ansatzpunkte für individuelle Therapien. Ein mögliches Zielprotein ist der B-lymphocyte-stimulator (BLyS) (Finzel et al., 2018). Eine Überexpression dieses B-Lymphozyten-Aktivators erhöht die Krankheitsaktivität; in einigen SLE-Patienten wurden expressionssteigernde Mutationen in dem Gen nachgewiesen (Finzel et al., 2018). Der monoklonale AK Belimumab, der an den B-lymphocyte-stimulator bindet und dessen biologische Aktivität hemmt, reduziert die Schubfrequenz (Finzel et al., 2018). Ein weiteres therapeutisches Ziel ist IFN- $\alpha$ , da bei chronischen Hepatitiden eine IFN- $\alpha$ -Therapie einen medikamenteninduzierten Lupus auslösen kann (Finzel et al., 2018). Eine Phase II-Studie mit einem IFN- $\alpha$  antagonisierenden AK zeigte vielversprechende Ergebnisse. Der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) spielt vor allem bei Lupus-Nephritiden (LN) eine Rolle. Eine antagonisierende Therapie mit Infliximab (AK) und Etanercept (Medikament auf der Basis des TNF- $\alpha$ -Rezeptors) wird bei therapierefraktären LN und muskuloskelettalen Symptomen eingesetzt (Finzel et al., 2018).

Auch Interleukine (IL) stellen potenzielle Auslöser für einen SLE dar. Der Januskinase 1/2-Inhibitor Baricitinib inhibiert verschiedene Zytokine (z. B. Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)) und verbessert die Beschwerden bei Haut- und Gelenkmanifestationen bei SLE-Patienten signifikant (Finzel et al., 2018).

### *2.1.2 Klinik und Diagnostik*

Die SLE-Diagnosestellung wird durch den nicht linearen Verlauf der Krankheit erschwert und erfolgt auf der Basis klinischer und laborchemischer Parameter.

Zwei Klassifikationssysteme fassen die Symptome zusammen. Bei der vom American College of Rheumatology (ACR) 1982 entwickelten Klassifikation mussten für die Diagnosestellung eine bestimmte Anzahl an Kriterien erfüllt sein (Kuhn et al., 2015). Die Klassifikation wies Schwächen hinsichtlich der Genauigkeit und Empfindlichkeit auf, sodass 2019 eine überarbeitete Version in Zusammenarbeit mit der European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) veröffentlicht

wurde (Fanouriakis et al., 2019). Weiter entwickelte 2012 die Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) Kriterien zur Diagnosestellung, die die Nierenbeteiligung stärker berücksichtigen. Aktuell finden beide Klassifikationen Anwendung (Kuhn et al., 2015).

Über 75 % der SLE-Patienten mit SLE weisen im Laufe ihrer Erkrankung LE-spezifische und/oder -unspezifische Hautveränderungen auf (Kuhn et al., 2015). Bei den meisten Patienten ist das Muskel- und Skelettsystem in Form von Myalgien, Arthralgien und Arthritiden der kleinen und großen Gelenke beteiligt (Kuhn et al., 2015). Etwa die Hälfte der SLE-Patienten entwickelt eine LN. Diese zu den Glomerulonephritiden zählende Symptomatik ist durch eine Proteinurie, Erythrozyturie mit dysmorphen Erythrozyten und Erythrozytenzylindern im Urinsediment gekennzeichnet. Die LN wird in sechs Formen unterteilt, die der Therapiefindung dienen (Kuhn et al., 2015).

Beim SLE erhöhen Komplikationen aufgrund verschiedener Manifestationen das Mortalitätsrisiko Betroffener gegenüber der Normalbevölkerung um das Fünffache (Boedecker et al., 2020). Beispielsweise führt die frühzeitige Entwicklung einer Arteriosklerose zu Myokardinfarkten, die durchschnittlich im Alter von 49 Jahren und damit 20 Jahre früher als in der Normalbevölkerung auftreten und die Haupttodesursache bei SLE darstellen (O'Dwyer et al., 2017). Auch neuropsychiatrische Manifestationen treten beim SLE in diversen Ausprägungen (z. B. kognitive Einschränkungen, Psychosen, Depressionen, hirnorganische Syndrome, Epilepsien) auf (Kuhn et al., 2015). Im Alltag beeinträchtigt die Patienten hauptsächlich eine Fatigue. Der verminderte oxidative Stoffwechsel mit einer geringen aeroben Kapazität liefert weniger Energie für körperliche Aktivitäten (Keyser et al., 2003).

Laborchemisch ist beim aktiven SLE oft die Blutsenkungsgeschwindigkeit erhöht, bei normwertigen bzw. leicht erhöhten Spiegel des C-reaktiven Proteins (CRP) (Herold et al., 2012). Typisch sind auch Zytopenien und autoimmunhämolytische Anämien. Bei Nierenbeteiligung wird das Serumkreatinin sowie der Urin-Status und das Urin-Sediment bestimmt. Diagnoserelevante AK sind primär ANA. Der indirekte ANA-Immunfluoreszenztest weist eine hohe Sensitivität (95 %) bei einer relativ geringe Spezifität auf (Hartung und Seelig, 2006). Bei positivem ANA-Nachweis sollten anti-dsDNA-AK mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) und Radioimmun-assay nachgewiesen werden, deren Prävalenz bei SLE 70–98 % beträgt. Weitere AK

sind SS-A(Ro)-AK, Anti-U1 RNP-AK, Antiphospholipid-AK und Anti-C1q-AK (Hartung und Seelig, 2006). Oft besteht auch ein Komplementverbrauch, der die Bestimmung von C3 und C4 indiziert (Kuhn et al., 2015).

Der Krankheitsverlauf besteht aus Schüben und Remissionen, wobei die Höhe der ANA-Titer die Krankheitsaktivität nicht abbilden. Allerdings sind die anti-dsDNA-AK schon Monate vor einem Schub erhöht, parallel zu einem Abfall der Komplementfaktoren (Kuhn et al., 2015). Zahlreiche Studien analysierten die Eignung von cfDNA als Marker für die Krankheitsaktivität beim SLE (Lood and Duvvuri, 2019). Tug et al. (2014) fanden eine positive Korrelation zwischen der Höhe der cfDNA-Titer und mit der SLE-Krankheitsaktivität assoziierten Laborparametern (z. B. C3, C4).

### *2.1.3 Therapie*

Die Therapie richtet sich nach den individuellen Befunden, die mittels ACR/EULAR Klassifikation, SLICC-Kriterien und Fragebögen zur Aktivität und zu den Schäden erfasst werden (Kuhn et al., 2015). Dazu zählen der Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), das Systemic Lupus Activity Measure (SLAM), die British Isles Lupus Assessment Group Scale (BILAG) und das European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM), die verschiedene Aspekte der Krankheitsaktivität abfragen (Kuhn et al., 2015). Weiter wird zur Verlaufsbeschreibung der jährlich mittels SLICC und ACR erfasste Krankheitsschaden in einem Damage-Index für SLE dokumentiert (Kuhn et al., 2015).

Bei SLE-Patienten ist eine Therapie mit Antimalariamittel (z. B. Chloroquin, Hydroxychloroquin) indiziert, falls keine Kontraindikationen vorliegen (Herold et. al, 2012). Diese Medikamente hemmen Toll-Like-Rezeptoren (TLR) und haben somit einen positiven Effekt auf Arthritiden und auf LE-spezifische Hautveränderungen, verlängern die Dauer der Remissionen, erniedrigen die Schubfrequenz und vermindern die Folgeschäden des SLE. Einige Studien belegen den positiven Einfluss von Hydroxychloroquin und Chloroquin auf die Entwicklung einer LN. Weiter beeinflussen die Medikamente vermutlich den Lipid- und Glukose-Stoffwechsel positiv und reduzieren somit das kardiovaskuläre Risiko. Während der Therapie sind aufgrund der Gefahr einer irreversiblen Retinopathie regelmäßige augenärztliche

Untersuchungen notwendig. Die individuelle Dosierung der Antimalariamittel richtet sich nach dem Körpergewicht. Eine Anpassung der Dosierung ist bei einer Glomerulären Filtrationsrate (GFR) <30 ml/min erforderlich (Kuhn et al., 2015).

Für die Hautveränderungen kommen Glucocorticoide als Topika zur Anwendung. Ein Immunsuppressiva-Einsatz ist beim SLE mit Organmanifestationen indiziert. Die EULAR empfiehlt bei fehlender Organbeteiligung Azathioprin, Methotrexat (MTX) oder Mycophenolat-Mofetil, um die Glucocorticoid-Dosis zu begrenzen (Kuhn et al., 2015).

Seit 2012 ist Belimumab als Zusatz bei schweren Verläufen zugelassen. Dieser an den B-lymphocyte-stimulator (BLyS) bindende monoklonale AK verringert die Lebensdauer der B-Lymphozyten und dämpft die Entzündungsaktivität ein (Tsokos, 2011). Seit 2021 ist Belimumab auch bei LN zugelassen, da der AK die Dauer der LN verkürzt und die Mortalität erniedrigt. In Abhängigkeit vom Grad der LN ist zusätzlich die Gabe von Azathioprin, Methotrexat (MTX) und Mycophenolat-Mofetil indiziert (Kuhn et al., 2015).

Entscheidend für den Krankheitsverlauf des SLE ist nicht nur die direkte Therapie, sondern auch die Behandlung von Nebenerkrankungen (z. B. Infektionen, Diabetes mellitus, Arteriosklerose, Dyslipidämien, Osteoporose) (Kuhn et al., 2015).

Zusätzlich ist die Gewichtskontrolle und eine Rauchabstinenz zu beachten, da beide Faktoren den Verlauf des SLE und seiner Komorbiditäten negativ beeinflussen. Wie bei anderen rheumatologischen Erkrankungen ist ein wichtiger Faktor eine ausreichende Bewegung (s. Kap. 2.3) (Kuhn et al., 2015).

## 2.2 Freizirkulierende Nukleinsäuren (cfDNA)

Erstmals wurden 1948 cfDNA im humanen Plasma beschrieben (Mandel and Matais, 1948). Als 1966 erhöhte cfDNA-Werte im Plasma von SLE-Patienten nachgewiesen wurden, erkannte man den diagnostischen Nutzen der cfDNA-Bestimmung als Biomarker auch für andere Autoimmunerkrankungen (Tan et al., 1966). In früheren Studien wurden die Ergebnisse durch die Ausschüttung von DNA, getriggert durch Leukozyten während der Koagulation, verfälscht. Der Durchbruch zur cfDNA-Bestimmung gelang mit der Erkenntnis, dass sich Plasma für die cfDNA-Bestimmung eignet (Barnett, 1968). Pathologische cfDNA-Werte wurden auch bei anderen

Autoimmunerkrankungen (z. B. Rheumatoide Arthritis) nachgewiesen (Dunaeva et al., 2015). Neuere, sensitivere Messverfahren erlauben den Nachweis der deutlich niedrigeren cfDNA-Konzentrationen auch in gesunden Probanden (Fleischhacker and Schmidt, 2007). Die Eignung von cfDNA als Biomarker für die Aktivität von Autoimmunerkrankungen wird dadurch unterstrichen, dass bei akuten Schüben besonders hohe Werte nachweisbar sind (Lood and Duvvuri, 2019).

Durch technologische Neuerungen (z. B. Enzymtests, Polymerase-Kettenreaktion (PCR)), gelang es, die cfDNA zu quantifizieren und weitere Informationen zu generieren. Die Nutzung von cfDNA als Biomarker wurde dabei aus den Augen verloren, bis man vor einiger Zeit ihre Relevanz für den Nachweis inflammatorischer bzw. autoimmunen Erkrankungen (z. B. SLE, Rheumatoide Arthritis (RA)) erkannte (Lood and Duvvuri, 2019).

Freizirkulierende Nukleinsäuren, kommen nicht nur beim Menschen sondern auch in extrazellulären Flüssigkeiten anderer Organismen (Tiere, Pflanzen) vor (El Messaoudi et al., 2013) (Schütz et al., 2005) (Gahan, 2003). In der Onkologie lässt sich die cfDNA-Bestimmung in Flüssigkeitsbiopsien für diagnostische und prognostische Zwecke nutzen (El Messaoudi et al., 2013), da sie Tumor-DNA enthält (Stroun et al., 1987). Zudem spielt die cfDNA-Bestimmung bei der pränatalen Diagnostik (Lo et al., 2010), Traumata (Rainer, 2001), Sepsis (Rhodes et al., 2006), Herzinfarkt (Shimony et al., 2010), Schlaganfall (Rainer et al., 2003) oder bei Transplantationen (Snyder et al., 2011) eine Rolle.

Gesunde Individuen zeigen relativ niedrige cfDNA-Konzentrationen (Fleischhacker and Schmidt, 2007). Die Fragmentlängen liegen unter 200 Basenpaaren (bp) (Chan et al., 2004). Die cfDNA enthält Informationen über die Herkunft, die für Diagnostik von Bedeutung sind (Snyder et al., 2016).

Von den verschiedenen Mechanismen zur Ausschüttung von cfDNA haben die Degradierung von DNA, Zellapoptose und Elimination von Zelltrümmern bei der SLE die größte Relevanz (Lood and Duvvuri, 2019).

### *2.2.1 Methoden zur Detektion der cfDNA*

Mit dem Aufkommen der PCR konnten über die Amplifikation von cfDNA neue Informationen erhalten werden (Lood and Duvvuri, 2019). Bislang fehlen

standardisierte Bedingungen für die cfDNA-Messung; in den ISO Richtlinien 20.395:2019 sind lediglich die Anforderungen zur Bewertung der Leistung von Quantifizierungsmethoden für Nukleinsäure-Zielsequenzen (qPCR und digitale Polymerasekettenreaktion (dPCR)) festgelegt (ISO, 2019). Das verwendete Laborverfahren beeinflusst die Ergebnisse der cfDNA-Quantifizierung (Breitbach et al., 2012). Zu den Einflussfaktoren zählen präanalytische (z. B. DNA-Reinigungsmethode) und analytische Variablen (z. B. Zielgen für die Amplifikation der cfDNA) (Meddeb et al., 2019).

Meddeb et al. (2019) veröffentlichten Richtlinien zur cfDNA-Messung und analysierten verschiedene Quantifizierungsverfahren. Die schnelle Messung der cfDNA-Konzentration mittels Spektralphotometrie unterliegt verschiedenen Limitierungen. Die Absorptionsmessung ist hauptsächlich auf dsDNA-Konzentrationen  $>2$  ng/ $\mu$ l beschränkt. Nur das Thermo Scientific™ NanoDrop™ One erfasst dsDNA-Konzentrationen von 0,2–27500 ng/ $\mu$ l. Für niedrige Konzentration ist eine fluorometrische Quantifizierung (z. B. Qubit-Technologien) eine Option. Tape-Stationen ermöglichen die fluorometrische Quantifizierung und die Größenbestimmung von cfDNA (Meddeb et al., 2019).

Die meisten Studien analysieren die cfDNA mittels qPCR-basierter Methoden, da diese die höchste Sensitivität und Spezifität für die Bestimmung von DNA-Konzentrationen besitzen (Meddeb et al., 2019). Bei der PCR werden in der Regel Fragmente amplifiziert, die nicht der vollständigen Länge der cfDNA-Fragmente entsprechen (Breitbach et al., 2012), da die Amplifizierung der gesamten cfDNA-Länge die Ausbeute verringert (Meddeb et al., 2019). Für die cfDNA-Messung unter Ruhebedingungen, ist aufgrund der geringen Konzentrationen (im niedrigen Nanogrammbereich) eine hochsensitive Labormethode erforderlich (Breitbach et al., 2012). Daher ist ein qualitativ hochwertiges Primer-Design für den Nachweis der DNA-Fragmente essenziell (Meddeb et al., 2019).

Die zielsequenzspezifischen qPCR-Methoden können zwischen nukleärer und mitochondrialer cfDNA unterscheiden und diese unabhängig voneinander quantifizieren. Dagegen lässt sich mit der Spektrometrie und Fluorometrie nur die cfDNA-Gesamtsumme bestimmen. Dieser Unterschied könnte die Diskrepanzen zwischen der Quantifizierung mittels qPCR und mittels optischer Methoden erklären. Letztere weisen häufig größere cfDNA-Mengen nach (Meddeb et al., 2019). Verschiedene Studien kommen in Abhängigkeit von der Messmethode zu

verschiedenen cfDNA-Ergebnissen. Unspezifische DNA-Messungen mittels Spektrometrie ergaben sehr hohe cfDNA-Werte (Summenwert aus nukleären, bakteriellen, viralen und mitochondrialen Fragmenten) (Atamaniuk et al., 2004). Die ermittelten niedrigen cfDNA-Konzentrationen zu Beginn und nach dem Training bei Fatouros et al. (2006) sind hingegen vermutlich darauf zurückzuführen, dass nur genomische cfDNA gemessen wurde und somit die Messung mitochondrialer oder potenzieller nicht humaner Sequenzen viralen oder bakteriellen Ursprungs im Plasma ausgeschlossen wurde. Hierbei wurde ein 189 bp-Fragment des  $\beta$ -Globulin-Gens amplifiziert, das die typische Größe apoptotischer DNA aufweist (Fatouros et al., 2006). Demgegenüber verwendeten Beiter et al. ein 88 bp-Fragment des Myostatin-Gens und erzielten dabei vergleichbar hohe cfDNA-Werte wie bei Atamaniuk et al. (Breitbach et al., 2012).

Die Ergebnisse bei der cfDNA-Bestimmung hängen somit maßgeblich von der Quantifizierungsmethode ab.

### 2.2.2 Apoptose

Die Apoptose (programmierte Zelltod) ist essenziell für die Homöostase des Organismus, da sie beschädigte Zellen eliminiert. Dieser Vorgang wird durch Enzyme (z. B. Effektor-Caspasen) initiiert, die durch verschiedene Signale (z. B. oxidativer Stress) aktiviert werden (Lood and Duvvuri, 2019). Die Apoptose besteht aus einer Kaskade morphologischer Veränderungen, zu denen die Abnahme der Zellgröße, die Auflösung der Kernmembran sowie die DNA-Fragmentierung gehören (Jahr et al., 2001) (Wang et al., 2003). Apoptotische Zellen werden durch die Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche erkannt und durch Phagozytose beseitigt (Fadok et al., 1998). Die Apoptose setzt anti-inflammatorische und immunsuppressive Effekte in Gang (Savill and Fadok, 2000). Bei einer gestörten Apoptose sammeln sich tote Zellen und Zelldebris an, wobei die intrazelluläre Akkumulation von Antigenen und extrazelluläre Akkumulation von DNA langfristig zu einer inflammatorischen Reaktion führen kann (Savill et al., 2002). Im Zellkern wird die DNA durch calciumabhängige Endonukleasen in gelelektrophoretisch nachweisbar doppelsträngige Fragmente (Länge 180–200 bp) geschnitten (Wyllie, 1980).

Bei SLE-Patienten, deren Erkrankung durch eine erhöhte Apoptose und gestörte Elimination von Zelltrümmern gekennzeichnet ist (Chan et al., 1997), tritt cfDNA mit einem niedrigen Molekulargewicht ähnlich der apoptotischen DNA auf. Gelelektrophoretisch lässt sich eine starke Fragmentierung auf eine durchschnittliche Fragmentlänge von 150–200 bp nachweisen (Giacona et al., 1998). Aus SLE-Plasma gereinigte DNA bildete diskrete Banden, überwiegend mit einer Einheitsgröße von ~200 bp, charakteristisch für DNA in Oligonukleosomen (Chan et al., 2014). In einer anderen Studie, in der DNA aus den anti-dsDNA-Auto-AK-Immunkomplexen in Seren von SLE-Patienten isoliert wurde, wurde eine starke Korrelation zwischen DNA-Größen mit niedrigem Molekulargewicht (sowohl 30-50 als auch 150-200 bp), Krankheitsaktivität und der Häufigkeit von Nierenerkrankungen festgestellt (Colombo et al., 2014). Bei der genomweiten Sequenzierung wurde festgestellt, dass die Plasma-DNA von SLE-Patienten eine verkürzte Fragmentlänge ( $\leq 115$  bp) aufweist, die mit dem SLEDAI-Score und der Menge der Anti-dsDNA-Auto-AK korreliert. Darüber hinaus sind IgG-gebundene DNA-Fragmente von SLE-Patienten kürzer ( $\leq 115$  bp) als nicht IgG-gebundene DNA (Lood and Duvvuri, 2019).

### 2.2.3 Nekrose

Die in Studien nachgewiesenen großen cfDNA-Fragmente führten zu der Annahme, dass auch die Nekrose an der Freisetzung von cfDNA beteiligt sein könnte (Jahr et al., 2001) (Wang et al., 2003).

Die Nekrose ist ein spontan ablaufender Zelltod als Antwort auf eine physische oder chemische Zellschädigung. Der Prozess ist gekennzeichnet von einem Anschwellen der Zelle und einer gestörten Barrierefunktion der Zellmembran, die zu einer Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen führt. Das freigesetzte Chromatin wird nicht spezifisch gespalten, wodurch große cfDNA-Fragmente entstehen (Rock and Kono, 2008). Dieser Vorgang spielt bei Traumata, Verletzungen und Sepsen, aber auch beim SLE eine große Rolle (Lam et al., 2003).

Die intrazelluläre Adenosintriphosphat-(ATP)-Konzentration gehört zu den Faktoren, die bestimmen, ob eine Zelle durch Nekrose oder Apoptose eliminiert wird. Bei SLE-Patienten sind viele Cluster of Differentiation (CD)4+-T-Zellen nachweisbar, die durch eine ATP-Erschöpfung gekennzeichnet sind auf Grund einer anhaltende mitochondriale Hyperpolarisation. Dies führt zu einer oxidativen Phosphorylierung

und einer Produktion von reaktiven Sauerstoffzwischenprodukten (ROI), wenn kein ATP zur Verfügung steht. Bei ATP-Mangel bleibt die Aktivierung der Apoptose aus, die CD4+-T-Zellen nekrotisieren und setzen somit cfDNA frei (Gergely Jr et al., 2002) (Gergely et al., 2002).

#### 2.2.4 NETose

Die NETose ist eine Form des programmierten Zelltods bei neutrophilen Granulozyten, bei dem eine netzartige Struktur aus nukleosomaler dekondensierter DNA, Histonen und Proteinen in den extrazellulären Raum gelangt (Yipp and Kubes, 2013). Diese „Netze“ dienen der Abwehr von Bakterien. Das freigesetzte Chromatin und bakterizide Enzyme bilden „neutrophil extrazellulär traps“ (NETs), die Bakterien immobilisieren und abtöten (Finzel et al., 2018). Hierbei werden geringe Mengen DNA, hauptsächlich mitochondrialer DNA (mtDNA), freigesetzt, so dass die Neutrophilen Granulozyten am Leben bleiben und weiterhin antimikrobielle Maßnahmen ergreifen können (Yipp and Kubes, 2013). Neben neutrophilen Granulozyten bilden auch andere Zelltypen extrazelluläre Fallen (Granger et al., 2017). In Anbetracht der Tatsache, dass dsDNA das strukturelle Rückgrat von NETs ist, könnten unter den Bedingungen einer übermäßigen NETose (Lood et al., 2016) oder einer fehlenden Beseitigung der NETs für erhöhte Konzentrationen von zirkulierender cfDNA verantwortlich sein (Leffler et al., 2015). In Übereinstimmung mit dieser These wurde festgestellt, dass die Ablagerung von NETs bei verschiedenen pathologischen Zuständen, einschließlich SLE, mit den cfDNA-Spiegeln in Zusammenhang steht (Lood et al., 2016). In-vitro Studien und Nierenbiopsien bei LN belegen, dass defekte NETs, die nicht degradiert werden, akkumulieren (Finzel et al., 2018).

#### 2.2.5 Pyroptose

Pyroptose ist eine Form des Zelltods im Rahmen einer Entzündung (Bergsbaken et al., 2009). Caspasen regulieren den Entzündungsprozess durch pro-inflammatorische Zytokine (z. B. IL-1 $\beta$ , IL-18) sowie Pyroptose (Magna and Pisetsky, 2015). Diese Zytokine werden durch die Caspase 1, die die Zellyse einleitet, freigesetzt, was zur Ausschüttung von cfDNA führen kann. Die Caspase 1 initiiert

außerdem die Fragmentierung von DNA, Kondensierung des Nukleus, die Exozytose von Lysosomen, die Zunahme der Porengröße in der Zellmembran und das Anschwellen der Zelle (Magna and Pisetsky, 2015). Zusätzlich zur Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 wird auch High-mobility group protein B1 (HMGB1), das als damage-associated molecular pattern (DAMP) wirkt und ein wichtiger Bestandteil des Immunkomplexes bei SLE-Patienten ist, sezerniert (Magna and Pisetsky, 2015). Die durch Pyroptose in den extrazellulären Raum freigesetzte cfDNA kann mit HMGB1 komplexieren (Lood and Duvvuri, 2019).

#### *2.2.6 Gebundene cfDNA an Transportproteinen*

Die cfDNA liegt oft in Komplexen mit verschiedenen Strukturen (z. B. anti-dsDNA-Auto-AK) vor. Diese werden mittels Endozytose in plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) aufgenommen, was zu einer Ausschüttung von IFN- $\alpha$  führt (Rönnblom and Pascual, 2008). Das bei SLE-Patienten erhöhte Zytokin ist mit der Krankheitsaktivität assoziiert (Rönnblom and Pascual, 2008). Antimikrobielle Peptide (z. B. LL37) verstärken die Immunität von DNA-Immunkomplexen bei SLE (Lande et al., 2011). Das in einer erhöhten Konzentration in der Zirkulation von SLE-Patienten vorliegende LL37 bindet an DNA, um diese vor Nukleasen zu schützen. Die LL37-DNA-Immunkomplexe unterstützen die Aktivierung der plasmazytoiden dendritischen Zellen (Lande et al., 2011).

#### *2.2.7 Oxidativer Status der cfDNA*

Relevant für das Inflammationspotenzial der cfDNA ist das Vorhandensein oxidierter Nukleotide, die zu den damage-associated molecular patterns (DAMPs) zählen. Dabei spielt auch der Grad der Oxidation eine Rolle (Gehrke et al., 2013). Erhöhte Werte oxidierter cfDNA wurden bei verschiedenen entzündlichen Prozessen nachgewiesen (Ermakov et al., 2013). Freie Sauerstoffradikale oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die durch den Zelltod oder durch Phagozyten bei der Inflammation generiert werden, können DNA oxidieren und somit oxidierte cfDNA freisetzen (Kannan and Jain, 2000). Die durch Basenmodifikation veränderte oxidierte cfDNA ist im Vergleich zu nicht oxidiertem DNA resistenter gegenüber

Nukleasen und kann somit weitere Inflammationsprozesse initiieren (Gehrke et al., 2013).

Unter den von reaktiven Sauerstoffspezies verursachten Modifikationen der Basenpaare scheint eine Umwandlung von Guanin in 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosin (8-OHdG) besonders wichtig zu sein (van Loon et al., 2010). Diese Modifikation dient als Marker für oxidativen Stress bei pathologischen Konditionen, da die oxidierte DNA inflammatorische Kaskaden (z. B. Aktivierung vom Toll-like Rezeptor 9) aktiviert (Gehrke et al., 2013) (Lood et al., 2016). Die Oxidation erhöht auch die Antigen-Wirkung der DNA, wie die gesteigerte Reaktivität der oxidierten DNA in Sera von SLE-Patienten im Vergleich zu nativer DNA belegt (Lunec et al., 1994). Die erhöhten 8-OHdG-Werte in den DNA-Immunkomplexen von SLE-Patienten belegen die zentrale Rolle der Sauerstoffradikale in der SLE-Pathologie, indem sie die Antigen-Wirkung von DNA modifizieren (Lunec et al., 1994).

