

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Genexpressionsanalyse von zwei Humanstudien mittels RT-qPCR in Bezug auf SARS-CoV-2 und Vitamin D

verfasst von | submitted by

Maria Weber BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien | Vienna, 2025

Studienkennzahl lt. Studienblatt | Degree
programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von | Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner

Mitbetreut von | Co-Supervisor:

Dr. Agnes Draxler BSc. MSc.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen herzlichen Dank aussprechen, die mich bei der Erstellung dieser Masterarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Co-Betreuerin, Agnes Draxler, PhD, sowie meinem Betreuer, Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner, für ihre Geduld und wertvollen Anregungen. Ihre fachliche Expertise und vorbildliches Engagement haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso gilt mein Dank allen Freund*innen und Kolleg*innen, die im praktischen Teil dieser Arbeit mit mir zusammengearbeitet und mich durch hilfreiche Gespräche und tolle Teamarbeit unterstützt haben.

Schließlich möchte ich auch meinen Freund*innen außerhalb der Universität danken, allen voran Christian Brandstätter, der mir bei der Rettung verlorener Daten und sonstigen IT-Problemen zur Seite stand, sowie meiner Familie für ihre emotionale Unterstützung und Motivation.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1. Einleitung	1
2. Theoretischer Hintergrund.....	2
2.1 Die Polymerase Kettenreaktion	2
2.2 Reverse Transkription	7
2.3 Primerdesign.....	9
2.3.1 Hybridisierungs- und Schmelztemperatur	9
2.3.2 Primer- und Amplikonlänge	10
2.3.3 Nukleotidsequenz.....	10
2.3.4 Vermeidung unspezifischer Nebenprodukte	11
2.3.5 Primerpositionierung.....	12
2.3.6 Methoden und Kennzahlen der experimentellen Validierung von Primern	13
2.3.6.1 Experimentelle Evaluierung der Spezifität	13
2.3.6.2 Optimierung der Konzentration	14
2.3.6.3 Anpassung der Hybridisierungstemperatur	15
2.3.6.4 Experimentelle Evaluierung der Effizienz.....	15
2.4 Ziel- und Referenzgene.....	17
2.4.1 Referenzgene.....	17
2.4.2 Zielgene der „NutriAging D“-Studie.....	18
2.4.3 Zielgene des ABCD-Projekts	20
3. Material und Methoden.....	25
3.1 „NutriAging D“-Studie	25
3.1.1 Studiendesign.....	25
3.1.2 Proband*innen.....	26
3.1.3 Interventionen.....	28
3.2 ABCD-Projekt.....	29
3.2.1 Studiendesign.....	29
3.2.2 Proband*innen.....	30
3.3 Materialien	31
3.3.1 Reverse Transkription	31
3.3.2 Gel-Elektrophorese.....	32
3.3.3 qPCR	32
3.4 Methoden.....	32
3.4.1 Primerdesign	32

3.4.1.1 Auswahl der Zielgensequenzen	32
3.4.1.2 Erstellung und in silico Validierung.....	33
3.4.1.3 Experimentelle Evaluierung der Spezifität und Effizienz	34
3.4.2 Auswahl der Referenzgene	35
3.4.3 Reverse Transkription	35
3.4.4 qPCR	36
3.4.5 Auswertung und statistische Analyse	38
4. Ergebnisse	39
4.1 „NutriAging D“-Studie	39
4.1.1 Verteilung der Proband*innen.....	39
4.1.2 Verlauf der Vitamin-D-Serumkonzentration	39
4.1.3 Effekte der Interventionen auf die Genexpression	40
4.1.3.1 Δ Ct-Werte – Vergleiche zwischen den Untersuchungszeitpunkten	40
4.1.3.2 log2FD – Vergleiche zwischen den Interventionsphasen	42
4.2 ABCD-Projekt.....	44
4.2.1 Verteilung der Proband*innen.....	44
4.2.2 Genexpressionsunterschiede	44
4.2.3 Korrelationen	47
5. Diskussion	49
5.1 „NutriAging D“-Studie	49
5.1.1 Vitamin D und Muskel.....	49
5.1.2 SOD1	50
5.1.3 Nrf2	51
5.1.4 IGF-1R	51
5.1.5 FOXO1	52
5.1.6 CYP27A1	52
5.1.7 MAPRE2	52
5.2 ABCD-Projekt.....	53
5.2.1 Chemokine	53
5.2.2 NF- κ B1 und IKK- γ	54
5.2.3 Nrf2	54
5.3 Limitationen.....	55
6. Schlussfolgerung	56
6.1 „NutriAging D“-Studie	56
6.2 ABCD-Projekt.....	56
7. Zusammenfassung	58
8. Summary	59
Literaturverzeichnis.....	60

Anhänge	73
Primerliste	73
Genexpressionsunterschiede der „NutriAging D“-Studie in den Interventionsgruppen als FD	74
Genexpressionsunterschiede Vitamin D vs. Kontrolle als Δ Ct-Werte nach Geschlecht	75
Genexpressionsunterschiede Vitamin D vs. Kontrolle als log2FD nach Geschlecht	76
Genexpressionsunterschiede des ABCD-Projekts als Δ Ct-Werte	77
Genexpressionsunterschiede des ABCD-Projekts als log2FD	79

Abkürzungsverzeichnis

ABCD	Analysis Blood COVID DNA
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
ACTB	β -Aktin
ANOVA	Varianzanalyse
ASC	Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a C-terminal Caspase-Recruitment Domain
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
CARD	Caspase Rekrutierungsdomäne
CCL2	C-C Motif Chemokin Ligand 2
CCR2	C-C Motif Chemokin Rezeptor 2
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COVID-19	Corona Virus Erkrankung 2019
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
Ct	Threshold Cycle/Schwellenwert-Zyklus
CXCL10	C-X-C Motif Chemokin Ligand 10
CYP	Cytochrom P450
CYP27A1	Cytochrome P450 Family 27 Subfamily A Member 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Fluoreszenz
FD	Fold-Difference
FOXO1	Forkhead Box O1
FOXO3	Forkhead Box O3
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
IGF-1R	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor
IκB	Inhibitor von nuklärer Faktor kappa B
IKK	Inhibitor von nuklärer Faktor kappa B Kinase
IKK-γ / IKBKG	Inhibitor von nuklärer Faktor kappa B Kinase regulatorische Untereinheit gamma
IL6	Interleukin 6
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase
IU	internationale Einheit
K	Kontrollgruppe

KEAP1	Kelch-like Erythroid cell-derived protein with Cap and collar Homology (ECH) Associated Protein 1
KI	Konfidenzintervall
log2FD	logarithmierte Fold-Differenz
MAP	mitogen-aktiviertes Protein
MAPRE2	Microtubule-Associated Protein RP/EB Family Member 2
mg	Milligramm
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
mL	Milliliter
mM	millimolar (mmol/L)
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEMO	NF- κ B essenzieller Modulator
NF-κB1	Nukleärer Faktor 'kappa-Leichtketten-Transkriptionsverstärker' aktivierter B-Lymphozyten 1
ng	Nanogramm
nM	nanomolar (nmol/L)
nm	Nanometer
n. p.	nicht parametrisch
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2
NRTC	no-reverse transcriptase control
NTC	no-template control
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion/Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
RCT	randomisierte kontrollierte Studie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PYD	Pyrin-Domäne
R²	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPS9	ribosomales Protein S9
RT	Reverse Transkription
SARS-CoV-2	schweres akutes Atemwegssyndrom-Corona Virus-Typ 2
SD	Standardabweichung

SOD1	Superoxiddismutase 1
T	Temperatur
T1	Termin 1
T2	Termin 2
T3	Termin 3
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat- Ethylendiamintetraessigsäure
TNF-α	Tumornekrose Faktor-Alpha
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
Vit	Vitamin
vs	versus
WHO	World Health Organization
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar (μmol/L)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsweise von TaqMan® Sonden. A: Unterdrückung der Fluoreszenz durch geringe Distanz des Fluorophors zum Quencher. B: Abtrennung des Fluorophors durch DNA-Polymerase und detektierbare Fluoreszenz. (QIAGEN, 2010).....	4
Abbildung 2: Funktionsweise des SYBR® Green Farbstoffs (QIAGEN, 2010)	4
Abbildung 3: Exponentielle Amplifikation der DNA mittels PCR (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013).....	5
Abbildung 4: Amplifikationskurven von Probe (rot) und Kontrolle ohne Probe (NTC) (blau) mit Basislinie (gepunktet) und Schwellenwert (strichliert) (modifiziert nach Nassiri et al., 2018)	6
Abbildung 5: Vier Reaktionsphasen der Amplifikationskurve (Page & Stromberg, 2011)....	7
Abbildung 6: Vergleich von ein- und zweistufiger RT-qPCR (QIAGEN). A: Reverse Transkription und PCR erfolgen nacheinander im selben Reaktionsgefäß mit gemeinsamem Master Mix. B: Zweistufiger Aufbau mit getrennten Reagenzien und Gefäßen für cDNA-Synthese und PCR. (QIAGEN, 2010)	8
Abbildung 7: Hybridisierung von Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit komplementären Sequenzen in Minus- und Plus-DNA-Strang, respektive (eigene Darstellung)	9
Abbildung 8: Arten von Primerdimeren (angepasst von Mészáros, 2022)	11
Abbildung 9: A: Amplifikation einer Haarnadelschleife. B: Amplifikation eines Heterodimers an beiden 3'-Enden (modifiziert nach Mészáros, 2022).....	12
Abbildung 10: Effekte der Primerpositionierung auf Produkte aus gDNA und mRNA in RT-PCR. A: Primer überspannt Exon-Exon-Grenze. B: Primer liegen auf dem gleichen Exon. C: Primer liegen auf unterschiedlichen Exons (modifiziert nach Rodríguez et al., 2015) ..	13
Abbildung 11: Gelelektrophorese. Links: mit Primerdimeren. Mitte: spezifisches Produkt. Rechts: DNA-Leiter (eigene Darstellung)	14
Abbildung 12: Schmelzkuvenanalyse. A: ein Peak, spezifische Amplifikation. B: Peak 3: geplantes Produkt, Peak 1: breiter, kleiner Peak bei tiefer Temperatur (Primerdimere), Peak 2: zusätzliche Amplifikation, Peak 4: Amplifikation im oberen Bereich (unspezifische Amplifikation) (eigene Darstellung)	14
Abbildung 13: Standardkurve des Gens ribosomales Protein S9 mit fünf Standards einer zehnfachen seriellen Verdünnung in jeweils dreifacher Reaktionsausführung (eigene Darstellung)	16
Abbildung 14: Interaktionen zwischen Nrf2 und NF-κB mit Einfluss von beziehungsweise Auswirkungen auf oxidativen Stress (modifiziert nach Muchtaridi et al., 2022).....	23
Abbildung 15: Studiendesign der „NutriAging D“-Studie (Aschauer et al., 2022)	26
Abbildung 16: Anzahl der Proband*innen und Ausstiege im Studienablauf der „NutriAging D“-Studie (Aschauer et al., 2022).....	28

Abbildung 17: Ablauf der Primererstellung und -validierung (modifiziert nach Rodríguez et al., 2015)	33
Abbildung 18: Temperaturprogramm der qPCR (eigene Darstellung)	37
Abbildung 19: log2FD in der gesamten Stichprobe mit 95% KI als Balken	41
Abbildung 20: log2FD von CYP27A1 und MAPRE2: Vitamin-D-Supplementierung vs. Kontrollgruppe mit 95 % KI als Balken	42
Abbildung 21: Verteilung der Δ Ct-Werte von CCL2 COVID vs. Kontrollgruppe nach Geschlecht und Alter mit Median und Quartilen als Balken dargestellt.....	45
Abbildung 22: Mittlere Genexpressionsunterschiede als log2FD mit 95 % KI als Balken dargestellt.....	46
Abbildung 23: Genexpressions-unterschiede von Nrf2 als log2FD nach Alter und Geschlecht mit 95 % KI als Balken dargestellt.....	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht und Vergleich der Dosierungen zwischen Interventionsgruppen.....	25
Tabelle 2: Herstellung 2X RT Master Mix.....	36
Tabelle 3: Temperaturprogramm der reversen Transkription	36
Tabelle 4: Herstellung qPCR Master Mix	37
Tabelle 5: Charakteristika der ausgewählten Proband*innen der „NutriAging“ D-Studie zum Zeitpunkt T1.....	39
Tabelle 6: Verlauf Vitamin-D-Konzentration nach Gruppe. 1: Kontrolle, 2: Vitamin D täglich, 3: Vitamin D monatlich (T1: Baseline; T2: nach Vitamin-D-Supplementation; T3: nach Vitamin-D-Supplementation und Krafttraining)	40
Tabelle 7: Genexpressionsunterschiede als ΔCt -Werte in den Interventionsgruppen. 1: Kontrolle, 2: Vitamin D täglich, 3: Vitamin D monatlich (T1: Baseline; T2: nach Vitamin-D-Supplementation; T3: nach Vitamin-D-Supplementation und Krafttraining).....	40
Tabelle 8: Genexpressionsunterschiede als $\log_2\text{FD}$ in den Interventionsgruppen. 1: Kontrolle, 2: Vitamin D täglich, 3: Vitamin D monatlich (T2: Unterschied zwischen Expression nach Supplementation zu Baseline, T3: Unterschied zwischen Expression nach Supplementation und Training zu Baseline).....	43
Tabelle 9: Charakteristika der Proband*innen des ABCD-Projekts	44
Tabelle 10: Verteilung der Proband*innen des ABCD-Projekts in Alters- und Geschlechtsgruppen.....	44
Tabelle 11: Genexpressionsunterschiede als $\log_2\text{FD}$	45
Tabelle 12: Genexpressionsunterschiede als $\log_2\text{FD}$ nach Geschlecht	46
Tabelle 13: Genexpressionsunterschiede als $\log_2\text{FD}$ nach Altersgruppen.....	47
Tabelle 14: Korrelationen ($ p > 0,500$ und $p < 0,010$) zwischen Genexpressionen als $\log_2\text{FD}$ in der gesamten Stichprobe	48

1. Einleitung

Die Idee, DNA-Polymerasen und passende Primersequenzen zur wiederholten Replikation bestimmter DNA-Abschnitte zu verwenden, wurde im Jahr 1971 erstmals beschrieben (Kleppe et al., 1971)¹. Nach der Einführung einer thermostabilen DNA-Polymerase konzipierte die Arbeitsgruppe um Randall K. Saiki und Kary B. Mullis die Technik unter dem heute bekannten Namen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und publizierte 1985 und 1986 erste experimentelle Daten (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986), wofür Mullis 1993 mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet wurde (Nobel Prize Outreach AB, 1993).

Die Methode der Datenerfassung am Endpunkt der PCR wird derzeit unter anderem zur Sequenzierung spezifischer DNA eingesetzt (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014).

Russel Higuchi et al. entwickelten eine Möglichkeit, zur Detektion und Quantifizierung der akkumulierenden Amplifikate über den Verlauf der PCR hinweg durch Verwendung des Farbstoffs Ethidiumbromid, dessen Fluoreszenz sich direkt proportional zur Menge doppelsträngiger DNA verhält (Higuchi et al., 1992), sowie einer Videokamera (Higuchi et al., 1993). Diese Echtzeit-Analyse der Amplifikationsreaktionen wird als Real-Time PCR oder quantitative PCR (qPCR) bezeichnet.

Heutzutage gilt qPCR aufgrund der hohen Sensitivität, guten Reproduzierbarkeit, breitem Quantifizierungsbereich, vergleichsweise niedrigen Kosten und schnellen Durchlaufzeit als „Goldstandard“ der quantitativen Analyse von RNA, mikro-RNA und DNA (D’haene et al., 2010; Pfaffl, 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode angewandt, um Expressionsunterschiede ausgewählter Gene einerseits in 20 selbstständig lebenden Personen mit insuffizientem Vitamin-D-Spiegel zwischen 65 und 81 Jahren zu bestimmen, welche über vier Wochen 400 mg Calcium sowie entweder Placebo, 800 internationale Einheiten (IU) Vitamin D3 täglich oder 50.000 IU Vitamin D3 monatlich einnahmen und im Anschluss zusätzlich zu ihrer jeweiligen Supplementation 10 Wochen Krafttraining absolvierten. Ziel dieser Untersuchung war es, potenzielle Effekte von Vitamin D und Krafttraining auf die Genexpression festzustellen und diese zwischen den Interventionsphasen sowie -gruppen zu quantifizieren. Zusätzlich wurden Expressionslevels von 45 COVID-19-Patient*innen mit 45 geschlechts- und altersentsprechenden gesunden Kontrollen verglichen, um eventuell durch SARS-CoV-2-induzierte Differenzen zu quantifizieren und mögliche Korrelationen zwischen Genen zu bestimmen.

¹Hinweis zur Zitierweise: Quellenangaben erfolgen entweder direkt im Fließtext oder am Satzende. Um den Lesefluss zu verbessern, wird bei mehreren aufeinanderfolgenden Sätzen aus derselben Quelle diese nur am Ende des jeweiligen Absatzes – nach dem letzten Satzzeichen – angegeben.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Die Polymerase Kettenreaktion

Das Prinzip der PCR hat seinen Ursprung im Prozess der DNA-Replikation in vivo (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2024).

Neben der DNA-Vorlage werden für die stattfindenden Reaktionen eine als „Master Mix“ bezeichnete Mischung aus DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und gepufferter Magnesiumlösung sowie spezifische kurze Nukleotidketten, welche als Primer bezeichnet werden, benötigt. Primer markieren als komplementäre Sequenzen die Anfänge des zu replizierenden Abschnitts auf beiden DNA-Strängen und dienen als Ausgangspunkte der Polymerisation. (Biassoni & Raso, 2020)

Der Ablauf einer PCR besteht aus einem sich wiederholenden dreistufigen Prozess, welcher bei Verwendung sogenannter hot-start DNA-Polymerase mit einer Aktivierungsphase in Form einer zweiminütigen Inkubation bei 95°C initiiert wird. Der Hot-start-Mechanismus involviert Modifikationen des Enzyms durch Bindung an chemische Gruppen oder Blockierung des aktiven Zentrums mit Hilfe von Antikörpern, Oligonukleotiden (Aptameren) oder in alpha-Helices angeordneten Peptiden (Affibodies), womit DNA-Polymerase-Aktivität bei niedrigen Temperaturen verhindert wird. (Thermo Fisher Scientific Inc., o.J. a)

Dadurch werden unspezifische Amplifikationen vor dem Beginn der PCR resultierend aus Primerbindung an Sequenzen mit geringer Homologie oder Primerdimerbildung inhibiert (QIAGEN, 2010).

Die drei Phasen eines PCR-Zyklus sind wie folgt:

1. Denaturierung

Mittels Erhitzung auf etwa 95 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinbasen der doppelsträngigen DNA gespalten, wodurch die komplementären Einzelstränge der DNA für die Primer-Hybridisierung zugänglich gemacht werden. Außerdem werden sekundäre Strukturen einzelsträngiger DNA gelockert. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014)

Enzymatische Reaktionen, wie auch die Elongation des vorherigen Zyklus, sistieren in diesem Schritt aufgrund der hohen Temperatur (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013).

Als sogenannte Schmelztemperatur wird jene Temperatur bezeichnet, bei der die Hälfte der DNA-Doppelstränge dissoziiert beziehungsweise ohne helikale Struktur vorliegen. Die Schmelztemperatur wird von Faktoren wie der Länge des DNA-Strangs sowie dessen Gehalt an Guanin und Cytosin beeinflusst. (Nolan et al., 2006)

2. Hybridisierung

In der zweiten Phase erfolgt die Anlagerung der Primer an die Zielsequenzen in der DNA. Durch die Temperaturabsenkung rehybridisiert die DNA zurück in doppelsträngige Form und Bindungen zwischen Primern und ihrer jeweiligen komplementären Einzelstrang-DNA bilden sich aus, da die kurzen Primer bereits bei höheren Temperaturen hybridisieren als die längeren PCR-Produkte. Ist die entstandene doppelsträngige Struktur stabil genug, kann sich die DNA-Polymerase anheften. Die ideale Temperatur für diesen Schritt ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und liegt üblicherweise zwischen 55 und 65 °C. (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013)

Bei der sogenannten Hybridisierungs- oder Annealing-Temperatur ist per Definition die maximale Bindung der Primer an ihre Zielsequenzen gegeben. Diese kann jedoch je nach verwendetem Puffer leicht variieren. (Bustin & Huggett, 2017)

3. Elongation

Im finalen Abschnitt des Zyklus erfolgt die Extension der Primer am freien 3'-Ende in 5' zu 3' Richtung unter Verwendung der freien dNTPs aus dem Master Mix (Nolan et al., 2013).

Magnesiumionen dienen der DNA-Polymerase als Cofaktor (Swords, 2020).

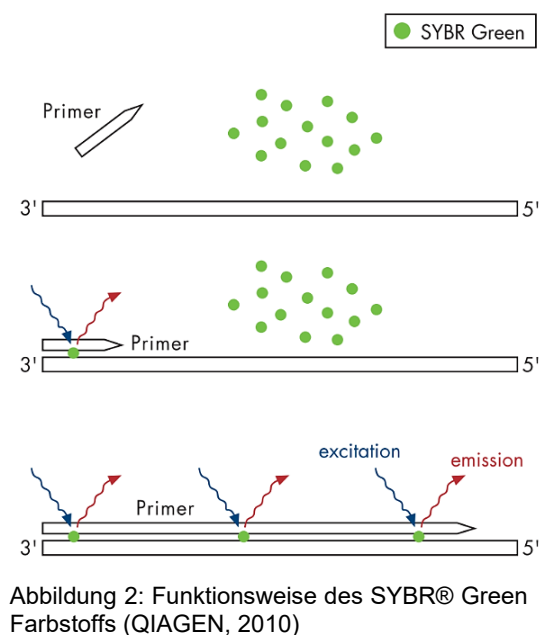
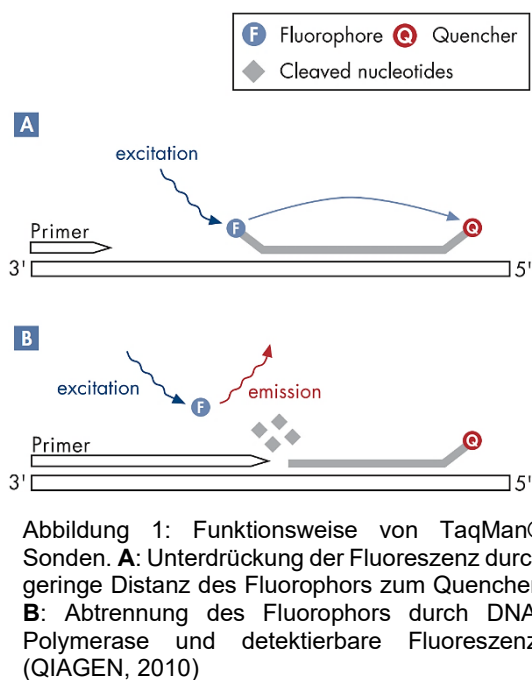
Bei Temperaturen von 70-72 °C ist die Aktivität der DNA-Polymerase optimal, was in einer Amplifikationsrate von bis zu 100 Basen pro Sekunde resultiert (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014).

Da die Länge der Zielsequenz (des sogenannten Amplikons) in der qPCR meist eher kurzgehalten wird, ist es nicht erforderlich, die ideale Polymerisierungsrate zu erreichen. Daher besteht die Möglichkeit, durch Kombination des Hybridisierungs- und Elongationsschritts bei etwa 60 °C die Laufzeit der PCR zu verkürzen. (Keer, 2008)

Die Fluoreszenzdetektion der Produkte findet in der Real-Time PCR in jeder Elongationsphase statt (QIAGEN, 2010). Als Färbemethoden werden an PCR-Primer oder Sonden gebundene Farbstoffmoleküle wie beispielsweise TaqMan® Sonden (siehe Abbildung 1) oder an doppelsträngige DNA bindende Farbstoffe wie SYBR® Green I (siehe Abbildung 2) verwendet (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014). Die beiden genannten Färbeararten zählen zu den am häufigsten verwendeten (Thornton & Basu, 2011).

TaqMan® Sonden sind Sequenz-spezifische, inmitten des Amplikons bindende Oligonukleotide mit einer Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende sowie einem Fluoreszenz-unterbindenden Quencher-Molekül am 3'-Ende (Thornton & Basu, 2011).

Primer und Sonde hybridisieren mit der Ziel-DNA und in der Elongationsphase wird mittels DNA-Polymerase mit 5' zu 3' Exonukleaseaktivität das Fluorophor von der Sonde abgespalten, welches durch die Freisetzung vom Quencher in direkt proportionaler Intensität zur Anzahl der PCR-Produkte fluoresziert (Dominy et al., 2020).



SYBR® Green I Farbstoff hat bei 497 nm sein Anregungsmaximum. Die Fluoreszenzemission im an doppelsträngige DNA gebundenen Zustand liegt um 520 nm. (Molecular Probes Inc., 2006)

Die durch Wechselwirkungen mit der kleinen DNA-Furche sowie Interkalation zwischen Basenpaare und elektrostatische Stabilisierung des Farbstoff-DNA-Komplexes entstehende Bindung von SYBR® Green I an doppelsträngige DNA steigert die Fluoreszenz von SYBR® Green I um mehr als das 1000-fache gegenüber seiner freien Form. Zusätzlich erhöhen viskose Lösungsmittel wie Glycerin im Vergleich zu Wasser Fluoreszenz und Lebensdauer des angeregten Zustands von SYBR® Green I etwa um das 200-fache. (Dragan et al., 2012) Nachteile dieser unspezifischen Färbemethode im Gegensatz zu fluorogenen Sonden sind einerseits die Detektion jeglicher doppelsträngigen DNA inklusive eventuell auftretender unerwünschter Nebenprodukte und andererseits, dass längere Amplikate zu höherer Signalbildung führen können, da die Bindung mehrere Farbstoffmoleküle an eine Zielsequenz möglich ist. (Thermo Fisher Scientific Inc., o.J. b)

Daher ist es für eine relative Genexpressionsanalyse mit mehreren Zielgenen empfehlenswert, die Länge der Produkte möglichst ähnlich zu halten (Singh & Pandey, 2015). Zusätzlich weisen Guanin- und Cytosin-reiche Amplikons aufgrund der höheren Affinität des Farbstoffs zu Adenin- und Thymin-reichen DNA-Sequenzen eine geringere Fluoreszenz auf (Bustin & Huggett, 2017).

Nach Abschluss jedes PCR-Zyklus hat, wie Abbildung 3 verdeutlicht, unter Annahme von 100-prozentiger Reaktionseffizienz, eine exakte Verdopplung der Zielsequenz aus der jeweiligen Input-DNA stattgefunden.

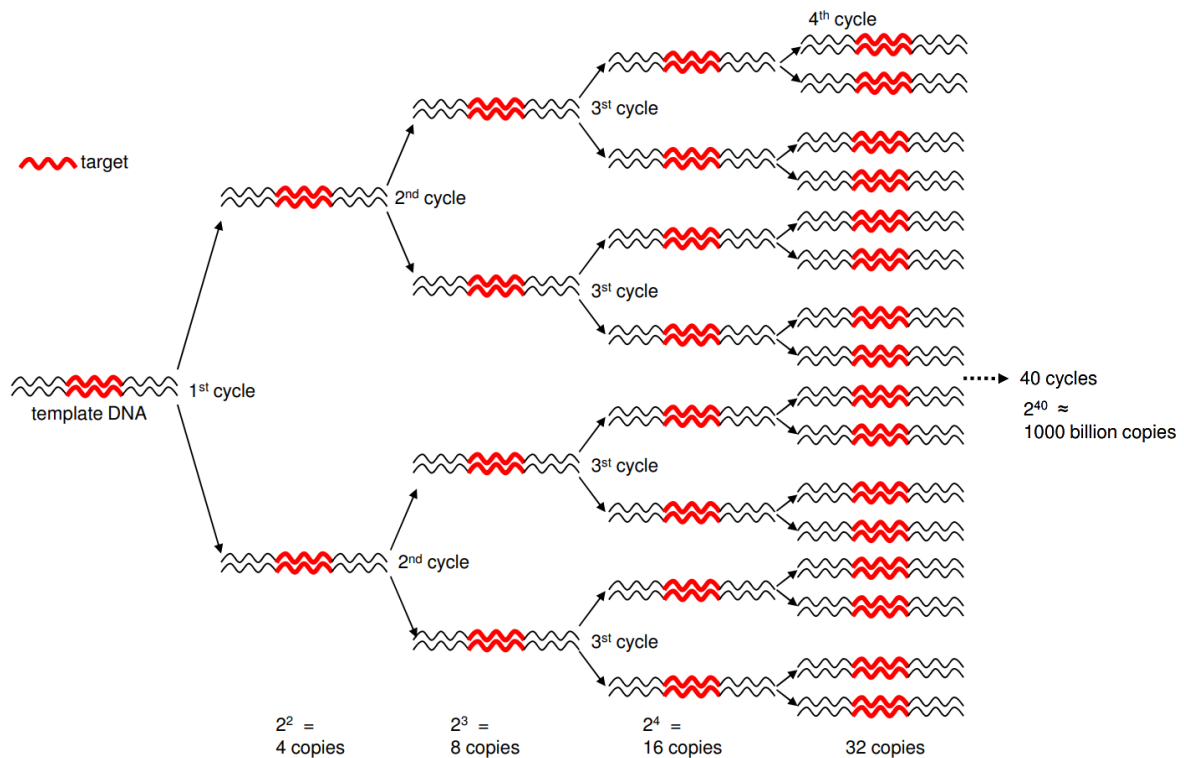


Abbildung 3: Exponentielle Amplifikation der DNA mittels PCR (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013)

Die Amplifikate des ersten Zyklus variieren noch in deren Länge, da die Elongation über die komplementäre Bindungsstelle des zweiten Primers hinaus verlaufen kann. Ab dem zweiten Durchlauf werden Produkte mit definierter Basenanzahl repliziert, welche dann die dominanten Endprodukte der Reaktion bilden (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013).

Das Stadium der exponentiellen Vervielfältigung ist jedoch beschränkt, da die Kettenreaktion beispielsweise aufgrund von Erschöpfung der Reaktanten limitiert ist (Raso & Biassoni, 2014). Ebenso führen die im Lauf der PCR zunehmenden Denaturierungsphasen zu reduzierter Enzymaktivität der DNA-Polymerase, weshalb bei Absolvierung von mehr als 40 Zyklen die Ausbeute nur noch kaum gesteigert werden kann (Bailey, 2008).

In der Real-Time PCR resultiert die lineare Darstellung der Fluoreszenzmessung über die Zyklen hinweg in einer sigmoidalen Amplifikationskurve, welche durch die zuvor erläuterten Faktoren, wie in Abbildung 5 illustriert, in vier Reaktionsphasen eingeteilt werden kann (D'haene et al., 2010).

1. Startphase/Basislinie

In der ersten Phase am Beginn der PCR befindet sich das Signal der Produkte aus der Amplifikation noch unterhalb der Nachweisgrenze beziehungsweise unter der Hintergrund-Fluoreszenz, welche beispielsweise durch Plastikmaterialien, Fluoreszenz von freien

Sonden oder Farbstoffen beziehungsweise Signalverschleppung aus benachbarten Reaktionen auf der Platte verursacht werden kann (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013). Die Amplifikationskurve verläuft daher in den ersten Zyklen flach, obwohl bereits eine exponentielle Vervielfältigung stattfindet (Biassoni & Raso, 2020).

Das Hintergrundsignal aller Reaktionen wird verwendet, um die Basislinie der Fluoreszenz festzulegen (Bustin & Nolan, 2004). Ein hohes Maß an Hintergrundfluoreszenz bedeutet daher reduzierte Sensitivität (Nolan et al., 2006).

2. Exponentielle Phase

Die exponentielle Amplifikation der DNA wird durch die vorteilhafte Reaktionskinetik in dieser Phase fortgesetzt, wodurch das Fluoreszenzsignal schließlich die Basislinie überschreitet (Raso & Biassoni, 2014).

Jener Signalpegel, welcher einen statistisch signifikanten Anstieg über die Basislinie repräsentiert, wird als Schwellenwert definiert (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014). Dieser sollte sich, wie in Abbildung 4 gezeigt, am Beginn der exponentiellen Phase befinden (Vautrot & Behm-Ansmant, 2020).

Der Zyklus, in dem die gemessene Fluoreszenz den gewählten Schwellenwert oder seltener die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wird als Ct (Schwellenwert-Zyklus) bezeichnet (Nolan et al., 2006).

Der Ct-Wert stellt einen charakteristischen Punkt auf der Amplifikationskurve dar, welcher mit der initialen Menge an DNA in der Probe korreliert (Bustin & Nolan, 2004). Größere Mengen an Input-DNA führen zu niedrigeren Ct-Werten (D'haene et al., 2010). Deshalb wird der Ct-Wert üblicherweise als Grundlage für qPCR-Berechnungen herangezogen. (Bustin & Nolan, 2004)

3. Lineare Phase

Amplifikationsgeschwindigkeit und Effizienz der Reaktion nehmen in der linearen Phase langsam ab, es findet keine exakte Verdopplung der Produkte pro Zyklus mehr statt (Nassiri et al., 2018).

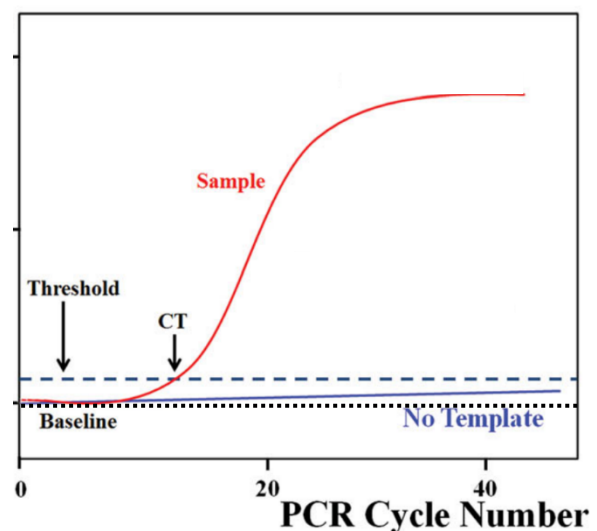


Abbildung 4: Amplifikationskurven von Probe (rot) und Kontrolle ohne Probe (NTC) (blau) mit Basislinie (gepunktet) und Schwellenwert (strichiert) (modifiziert nach Nassiri et al., 2018)

4. Plateau-Phase

In der Plateau-Phase erreicht die Reaktion schließlich ihr Minimum. Eine weitere Erhöhung der Zyklusanzahl erzeugt kaum neue Produkte und kann sogar deren Degradation begünstigen. (Raso & Biassoni, 2014)

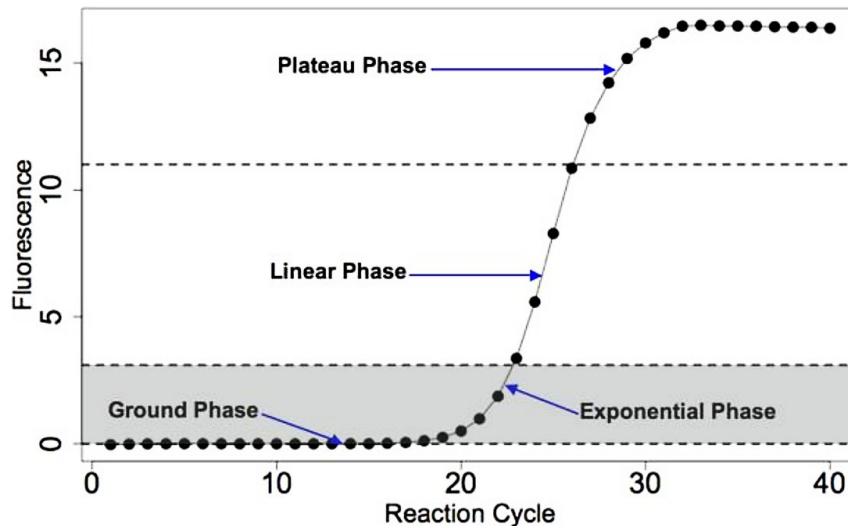


Abbildung 5: Vier Reaktionsphasen der Amplifikationskurve (Page & Stromberg, 2011)

2.2 Reverse Transkription

Reverse Transkription (RT) beschreibt die Konvertierung von RNA zu einzelsträngiger cDNA, entgegen der konventionellen Transkriptionsrichtung in Zellen von DNA zu RNA (Nolan et al., 2013).

Dieser Prozess wird mit Hilfe von dNTPs und des Enzyms Reverse Transkriptase, einer unter anderem in Retroviren vorkommenden und namensgebenden RNA-abhängigen DNA-Polymerase, ausgeführt (Morier, 2024).

RNA-Expressionsniveaus sind bedeutende Indikatoren des physiologischen Zell-beziehungsweise Gewebeszustands (Kirchner et al., 2014), da sich viele zelluläre Prozesse in Bezug auf Wachstum, Differenzierung und Überleben in veränderten Genexpressionsmustern zeigen (Bustin, 2000).

Durch Quantifizierung der Genexpression mittels RT-qPCR können medizinische Diagnosen gestellt sowie individuelle Reaktionen auf Medikamente, Behandlungen oder veränderte Lebensbedingungen erfasst werden (Stählberg et al., 2004).

Da RNA nicht als Matrize für eine PCR fungieren kann, geht in der RT-qPCR die cDNA-Synthese der qPCR immer voraus (Bustin, 2000). Wie in Abbildung 6 dargestellt, besteht die Möglichkeit beide Schritte gemeinsam in einem Reaktionsgefäß – mit reduzierter Arbeitszeit und Kontaminationswahrscheinlichkeit – oder separat voneinander durchzuführen, wodurch die Option zur Langzeitlagerung der cDNA, Durchführung multipler PCR-Läufe und Amplifikation unterschiedlicher Zielsequenzen ermöglicht wird (QIAGEN, 2010).

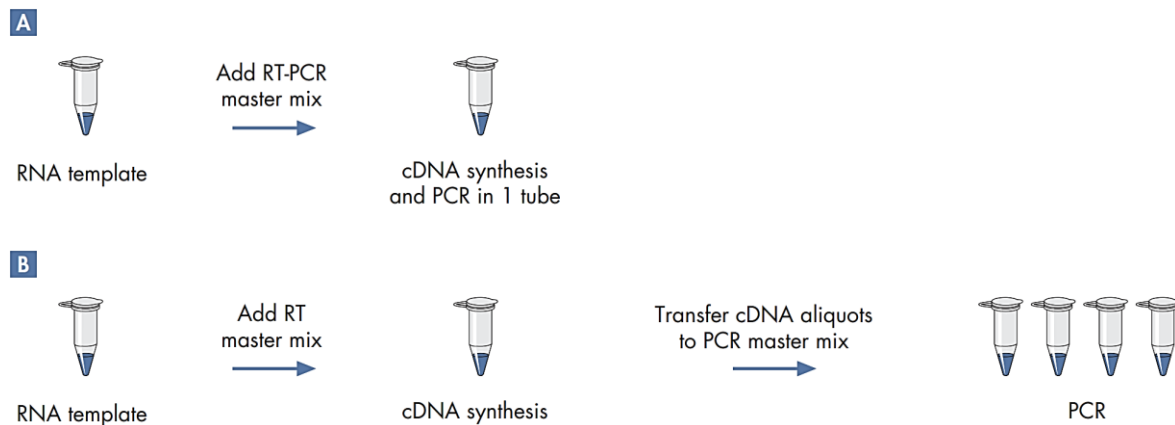


Abbildung 6: Vergleich von ein- und zweistufiger RT-qPCR (QIAGEN). **A:** Reverse Transkription und PCR erfolgen nacheinander im selben Reaktionsgefäß mit gemeinsamem Master Mix. **B:** Zweistufiger Aufbau mit getrennten Reagenzien und Gefäßen für cDNA-Synthese und PCR. (QIAGEN, 2010)

Wie auch in der qPCR sind Primer als Markierungen beziehungsweise Startsequenzen für die Reverse Transkriptase erforderlich. Für die zweistufige Version der RT-qPCR stehen hierfür drei Methoden oder eine Mischung dieser zur Auswahl:

- **unsystematische („random“) Primer**, welche meist aus Hexa- oder Nonameren bestehen, die an mehreren Stellen entlang jeder RNA-Matrize (inklusive ribosomaler RNA, Transfer-RNA und small nuclear RNA) hybridisieren und somit cDNA-Fragmente unterschiedlicher Länge produzieren (Nolan et al., 2013).
- **oligo-dT Primer**, bei welchen es sich um üblicherweise aus 15 Einheiten Thymin aufgebaute, einzelsträngige Oligonukleotide handelt, die mit dem in den meisten messenger RNAs (mRNA) vorhandenen Poly-A-Schwanz hybridisieren (Nolan et al., 2013). Mit dieser Methode können, bei entsprechend hoher Qualität und geringer sekundärer Struktur der Input-RNA, komplette RNA-Stränge in cDNA umgewandelt werden (Bustin et al., 2005).
- **Gen-spezifische Primer** erlauben gezielte und spezifische reverse Transkription einer Zielsequenz, mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für Primerdimerbildung, da die Primer über den gesamten Prozess der RT-qPCR hinweg präsent sind (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014). Außerdem wird bei dieser Methode für jede Ziel-RNA eine eigene Primerreaktion benötigt, welche nur unter sorgfältiger Optimierung der Reaktionsbedingungen im selben Reaktionsgefäß als sogenannte Multiplexamplifikation durchgeführt werden können (Bustin et al., 2005).

Für einstufige RT-qPCR ist lediglich die letztgenannte Methode möglich, da die beiden anderen Verfahren im einstufigen Prozess neben dem Zielprodukt unspezifische Amplifikate generieren würden (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014).

Im zweistufigen Verfahren sind für den qPCR-Schritt eigens designte Primer für jedes Ziel- sowie Referenzgen erforderlich.

2.3 Primerdesign

Der erste Schritt zur erfolgreichen Durchführung einer qPCR ist die sorgfältige Erstellung und empirische Austestung passender Primer, auch genannt „Primerdesign“ (Bustin et al., 2020).

Pro Zielmatrize werden zwei Oligonukleotid-Einzelstränge als Startsequenzen der Polymerisation eingesetzt (Fernandes & Skiena, 2007).

Wie in Abbildung 7 ersichtlich, ist die Sequenz des Vorwärtsprimers komplementär zum 3'-Ende der Zielsequenz auf dem Minus-DNA-Strang und hybridisiert dort mit dieser (Chuang et al., 2013). Die von DNA-Polymerase katalysierte DNA-Synthese kann somit in 5' zu 3' Richtung durch Bindung der freien terminalen 3'-Hydroxygruppe des Vorwärtsprimers an das α -Phosphat des nächsten, laut DNA-Vorlage des Minus-Strangs folgenden, dNTPs unter Freisetzung von Pyrophosphat ablaufen (Swords, 2020). Umgekehrt bindet der

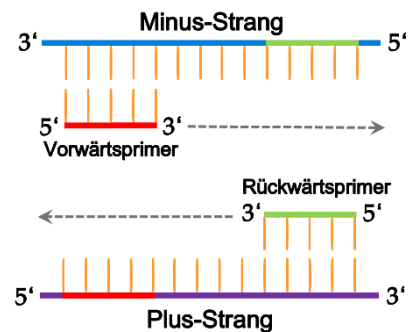


Abbildung 7: Hybridisierung von Vorwärts- und Rückwärtsprimern mit komplementären Sequenzen in Minus- und Plus-DNA-Strang, respektive (eigene Darstellung)

Rückwärtsprimer an das 3'-Ende des Plus-Strangs und bietet somit ebenfalls ein freies 3'-Ende zur Polymerisierung in die entgegengesetzte Richtung (Chuang et al., 2013).

Um passende spezifische Primer zu generieren, sind die folgenden Faktoren zu beachten:

2.3.1 Hybridisierungs- und Schmelztemperatur

Die Hybridisierungstemperatur der Primer liegt üblicherweise zwischen 55 und 65 °C (Nolan et al., 2013), beziehungsweise 5-10 °C unter deren Schmelztemperatur (Bailey, 2008). Die Schmelztemperatur der Primer ist definiert als Dissoziationstemperatur des Primer-Matrizen-Duplex (Dieffenbach et al., 1993) beziehungsweise als jene Temperatur, bei der 50 Prozent der Primer bereits in Einzelstrangform vorliegen (Thornton & Basu, 2011).

Ein höherer Gehalt an Adenin und Thymin erniedrigt die Schmelztemperatur des Primers (Bustin et al., 2020), welche innerhalb eines Primerpaares möglichst ähnlich, also zumindest innerhalb von 5 °C (Elkins, 2015), idealerweise innerhalb von 1 °C (Thornton & Basu, 2011), gewählt werden sollte.

Primerlänge und Schmelztemperatur stehen in einem direkt proportionalen Zusammenhang (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014).

Werden Hybridisierungs- und Elongationsschritt im PCR-Zyklus kombiniert, ist keine Möglichkeit der exakten Anpassung der Hybridisierungstemperatur an die Primer gegeben. Die Hybridisierungstemperatur der Primer sollte dann im oberen Bereich gewählt werden,

um dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase möglichst nahe zu kommen. (Bustin & Huggett, 2017)

2.3.2 Primer- und Amplikonlänge

Um optimale Spezifität und thermische Parameter zu erreichen, sollte die Primerlänge zwischen 18 und 24 Nukleotiden gewählt werden (Dieffenbach et al., 1993). Jedes zusätzliche Nukleotid macht einen Primer viermal spezifischer, jedoch führen zu lange Primersequenzen zu längeren Hybridisierungs- und Dissoziationszeiten und können dadurch die Effizienz der Reaktion reduzieren (Bustin et al., 2020; Thornton & Basu, 2011). Das Amplikon sollte eine Länge von 75-150 Basenpaaren (bp) ohne sekundäre Strukturen aufweisen (Taylor et al., 2010). Zielsequenzen unter 80 bp können bei Verwendung unspezifischer Färbemethoden höhere Ct-Werte sowie Schwierigkeiten in der Unterscheidung von PCR-Produkten und Primerdimeren bereiten (Bustin & Huggett, 2017). Längere Produkte (mehr als 150 bp) können hingegen durch Mehrfachbindung unspezifischer Farbstoffe zu einer unproportionalen Fluoreszenzsteigerung führen (Bertoni et al., 2020). Mit steigender Produktlänge nimmt des Weiteren die Amplifikationseffizienz exponentiell ab, da sich die Wahrscheinlichkeit für sekundäre Strukturen wie Haarnadelschleifen erhöht (Singh et al., 2000). Amplikonlängen von mehr als 1200 bp sind aufgrund von potenziell unvollständiger Dissoziation der DNA während der Denaturierungsphase für qPCR gänzlich ungeeignet (Fernandes & Skiena, 2007).

2.3.3 Nukleotidsequenz

Ein zu hoher Cytosin- und Guaninanteil im Primer kann fehlerhafte Primerhybridisierung aufgrund soliderer Bindung an inkorrekte Zielsequenzen begünstigen (Bustin et al., 2020) sowie durch suboptimale Denaturierung die Amplifikationseffizienz reduzieren (Lim et al., 2011), daher sollte ein Gehalt von 40-60 Prozent angestrebt werden (Elkins, 2015).

Wiederholungen von vier oder mehr gleichen Nukleotiden (zum Beispiel CCCC oder AGAGAGAG) sollten besonders am 3'-Ende des Primers vermieden werden (Singh & Pandey, 2015).

Das 3'-Ende des Primers hat zentrale Bedeutung in der korrekten Hybridisierung des Primers während der PCR. Ein bis drei Guanin- oder Cytosinbasen innerhalb der letzten fünf Nukleotide des 5'-Endes, auch „G/C-Klammer“ genannt, erhöhen durch ihre stärkeren Wasserstoffstoffbrückenbindungen die Bindungseffizienz des Primers. Jedoch kann eine höhere Anzahl den sogenannten „slippage effect“ auslösen (Nolan et al., 2006): Aufgrund von Primerdegeneration oder Matrizen-DNA mit geringer Diversität kann die Bindung besonders in Homopolymerregionen ein oder zwei bp von der Zielregion entfernt stattfinden.

In weiterer Folge kann dies zur Deletion oder seltener Insertion von ein bis zwei Basen führen. (Elbrecht et al., 2018)

Homopolymersequenzen aus Guanin oder Cytosin können zudem auch stabile Tetraplexstrukturen formen, welche nicht mehr von der Polymerase transkribiert werden können (Simonsson et al., 1998).