#### *2.2.8 Elimination von Zelltrümmern*

Eine schnelle Elimination von Zelltrümmern ist für die Verhinderung von beim SLE auftretenden Entzündungen und Autoimmunreaktionen gegen DNA essenziell (Lood and Duvvuri, 2019). In gesunden Organismen wird die cfDNA zeitnah durch Endonukleasen degradiert und über verschiedene Organe (Niere, Leber, Milz) eliminiert (Emlen and Mannik, 1978). Zu den Faktoren, die die Funktion der DNasen und damit auch die Elimination der cfDNA beeinträchtigen, zählen die Bildung von cfDNA-Komplexen mit Proteinen, Nukleosomen oder AK. Weiter spielt eine Rolle, ob die cfDNA frei im Plasma zirkuliert oder ob sie in Exosomen oder Apoptosekörpern vorliegt (Lood and Duvvuri, 2019). Auch die Herkunft – nukleär oder mitochondrial – bestimmt die Stabilität und Struktur der cfDNA (Richter et al., 1988).

Hauptenzyme für die Degradierung von freier oder proteingebundener, nukleärer cfDNA sind die DNase I und DNase I L3. Während die DNase I freie DNA spaltet, verdaut die DNase I L3 hauptsächlich nukleosomale cfDNA die im extrazellulären Raum oder in Mikropartikeln vorhanden ist (Lood and Duvvuri, 2019).

Bei SLE-Patienten ist die Aktivität der DNase I reduziert (Leffler et al., 2015). Vor allem Patienten mit renaler Beteiligung (Leffler et al., 2015) und erhöhten Serumwerten von DNase I-Inhibitoren (z. B. G-Aktin) zeigen erhöhte ANA-Titer

(Frost and Lachmann, 1968). Mutationen in der DNase I sind mit erhöhten anti-dsDNA-AK-Titern assoziiert (Yasutomo et al., 2001).

Spezifische AK können die DNA vor der Verdauung durch die DNase I schützen (Emlen et al., 1984) und deren Enzymaktivität beeinflussen (Yeh et al., 2003). Anti-dsDNA-AK vermindern nicht nur die Enzymaktivität, sondern verhindern auch die Erkennung der DNA durch die DNase I (Lood and Duvvuri, 2019). Kationisch Proteine, wie Cathelicidin LL3, neutrophile Peptide und IL-26B, können die Fähigkeit der DNA, von DNase I erkannt und abgebaut zu werden, beeinträchtigen, in dem sie durch ihre Ladungswechselwirkungen unlösliche Aggregate bilden und somit die cfDNA schützen (Meller et al., 2015). Zusätzlich kann ein Mangel an Kofaktoren die Aktivität der DNase I verringern. Beispielsweise ist die C1q-Konzentration bei SLE-Patienten verringert. Dieser Komplementfaktor fördert die Aktivität der DNase I bei der Degradierung des Chromatins nekrotischer Zellen (Gaipl et al., 2004). Kofaktoren lösen beispielweise an die DNA gebundene Proteine ab und legen so die Spaltstellen für die DNase I frei oder stabilisieren diese (Gaipl et al., 2004).

In einer Genanalyse von Familien mit an SLE erkrankten Kindern war eine homozygote loss-of-function Mutation des DNASE1L3 Genes mit höheren anti-dsDNA-AK-Titern und LN assoziiert (Al-Mayouf et al., 2011).

Neben der Elimination der cfDNA durch extrazelluläre Nukleasen degradieren intrazelluläre Nukleasen wie TREX1, primär einzelsträngige DNA (ssDNA), die durch Carrierproteine ins Zytosol transloziert wurde. TREX1 kann jedoch keine oxidierten Substrate wie die mtDNA eliminieren, die beim SLE hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten vorkommen (Caielli et al., 2016). Liegt oxidierte zellfreie mtDNA länger frei im Zytosol von Immunzellen vor, werden Entzündungskaskaden in Gang gesetzt (Lee-Kirsch et al., 2007). Hierbei spielen Komplementfaktoren wie C1 eine wichtige Rolle, da sie abgestorbene Zellen und Zelltrümmer opsonieren und so cfDNA aus der Zirkulation entfernen (Gaipl et al., 2004). Andere Opsonine (z. B. CRP, Immunglobulin M (IgM)) übernehmen bei der Beseitigung abgestorbener Zellen ähnliche Funktionen; auch hier führen Defekte zur Akkumulation von cfDNA (Mahajan et al., 2016). Weiter spielen die Gene ATG5 und RAD51B bei einer gestörten Eliminierung von Zelldetritus eine Rolle (Teruel and Alarcón-Riquelme, 2016). ATG5 ist für die Aktiveringung und Differenzierung bestimmter Immunzellen verantwortlich und RAD51B für die Reperatur bei Doppelstrangbrüchen verantwortlich (Teruel and Alarcón-Riquelme, 2016).

Bei einer gestörten Phagozytose werden apoptotische Zellen nekrotisch und setzen Kernbestandteile frei. Dazu gehört das Alarmin High mobility group box 1 (HMBG1) (Finzel et al., 2018), das ein zentrales Autoantigen der SLE-Immunpathogenese darstellt (Finzel et al., 2018). Im Mausmodell kommt es bei erhöhten HMBG1-Serumkonzentrationen zu einer gesteigerten anti-dsDNA-AK-Produktion, da es über TLR2 Antigen-präsentierende Zellen und somit autoreaktive T-Zellen aktiviert (Finzel et al., 2018).

### *2.2.9 cfDNA unter körperlicher Belastung*

Zunächst wurden in den 1960er Jahren erhöhte cfDNA-Werte bei pathologischen Prozessen im Körper nachgewiesen. 2004 fanden dann Atamaniuk et al. (2004) eine solche Zunahme auch bei gesunden Individuen nach erschöpfender, physischer Aktivität in Form eines Halbmarathons. Nach starker Belastung stiegen die cfDNA-Werte um ein Vielfaches über dem Basalwert an und fielen nach ca. zwei Stunden wieder auf den Ausgangswert ab (Atamaniuk et al., 2004). Diese phasenhafte Verlauf bestätigte sich auch bei anderen körperlichen Aktivitäten (z. B. Wettkampfläufe, Krafttraining, Rad- und Ruderergometer) (Breitbach et al., 2014). Hier stiegen die cfDNA-Werte bei gesunden Probanden um das 10-Fache an und fielen nach 15 min wieder ab (Breitbach et al., 2014). In einer Studie mit Schwangeren betrug die durchschnittliche Halbwertszeit von cfDNA 16,3 min (Lo et al., 2010).

Nachdem Studien die Eignung der cfDNA als Biomarker unter pathologischen Konditionen nachgewiesen hatten (Beiter et al., 2014) (Lood and Duvvuri, 2019), schien auch eine Nutzung bei der durch physische Aktivität ausgelösten Inflammation bzw. beim Übertraining möglich (Atamaniuk et al., 2004). Die cfDNA-Werte weisen jedoch starke individuelle Schwankungen auf und hängen von der Art der Aktivitätssteigerung und der Belastungssituation ab (Breitbach et al., 2012).

Ein möglicher Vorteil der cfDNA gegenüber konventionellen Biomarkern mit verzögerter Kinetik (z. B. Kreatinkinase) ist eine Veränderung direkt nach dem Training (Breitbach et al., 2014). Zudem ist die cfDNA-Messung weniger invasiv, da keine venöse Blutabnahme erforderlich ist, sondern kapilläres Blut aus der Fingerkuppe verwendet werden kann (Breitbach et al., 2014). Bei einer insgesamt lückenhaften Studienlage wurde angenommen, dass die cfDNA-Elevation bei kurzen

Belastungen (z. B. Ausbelastung auf dem Laufband) durch aktive Sekretion verursacht wird und nicht wie unter pathologischen Konditionen durch Nekrose oder Apoptose (Breitbach et al., 2014). In einer Studie wurde eine Genkartierung von cfDNA durchgeführt und, dass bei gesunden Probanden hauptsächlich myeloide und lymphoide Zellen für die Ausschüttung von cfDNA verantwortlich sind (Snyder et al., 2016). Wie bei Traumata (Rainer, 2001) oder einer Sepsis (Rhodes et al., 2006) kommt es auch bei anstrengender körperlicher Aktivität zu oxidativem Stress, der Leukozyten und Muskelzellen schädigt und pro-inflammatorische Akute-Phase-Proteine aktiviert (Gleeson, 2007).

Breitbach et al. (2012) entwickelten ein Modell zur cfDNA-Ausschüttung bei physischer Aktivität. In Ruhe liegt die DNA im Zellkern vor. Infolge biologischer Reorganisationsprozesse und/oder Umwelteinflüsse werden kleine Mengen DNA in die Zirkulation entlassen. Bei chronischer Belastung (z. B. Ultramarathon) (Atamaniuk et al., 2008) kommt es zu apoptotischen und nekrotischen Prozessen. DNA-Fragmente verlassen die Zelle und binden an die äußere Zellmembran. Bei Überschreitung der Bindekapazität gelangen die Fragmente in die Zirkulation, wodurch sich mehrere Stunden nach Einsetzen des Belastungsstimulus die cfDNA-Werte erhöhen. Akuter Stress bei kurzzeitiger, intensiver körperlicher Betätigung geht einher mit der Akkumulation von Stresshormonen und Zytokinen, Veränderungen der Blutbestandteile, erhöhter Temperatur, erhöhtem Sauerstoff- und Energiemangel oder mechanischer Beeinträchtigung. Hierbei steigen die cfDNA-Spiegel innerhalb von Sekunden spontan an, durch NETose, die Freisetzung von Exosomen oder Mikrovesikeln und eine aktive Freisetzung von extrazellulärer oder neu synthetisierter DNA (Breitbach et al., 2012).

Die beschriebenen Prozesse belegen die Komplexität der an der cfDNA-Ausschüttung unter pathologischen Konditionen und bei physischer Aktivität beteiligten Mechanismen. Letztlich müssen die detaillierten Prozesse noch entschlüsselt werden. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass die methylierte cfDNA bei körperlicher Aktivität (Ausbelastung auf dem Laufband) hauptsächlich durch Granulozyten freigesetzt wird (Neuberger et al., 2022).

Die cfDNA-Werte werden durch die Intensität und Frequenz der körperlichen Belastung beeinflusst, die unterschiedlichen oxidativen, mechanischen und metabolischen Stress verursachen (Breitbach et al., 2012). Laut Atamaniuk et al. (2004) und Beiter et al. (2014) wird die cfDNA-Steigerung bei gesunden Probanden

durch lange aerobe oder kurze anaerobe körperliche Belastung ausgelöst. Das Ausmaß des Anstiegs variiert jedoch stark zwischen Individuen und der Art der Belastung. Nach einem Krafttraining beträgt der Anstieg im Vergleich zum Ruhewert 1,6 (Tug et al., 2017a) und nach einer Steigerungsbelastung auf dem Laufband 9,8 (Breitbach et al., 2014). Auch Haller et al. (2017) wiesen nach, dass die Höhe der cfDNA-Konzentration maßgeblich von der Belastungsintensität und -dauer abhängt (Haller et al., 2017).

Wie in Kapitel 2.2.7 aufgeführt, unterliegt die cfDNA-Konzentration einem homöostatischen System aus Freisetzung und Degradierung über Exonukleasen und dem Abbau über Leber, Niere und Milz (Emlen and Mannik, 1978). Die frei liegende oder gebundene DNA wird im Blutkreislauf mittels DNase I abgebaut (Beiter et al., 2014). Bei einer Ausschüttung von cfDNA als Antwort auf physische Belastung steigt gleichzeitigen die DNase I-Aktivität im Blut an (Beiter et al., 2014).

Die cfDNA zeigt ein typisches Fragmentierungsmuster (dominierende Länge circa 166 bp), das einem DNA-Abschnitt, der um ein Histon 1 gewickelt ist (Nukleosom), entspricht (Jiang and Lo, 2016). Auf diese Weise wird der DNA-Abschnitt vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt. Ein weiterer Schutz stellt die Bindung der cfDNA an extrazelluläre Vesikel dar (Neuberger et al., 2021b). Dies betrifft zwar nur einen kleinen Teil der cfDNA, vermutlich handelt es sich jedoch bei den cfDNA-haltigen extrazellulären Vesikeln um eine Steady-State-Population von apoptotischen Körpern im Blutkreislauf, die für die Homöostase der cfDNA elementar ist (Neuberger et al., 2021b).

Aktuell wird die cfDNA zur Messung des individuellen Leistungsniveau verwendet, dient als Marker für metabolischen oder oxidativen Stress oder spiegelt einen Zustand des Übertrainings wider (s. Abb. 3) (Breitbach et al., 2014).

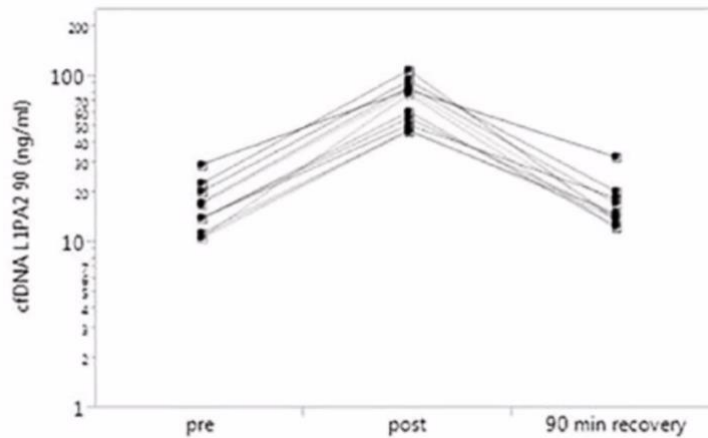


Abbildung 3: Verlauf einer Ausbelastung von gesunden Probanden auf einem Fahrradergometer vor, direkt nach und 90 min nach der Ausbelastung – Anstieg der cfDNA um das 4,4-Fache kurz nach der Ausbelastung (Tug et al., 2017b)

### 2.3 Körperliche Aktivität bei SLE

Beim SLE ist der Alltag der Betroffenen durch unterschiedliche Symptome geprägt. Diese bewirken eine verminderte physischen Aktivität, was bekanntermaßen die Prävention verschiedener Herz-Kreislauf-Erkrankungen negativ beeinflusst und wahrscheinlich auch die chronische Fatigue, die charakteristisch für SLE ist, verstärkt (Mancuso et al., 2011). Myokardinfarkte sind die Haupttodesursache bei SLE und ereignen sich im Durchschnitt im Alter von 49 Jahren und damit 20 Jahre früher als in der Normalbevölkerung (Borba and Bonfa, 1997). Laut Volkmann et al. (2010) begünstigt körperliche Inaktivität bei SLE-Patienten pro-inflammatorisches High density lipoprotein (HDL) und so die Entstehung von Arteriosklerose.

Oftmals sehen sich SLE-Patienten mit Hürden konfrontiert, die sie daran hindern, regelmäßig zu trainieren. Viele Patienten leiden unter Arthrose, Arthralgie, Serositis, Anämie und an pulmonalen Erkrankungen (O'Dwyer et al., 2017). SLE-Patienten besitzen eine geringere kardiovaskuläre Kapazität und Muskelkraft (Tench et al., 2002). Zu den 2008 publizierten EULAR-Empfehlungen für einen besseren Lebensstil bei SLE gehören körperliche Aktivität, Gewichtskontrolle und Raucherentwöhnung (Bertsias et al., 2008). In einer Zusammenfassung der aktuellen Studienlage zur körperlichen Aktivität bei SLE (O'Dwyer et al., 2017) kam es bei vier von zehn inkludierten Studien zu einer leichten, nicht signifikanten Besserung des SLEDAI post interventionell; in keiner Studien zeigte sich ein negativer Effekt. Weiter wurde nachgewiesen, dass sich die physische Aktivität durch die Steigerung der

Reserven der Chronotropie und durch eine schnellere Abnahme der Herzfrequenz nach Belastung positiv auf das Herz-Kreislaufsystem auswirkte. Auch die allgemeine physische Fitness (z. B. Steigerung der anaeroben Schwelle, respiratorische Kompensation) verbesserte sich. Ein weiterer zentraler Aspekt der inkludierten Studien war die Fatigue. Aufgrund der Nutzung verschiedener Fragebögen und individueller Faktoren waren die Ergebnisse nach dem Sport nicht konsistent (leichte Besserung oder keinerlei Einfluss). Jedoch förderte die körperliche Aktivität keine Entzündungen, die als starker Einflussfaktor der Fatigue gelten, und beeinflusste somit den Krankheitsaktivität nicht negativ. Insgesamt ließ sich folgern, dass sich regelmäßiges Training überwiegend positiv auf die Fatigue auswirkt (O'Dwyer et al., 2017).

Zusätzlich zeigte eine 2003 veröffentlichten Studie, dass SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine niedrigere maximale Sauerstoffaufnahme ( $VO_2\text{peak}$ ) aufweisen und demnach über ein geringeres Leistungsniveau verfügen. Die aerobe Kapazität war so stark herabgesetzt, dass bereits bei der Verrichtung von Aktivitäten des Alltags die  $VO_2\text{peak}$  erreicht wurde. Weiter bestand eine negative Korrelation zwischen der aeroben Kapazität und der schweren, aktivitätseinschränkenden Fatigue (Keyser et al., 2003). Je ausgeprägter die Fatigue war, desto geringer war die aerobe Kapazität und die körperliche Belastbarkeit.

Sportliche Aktivität erhöht die Produktion von regulatorischen T-Zellen, vermindert die Ausschüttung von Immunglobulinen und verändert das Verhältnis von Th1- und Th2-Zellen und hat somit Einfluss auf das Immunsystem (Sharif et al., 2018).

### 3 Material

#### 3.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller
384-well PCR Platten (FrameStar®)	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
AMPISEAL Transparente Mikroplatten Abdeckfolie	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Avant Guard Barrier Tips Low Binding 10µl, 100µl, 1000µl	Midwest Scientific, Valley Park, USA
Butterfly zur Blutentnahme: Safety-Multifly®-Set (Nadel: 0,8 x 19 mm)	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbergrecht
Cellstar Tubes (Falcon) 15 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Kunststoff-Kapillaren	EKF Diagnostics Holdings plc Company, Barleben
Low retention Reaktionsgefäße 0,6/1,5 ml	Sigma-Aldrich
Mikrovette CB300 K2E	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbergrecht
Mundschutz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Safety-Lanzetten	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbergrecht
Screen touch nitril (Handschuhe)	Axon Lab AG, Reichenbach
S-Monovette® 7,5 ml EDTA K3 / 2,7 ml EDTA K3	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbergrecht

#### 3.2 Chemikalien und PCR-Komponenten

Tabelle 2 Chemikalien und PCR-Komponenten

Artikel	Hersteller
70 % Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA Away®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

DNA Oligonukleotide	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg
dNTPs	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Elektrodenspray	Gello GmbH, Ahaus
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HiFi-Puffer	Bioline GmbH, Luckenwalde
Invitrogen Ultra Pure Water	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kodan Tinktur forte (Antiseptikum)	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
NucleoSnap cfDNA-Kit für zellfreie DNA aus Plasma	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAamp-Kit für zirkulierende Nukleinsäure	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quant-iT PicoGreen	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SYBR® Green I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
VELOCITY DNA-Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde

### 3.3 Geräte und Software

Tabelle 3 Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Bio-Rad CFX Manager 3.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BlueCherry Version 1.3.0.1	Geratherm Medical AG, Geschwenda
Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
CFX384 Real-Time System mit C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ErgoOne 2,5 µl, 10 µl (Pipetten)	ergoline GmbH, Bitz
Ggplot2 (v3.3.2)	Programm

Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Labnet SN C1301-T-230V (Minizentrifuge)	BioSpace, Urbandale, USA Cole-Parmer GmbH, Wertheim
Matplotlib (v3.1.1)	Matplotlib development team, Programm
Minizentrifuge Mini Star	VWR International, Radnor, USA
NanoDrop 3300 Fluorospektrometer	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA
Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Optiplex 9020	Dell Technologies Incl., Round Rock, USA
peqlab PCR Workstation	VWR International, Radnor, USA
R (v3.6.3)	R Core Team, Programm
Reference 2 20 µl (Pipetten)	Eppendorf AG, Hamburg
Research plus 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Pipetten)	Eppendorf AG, Hamburg
Respiratory Ergostik	Geratherm Medical AG, Geschwenda
Rotilabo-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RS-VA10 (Vortexer)	Phoenix Instruments GmbH, Garbsen
Saturn (Laufband)	h/p/cosmos sports & medical GmbH, Nußdorf
Scientific Industries, Vortex-Gen 2	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Seaborn (v0.9.0)	M. L. Waskom, Programm
SPSS Statistics v23	International Business Machines (IBM) Corporation, Armonk, USA
Scotsman AF 80 (Eismaschine)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Polar Flow	Polar Electro GmbH Deutschland, Büttelborn
Pulsuhr M430	Polar Electro GmbH Deutschland, Büttelborn
Python (v3.7.6)	Python Software Foundation License
Zotero	Roy Rosenzweig Center; for History and New Media; George Mason University

## 4 Methoden

### 4.1 Ethik

Die klinische Studie NCT03942718 wurde am 08.05.2018 durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Mainz und Rheinland-Pfalz unter der Antragsnummer 2018-13039 genehmigt und nach den Standards der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil. Das schriftliche Einverständnis wurde im Vorfeld von jedem Probanden eingeholt.

### 4.2 Probandenrekrutierung

In die Studie wurden Patienten der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik in der Rheumatologisch-Immunologischen Ambulanz der Universitätsmedizin Mainz zwischen 18 und 65 Jahren mit positiven ANA-Titern oder (hochaviden) anti-dsDNA-AK aufgenommen. Weitere Voraussetzungen waren ein inaktiver Krankheitsverlauf zum Zeitpunkt der Studie sowie eine stabile immunsuppressive Therapie seit mindestens 30 Tage vor Studienbeginn. Zu den Ausschlusskriterien zählten eine regelmäßige Sportausübung > 2 mal pro Woche oder eine Schwangerschaft. Die SLEEP-Studie wurde im Mai 2019 registriert. Danach wurde mit der Rekrutierung der Probanden begonnen. Von 40 gescreenten Patienten erfüllten 30 Probanden die Einschlusskriterien (s. Tab. 4). Ein Proband schied vor Beginn der Studie aus und drei Probanden brachen die Studie ab (dauerhafte Erkältung, n=1; Crohn-Schub, n=1; Erschöpfung, n=1). Insgesamt absolvierten 26 Probanden die Studie.

Tabelle 4: Ein- und Ausschlusskriterien für die SLEEP-Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Diagnostizierter SLE nach den ACR-Kriterien und den 2019 EULAR/ACR-Kriterien für SLE	Aktiver Krankheitsverlauf: Lupus-Nephritis, Myokarditis, Perikarditis oder andere
Alter zwischen 18 und 65 Jahre	Schwangerschaft
Positive SLE-Serologie: ANA-Titer >1:80 oder anti-dsDNA-AK >200 IU/ml oder anti-dsDNA-Auto-AK >30 IU/ml	Regelmäßiger Sport: >2 x die Woche
≥ 30 Tage dauernde immunsuppressive Therapie mit Cortison (0–20 mg/d) oder einem anderen Therapeutikum (Hydroxychloroquin, Chloroquin, Rituximab, Azathioprin, Methotrexat, Mycophenolat-Mofetil,	

### 4.3 Rahmenbedingungen und Ablauf

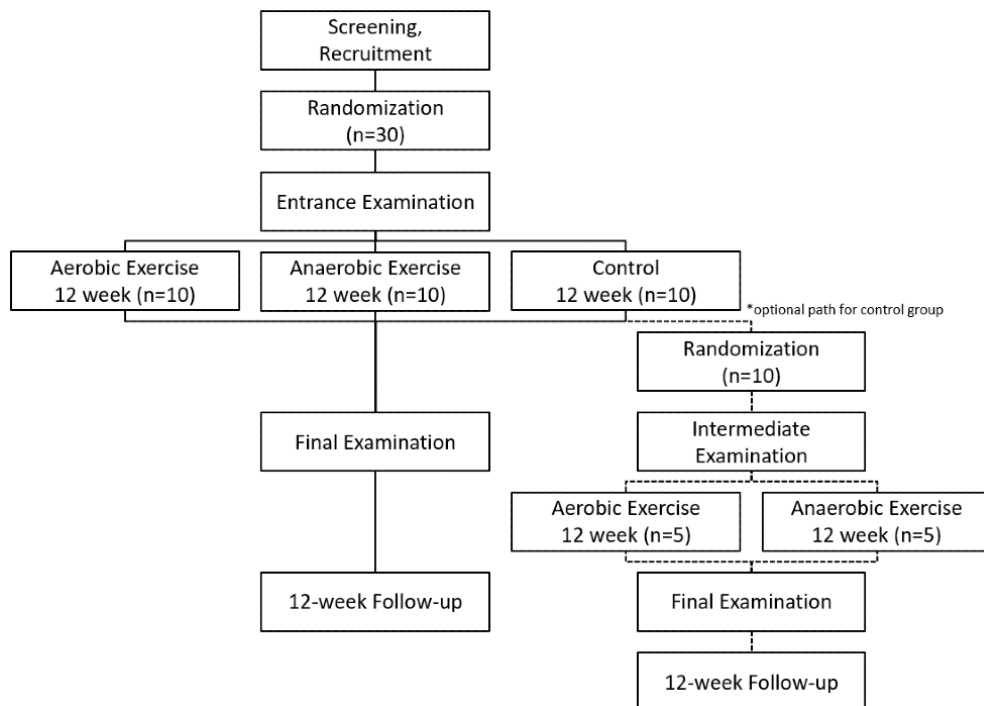


Abbildung 4: Studiendesign der SLEEP-Studie (Boedecker et al., 2020)

Die interdisziplinäre SLEEP-Studie hatte verschiedene Ziele. Der primäre Zielparameter war die Veränderung der physischen Fitness ( $VO_2\text{peak}$ ) nach 12 Wochen Training. Sekundäre Zielparameter waren Veränderungen der Krankheitsaktivität, der Muskelmasse, des Chair-Stand-Test-Ergebnisses, der cfDNA und der extrazellulären Vesikel (Boedecker et al., 2020). In dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf der cfDNA.

Die Studie fand in der Abteilung Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation am Institut für Sportwissenschaft der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz in Kooperation mit der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz statt. Die klimatischen Bedingungen in den Untersuchungsräumen wurden auf 23–24 °C Raumtemperatur und 50 % Luftfeuchtigkeit festgelegt. Im Rahmen der Voruntersuchung der Probanden erfolgte eine erste Blutabnahme, die Messung von Körpergewicht- und -größe, eine Spirometrie, ein Ruhe-Elektrokardiogramm (EKG) und ein Chair-Stand

Test (zur Überprüfung der Kraft und Ausdauer der Beine). Vor der Ausbelastung wurde eine EKG durchgeführt. Bei unauffälligem Befund fand die Ausbelastung statt.

#### 4.3.1 Ablauf des Stufentest

Die Probanden absolvierten von April 2019 bis Februar 2020 vormittags von 8:00–12:00 Uhr zwei Stufentests auf dem Laufband (Saturn, h/p/cosmos sports & medical GmbH). Das Intervall zwischen den zwei Ausbelastungstests betrug 12 Wochen, in denen die Probanden die Sportintervention durchführten. Das Walking-Protokoll entsprach dem Standardprotokoll (mit / ohne Pausen zwischen den Stufen) der Abteilung (s. Tab. 5) (Boedecker et al., 2020). Für diese Studie wurde es ohne Pause durchgeführt, um eine Verfälschung der Werte zu vermeiden. Für die Durchführung des Tests wurde der Proband an ein 12-Kanal EKG angeschlossen. Zudem wurde eine Blutdruckmanschette am linken Oberarm und eine Maske zur Spiroergometrie angebracht. Nach einem Aufwärmtraining (1 min) wurde das Walking-Protokoll gestartet. Nach 3 min wurde die Laktat-Konzentration (Blutabnahme an der Fingerkuppe mit einer Safety-Lanzette) gemessen. Bei Erreichen des RQ (Verhältnis der ausgeatmeten Kohlenstoffdioxid-Menge zur aufgenommenen Sauerstoff-Menge) wurde zusätzlich zum Laktat-Wert eine Probe für den kapillären cfDNA-Wert abgenommen. Während der gesamten Testdauer wurden mit dem System Respiratory Ergostik spiroergometrische Daten in Echtzeit aufgezeichnet und mit der Software BlueCherry (beides Geratherm Medical AG) ausgewertet. Die Software BlueCherry bestimmt automatisch die  $VO_2$ peak anhand der Vorgaben von Wasserman et al. (2005).

Tabelle 5: Walking-Protokoll (Boedecker et al., 2020)

<b>Walkingprotokoll</b>				
<b>Stufe</b>	<b>Zeit [min:sec]</b>	<b>Geschwindigkeit [km/h]</b>	<b>Steigung [%]</b>	<b>Gesamtzeit am Ende [min:sec]</b>
<b>1</b>	03:00	3,0	1,5	<b>03:00</b>
<b>2</b>	03:00	3,7	3,0	<b>06:00</b>
<b>3</b>	03:00	4,4	4,9	<b>09:00</b>
<b>4</b>	03:00	5,1	6,3	<b>12:00</b>
<b>5</b>	03:00	5,8	7,4	<b>15:00</b>

<b>6</b>	03:00	6,5	8,2	<b>18:00</b>
<b>7</b>	03:00	6,5	9,8	<b>21:00</b>
<b>8</b>	03:00	6,5	11,4	<b>24:00</b>
<b>9</b>	03:00	6,5	13,0	<b>27:00</b>
<b>10</b>	03:00	6,5	14,6	<b>30:00</b>

Der Proband durchlief die Stufen des Protokolls nacheinander und beendete dieses bei Erreichen des Belastungsmaximums oder wegen anderer Gründe (Luftnot, Muskelererschöpfung). Zur Erhebung der Verträglichkeit der Ausbelastung für den Probanden, wurde bei jeder Stufe der subjektiv empfundene Wert auf der Borg-Skala abgefragt. Diese Tabelle auf Augenhöhe der Patienten beinhaltete Skalenwerte von 6–20, die der Belastungsempfindung (6 = überhaupt nicht anstrengend, 20 = maximale Anstrengung) entsprachen (s. Abb. 5). Bei einem Borg-Wert  $\leq 16$  Punkte wurde der Proband gefragt, ob er glaubt die nächste Stufe noch zu schaffen. Aus Sicherheitsgründen wurde der Test abgebrochen, wenn der Patient sich nicht mehr in der Lage dazu sah.

Der Status der Ausbelastung wurde angenommen (Riebe et al., 2018), wenn

- die Herzfrequenz (HF) und/oder die Sauerstoffaufnahme ( $VO_2$ ) trotz höherer Intensität nicht weiter anstiegen,
- der Wert auf der Borg- Skala 20 approximiert,
- die Probanden verbal oder gestikulierend andeuteten, eine weiter andauernde Belastung nicht ausführen zu können,
- die Versuchsleiter den Eindruck hatten, dass der Proband eine weitere Belastung nicht ausführen kann.

6	Überhaupt nicht anstrengend	
7		
8	Extrem leicht	
9	Sehr leicht	
10		
11	Leicht	
12		
13	Etwas anstrengend	
14		
15	Anstrengend	schwer
16		
17	Sehr anstrengend	
18		
19	Extrem anstrengend	
20	Maximale Anstrengung	

Abbildung 5 Borg-Skala zur Abschätzung des Anstrengungsempfindens (Borg, 2004)

Direkt nach Beendigung des Tests erfolgten venöse und kapilläre Blutabnahmen. Der Ablauf der durchgeführten Tests ist in Abbildung 6 dargestellt.

Die venösen Blutproben wurden

- vor dem Test (pre),
- schnellstmöglich nach Belastungsabbruch (post) sowie
- 90 min nach Belastungsabbruch (+90)

durch geschultes Personal mithilfe einer Flügelkanüle (Safety-Multifly-Kanüle, Sarstedt AG & Co. KG) aus einer antekubitalen Vene entnommen und in zwei 7,5 ml EDTA-Monovetten (Sarstedt AG & Co. KG) überführt. Die Proben wurden direkt in das Labor gebracht und weiterverarbeitet. Zudem wurden kapilläre Blutproben

- vor dem Walking-Protokoll (PRE)
- bei Erreichen des RQ,
- sofort nach Belastungsabbruch (POST),
- 15, 30, 60 und 90 min nach Belastungsabbruch (+15, +30, +60, +90)

zur cfDNA-Bestimmung entnommen. Hierzu wurde die Fingerbeere eines Fingers der rechten Hand desinfiziert und mit einer Lanzette (Sarstedt AG & Co. KG) punktiert. 10–20 µl des austretenden Bluts wurden mithilfe einer EDTA-Mikrovette (CB300 K2E, Sarstedt AG & Co. KG) aufgefangen und auf Eis gelegt. Während die Abnahme des kapillären post-Werts (post<sub>kapillär</sub>) direkt nach dem Abbruch der Ausbelastung konnte die venöse Blutabnahme meist erst nach 2–3 min beginnen, damit der

Proband Zeit hatte, sicher vom Laufband zu steigen und sich auf einen Stuhl zu setzen.

Bei jedem Belastungstest wurden demnach

- 6 x 7,5 ml EDTA-Monovette (pre, post, +90)
- 7 x 20 µl EDTA-Mikrovette (pre, RQ, post, +15, +30, +60, +90)

= ~46,4 ml Blut entnommen.

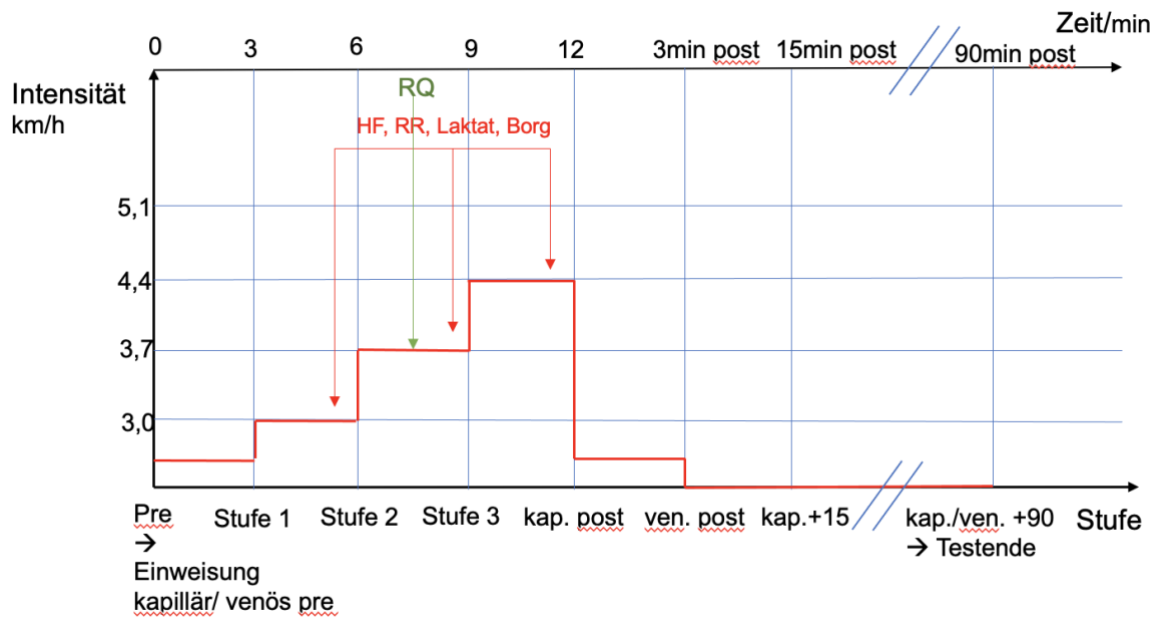


Abbildung 6: Ablauf eines Ausbelastungstests (Beispiel)

Dem Probanden wurde vor der Ausbelastung kapillär und venös Blut abgenommen (pre). Danach durchlief der Proband das Walking-Protokoll (s. Tab. 5). Hierbei wurden verschiedene Parameter (Herzfrequenz (HF), Blutdruck (RR), Laktat) gemessen und bei jeder Stufe der Borg-Wert bestimmt (s. Abb. 5). Bei Erreichen des RQ-Wertes erfolgte eine kapilläre Blutabnahme. Bei Abbruch des Tests bei Erreichen der Ausbelastung erfolgte direkt im Anschluss eine kapilläre und venöse Blutabnahme. Die nächsten Blutabnahmen erfolgten kapillär (+15 min, +30 min, +60 min). 90 min nach Beendigung der Ausbelastung wurde ein letztes Mal venös und kapillär Blut abgenommen.

#### 4.3.2 Ablauf der Sportintervention

Nach jedem Eingangstest erhielten die Probanden eine Einweisung in das internetbasierte Trainingsprogramm sowie zur Verwendung der Fitnessuhr (M430 Polar Electro Oy) und der drei Terrabänder (KG 67071, 67072, 67073, Trendy Sport GmbH & Co). Die Fitnessuhr diente zur Überwachung der Herzfrequenz sowie zur Aufzeichnung der zurückgelegten Strecke beim Joggen. Jeden Montag wurde ein individualisierter Trainingsplan mit allen Trainingseinheiten jedem Probanden auf der Onlineplattform zur Verfügung gestellt.

#### 4.4 Probenverarbeitung

Die venösen Proben wurden direkt weiterverarbeitet, um Plasma für die Untersuchung der Exosomen und cfDNA zu gewinnen. In der vorliegenden Studie wurde lediglich die cfDNA untersucht.

Die zwei venösen EDTA-Röhrchen wurden nach der Blutabnahme direkt in das im gleichen Haus liegende Labor der Sportmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz gebracht. Die Proben wurden nach dreimaligen Schwenken innerhalb von maximal 15 min, idealerweise jedoch schon innerhalb der ersten 5 min, weiterverarbeitet. Nach der Überführung in ein 15 ml Falcon (Cellstar Tubes, Greiner Bio-One International GmbH) wurden die beiden Proben bei 2.500 x g für 15 min und Raumtemperatur zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG). Danach wurde der Plasmaüberstand vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette (Research plus, Eppendorf AG) in ein neues 15 ml Falcon überführt. Um alle zellulären Bestandteile zu eliminieren, wurden die Proben erneut bei 2.500 x g für 15 min und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde das Plasma (ca. 6–8 ml) auf drei 2 ml und ein 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß (Eppis, Greiner Bio-One International GmbH) aufgeteilt. Zwei 2 ml Gefäße sollten genau 2 ml enthalten und das 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß 50 µl. Das restliche Plasma wurde mit einem Sicherheitsüberstand von 1 cm zwischen Plasma und zellulären Bestandteile in das dritte 2 ml Gefäß pipettiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei –20 °C gelagert. Für die vorliegende Studie wurde der Inhalt der 0,5 ml Mikroreaktionsgefäße zur Bestimmung der cfDNA-Proben verwendet.

Die kapillären Blutproben wurden nach der Abnahme direkt auf Eis gelegt und nach der letzten Probenentnahme für 10 min mit 600 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810R), um die zellulären Bestandteile vom Plasma zu trennen. Der Überstand von 5–10 µl wurde vorsichtig mit einer 10 µl Pipette abgenommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäße gegeben. Die Plasmaproben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C zwischengelagert.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben in 1:10 UltraPure DNase/RNase-Free H<sub>2</sub>O (Invitrogen, Waltham, MA) verdünnt, um die Konzentration inhibitorischer Moleküle zu verringern. Alle Plasmaproben eines Probanden wurden an einem Tag aufgetaut, verdünnt und für mindestens eine Woche wieder bei –20 °C eingefroren, um Pipettierfehler bei den Messungen möglichst konstant zu halten (s. Abb. 7).

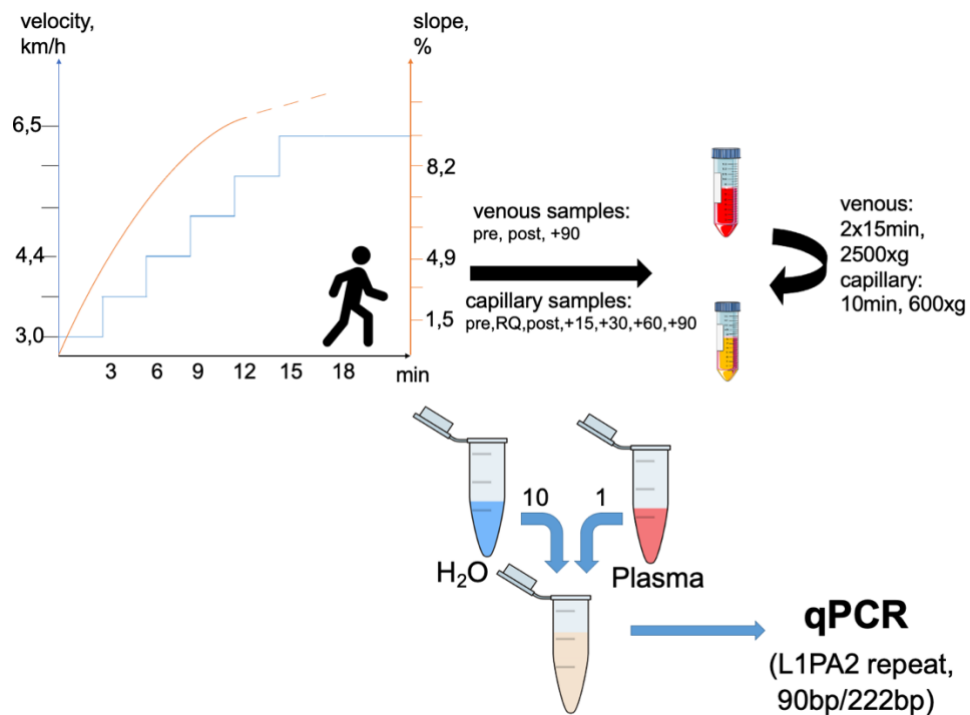


Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Probenverarbeitung

## 4.5 cfDNA Messung und Auswertung

Die Probenverarbeitung sowie die cfDNA-Messung und Auswertung erfolgte wie bei Neuberger et al. (2021a) beschrieben.

### 4.5.1 Vorbereitungen und qPCR

Die cfDNA-Quantifizierung erfolgte aus nicht-aufgereinigtem Plasma mittels qPCR nach dem Protokoll von Breitbach et al. (2014). Dabei wurden 90 bp und 222 bp lange Fragmente der L1PA2-Sequenz amplifiziert, die zu den Long interspersed nuclear elements (LINEs) gehört. Jeder qPCR-Ansatz zur L1PA2-Amplifizierung enthielt einen Mastermix, einen Primermix und die verdünnte Plasmaprobe (Template). Die beiden DNA-Oligonukleotide (Eurofins Genomics Germany GmbH, s. Tab. 6 + 7) für den Primermix wurden verdünnt (je 15 µl Primer + 400 µl nukleasefreies Wasser). Neben dem Primermix wurde auch der Mastermix unter einer Sicherheitswerkbank (Herasafe KS, Thermo Fisher Scientific Inc.) angesetzt. Die finalen Endkonzentrationen in der qPCR betragen 1,2 x HiFi Puffer (BioCat, Heidelberg, Deutschland), 0,3 mM von jedem Desoxyribonukleotid (dNTP) (Carl

Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,15 x SYBR-Green (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 0,04 IU Velocity Polymerase (BioCat, Heidelberg, Germany) und 140 nM der Primer.

Tabelle 6: Sequenz des L1PA2 DNA-Fragments (GRCh38/hg38\_ chr4:68,085,016-68,085,410 / Größe=395 bp / Strang= +). Die Bindungsstelle für den L1PA2-forward-Primer (L1PA2\_fw) ist grau unterlegt. Die Bindungsstellen für die Reverse-Primer der L1PA2\_90bp- und L1PA2\_222bp-Tests (L1PA2\_90bp/222bp\_rv) sind blau bzw. grün hervorgehoben (Neuberger et al., 2021a)

Sequenz (5'-3')
gaattcAGAATGATGATTTCCAATTTTCATCCATGTCCCTACAAAG GACATGAACTCATCATTTTTTATGGCTGCATAGTATTCCATGGTGTA TATGTGCCACATTTTCTTAATCCAGTCTATCATTGTTGGACATTTG GATTGGTTCCAAGTCTTTGCTATTGTGAATAA <b>TGCCGCAATAAACATACGTG</b> TGCATGTGTCTTTATAGCAGCA GATTTATAGTCATTTGGGTATATACCCA <b>GTAATGGGATGGCTGGGTC</b> AAATGG TATCTCTAGTTCTAGATCCCTGAGGAATC GCCACACTGACTTCCACAATGGTTGAACTAGTTTACAGTCCCACCA ACAGTGAAAAGTGTTCCCTATTTCTCCACAT <b>CCTCTCCAGCACCTGTTGT</b> TCC TGACTTgaattc

Tabelle 7: Primersequenzen (Neuberger et al., 2021a)

L1PA2 PCR Primers [0.14 µmol/PCR]	Sequenz von 5' → 3'	Amplifikatgröße	Annealing Temperatur
L1PA2_fw	TGCCGCAATAAACATACGTG		60,4 °C
L1PA2_90bp_rv	<b>GACCCAGCCATCCCATTAC</b>	90 bp	61,1 °C
L1PA2_222bp_rv	<b>AACAACAGGTGCTGGAGAGG</b>	222 bp	63,4 °C

Für die qPCR wurden 2 µl des verdünnten Plasmas zusammen mit 12 µl Mastermix und 1 µl Primermix vermischt und in Tripletts mit einem Finalvolumen von 5 µl je Well unter einer PCR-Werkbank (peqlab, VWR International) auf eine 384-Well Platte (Axon Lab AG) pipettiert. Abschließend wurde die Platte mit einer Folie (AMPISEAL, Greiner Bio-One International GmbH) versiegelt und für 2 min bei 1500 x g zentrifugiert, um eventuelle Luftblasen aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen.

Für die Amplifikation der Proben wurde ein BioRad CFX384 System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) verwendet, das die zunehmende Fluoreszenz mit steigender Anzahl an Zyklen durch die Interkalation von SYBR-Green in die dsDNA misst (Breitbach et al., 2014). Der PCR-Zyklus erfolgte nachfolgendem Protokoll: Nach

einer ersten Denaturierung (98 °C für 2 min) folgten 35 Zyklen aus Denaturierung (95 °C für 10 Sekunden) und Primerhybridisierung / Elongation / Plattenablesung (64 °C für 10 Sekunden). Am Ende jedes Durchlaufs wurde eine Schmelzkurve aufgenommen (70–95 °C in 0,5 °C Schritten für 10 Sekunden). Für die Negativkontrolle (no template control; NTC) wurde Nuklease-freies Wasser als Template eingesetzt. Weiter wurde ein Ansatz mit Mausplasma als Template verwendet, um die Inhibition der Messung durch plasmalösliche Stoffe auszuschließen. Wenn die Proben-Triplets eine Standardabweichung (SD) > 0,4 in einem Quantifikationszyklus zeigten, wurde die Probe erneut gemessen. Lag der SD erneut > 0,4, wurde die native Plasmaproben erneut verdünnt und gemessen. Blieb die SD bestehen, galt die Probe als nicht messbar.

#### *4.5.2 Material zur Assay-Validierung*

Zur Sicherstellung der Präzision des Assays wurde die Linearität und die Genauigkeit der Direktquantifizierung an einem speziell angefertigten 401 bp Fragment aus der L1PA2-Familie getestet (s. Tab. 6). Das Fragment wurde von Eurofins MWG Operon synthetisiert, kloniert und in Bakterien amplifiziert. Die DNA wurde anschließend mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Nach erfolgter EcoRI-Restriktion wurde das 401 bp Fragment mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Anschließend wurde die Konzentration mit einem NanoDrop 3300 Fluorospektrometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) unter Verwendung des Quant-iT PicoGreen Farbstoffs (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) bestimmt. Als Material zur Validierung der Methode wurden venöse Plasmaproben von sechs gesunden Probanden vor (PRE exercise sample) und nach dem Training (POST exercise sample) verwendet, die nach dem Zufallsprinzip aus dem Studienkollektiv von Neuberger et al. (2021a) ausgewählt wurden.

#### *4.5.3 In-silico-Berechnung der L1PA2-Kopienzahl pro Genom*

Zur Bestimmung der Anzahl der L1PA2-Zielsequenzen der Primerpaare im menschlichen Genom (GRCh38/hg38) wurde das UCSC Genome Browser In-Silico PCR Tool verwendet (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Dabei war es

erforderlich, die maximale Produktgröße (maximale Größe der amplifizierten Region) auf 660 bp zu beschränken, was der maximalen Amplifikationskapazität der Polymerase in 10 sec (Elongationsphase) entspricht. Weiter wurde die Anzahl der Basen, die am 3'-Ende der Primer exakt übereinstimmten (min perfect match), auf 19 bp festgelegt. Die laut des Tools vorhergesagten Sequenzen pro Chromosom, sowie die Längenverteilung sind im Anhang in Abbildung 21 und Tabelle 15 dargestellt.

#### 4.5.4 Berechnung der cfDNA-Konzentration in Plasmaproben

Die cfDNA-Konzentration (ng/ml) wurde aus den Cq-Werten der Proben wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \triangleq \frac{\text{pg}}{\mu\text{l}} = 10 \left( \frac{\frac{\text{Cq} - \text{Intersept}}{\text{Slope}}}{5 \mu\text{l}} \right) \left( \frac{1}{75} * 3,23 \text{ pg} \right) \left( \frac{1}{3416 \text{ für L1 PA 2}_{90\text{bp}} \text{ oder } 3237 \text{ für L1 PA 2}_{222\text{bp}}} \right)$$

Unter Verwendung der Steigung und des Achsenabschnitts der validierten Standardkurve wird die Gesamtzahl der Kopien pro 5 µl qPCR-Reaktion berechnet. Die Division durch 5 ergab die Kopienzahl pro µl. Bei der Berechnung der Kopienzahl pro µl Plasma wurde der Gesamtverdünnungsfaktor des Plasmas von 1/75 (Plasmaverdünnung 1/10 und qPCR-Verdünnung: 2 µl Template pro 15 µl Reaktion) berücksichtigt. Die Anzahl der Kopien pro µl wurde durch die Anzahl der vorhergesagten Sequenzen im menschlichen Genom dividiert (3416 für L1PA2\_90bp und 3237 für L1PA2\_222bp). Die resultierenden Genomäquivalente wurden mit 3,23 pg (Gewicht eines haploiden Genoms) (Piovesan et al., 2019) multipliziert, um die pg-Menge pro µl Plasma (entspricht ng/ml) zu berechnen.

#### 4.5.5 qPCR-Kalibrierung

Das CFX384-System berechnet die Cq-Werte auf der Grundlage des Schnittpunktes der Fluoreszenzspuren mit einer automatisch berechneten Schwellenwertlinie, der Schwellwert ist hierbei abhängig von der Gesamtzahl der Proben und der Fluoreszenzintensität. Zur Korrektur von Unterschieden wurden in jedem Lauf zwei

Positivkontrollen als Referenzproben mitgeführt. Der Schwellenwert wurde so angepasst, dass der Mittelwert der Cq-Werte der Referenzproben dem vordefinierten mittleren Cq-Wert entsprach. Dieser Wert basierte auf dem Mittelwert, der bei zehn PCR-Durchläufen durch zwei Personen automatisch berechnet wurde. Die Referenzproben stammten aus vor (pre) und nach (post) einer Belastung venös abgenommenen Blutproben eines Probanden, die 10 min bei 1.600 x g zentrifugiert wurden, gefolgt von einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 16.000 x g für 5 min. Die Lagerung der Plasmaproben erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Verwendete Proben wurden maximal dreimal aufgetaut und eingefroren. Die Positivkontrolle wurde zusammen mit den Studienproben 1:10 verdünnt. Typische Amplifikationskurven sind in Abbildung 8 dargestellt.

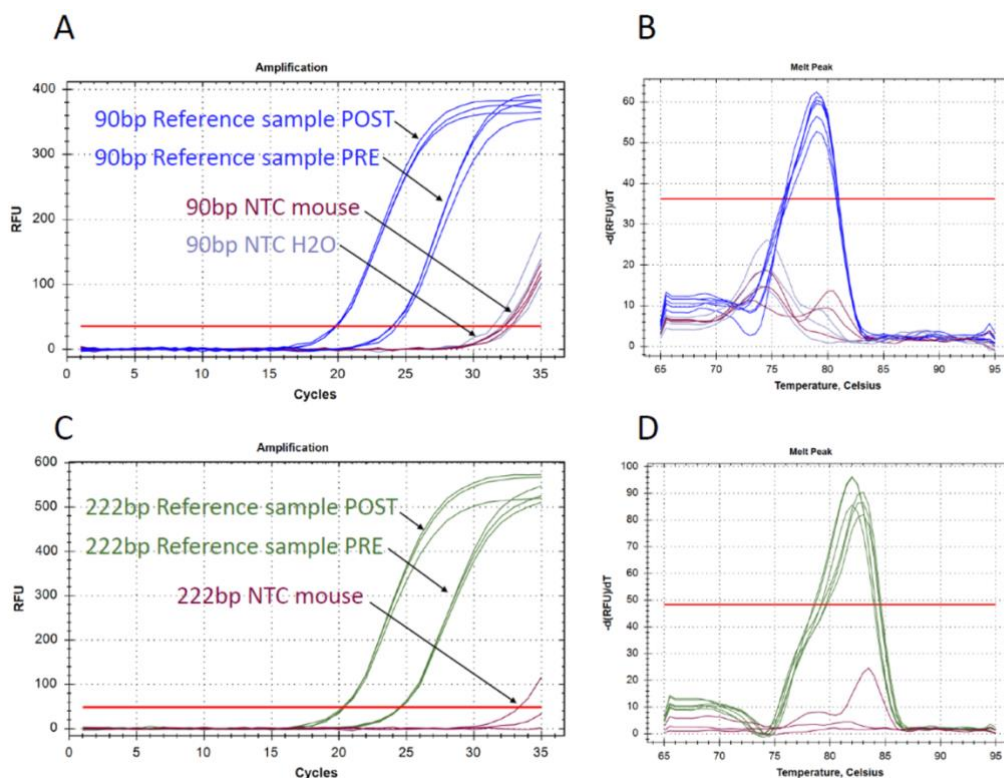


Abbildung 8: Typische Amplifikationskurven (A + C) und Schmelzkurven (B + D) der direkten Quantifizierung der Referenzproben und Negativkontrollen  
A + B: Referenzprobe, H<sub>2</sub>O- oder Mausplasma-Negativkontrolle (NTC) im L1PA2\_90bp-Assay, C + D: Referenzprobe oder Mausplasma-NTC im L1PA2\_222bp-Assay. RFU = relative Fluoreszenzeinheiten. Die Referenzproben sind PRE- bzw. POST-Übungsplasmaproben eines Probanden 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt. (Neuberger et al., 2021a)

#### 4.5.6 Bestimmung der Assay-Leistung und -Ungenauigkeit

Wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, wurde als Negativkontrolle verdünntes Mausplasma verwendet. Die Ansätze dienten zusätzlich dazu, den dynamischen

Bereich, die Assay-Linearität, die Nachweisgrenze (LOD; limit of detection) und die Quantifizierungsgrenze (LOQ; Limit of quantification) zu bestimmen, da Mausplasma keine humanspezifischen L1PA2-Sequenzen enthält. Dazu wurden drei unabhängige Standardkurven erstellt, bei denen jede Konzentration ( $1 \times 10^6$ – $25$  Kopien pro Well) in sieben Wells pipettiert wurde. Zusätzlich wurden Mausplasma und Wasser als Negativ- und Positivkontrolle den Referenzproben auf den Platten hinzugefügt.