2.3.4 Vermeidung unspezifischer Nebenprodukte

Unspezifische Amplifikationsprodukte entstehen in der PCR durch unerwartete Hybridisierung des Primers an eine Sequenz mit unvollkommener Kompatibilität.

Die Amplifikation dieser kann bei Verwendung unspezifischer Farbstoffe durch Erhöhung des Fluoreszenzsignals den Ct-Wert der Reaktion künstlich verschieben und die Reaktionseffizienz durch frühzeitige Erschöpfung der Reaktanten beeinflussen. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014)

Sekundäre Strukturen wie Primerdimere und Haarnadelschleifen reduzieren die Fähigkeit und Verfügbarkeit des Primers zur Bindung an der Zielstelle (Singh et al., 2000).

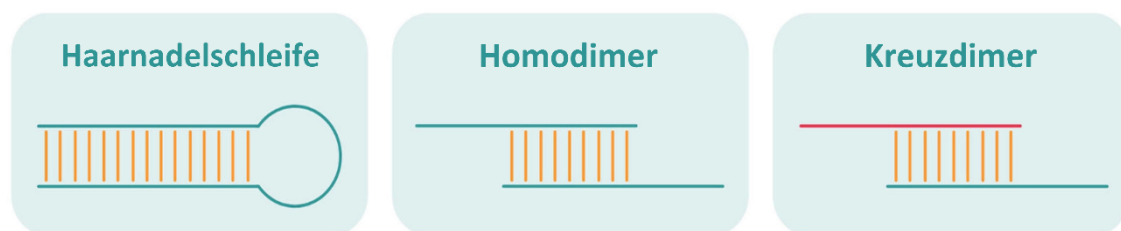


Abbildung 8: Arten von Primerdimeren (angepasst von Mészáros, 2022)

Homodimere entstehen, wie in Abbildung 8 illustriert, bei Bindung von vier oder mehr kompatiblen Nukleotiden von Primern gleicher Art. Hetero- oder Kreuzdimere resultieren aus Dimerisierung mit dem gepaarten Primer oder einem anderen Primer bei Multiplexamplifikation. (Pierce & Wang, 2015)

Bei komplementären Sequenzen innerhalb eines Primers, beispielsweise in Form von umgekehrten Wiederholungen, besteht durch intramolekulare Interaktionen die Möglichkeit der Bildung von Haarnadelschleifen (Singh et al., 2000).

Abbildung 9 erläutert, wie freie 3'-Enden von Primerdimeren und Haarnadelschleifen unter Verwendung des 5'-Endes als Matrice von DNA-Polymerasen elongiert werden können (Marshall, 2007).

Die gebildeten unerwünschten Amplifikate stellen vor allem bei der Verwendung unspezifischer Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR® Green I, welche an jegliche doppelsträngige DNA binden, ein Problem bei der Datenanalyse dar (Wang & Seed, 2003).

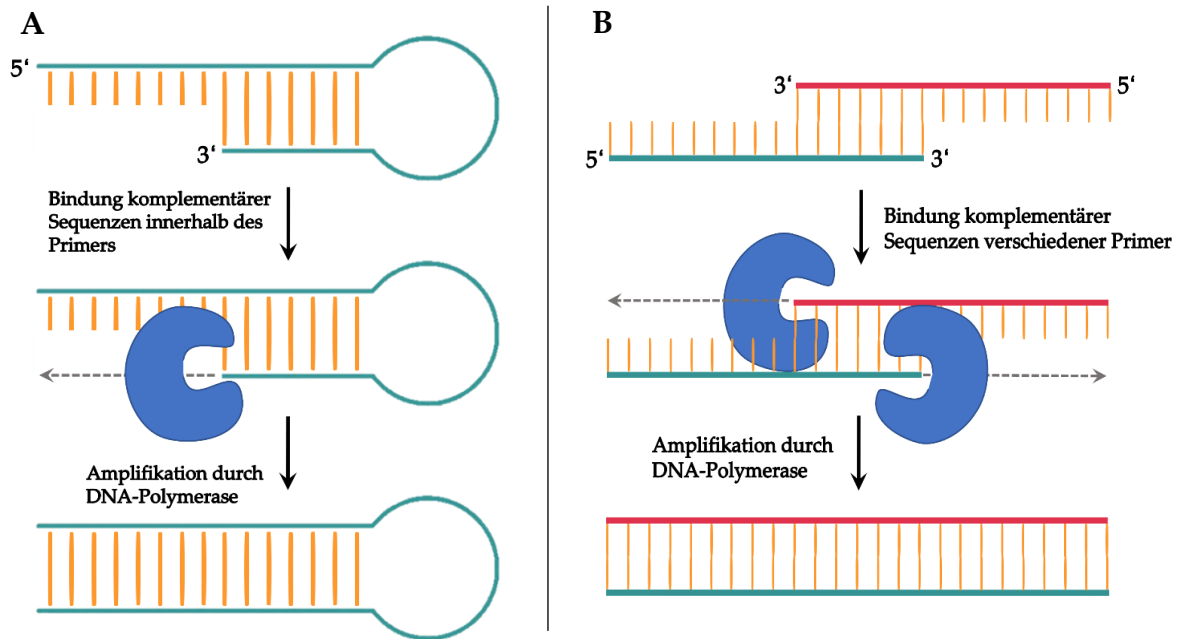


Abbildung 9: **A:** Amplifikation einer Haarnadelschleife. **B:** Amplifikation eines Heterodimers an beiden 3'-Enden (modifiziert nach Mészáros, 2022)

Primerdimere treten vor allem in Kontrollen ohne DNA (sogenannten „no-template controls“ beziehungsweise NTCs) auf, weil das Fehlen der DNA-Matrizen die Interaktionswahrscheinlichkeit der Primer erhöht (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014).

In der Prävention dessen ist die Optimierung der Konzentrationen von Primern sowie Input-DNA ein wichtiger Punkt. Zu hohe Primerkonzentrationen können die Bildung von Primerdimeren oder unspezifischen Produkten begünstigen, bei zu geringen Konzentrationen besteht die Gefahr der vorzeitigen Erschöpfung der Primer. (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013)

2.3.5 Primerpositionierung

In der RT-qPCR kann zusätzliche Amplifikation unterschiedlicher Konzentrationen an genomischer DNA (gDNA) in den Proben ein unerwünschtes und uneinheitliches Hintergrundsignal verursachen (Laurell et al., 2012).

Primer, welche eine Exon-Exon-Schnittstelle überspannen, haben den Vorteil einer cDNA-spezifischen Amplifikation, da in diesem Fall aus gDNA, wie in Abbildung 10 dargestellt, kein Produkt gebildet werden kann (Singh & Pandey, 2015).

Werden Vorwärts- und Rückwärtsprimer auf unterschiedlichen Exons platziert, kann eine Co-Amplifikation von gDNA aufgrund des durch das Intron verlängerten Produkts verhindert werden (Rodríguez et al., 2015).

Befinden sich beide Primer auf demselben Exon, wie beispielsweise bei Zielsequenzen mit nur einem Exon oder im Falle unbekannter Intron-Exon-Grenzen des Gens, ist die Behandlung der RNA mit RNase-freier DNase erforderlich (Bustin, 2000).

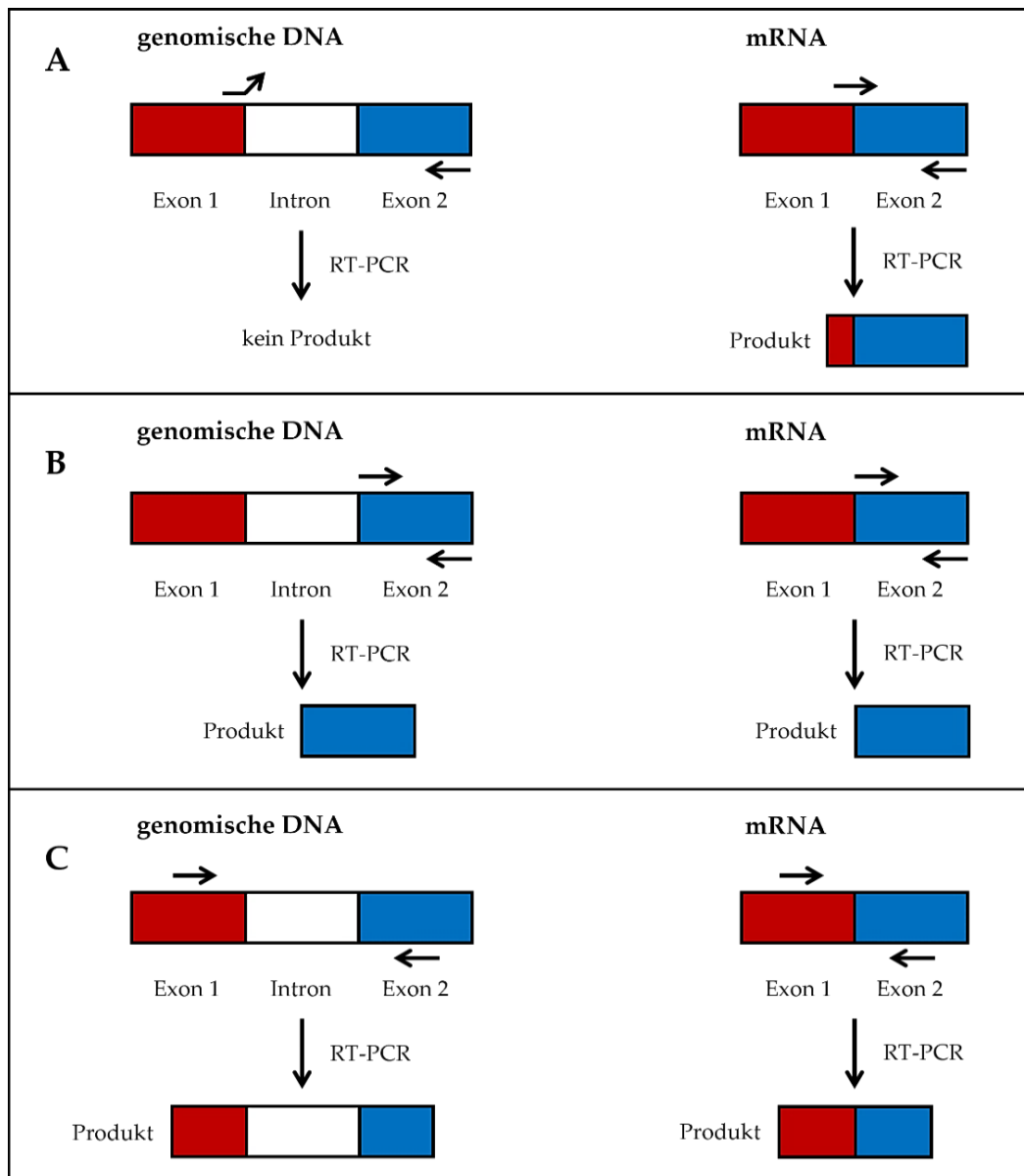


Abbildung 10: Effekte der Primerpositionierung auf Produkte aus gDNA und mRNA in RT-PCR. **A:** Primer überspannt Exon-Exon-Grenze. **B:** Primer liegen auf dem gleichen Exon. **C:** Primer liegen auf unterschiedlichen Exons (modifiziert nach Rodríguez et al., 2015)

2.3.6 Methoden und Kennzahlen der experimentellen Validierung von Primern

2.3.6.1 Experimentelle Evaluierung der Spezifität

Gelelektrophorese und Analyse der Schmelzkurve stellen einfache und zuverlässige Methoden zur qualitativen Evaluierung der Primerspezifität und dem Ausschluss unerwünschter Nebenprodukte der PCR dar (Maza-Márquez et al., 2020).

Die Option einer Schmelzkurvenanalyse besteht bei Einsatz von SYBR® Green Farbstoffen und erfolgt am Ende der qPCR durch graduelle Erhitzung der doppelsträngigen DNA bis zur Denaturierung. Die Dissoziation am spezifischen Schmelzpunkt hat die Freisetzung des Farbstoffs zur Folge, welche einen detektierbaren, steilen Rückgang der Fluoreszenz für jedes amplifizierte Produkt bewirkt. (Mussack et al., 2020)

Die Abszisse im gebildeten Diagramm stellt die Temperatur dar, die Ordinate zeigt die negative Ableitung (Änderungsrate) der Fluoreszenz (F) bezogen auf die Temperatur (T) (Nolan et al., 2013).

Eine ideale, spezifische Amplifikation führt zu einem einzelnen, schmalen Peak (siehe Abbildung 12 A) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014).

Bei unspezifischer Amplifikation zeigt die Schmelzkurve einen weiteren Höhepunkt mit abweichender Schmelztemperatur (Abbildung 12 B) (De Keyser et al., 2020). Dieser kann auf zusätzliche Amplifikation von gDNA hindeuten (QIAGEN, 2010). Ein kleinerer und breiterer Peak im unteren Temperaturbereich spricht für Primerdimerbildung, da die kürzeren Primerdimere bei tieferen Temperaturen denaturieren als die längeren PCR-Amplifikate (Nolan et al., 2006). Eine Schulter im oberen Bereich der Kurve weist auf andere unspezifische Amplifikation hin (QIAGEN, 2010).

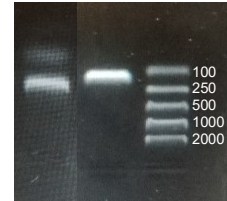


Abbildung 11:
Gelelektrophorese.
Links: mit
Primerdimeren.
Mitte: spezifisches
Produkt. Rechts:
DNA-Leiter (eigene
Darstellung)

Die Höhepunkte in der Schmelzkurve sind analog zu Banden eines Elektrophoresegels zu verstehen (Nolan et al., 2006). Gelanalyse wird aufgrund der geringeren Sensitivität meist nur zur Validierung der Schmelzkurvenanalyse eingesetzt, kann aber die Länge des mit der Schmelzkurve korrespondierenden Produkts überprüfen. Primerdimere werden in der Gelelektrophorese als diffuse Bänder nahe der Unterseite des Gels, wie in Abbildung 11 gezeigt, abgebildet. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014)

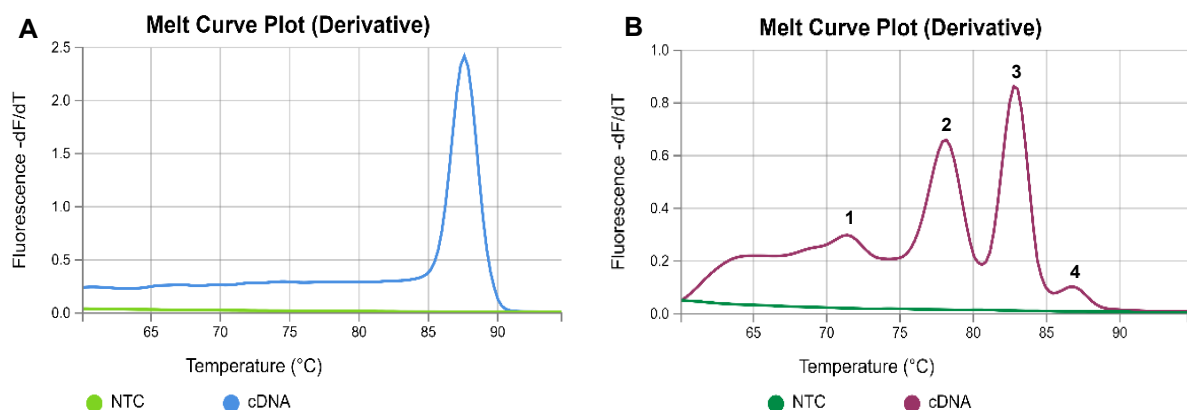


Abbildung 12: Schmelzkurvenanalyse. **A:** ein Peak, spezifische Amplifikation. **B:** Peak 3: geplantes Produkt, Peak 1: breiter, kleiner Peak bei tiefer Temperatur (Primerdimere), Peak 2: zusätzliche Amplifikation, Peak 4: Amplifikation im oberen Bereich (unspezifische Amplifikation) (eigene Darstellung)

2.3.6.2 Optimierung der Konzentration

Die Performance der Primer sollte in einem Bereich von 50-900 nM analysiert und jene Konzentration, die den niedrigsten Ct-Wert ohne Primerdimerbildung erreicht, ausgewählt werden (Keer, 2008). Bei Verwendung von SYBR® Green I werden üblicherweise niedrigere Primerkonzentrationen (100-400 nM) als bei Sonden (300-900 nM) eingesetzt (Bustin &

Huggett, 2017), Primerkonzentrationen von 50 nM und darunter sind aufgrund signifikant geringerer Sensitivität zu vermeiden (Bustin et al., 2020).

2.3.6.3 Anpassung der Hybridisierungstemperatur

Bei zweistufigen PCR-Temperaturprogrammen mit kombiniertem Hybridisierungs- und Elongationsschritt, wird die Temperatur dieser Phase meist bei 60 °C gewählt, wodurch schnellere Durchlaufzeiten erreicht, jedoch keine spezifischen Optimierungen der Hybridisierungstemperatur mehr getroffen werden können (Nolan et al., 2013).

In einem dreistufigen Zyklusablauf können ideale thermische Bedingungen im Hybridisierungsschritt, welche spezifische Produkte sowie niedrige Ct-Werte ohne Amplifikation in der NTC erbringen, mittels Temperaturgradientenfunktion des Thermozyklers ausgetestet werden (Taylor et al., 2010).

Während zu tiefe Hybridisierungstemperaturen die Bildung von unspezifischen Amplifikaten sowie Primerdimeren begünstigen, kann eine zu hohe Temperatur die Effizienz beziehungsweise Ausbeute der PCR reduzieren oder sogar die Primerhybridisierung gänzlich verhindern (Bailey et al., 2008; Nolan et al., 2013).

2.3.6.4 Experimentelle Evaluierung der Effizienz

Die Beurteilung der mittleren Amplifikationseffizienz einer PCR-Analyse erfolgt meist durch Erstellung einer Standardkurve aus zehn- oder fünffachen seriellen DNA-Verdünnungen (Bustin et al., 2020). Dabei sollten mindestens fünf Konzentrationen jeweils in dreifacher Ausführung angesetzt werden (Nolan et al., 2013).

Zur graphischen Darstellung, zu sehen in Abbildung 13, wird der Logarithmus der Konzentrationen an Input-DNA als unabhängige Variable auf der Abszisse gegen die Ct-Werte als abhängige Variable auf der Ordinate aufgezeichnet (Bustin et al., 2009).

Die Effizienz der Reaktion wird nach der Formel „Effizienz = $10^{-1/\text{Steigung}} - 1$ “ aus der Steigung der Regressionsgerade berechnet, welche idealerweise exakt -3,3219 beträgt, was einer Effizienz von 1 beziehungsweise 100 Prozent entspricht (Raymaekers et al., 2009).

Ein optimaler Effizienzwert von 100 Prozent impliziert eine exakte Verdopplung der Zielsequenzen pro PCR-Zyklus innerhalb der exponentiellen Phase (Mallona et al., 2011). Steigungen von -3,58 bis -3,10 respektive Effizienzen zwischen 90 und 110 Prozent gelten als akzeptabel. Verwendung suboptimal konzentrierter Reagenzien sowie unzureichende Enzymqualität können zu Effizienzen unter 90 Prozent führen, wohingegen in den niedrigsten Verdünnungsstufen konzentrierter vorliegende Polymerase-Inhibitoren, wie exzessive Mengen an DNA oder RNA sowie Ethanol aus deren Isolierung, höhere Ct- Werte

und daher geringere Steigungen beziehungsweise Effizienzen über 110 Prozent bewirken können. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014)

Standardkurven bringen zusätzlich zur Leistungsfähigkeit Einblicke in die Nachweis- beziehungsweise Quantifizierungsgrenze, den dynamischen Bereich sowie die optimale Probenkonzentration der PCR (Svec et al., 2015).

Neben Steigung und Effizienz wird das Bestimmtheitsmaß (R^2) berechnet, welches mindestens 0,98 betragen sollte und aussagt, wie gut die experimentellen Daten zur Regressionslinie passen sowie die Linearität der Standardkurve und deren Stabilität in Reproduzierbarkeit der dreifach durchgeführten Reaktionen widerspiegelt (Nolan et al., 2006).

Ebenso interessant ist der Ordinatenabschnitt, auch „Y-intercept“ genannt, welcher als Sensitivitätsmarker oder Detektionslimit gilt, da er den theoretischen Ct-Wert angibt, bei dem eine initiale Input-Menge von einer einzelnen Einheit an Zielsequenz in der PCR einen Signalpegel über dem Schwellenwert auslösen würde (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014). Als dynamischer Bereich der qPCR wird jene Konzentrationsspanne an Ausgangs-DNA bezeichnet, die zu einer proportionalen Erhöhung des Amplifikationsprodukts führt. Der dynamische Bereich in der qPCR für cDNA oder gDNA sollte zumindest drei bis vier Zehnerpotenzen umfassen. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014)

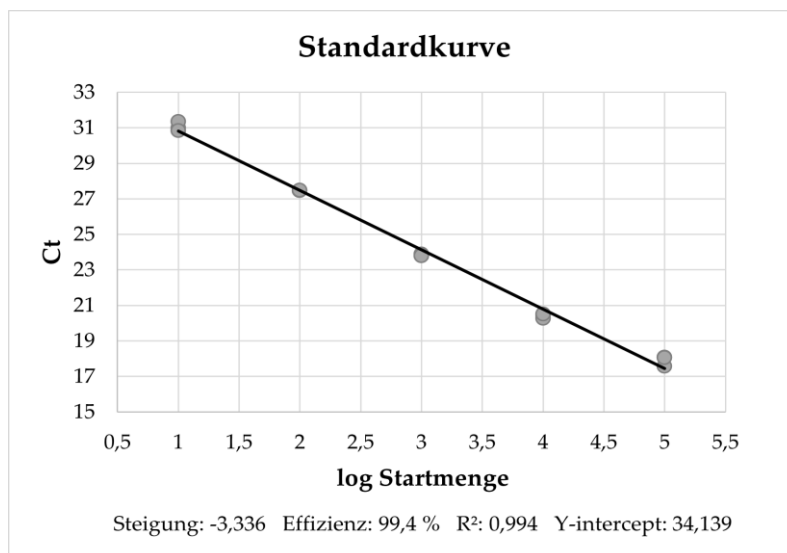


Abbildung 13: Standardkurve des Gens ribosomales Protein S9 mit fünf Standards einer zehnfachen seriellen Verdünnung in jeweils dreifacher Reaktionsausführung (eigene Darstellung)

2.4 Ziel- und Referenzgene

2.4.1 Referenzgene

Referenzgene, welche früher auch als „Haushaltsgene“ bezeichnet wurden, werden zur Normalisierung in Genexpressionsanalysen verwendet (Bustin et al., 2009).

Damit ein Gen als interne Kontrolle eingesetzt werden kann, sollte es ein stabiles Expressionsniveau im untersuchten Gewebe über alle experimentellen Interventionen hinweg bieten (Andersen et al., 2004), eine starke Korrelation zur Gesamtmenge an RNA beziehungsweise DNA aufweisen (Bustin et al., 2009) und auf ähnlichem Niveau mit untersuchten Zielgenen exprimiert werden, also vergleichbare Ct-Werte generieren (Chapman & Waldenström, 2015).

Da mittels Normalisierung in der RT-qPCR Schwankungen in der extrahierten RNA-Menge, der Ausbeute der reversen Transkription sowie der Amplifikationseffizienz kontrolliert und ausgeglichen werden, ist sie ein essenzieller Bestandteil in der qPCR, um Vergleiche zwischen Proben zu ermöglichen (Bustin et al., 2009).

Weitere Strategien zur zusätzlichen Reduktion von Variabilität sind die Sicherstellung gleicher Probenmengen beziehungsweise -volumina bei der Probennahme sowie gleicher Gesamt-RNA-Konzentrationen vor der reversen Transkription, wobei die damit einhergehende Interpretation der RNA-Qualität einen essenziellen Vorgang darstellt (Huggett et al., 2005).

Standardisierung mittels Referenzgenen ist die am häufigsten angewandte Methode (Chapman & Waldenström, 2015).

Die Verwendung von mehr als einem Referenzgen als internen Standard wird empfohlen (Bustin et al., 2009).

NormFinder

Bei NormFinder handelt es sich um einen Algorithmus, welcher aus einer Auswahl von potenziellen Referenzgenen die beste endogene Kontrolle oder die beste Kombination aus diesen auf Basis ihrer Genexpressionsstabilität auswählt.

NormFinder evaluiert die statistische Expressionsvariation zwischen Proben aus den experimentellen Daten einer RT-qPCR oder anderen quantitativen Methoden, berechnet daraus Stabilitätswerte für jedes Referenzgen und ist als Add-In für Microsoft Excel verfügbar. (Andersen et al., 2010)

β-Aktin – ACTB

ACTB gehört zur Gruppe der Aktine, deren sechs hoch konservierte Isoformen essenzielle Strukturproteine des Zytoskeletts darstellen, sowie in der Zellmigration, Zellteilung und

Regulation der Genexpression eine bedeutsame Rolle spielen. Die beiden zytoplasmatischen Isoformen β -Aktin und γ -Aktin werden ubiquitär exprimiert. (Bunnell et al., 2011)

ACBT wird trotz unter bestimmten Bedingungen wie beispielsweise bei der Tumorentwicklung bekannter Variationen in der Genexpression (Gu et al., 2021) seit Jahrzehnten häufig als endogene Kontrolle eingesetzt (Suzuki et al., 2000).

Die Expression von ACTB zeigte sich in viral stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) und T-Zellen jedoch unabhängig von Alter und Intervention stabil (Roy et al., 2020).

Ribosomales Protein S9 – RPS9

RPS9 wurde als relativ neues und bis dato eher selten eingesetztes Referenzgen mit optimaler Stabilität für RT-qPCR aus entzündeten oder gesunden Darmmukosaproben identifiziert (Bamias et al., 2013) und auch als interner Standard zur Analyse transkriptomischer Alters-Biomarker in PBMCs eingesetzt (Vo et al., 2010).

Dieses Referenzgen kodiert für ein ribosomales Protein, welches als Bestandteil der kleineren 40S Untereinheit der Ribosomen im Zytoplasma vorliegt und am Translationsschritt der Proteinbiosynthese beteiligt ist (O'Leary et al., 2016).

2.4.2 Zielgene der „NutriAging D“-Studie

Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a C-terminal Caspase-Recruitment Domain – ASC/PYCARD

ASC ist ein von PYCARD kodiertes Adapterprotein in Inflammasomen, welches über zwei death-fold Domänen verfügt: eine Pyrin-Domäne (PYD) und eine Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD). Wird beispielsweise durch Infektionen, Gewebeschäden oder metabolische Entgleisung die Formation eines Inflammasom-Proteinkomplexes ausgelöst, bringen diese beiden Domänen ein Inflammasom-Sensormolekül und Procaspase 1 in räumliche Nähe. (Latz et al., 2013)

Nach autoproteolytischer Aktivierung von Caspase 1 durch gegenseitige Spaltung zweier Procaspase-1-Monomere innerhalb des Komplexes aktiviert Caspase 1 die Vorstufen von Interleukin 1 β sowie Interleukin 18 und induziert Pyroptose (Broz & Dixit, 2016).

Superoxiddismutase 1 – SOD1

SOD1 ist ein intrazelluläres Enzym, dessen Hauptaufgabe die Regulation von oxidativem Stress darstellt. Mittels des im aktiven Zentrum gebundenen Kupfers katalysiert es als Homodimer den Abbau von Superoxiden, welche natürlicherweise unter anderem im mitochondrialen Stoffwechsel oder bei Redoxreaktionen mit Beteiligung von molekularem

Sauerstoff entstehen. Mithilfe des Kupfers als Reaktionspartner erfolgt zunächst eine Superoxid-Oxidation zu molekularem Sauerstoff und anschließend die Reduktion eines Superoxids in Anwesenheit zweier Protonen zu Wasserstoffperoxid, welches durch Katalase weiter zu Wasser und Sauerstoff metabolisiert werden kann. (Trist et al., 2021)
Es werden jedoch auch mögliche pathologische Rollen von SOD1 bei Alterskrankheiten und Neurodegeneration diskutiert (Papa et al., 2014; Trist et al., 2021).

Cytochrome P450 Family 27 Subfamily A Member 1 – CYP27A1

Enzyme aus der Cytochrom P450 (CYP) Familie haben essenzielle Funktionen im Vitamin-D-Metabolismus (Zhou et al., 2014). Dessen Hauptschritte, 25-Hydroxylierung in der Leber und 1 α -Hydroxylierung in der Niere, werden von CYP-Monooxygenasen katalysiert. CYP27A1 ist nicht nur in der Leber, sondern im gesamten Körper weit verbreitet und als einzige 25-Hydroxylase in Mitochondrien lokalisiert. (Bikle, 2014)

Obwohl CYP2R1 als primärer Katalysator der Reaktion von Cholecalciferol zu 25-Hydroxycholecalciferol wirkt, ist auch CYP27A1 in geringerem Ausmaß daran beteiligt (Tuckey et al., 2019).

Zusätzlich ist CYP27A1 als 27-Hydroxylase in die Synthese von Gallensäuren involviert und spielt somit eine substanzielle Rolle in der Cholesterinhomöostase sowie potenziell in der Prävention von Arteriosklerose (Escher et al., 2003).

Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor – IGF-1R

IGF-1R kodiert für einen Transmembran-Rezeptor, welcher nach Aktivierung durch IGF-1 oder IGF-2 proliferative, transformative und differenzierende Zellprozesse in Gang setzt. IGF-1R gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und ist aus kovalenten Dimeren, welche aus zwei extrazellulären α -Untereinheiten und zwei transmembranen β -Untereinheiten bestehen, aufgebaut. (Sarfstein & Werner, 2015)

Die in den β -Untereinheiten lokalisierte Tyrosinkinase-Domäne wird bei Ligandenbindung an die α -Untereinheiten aktiviert und löst allosterische Umwandlung und darauffolgende Autophosphorylierung des Rezeptors aus (Sepp-Lorenzino, 1998). Infolge der Tyrosin-Phosphorylierung mehrerer Substrate wird über den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Proteinkinase B (PKB)-Weg zelluläre Proliferation stimuliert und durch den Ras-Mitogen-aktiviertes-Protein (MAP)-Kinase-Weg die Proteinbiosynthese aktiviert sowie Apoptose gehemmt (Galvan et al., 2003).

Somit wird IGF-1 unter anderem mit Muskelwachstum, Angiogenese sowie höherer Knochenmasse- und dichte in Verbindung gebracht und erlebt, wie auch sein Rezeptor (Budzinska et al., 2016) einen physiologischen Konzentrationsabfall im Alter (Lippi et al., 2014). IGF-1R kann jedoch auch in der Onkogenese mitwirken (Baserga, 1999).

Forkhead Box O1 – FOXO1 und Forkhead Box O3 – FOXO3

Als FOXO wird die Subklasse „O“ aus der Familie der Forkhead-Transkriptionsfaktoren bezeichnet, denen vier konservierte funktionelle Domänen gemein sind: die namensgebende Forkhead-Domäne, welche an den DNA-Strang bindet, die Kernlokalisierungssignaldomäne, das Kernexportsignal und die Transaktivierungsdomäne (Wang et al., 2014).

Alle FOXOs binden an dieselbe Consensus-Sequenz (5'-TTGTTTAC-3') und können daher redundant wirken. FOXOs werden unter anderem von oxidativem Stress durch Signalübertragung der Jun-N-terminalen Kinase aktiviert und in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren über den zuvor beschriebenen Insulin/IGF-1-Signalweg durch Phosphorylierung mittels PI3K und PKB inhibiert und aus dem Nukleus exkludiert. (Eijkelenboom & Burgering, 2013)

FOXO1 und FOXO3 werden in nahezu allen Gewebearten exprimiert (Wang et al., 2014).

FOXO1 wird stark durch TNF- α aktiviert (Alikhani et al., 2005).

Die erhöhte Transkriptionsaktivität von FOXO1 und FOXO3 bei Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt zu einer gesteigerten Expression von antioxidativ wirksamen Enzymen wie Superoxiddismutase 2 und Katalase (Xing et al., 2018).

Durch Expressionsregulation von stromabwärts gelegenen Genen ist FOXO1, wie auch FOXO3, in der Modulation von Immunsystem, Glukosemetabolismus, Lipogenese, Apoptose, Autophagie und Blockierung des Zellzyklus involviert (Zhang et al., 2021).

Insbesondere für FOXO3 werden potenzielle Rollen als Tumorsuppressor und in der Verlängerung der Lebenszeit diskutiert (van der Vos et al., 2011).

Microtubule-Associated Protein RP/EB Family Member 2 – MAPRE2

Mikrotubuli haben in eukaryotischen Zellen Funktionen in Organellentransport, Zellmotilität, -morphogenese und -organisation sowie in der symmetrischen Bildung der mitotischen Spindel, welche für die Spaltung der Chromosomen in der Zellteilung verantwortlich ist (Valiron et al., 2001). Stabilität und Funktion von Mikrotubuli werden von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen reguliert, deren Aktivität wiederum durch Phosphorylierung gesteuert wird (Drewes et al., 1998). MAPRE2, welches an das Tumorsuppressorprotein adenomatous polyposis coli bindet, wird eine mögliche Position in der Tumorgenese zugesprochen (Sugihara et al., 2012; Wang et al., 2005).

2.4.3 Zielgene des ABCD-Projekts

Chemokine

C-C Motif Chemokin Ligand 2 (CCL2) sowie C-X-C Motif Chemokin Ligand 10 (CXCL10) sind Teil der großen Familie der chemotaktischen Zytokine, genannt Chemokine. Diese

setzt sich aus kleinen, meist basischen, strukturell ähnlichen, sezernierten Signalproteinen zusammen, deren Hauptaufgabe die Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsherden (Chemotaxis) ist. (Zlotnik & Yoshie, 2000)

Die hierfür nötige Signalübermittlung in das Zellinnere erfolgt durch Bindung der Chemokine an spezifische G-Protein-gekoppelte heptahelikale Rezeptoren an der Zelloberfläche (Hughes & Nibbs, 2018).

Chemokine werden aufgrund der Konfiguration der zwei Cysteinreste nahe des N-Terminus in vier Untergruppen (CC, CXC und CX3C) eingeteilt (Zlotnik & Yoshie, 2000). Die C-Chemokin-Familie (XC) bildet die Ausnahme mit nur einem N-terminalen Cystein (Miller & Mayo, 2017). C-C Chemokine wurden hinsichtlich der nebeneinanderliegenden Position der ersten beiden von vier für Chemokine charakteristischen und konservierten Cysteinreste benannt. Bei C-X-C Chemokinen werden die Cysteinreste von einem einzelnen anderen Aminosäurerest getrennt. (Charo & Taubman, 2004)

Die proinflammatorischen Effekte von CCL2, welches auch als Monozyten-chemotaktisches Protein 1 bezeichnet wird, und seinem Rezeptor C-C Motif Chemokin Rezeptor 2 (CCR2) tragen unter anderem zur Proliferation von Tumorgewebe bei (Hao et al., 2020) und spielen eine Rolle in der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen (van der Vorst et al., 2015).

CXCL10, auch Interferon- γ -induziertes Protein 10 genannt, bindet an den Rezeptor CXCR3 (Van Raemdonck et al., 2015). Interferon-Signalisierung beispielsweise im Zuge viraler Infekte führt zur Bildung von CXCL10, welches nach Rezeptorbindung unter anderem PKB aber auch p38 durch Phosphorylierung aktiviert und somit in T-Lymphozyten sowohl Apoptose hemmende als auch fördernde Prozesse auslöst (Sidahmed et al., 2012). Zusätzlich werden basierend auf der Angiogenese-inhibierenden Wirkung antikanzerogene Funktionen von CXCL10 angenommen (Angiolillo et al., 1995).

Nukleärer Faktor 'kappa-Leichtketten-Transkriptionsverstärker' aktivierter B-Lymphozyten 1 – NF- κ B1 und Inhibitor von NF- κ B Kinase regulierende Untereinheit gamma – IKK- γ

Als NF- κ B wird eine Gruppe aus fünf Transkriptionsfaktoren (RelA oder p65, RelB, c-Rel, NF- κ B1 und NF- κ B2) bezeichnet (Sen & Baltimore, 1986), welche sich als strukturelle Gemeinsamkeit unter anderem eine Rel-Homologie-Domäne teilen und Homo- oder Heterodimere bilden (Hoesel & Schmid, 2013).

NF- κ B wird nahezu ubiquitär exprimiert und reguliert die Expression von Genen, die an Immun-, Entzündungs- beziehungsweise Stressreaktionen sowie Apoptose, Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt sind (Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

NF- κ B wird im Zytoplasma durch Assoziation mit Inhibitor von NF- κ B (I κ B)-Proteinen inaktiv gehalten und durch Faktoren wie bakterielle oder virale Infektionen, pro-inflammatorische

Zytokine wie TNF- α und Ligandenbindung an Antigen-, Interleukin 1- oder Toll-like-Rezeptoren aktiviert (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Der I κ B-Kinase (IKK)-Komplex, bestehend aus den katalytischen Kinaseuntereinheiten IKK- α und IKK- β sowie der regulatorischen Untereinheit IKK- γ , auch IKBKG oder NF- κ B-essenzieller-Modulator (NEMO) genannt (Maubach et al., 2017), leitet daraufhin die Phosphorylierung, Ubiquitinierung und proteasomale Degradation der I κ B-Proteine ein, wonach die freigesetzten NF- κ B-Dimere in den Zellkern wandern und an spezifische DNA-Sequenzen wie das κ B-Motiv in der Promotorregion zahlreicher Gene binden können (Hayden & Ghosh, 2012).

NF- κ B reguliert beispielsweise die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Cyclooxygenase 2, induzierbarer Stickoxid-Synthase (iNOS) (Tak & Firestein, 2001) sowie von Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und anderen Transkriptionsfaktoren (Hoesel & Schmid, 2013).

Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 – Nrf2 und Kelch-like Erythroid cell-derived protein with Cap and collar Homology [ECH]-associated protein 1 – KEAP1

Nrf2 ist ein von NFE2L2 kodierter, ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor mit basic-region Leucin-Zipper motif (Ma, 2013), dessen Nrf2-ECH Homologie-Domäne an die C-terminalen wiederholten Kelch-Domänen seines Repressors, des als Dimer vorliegenden Ubiquitinligase-Substrat-Adapters KEAP1, bindet (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

Inaktivierung von KEAP1 durch ROS oder elektrophile Chemikalien stabilisiert und aktiviert Nrf2, wie in Abbildung 14 illustriert, welches daraufhin in den Zellkern übergeht. Nach Heterodimerisierung mit kleinen muskulo-aponeurotische Fibrosarkom-Proteinen bindet Nrf2 an antioxidative Response-Elemente in zytoprotektiven Genen und induziert deren Transkription. Zu diesen antioxidativen Zielgenen gehören unter anderem SOD1, Katalase, Enzyme für die Produktion und Regeneration von reduziertem Glutathion sowie Proteine wie breast cancer resistant protein, deren Aufgabe die Ausschleusung toxischer Substanzen ist. (He et al., 2020; Taguchi & Yamamoto, 2017)

Daher ist das Nrf2-KEAP1-System unter physiologischen Bedingungen als wichtiger zellulärer Abwehrmechanismus gegen oxidativen und xenobiotischen Stress anerkannt (Suzuki & Yamamoto, 2015).

Nach Dissoziation von Nrf2 frei vorliegendes KEAP1 ubiquitiniert IKK β , wodurch dessen Degradation mittels Proteasomen und des Autophagie-Lysosom-Systems induziert sowie Phosphorylierung und damit einhergehende Aktivierung inhibiert wird (Kim et al., 2010; Lee et al., 2009).

Nrf2 reguliert Funktion und Biosynthese von Mitochondrien und somit Prozesse der Zellatmung und Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese (Vomund et al., 2017).

Trotz antikanzero gener Effekte kann Nrf2 die Entwicklung von bereits entstandenen Tumoren begünstigen sowie in manchen Viruserkrankungen positive oder negative Effekte auf die Immunantwort des Körpers auslösen (He et al., 2020).

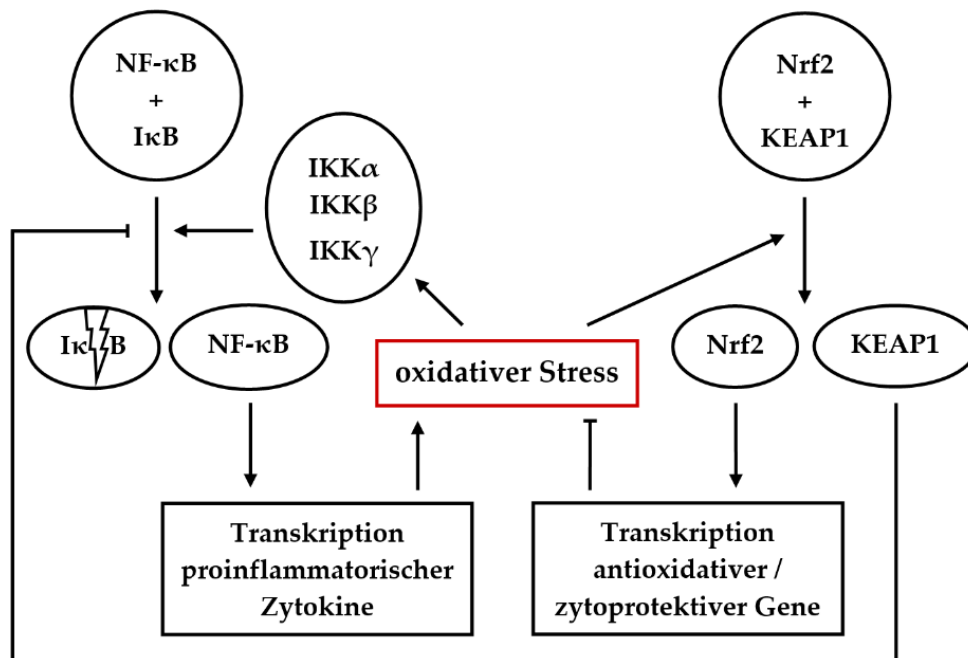


Abbildung 14: Interaktionen zwischen Nrf2 und NF-κB mit Einfluss von beziehungsweise Auswirkungen auf oxidativen Stress (modifiziert nach Muchtaridi et al., 2022)

Interleukin 6 – IL6

Bei IL6 handelt es sich um ein überwiegend von Monozyten und Makrophagen produziertes Glykoprotein, welches als Zytokin eine Signalsubstanz in Entzündungen und immunologischen Reaktionen darstellt (Uciechowski & Dempke, 2020).

IL6 hat zusätzliche Funktionen in der Hämatopoese sowie der Proliferation und Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen. Die Regulation beziehungsweise Stimulation der Genexpression von IL6 erfolgt analog zu zuvor für NF-κB beschriebenen Mechanismen beispielsweise mittels inflammatorischer Zytokine und Erkennung exogener Pathogene durch Toll-like Rezeptoren, aber auch über Gewebeschaden-assoziierte molekulare Muster, welche bei Verbrennungen und Traumata freigesetzt werden. (Tanaka et al., 2014)

Die Bindung von IL6 an IL6-Rezeptor und ein zweites signalumwandelndes Transmembranprotein namens gp130 leitet die IL6-Signalkaskade ein (Kishimoto et al., 1992). Nach Rezeptorbindung werden der MAP-Kinase- sowie der PI3K/PKB-Signalweg initiiert (Scheller et al., 2011). Zudem bewirkt Januskinase die Phosphorylierung und Homodimerisierung von Signal Transduktor und Aktivator der Transkription 3, welcher die Expression von Akut-Phase-Proteinen wie des C-reaktiven-Proteins moduliert (Kang et al., 2019).

Tumornekrose Faktor-Alpha – TNF- α

Als proinflammatorisches Zytokin wird TNF- α vor allem von aktivierten Makrophagen sowie T-Lymphozyten als multifunktionaler Signalstoff in akuten Entzündungszuständen exprimiert (Idriss & Naismith, 2000).

Nach Spaltung mittels einer Metalloprotease, dem TNF- α -konvertierenden Enzym, wird von der Vorstufe namens Transmembran-TNF- α die lösliche Form abgespalten. Beide Arten können an Typ 1 und 2 TNF-Rezeptoren binden und dadurch Zytokinproduktion, Apoptose, Zellproliferation und -differenzierung medieren. (Horiuchi et al., 2010)

Strukturell liegen TNF- α wie auch seine Vorstufe als Homotrimere vor, wobei von beiden Formen individuelle biologische Funktionen vermutet werden (Bradley, 2008).

TNF- α wird eine Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Jang et al., 2021) sowie der Tumorgenese von beispielsweise Brustkrebs zugeschrieben (Cruceriu, 2020).

3. Material und Methoden

3.1 „NutriAging D“-Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Teilstichprobe der „NutriAging D“-Studie analysiert, welche im Rahmen des „NutriAging“-Projekts durchgeführt wurde.

Ziel des „NutriAging“-Projekts ist es, durch die grenzüberschreitende Zusammenarbeit der Comenius Universität in Bratislava und der Universität Wien, Forschung bezüglich der Bedeutung von Vitamin D, Proteinen und Omega-3-Fettsäuren für die Gesundheit älterer Menschen zu untersuchen sowie Kennzeichen und Marker des gesunden Alterns festzustellen, um chronische Erkrankungen im Alter zu reduzieren und die Lebensqualität zu erhöhen (NutriAging, 2022).

Die „NutriAging D“-Studie untersuchte, ob eine zusätzlich eingenommene Vitamin-D-Supplementation mit täglichem oder monatlichem Dosierungsschema positive Effekte von Krafttraining in Erwachsenen Personen mit niedrig bis moderatem Vitamin-D-Spiegel augmentieren könnte (Aschauer et al., 2022).

3.1.1 Studiendesign

Die „NutriAging D“-Studie wurde als randomisierte, doppelt verblindete, Placebo-kontrollierte Interventionsstudie mit zwei Interventionsphasen über 16 Wochen durchgeführt. Der Hauptteil der Studie fand im Zeitraum von Februar 2019 bis Juli 2019 statt.

Die nach Ein- und Ausschlusskriterien selektierten 100 Teilnehmer*innen wurden hinsichtlich Alter, Geschlecht und initialer Vitamin-D-Serumkonzentration stratifiziert und anschließend randomisiert in drei Parallelgruppen aufgeteilt.

Siebenundzwanzig Proband*innen wurden der Kontrollgruppe (Gruppe 1) zugeordnet, welche über den Zeitraum der beiden Interventionsphasen Placebo-Tabletten mit einer Tagesdosis von 400 mg Calcium ohne Vitamin D3 einnahmen.

Die 27 Proband*innen der zweiten Interventionsgruppe erhielten zusätzlich zu den 400 mg Calcium täglich 800 IU Vitamin D3 (siehe Tabelle 1).

Für 30 Teilnehmende in Gruppe 3 wurde additional zur Calciumsupplementation Vitamin D3 in einer Dosis von monatlich 50.000 IU bei den Laborkontrollen zu Termin 1 (T1), Termin 2 (T2) sowie an den in Abbildung 15 mit „BS“ für Blutprobe markierten Zeitpunkten in Woche 9 und 13 ausgegeben.

Interventions- gruppe	Vitamin D [IU]		Verabreichungs- anzahl	Gesamtdosis
	pro Tag	pro Monat		
täglich	800	24.000	112x	96.000
monatlich	1667	50.000	4x	200.000

Tabelle 1: Übersicht und Vergleich der Dosierungen zwischen Interventionsgruppen

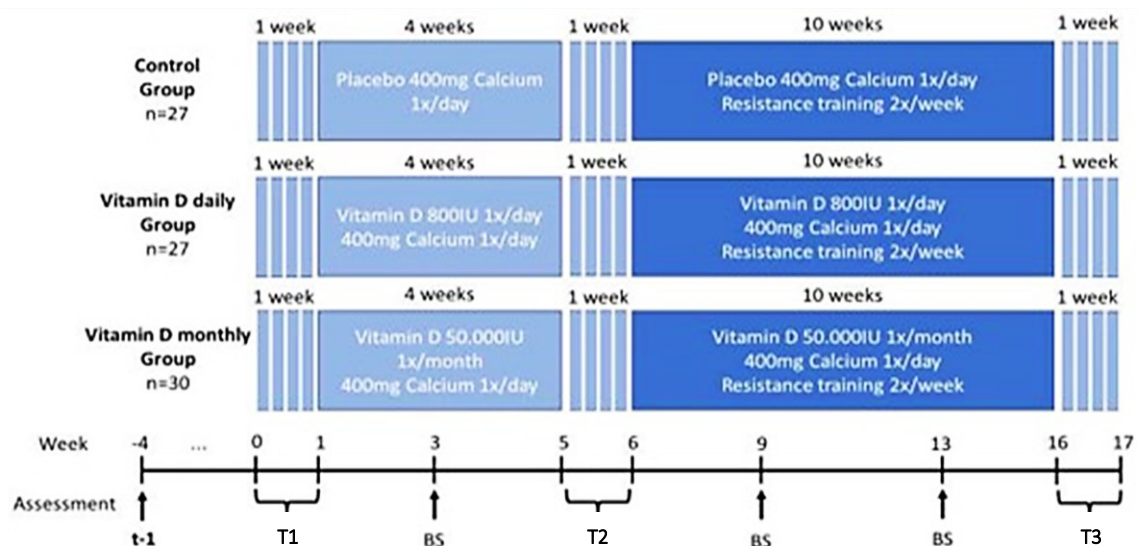


Abbildung 15: Studiendesign der „NutriAging D“-Studie (Aschauer et al., 2022)

In der vierwöchigen ersten Interventionsphase nahmen die Proband*innen ausschließlich ihre jeweiligen Nährstoffsupplemente ein, in den zehn Wochen der zweiten Interventionsphase wurde in allen Gruppen zusätzlich zweimal pro Woche Krafttraining absolviert.