Zur Bestimmung der LOQ wurden die Ergebnisse aller Standardkurven zusammengefasst und mit Hilfe des Variance Function Program (VFP; v1.2) mit R (v3.6.3) ein Ungenauigkeitsprofil erstellt (s. Abb. 10). Die LOD ist definiert als die niedrigste Konzentration der Plasmaprobe, bei der die Nachweisrate 95 % beträgt (Forootan et al., 2017). Wo anwendbar, wurde die Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) Richtlinie EP17-A2 verwendet, die eine Leerwertgrenze (LOB; Limit of blank) =  $\text{Mean}_{\text{copy number blank}} + 1,645 \times \text{SD}_{\text{copy number blank}}$  und  $\text{LOD} = \text{LOB} + 1,645 \times \text{SD}_{\text{low copy number sample}}$  definiert (Pierson-Perry et al., 2012).

Um einen potenziellen Einfluss des Verdünnungsprozesses der Plasmaproben auf die Ergebnisse zu bestimmen, wurden 20 PRE- und POST-Proben in einem einzigen Durchgang gemessen. Dabei wurden zehn Plasmaproben aus demselben verdünnten Plasmapool gemessen und zehn weitere Plasmaproben einmalig im Verhältnis 1:10 verdünnt. Der Variationskoeffizient (CV) wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{CV} = (\text{SD}/\text{Mittelwert}) * 100$$

Zusätzlich wurde dieser Prozess bei zehn qPCR-Durchläufen wiederholt, um die mittlere Präzision sowie die Wiederholbarkeit abzuschätzen.

#### *4.5.7 Direktquantifizierung im Vergleich zur Kit-Isolierung*

Zur Analyse potenzieller Unterschiede zwischen einer Direktquantifizierung und einer Isolierung der cfDNA mittels DNA-Extraktionskit wurde Plasma in 15 Röhrchen aliquotiert und bei  $-20$  °C eingefroren. Diese Aliquots wurden auf drei Isolierungskits aufgeteilt. In jeweils fünf der Aliquots (1 ml Plasma) wurde die cfDNA mit dem QIAamp-Kit für zirkulierende Nukleinsäure (Qiagen, Hilden, Deutschland) (Isolierungskit 1), dem NucleoSnap cfDNA-Kit für cfDNA aus Plasma (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) (Isolierungskit 2) und dem QIAamp DNA Blood Mini Kit

(Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert (Isolierungskit 3). Für die Direktquantifizierung wurde von jedem Plasma-Aliquot eine 1:10 Verdünnung hergestellt und nach einem einzigen Gefrier-Auftau-Zyklus gemessen.

#### 4.5.8 Reanalysen und Lagerstabilität der Proben

Für die Überprüfung der Reliabilität der cfDNA-Konzentration der Proben wurden in jedem qPCR-Lauf zwei Proben aus dem vorherigen Lauf erneut analysiert. Gemäß dem Leitfaden zur Validierung bioanalytischer Methoden für die Industrie (Research, 2020) wurde die prozentuale Differenz der cfDNA-Konzentration zwischen der ersten und zweiten Messung mit folgender Gleichung bestimmt:

$(\text{Zweite Messung} - \text{Erste Messung}) / \text{Mittelwert} * 100.$

Die Lagerstabilität der Proben wurde bei 20 plasmaverdünnten Proben aus einer früheren Studie nach über 2 Monaten Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  überprüft. Zur Bestimmung der Lagerstabilität von Vollblut vor der Zentrifugation wurden vier venöse und kapilläre Proben nacheinander entnommen und direkt nach der Blutentnahme, nach 60 min, 90 min oder 180 min für 10 min bei  $2.500 \times g$  zentrifugiert und gemessen.

#### 4.5.9 Datenanalyse

Die Daten wurden mittels der Software Bio-Rad CFX Manager 3.0 (Bio-Rad Laboratories GmbH) und Excel 2010 (Microsoft Corporation) verarbeitet. Für die deskriptive Analyse wurden Python (v3.7.6) mit 'matplotlib' (v3.1.1), 'seaborn' (v0.9.0), sowie R (v3.6.3) mit ggplot2 (v3.3.2) verwendet. Die Ungenauigkeit wurde mit dem R-Paket 'VFP' (v1.2) analysiert. Zur Analyse potenzieller Unterschiede zwischen kapillärer und venöser cfDNA und der Reaktion auf die Belastung wurden linear gemischte Modelle mit dem 'lme4'-Paket (v1.1.23) durchgeführt. Für die Berechnung der korrigierten p-Werte nach Tukey wurde das 'emmeans'-Paket (v1.4.8) genutzt. Zusätzlich wurden der Pearsons r und Spearman's rho berechnet. Zur Analyse potenzieller Unterschiede der cfDNA-Ruhewerte bei Probanden mit oder ohne Medikation wurde der Welch's t-Test verwendet. Bei allen Tests wurde das Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt, womit ein Überschreitungswahrscheinlichkeitswert ( $p$ )  $p < 0,05$  als signifikant gewertet wurde.

In den Abbildungen entspricht ein Stern (\*) einem p-Wert von  $0,05 < p > 0,01$ , zwei Sterne (\*\*)  $0,01 < p > 0,001$ , drei Sterne (\*\*\*)  $0,001 < p > 0,0001$  und vier Sterne (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Anthropometrische und physiologische Daten der Probanden

Von den 26 Patienten der SLEEP-Studie waren 24 weiblich und zwei männlich. In den Tabellen 8 und 9 sind die anthropometrischen und physiologischen Daten der teilnehmenden Probanden aufgelistet. Die Probanden zeigten einen erhöhten Body Mass Index (BMI) und eine erniedrigte körperliche Fitness ( $VO_2\text{peak}$ ) im Vergleich zur Normalbevölkerung (Rapp et al., 2018). Die Altersspanne reichte von 30–60 Jahren (Mittelwert = 49,42 Jahre). Der SLEDAI betrug im Durchschnitt 6,50, was einer milderen Krankheitsaktivität entsprach (Bombardier et al., 1992).

Tabelle 8: Ausgewählte anthropometrische und physiologische Parameter der Probanden

Charakteristika	Durchschnitt	Standardabweichung (±)
Alter (Jahre)	49,42	8,70
Gewicht (kg)	77,53	18,54
Körpergröße (cm)	166,43	8,34
BMI ( $\text{kg}/\text{cm}^2$ )	27,96	6,07
SLEDAI	6,50	4,42

Da die Einschlusskriterien (s. Tab. 4) einen stabilen Krankheitszustand erforderten, nahmen die meisten Probanden eine immunsuppressive Medikation ein (s. Tab. 9). Die meisten Patienten erhielten als Dauermedikation ein Cortison-Präparat in niedriger Dosierung ( $<7,5 \text{ mg/d}$ ) unterhalb der Cushing-Schwelle. Die Hälfte der Probanden nahm ein etabliertes SLE-Medikament (Antimalariamittel wie Hydroxychloroquin) ein. Nur ca. ein Fünftel der Probanden waren ohne immunsuppressive Therapie schubfrei.

Tabelle 9: Immunsuppressive Medikation der Probanden (Neuberger et al., 2021a)

Medikamentenanamnese	Anzahl (n,%)
Anzahl der Probanden mit immunsuppressiver Therapie	22 (78 %)
Cortison	17 (61 %)
Hydroxychloroquin	14 (50 %)
Belimumab	4 (14 %)

Cyclophosphamid	1 (3 %)
Azathioprin	2 (7 %)
Mycophenolat-Mofetil	7 (25 %)
Keine immunsuppressive Therapie	6 (21%)

Neben einem stabilen Krankheitsverlauf war auch eine positive Serologie eine Voraussetzung für die Teilnahme der Probanden. Hierfür wurden die für die SLE-Diagnose relevanten ANA- und anti-dsDNA-AK-Titer bestimmt. Typisch für eine SLE-Serologie lag der mediane ANA-Titer bei 1:320 und der durchschnittliche anti-dsDNA-AK-Titer bei ca. 280 IU/ml. Ein weiterer wichtiger Faktor bei SLE ist die Nierenbeteiligung. Der Kreatinin-Wert betrug im Durchschnitt 0,85 mg/dl und lag damit im Normbereich. Der durchschnittliche CRP-Wert erreichte mit 3,30 mg/l nicht den Schwellwert von 5,0 mg/l für eine relevante Entzündung. Als sekundäre Endpunkte waren neben der Lupus-Serologie, weitere klinische Parameter von Bedeutung (Boedecker et al., 2020). Diese Parameter wurden vor der Intervention sowie 12 und 24 Wochen nach der Intervention ermittelt. Abbildung 9 zeigt die Spearman-Korrelationsanalyse der Eingangstest-Werte der sekundären Endpunkte. Lediglich für C4 ( $r = -0,29$ ) war eine signifikante Korrelation mit den cfDNA-Werten nachweisbar.

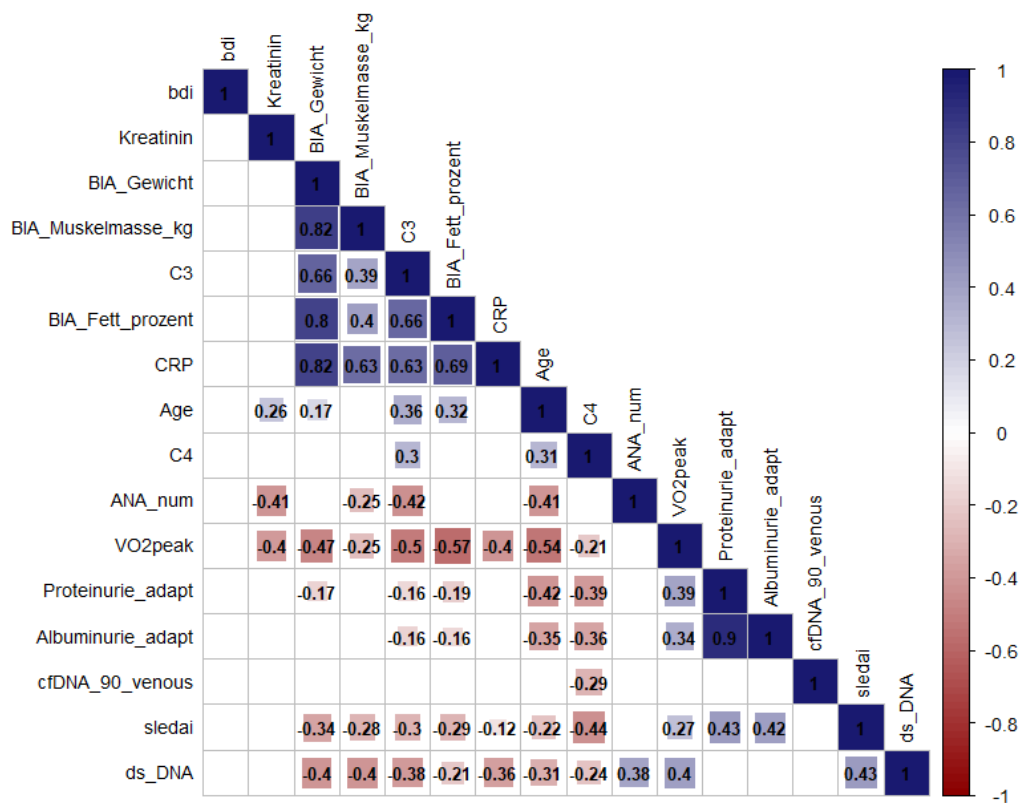


Abbildung 9: Spearman-Korrelationsanalyse der sekundären Zielparameter  
 Bei den Parametern wurden die Werte des Eingangstest genutzt (alle Gruppen gepoolt). Nur bei signifikanten Ergebnissen  $p \leq 0,05$  wurden die Werte eingetragen.

## 5.2 Stufentest

Der Stufentest wurde von jedem Probanden vor und nach der Trainingsintervention absolviert. Sieben Probanden der TAU-Gruppe führten diesen insgesamt dreimal aus, da sie im Anschluss der ersten 12 Wochen entweder in die aerobe oder anaerobe Trainingsintervention eingeteilt wurden. Die Probanden zeigten (s. Kap 5.1) im Vergleich zu gesunden Personen derselben Altersgruppe ein erniedrigten VO<sub>2</sub>peak und eine etwas geringere maximale Herzfrequenz (156 beats per minute (bpm)) (Such and Meyer, 2010). Der Grad der empfundenen Anstrengung, die mittels BORG-Skala ermittelt wurde, lag mit 17,86 von maximal 20 relativ hoch. Daher ist in den meisten Fällen von einer Ausbelastung auszugehen.

Tabelle 10: Parameter des Stufentests

<b>Charakteristika</b>	<b>Durchschnitt</b>	<b>Standardabweichung (±)</b>
Zeit bis zur Erschöpfung (min)	13,61	3,67
VO <sub>2</sub> peak (ml/min/kg)	24,34	5,04
Maximale Herzfrequenz	156,64	19,56
BORG-Skala	17,86	0,93

### 5.3 Nachweis der Eignung des Assays

Vor der Auswertung der cfDNA-Ergebnisse wurde die Assay-Leistung zur Validierung der Methode analysiert. Diese Ergebnisse wurden in der Arbeit zur Validierung der cfDNA-Direktmessung publiziert (Neuberger et al., 2021a).

#### Assay-Leistung

Die L1PA2-Kurven mit den beiden Primern wiesen ähnliche Verläufe auf (s. Abb. 10). Die Wirkungsgrade lagen zwischen 87,77 und 89,25 % für den L1PA2\_90bp-Assay und zwischen 84,19 und 88,75 % für den L1PA2\_222bp-Assay.

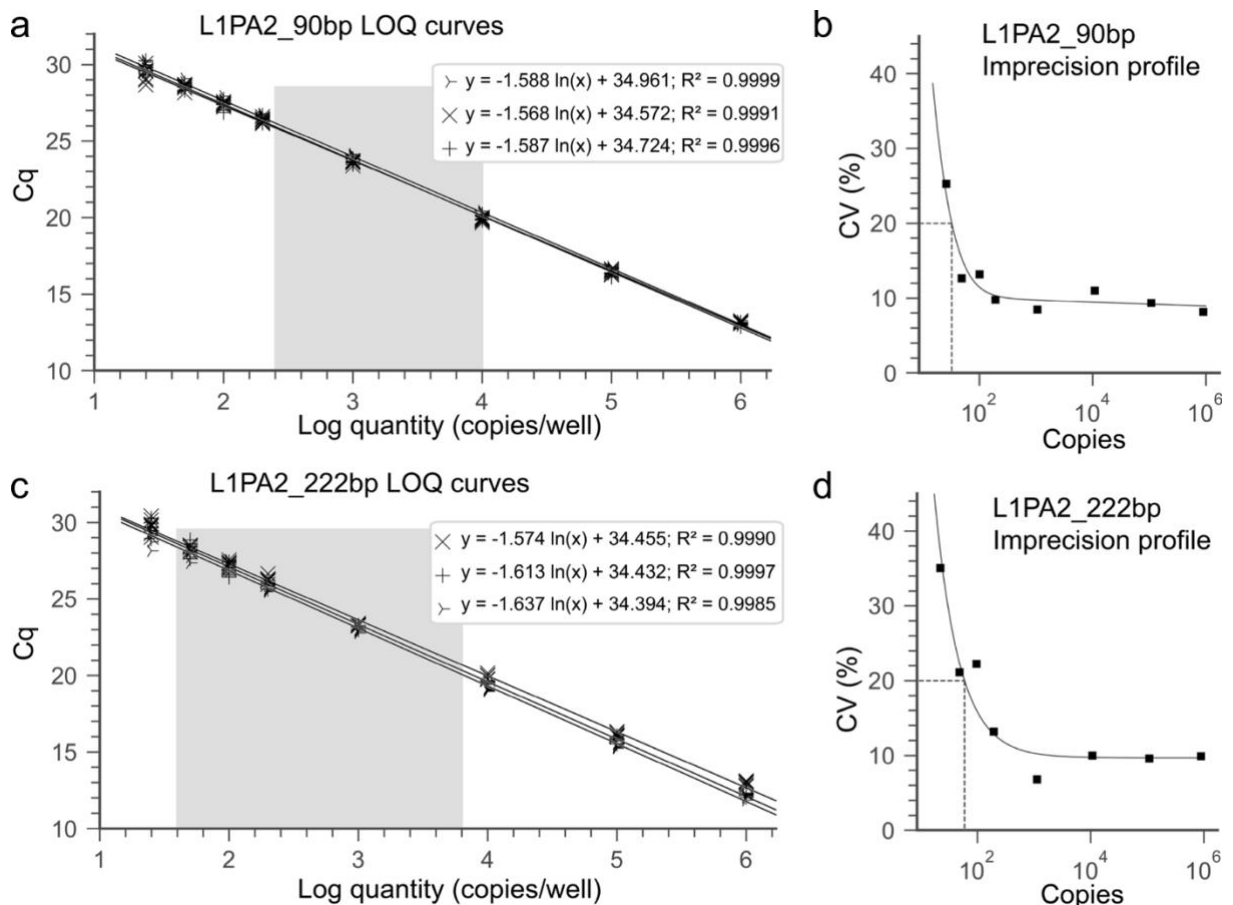


Abbildung 10: Standardkurven und Unpräzisionsprofile für den L1PA2\_90bp-Assay (a, b) und den L1PA2\_222bp-Assay (c, d)

Für jeden Assay wurden drei unabhängige Standardkurven mit sieben Parallelansätzen pro Konzentration erstellt. Die Ungenauigkeitsprofile wurden unter Verwendung des R 'VFP' Pakets (v1.2) mit folgenden Formeln berechnet:  $\sigma^2 = 31,37 + 0,011 \times U$  und  $\sigma^2 = (6,10 + 0,097 \times U)^2$ . Der graue Bereich zeigt den Quantifizierungsbereich der cfDNA-Konzentrationen in der vorliegenden Studie an (Neuberger et al., 2021a).

### Nachweisgrenze (LOD) und Quantifizierungsgrenze (LOQ)

Wie in Kapitel 4.5.6 beschrieben, wurden die LOB und LOQ gemäß der CLSI-Richtlinie berechnet, da die Daten normalverteilt waren und eine homogene Varianz aufwiesen (Pierson-Perry et al., 2012). Hierbei lag die LOB für den Assay mit 90 bp bei 8,39 Kopien und die LOD bei 18,59 Kopien. Die aus dem Ungenauigkeitsprofil abgeleitete LOQ betrug 32,5 Kopien für den L1PA2\_90bp- und 59,26 Kopien für den L1PA2\_222bp-Assay (s. Abb. 10), was einer Konzentration von 0,47 ng/ml bzw. 0,69 ng/ml entsprach. In den Negativkontrollen des L1PA2\_90bp-Assays war ein Hintergrundsignal erkennbar, das von Proben mit geringer Kopienzahl unterschieden werden muss (s. Abb. 8).

### Studien zur Ungenauigkeit

Die Erhebung der Genauigkeit der qPCR ist für reliable Ergebnisse von großer Bedeutung. Der Variationskoeffizient (CV) soll für eine hohe Messgenauigkeit möglichst niedrig liegen. Bei den gepoolten oder einmalig verdünnten Plasmaproben betrug der CV im L1PA2\_90bp-Assay 7,32 % und 8,77 % (PRE-Proben) und 6,67 % bzw. 8,51 % (POST-Proben) (s. Abb. 11a). Im L1PA2\_222bp-Assay lagen die CVs bei 9,17 % und 9,37 % für die PRE-Proben und bei 7,55 % und 8,56 % für die POST-Proben. Die Präzisionsberechnung für die Messwerte der PRE- und POST-Proben in wiederholten Läufen ergab eine Wiederholbarkeit  $\leq 11,59\%$  (95 % KI 8,10–20,34) für beide Assays.

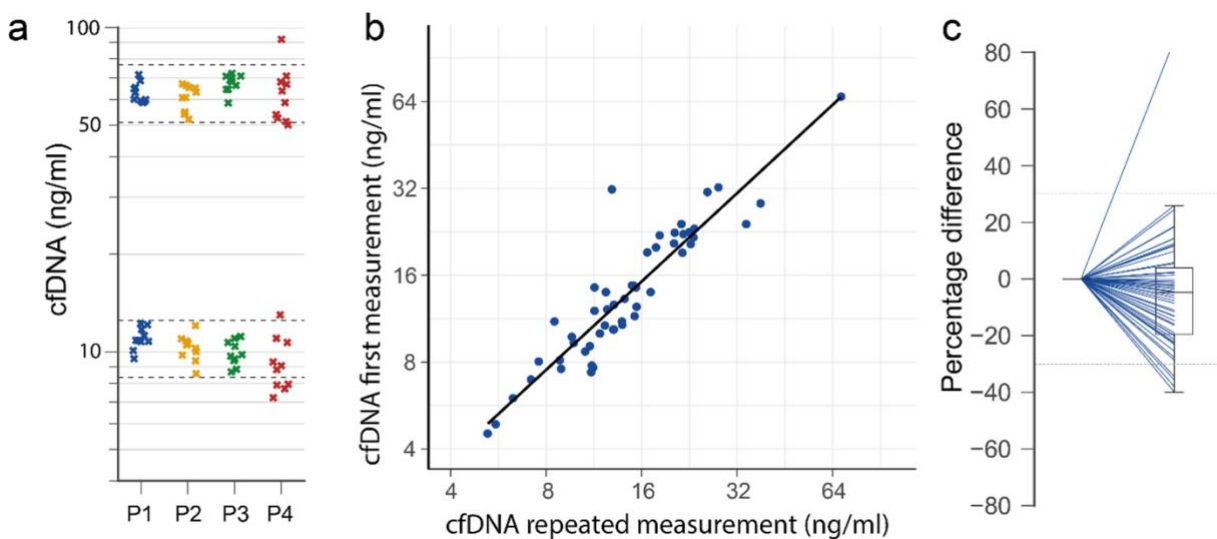


Abbildung 11: Präzision des L1PA2\_90bp-Tests

(a) Dieselben Plasmaproben eines Probanden mit niedriger und hoher Konzentration wurde 10-mal gemessen (P1), dasselbe Plasma wurde 10-mal individuell verdünnt (P2), die Plasmaverdünnung wurde in 10 aufeinanderfolgenden Läufen in Duplikaten gemessen (P3 = Mittelwert der Duplikate nach Inter-Run-Kalibrierung, P4 = Mittelwert der Duplikate vor Inter-Run-Kalibrierung). Die gestrichelten Linien geben  $\pm 20\%$  des nominalen Mittelwerts der Bedingungen P1–3 an. Reanalyse der ausgefallenen Proben ( $SD > 0,4$ ). Von jedem Durchlauf der Studienproben wurden zwei Proben erneut analysiert. (b) Korrelation zwischen der ersten und der zweiten Messung. (c) Prozentualer Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Messung. (Neuberger et al., 2021a)

### Inter-Run-Kalibrierung

Die Inter-Run-Kalibrierung diente dazu die Genauigkeit des Assays zu verbessern. Nach zehn aufeinanderfolgenden qPCR-Läufen sank die berechnete mittlere Präzision für den L1PA2\_90bp-Assay von 23,80 % (95 % KI 17,96–35,31) auf 11,62 % (95 % KI 8,77–17,22) bei den PRE-Proben und von 24,75 % (95 % KI 18,47–37,51) auf 8,46 % (95 % KI 6,40–12,45) bei den POST-Proben (s. Abb. 11). Bei dem L1PA2\_222bp-Assay verringerte sich die mittlere Präzision für die PRE-Proben von 18,01 % (95 % KI 12,58–31,61) auf 12,97 % (95 % KI 8,90–18,24) und für die POST-Proben von 21,54 % (95 % KI 16,04–32,78) auf 12,06 % (95 % KI 9,16–17,69).

### Stabilität von Plasmaverdünnungen

Eine Lagerung von Plasmaproben ist bei  $-20\text{ °C}$  oder  $-80\text{ °C}$  mehrere Monate möglich, ohne dass die cfDNA beeinträchtigt wird (Meddeb et al., 2019). Zur Ermittlung der Stabilität von 1:10-Plasmaverdünnungen wurden 20 verdünnte Proben nach einer mehr als zweimonatigen Lagerung bei  $-20\text{ °C}$  erneut mit dem L1PA2\_90bp-Assay analysiert (s. Kap. 4.5.8). Dabei wurde keine signifikante Änderung der cfDNA-Konzentration nachgewiesen ( $p = 0,35$ ). Dieses Ergebnis wiederholte sich nach einem Gefrier-Auftau-Zyklus. Auch bei einer längeren Lagerung des Vollbluts (bis zu 180 min) vor der Zentrifugation waren keine relevanten Veränderungen der cfDNA-Konzentration erkennbar (s. Abb. 12).

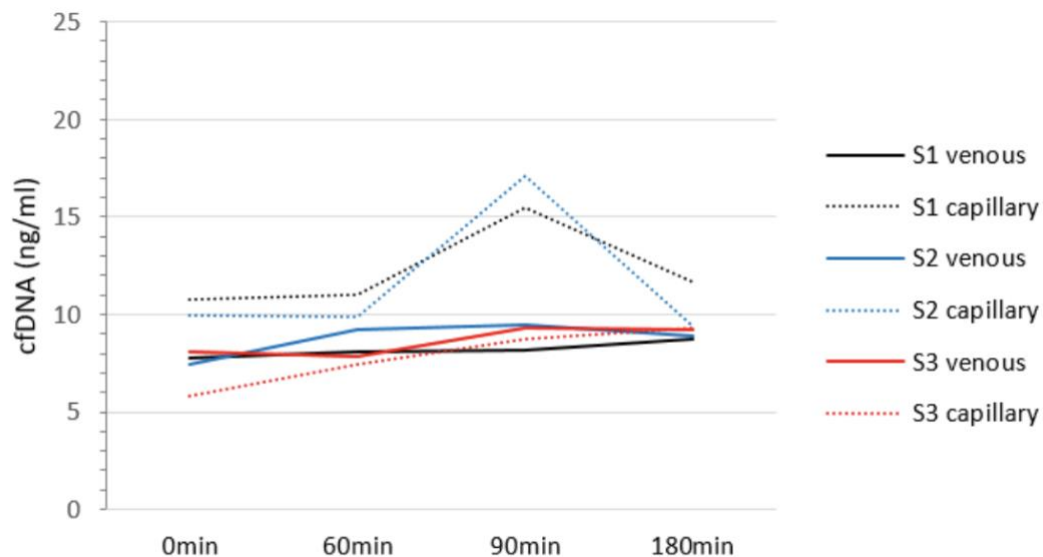


Abbildung 12: CfDNA-Konzentrationen nach längerer Lagerung des Vollblutes  
Nach längerer Lagerung der Blutproben vor der Zentrifugation (60 min, 90 min oder 180 min) unterschieden sich die cfDNA-Konzentrationen bei den drei Probanden nicht nennenswert. Kapilläre cfDNA-Proben zeigten eine höhere Varianz im Vergleich zu venösen Proben. (Neuberger et al., 2021a)

### Auswirkungen der cfDNA-Isolierung

Die für die cfDNA-Isolierung aus Plasma verwendeten Kits zeigten leichte Auswirkungen auf die cfDNA-Konzentration und die DNA-Integrität (s. Abb. 13a). Bei der Isolierung mit Kit 1 und 2 gingen etwa 12 % ( $\pm 9,5$ ) bzw. 23 % ( $\pm 6,2$ ) verloren. Bei Nutzung des Isolierungskits 3 kam es bei der Isolierung von Vollblut-DNA zu

relevanten DNA-Verlusten von etwa 84 %. Die erhöhte DNA-Integrität deutet auf einen Verlust kurzer DNA-Fragmente hin.

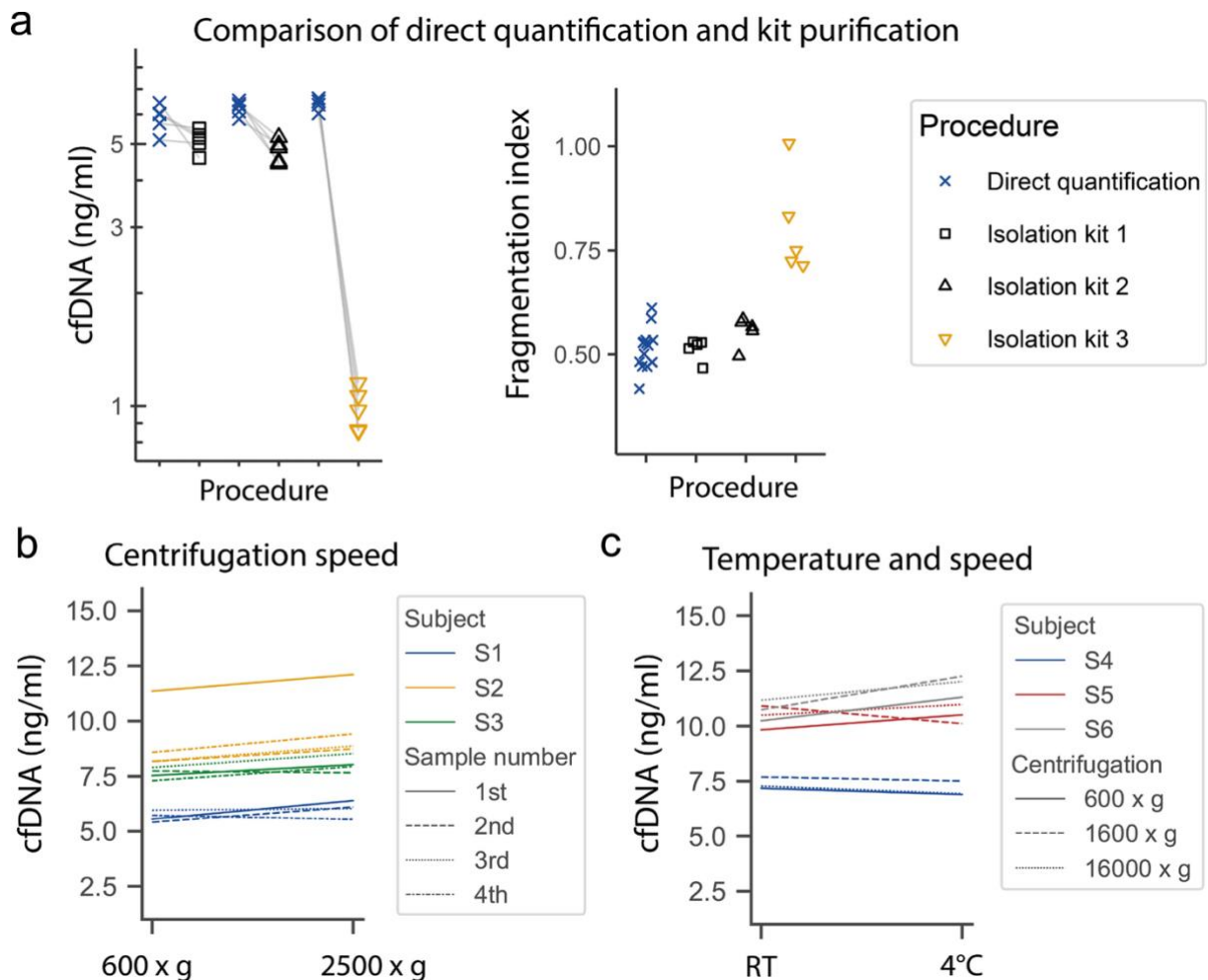


Abbildung 13: Einfluss der DNA-Isolierung, der Zentrifugationsgeschwindigkeit und der Temperatur auf die cfDNA-Konzentration

(a) Plasma-Aliquots derselben Probe wurden direkt oder nach der DNA-Isolierung mit DNA-Isolierkits analysiert, um die cfDNA-Konzentration (links) und den Fragmentierungsindex (rechts) zu bestimmen. (b) Vier Proben von drei Probanden (S1–S3) wurden nacheinander in verschiedenen Blutröhrchen entnommen, 10 min lang bei 600 x g oder 2500 x g zentrifugiert und mit dem L1PA2\_90bp-Assay gemessen. (c) Von drei Probanden (S4–S6) wurde eine einzelne Blutprobe entnommen und nacheinander bei der angegebenen Geschwindigkeit bei 4 °C oder Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und zweimal gemessen; dargestellt sind die Mittelwerte. (Neuberger et al., 2021a)

### Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit oder der Temperatur auf die cfDNA

Zur Beurteilung des potenziellen Einflusses der Zentrifugationsgeschwindigkeit oder der Temperatur auf die cfDNA wurden von drei Probanden Proben mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten oder Temperaturen verarbeitet. Beide Parameter beeinflussten die cfDNA-Konzentration im venösen Plasma nicht (s. Abb. 13 b, c). Die Konzentrationsunterschiede lagen innerhalb der Assaypräzision des L1PA2\_90bp-Assays. Bei einem Probanden wies die erste von vier entnommenen

Proben unabhängig von der Zentrifugationsgeschwindigkeit höhere cfDNA-Konzentrationen auf (s. Abb. 13b).

#### Anfallende Re-Analysen der Proben

Proben mit Cq-Werten  $> 0,4$  wurden erneut analysiert. Davon waren etwa 17 % der SLE-Studienproben betroffen. Die cfDNA-Konzentrationen in den beiden Messdurchgängen korrelierten gut ( $r = 0,925$ ,  $p < 0,0001$ ) (s. Abb. 11b). Bei den reanalysierten Proben wiesen fünf (9,16%) im L1PA2\_90bp-Assay einen Unterschied  $> 30$  % zwischen der ersten und zweiten Messung auf (s. Abb. 11c). Im L1PA2\_222bp-Assay lag der Unterschied bei 25,53 % der reanalysierten Proben bei  $> 30$  %.

#### 5.4 *cfDNA Kinetik*

Bei den 26 Probanden wurde zu zehn Zeitpunkten venöses und kapilläres Blut entnommen. Insgesamt wurden 280 Proben mit jedem Assay gemessen. Von den 280 Proben im L1PA2\_90bp-Assay wurden sieben Proben (2,5 %) aufgrund wiederholt hoher SD der Cq-Werte ( $\geq 0,4$ ) als nicht messbar eingestuft. Beim L1PA2\_222bp-Assay betrug die Anzahl der nicht messbaren Proben 21 (7,5 %).

Bei der Analyse der akuten Effekte der Sportintervention auf die Kinetik der cfDNA, nahmen die venösen cfDNA-Konzentrationen der SLE-Patienten im Mittel im L1PA2\_90bp-Assay um das 2,1-Fache von 13,94 ng/ml (95 % KI 10,4–18,8) auf 29,6 ng/ml (95 % KI 22,0–39,9) zu. Die Werte sanken 90 min nach der Ausbelastung dann wieder auf 14,1 ng/ml (95 % KI 10,5–19,9) ab (s. Abb. 14c). Auch in den kapillären Proben stiegen die cfDNA-Werte zunächst signifikant um das 2,2-Fache von 11,1 ng/ml (95 % KI 8,0–15,4) auf 24,8 ng/ml (95 % KI 17,9–34,4) an und sanken anschließend auf 13,6 ng/ml (95 % KI 10,0–18,4) wieder ab. Nach 90 min erreichten die cfDNA-Konzentrationen somit wieder nahezu die PRE-Übungswerte. Die genauen Ergebnisse finden sich in den Tabellen 13, 14, 16 und 17 im Anhang.

In Abbildung 14 a und b sind beispielhaft die Abweichungen der cfDNA-Werte ausgehend von den PRE-Übungswerten für den L1PA2\_90bp-Assay dargestellt.

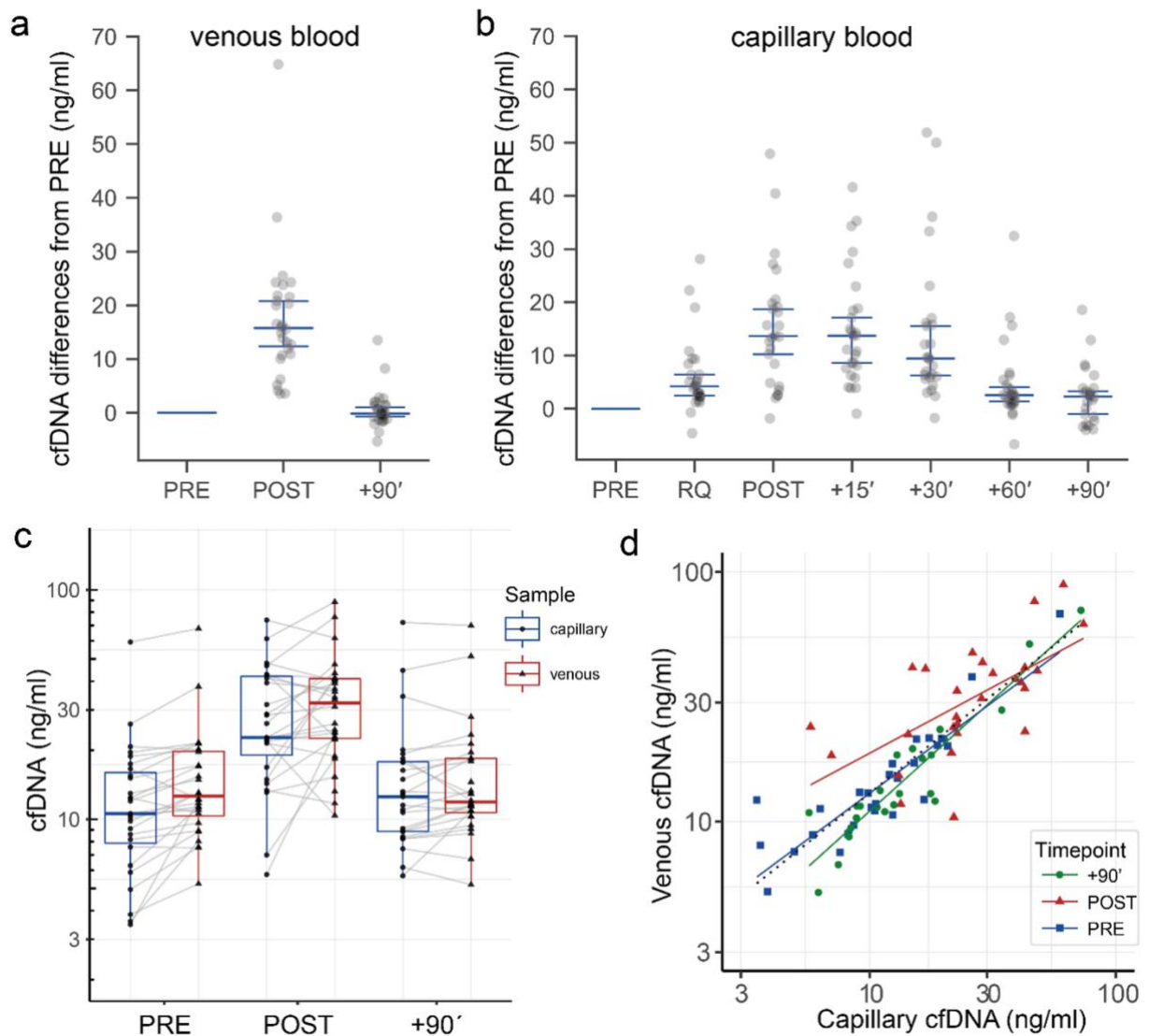


Abbildung 14: Kinetik der venösen und kapillären cfDNA im L1PA2\_90bp-Assay – Vergleich der Werte vor (PRE) und nach (POST, +90) dem Training  
 Unterschiede der cfDNA-Werte bezogen auf die Werte in den PRE-Proben während und nach dem Training in venösen Plasmaproben (a) und kapillären Plasmaproben (b) (dargestellt sind Median und 95 % KI). (c) Boxplots der cfDNA-Konzentration in den kapillären und venösen Plasmaproben. (d) Korrelation zwischen venösen und kapillären cfDNA-Konzentrationen. (Neuberger et al., 2021a)

Abbildung 15 zeigt die Assoziation zwischen den mit dem L1PA2\_222bp-Assay ermittelten venösen und kapillären cfDNA-Konzentrationen. Insgesamt war die Korrelation deutlich erkennbar ( $R^2 = 0,774$ ,  $p < 0,0001$ ; gepunktete schwarze Linie). Betrachtet man die einzelnen Zeitpunkte, bestand bei den PRE-Werten ( $R^2 = 0,933$ ,  $p < 0,0001$ ) und bei den +90-Werten ( $R^2 = 0,974$ ,  $p < 0,0001$ ) eine höhere Korrelation als direkt nach der Ausbelastung (POST,  $R^2 = 0,726$ ,  $p = 0,0002$ ).

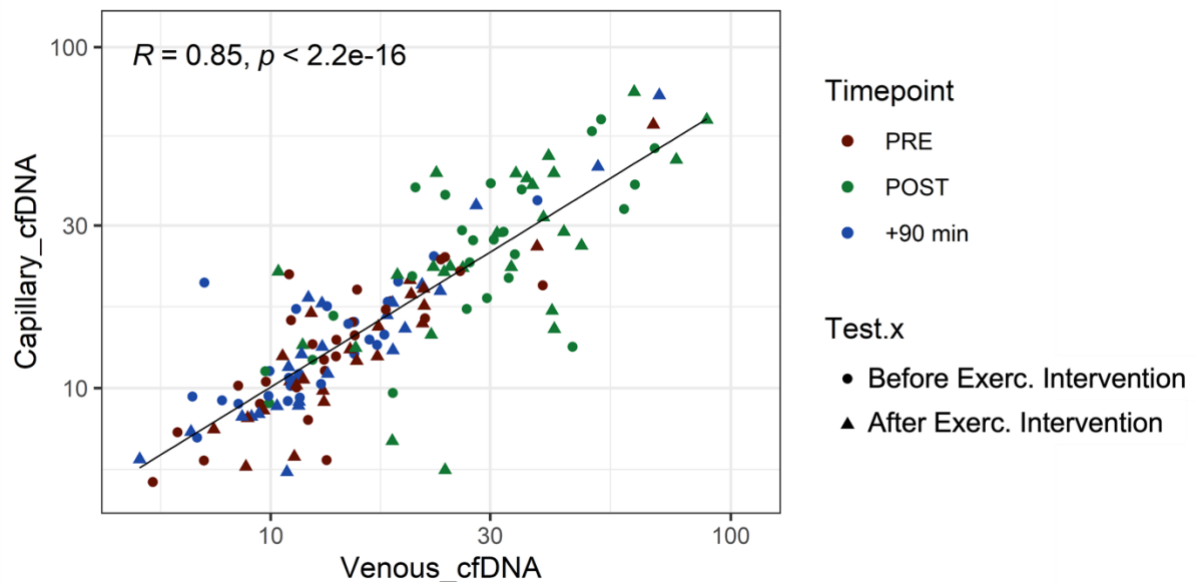


Abbildung 15: Korrelation venöser zu kapillärer cfDNA des L1PA2\_90bp- und L1PA2\_222bp-Assays. Verglichen werden die Zeitpunkte pre, post und +90 min, sowie Eingangstest- und Ausgangstest. Die Regression beträgt hierbei 0.65 bei einem p-Wert von  $<2.2e-16$ .

Die cfDNA-Werte des Eingangstest blieben bis circa 30 min nach der Ausbelastung deutlich erhöht, wie die lineare Regression über alle Zeitpunkte zeigt (schwarze Linie, Steigung =

$-0,167$  ng/ml min, y-Achsenabschnitt =  $16,87$  ng/ml, s. Abb. 16a)). Die höchste Abnahme fand zwischen 30 und 60 min nach der Ausbelastung statt. Zwischen diesen beiden Zeitpunkten betrug die Halbwertszeit ca. 15 min (rote Regressionslinie, Steigung =  $-0,315$  ng/ml min, y-Achsenabschnitt =  $23,61$  ng/ml).

Der Fragmentierungsindex, berechnet als Quotient der Konzentrationen der längeren L1PA2\_222bp-Fragmente und der kürzeren L1PA2\_90bp-Fragmente, stieg zunächst von  $0,33 \pm 0,23$  ng/ml vor der Ausbelastung (PRE-Werte) auf  $0,35 \pm 0,23$  ng/ml nach dem Training (POST-Werte) an und sank nach 90 min (+90-Werte) auf  $0,32 \pm 0,26$  ng/ml beim Eingangstest ab (s. Abb. 16b).

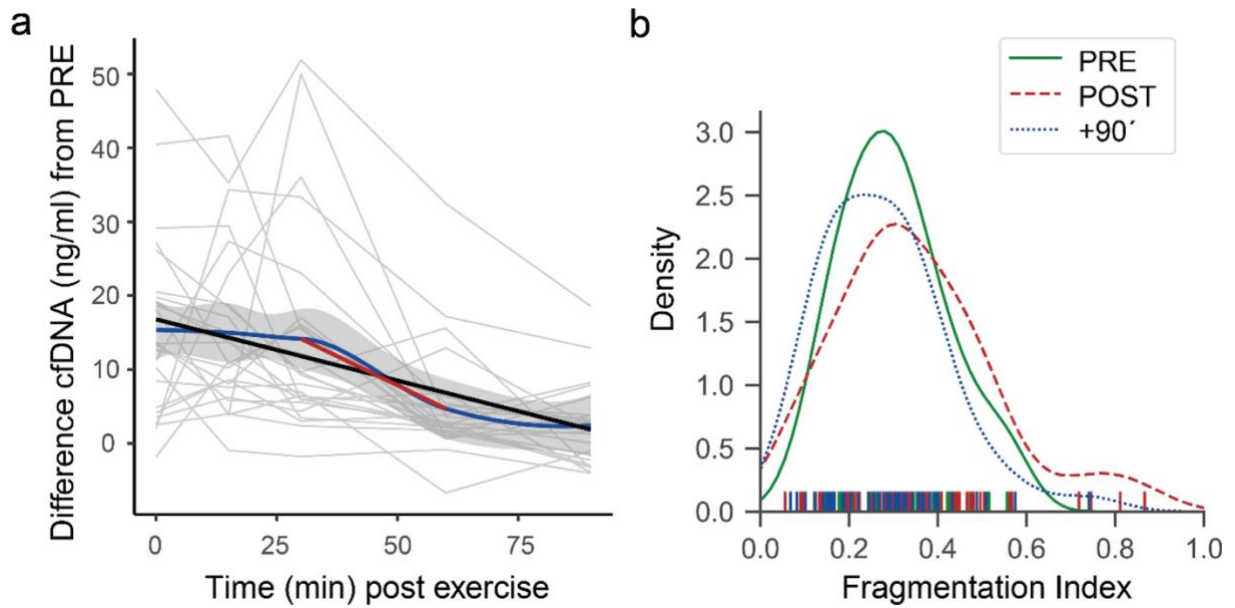


Abbildung 16: cfDNA-Zerfall und Fragmentierungsindex für den Eingangstest  
 (a) Laut LOESS-Regressionslinie (blau, mit 95 % KI in grau) blieben die cfDNA-Konzentrationen bis 30 min nach dem Training erhöht und nahmen zwischen +30 min und +60 min am stärksten ab (rote lineare Regressionslinie).  
 (b) Verteilung des Fragmentierungsindizes aller Studienproben. (Neuberger et al., 2021a)

Abbildung 17 vergleicht den Fragmentierungsindex zwischen dem Eingangs- zu Ausgangstest in den verschiedenen Interventionsgruppen. Zwischen den Interventionsgruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. In beiden Tests führte aber die akute Sportintervention zu einer signifikanten Änderung der cfDNA-Werte.

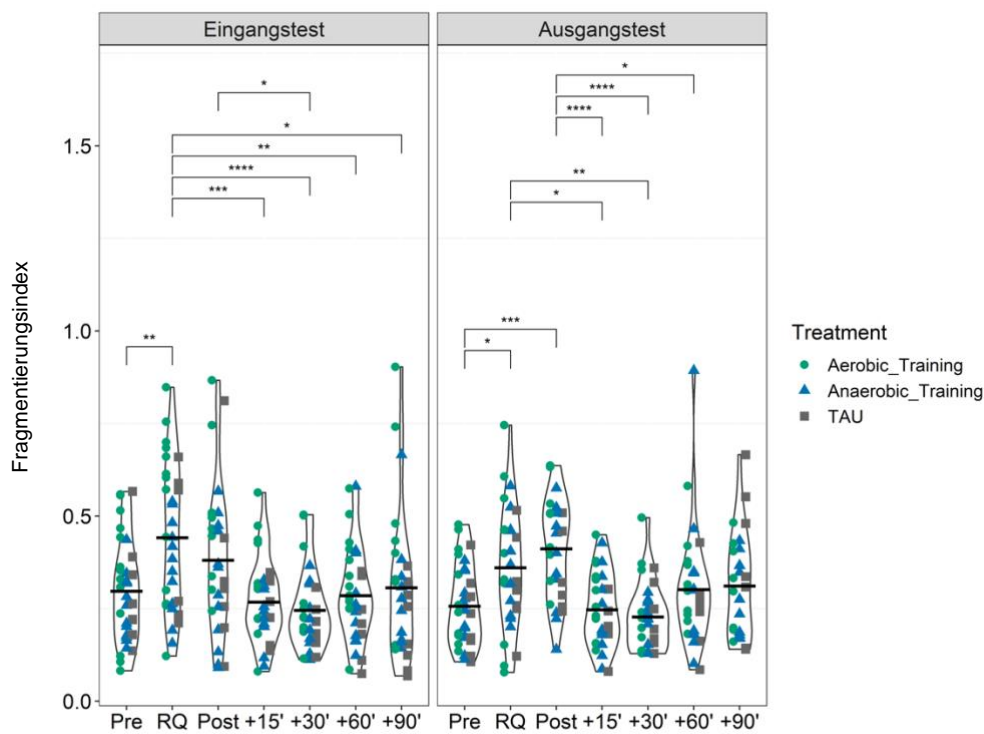


Abbildung 17: Fragmentierungsindizes des L1PA2\_90bp- und L1PA2\_222bp- Assays bei dem der Eingangstest zu Ausgangstest in den verschiedenen Interventionsgruppen verglichen wird. In den Klammern sind jeweils die Signifikanzen aufgezeigt, wobei \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  entspricht.

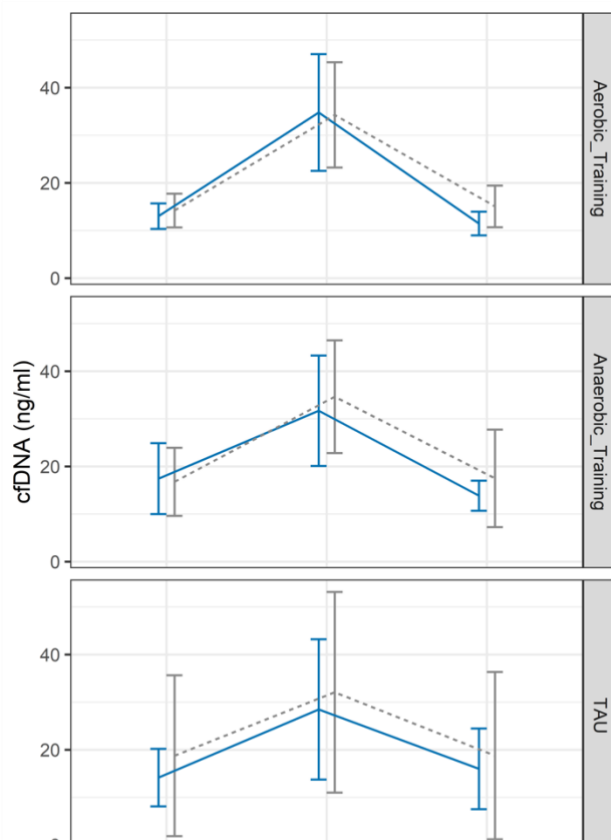


Abbildung 18 Kinetik der venösen cfDNA in den verschiedenen Studiengruppen des L1PA2\_90bp- Assays, (aerob, anaerob, TAU); graue Linie= Eingangstest, blaue Linie= Ausgangstest.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, war die Kinetik der venösen cfDNA in den verschiedenen Interventionsgruppen (anaerobes / aerobes Training, TAU) vergleichbar. Dabei lagen alle cfDNA-Werte in derselben Größenkategorie mit nur wenigen Ausreißern. Der höchste Wert betrug 108,34 ng/ml und der niedrigste 0,47 ng/ml. Im Vergleich mit gesunden Individuen, lagen die erreichten cfDNA-Werte direkt nach der Ausbelastung deutlich niedriger (Tug et al., 2017b). Generell änderten sich die kapillären cfDNA-Werte nur geringfügig (s. Abb. 19). Die größte Konstanz zeigten die kapillären cfDNA-Werte in der TAU-Gruppe.