Zu den in Abbildung 15 mit T1, T2 und T3 gekennzeichneten Untersuchungszeitpunkten, welche respektive vor Beginn der Intervention, nach der vierwöchigen reinen Supplementierungsphase und nach Abschluss der kombinierten Interventionsphase stattfanden, wurden anthropometrische Daten erhoben, Blut-, Stuhl- und Harnproben genommen sowie die körperliche Leistungsfähigkeit der Teilnehmer*innen untersucht.

3.1.2 Proband*innen

Von 378 über Zeitungsartikel, Radio und Internet akquirierten Interessent*innen wurde per Fragebogen die Eignung zur Studienteilnahme bewertet und bei passenden Personen die Gesamtkonzentration an Vitamin D im Serum bestimmt.

Bei einer Voruntersuchung wurden 231 potenzielle Proband*innen bezüglich medizinischer Ausschlusskriterien untersucht. Von diesen wurden schließlich 100 Personen, welche allen Ein- und Ausschlusskriterien entsprachen, nach Unterzeichnung einer schriftlichen Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen. Der Anteil der weiblichen Probandinnen betrug 33 Prozent.

Einschlusskriterien:

- Alter zwischen 65 und 85 Jahren
- Geschlecht weiblich oder männlich
- normale kognitive Funktion (Mini-Mental-Status-Test von mehr als 23)
- unabhängiger Lebensstil (kein Bedarf an häuslicher Pflege oder eines Pflegeheims)

Ausschlusskriterien:

- initiale Vitamin-D-Serumkonzentration von über 30 ng/mL
- öfter als einmal wöchentlich ausgeübtes regelmäßiges Krafttraining innerhalb der letzten sechs Monate vor Studienbeginn
- Bedarf an jeglichen Gehhilfen
- chronische Erkrankungen, welche Kontraindikationen für Krafttraining darstellen
- kardiovaskuläre Erkrankungen wie dekompensierte Herzinsuffizienz, Aortenstenose, instabile Angina pectoris, unbehandelte arterielle Hypertonie, Herzrhythmusstörungen oder Herzklappenfehler
- Einnahme von Herzglykosiden oder Thiaziddiuretika
- diabetische Retinopathie
- chronische Nierenerkrankung, Nierensteine
- Osteoporose beziehungsweise Osteopenie mit Calcium und/oder Vitamin-D-Supplementation
- Störungen des Parathormon- oder Calciumspiegels
- Frailty Index von drei oder höher
- regelmäßige Einnahme von Cortison
- Einnahme von Antibiotika innerhalb der letzten sechs Monate

In Abbildung 16 sind alle 15 Ausstiege von Teilnehmer*innen inklusive deren Ursache (mangelndes Interesse oder medizinische Gründe) über den Studienverlauf hinweg ersichtlich.

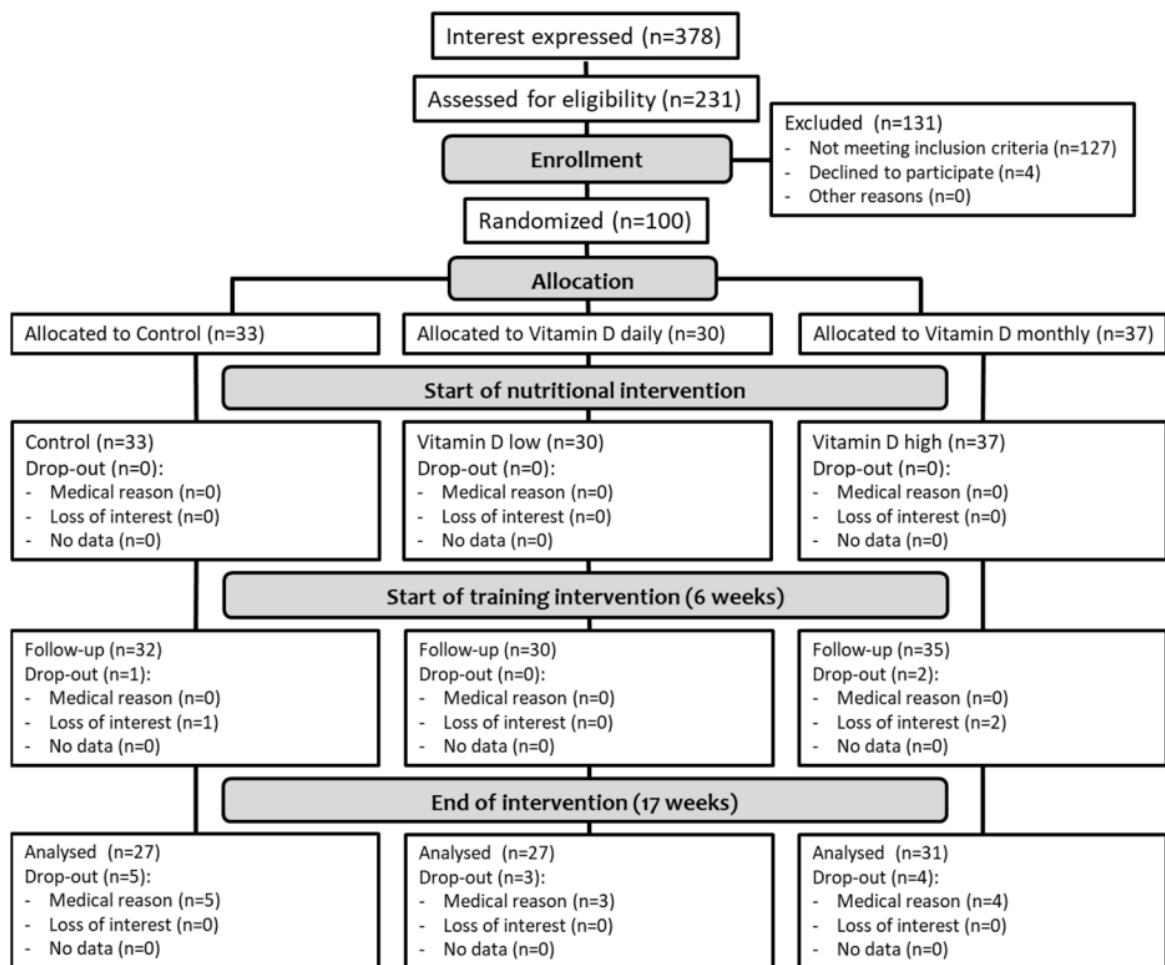


Abbildung 16: Anzahl der Proband*innen und Ausstiege im Studienablauf der „NutriAging D“-Studie (Aschauer et al., 2022)

3.1.3 Interventionen

Nährstoffsupplementation

Alle drei Gruppen erhielten 400 mg Calcium pro Tag aufgeteilt auf zwei Tabletten mit je 200 mg. Für Gruppe 2 wurden zusätzlich 800 IU Vitamin D3 täglich in Form einer weiteren Tablette verabreicht. Gruppe 3 wurden Vitamin-D3-Tabletten mit einer Dosierung von 50.000 IU monatlich gegeben.

Die Proband*innen wurden angewiesen, die jeweiligen Nahrungsergänzungsmittel immer zur gleichen Tageszeit und im Rahmen einer Mahlzeit zu konsumieren.

Täglich einzunehmende Supplemente wurden in 28-Tage-Tablettenboxen ausgegeben, welche bei der Rückgabe auf korrekte Einnahme überprüft wurden. Die Compliance bezüglich Vitamin-D-Einnahme in Gruppe 2 betrug 99 Prozent und in Gruppe 3, welche ihre Vitamin-D-Präparate im Zuge der vier durchgeführten Laborkontrollen erhielt, 100 Prozent.

Krafttraining

Die Nährstoffsupplementation innerhalb der ersten vierwöchigen Interventionsphase wurde in den zehn Wochen der zweiten Interventionsphase um Krafttraining für alle Gruppen erweitert.

Das Sportprogramm bestand aus zwei Trainingseinheiten pro Woche an nicht aufeinander folgenden Tagen mit einer Dauer von jeweils 60 bis 90 Minuten.

Die insgesamt 20 Termine wurden in Teilgruppen mit einer Anzahl von maximal fünf Proband*innen absolviert und von geschulten Sportwissenschaftler*innen geleitet.

Jede Einheit wurde mit fünf-minütigem Aufwärmen eingeleitet und einer ebenso langen Erholungsphase beendet. Der zwischenliegende Krafttrainingsabschnitt war wie folgt aufgebaut:

Die beiden Sporteinheiten der ersten Woche dienten als Eingewöhnungsphase, in der die Teilnehmer*innen mit acht verschiedenen Übungen vertraut gemacht wurden. Dazu führten sie insgesamt zwei Sätze pro Übung mit je zehn bis 20 Wiederholungen aus.

Ab dem dritten Trainingstermin wurden acht bis zwölf Wiederholungen pro Übung und Einheit durchgeführt.

Das Fünf-Wiederholungs-Maximum der Proband*innen wurde während der vierten Einheit in Woche 2 bestimmt. Das daraus errechnete Ein-Wiederholungs-Maximum diente als Referenz für die ab der dritten Woche bis zum Ende der Interventionsphase durchgeführten drei Sätze mit acht bis zwölf Wiederholungen bei 60 bis 80 Prozent des Ein-Wiederholungs-Maximums.

3.2 ABCD-Projekt

Das Akronym „ABCD“ im Titel des Projekts steht für Analysis Blood Covid DNA.

In der Studie wurden hospitalisierte COVID-19-Patient*innen, Patient*innen mit Influenza-Infektion sowie zu diesen passende gesunde Kontrollen verglichen. Ziel des Projekts war es, die Gruppen hinsichtlich DNA-Schäden, Parametern der Inflammation und des oxidativen Stresses, phänotypischer Altersmarker, klinischer Biochemie sowie Expression relevanter Gene für DNA-Schädigung beziehungsweise -Reparatur gegenüberzustellen.

3.2.1 Studiendesign

Das ABCD-Projekt wurde als prospektive Fall-Kontroll-Studie durchgeführt. Allen COVID-19-Fällen und Influenza-Proband*innen wurden in Alter und Geschlecht übereinstimmende gesunde Kontrollen zugeordnet.

Des Weiteren wurden bei einer teilnehmenden Person in der COVID-19-Gruppe während eines Zytokinsturms an fünf aufeinander folgenden Tagen Blutproben entnommen, um

eventuelle Unterschiede der zuvor definierten Parameter zwischen den Zeitpunkten zu analysieren.

Potenzielle Proband*innen der COVID-19- und Influenzagruppen wurden aus den Neuaufnahmen der Notfallambulanz der Klinik Donaustadt identifiziert und mit Hilfe eines Rekrutierungsprotokolls dokumentiert.

Nachdem geeignete Teilnehmer*innen ausreichend über die Studie informiert wurden und ihre Einverständniserklärung unterzeichnet hatten, erfolgte eine einmalige Blutabnahme durch das Pflegepersonal der Klinik Donaustadt.

Analysen, welche nicht routinemäßig im Labor des Krankenhauses durchgeführt werden, wurden im Labor des Departments für Ernährungswissenschaften der Universität Wien durchgeführt.

Demografische Daten der Proband*innen wie Alter und Geschlecht, anthropometrische Daten wie Größe und Gewicht sowie ihre Krankengeschichte, Länge des Krankenhausaufenthalts und eventuelle Verlegungen von oder auf die Intensivstation wurden aus den Krankenberichten beziehungsweise der Krankenakte der Patient*innen entnommen.

3.2.2 Proband*innen

Die Anzahl der in die Studie aufgenommen Proband*innen betrug 45 Personen, sowohl in der Gruppe der Fälle als auch bei den Kontrollen.

Allgemein gültige Kriterien zur Teilnahme an der Studie wurden wie folgt definiert:

Einschlusskriterien:

- Alter von mindestens 40 Jahren
- Geschlecht weiblich oder männlich
- Fähigkeit eine schriftliche Einverständniserklärung abgeben zu können

Ausschlusskriterien:

- Kinder unter 18 Jahren sowie Erwachsene zwischen 19 und 39 Jahren

In die Gruppe der COVID-19-Patient*innen wurden darüber hinaus nur in die Notfallambulanz aufgenommene Patient*innen Personen mit COVID-19-Verdacht inkludiert. Nicht-hospitalisierte Patient*innen mit COVID-19-Erkrankung und Patient*innen ohne nachgewiesene SARS-CoV-2-Infektion wurden von der Studie ausgeschlossen.

Ebenso wurden für die Gruppe der an Influenza Erkrankten zusätzlich zu den allgemeinen Kriterien nur in die Notfallambulanz aufgenommene Patient*innen mit Verdacht auf

Influenza integriert. Patient*innen außerhalb des Krankenhauses oder ohne bestätigte Influenzainfektion wurden exkludiert.

Für die Gruppe der gesunden Kontrollen stellte die Abwesenheit schwerer Erkrankungen ein weiteres Einschlusskriterium dar. Daher führten jegliche akuten oder vergangenen klinisch signifikanten Krankheiten wie beispielsweise Adipositas Grad III (BMI > 40), kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ I und II, Malignome und andere schwere Erkrankungen wie Nieren-, Leber- oder Schilddrüsenerkrankungen, Krankheiten des Knochenstoffwechsels, rheumatoide Osteoarthritis oder erworbenes Immunschwächesyndrom zum Ausschluss aus der Studie.

3.3 Materialien

- Pipette Eppendorf Research® Plus, 0.5 – 10 µl, grau (Eppendorf SE)
- Pipette Eppendorf Research® Plus, 2 – 20 µl, gelb (Eppendorf SE)
- Pipette Eppendorf Research® Plus, 20 – 200 µl, gelb (Eppendorf SE)
- Pipette Eppendorf Research® Plus, 100 – 1000 µl, blau (Eppendorf SE)
- Biotix®, uTIP, Universal Pipette Tips, 96 Stück je Packung, sterilisiert, mit Filter: 1250 µL, 200 µL, 20 µL, 10 µL und 10 µL XL (Biotix, Inc.)
- DNA LoBind® Tubes, 1.5 mL und 0.5 mL, PCR clean, farblos (Eppendorf SE)
- Nuclease-Free Water, 50 mL (Ambion™, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Mikrozentrifuge MiniStar (VWR™, Avantor™)
- Heraeus Megafuge 40R Zentrifuge (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- SA8 Vortex-Mixer mit variabler Drehzahl (Cole-Parmer™, Stuart™)
- DNA/RNA UV-Cleaner Box (LTF Labortechnik GmbH & Co. KG)
- NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen™, Life Technologies Holdings Pte Ltd)
- 70-prozentiger Isopropanol zu Reinigungszwecken

3.3.1 Reverse Transkription

- High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- PCR-Strips, BIO-CERT® PCR QUALITY, 8er-Streifen, transparent, 0,2 mL, 1 Steg mit flachem Deckel (BRAND®)
- Thermal Cycler Gene-Explorer Touch Series (Hangzhou Bio-Gener Technology Co., Ltd)

3.3.2 Gel-Elektrophorese

- UltraPure™ Agarose-1000 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- TAE-Puffer:
 - Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
 - Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
 - Eisessig
 - deionisiertes Wasser
- GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)
- Gel Loading Dye, Purple 6X (New England Biolabs, Inc.)
- Quantitas Fast DNA marker 100 bp – 2000 bp (New England Biolabs, Inc.)
- Elektrophoresekammer PerfectBlue™ wide format gel system, Maxi ExW 'Revolution' (VWR™, Avantor™)
- Bio-Rad Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System und Image Lab™ Software

3.3.3 qPCR

- QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.) mit Quant Studio™ Real-Time PCR Software v1.7.1
- SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- 384-well PCR Platten (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Aluminium-Kühlblöcke

3.4 Methoden

3.4.1 Primerdesign

In den RT-qPCR-Analysen der beiden Humanstudien, welche in dieser Arbeit behandelt werden, wurde ein zweistufiges Verfahren mit getrennter reverser Transkription und qPCR sowie kombiniertem Hybridisierungs- und Elongationsschritt angewandt. Während in der RT-Phase unspezifische Primersequenzen eingesetzt wurden, fanden in der qPCR insgesamt 18 verschiedene Primerpaare Verwendung, deren kompletter Ablauf der Erstellung und Validierung in Abbildung 17 illustriert wird.

3.4.1.1 Auswahl der Zielensequenzen

Im ersten Schritt wurden die entsprechenden Eintragsnummern der unter Punkt 2.4 beschriebenen Gene in der NCBI Nukleotid Datenbank identifiziert. Es wurden nur Sequenzen ausgewählt, welche in der Nomenklatur der NCBI Nukleotid Datenbank das Präfix „NM_“ tragen, da dies signalisiert, dass es sich bei jenem Eintrag um eine kuratierte und somit vertrauenswürdiger mRNA-Sequenzierung handelt (Bustin & Huggett, 2017).

3.4.1.2 Erstellung und in silico Validierung

Die NCBI Primer designing Plattform „Primer-BLAST“ wurde genutzt, um pro Gen etwa fünf passende Primersequenzen zu generieren (Ye et al., 2012).

Zusätzlich wurde eine Literatursuche nach weiteren Primersequenzen in der Datenbank PubMed durchgeführt. Die Primer aus anderen Publikationen wurden auf gleiche Weise wie selbst entwickelte Primer ausgewählt und getestet.

Bei der Primerselektion wurde auf folgende Kriterien geachtet:

Die Länge der Primer wurde mit einer Ausnahme darüber und darunter zwischen 18 und 24 Nukleotiden gewählt.

Der Guanin- und Cytosinegehalt der Oligonukleotide sollte etwa 50 Prozent betragen und die Schmelztemperatur innerhalb

jedes Primerpaares sollte möglichst ähnlich (idealerweise in einer Spanne von 1 °C) sein.

Es konnten jedoch deutliche und schwankende Unterschiede von mehr als 6 °C in der Berechnung der Schmelztemperaturen zwischen der Primer-BLAST-Ausgabe und dem mitgelieferten technischen Datenblatt von Sigma-Aldrich® beobachtet werden.

Um die Spezifität der Primer zu gewährleisten, wurden in Primer-BLAST ein Minimum von zwei inkompatiblen Nukleinbasen zu unerwünschten Zielsequenzen, davon zumindest zwei innerhalb der letzten fünf Nukleotide am 3'-Ende des Primers, als Voraussetzungen definiert. Unerwünschte mögliche Zielsequenzen, zu denen mindestens sechs inkompatible Stellen im Primer vorlagen, wurden als irrelevant eingestuft und in Primer-BLAST ignoriert. Des Weiteren wurden Homopolymersequenzen mit Wiederholungen von vier oder mehr gleichen Nukleotiden in den Primern vermieden.

Als Unter- und Obergrenzen der PCR-Produktlänge wurden respektive 70 und 200 definiert.

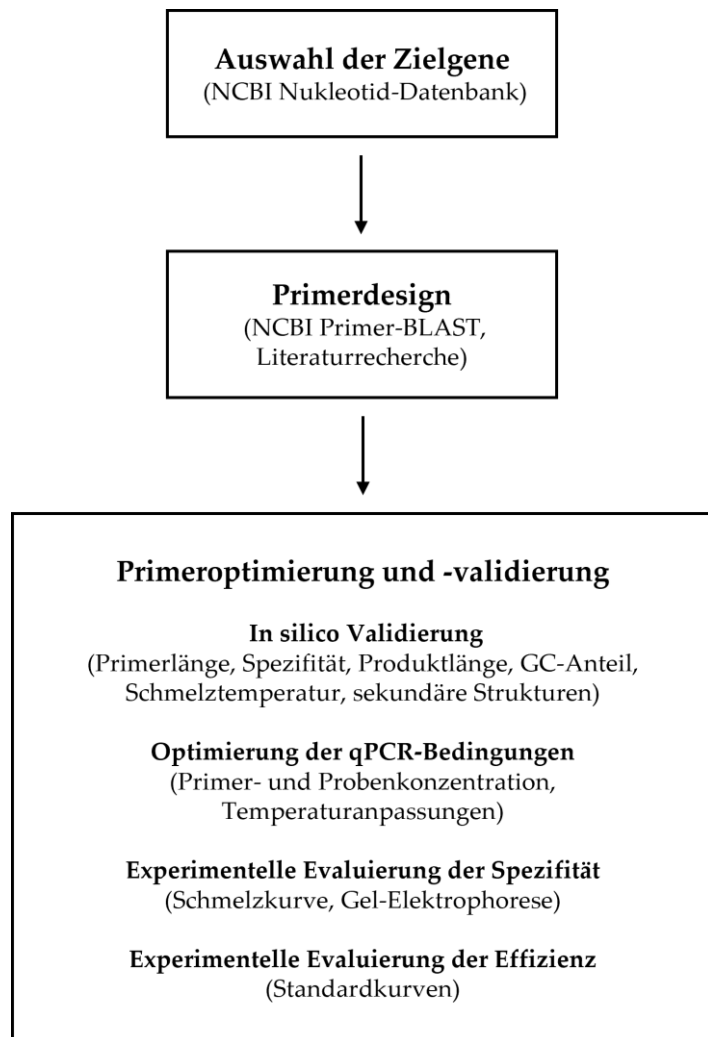


Abbildung 17: Ablauf der Primererstellung und -validierung (modifiziert nach Rodríguez et al., 2015)

Zur Vermeidung unerwünschter Amplifikation von Produkten mit ähnlicher Länge aus gDNA wurden Primer, welche eine Exon-Exon-Verbindungsstelle überspannen, präferiert.

3.4.1.3 Experimentelle Evaluierung der Spezifität und Effizienz

Alle Primer wurden über Sigma-Aldrich® (Merck KGaA) in trockener Form akquiriert und laut Herstellerangaben mit Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die so erhaltenen 100 µM Stocklösungen wurden auf eine Konzentration von 16 beziehungsweise 8 µmol/L verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Für diese Studien wurden zwei verschiedene Primerkonzentrationen von 400 nM beziehungsweise 800 nM im qPCR-Reaktionsansatz getestet.

Zur Evaluierung der Spezifität und zum Ausschluss von Primerdimeren wurde mit allen Primern nach erfolgter qPCR sowohl von cDNA-Proben als auch NTCs neben der Schmelzkurvenanalyse auch eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Das Gel wurde aus 2 g Agarose (UltraPure™ Agarose-1000, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.) und 100 mL TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) mit einer Konzentration von 40 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 20 mM Essigsäure und 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hergestellt. Als Farbstoff wurden dem Gel 5 µL GelRed® (Biotium) vor dem Gießen hinzugefügt. In der mit TAE-Puffer gefüllten horizontalen Elektrophoresekammer PerfectBlue™ wide format gel system, Maxi ExW 'Revolution' (VWR™, Avantor™) wurden die zehn Taschen des Gels mit jeweils 12 µL, bestehend aus 2 µL Gel Loading Dye Purple 6X (New England Biolabs, Inc.), 8 µL Nuklease-freiem Wasser und 2 µL Probe, beladen. Als Leiter wurden pro Gel einmalig 5 µL der Quantitas Fast DNA Marker 100 bp – 2000 bp (New England Biolabs, Inc.) Leiter, welche fünf Banden zeigt, eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und 140 V für 40 Minuten durchgeführt und das Gel nachfolgend mittels Bio-Rad Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System und Image Lab™ Software abgebildet und ausgewertet.