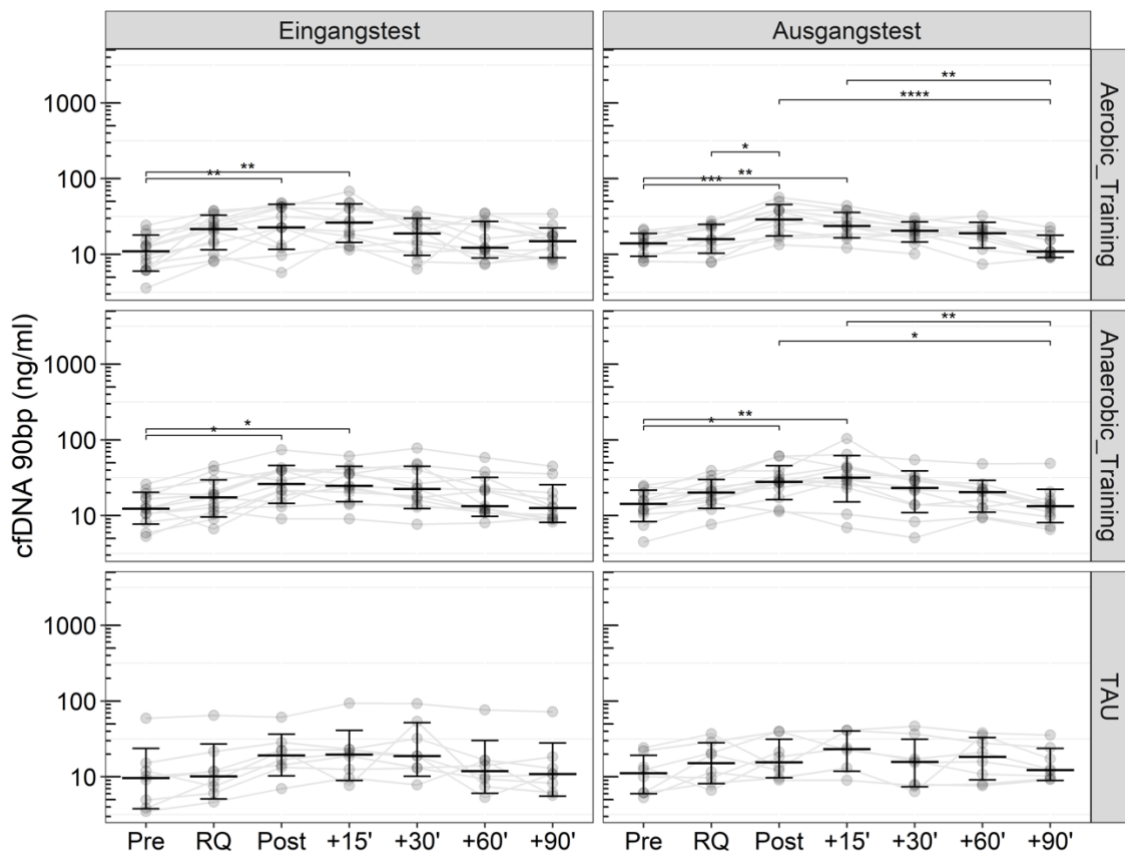


Abbildung 19: Kinetik der kapillären cfDNA im L1PA2\_90bp-Assay in den Interventionsgruppen Korrigierte Signifikanzniveaus nach TukeyHSD bei  $p$ -Werten  $\leq 0,05$ . In den Klammern sind jeweils die Signifikanzniveaus aufgezeigt, wobei \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  entspricht.

Patienten, die Medikamente erhielten, und Patienten, die keine Medikamente erhielten, zeigten keine signifikante Unterschiede bei den cfDNA-Konzentrationen in Ruhe ( $p = 0,28$ ) und bei den entsprechenden Fragmentierungsindizes ( $p = 0,21$ ). Hierbei wurde mittels einem T-Test die Patienten im Eingangstest verglichen, wobei 6 Patienten keine Medikation und 22 Patienten eine Medikation einnahmen.

Die Analyse des gemischten Modells mit Tukey-HSD-korrigierten Post-hoc-Tests ergab, wie bereits für die Fragmentierungsindizes gezeigt (s. Abb. 17), keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen (aerobe, anaerobe, TAU) zu den verschiedenen Interventionszeitpunkten. Hierbei war es unerheblich, ob die Proben aus kapillärem oder venösem Blut stammten. In Abbildung 20 wurden die kapillären und venösen PRE-Werte der 90bp-cfDNA des Eingangs- und Ausgangstests in den Interventionsgruppen verglichen.

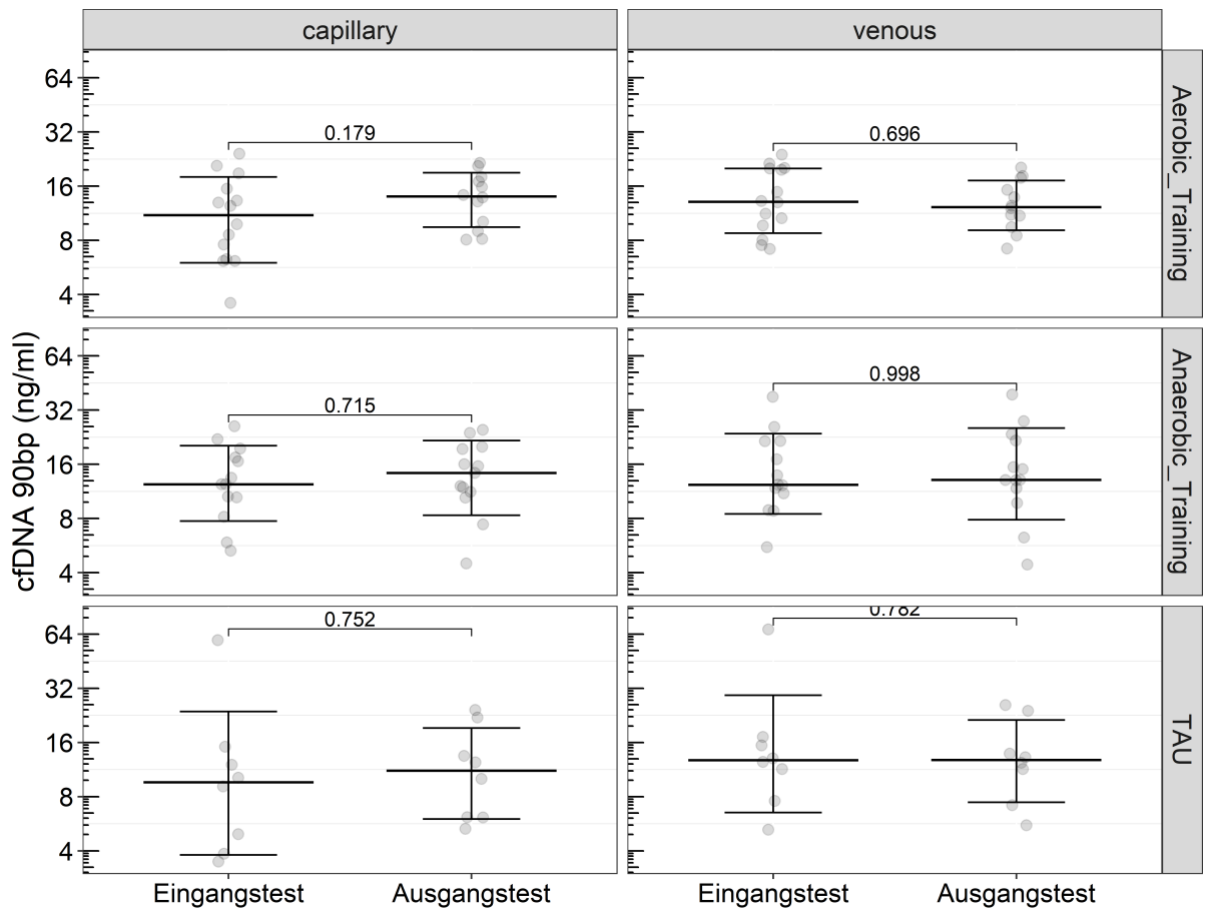


Abbildung 20 Kapilläre und venöse PRE-Werte der cfDNA im L1PA2\_90bp-Assay beim Eingangs- und Ausgangstest in den Interventionsgruppen  
 Y-Achse: PRE-Werte der cfDNA in ng/ml; die Zahlen über den abgebildeten Mittelwerten und KI-Plots sind die p-Werte der Mittelwertvergleiche.

## 6 Diskussion

Der cfDNA-Nachweis hat sich als diagnostischer / prognostischer Biomarker in verschiedenen Fachrichtungen etabliert (El Messaoudi et al., 2013) (Lood and Duvvuri, 2019). Der Versuch die bereits in den 1960er Jahren nachgewiesenen erhöhten cfDNA-Konzentrationen bei SLE-Patienten (Tan et al., 1966) als prognostischen Biomarker zu verwenden, scheiterte zunächst an fehlenden Quantifizierungsmethoden. Laut Studien korreliert die cfDNA mit der Krankheitsaktivität und der Häufigkeit einer renalen Beteiligung (Colombo et al., 2014) (Tug et al., 2014). Die cfDNA mitochondrialen oder nukleären Ursprungs variiert hinsichtlich ihrer Struktur und Fragmentlänge und wird durch unterschiedliche Prozesse freigesetzt (Thierry et al., 2016), wobei diese Charakteristika zumeist mit dem Ursprungsgewebe in Beziehung stehen (Emlen and Mannik, 1978). Die vielfältigen cfDNA-Ausschüttungsmechanismen sind nicht abschließend geklärt. Dasselbe gilt für die SLE-Pathogenese, bei der die genetische Prädisposition und Umweltfaktoren eine Rolle spielen (Finzel et al., 2018). Die vorliegende Studie untersuchte die cfDNA-Kinetik nach einer akuten und chronischen Sportintervention bei SLE-Patienten.

### 6.1 Etablierung eines qPCR-Assays

Für die Erhebung valider cfDNA-Werte ist eine zuverlässige und reproduzierbare Quantifizierung essenziell. In der Richtlinie ISO 20.395:2019 ist die Bewertung der Leistung von Quantifizierungsmethoden für Nukleinsäure-Zielsequenzen für qPCR- und dPCR-Experimente festgelegt (ISO, 2019). Dieser Leitfaden bietet eine Basis zur Validierung von qPCR-Assays unter Berücksichtigung der Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) und der einschlägigen CLSI-Richtlinien. Die gewählte Quantifizierungsmethode sollte die cfDNA möglichst effizient und präzise analysieren. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der cfDNA-Konzentrationen in den SLE-Proben in verschiedenen qPCR-Läufen wurde ein Inter-Plate-Kalibrierungsverfahren (s. Kap. 4.5.8) implementiert (Research, 2020). Mit den etablierten L1PA2\_90bp und L1PA2\_222bp qPCR-Assays ist es möglich, cfDNA in kleinsten Mengen in Plasmaproben zuverlässig zu quantifizieren. Ein weiterer Vorteil der Assays ist, dass die DNA nicht aus den Plasmaproben isoliert werden muss. Durch die Direktquantifizierung lassen

sich Zeit und Kosten sparen sowie Fehler minimieren. Wie die vorliegende Studie belegt (s. Abb. 13a), kommt es bei der Nutzung von nicht speziell für die cfDNA entwickelten DNA-Isolierungskits zu reduzierten cfDNA-Konzentrationen und zum Verlust von kurzen DNA-Fragmenten. Dies wirkt sich negativ auf den Fragmentierungsindex aus und führt bei Fragestellungen, bei denen niedrige cfDNA-Werte nachgewiesen werden müssen (z. B. molekulare Profilierung von cfDNA bei Tumorerkrankungen) (Thierry et al., 2016) zu fehlerhaften Ergebnissen. Nachweislich weisen auch im Handel erhältliche cfDNA-Isolierungskits oft großen Schwankungen bei der Wiederfindung, Reproduzierbarkeit und Größenunterscheidung auf (Sorber et al., 2017). Die Direktquantifizierung aus dem Plasma wurde in der vorliegenden Arbeit als kosteneffiziente Qualitätskontrolle eingesetzt und diente dazu, DNA-Verluste während der Isolierung zu erkennen und die Integrität der isolierten DNA-Proben abzuschätzen.

Für die Bestimmung der LOQ werden mindestens zehn Wiederholungen pro Konzentration empfohlen (ISO, 2019). Für die Durchführung der Präzisionsstudie wurden gepoolte PRE- und POST-Plasmaproben verwendet, die Proben mit niedrigen und hohen cfDNA-Werten repräsentierten. Der für alle Proben unter 10 % liegende CV wies auf eine ausreichende Präzision hin. Daher war es möglich, die Auswirkungen des Trainings auf die Studienteilnehmer zu analysieren. Um die Wiederholbarkeit und die relativen SD bei jedem Lauf zu bestimmen, wurden Duplikate des Plasmapools mit niedriger und hoher Kopienzahl in zehn aufeinanderfolgenden qPCR-Läufen gemessen. Auch hier zeigte sich eine ausreichende Präzision mit Abweichungen unter 12,1 %.

Da nicht alle Proben im selben PCR-Lauf analysiert werden konnten, war eine Kalibrierung zwischen den Läufen (Inter-Run Kalibrierung) erforderlich. Dies gilt vor allem für qPCR-Assays, da sich das Verhältnis zwischen Quantifizierungszyklus und relativer Menge in jedem Lauf unterscheidet (Hellemans et al., 2007). Die Korrektur der Basislinie eines individuellen qPCR-Laufs hängt von der Gesamtzahl der Proben und der Fluoreszenzintensität ab (Hellemans et al., 2007). Die durchgeführten Messungen belegten, dass die Verwendung von zwei Referenzproben anstelle einer vollständigen Standardkurve für die Kalibrierung zwischen den Läufen für zuverlässige Studienergebnisse ausreichte. Im Vergleich zu den nicht kalibrierten PCR-Ergebnissen erhöhte sich die mittlere Präzision durch die Inter-Run-Kalibrierung und die Abweichungen im L1PA2\_90bp- und L1PA2\_222bp-Assay reduzierten sich

auf 8,07 % und 16,29 % für die gepoolten PRE- und POST-Plasmaproben (s. Kap. 5.3, Inter-Run-Kalibrierung und Abb. 10).

Aufgrund einer fehlenden Standardisierung werden die Ergebnisse einer cfDNA-Messung potenziell durch präanalytische, analytische oder postanalytische Variablen beeinflusst. Die häufigste Fehlerquelle bilden präanalytische Variablen (48–68,2 %) (Meddeb et al., 2019). In diesem Kontext sind die Aspekte Proband (demographischer und biologischer Status), Probensammlung, Probentransport, Probenverarbeitung und die Probenaufbewahrung zu berücksichtigen (Meddeb et al., 2019). Meddeb et al. (2019) empfehlen, wie auch andere Autoren, die Durchführung eines zweiten Zentrifugationsschrittes, um die Homogenität und Reinheit der Probe zu erhöhen und eine Kontamination durch DNA aus Erythrozyten zu vermeiden. Laut den vorliegenden Ergebnissen hat die Zentrifugationsgeschwindigkeit (600 x g, 2500 x g oder 16.000 x g) keinen relevanten Einfluss auf die cfDNA-Konzentrationen. Die nachgewiesenen Unterschiede lagen im Bereich der Assaypräzision. Bei der Probenverarbeitung wurden keine nicht tarierte Zentrifugen genutzt und der Plasmaüberstand mit genügend Abstand vom Pellet vorsichtig abpipettiert. Die erhöhten cfDNA-Konzentrationen in der ersten Probe direkt nach der Venenpunktion könnten mit einer Gewebeschädigung zusammenhängen (s. Abb. 11b). Um dies zu vermeiden, empfiehlt das National Cancer Institute bei der Verarbeitung von cfDNA-Proben das erste gewonnene Blut nach Punktion zu verwerfen (Greytak et al., 2020). Wird mehr als ein Röhrchen entnommen, sollte das erste Röhrchen nicht für die Messung von cfDNA verwendet werden. In der vorliegenden Studie wurde bei jeder Messung primär das Serum-Röhrchen abgenommen, um diesen präanalytischen Fehler zu umgehen.

Ähnlich wie in anderen Studien veränderten sich in der vorliegenden Studie die cfDNA-Werte nach Lagerung der EDTA-Vollblutproben über mehrere Stunden vor der Zentrifugation nicht (Lam et al., 2004). Die Studienlage zu den Auswirkungen einer Langzeitlagerung des Plasmas auf die cfDNA-Quantität und -Qualität ist widersprüchlich. Empfohlen wird, das Plasma für quantitative Analysen von cfDNA mindestens neun Monate zu lagern (Meddeb et al., 2019). Die Plasmaproben in der vorliegenden Studie wurden meist erst nach mehr als sechs Monaten Lagerung analysiert. Zur Analyse der Stabilität von verdünntem Plasma wurden die 1:10 verdünnten Plasmaproben nach einer Lagerzeit von mindestens zwei Monaten bei – 20 °C erneut untersucht. Die fehlenden signifikanten Konzentrationsunterschiede

lassen darauf schließen, dass sich die cfDNA in Verdünnungen stabil lagern lässt. Neben den präanalytischen Variablen (z. B. Wahl der Blutentnahmeröhrchen, Zentrifugationsprotokoll, Lagerungsbedingungen der Plasmaproben) können sich auch physiologische Faktoren der Probanden (z. B. Alter, zirkadianer Rhythmus, Ernährung, Medikation) auf die Qualität und Quantität der cfDNA auswirken (Fleischhacker and Schmidt, 2020). Um diese präanalytischen Variablen möglichst zu standardisieren, wurden alle Patienten morgens untersucht, nachdem sie über Nacht gefastet hatten.

Die Blutproben wurden venös und kapillär gewonnen, wobei die kapilläre Entnahme weniger invasiv ist. Wichtig hierbei ist, die kapillären Proben stets an unterschiedlichen Orten zu entnehmen, da wiederholte Probeentnahmen an derselben Stelle zu erhöhten cfDNA-Werten führen (s. Abb. 12). Die Ursachen für die intra-individuelle Varianz sind nicht geklärt, so dass weitere Untersuchungen erforderlich sind. Ein möglicher Grund sind Mikrotraumata durch die wiederholte Punktion, die die Freisetzung von cfDNA triggern.

Die cfDNA-Werte stimmten bei der kapillären oder venösen Probenentnahme weitgehend überein. Die kapilläre Blutentnahme stellt eine schnellere und effizientere Entnahmemethode dar, da für die Direktquantifizierung nur kleine Plasamengen benötigt werden. Dadurch wird die venöse Abnahme von mehreren EDTA-Röhrchen, die bei der Verwendung von Isolierungskits benötigt werden, überflüssig. Die einzige Schwierigkeit bei den geringen Blutmengen ist die Aufbereitung des Plasmas, da die Abnahme des Plasmaüberstands nach der Zentrifugation eine hohe Präzision erfordert. Die venösen und kapillären Proben wiesen auch nach verlängerter Lagerung des Vollblutes keine großen Unterschiede bei den cfDNA-Werten (s. Kap. 5.3) auf. Daher bleibt es dem Anwender überlassen, ob er das Blut nach der Abnahme direkt verarbeitet oder am Ende einer Untersuchung alle Blutproben gemeinsam. Für ein standardisiertes Protokoll und eine Minimierung von Fehlern in der präanalytischen Phase ist jedoch eine einheitliche Handhabung erforderlich. Generell belegen die vorliegenden Experimente, dass cfDNA-Werte aus venösem und kapillärem Blut mittels Direktquantifizierung zuverlässig bestimmt werden können (s. Abb. 11).

Der cfDNA-Fragmentierungsindex liefert Hinweise auf den Ausschüttungsmodus, der in der Onkologie zur Detektion von Tumor-DNA genutzt wird (Vizza et al., 2018). Dieser Fragmentierungsindex (Synonym DNA-Integritätsindex) weist bei gesunden

Personen eine hohe Homogenität auf und liegt zwischen 0,3 und 0,8 (Meddeb et al., 2019). Nekrotische Tumorzellen setzen überwiegend lange cfDNA-Fragmente frei (Thierry et al., 2016). Die mit 0,35 geringen Fragmentierungsindices (s. Abb. 16b und 17) in der vorliegenden Studie bilden eine Dominanz kurzer cfDNA-Fragmente ab, die für gesunde Individuen typisch ist und gegen einen pathologischen Freisetzungsprozess spricht (Vizza et al., 2018). Die Befunde passen zu den Ergebnissen von Tug et al. (2014), die keine Unterschiede bei der cfDNA-Fragmentierung zwischen SLE-Patienten und gesunden Probanden fanden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den Einfluss verschiedener Erkrankungen und den Effekt physischer Belastung auf den cfDNA-Ausschüttungsmodus im Detail zu analysieren.

## 6.2 Kollektiv

Die Stichprobengröße der vorliegenden Studie war mit 26 Probanden eher gering. Der SLE gehört mit einer Prävalenz von 36,7/100 000 zu den selteneren Krankheitsbildern (Kuhn et al., 2015). In der Studie dominierten weibliche Teilnehmer (26 Frauen vs. 2 Männer), was die Geschlechterverteilung beim SLE – Frauen erkranken viermal häufiger als Männer – widerspiegelt (Kuhn et al., 2015). Der BMI lag im Mittel bei 27,96 kg/cm<sup>2</sup>, was auf ein leicht übergewichtiges Kollektiv hindeutet. Eine wahrscheinliche Ursache ist eine geringere körperliche Betätigung aufgrund der einschränkenden SLE-Symptomatik (Mancuso et al., 2011). Durch den erhöhten BMI war generell eine geringere Leistungsfähigkeit zu erwarten (Riebe et al., 2018). Jedoch belegen Studien, dass der BMI die cfDNA-Werte nicht beeinflusst (Beiter et al., 2011) (Breitbach et al., 2012) (Meddeb et al., 2019). Dies wurde in der vorliegenden Studie (s. Abb. 9) bestätigt. Dagegen zeigte das Gewicht eine lineare Korrelation zur Muskelmasse, zum Körperfettanteil und zum CRP ( $\sim r = 0,8$ ). Auch in anderen Studien war Übergewicht mit erhöhten CRP-Werten und anderen Infektionsparametern assoziiert (Park et al., 2005). Diese Befunde untermauern die Bedeutung der physischen Aktivität bei SLE-Patienten, damit das Immunsystem nicht zusätzlich durch das Übergewicht belastet wird.

Die Probanden wiesen im Vergleich zu anderen cfDNA-Studien, bei denen die Sportintervention an jungen, gesunden Sportlern durchgeführt wurde (Breitbach et al., 2014), ein höheres Alter auf (Durchschnitt 49,42 Jahre). In einer Studie mit einem

großen Patientenkollektiv erhöhte ein Alter über 47 Jahren sowie das weibliche Geschlecht die cfDNA-Konzentration (Meddeb et al., 2019). Für eine bessere Vergleichbarkeit der vorliegenden Befunde, sind Untersuchungen an gesunden Probanden mit einem ähnlichen Alter, BMI und Trainingszustand erforderlich.

Während des Stufentests wurden zwar hohe BORG-Werte erreicht, die auf eine Ausbelastung hindeuten, ohne jedoch die maximale Herzfrequenz zu erreichen. Bei einem Durchschnittsalter von ~49 Jahren beträgt die maximale Herzfrequenz 171 bpm (Such and Meyer, 2010); bei den Probanden der vorliegenden Studie lag sie jedoch bei ~157 bpm. Auch der VO<sub>2</sub>peak als Maß des physischen Leistungsniveaus zeigte im Vergleich zu gesunden Individuen einen geringeren Wert (Rapp et al., 2018). Die geringere Leistungsfähigkeit von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen wurde bereits aufgezeigt (Keyser et al., 2003). Die vorliegenden Befunde lassen sich möglicherweise auch dadurch erklären, dass Personen mit SLE über eine geringere kardiovaskuläre Kapazität und Muskelkraft verfügen (Tench et al., 2002).

Ein weiterer Faktor, der die cfDNA-Werte beeinflusst haben könnte, war die immunsuppressive Medikation der Probanden. Wenn SLE-Patienten erhöhte cfDNA-Werte aufweisen und gesteigerte cfDNA-Werte eine hohe Krankheitsaktivität widerspiegeln (Colombo et al., 2014), müsste eine Immunsuppression die Werte wieder verringern. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden, da kein signifikanter Unterschied zwischen medikamentös und nicht medikamentös behandelten Patienten bestand (s. Kap. 5.4). Aufgrund der geringen Probandenanzahl ohne medikamentöse Behandlung (21 %; s. Tab. 9) sollten die Versuche mit einem größeren Patientenkollektiv wiederholt werden, um valide Ergebnisse zu erhalten. Die meisten Probanden nahmen regelmäßig Immunsuppressiva, um den Krankheitszustand zu stabilisieren. Dies spiegelte sich auch in dem durchschnittlichen SLEDAI-Score wider, der mit 6,50 eine mittlere Krankheitsaktivität aufzeigte. Der SLEDAI korreliert jedoch nicht mit der Höhe der cfDNA, da der Score nur das Vorhandensein / Fehlen von Items und in den meisten Fällen nicht deren Schweregrad bewertet. Daher müssten für die Analyse des potenziellen Einflusses der Krankheitsaktivität auf die cfDNA-Werte andere klinische Bewertungsindizes inkludiert werden (Tug et al., 2014). In der Studie von Tug et al. (2014) mit 59 SLE-Patienten zeigten diese im Vergleich zu gesunden Individuen erhöhte cfDNA-Werte, wobei 74,5 % der SLE-Patienten eine immunsuppressive

Therapie erhielten. Dieser Befund wurde in der vorliegenden Studie nicht bestätigt. Mögliche Ursachen sind die individuelle Fluktuation der cfDNA-Werte der Probanden und/oder ein stabiler Krankheitsverlauf im Patientenkollektiv.

### 6.3 *Interpretation der Ergebnisse*

Die cfDNA-Messung hat sich seit einiger Zeit in vielen Fachrichtungen etabliert. Schon lange ist bekannt, dass SLE-Patienten hohe cfDNA-Werte aufweisen (Tan et al., 1966). Diverse Studien belegen, dass SLE-Patienten im Vergleich zur gesunden Bevölkerung höhere cfDNA-Konzentrationen aufweisen und dass diese mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Tug et al., 2014). Bei Autoimmunerkrankungen fungieren erhöhte cfDNA-Werte als Trigger zur Bildung von Auto-AK und für eine Voranschreiten der Inflammation (Bai et al., 2018) (Lood and Duvvuri, 2019). Zum Therapiekonzept des SLE zählt laut den Empfehlungen der EULAR und den Leitlinien von 2008 körperliche Betätigung (Fanouriakis et al., 2019). Die körperliche Betätigung dient (s. Kap. 2.3) der Reduktion der Symptome (z. B. Fatigue) und der Prävention von Nebenerkrankungen (z. B. koronare Herzerkrankungen). Die cfDNA-Kinetik nach körperlicher Betätigung wurde bei SLE-Patienten bisher noch nicht untersucht.

#### 6.3.1 *Akute Sportintervention*

Zu Beginn der Ausbelastungstests zeigten alle Probanden relativ niedrige mit gesunden Individuen vergleichbare cfDNA-Ruhewerte (Breitbach et al., 2012). Nach der Ausbelastung bis zur Erschöpfung wiesen die untersuchten SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden einen zwei bis dreifach geringeren Anstieg der cfDNA-Werte auf (Tug et al., 2017a). Maßgeblich für diesen Befund ist wahrscheinlich die Abhängigkeit der cfDNA-Konzentration von der Belastungsdauer- und -intensität (Haller et al., 2017). Die SLE-Patienten mussten die Ausbelastung meist schon auf früheren Stufen beenden als gesunde Probanden, was vermutlich auf den schlechteren Trainingszustand, die geringere Zeit bis zur Erschöpfung und den niedrigen Gesamtenergieverbrauch im Alltag zurückzuführen war (Beiter et al., 2011) (Breitbach et al., 2012) (Tug et al., 2017a). Wie die niedrigeren VO<sub>2</sub>peak-

Werte belegten, verfügten die SLE-Patienten über ein geringeres Leistungsniveau als gesunde Personen, was ihnen die Ausbelastung auf dem Laufband erschwerte.

Ein weiterer interessanter Aspekt war die Beobachtung, dass die PRE- und +90-cfDNA-Werte eine höhere Korrelation aufwiesen als die POST-Werte. Dies könnte auf die unterschiedliche Dauer der Ausbelastung bei den Probanden sowie auf individuelle Schwankungen zurückzuführen sein.

Die cfDNA-Konzentrationen normalisierten sich 60–90 min nach der Ausbelastung bei den meisten Patienten (s. Abb. 14 und 16) ohne signifikante Unterschiede zu den PRE-cfDNA-Werten (s. Tab. 16 und 17 im Anhang). Im Beobachtungszeitraum lag die Halbwertszeit insgesamt bei etwa 30 min (s. Abb. 16a), im Zeitraum zwischen 30 und 60 min dagegen bei nur 15 min. Es scheint, als wäre die cfDNA in dieser Zeitspanne besonders schnell degradiert worden. Dieser Aspekt der cfDNA-Kinetik tritt auch bei gesunden Probanden auf. In einer Studie betrug die Halbwertszeit von cfDNA 16,3 min (Lo et al., 1999). Dieser Befund war bei den vorliegenden SLE-Patienten unerwartet, da sie vor allem bei einer Nierenbeteiligung weniger DNase I besitzen, die maßgeblich an der Degradierung der cfDNA beteiligt ist (Leffler et al., 2015). Die DNase I wird durch verschiedene pathologische Prozesse inhibiert (s. Kap. 2.2.7). Dazu zählen Anti-dsDNA-AK, die die Enzymaktivität verringern und die Erkennung der DNA durch die DNase I verhindern (Meller et al., 2015). Wenn die komplexe Regulation der Aktivität der DNase I aus dem Gleichgewicht gerät, erhöht sich die cfDNA-Konzentration, was wiederum eine Entzündungsreaktion (Lood and Duvvuri, 2019) oder die Produktion von Anti-ds-DNA-AK (Bai et al., 2018) auslösen kann. Nicht nur bei von Autoimmunerkrankungen Betroffenen, sondern auch bei Sportlern, die an chronischer Müdigkeit (Fatigue) leiden, wurde eine erhöhte ANA-Seroprävalenz nachgewiesen (Beiter et al., 2014). Die Autoren vermuteten, dass übermäßige oder ungewohnte Trainingsbelastungen, hohe Stresswerte oder unzureichende Ruhezeiten potenzielle Ursachen für eine abnormale cfDNA-Freisetzung bei gesunden Menschen bei akuter oder längerer sportlicher Betätigung darstellen (Beiter et al., 2014). Demnach konnten sich bei den vorliegenden Probanden, die keinem dieser Aspekte ausgesetzt waren, die cfDNA-Werte aufgrund der geringen Krankheitsaktivität wieder normalisieren. Die DNase I Aktivität ist hauptsächlich bei SLE-Patienten mit Nierenbeteiligung verringert (Leffler et al., 2012). Der durchschnittliche Kreatinin-Wert von 0,85 mg/dl bei den Probanden der vorliegenden Studie lässt auf eine geringe Nierenbeteiligung im Kollektiv schließen.

Die Normalisierung der cfDNA-Werte nach ca. 90 min nach einem vorübergehenden Anstieg lässt auf eine normale cfDNA-Degradierung und eine fehlende Akkumulation schließen.

Die niedrigeren cfDNA-Maximalwerte unter Ausbelastung des vorliegenden Kollektivs im Vergleich zu gesunden Probanden beruhen vermutlich auf einem schlechteren Trainingszustand, wie der niedrigeren VO<sub>2</sub>peak belegte (s. Kap. 6.2). Laut einer Studie hängt die cfDNA-Konzentration maßgeblich von der Belastungsdauer und -intensität ab (Haller et al., 2017), die bei SLE Patienten geringer ist. Allerdings zeigten alle Probanden einen signifikanten Anstieg der cfDNA-Werte während der akuten Sportintervention.

### *6.3.2 Chronische Sportintervention*

In der Sportphysiologie dient die cfDNA-Messung als Indikator für das individuelle Leistungsniveau, für metabolischen oder oxidativen Stress oder für ein Übertraining (Breitbach et al., 2012). Hierbei sind jedoch intraindividuelle Schwankungen sowie die Belastungsdauer und -intensität zu beachten, die die cfDNA-Konzentration beeinflussen (Haller et al., 2017). Einige Studien analysierten die Auswirkung verschiedener Trainingsformen auf die cfDNA über eine gewisse Zeitspanne. Fatouros et al. (2006) zeigten erstmals den Einfluss der chronischen physischen Aktivität auf die cfDNA-Werte. In der vorliegenden Studie wurden die Studienteilnehmer in drei Trainingsgruppen (aerob, anaerob, TAU) eingeteilt, um den Einfluss der Trainingsintensität der 12-wöchigen Sportintervention auf die Endpunkte der Studie zu analysieren (Boedecker et al., 2020). Die cfDNA-Werte der Eingangs- und Ausgangstests wiesen in keiner der Gruppen signifikante Veränderungen auf, unabhängig davon, ob venöses oder kapilläres Blut verwendet wurde (s. Abb. 13). Vor allem bei den kapillären Proben der TAU-Gruppe waren nur marginale Veränderungen der cfDNA-Werte erkennbar. Mögliche Ursachen für diese Befunde sind die geringe Stichprobengröße und ein fehlender Übertrainingszustand durch die 12-wöchige Sportintervention in allen Trainingsgruppen. Wertet man die cfDNA als individuellen Leistungsparameter, deuten die Befunde an, dass keine der Trainingsinterventionen den Leistungszustand der SLE-Patienten beeinflusst hat. Für eine umfassende Analyse des Effekts körperlichen Trainings bei SLE-Patienten sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich. Der fehlende Einfluss körperlichen

Trainings auf die cfDNA-Konzentration ist bei Personen mit Autoimmunerkrankungen generell positiv zu bewerten, da hier erhöhte cfDNA-Konzentrationen mögliche Auslöser für eine Inflammation (Lood and Duvvuri, 2019) oder für eine Produktion von Anti-ds-DNA-AK darstellen (Bai et al., 2018). Um die Auswirkungen der cfDNA genau zu verstehen, müssen die Mechanismen der Freisetzung bei körperlicher Aktivität geklärt werden.

## 7 Zusammenfassung

Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) weisen erhöhte Konzentrationen von zellfreier Desoxyribonukleinsäure (cfDNA) auf. Erhöhte cfDNA-Werte werden aber nicht nur unter pathologischen Konditionen, sondern auch nach körperlicher Aktivität nachgewiesen. In einigen Fachdisziplinen wird die cfDNA als Biomarker verwendet, obwohl eine Standardisierung der cfDNA-Messung bislang fehlt. Beim SLE ist die cfDNA-Konzentration mit der Krankheitsaktivität assoziiert. In der Sportleistungsdiagnostik dient die cfDNA als Marker für das individuelle Leistungsniveau, für metabolischen oder oxidativen Stress oder für ein Übertraining. Jedoch sollte beachtet werden, dass die cfDNA-Konzentrationen individuell sehr stark schwanken und von der Art und der Intensität der Belastung abhängen.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse des Einflusses von akuten und/oder chronischen Sportintervention auf die cfDNA-Kinetik bei SLE-Patienten. Untersucht werden sollte, ob sich die cfDNA-Werte nach aeroben und anaeroben Sportinterventionen unterscheiden und ob sich die cfDNA-Kinetik während einer akuten Sportintervention bei SLE-Patienten verändert. Um die erhobenen Werte beurteilen zu können, erfolgte eine ausführliche Literaturrecherche zu publizierten cfDNA-Daten bei gesunden Individuen und SLE-Patienten.

Weiter sollten im Rahmen der Dissertation die verschiedenen Methoden zur cfDNA-Messung standardisiert werden.

Im Rahmen der Systemic Lupus Erythematosus Exercise Program (SLEEP) Studie wurde die cfDNA-Kinetik nach einer akuten (einmaligen) und chronischen (langfristigen) Sportintervention bei SLE-Patienten untersucht. Dafür wurden 26 SLE-Patienten mit einem klinisch stabilen Krankheitszustand randomisiert in eine aerobe Trainingsgruppe (n=12), anaerobe Trainingsgruppe (n=13) und eine Kontrollgruppe (treatment as usual (TAU) Gruppe) (n=8) eingeteilt. Sieben Studienteilnehmer der TAU-Gruppe wurden nach den 12 Wochen erneut in die aerobe oder anaerobe Trainingsgruppe eingeteilt. Nach einer klinischen Untersuchung und Tests zur physischen Leistungsfähigkeit durchliefen die Patienten ein 12-wöchiges Trainingsprogramm (chronische Sportintervention) mit wöchentlichen Trainingsplänen, die an ihre physische Leistung angepasst wurden.

Im Rahmen der akuten Sportintervention führten die Studienteilnehmer zu Beginn und nach der chronischen Sportintervention eine schrittweise Ausbelastung mit

einem angepassten Walking-Protokoll durch. Vor, direkt nach sowie 90 min nach der Ausbelastung wurden den Probanden venöses Blut abgenommen. Zusätzlich wurden kapilläre Blutproben bei jedem Test entnommen (pre, Respiratorischer Quotient (RQ), post, +15, +30, +60, +90). Nach Zentrifugation wurde in dem verdünnten Plasma die cfDNA mittels qPCR bestimmt.

Für die präzise und effiziente Messung der cfDNA wurde zuvor das L1PA2\_90bp und L1PA2\_222bp- Assay validiert und zur Verarbeitung der vorliegenden Proben der SLEEP-Studie implementiert.

Bei Betrachtung der akuten Effekte der Sportintervention war ein 2,1-facher signifikanter Anstieg der cfDNA von 13,9 ng/ml (95 % Konfidenzintervall (KI) 10,4–18,8) auf 29,6 ng/ml (95 % KI 22,0–39,9) gefolgt von einem Abfall auf 14,1 ng/ml (95 % KI 10,5–19,9) nach 90 min zu erkennen. Ähnlich verhielten sich die cfDNA-Werte in den kapillären Proben, bei denen ein 2,2-facher signifikanter Anstieg von 11,1 ng/ml (95 % KI 8,0–15,4) auf 24,8 ng/ml (95 % KI 17,9–34,4) und ein anschließender Abfall auf 13,6 ng/ml (95 % KI 10,0–18,4) zu beobachten war. Die cfDNA-Werte in den venösen und kapillären Proben korrelierten signifikant ( $R^2 = 0,774$ ,  $p < 0,0001$ ).

Laut den vorliegenden Messungen stiegen die cfDNA-Werte bei SLE-Patienten nach einer akuten Sportintervention deutlich weniger stark an als bei gesunden Individuen. Mögliche Ursachen sind eine geringere Trainingsintensität, eine kürzere Zeit bis zur Ausbelastung und ein niedrigerer Energieaufwand. Die körperliche Aktivität erhöhte die cfDNA nicht auf kritische Werte, die eine gesteigerte Immunreaktion und die Bildung von AK gegen doppelsträngige DNA (anti-dsDNA-Auto-AK) triggern könnten.

Die direkte Quantifizierung der cfDNA aus venösen und kapillären Blutproben mittels L1PA2\_90bp- und L1PA2\_222bp-Assay stellt eine kostengünstige, schnelle und effiziente Art der cfDNA-Konzentrationsbestimmung dar. Bei standardisierter Durchführung und Beachtung der geltenden Anforderungen der ISO-Richtlinien eignet sich der Assay für eine valide cfDNA-Bestimmung. Diese Methode ist auch für andere Fragestellungen und Fachrichtungen geeignet, bei denen die cfDNA als Biomarker relevant ist.

Die cfDNA-Kinetik bei SLE-Patienten war unter Ausbelastung mit der von gesunden Probanden vergleichbar. Nach der Ausbelastung kam es zu einem temporären Anstieg; 60–90 min kehrten die cfDNA-Werte jedoch wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Da erhöhte cfDNA-Konzentrationen als Trigger für eine

Inflammationsreaktion oder für die Produktion von Anti-dsDNA-Antikörpern diskutiert werden, sind ein geringer Anstieg und ein schneller Abfall der cfDNA-Werte positiv zu werten. In Bezug auf die cfDNA hat eine regelmäßige körperliche Belastung keinen negativen Effekt bei SLE-Patienten. Die vorliegenden cfDNA-basierten Befunde unterstützen daher die Empfehlungen der European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) für SLE-Patienten sich regelmäßig körperlich zu betätigen.

## 8 Literaturverzeichnis

- Al-Mayouf, S.M., Sunker, A., Abdwani, R., Al Arawi, S., Almurshedi, F., Alhashmi, N., Al Sonbul, A., Sewairi, W., Qari, A., Abdallah, E., 2011. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 43, 1186–1188.
- Arneth, B.M., 2019. Systemic Lupus Erythematosus and DNA Degradation and Elimination Defects. *Front. Immunol.* 10, 1697.
- Atamaniuk, J., Stuhlmeier, K.M., Vidotto, C., Tschan, H., Dossenbach-Glaninger, A., Mueller, M.M., 2008. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro-and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *Eur. J. Appl. Physiol.* 104, 711–717.
- Atamaniuk, J., Vidotto, C., Tschan, H., Bachl, N., Stuhlmeier, K.M., Müller, M.M., 2004. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin. Chem.* 50, 1668–1670.
- Bai, Y., Tong, Y., Liu, Y., Hu, H., 2018. Self-dsDNA in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 191, 1–10. <https://doi.org/10.1111/cei.13041>
- Barnett, E.V., 1968. Detection of nuclear antigens (DNA) in normal and pathologic human fluids by quantitative complement fixation. *Arthritis Rheum. Off. J. Am. Coll. Rheumatol.* 11, 407–417.
- Beiter, T., Fragasso, A., Hudemann, J., Nieß, A.M., Simon, P., 2011. Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clin. Chem.* 57, 633–636.
- Beiter, T., Fragasso, A., Hudemann, J., Schild, M., Steinacker, J., Mooren, F.C., Niess, A.M., 2014. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *J. Appl. Physiol.* 117, 325–333. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00173.2014>
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., Cookson, B.T., 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 99–109.
- Bertsias, G.K., Ioannidis, J.P.A., Boletis, J., Bombardieri, S., Cervera, R., Dostal, C., Font, J., Gilboe, I.M., Houssiau, F., Huizinga, T., 2008. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 195–205.
- Boedecker, S.C., Philippi, K.F.A., Neuberger, E., Schmidt, S., Pfirrmann, D., Haller, N.,

- Schwarting, A., Simon, P., Weinmann-Menke, J., 2020. Twelve-Week Internet-Based Individualized Exercise Program in Adults With Systemic Lupus Erythematosus: Protocol for a Randomized Controlled Trial. *JMIR Res. Protoc.* 9, e18291. <https://doi.org/10.2196/18291>
- Bombardier, C., Gladman, D.D., Urowitz, M.B., Caron, D., Chang, C.H., Austin, A., Bell, A., Bloch, D.A., Corey, P.N., Decker, J.L., Esdaile, J., Fries, J.F., Ginzler, E.M., Goldsmith, C.H., Hochberg, M.C., Jones, J.V., Riche, N.G.H.L., Liang, M.H., Lockshin, M.D., Muenz, L.R., Sackett, D.L., Schur, P.H., 1992. Derivation of the sledai. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum.* 35, 630–640. <https://doi.org/10.1002/art.1780350606>
- Borba, E.F., Bonfa, E., 1997. Dyslipoproteinemias in systemic lupus erythematosus: influence of disease, activity, and anticardiolipin antibodies. *Lupus* 6, 533–539.
- Breitbach, S., Sterzing, B., Magallanes, C., Tug, S., Simon, P., 2014. Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise. *J. Appl. Physiol.* 117, 119–130. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00002.2014>
- Breitbach, S., Tug, S., Simon, P., 2012. Circulating Cell-Free DNA: An Up-Coming Molecular Marker in Exercise Physiology. *Sports Med.* 42, 565–586. <https://doi.org/10.2165/11631380-000000000-00000>
- Caielli, S., Athale, S., Domic, B., Murat, E., Chandra, M., Banchereau, R., Baisch, J., Phelps, K., Clayton, S., Gong, M., 2016. Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *J. Exp. Med.* 213, 697–713.
- Chan, E.Y., Ko, S.C., Lau, C.S., 1997. Increased rate of apoptosis and decreased expression of bcl-2 protein in peripheral blood lymphocytes from patients with active systemic lupus erythematosus. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 15, 3.
- Chan, K.A., Zhang, J., Hui, A.B., Wong, N., Lau, T.K., Leung, T.N., Lo, K.-W., Huang, D.W., Lo, Y.D., 2004. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 50, 88–92.
- Chan, R.W., Jiang, P., Peng, X., Tam, L.-S., Liao, G.J., Li, E.K., Wong, P.C., Sun, H., Chan, K.A., Chiu, R.W., 2014. Plasma DNA aberrations in systemic lupus erythematosus revealed by genomic and methylomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E5302–E5311.
- Colombo, M., Raposo, G., Théry, C., 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles 155–289.
- Dunaeva, M., Buddingh, B.C., Toes, R.E., Luime, J.J., Lubberts, E., Pruijn, G.J., 2015. Decreased serum cell-free DNA levels in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Highlights* 6, 23–

30.

El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F., Thierry, A.R., 2013. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clin. Chim. Acta* 424, 222–230.

Emlen, W., Ansari, R., Burdick, G., 1984. DNA-anti-DNA immune complexes. Antibody protection of a discrete DNA fragment from DNase digestion in vitro. *J. Clin. Invest.* 74, 185–190.

Emlen, W., Mannik, M., 1978. Kinetics and mechanisms for removal of circulating single-stranded DNA in mice. *J. Exp. Med.* 147, 684–699.

Ermakov, A.V., Konkova, M.S., Kostyuk, S.V., Izevskaya, V.L., Baranova, A., Veiko, N.N., 2013. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L., Henson, P.M., 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 5, 551–562.

Fanouriakis, A., Kostopoulou, M., Alunno, A., Aringer, M., Bajema, I., Boletis, J.N., Cervera, R., Doria, A., Gordon, C., Govoni, M., Houssiau, F., Jayne, D., Kouloumas, M., Kuhn, A., Larsen, J.L., Lerstrøm, K., Moroni, G., Mosca, M., Schneider, M., Smolen, J.S., Svenungsson, E., Tesar, V., Tincani, A., Troldborg, A., Vollenhoven, R. van, Wenzel, J., Bertsias, G., Boumpas, D.T., 2019. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 78, 736–745.  
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215089>

Fatouros, I.G., Destouni, A., Margonis, K., Jamurtas, A.Z., Vrettou, C., Kouretas, D., Mastorakos, G., Mitrakou, A., Taxildaris, K., Kanavakis, E., Papassotiriou, I., 2006. Cell-Free Plasma DNA as a Novel Marker of Aseptic Inflammation Severity Related to Exercise Overtraining. *Clin. Chem.* 52, 1820–1824. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.070417>

Finzel, S., Schaffer, S., Rizzi, M., Voll, R.E., 2018. Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses. *Z. Für Rheumatol.* 77, 789–798. <https://doi.org/10.1007/s00393-018-0541-3>

Fleischhacker, M., Schmidt, B., 2020. Pre-analytical issues in liquid biopsy – where do we stand? *J. Lab. Med.* 44, 117–142. <https://doi.org/10.1515/labmed-2019-0167>

Fleischhacker, M., Schmidt, B., 2007. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Cancer* 1775, 181–232.

- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., Kubista, M., 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* 12, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>
- Frost, P.G., Lachmann, P.J., 1968. The relationship of desoxyribonuclease inhibitor levels in human sera to the occurrence of antinuclear antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 3, 447.
- Gahan, P.B., 2003. Messenger DNA in higher plants. *Cell Biochem. Funct. Cell. Biochem. Its Modul. Act. Agents Dis.* 21, 207–209.
- Gaipl, U.S., Beyer, T.D., Heyder, P., Kuenkele, S., Böttcher, A., Voll, R.E., Kalden, J.R., Herrmann, M., 2004. Cooperation between C1q and DNase I in the clearance of necrotic cell-derived chromatin. *Arthritis Rheum. Off. J. Am. Coll. Rheumatol.* 50, 640–649.
- Gehrke, N., Mertens, C., Zillinger, T., Wenzel, J., Bald, T., Zahn, S., Tüting, T., Hartmann, G., Barchet, W., 2013. Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. *Immunity* 39, 482–495.
- Gergely Jr, P., Grossman, C., Niland, B., Puskas, F., Neupane, H., Allam, F., Banki, K., Phillips, P.E., Perl, A., 2002. Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 46, 175–190.
- Gergely, P., Niland, B., Gonchoroff, N., Pullmann, R., Phillips, P.E., Perl, A., 2002. Persistent mitochondrial hyperpolarization, increased reactive oxygen intermediate production, and cytoplasmic alkalinization characterize altered IL-10 signaling in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 169, 1092–1101.
- Giacona, M.B., Ruben, G.C., Iczkowski, K.A., Roos, T.B., Porter, D.M., Sorenson, G.D., 1998. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 17, 89–97.
- Gleeson, M., 2007. Immune function in sport and exercise. *J. Appl. Physiol.* 103, 693–699.
- Granger, V., Faille, D., Marani, V., Noël, B., Gallais, Y., Szely, N., Flament, H., Pallardy, M., Chollet-Martin, S., de Chaisemartin, L., 2017. Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J. Leukoc. Biol.* 102, 775–781.
- Greytak, S.R., Engel, K.B., Parpart-Li, S., Murtaza, M., Bronkhorst, A.J., Pertile, M.D., Moore, H.M., 2020. Harmonizing Cell-Free DNA Collection and Processing Practices through Evidence-Based Guidance. *Clin. Cancer Res.* 26, 3104–3109. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3015>

- Haller, N., Tug, S., Breitbach, S., Jörgensen, A., Simon, P., 2017. Increases in Circulating Cell-Free DNA During Aerobic Running Depend on Intensity and Duration. *Int. J. Sports Physiol. Perform.* 12, 455–462. <https://doi.org/10.1123/ijsp.2015-0540>
- Hartung, K., Seelig, H.-P., 2006. Labordiagnostik der systemischen Autoimmunerkrankungen. *Z. Für Rheumatol.* 65, 709–724. <https://doi.org/10.1007/s00393-006-0125-5>
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Herold, G., 2012. *Innere Medizin*. Eigenverlag, 2012.
- ISO, 2019. *Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR [WWW Document]*. URL <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:20395:ed-1:v1:en>
- Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E.S., Dumortier, H., Douchet, I., Raffray, L., Richez, C., Lazaro, E., Duffau, P., Truchetet, M.-E., Khoryati, L., Mercié, P., Couzi, L., Merville, P., Schaeffer, T., Viallard, J.-F., Pellegrin, J.-L., Moreau, J.-F., Muller, S., Zurawski, S., Coffman, R.L., Pascual, V., Ueno, H., Blanco, P., 2015. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 42, 1159–1170. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.012>
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.-D., Knippers, R., 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 61, 1659–1665.
- Jiang, P., Lo, Y.M.D., 2016. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet.* 32, 360–371. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.03.009>
- Kannan, K., Jain, S.K., 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7, 153–163.
- Keyser, R.E., Rus, V., Cade, W.T., Kalappa, N., Flores, R.H., Handwerger, B.S., 2003. Evidence for aerobic insufficiency in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res.* 49, 16–22. <https://doi.org/10.1002/art.10926>
- Kuhn, A., Bonsmann, G., Anders, H.-J., Herzer, P., Tenbrock, K., Schneider, M., 2015.

Diagnostik und Therapie des systemischen Lupus erythematoses. *Dtsch. Aertzblatt Int.* 112.

Lam, N.Y., Rainer, T.H., Chan, L.Y., Joynt, G.M., Lo, Y.D., 2003. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin. Chem.* 49, 1286–1291.

Lam, N.Y.L., Rainer, T.H., Chiu, R.W.K., Lo, Y.M.D., 2004. EDTA Is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. *Clin. Chem.* 50, 256–257. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.026013>

Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., 2011. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA–peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 3, 73ra19-73ra19.

Lee-Kirsch, M.A., Gong, M., Chowdhury, D., Senenko, L., Engel, K., Lee, Y.-A., de Silva, U., Bailey, S.L., Witte, T., Vyse, T.J., 2007. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 39, 1065–1067.

Leffler, J., Ciacma, K., Gullstrand, B., Bengtsson, A.A., Martin, M., Blom, A.M., 2015. A subset of patients with systemic lupus erythematosus fails to degrade DNA from multiple clinically relevant sources. *Arthritis Res. Ther.* 17, 205.

Leffler, J., Martin, M., Gullstrand, B., Tydén, H., Lood, C., Truedsson, L., Bengtsson, A.A., Blom, A.M., 2012. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J. Immunol.* 188, 3522–3531.

Lo, Y.D., Chan, K.A., Sun, H., Chen, E.Z., Jiang, P., Lun, F.M., Zheng, Y.W., Leung, T.Y., Lau, T.K., Cantor, C.R., 2010. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci. Transl. Med.* 2, 61ra91-61ra91.

Lo, Y.D., Zhang, J., Leung, T.N., Lau, T.K., Chang, A.M., Hjelm, N.M., 1999. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 218–224.

Lood, C., Blanco, L.P., Purmalek, M.M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S.S., Smith, C.K., Malech, H.L., Ledbetter, J.A., Elkon, K.B., Kaplan, M.J., 2016. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* 22, 146.

Lood, C.J., Duvvuri, B., 2019. Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases. *Front. Immunol.* 10, 502.

- Lunec, J., Herbert, K., Blount, S., Griffiths, H.R., Emery, P., 1994. 8-Hydroxydeoxyguanosine. *FEBS Lett.* 348, 131–138. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00583-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00583-4)
- Magna, M., Pisetsky, D.S., 2015. The role of cell death in the pathogenesis of SLE: is pyroptosis the missing link? *Scand. J. Immunol.* 82, 218–224.
- Mahajan, A., Herrmann, M., Muñoz, L.E., 2016. Clearance deficiency and cell death pathways: a model for the pathogenesis of SLE. *Front. Immunol.* 7, 35.
- Mancuso, C.A., Perna, M., Sargent, A.B., Salmon, J.E., 2011. Perceptions and measurements of physical activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 20, 231–242.
- Mandel, P., Matais, P., 1948. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Seances Soc Biol Ses Fil* 142, 241–243.
- Meddeb, R., Pisareva, E., Thierry, A.R., 2019. Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clin. Chem.* 65, 623–633. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.298323>
- Meller, S., Di Domizio, J., Voo, K.S., Friedrich, H.C., Chamilos, G., Ganguly, D., Conrad, C., Gregorio, J., Le Roy, D., Roger, T., 2015. T H 17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat. Immunol.* 16, 970.
- Neuberger, E.W.I., Brahmer, A., Ehlert, T., Kluge, K., Philippi, K.F.A., Boedecker, S.C., Weinmann-Menke, J., Simon, P., 2021a. Validating quantitative PCR assays for cfDNA detection without DNA extraction in exercising SLE patients. *Sci. Rep.* 11, 13581. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92826-4>
- Neuberger, E.W.I., Hillen, B., Mayr, K., Simon, P., Krämer-Albers, E.-M., Brahmer, A., 2021b. Kinetics and Topology of DNA Associated with Circulating Extracellular Vesicles Released during Exercise. *Genes* 12, 522. <https://doi.org/10.3390/genes12040522>
- Neuberger, E.W.I., Sontag, S., Brahmer, A., Philippi, K.F.A., Radsak, M.P., Wagner, W., Simon, P., 2022. Physical activity specifically evokes release of cell-free DNA from granulocytes thereby affecting liquid biopsy. *Clin. Epigenetics* 14, 29. <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01245-3>
- O'Dwyer, T., Durcan, L., Wilson, F., 2017. Exercise and physical activity in systemic lupus erythematosus: a systematic review with meta-analyses, in: *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. Elsevier, pp. 204–215.