Die Effizienz der Primerpaare wurde mittels Standardkurven bestimmt. Durch serielle Verdünnung um den Faktor zehn oder fünf wurden fünf cDNA-Standards erstellt. Nach erfolgter qPCR mit dem jeweiligen Primer wurden mithilfe der Webanwendung Thermo Fisher Connect™ Effizienz, Steigung, Ordinatenabschnitt und Bestimmtheitsmaß (R^2) der erhaltenen Standardkurve berechnet. Primerpaare mit einer Effizienz von unter 90 oder über 110 Prozent wurden ausgeschlossen. Aus den fünf bis sechs designten Primern wurden jene mit der besten Effizienz und dem höchsten Bestimmtheitsmaß für die Studien ausgewählt.

3.4.2 Auswahl der Referenzgene

Um die beste Kombination an Referenzgenen zu identifizieren, wurden Primer von drei potenziellen Genen (Aktin beta, ribosomales Protein S9, 18S ribosomale RNA) analysiert. Dazu wurden cDNA-Standardreihen mit fünf seriellen Verdünnungsschritten um den Verdünnungsfaktor zehn erstellt und mit den zur Auswahl stehenden Primern eine qPCR durchgeführt.

Im Anschluss wurden mittels NormFinder Algorithmus in Form des Excel Add-Ins die zwei besten Referenzgene fixiert, welche in den beiden Studien als interne Standards Verwendung fanden. Um die Eingabewerte hierfür auf einer linearen Skala zu erhalten, wurden die Ct-Werte über folgende Formel transformiert: $2^{-\Delta Ct}$, wobei ΔCt gleich $Ct - \text{Minimum Ct}$ ist.

3.4.3 Reverse Transkription

Die Extraktion der RNA aus den erhaltenen Blutproben erfolgte in den beiden Studien unterschiedlich. Für das ABCD-Projekt erfolgte die Isolierung aus Vollblut mittels PAXgene® Blood RNA Kit (PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH), QIAGEN®). In der „NutriAging D“-Studie wurde das ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega GmbH) zur RNA-Isolierung aus PBMCs verwendet. In beiden Methoden wurde eine Behandlung mit RNase freier DNase I zur Entfernung von gDNA durchgeführt.

Die Quantität und Qualität beziehungsweise Reinheit der RNA-Proben wurde mittels NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) und Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen™, Life Technologies Holdings Pte Ltd) bestimmt, zusätzlich wurden Gel-Elektrophoresen durchgeführt. Die fertigen RNA-Proben wurden ständig auf Eis gehalten aliquotiert, mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

In beiden Studien wurde das High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.) laut Herstellerangaben zur Konvertierung von RNA in cDNA eingesetzt. RNA-Proben und Master Mix Komponenten wurden hierbei in allen Schritten räumlich getrennt.

Durchführung:

Alle Komponenten des Kits wurden auf Eis aufgetaut und anschließend die benötigte Menge 2X RT Master Mix laut Tabelle 2 berechnet. Die einzelnen Bestandteile wurden in Reihenfolge der Tabelle addiert und auf Eis durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

2X RT Master Mix Komponenten	Volumen für eine Reaktion
10X RT Buffer	2,0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µL
10X RT Random Primers	2,0 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µL
Nuklease-freies Wasser	4,2 µL
Totales Volumen pro Reaktion	10,0 µL

Tabelle 2: Herstellung 2X RT Master Mix

Pro Reaktion wurden 10 µL 2X RT Master Mix und 10 µL RNA-Proben jeweils im Doppelansatz in individuellen Tubes (PCR-Strips, BIO-CERT® PCR QUALITY, BRAND®) durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Die Tubes wurden verschossen und abgespinnt (Mikrozentrifuge MiniStar, VWR™, Avantor™), um etwaige Luftblasen zu entfernen.

Danach wurden die Tubes auf Eis zum Thermal Cycler (Gene-Explorer Touch Series, Hangzhou Bio-Gener Technology Co., Ltd) gebracht und nach dem in Tabelle 3 dargestellten Programm behandelt.

Einstellungen	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 Minuten	120 Minuten	5 Minuten	∞

Tabelle 3: Temperaturprogramm der reversen Transkription

Die Verdünnung der Proben erfolgte auf Basis der fluorometrisch gemessenen RNA-Konzentrationen mit Nuklease-freiem Wasser auf eine einheitliche Konzentration von 2 ng/µL. Die fertigen cDNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

3.4.4 qPCR

Für die qPCR wurde das QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.) mit Quant Studio™ Real-Time PCR Software v1.7.1 verwendet. SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde ausgewählt und die qPCR in 384-well PCR-Platten (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt.

Wie auch bei der reversen Transkription wurde auf strikte räumliche Trennung zwischen Master Mix Erstellung und Arbeitsschritten mit cDNA-Proben geachtet.

Um die PCR-Platte und den Master Mix beziehungsweise die Proben darin während der vielen Pipettievorgänge konstant gekühlt zu halten, wurden für die PCR-Platte passende Aluminium Kühlblöcke eingesetzt.

Zunächst wurden laut Tabelle 4 aus SYBR™ Select Master Mix sowie dem jeweiligen Primerpaar die benötigte Menge an qPCR Master Mix berechnet, hergestellt und auf die PCR-Platte aufgetragen.

qPCR Master Mix	Volumen für eine Reaktion
SYBR™ Select Master Mix	5,0 µL
Primer forward (16 µM)	0,5 µL
Primer reverse (16 µM)	0,5 µL
Totales Volumen pro Reaktion	6,0 µL

Tabelle 4: Herstellung qPCR Master Mix

Im nächsten Schritt wurden in dreifacher Ausführung 4,0 µL der entsprechenden Proben dem qPCR Master Mix hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 10,0 µL pro Reaktion zu erreichen. Für die Kontrollen ohne cDNA (NTCs), welche pro Primer ebenfalls dreifach bei jedem Lauf durchgeführt wurden, um Kontaminationen der verwendeten Reagenzien auszuschließen und Primerdimere zu detektieren, wurde statt cDNA die äquivalente Menge an Nuklease-freiem Wasser zugegeben.

Die fertige Platte wurde mit einer selbstklebenden Kunststoffolie bedeckt und zur Entfernung von Luftblasen vor der qPCR unter Verwendung der „pulse“ Funktion der Heraeus Megafuge 40R Zentrifuge (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc.) auf maximal 3000 U/min abzentrifugiert.

Als Anzahl der PCR-Zyklen wurde 40 gewählt. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C, Hybridisierung und Elongation wurden kombiniert bei 60 °C durchgeführt. Für die qPCR inklusive Schmelzkurve wurde folgendes Temperaturprogramm angewandt (Abbildung 18):

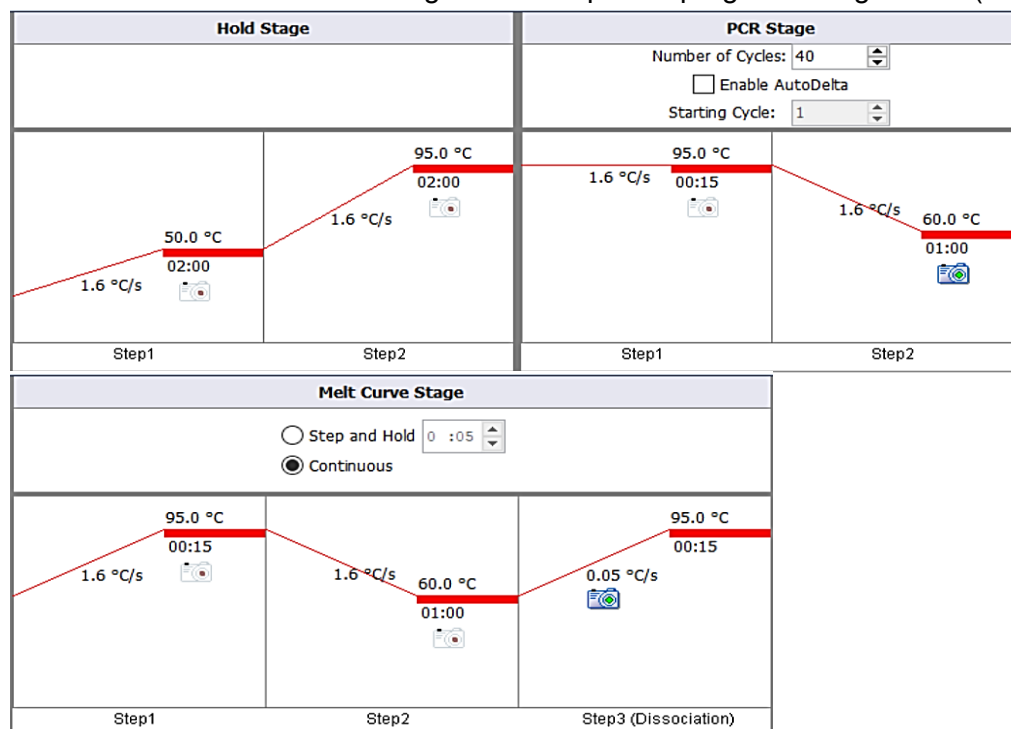


Abbildung 18: Temperaturprogramm der qPCR (eigene Darstellung)

Die Auswertung aller qPCR-Ergebnisse sowie Schmelzkurven erfolgte mittels der Webanwendung Thermo Fisher Connect™. Zusätzlich wurde die relative Genexpression nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode nach Livak und Schmittgen (2001) in Microsoft® Excel® (Version 16.0.) berechnet. Wie von Hellemans and Vandesompele (2014) empfohlen, wurden die Ergebnisse der relativen Genexpression logarithmisch transformiert, um die Daten symmetrisch verteilt darzustellen. Als Referenzproben wurden in der „NutriAging D“-Studie die Expressionslevels von T1 verwendet. Im ABCD-Projekt wurden hierfür die zugeordneten gesunden Kontrollen herangezogen.

3.4.5 Auswertung und statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mittels IBM SPSS Statistics (Version 28.0. für Windows, Armonk, NY: International Business Machines (IBM) Corporation) und GraphPad Prism (Version 9.3.1 für Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA), welches vornehmlich zur Erstellung von Grafiken genutzt wurde, durchgeführt.

Zur Überprüfung auf Normalverteilung der Daten wurde der Shapiro-Wilk-Test angewandt. In der Auswertung des ABCD-Projekts wurden die Genexpressionsunterschiede zwischen den zwei Gruppen (COVID und gesunde Kontrollen) als ΔC_t -Werte je nach gegebener Normalverteilung mittels t-Test für parametrische Variablen beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test, wenn keine Normalverteilung vorlag, ermittelt.

Für paarweise Vergleiche zwischen mehreren Gruppen wurde Tukey's multiple comparisons Test durchgeführt.

Fold-Difference (FD) und logarithmierte Fold-Difference ($\log_2 FD$) der Genexpression wurden für normalverteilte Daten mit t-Test für eine Stichprobe und für nicht normalverteilte Daten mit Wilcoxon-Test jeweils gegen eins und null, respektive, getestet.

Mögliche Korrelationen wurden mit Spearman-Korrelation analysiert.

Für die Daten der „NutriAging D“-Studie wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwertwiederholung beziehungsweise Friedmans zweifaktorielle ANOVA nach Rang für nicht normalverteilte Daten durchgeführt, um den Verlauf der Genexpressionslevels über die drei Zeitpunkte der Probennahme darzustellen.

Statistische Signifikanz wurde bei $p \leq 0,050$ angenommen. Folgende Signifikanzniveaus wurden definiert und entsprechend in Grafiken gekennzeichnet:

p-Wert	Formulierung	Kennzeichnung
< 0,001	höchst signifikant	***
0,001 bis 0,010	hoch signifikant	**
0,010 bis 0,050	signifikant	*
$\geq 0,050$	nicht signifikant	ns

4. Ergebnisse

4.1 „NutriAging D“-Studie

4.1.1 Verteilung der Proband*innen

Aus den 100 in die Studie aufgenommenen Teilnehmenden, deren Daten zu Beginn der Studie (T1) aufgenommen wurden, wurde zur Erstellung dieser Arbeit eine Stichprobe aus 20 Proband*innen gezogen.

Wie in Tabelle 5 dargestellt, erhielten zwölf der Testpersonen Vitamin D (vier davon täglich, acht monatlich) und acht als Kontrollgruppe nur Calcium.

Die Teilstichprobe bestand aus 60 Prozent Männern und 40 Prozent Frauen. Das Alter der Proband*innen lag zwischen 65 und 81 Jahren mit einem Durchschnitt von 69,9 ($\pm 4,3$) Jahren. Der Vitamin-D-Spiegel zum Zeitpunkt T1 betrug im Mittel 21,8 ($\pm 5,6$) ng/mL und unterschied sich zwischen den drei Interventionsgruppen nicht signifikant. Mit einem Querschnitt von 32,0 ($\pm 2,7$) kg/m² befand sich der BMI der Gruppe mit täglicher Vitamin-D-Supplementierung laut Klassifikation der World Health Organization (WHO) im Bereich Adipositas Klasse 1, jener der anderen Interventionsgruppen sowie der gesamte Mittelwert lagen im Bereich der Präadipositas (WHO, 2000). Diese Differenzen waren jedoch ebenfalls nicht signifikant.

Parameter	gesamt	Vitamin D täglich	Vitamin D monatlich	Kontrolle	Signifikanz
n	20	4 (20%)	8 (40%)	8 (40%)	0,449
Geschlecht w/m	8/12	3/1	2/6	3/5	0,371
Alter [Jahre]	69,9 $\pm$ 4,3	71,2 $\pm$ 3,5	70,2 $\pm$ 5,1	69,1 $\pm$ 4,1	0,731
Vitamin D [ng/mL]	21,8 $\pm$ 5,6	24,4 $\pm$ 3,1	19,9 $\pm$ 6,0	22,4 $\pm$ 6,2	0,407
Körpergewicht [kg]	80,0 $\pm$ 17,5	88,2 $\pm$ 14,5	77,6 $\pm$ 14,3	78,3 $\pm$ 22,0	0,602
Körpergröße [m]	1,71 $\pm$ 0,09	1,65 $\pm$ 0,09	1,72 $\pm$ 0,09	1,74 $\pm$ 0,10	0,386
BMI [kg/m ²]	27,3 $\pm$ 5,5	32,0 $\pm$ 2,7	26,3 $\pm$ 3,4	25,9 $\pm$ 7,1	0,151

Tabelle 5: Charakteristika der ausgewählten Proband*innen der „NutriAging“ D-Studie zum Zeitpunkt T1

4.1.2 Verlauf der Vitamin-D-Serumkonzentration

Wie in Tabelle 6 gezeigt, stieg der Vitamin-D-Spiegel jener Personen, die innerhalb der Studie eine Vitamin-D-Supplementation erhielten, im Mittel um 48 Prozent von T1 zu T3, jener der Proband*innen in der Kontrollgruppe blieb über den Untersuchungszeitraum stabil. Während in Interventionsgruppe 2, welche täglich Vitamin D einnahm, in dieser Teilstichprobe keine Erhöhung des Vitamin-D-Spiegels gezeigt werden konnte, wurde mit monatlicher Verabreichung in Gruppe 3 eine signifikante Steigerung von 21 Prozent von T1 zu T2 ($p = 0,045$) beziehungsweise 81 Prozent ($p < 0,001$) von T1 bis T3 erzielt.

Parameter	Gruppe	T1	T2	T3	Zeitpunkt	Zeitpunkt × Gruppe
Vitamin D [ng/mL]	1	22,4±6,2	21,7±5,9	23,9±13,4	0,668	0,003
	2	24,4±3,1	25,1±2,7	22,9±8,0	0,704	
	3	19,9±6,0	24,0±4,9	36,0±7,1	<0,001	
	2+3	21,4±5,5	24,4±4,2	31,7±9,5	0,005	

Tabelle 6: Verlauf Vitamin-D-Konzentration nach Gruppe. 1: Kontrolle, 2: Vitamin D täglich, 3: Vitamin D monatlich (T1: Baseline; T2: nach Vitamin-D-Supplementation; T3: nach Vitamin-D-Supplementation und Krafttraining)

4.1.3 Effekte der Interventionen auf die Genexpression

4.1.3.1 Δ Ct-Werte – Vergleiche zwischen den Untersuchungszeitpunkten

Parameter	Gruppe	T1	T2	T3	Zeitpunkt	Zeitpunkt × Gruppe
Δ Ct ASC	1	7,50±0,32	7,29±0,11	7,42±0,23	0,173	0,122
	2	7,05±0,08	7,16±0,23	7,31±0,18	0,140	
	3	7,30±0,29	7,33±0,36	7,31±0,31	0,896	
	gesamt	7,33±0,31	7,28±0,25	7,35±0,25	0,387	
Δ Ct SOD1	1	4,19±0,24	4,04±0,27	4,08±0,29	0,450	0,682
	2	4,11±0,21	4,10±0,08	3,95±0,34	0,462	
	3	4,31±0,32	4,06±0,24	4,14±0,25	0,054	
	gesamt	4,22±0,27	4,06±0,22	4,08±0,28	0,080	
Δ Ct CYP27A1	1	6,02±0,55	6,10±0,42	6,38±0,57	0,025	0,228
	2	5,92±0,32	5,88±0,27	6,08±0,24	0,556	
	3	6,25±0,72	6,30±0,59	6,22±0,75	0,827	
	gesamt	6,09±0,58	6,14±0,48	6,26±0,59	0,159	
Δ Ct IGF-1R	1	6,91±0,31	6,80±0,38	6,41±0,99	0,607	0,116
	2	6,61±0,27	6,77±0,31	6,55±0,29	0,368	
	3	7,01±0,41	6,80±0,35	6,83±0,34	0,417	
	gesamt	6,89±0,36	6,80±0,34	6,61±0,67	0,116	
Δ Ct FOXO1	1	4,98±0,40	4,81±0,37	4,61±0,73	0,223	0,024
	2	4,91±0,37	4,85±0,16	4,76±0,25	0,105	
	3	5,06±0,38	4,87±0,45	4,97±0,34	0,325	
	gesamt	5,00±0,37	4,84±0,36	4,78±0,52	0,024	
Δ Ct FOXO3	1	6,23±0,18	6,33±0,23	6,02±0,80	0,223	0,287
	2	6,18±0,34	6,28±0,12	6,34±0,12	0,174	
	3	6,28±0,15	6,26±0,20	6,34±0,21	0,223	
	gesamt	6,24±0,20	6,29±0,19	6,21±0,53	0,287	
Δ Ct MAPRE2	1	9,67±0,52	9,51±0,65	9,22±0,51	0,019	0,517
	2	9,86±0,21	9,47±0,24	9,59±0,44	0,049	
	3	9,48±0,38	9,26±0,51	9,26±0,42	0,388	
	gesamt	9,63±0,43	9,40±0,53	9,31±0,46	0,008	
Δ Ct Nrf2	1	4,92±0,67	4,79±0,84	4,87±1,06	0,839	0,782
	2	5,19±0,18	5,13±0,08	5,47±0,21	0,037	
	3	4,90±0,89	5,02±0,63	5,22±0,64	0,307	
	gesamt	4,97±0,69	4,95±0,65	5,13±0,79	0,409	

Tabelle 7: Genexpressionsunterschiede als Δ Ct-Werte in den Interventionsgruppen. 1: Kontrolle, 2: Vitamin D täglich, 3: Vitamin D monatlich (T1: Baseline; T2: nach Vitamin-D-Supplementation; T3: nach Vitamin-D-Supplementation und Krafttraining)

Signifikante Änderungen der Genexpression über die drei Untersuchungszeitpunkte hinweg fanden sich, wie Tabelle 7 dargestellt, bei den Genen CYP27A1, FOXO1, MAPRE2 und Nrf2. Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden in der Expression von SOD1, IGF-1R, MAPRE2 und Nrf2 gemessen. Ergebnistabellen mit zusätzlicher Unterteilung nach Geschlecht finden sich im Anhang.

Für CYP27A1 konnte in der Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der ΔCt -Werte und somit Reduktion der Genexpression ($p = 0,025$) beobachtet werden, während in beiden der Vitamin-D-erhaltenden Gruppen keine statistisch signifikante Variation über den Studienzeitraum festgestellt wurde. In der Untergruppe der Frauen war dieser Trend in der Kontrollgruppe erkennbar, im Gegensatz zu den Ergebnissen der Männer ($p = 0,034$) jedoch nicht signifikant.

Eine signifikante Zunahme der Expression von FOXO1 ($p = 0,024$) sowie MAPRE2 ($p = 0,008$) wurde für die gesamte Stichprobe und in der weiblichen Geschlechtsgruppe (FOXO1: $p = 0,044$; MAPRE2: $p = 0,027$) nachgewiesen. MAPRE2 zeigte zusätzlich signifikante Hochregulierung in den Interventionsgruppen 1 und 2 ($p = 0,019$ und $p = 0,049$, respektive), ebenfalls besonders ausgeprägt für Frauen in Gruppe 1 ($p = 0,018$).

Für die männlichen Teilnehmer wurden signifikante Steigerungen in der IGF-1R-Expression bei Vitamin-D-Supplementation festgestellt (Vitamin D gesamt: $p = 0,018$; Gruppe 3: $p = 0,042$). Im Vergleich zu Männern in der Kontrollgruppe zeigten diese aber eine signifikant geringere Expression zu T1 ($p = 0,042$).

Das Gen SOD1 zeigte in der gesamten Stichprobe keine signifikanten Veränderungen, unterteilt in Geschlechts- und Interventionsgruppen, konnte aber eine signifikante Hochregulation in der Gruppe der Frauen ($p = 0,014$), besonders ausgeprägt innerhalb der Kontrollgruppe ($p = 0,006$) gemessen werden. Für Männer war dieser Trend nur bei Vitamin-D-supplementierenden Probanden signifikant zu beobachten ($p = 0,022$), welche jedoch eine signifikant niedrigere initiale Expression gegenüber der Kontrollgruppe hatten ($p = 0,029$).

Nrf2 ist mit CYP27A1 das einzige Gen, das eine signifikante Herunterregulierung im Untersuchungszeitraum erfuhr. Im Gegensatz zu CYP27A1 zeigte sich diese für Nrf2 in den Vitamin-D-supplementierenden Gruppen. Statistische Signifikanz erreichte

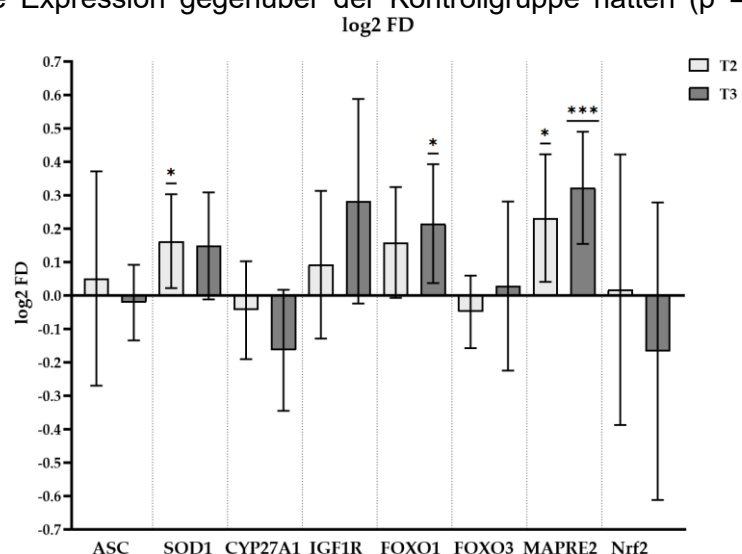


Abbildung 19: log2FD in der gesamten Stichprobe mit 95% KI als Balken

sie knapp in Interventionsgruppe 2 ($p = 0,037$).

Es konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Interventionsgruppen festgestellt werden.

4.1.3.2 log2FD – Vergleiche zwischen den Interventionsphasen

Die log2FD in Tabelle 8 sowie Abbildung 19 stellen die Veränderung der Genexpression von T2 beziehungsweise T3 im Vergleich zur Baseline (T1) dar.

Die Expressionsrate von CYP27A1 verhielt sich in der ersten Hälfte der Interventionsphase stabil. Erst mit zusätzlichem Krafttraining in der zweiten Interventionsphase wurde eine signifikante Reduktion um 21 Prozent bei einer log2FD von -0,362 ($p = 0,010$) in Gruppe 1 festgestellt.