- Park, H.S., Park, J.Y., Yu, R., 2005. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- $\alpha$  and IL-6. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 69, 29–35.  
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.11.007>
- Pierson-Perry, J.F., Vaks, J.E., Durham, A.P., 2012. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline - second edition. CLSI, Wayne, Pa., U.S.A.
- Piovesan, A., Pelleri, M.C., Antonaros, F., Strippoli, P., Caracausi, M., Vitale, L., 2019. On the length, weight and GC content of the human genome. *BMC Res. Notes* 12, 106.  
<https://doi.org/10.1186/s13104-019-4137-z>
- Rainer, T.H., 2001. Plasma DNA, prediction and post-traumatic complications. *Clin. Chim. Acta* 313, 81–85.
- Rainer, T.H., Wong, L.K., Lam, W., Yuen, E., Lam, N.Y., Metreweli, C., Lo, Y.D., 2003. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin. Chem.* 49, 562–569.
- Rapp, D., Scharhag, J., Wagenpfeil, S., Scholl, J., 2018. Reference values for peak oxygen uptake: cross-sectional analysis of cycle ergometry-based cardiopulmonary exercise tests of 10 090 adult German volunteers from the Prevention First Registry. *BMJ Open* 8, e018697.  
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-018697>
- Research, C. for D.E. and, 2020. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry [WWW Document]. US Food Drug Adm. URL <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> (accessed 1.27.22).
- Rhodes, A., Wort, S.J., Thomas, H., Collinson, P., Bennett, E.D., 2006. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit. Care* 10, R60.
- Richter, C., Park, J.-W., Ames, B.N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 6465–6467.
- Riebe, D., Ehrman, J.K., Liguori, G., Magal, M., Medicine, A.C. of S., 2018. ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. Wolters Kluwer.
- Rock, K.L., Kono, H., 2008. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 3, 99–126.

- Rönblom, L., Pascual, V., 2008. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus* 17, 394–399.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., Haslett, C., 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 965–975.
- Savill, J., Fadok, V., 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784–788.
- Schütz, E., Urnovitz, H.B., Iakoubov, L., Schulz-Schaeffer, W., Wemheuer, W., Brenig, B., 2005. Bov-tA short interspersed nucleotide element sequences in circulating nucleic acids from sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy (BSE) and sera of cattle exposed to BSE. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 814–820.
- Sharif, K., Watad, A., Bragazzi, N.L., Lichtbroun, M., Amital, H., Shoenfeld, Y., 2018. Physical activity and autoimmune diseases: Get moving and manage the disease. *Autoimmun. Rev.* 17, 53–72.
- Shimony, A., Zahger, D., Gilutz, H., Goldstein, H., Orlov, G., Merkin, M., Shalev, A., Ilia, R., Douvdevani, A., 2010. Cell free DNA detected by a novel method in acute ST-elevation myocardial infarction patients. *Acute Card. Care* 12, 109–111.
- Snyder, M.W., Kircher, M., Hill, A.J., Daza, R.M., Shendure, J., 2016. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell* 164, 57–68.
- Snyder, T.M., Khush, K.K., Valantine, H.A., Quake, S.R., 2011. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 6229–6234.
- Sorber, L., Zwaenepoel, K., Deschoolmeester, V., Roeyen, G., Lardon, F., Rolfo, C., Pauwels, P., 2017. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma. *J. Mol. Diagn.* 19, 162–168.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.09.009>
- Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C., Maurice, P.A., 1987. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 23, 707–712.
- Such, U., Meyer, T., 2010. Die maximale Herzfrequenz. *Dtsch. Z. Für Sportmed.* 61, 310–311.
- Tan, E.M., Schur, P.H., Carr, R.I., Kunkel, H.G., 1966. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.*

45, 1732–1740.

Tench, C., Bentley, D., Vleck, V., McCurdie, I., White, P., D’Cruz, D., 2002. Aerobic fitness, fatigue, and physical disability in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 29, 474–481.

Teruel, M., Alarcón-Riquelme, M.E., 2016. The genetic basis of systemic lupus erythematosus: what are the risk factors and what have we learned. *J. Autoimmun.* 74, 161–175.

Thierry, A.R., El Messaoudi, S., Gahan, P.B., Anker, P., Stroun, M., 2016. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 35, 347–376.

<https://doi.org/10.1007/s10555-016-9629-x>

Tsokos, G.C., 2011. Systemic Lupus Erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 12.

Tug, S., Helmig, S., Menke, J., Zahn, D., Kubiak, T., Schwarting, A., Simon, P., 2014. Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients. *Cell. Immunol.* 292, 32–39.

<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.08.002>

Tug, S., Mehdorn, M., Helmig, S., Breitbach, S., Ehlert, T., Simon, P., 2017a. Exploring the Potential of Cell-Free-DNA Measurements After an Exhaustive Cycle-Ergometer Test as a Marker for Performance-Related Parameters. *Int. J. Sports Physiol. Perform.* 12, 597–604.

<https://doi.org/10.1123/ijsp.2016-0157>

Tug, S., Tross, A.-K., Hegen, P., Neuberger, E.W.I., Helmig, S., Schöllhorn, W., Simon, P., 2017b. Acute effects of strength exercises and effects of regular strength training on cell free DNA concentrations in blood plasma. *PloS One* 12, e0184668.

van Loon, B., Markkanen, E., Hübscher, U., 2010. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair* 9, 604–616.

Vizza, E., Corrado, G., De Angeli, M., Carosi, M., Mancini, E., Baiocco, E., Chiofalo, B., Patrizi, L., Zampa, A., Piaggio, G., Cicchillitti, L., 2018. Serum DNA integrity index as a potential molecular biomarker in endometrial cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37, 16.

<https://doi.org/10.1186/s13046-018-0688-4>

Volkman, E.R., Grossman, J.M., Sahakian, L.J., Skaggs, B.J., FitzGerald, J., Ragavendra, N., Charles-Schoeman, C., Chen, W., Gorn, A., Karpouzas, G., 2010. Low physical activity is associated with proinflammatory high-density lipoprotein and increased subclinical atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res. Off. J. Am. Coll. Rheumatol.* 62, 258–265.

Wang, B.G., Huang, H.-Y., Chen, Y.-C., Bristow, R.E., Kassauei, K., Cheng, C.-C., Roden, R., Sokoll, L.J., Chan, D.W., Shih, I.-M., 2003. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 63, 3966–3968.

Wasserman, K., Hansen, J.E., Sue, D.Y., Stringer, W.W., Whipp, B.J., 2005. Principles of exercise testing and interpretation: including pathophysiology and clinical applications. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37, 1249.

Wyllie, A.H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555–556.

Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M., Kuroda, Y., 2001. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 28, 313–314.

Yeh, T.-M., Chang, H.-C., Liang, C.-C., Wu, J.-J., Liu, M.-F., 2003. Deoxyribonuclease-inhibitory antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Sci.* 10, 544–551.

Yipp, B.G., Kubes, P., 2013. NETosis: how vital is it? *Blood J. Am. Soc. Hematol.* 122, 2784–2794.

## 9 Anhang

Tabelle 11: Auszug aus den Daten der Studienteilnehmer (Beispiel)  
Es sind nicht alle Werte der sekundären Endpunkte dargestellt.

Timepoint	Subject	Group	Visit	Alter_ET	STEROIDS_mg	VO2peak	BIA_Gewicht	BIA_Muskelmasse_kg	HFmax	sledai	bdi	C3	C4	ANA_num	ds_DNA	cfDNA_90_venous	Kreatinin	CRP
Pre	S01	Aerobic	V1	58,9	0	22,2	66,2	44,6	158	4	37	1,42	0,27	0	88	8,02	0,79	2,1
Pre	S01	Aerobic	V2		5	22,8	64,6	44,3	150	0	40	1,41	0,24	0	88	9,48	0,86	1,2
Pre	S02	Anaerobic	V1	55,0	3	22,4	100,9	58,9	155	2	21	1,16	0,27	80	88	11,02	0,96	0,84
Pre	S02	Anaerobic	V2		3	23	99,3	53,7	144	6	25	1,28	0,28	0	88	13,12	1,03	0,52
Pre	S03	TAU	V1	53,3	0	25,1	57,7	37,5	162	2	26	1,11	0,24	640	514	17,14	0,89	0,2
Pre	S03	TAU	V2		0	21,7	58,6	37,3	160	2	19	1,04	0,21	640	637	23,93	0,87	0,21
Pre	S03_2	Aerobic	V1	53,6	0	21,7	58,6	37,3	160	2	19	1,04	0,21	640	637	23,93	0,87	0,21
Pre	S03_2	Aerobic	V2		0	23,7	58,9	39,2	160	2	19	1,2	0,24	640	653	20,28	0,9	0,21

Tabelle 12: PRE-cfDNA des L1PA2\_90bp-Assays venös bei Eingangs- und Ausgangstest

Timepoint	Subject	Group	cfDNA 90bp ven	ET	AT
Pre	S01	Aerobic	V1	8,02	9,48
Pre	S02	Anaerobic	V1	11,02	13,12
Pre	S03	TAU	V1	17,14	23,93
Pre	S03_2	Aerobic	V1	23,93	20,28
Pre	S05	Anaerobic	V1	21,57	39,03
Pre	S06	TAU	V1	13,06	13,87
Pre	S06_2	Anaerobic	V1	13,87	13,04
Pre	S07	Aerobic	V1	12,99	13,89
Pre	S10	Aerobic	V1	21,38	18,23
Pre	S11	Anaerobic	V1	17,05	21,65
Pre	S12	TAU	V1	7,58	7,17
Pre	S12_2	Aerobic	V1	7,17	7,21
Pre	S13	Aerobic	V1	14,88	15,23
Pre	S14	Anaerobic	V1	21,50	20,83
Pre	S15	TAU	V1	5,24	5,55
Pre	S15_2	Anaerobic	V1	5,55	4,43
Pre	S17	Anaerobic	V1	8,91	13,07
Pre	S18	TAU	V1	15,38	12,33
Pre	S18_2	Anaerobic	V1	12,33	11,77
Pre	S19	Aerobic	V1	9,65	8,51
Pre	S20	Anaerobic	V1	37,91	15,41
Pre	S21	TAU	V1	67,88	25,82
Pre	S21_2	Anaerobic	V1	25,82	27,76
Pre	S22	Aerobic	V1	10,61	10,97
Pre	S23	Anaerobic	V1	12,25	15,06
Pre	S24	TAU	V1	12,47	13,23
Pre	S25	Aerobic	V1	20,20	17,79
Pre	S26	Anaerobic	V1	8,83	9,76
Pre	S28	Aerobic	V1	11,25	11,08
Pre	S30	TAU	V1	11,38	11,39
Pre	S31	Anaerobic	V1	11,79	6,28
Pre	S33	Aerobic	V1	7,52	12,06

Tabelle 13: Varianzanalyse – Berechnung mittels dem Tukey post-hoc Test berechnet mittels R (v3.6.3)

	Test	Group	Timepoint	response	SE	df	lower.CL	upper.CL
posthoc_tukey_emmeans								
AEROB ET	Eingangstest	Aerobic_Training	PRE	13,30	2,04	40,46	8,16	21,67
	Eingangstest	Aerobic_Training	POST	31,26	4,80	40,46	19,19	50,92
	Eingangstest	Aerobic_Training	+90 min	13,88	2,13	40,46	8,52	22,62
AEROB AT	Ausgangstest	Aerobic_Training	PRE	13,57	2,16	46,11	8,21	22,44
	Ausgangstest	Aerobic_Training	POST	34,22	5,46	46,11	20,70	56,58
	Ausgangstest	Aerobic_Training	+90 min	11,94	1,90	46,11	7,22	19,74
ANAEROB ET	Eingangstest	Anaerobic_Training	PRE	14,96	2,54	40,46	8,72	25,66
	Eingangstest	Anaerobic_Training	POST	31,50	5,35	40,46	18,37	54,04
	Eingangstest	Anaerobic_Training	+90 min	14,85	2,52	40,46	8,66	25,48
ANAEROB AT	Ausgangstest	Anaerobic_Training	PRE	15,39	2,61	40,46	8,97	26,39
	Ausgangstest	Anaerobic_Training	POST	28,40	4,82	40,46	16,56	48,71
	Ausgangstest	Anaerobic_Training	+90 min	13,21	2,24	40,46	7,70	22,67
TAU ET	Eingangstest	TAU	PRE	13,80	2,49	40,46	7,79	24,46
	Eingangstest	TAU	POST	25,66	4,62	40,46	14,48	45,47
	Eingangstest	TAU	+90 min	13,65	2,46	40,46	7,70	24,19
TAU AT	Ausgangstest	TAU	PRE	12,60	2,27	40,46	7,11	22,32
	Ausgangstest	TAU	POST	24,11	4,34	40,46	13,60	42,73
	Ausgangstest	TAU	+90 min	13,84	2,49	40,46	7,81	24,53

Tabelle 14: Varianzanalyse – Berechnung mittels dem Tukey post-hoc Test, Vergleich von Eingangs- und Ausgangstest berechnet mittels R (v3.6.3)

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
posthoc_tukey_contrasts						
	Eingangstest Aerobic_Training POST - Eingangstest Aerobic_Training PRE	0,37	0,05	119,01	7,59	1,1912E-09
	(Eingangstest Aerobic_Training +90 min) - Eingangstest Aerobic_Training POST	-0,35	0,05	119,01	-7,21	8,5463E-09
	Ausgangstest Aerobic_Training POST - Ausgangstest Aerobic_Training PRE	0,40	0,05	119,01	7,43	2,7317E-09
	(Ausgangstest Aerobic_Training +90 min) - Ausgangstest Aerobic_Training POST	-0,46	0,05	119,01	-8,46	1,2345E-11
	Eingangstest Anaerobic_Training POST - Eingangstest Anaerobic_Training PRE	0,32	0,05	119,01	5,98	3,4959E-06
	(Eingangstest Anaerobic_Training +90 min) - Eingangstest Anaerobic_Training POST	-0,33	0,05	119,01	-6,04	2,6602E-06
	Ausgangstest Anaerobic_Training POST - Ausgangstest Anaerobic_Training PRE	0,27	0,05	119,01	4,92	0,00037885
	(Ausgangstest Anaerobic_Training +90 min) - Ausgangstest Anaerobic_Training POST	-0,33	0,05	119,01	-6,15	1,6139E-06
	Eingangstest TAU POST - Eingangstest TAU PRE	0,27	0,06	119,01	4,70	0,00095307
	(Eingangstest TAU +90 min) - Eingangstest TAU POST	-0,27	0,06	119,01	-4,78	0,000683
	Ausgangstest TAU POST - Ausgangstest TAU PRE	0,28	0,06	119,01	4,92	0,00038725
	(Ausgangstest TAU +90 min) - Ausgangstest TAU POST	-0,24	0,06	119,01	-4,20	0,0061413
Vergleich ET zu AT						
AEROB	Ausgangstest Aerobic_Training PRE - Eingangstest Aerobic_Training PRE	0,01	0,05	119,80	0,17	1
	Ausgangstest Aerobic_Training POST - Eingangstest Aerobic_Training POST	0,04	0,05	119,80	0,75	0,99999876
	(Ausgangstest Aerobic_Training +90 min) - (Eingangstest Aerobic_Training +90 min)	-0,07	0,05	119,80	-1,25	0,99860284
ANAEROB	Ausgangstest Anaerobic_Training PRE - Eingangstest Anaerobic_Training PRE	0,01	0,05	119,01	0,23	1
	Ausgangstest Anaerobic_Training POST - Eingangstest Anaerobic_Training POST	-0,05	0,05	119,01	-0,83	0,99999429
	(Ausgangstest Anaerobic_Training +90 min) - (Eingangstest Anaerobic_Training +90 min)	-0,05	0,05	119,01	-0,94	0,99996822
TAU	Ausgangstest TAU PRE - Eingangstest TAU PRE	-0,04	0,06	119,01	-0,69	0,99999965
	Ausgangstest TAU POST - Eingangstest TAU POST	-0,03	0,06	119,01	-0,47	1
	(Ausgangstest TAU +90 min) - (Eingangstest TAU +90 min)	0,01	0,06	119,01	0,10	1

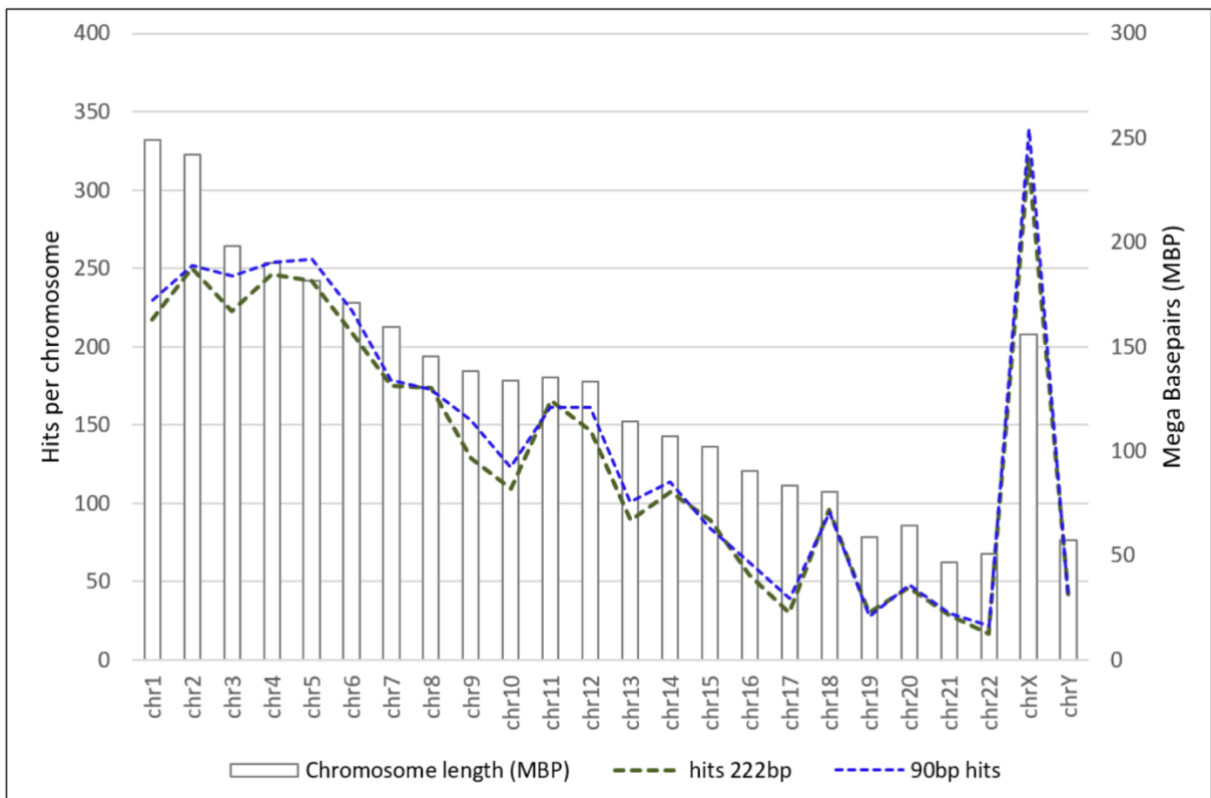


Abbildung 21: Verteilung der Treffer pro Chromosom im menschlichen Genom (GRCh38/hg38)  
 Die Abbildung wurde mit Microsoft Office Excel 2016 erstellt (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA). (Neuberger et al., 2021)

*Tabelle 15 Vorausgesagte Targets aus der UCSC In-Silico PCR (Länge und Anzahl) für das L1PA2\_fw und L1PA2\_222bp\_rv Primerpaar in GRCh38/hg38. Die maximale Produktgröße (maximale Größe der amplifizierten Region) wurde auf 660 bp festgelegt, was der vorhergesagten maximalen Amplifikationsrate der Polymerase während der 10 sec Amplifikation entspricht. Min Perfect Match (Anzahl der Basen, die genau mit am 3'-Ende der Primer enden) wurde auf 19 bp festgelegt. (Neuberger et al., 2021)*

<b>L1PA2_90bp</b>		<b>L1PA2_222bp</b>	
Sequence length	Hits in the Genome	Sequence length	Hits in the Genome
90bp	3338	222bp	2985
89bp	28	221bp	117
91bp	14	223bp	35
92bp	7	220bp	20
88bp	5	219bp	10
87bp	4	224bp	10
68bp	2	226bp	5
79bp	2	228bp	4
321bp	2	212bp	4
96bp	2	227bp	4
330bp	1	218bp	3
422bp	1	213bp	2
94bp	1	210bp	2
278bp	1	200bp	2
186bp	1	217bp	2
76bp	1	209bp	2
97bp	1	204bp	2
260bp	1	240bp	2
86bp	1	230bp	2
81bp	1	216bp	2
95bp	1	232bp	2
<b>Total</b>	<b>3416</b>	197bp	1
		235bp	1
		236bp	1
		225bp	1
		410bp	1
		229bp	1
		215bp	1
		408bp	1
		205bp	1
		392bp	1
		233bp	1
		214bp	1
		242bp	1
		238bp	1
		190bp	1
		211bp	1
		558bp	1
		208bp	1
		203bp	1
		256bp	1
		<b>Total</b>	<b>3237</b>

Tabelle 16 Ergebnisse der Post-hoc-Vergleiche zwischen kapillären und venösen Proben, bezogen auf die Anpassung des linearen gemischten Modells durch REML ['lmer-Mod'] (Neuberger et al., 2021)

Formula: log10(cfDNA\_ng\_ml) ~ Timepoint \* Sample\_type + (1 | Subject)

Timepoint	Sample_type	response	SE	df	lower.CL	upper.CL
+90 min	capillary	13.6	1.49	44.9	10.0	18.4
POST	capillary	24.8	2.69	43.0	18.3	33.4
PRE	capillary	11.1	1.20	43.0	8.2	14.9
+90 min	venous	14.1	1.53	42.1	10.5	19.0
POST	venous	29.6	3.20	42.1	22.0	39.9
PRE	venous	13.9	1.51	42.1	10.4	18.8

Degrees-of-freedom method: kenward-roger

Confidence level used: 0.95

Conf-level adjustment: sidak method for 6 estimates

Intervals are back-transformed from the log10 scale

\$contrasts

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
(+90 min capillary) - POST capillary	-0.26040	0.0345	130	-7.544	<.0001
(+90 min capillary) - PRE capillary	0.08916	0.0345	130	2.583	0.1089
(+90 min capillary) - (+90 min venous)	-0.01662	0.0342	130	-0.487	0.9966
(+90 min capillary) - POST venous	-0.33834	0.0342	130	-9.906	<.0001
(+90 min capillary) - PRE venous	-0.01128	0.0342	130	-0.330	0.9995
POST capillary - PRE capillary	0.34956	0.0337	130	10.367	<.0001
POST capillary - (+90 min venous)	0.24378	0.0334	130	7.308	<.0001
POST capillary - POST venous	-0.07794	0.0334	130	-2.337	0.1871
POST capillary - PRE venous	0.24912	0.0334	130	7.468	<.0001
PRE capillary - (+90 min venous)	-0.10578	0.0334	130	-3.171	0.0228
PRE capillary - POST venous	-0.42750	0.0334	130	-12.816	<.0001
PRE capillary - PRE venous	-0.10044	0.0334	130	-3.011	0.0362
(+90 min venous) - POST venous	-0.32172	0.0330	130	-9.750	<.0001
(+90 min venous) - PRE venous	0.00534	0.0330	130	0.162	1.0000
POST venous - PRE venous	0.32706	0.0330	130	9.912	<.0001

Note: contrasts are still on the log10 scale

Degrees-of-freedom method: kenward-roger

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 6 estimates

Tabelle 17 Ergebnisse der Post-hoc-Vergleiche zwischen Kapillärproben zu allen Zeitpunkten, bezogen auf die Anpassung des linearen gemischten Modells durch REML ['lmer-Mod'] (Neuberger et al., 2021)

Formula: log10(cfDNA\_ng\_ml) ~ Timepoint + (1 | Subject)

Timepoint	response	SE	df	lower.CL	upper.CL
+15 min	24.7	2.87	45.8	17.83	34.2
+30 min	22.5	2.63	46.9	16.18	31.2
+60 min	15.1	1.76	46.8	10.86	20.9
+90 min	13.6	1.61	49.1	9.76	18.9
POST	24.8	2.90	46.8	17.87	34.4
PRE	11.1	1.30	46.8	8.00	15.4
RQ	16.5	1.92	45.8	11.92	22.9

Degrees-of-freedom method: kenward-roger

Confidence level used: 0.95

Conf-level adjustment: sidak method for 7 estimates

Intervals are back-transformed from the log10 scale

\$contrasts

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
(+15 min) - (+30 min)	0.04137	0.0382	155	1.082	0.9325
(+15 min) - (+60 min)	0.21461	0.0382	155	5.616	<.0001
(+15 min) - (+90 min)	0.25918	0.0391	155	6.627	<.0001
(+15 min) - POST	-0.00167	0.0382	155	-0.044	1.0000
(+15 min) - PRE	0.34729	0.0382	155	9.088	<.0001
(+15 min) - RQ	0.17489	0.0378	155	4.626	0.0002
(+30 min) - (+60 min)	0.17325	0.0386	155	4.485	0.0003
(+30 min) - (+90 min)	0.21781	0.0394	155	5.530	<.0001
(+30 min) - POST	-0.04303	0.0386	155	-1.114	0.9230
(+30 min) - PRE	0.30593	0.0386	155	7.920	<.0001
(+30 min) - RQ	0.13352	0.0382	155	3.493	0.0109
(+60 min) - (+90 min)	0.04456	0.0395	155	1.128	0.9187
(+60 min) - POST	-0.21628	0.0386	155	-5.601	<.0001
(+60 min) - PRE	0.13268	0.0386	155	3.436	0.0131
(+60 min) - RQ	-0.03972	0.0382	155	-1.040	0.9440
(+90 min) - POST	-0.26084	0.0395	155	-6.601	<.0001
(+90 min) - PRE	0.08812	0.0395	155	2.230	0.2858
(+90 min) - RQ	-0.08429	0.0391	155	-2.155	0.3263
POST - PRE	0.34896	0.0386	155	9.036	<.0001
POST - RQ	0.17655	0.0382	155	4.620	0.0002
PRE - RQ	-0.17240	0.0382	155	-4.512	0.0003

Note: contrasts are still on the log10 scale

Degrees-of-freedom method: kenward-roger

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 7 estimates

## **10 Tabellarischer Lebenslauf**

Katrin Kluge

Geboren am 15.12.1995 in Otterndorf, Niedersachsen

### Schulbildung

08.2002–07.2006	Grundschule Otterndorf
08.2006–07.2011	Gymnasium Otterndorf
08.2011–06.2012	Bellbrook High School, Ohio, USA
09.2012–07.2015	BBS Cuxhaven – Gymnasium Gesundheit & Pflege
	Abitur / Allgemeine Hochschulreife 01.07.2015

### Akademischer Werdegang

10.2015–05.2022	Studium der Humanmedizin an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
06.09.2017	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.05.2021	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05.05.2022	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Berufstätigkeit

Seit 01.09.2022	Assistenzärztin der Orthopädie und Unfallchirurgie im St. Josefs-Hospital Wiesbaden
-----------------	--