SOD1 zeigte erneut deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede. Während bei Frauen in der Kontrollgruppe eine Steigerung von 45 Prozent von T1 zu T2 ($p = 0,024$) erzielt wurde, die zu T3 anhielt (+43 %; $p = 0,043$), konnte bei Vitamin-D-supplementierenden männlichen Teilnehmern eine Erhöhung von 24 Prozent von T1 zu T2 ($p = 0,026$) beziehungsweise 18 Prozent von T1 zu T3 ($p = 0,049$) beobachtet werden.

Die FOXO1-Expression aller Proband*innen stieg von T1 zu T3 um 21 Prozent ($p = 0,012$), wobei eine Hochregulation von 15 Prozent bereits nach der ersten Interventionsphase erkennbar war.

Für Vitamin-D-supplementierende Männer wurde eine Erhöhung der IGF-1R-Expression von 23 Prozent ermittelt, die über beide Interventionsphasen konstant, aber nur für den Unterschied von T1 zu T3 statistisch signifikant ($p = 0,018$), ausfiel.

MAPRE2 zeigte signifikante Differenzen über die gesamte Stichprobe hinweg, besonders nach Einführung des Krafttrainings (siehe Abbildung 20) und innerhalb der weiblichen Geschlechtsgruppe. Bei Vergleichen mit der Baseline konnte an T3 eine 29-prozentige Hochregulation gezeigt werden ($p = 0,001$). Während alle Interventions- und Geschlechtsgruppen von T1 zu T3 eine um zumindest 20 Prozent erhöhte Expression zeigten, war die Steigerung besonders prominent für Frauen in der Kontrollgruppe mit einem Plus von 50 Prozent ($p = 0,016$) sowie für weibliche Probandinnen insgesamt mit 33 Prozent ($p = 0,005$).

Nrf2 zeigte sich in den Interventions- und Geschlechtsgruppen in der ersten Interventionsphase stabil, wobei

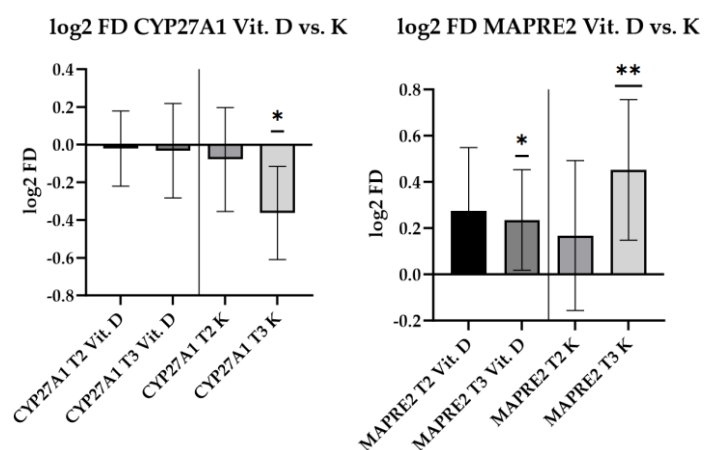


Abbildung 20: log2FD von CYP27A1 und MAPRE2: Vitamin-D-Supplementierung vs. Kontrollgruppe mit 95 % KI als Balken

besonders innerhalb der Kontrollgruppe eminente interindividuelle Unterschiede in der Expression festgestellt wurden. Veränderungen konnten erst nach der zweiten Interventionsphase observiert werden, mit einer signifikanten Reduktion von T2 zu T3 um 16 Prozent für alle Vitamin-D-einnehmenden Proband*innen ($p = 0,006$) und 13 Prozent in der Untergruppe mit monatlicher Gabe ($p = 0,036$). Für Vitamin-D-supplementierende Frauen betrug die Abnahme von T1 zu T3 29 Prozent bei einer log2FD von -0,634 ($p = 0,043$) für Männer in der Kontrollgruppe 30 Prozent mit einer log2FD von -0,673 ($p = 0,043$).

Parameter	Gruppe	T2	Signifikanz	T3	Signifikanz
log2FD ASC	1	0,218±0,37	0,140	0,087±0,28	0,403
	2	-0,107±0,19	0,332	-0,261±0,20	0,083
	3	-0,038±0,27	0,703	-0,009±0,14	0,857
	2+3	-0,016±0,24	0,393	-0,093±0,20	0,129
	gesamt	0,051±0,32	0,487	-0,021±0,24	0,700
log2FD SOD1	1	0,152±0,34	0,248	0,115±0,44	0,481
	2	0,009±0,17	0,921	0,163±0,35	0,418
	3	0,250±0,31	0,053	0,175±0,27	0,110
	2+3	0,170±0,29	0,064	0,171±0,28	0,060
	gesamt	0,163±0,30	0,025	0,148±0,34	0,067
log2FD CYP27A1	1	-0,079±0,33	0,520	-0,362±0,30	0,010
	2	0,047±0,34	0,799	-0,159±0,49	0,560
	3	-0,055±0,32	0,644	0,032±0,36	0,808
	2+3	-0,021±0,31	0,822	-0,032±0,39	0,786
	gesamt	-0,044±0,31	0,536	-0,164±0,39	0,073
log2FD IGF-1R	1	0,103±0,58	0,263	0,493±0,97	0,263
	2	-0,158±0,54	0,715	0,066±0,41	0,715
	3	0,206±0,30	0,123	0,179±0,24	0,093
	2+3	0,085±0,41	0,209	0,041±0,29	0,099
	gesamt	0,092±0,47	0,100	0,282±0,65	0,052
log2FD FOXO1	1	0,175±0,43	0,292	0,367±0,55	0,093
	2	0,056±0,23	0,660	0,155±0,12	0,068
	3	0,193±0,35	0,160	0,093±0,19	0,263
	2+3	0,148±0,31	0,128	0,114±0,17	0,041
	gesamt	0,159±0,35	0,060	0,215±0,38	0,012
log2FD FOXO3	1	-0,100±0,42	0,279	0,211±0,79	1,000
	2	-0,095±0,27	0,537	-0,160±0,34	0,465
	3	0,025±0,21	0,750	-0,061±0,22	0,484
	2+3	-0,015±0,23	0,823	-0,094±0,26	0,272
	gesamt	-0,049±0,23	0,355	0,028±0,54	0,370
log2FD MAPRE2	1	0,168±0,39	0,260	0,452±0,36	0,010
	2	0,383±0,16	0,017	0,264±0,24	0,114
	3	0,219±0,52	0,273	0,221±0,40	0,160
	2+3	0,274±0,43	0,050	0,236±0,34	0,036
	gesamt	0,232±0,41	0,020	0,322±0,36	0,001
log2FD Nrf2	1	0,131±1,22	0,779	0,048±1,35	0,575
	2	0,061±0,13	0,465	-0,283±0,28	0,144
	3	-0,118±0,70	0,575	-0,324±0,71	0,401
	2+3	-0,058±0,57	0,729	-0,310±0,59	0,094
	gesamt	0,017±0,87	0,388	-0,167±0,95	0,071

Tabelle 8: Genexpressionsunterschiede als log2FD in den Interventionsgruppen. 1: Kontrolle, 2: Vitamin D täglich, 3: Vitamin D monatlich (T2: Unterschied zwischen Expression nach Supplementation zu Baseline, T3: Unterschied zwischen Expression nach Supplementation und Training zu Baseline)

4.2 ABCD-Projekt

4.2.1 Verteilung der Proband*innen

Aus dem ABCD-Projekt wurden die Daten aller 90 aufgenommenen Proband*innen analysiert. Die Verteilung der Testpersonen in Fall- und Kontrollgruppe hinsichtlich Alter und Geschlecht ist in Tabelle 9 veranschaulicht.

Der Frauenanteil der 45 Teilnehmenden in der COVID-19-Gruppe lag mit 46,7 Prozent insignifikant niedriger als in der Kontrollgruppe mit 48,9 Prozent. Die Proband*innen waren 24 bis 98 Jahre alt mit einem Durchschnittsalter von 69,1 ($\pm 16,7$) Jahren.

Parameter	gesamt	COVID-19	Kontrolle	Signifikanz
n	90	45	45	
Geschlecht w/m	43/47	21/24	22/23	0,673
Frauenanteil [%]	47,8	46,7	48,9	
Alter [Jahre]	69,1 $\pm$ 16,7	68,7 $\pm$ 16,6	69,5 $\pm$ 17,0	0,826

Tabelle 9: Charakteristika der Proband*innen des ABCD-Projekts

Teilnehmende wurden zur Auswertung, wie in Tabelle 10 dargestellt, nach Alter und Geschlecht in Gruppen eingeteilt.

Gruppe	gesamt	COVID-19	Kontrolle
weiblich < 69 Jahre	20	10	10
weiblich > 69 Jahre	23	11	12
männlich < 69 Jahre	25	13	12
männlich > 69 Jahre	22	11	11

Tabelle 10: Verteilung der Proband*innen des ABCD-Projekts in Alters- und Geschlechtsgruppen

4.2.2 Genexpressionsunterschiede

Tabelle 11 und Abbildung 22 zeigen die mittleren Genexpressionsunterschiede zwischen Personen der COVID-Gruppe und Kontrollgruppe als logarithmierte Fold-Differenzen. Bei insgesamt fünf der analysierten Gene (CCR2, CXCL10, IKK- γ , NF- κ B1 und Nrf2) konnten statistisch signifikante Hochregulationen bei Vorliegen einer SARS-CoV-2-Infektion festgestellt werden.

Die beiden Chemokine CCL2, CXCL10 und der Rezeptor CCR2 zeigten, wie in Abbildung 21 am Beispiel von CCL2, eine größere Expressionsvariabilität innerhalb der COVID-Gruppe vor allem bei Männern und älteren Personen. In Bezug auf CCL2 wurden markante geschlechtsspezifische Differenzen in Form einer 8,0-fach erhöhten Genexpression in der Gruppe der älteren Frauen ($p = 0,047$) sowie 6,8-fach erhöhte Expression für Frauen allgemein ($p = 0,006$) im Vergleich zu ihren gesunden Pendants detektiert, während sich bei

Männern in beiden Altersgruppen eine Dichotomie der Datenpunkte abzeichnete mit einem Cluster unter und über des Expressionslevels der Kontrollgruppe.

Eine 83-prozentige Steigerung ($p = 0,022$) wurde für CCR2 gemessen, die auch, wie in Tabellen 12 und 13 ersichtlich, bei den Untergruppen der Frauen mit 59 Prozent ($p = 0,043$) und Personen unter 69 Jahren um den Faktor 2,1 ($p = 0,039$) statistisch signifikant ausfiel. Für CXCL10 wurden neben einer 4,7-fach höheren Expression innerhalb der COVID-Gruppe für die gesamte Stichprobe ($p = 0,022$) zusätzlich signifikante Ergebnisse mit Zunahmen um den Faktor 5,7 ($p = 0,029$) bei Männern, 4,3 bei jüngeren Männer ($p = 0,038$), 3,6 ($p = 0,029$) bei Frauen und 3,6 ($p = 0,007$) bei Personen unter 69 Jahren dokumentiert. Ebenso zeigten IKK- γ , NF- κ B1 und Nrf2 signifikante Veränderungen in diesen Alters- und Geschlechtsgruppen. Bei Männern wurden Hochregulierungen um 40 Prozent für IKK- γ ($p = 0,041$), 27 Prozent für NF- κ B1 ($p = 0,012$) und 54 Prozent für Nrf2 ($p < 0,001$) festgestellt. Personen unter 69 Jahren exprimierten IKK- γ um 27 ($p = 0,007$), NF- κ B1 um 15 ($p = 0,014$) und Nrf2 um 36 ($p < 0,001$) Prozent häufiger bei vorliegender SARS-CoV-2-Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. In der gesamten Stichprobe waren IKK- γ um 33 ($p = 0,041$), NF- κ B1 um 22 ($p = 0,012$) und Nrf2 um 44 Prozent ($p < 0,001$) hochreguliert. Bei Männern der jüngeren Altersgruppe wurde eine Erhöhung der IKK- γ -Expression um 40 Prozent ($p = 0,011$) sowie der Expression von Nrf2 um 41 Prozent ($p = 0,001$) festgestellt. NF- κ B1 wurde in der Untergruppe der weiblichen Personen unter 69 Jahren mit einem Anstieg von 36 Prozent ($p = 0,004$) vermehrt exprimiert, Nrf2 sogar um 67 Prozent ($p = 0,011$). Nrf2 zeigte auch bei älteren Proband*innen signifikante Veränderungen, speziell in der Untergruppe der Männer mit einer Hochregulation von 68 Prozent ($p = 0,003$). Signifikante Nrf2-Genexpressionsunterschiede zwischen den Gruppen wurden in Abbildung 23 visualisiert.

Parameter	Mittelwert $\pm$ SD	Signifi- kanz	95% KI der Differenz
log2FD CCL2	0,988 $\pm$ 3,48	0,070	[-0,083;2,059]
log2FD CCR2	0,421 $\pm$ 1,16	0,022	[0,063;0,780]
log2FD CXCL10	0,987 $\pm$ 1,96	0,002	[0,383;1,591]
log2FD IKK- γ	0,188 $\pm$ 0,92	0,041	[-0,095;0,471]
log2FD IL6	-0,189 $\pm$ 1,42	0,386	[-0,625;0,247]
log2FD KEAP1	0,017 $\pm$ 0,61	0,440	[-0,171;0,206]
log2FD NF- κ B1	0,196 $\pm$ 0,49	0,012	[0,045;0,348]
log2FD Nrf2	0,418 $\pm$ 0,57	<0,001	[0,242;0,594]
log2FD TNF- α	0,132 $\pm$ 0,98	0,385	[-0,171;0,435]

Tabelle 11: Genexpressionsunterschiede als log2FD

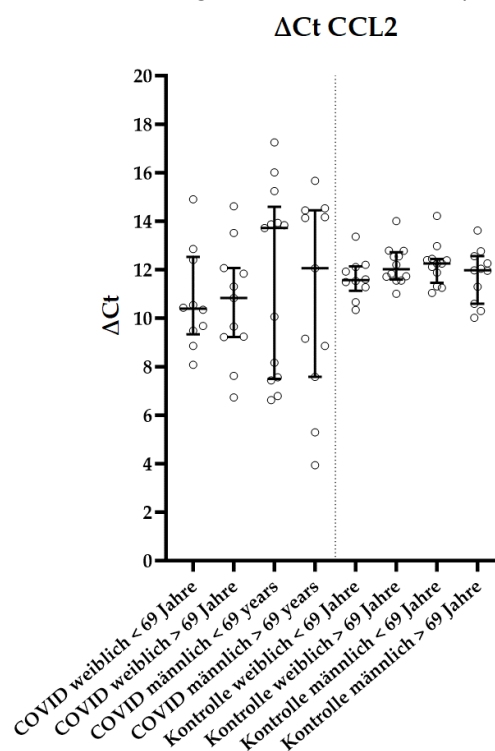


Abbildung 21: Verteilung der Δ Ct-Werte von CCL2 COVID vs. Kontrollgruppe nach Geschlecht und Alter mit Median und Quartilen als Balken dargestellt

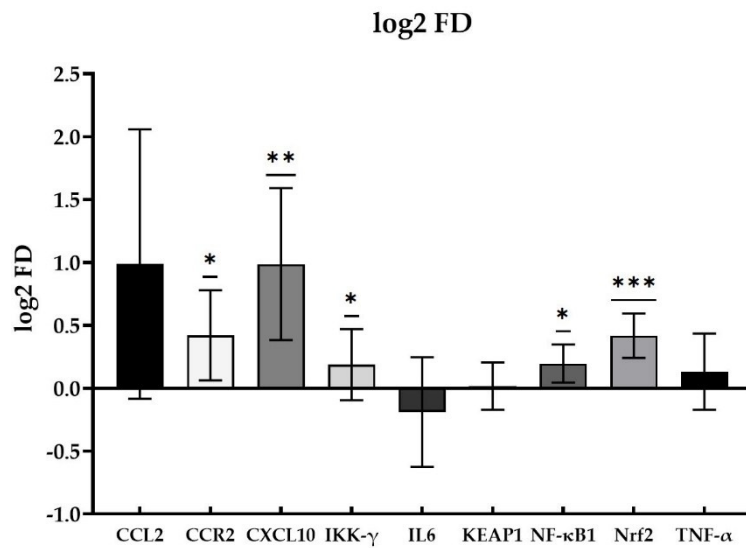


Abbildung 22: Mittlere Genexpressionsunterschiede als log2FD mit 95 % KI als Balken dargestellt

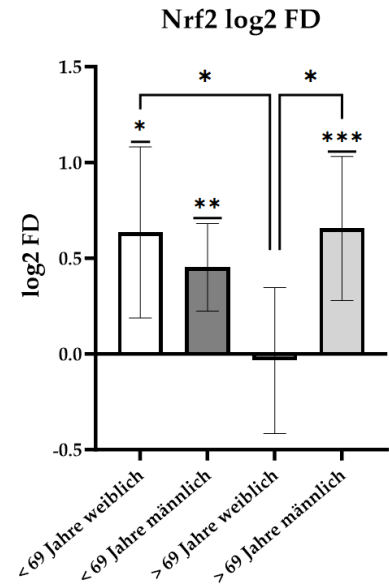


Abbildung 23: Genexpressionsunterschiede von Nrf2 als log2FD nach Alter und Geschlecht mit 95 % KI als Balken dargestellt

Parameter	Geschlecht	Mittelwert ±SD	Signifi- kanz	95% KI der Differenz
log2FD CCL2	weiblich	1,512±2,16	0,006	[0,501;2,523]
	männlich	0,532±4,31	0,523	[-1,334;2,398]
log2FD CCR2	weiblich	0,420±0,86	0,043	[0,015;0,824]
	männlich	0,423±1,39	0,159	[-0,179;1,026]
log2FD CXCL10	weiblich	0,869±1,64	0,029	[0,101;1,636]
	männlich	1,090±2,24	0,029	[0,122;2,057]
log2FD IKK-γ	weiblich	0,001±1,14	0,550	[-0,535;0,537]
	männlich	0,351±0,65	0,017	[0,069;0,632]
log2FD IL6	weiblich	-0,496±1,20	0,079	[-1,056;0,064]
	männlich	0,078±1,56	0,814	[-0,597;0,752]
log2FD KEAP1	weiblich	-0,047±0,61	0,940	[-0,334;0,240]
	männlich	0,074±0,62	0,576	[-0,195;0,342]
log2FD NF-κB1	weiblich	0,150±0,43	0,137	[-0,052;0,351]
	männlich	0,237±0,55	0,049	[0,001;0,473]
log2FD Nrf2	weiblich	0,267±0,65	0,084	[-0,040;0,573]
	männlich	0,550±0,47	<0,001	[0,348;0,752]
log2FD TNF-α	weiblich	0,178±0,67	0,247	[-0,134;0,490]
	männlich	0,092±1,21	0,719	[-0,431;0,615]

Tabelle 12: Genexpressionsunterschiede als log2FD nach Geschlecht

Parameter	Alters- gruppe	Mittelwert ±SD	Signifi- kanz	95% KI der Differenz
log2FD CCL2	< 69 Jahre	0,709±3,28	0,334	[-0,785;2,203]
	> 69 Jahre	1,254±3,71	0,128	[-0,393;2,901]
log2FD CCR2	< 69 Jahre	0,588±1,22	0,039	[0,034;1,142]
	> 69 Jahre	0,263±1,12	0,282	[-0,232;0,757]
log2FD CXCL10	< 69 Jahre	1,043±1,58	0,007	[0,324;1,761]
	> 69 Jahre	0,934±2,31	0,072	[-0,090;1,957]
log2FD IKK-γ	< 69 Jahre	0,371±0,57	0,007	[0,113;0,628]
	> 69 Jahre	0,014±1,15	0,570	[-0,496;0,524]
log2FD IL6	< 69 Jahre	-0,329±1,56	0,347	[-1,041;0,383]
	> 69 Jahre	-0,056±1,28	0,840	[-0,624;0,513]
log2FD KEAP1	< 69 Jahre	0,067±0,67	0,357	[-0,236;0,370]
	> 69 Jahre	-0,030±0,57	0,805	[-0,283;0,222]
log2FD NF-κB1	< 69 Jahre	0,283±0,49	0,014	[0,063;0,504]
	> 69 Jahre	0,113±0,49	0,295	[-0,106;0,333]
log2FD Nrf2	< 69 Jahre	0,531±0,46	<0,001	[0,320;0,742]
	> 69 Jahre	0,310±0,65	0,037	[0,020;0,600]
log2FD TNF-α	< 69 Jahre	0,085±1,07	0,721	[-0,403;0,572]
	> 69 Jahre	0,177±0,92	0,376	[-0,230;0,584]

Tabelle 13: Genexpressionsunterschiede als log2FD nach Altersgruppen

4.2.3 Korrelationen

Durch die Ermittlung von Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten wurde nach starken ($|p| > 0,500$) und zugleich hoch signifikanten ($p < 0,010$) Korrelationen zwischen den Genexpressionswerten gesucht (siehe Tabelle 14).

Eine positive Korrelation konnte zwischen CCL2 und CXCL10 beobachtet werden ($p = 0,791$; $p < 0,001$). Diese war in allen Alters- und Geschlechtsgruppen hoch signifikant, außer den Gruppen der Frauen unter beziehungsweise über 69 Jahren, jedoch besonders ausgeprägt in der Gruppe der älteren Männer ($p = 0,973$; $p < 0,001$).

CCL2 zeigte zusätzlich eine positive Korrelation mit TNF-α ($p = 0,551$; $p < 0,001$). In der Gruppe der Männer ($p = 0,792$; $p < 0,001$), Personen unter 69 Jahren ($p = 0,662$; $p = 0,001$) und vornehmlich bei Männern unter 69 Jahren ($p = 0,881$; $p < 0,001$) wurde diese noch deutlicher festgestellt.

Analog zeigten sich hochsignifikante Zusammenhänge von KEAP1 und TNF-α ($p = 0,658$; $p < 0,001$) besonders innerhalb dieser Gruppen mit einem Spearman-Rho von 0,721 ($p < 0,001$) bei Männern, 0,796 ($p < 0,001$) für jüngere Personen und 0,923 ($p < 0,001$) bei männlichen Probanden unter 69 Jahren.

Eine positive Korrelation fand sich auch zwischen IKK- γ und KEAP1 ($\rho = 0,633$; $p < 0,001$) in beiden Alters- und Geschlechtsgruppen, speziell aber bei weiblichen Teilnehmenden unter 69 Jahren ($\rho = 0,833$; $p = 0,005$) und Männern über 69 Jahren ($\rho = 0,764$; $p = 0,006$). Ebenso zeigten NF- κ B1 und Nrf2 eine positive Korrelation mit einem Spearman-Rho von 0,597 ($p < 0,001$), mit markantester Ausprägung bei jüngeren Frauen ($\rho = 0,900$; $p = 0,001$) sowie älteren Männern ($\rho = 0,836$; $p = 0,001$).

Eine hochsignifikante Korrelation zwischen KEAP1 und Nrf2 konnte bei weiblichen Testpersonen ($\rho = 0,785$; $p < 0,001$), vor allem im Alter unter 69 Jahren ($\rho = 0,917$; $p = 0,001$) nachgewiesen werden.

Gene	Spearman- Rho	Signifi- kanz	95% KI
CCL2 - CXCL10	0,791	<0,001	[0,638;0,884]
CCL2 - TNF-α	0,551	<0,001	[0,293;0,735]
IKK-γ - KEAP1	0,633	<0,001	[0,403;0,787]
IL6 - TNF-α	0,536	<0,001	[0,272;0,725]
KEAP1 - TNF-α	0,658	<0,001	[0,438;0,803]
NF-κB1 - Nrf2	0,597	<0,001	[0,353;0,765]

Tabelle 14: Korrelationen ($|\rho| > 0,500$ und $p < 0,010$) zwischen Genexpressionen als log2FD in der gesamten Stichprobe

5. Diskussion

5.1 „NutriAging D“-Studie

In dieser Masterarbeit wurde eine Teilstichprobe der „NutriAging D“-Studie auf Genexpressionsunterschiede ausgewählter Zielgene zwischen einer Kontrollgruppe mit reiner Calciumsupplementation sowie zwei Interventionsgruppen mit additionaler Gabe von Vitamin D in täglichem oder monatlichem Dosierungsschema jeweils nach vier Wochen Supplementation und infolge von zehnwöchigem Krafttraining analysiert.

Auch wenn aufgrund des Hauptuntersuchungszeitraums von Februar bis Juli eine Erhöhung des Vitamin-D-Spiegels nicht untypisch gewesen wäre, konnten innerhalb der Kontrollgruppe der Teilstichprobe keine Veränderungen über die drei Untersuchungszeitpunkte hinweg detektiert werden. Innerhalb der Vitamin-D-Gruppe mit täglicher Supplementation konnte trotz guter Compliance bei der Einnahme von insgesamt 89.600 IU über den Untersuchungszeitraum hinweg ebenso kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Nur in Interventionsgruppe 3 konnte eine signifikante beziehungsweise hochsignifikante Steigerung der Vitamin-D-Serumkonzentration von respektive $4,15 \pm 3,67$ ng/mL nach Einnahme von 50.000 IU (T1 bis T2) und $16,2 \pm 2,75$ ng/mL von T1 bis T3 nach einer Gesamtdosis von 200.000 IU festgestellt werden.

Obwohl die BMI-Differenzen in dieser Teilstichprobe keine statistische Signifikanz erreichten, gilt es dennoch zu beachten, dass Vitamin-D-Serumkonzentration invers mit BMI und Körperfettmasse korreliert ist (Asghari et al., 2021). Interventionsgruppe 2, deren durchschnittlicher BMI etwa 22 Prozent über Interventionsgruppe 3 lag, erhielt zudem auch eine geringere Vitamin-D-Dosierung.

5.1.1 Vitamin D und Muskel

Myopathie, welche sich primär in proximal gelegenen Muskelschmerzen und -schwäche äußert, ist schon lange als klinisches Zeichen einer Vitamin-D-Hypovitaminose bekannt (Smith & Stern, 1967). Neben Regulation des Calciumstroms in Muskelzellen, welcher substanziell für Muskelkontraktionen ist (Pojednic & Ceglia, 2014), wird auch eine direkte regulatorische Beteiligung von Vitamin D an Myogenese, Zellproliferation und Differenzierung sowie Regulation von Proteinbiosynthese und mitochondrialem Metabolismus in Skelettmuskulatur vermutet (Montenegro et al., 2019). Die Expression des spezifischen intrazellulären Vitamin-D-Rezeptors (VDR) im Muskelgewebe erfährt mit zunehmendem Alter eine Reduktion, worin Bischoff-Ferrari et al. (2004) aufgrund von dessen Einfluss auf die Proteinbiosynthese eine mögliche Erklärung für Muskelatrophie im Alter sehen.

Assoziationen zwischen Vitamin-D-Mangel und verminderter körperlicher Leistungsfähigkeit und Muskelstärke in selbstständig lebenden älteren Personen wurden bereits in zahlreichen Kohortenstudien beobachtet (Aspell et al., 2019; Houston et al., 2007; Sohl et al., 2013; Toffanello et al., 2012).

In randomisierten kontrollierten Studien (RCT) zeigten sich diese Effekte jedoch weniger deutlich ausgeprägt. Vitamin-D-Supplementation über zwölf Monate ohne zusätzliches körperliches Training für ältere Personen (≥ 65 Jahre) mit niedriger Vitamin-D-Serumkonzentration (< 30 ng/mL) zeigte keine signifikanten Verbesserungen gegenüber Placebo in Bein- und Griffstärke, körperlicher Leistungsfähigkeit oder Zusammensetzung der Muskelfasern und deren kontraktile Eigenschaften in einer rezenten RCT mit 136 Teilnehmenden (Houston et al., 2023). Bei Erwachsenen ohne Vitamin-D-Mangel konnten nach zwölfmonatiger Gabe von Vitamin D (420 IU/Tag) zwar Verbesserungen der fettfreien Körpermasse erzielt werden, kardiorespiratorische Fitness und Muskelstärke blieben aber konstant (Sun et al., 2019).

In systematischen Reviews und Metaanalysen von RCTs konnten Antoniak und Greig (2017) sowie Beaudart et al. (2014) eine signifikant positive zusätzliche Wirkung von Vitamin D auf Krafttraining in Bezug auf Muskelstärke feststellen, andere Parameter wie Muskelmasse und Muskelschnellkraft zeigten jedoch keinen signifikanten zusätzlichen Nutzen der Vitamin-D-Einnahme.

5.1.2 SOD1

Neben direktem Einfluss von Vitamin D auf den Skelettmuskel, könnten auch die komplexen Relationen zwischen Vitamin D und oxidativem Stress beziehungsweise antioxidativem Schutz durch Regulation der ROS-Produktion und der damit verbundenen positiven Beeinflussung der Mitochondrienfunktion die Wahrscheinlichkeit von Muskelatrophie verringern (Dzik & Kaczor, 2019).

Studien, welche die Folgen einer Vitamin-D-Intervention auf die SOD-Serumkonzentration erwachsener Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 untersuchten, zeigten entweder keine signifikanten Veränderungen (Shab-Bidar et al., 2014; Yiu et al., 2013) oder einen Anstieg nach Verabreichung von Vitamin D (Nikooyeh et al., 2014). Scholten et al. (2015) konnten bei körperlich aktiven, jüngeren Männern mit größtenteils suffizientem Vitamin-D-Spiegel ebenfalls keinen Effekt auf SOD nachweisen. Nasif et al. (2018) zeigten bei mehrheitlich (73,3 Prozent) männlichen erwachsenen Hämodialysepatient*innen mit sekundärem Hyperparathyreoidismus nach Vitamin-D-Supplementation einen Verlauf analog zu den vorliegenden Daten männlicher Probanden mit initialem Anstieg und über die Interventionsphase stabiler Konzentration von SOD.

5.1.3 Nrf2

Durch körperliche Bewegung generierter oxidativer Stress aktiviert Nrf2 und in weiterer Folge endogene antioxidative Schutzmechanismen, worin Done und Traustadóttir (2016) einen möglichen Ursprung der positiven Auswirkungen von Training auf den menschlichen Organismus sehen. In einer RCT wurden bei älteren Erwachsenen (≥ 60 Jahre) signifikant höhere nukleäre Nrf2-Spiegel gegenüber jüngeren Personen (18-28 Jahre) festgestellt. Nach achtwöchigem aerobem Training reduzierte sich die Nrf2-Proteinexpression verglichen mit einer Kontrollgruppe ohne Training sowohl bei jüngeren als auch älteren Proband*innen. (Ostrom & Traustadóttir, 2020)

Tägliche Vitamin-D-Supplementation mit 10.000-20.000 IU pro Tag über 8 Wochen führte zu einer signifikant höheren Nrf2-Genexpression im Vergleich zu Placebo bei Hämodialysepatient*innen (Sharif, 2022).

Konträr dazu konnte in der vorliegenden Studie eine signifikante Reduktion der Genexpression um 16 Prozent ($p = 0,006$) in der zweiten Interventionsphase bei Vitamin-D-supplementierenden Proband*innen beobachtet werden, ähnlich den Daten zur Proteinexpression von Ostrom und Traustadóttir.

5.1.4 IGF-1R

IGF-1 fördert die Aktivität von 1α -Hydroxylase (CYP27B1), welche die renale Vitamin-D-Produktion reguliert (Esposito et al., 2019). Parallel dazu wurde gezeigt, dass Vitamin D die Vervielfältigung von IGF-1R fördert (Gómez, 2006). Zusätzlich deutet die hohe Anzahl an VDR in Zellen der Hypophyse und Leber, den zentralen IGF-1-Bildungsorten, auf eine regulatorische Rolle von Vitamin D in der Produktion und Sekretion dieses Hormons hin (Kord-Varkaneh et al., 2020). In ihrer umfassenden Metaanalyse konnten Kord-Varkaneh et al. (2020) jedoch nur eine insignifikante Steigerung von IGF-1 nach erfolgter Vitamin-D-Supplementation feststellen. Interessanterweise zeigte sich bei Studien mit einer Vitamin-D-Dosierung von unter 1000 IU/Tag beziehungsweise einer Interventionsdauer von geringer als zwölf Wochen ein signifikanter Anstieg der IGF-1-Konzentration im Vergleich zu höheren Mengen Vitamin D und längeren Einnahmezeiträumen (ebd.). Aus den hier vorliegenden Daten lässt sich für männliche Teilnehmer mit Vitamin-D-Supplementation ein ähnliches Bild für IGF-1R ableiten. Die Dosierungen lagen mit 800 IU/Tag bei täglicher und 1667 IU/Tag bei monatlicher Verabreichung um den postulierten Schwellenwert von 1000 IU herum und es zeigte sich ein initialer Anstieg der Konzentration nach vierwöchiger Vitamin-D-Gabe um 23 Prozent, der sich bis zum dritten Untersuchungszeitpunkt weitgehend konstant hielt.

5.1.5 FOXO1

Hirose et al. (2018) zeigten eine Erhöhung der Expression bei gleichzeitiger Reduktion der Transkriptionsaktivität von FOXO1 nach Vitamin-D-Behandlung von C2C12 Myoblasten. Des Weiteren postulierten die Autor*innen, dass von FOXO1 induzierte Atrophie-assoziierte Gene, nach Hochregulation von deren Expression mittels Glukokortikoidbehandlung, durch Vitamin-D-Einnahme reduziert werden konnten (ebd.). Sechs Monate aerobes Training von über 55-jährigen Afroamerikaner*innen mit leichter kognitiver Beeinträchtigung führten zu einer Steigerung der Genexpression von FOXO1 bei männlichen Probanden (Bedada et al., 2021). Zusätzlich stellten Budzinska et al. (2016) mit zunehmendem Alter eine Verringerung der FOXO1-Expression fest. Die vorliegenden Daten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen, jedoch konnte für alle Teilnehmenden eine signifikante Steigerung der Genexpression nach der Trainingsintervention im Vergleich zur Baseline nachgewiesen werden (+21 %; $p = 0,012$), welche sich in beiden Geschlechtergruppen in ähnlichem Ausmaß zeigte, aber konträr zu den Ergebnissen von Bedada et al. (2021) nur in der Untergruppe der Frauen Signifikanz erreichte (+16 %; $p = 0,036$).

5.1.6 CYP27A1

Für CYP27A1 konnte in einigen Tiermodellen eine Steigerung der Genexpression durch Bewegungsinterventionen beobachtet werden (Ferreira et al., 2017; Presby et al., 2019; Wilund et al., 2008). Vitamin-D-Supplementation induzierte CYP27A1-Expression bei Schweinen mit Hypercholesterinämie (Yin et al., 2015). Khan et al. (2019) konnten jedoch in Prostatatumoren keine Assoziation zwischen Vitamin-D-Spiegel und CYP27A1 feststellen. In den vorliegenden Daten wurde innerhalb der Kontrollgruppe eine deutliche Abnahme der Genexpression in der zweiten Interventionsphase beobachtet, während sich bei Vitamin-D-Einnahme keine Veränderungen zeigten.

5.1.7 MAPRE2

Obwohl statistisch signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen den Gruppen und über den Untersuchungszeitraum hinweg gefunden wurden, erreichten diese keine biologische Relevanz, welche üblicherweise erst ab Steigerungen von 100 Prozent angenommen wird. Die stärksten Ausprägungen zeigten sich für MAPRE2 mit einer 29-prozentigen Zunahme ($p = 0,001$) unter allen Teilnehmenden, insbesondere in der Kontrollgruppe (+41 %; $p = 0,010$) und bei Frauen in der Kontrollgruppe mit einer Erhöhung um 50 Prozent ($p = 0,016$) von T1 zu T3. Zhu et al. (2013) detektierten signifikant geringere Methylierungen an Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) Inseln in der Promotorregion von MAPRE2 bei Jugendlichen mit Vitamin-D-Mangel gegenüber gesunden Kontrollen.

Vermehrte Genexpression durch niedrigere Methylierung des Promotors könnte einen möglichen Grund für die stärkere Hochregulation innerhalb der Kontrollgruppe darstellen.

5.2 ABCD-Projekt

Für das ABCD-Projekt wurden Genexpressionsunterschiede ausgewählter Zielgene zwischen Proband*innen mit SARS-CoV-2-Infektion und in Alter und Geschlecht vergleichbaren gesunden Personen ermittelt.

5.2.1 Chemokine

COVID-19 kann überschießende Entzündungsreaktionen mit erhöhter Expression von Zytokinen wie IL6, TNF- α , CCL2 und CXCL10 und daraus resultierender Aktivierung von Makrophagen auslösen (Merad & Martin, 2020). Diese Vorgänge sind bei der Eradikation des Virus wichtig, Hyperinflammation kann jedoch auch Gewebeschäden vorrangig in der Lunge zur Folge haben, weshalb der Expression von Chemokinen beziehungsweise deren Kontrolle maßgebliche Bedeutung in Prognose und Therapie von COVID-19 beigemessen wird (Khalil, 2021).

Eine hohe CCL2-Expression ist tendenziell mit einem schlechteren COVID-19-Verlauf assoziiert (Hsu et al., 2022) und korreliert insbesondere mit dem Schweregrad der respiratorischen Beeinträchtigung und Gerinnungsstörungen (Nieri et al., 2021).

In den vorliegenden Daten zeigte sich eine hohe Expressionsvariabilität von CCL2 innerhalb der Gruppe mit COVID-19, welche auf Unterschiede im Schweregrad der Infektion zurückzuführen sein könnten. Interessanterweise wurde dies innerhalb beider Altersgruppen deutlicher bei männlichen als weiblichen Teilnehmenden beobachtet.

Für CCL2s Rezeptor CCR2 konnte eine weniger ausgeprägte, aber signifikante Hochregulation von 83 Prozent ($p = 0,022$) in der gesamten Stichprobe detektiert werden.

Huang et al. (2020) stellten fest, dass Personen mit SARS-CoV-2-Infektion hohe CCL2- und CXCL10-Konzentrationen aufwiesen. Zusätzlich wurden bei Patient*innen, welche eine Aufnahme auf die Intensivstation erforderten, höhere Spiegel dieser Chemokine gemessen als bei jenen, die keine Aufnahme benötigten. Die markante positive Korrelation zwischen CCL2 und CXCL10 ($p = 0,791$; $p < 0,001$), welche aus den Daten dieser Arbeit hervorgeht, ist aufgrund ihrer ähnlichen Wirkungsweisen und Expressionsmuster bei COVID-19 plausibel.

Erhöhte Serumkonzentrationen von CXCL10 sind laut Hue et al. (2020) außerdem mit einer höheren Mortalität in COVID-19-Patient*innen verbunden und zeigten sich in dieser Studie innerhalb der gesamten Stichprobe (+373 %; $p = 0,022$) und beiden Geschlechtergruppen (Männer: +473 %; $p = 0,029$ / Frauen: +258 %; $p = 0,029$) deutlich hochreguliert.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass der Grenzwert für biologische Relevanz der Induktion von Chemokinen durch Virusinfektion oft höher als die typischen 100 Prozent angesetzt wird (Wilhelm, 2021).

5.2.2 NF- κ B1 und IKK- γ

NF- κ B stellt einen zentralen Transkriptionsverbindungs- und Signalweg für SARS-CoV-2-induzierte Entzündungsreaktionen dar. Einerseits stimuliert das Virus NF- κ B-Signalgebung auf transkriptioneller, Protein-, posttranslati- und epigenetischer Ebene, andererseits ist NF- κ B für Virusreplikation von SARS-CoV-2 und die anschließende Zytokinreaktion erforderlich (Gudowska-Sawczuk & Mroczko, 2022; Nilsson-Payant et al., 2021). Sohn et al. (2020) und El Kazafy et al. (2023) zeigten höhere Genexpressionen von NF- κ B1 und RelA in COVID-19-Patient*innen verglichen mit gesunden Kontrollpersonen. Sohn et al. (2020) stellten zusätzlich eine signifikante Hochregulation von NF- κ B2 und IKK- γ fest. In der vorliegenden Studie wurde sowohl bei NF- κ B1 (+22 %; $p = 0,012$) als auch IKK- γ (+33 %; $p = 0,041$) eine signifikant gesteigerte Genexpression beobachtet.

Sowohl Alter als auch Geschlecht nehmen Einfluss auf die Expression und Aktivierung von NF- κ B beispielsweise in Form von Immunoseneszenz (der progressiven Verminderung der Potenz des Immunsystems im Alter) und der herunterregulierenden Wirkung von Östrogen auf den NF- κ B-Signalübertragungsweg (Attiq et al., 2021). NF- κ B1 und IKK- γ zeigten in den hier vorliegenden Daten bei älteren sowie weiblichen Personen geringere Expressionsunterschiede von Erkrankten zu Gesunden.

5.2.3 Nrf2

Nrf2 fördert Gewebereparatur, reguliert oxidativen Stress und wirkt antiinflammatorisch, unter SARS-CoV-2-Infektion beispielsweise durch Unterbindung von exzessiver Interferonproduktion. Im Gegensatz dazu kann Nrf2-Mangel zu einer Vermehrung von Angiotensin-konvertierendem Enzym 2 (ACE2) auf Wirtszellen führen, welches durch Bindung an virale Proteine den Eintritt von SARS-CoV-2 ermöglicht. (Cuadrado et al., 2020) Mihić et al. (2022) stellten in einer Untersuchung von 80 Erwachsenen mit symptomatischem COVID-19 fest, dass Personen mit höherem Schweregrad der Infektion geringere Nrf2-Spiegel aufwiesen. Gümüş et al. (2022) konstatierten ähnliche Ergebnisse bei 40 Kindern mit SARS-CoV-2-Infektion, welche geringere Nrf2-Spiegel als ihre 35 gesunden Kontrollen verzeichneten.

Gleichzeitig wurden auch Veränderungen im Nrf2-Signalweg bei COVID-19-Patient*innen in Form einer reduzierten Genexpression von Nrf2-abhängigen antioxidativ wirkenden Genen detektiert (Olagnier et al., 2020).

In der vorliegenden Studie zeigte sich eine hochsignifikant, jedoch nicht sehr ausgeprägt hochregulierte Genexpression von Nrf2 insbesondere bei jüngeren Personen (+36 %; $p < 0,001$) und Männern (+54 %; $p < 0,001$).

Emanuele et al. (2021) postulierten eine Hochregulation von Nrf2 als initiale zelluläre Reaktion auf eine beginnende SARS-CoV-2-Infektion und eine Abnahme der Nrf2-Konzentration nach erfolgter Virusvermehrung.

Unterschiede zwischen beziehungsweise Schwankungen in Genexpressionslevel, Proteinkonzentration und Signalweg könnten auch durch Nrf2-Degradation, Blockierung der nukleären Translokation, posttranskriptionale Modifikationen und Zunahme spezifischer regulatorischer miRNAs begründet sein (Zhang et al., 2015).

5.3 Limitationen

Wie jeder wissenschaftlichen Studie sind auch dieser Arbeit bestimmte Einschränkungen und Verbesserungspotenziale inhärent.

Methodische Verbesserungen könnten in Form einer zusätzlichen „no-reverse transcriptase control (NRTC)“ erfolgen, welche mit allen Reaktionskomponenten exklusive RT durchgeführt wird. Diese stellt, neben intelligentem Design der Primerpaare (Überspannung einer Exon-Exon-Verbindungsstelle oder Hybridisierung von Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit ungleichen Exons) und Behandlung der RNA mit DNase, eine weitere Kontrollinstanz dar, um unerwünschte co-Amplifikation von gDNA erkennen und vermeiden zu können. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014)

Bei der Interpretation von Ergebnissen der „NutriAging D“-Studie in dieser Arbeit gilt es zu beachten, dass es sich lediglich um eine Teilstichprobe handelt und daher die Stichprobengröße begrenzt ist. Interventionsgruppe 2 war mit lediglich 4 Proband*innen die kleinste Gruppe dieser Teilstichprobe. Eine höhere Anzahl an Proband*innen erlaubt präzisere Darstellung kleinerer Effekte, wie sie in der vorliegenden Studie beobachtet wurden und steigert die Aussagekraft, Robustheit und externe Validität der Ergebnisse.

Außerdem wurden Studiendaten der „NutriAging D“-Studie nicht für Faktoren wie Alter oder Geschlecht korrigiert, gleiches gilt für das ABCD-Projekt für weitere Faktoren wie anthropometrische Daten oder Lebensstilfaktoren, was Confounding-Effekte oder verzerrte Resultate zur Folge haben könnte.

6. Schlussfolgerung

6.1 „NutriAging D“-Studie

Die Diskrepanz zwischen dem in Kohortenstudien gezeigten Einfluss des Vitamin-D-Spiegels auf Muskelstärke und physische Leistungsfähigkeit im Alter (Aspell et al., 2019; Houston et al., 2007; Sohl et al., 2013; Toffanello et al., 2012) und den ambivalenten Ergebnissen von RCTs (Houston et al., 2023; Sun et al., 2019) deutet auf weiteren Forschungsbedarf hinsichtlich Kausalität und zugrundeliegender molekularer Mechanismen dieser Zusammenhänge hin.

In dieser Studie konnten geringe, aber signifikante Genexpressionseffekte von Vitamin D- und Calciumsupplementation sowie Krafttraining auf eine kleine Stichprobe (n = 20) selbstständig lebender älterer Personen mit insuffizienter Vitamin-D-Serumkonzentration beobachtet werden. Die deutlichsten Expressionsunterschiede infolge der durchgeführten Interventionen zeigten sich bei den Genen FOXO1 und MAPRE2 mit einem Anstieg von T1 zu T3 in der gesamten Stichprobe um 21 Prozent (p = 0,012) und 29 Prozent (p = 0,001), respektive, sowie CYP27A1 mit einer Reduktion von 21 Prozent (p = 0,010) in der Kontrollgruppe, bei konstanten Werten von Vitamin-D-supplementierenden Proband*innen. Zwischen täglichem und monatlichem Verabreichungsschema konnten keine signifikanten Unterschiede in der gesamten Stichprobe festgestellt werden. Die markanteste Erhöhung wurde bei MAPRE2 mit einer Steigerung um 50 Prozent (p = 0,016) von T1 zu T3 für Frauen in der Kontrollgruppe detektiert.

6.2 ABCD-Projekt

Im Genexpressionsvergleich von 45 COVID-19-Patient*innen mit 45 geschlechts- und altersentsprechenden gesunden Kontrollen erreichte die Hochregulation der untersuchten Chemokine CXCL10, CCL2 und dessen Rezeptor CCR2 biologische Relevanz. Für CXCL10 wurde eine 4,7-fach (p = 0,022) höhere Expression bei Personen mit SARS-CoV-2-Infektion verzeichnet besonders prominent in der Gruppe der Männer mit einer Steigerung um den Faktor 5,7 (p = 0,029).

CCL2 zeigte sich in der Gruppe der Frauen 6,8-fach (p = 0,006) durch SARS-CoV-2 hochreguliert, bei Frauen über 69 Jahren 8,0-fach (p = 0,047). Die beobachtete Dichotomie bei männlichen COVID-19-Patienten in beiden Altersgruppen mit einem Cluster unter beziehungsweise über dem Expressionslevel der Kontrollgruppe könnte einen Ansatz für weitere Forschung darstellen.

In der gesamten Stichprobe wurde eine Hochregulation von CCR2 durch SARS-CoV-2 um 83 Prozent (p = 0,022) detektiert, speziell bei Personen unter 69 Jahren um den Faktor 2,1 (p = 0,039).

Die stärkste höchst signifikante ($p < 0,001$) Korrelation wurde zwischen den beiden Chemokinen CCL2 und CXCL10 mit einem Spearman-Rho von 0,791 in der gesamten Stichprobe und 0,973 in der Untergruppe der über 69-jährigen Männer festgestellt.

Höchst signifikante, wenn auch geringere Genexpressionsunterschiede wurden für Nrf2 mit Hochregulation von 44 Prozent durch COVID-19 in der gesamten Stichprobe und 54 Prozent für Männer identifiziert. Insbesondere Männer über 69 Jahre mit 68 Prozent ($p = 0,003$) sowie Frauen unter 69 Jahren mit 67 Prozent ($p = 0,011$) wiesen eine markant gesteigerte Nrf2-Expression im Vergleich zu gesunden Pendants auf. Weitere Studien bezüglich der diametralen Ausprägungen von Genexpression und Proteinkonzentration von Nrf2 bei SARS-CoV-2-Infektionen könnten zum besseren Verständnis dieser Erkrankung beitragen.

7. Zusammenfassung

Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden potenzielle alleinige Effekte von täglicher beziehungsweise monatlicher Vitamin-D-Supplementation sowie Effekte von Vitamin-D-Gabe bei zusätzlichem Krafttraining auf die Genexpression 20 selbstständig lebender Personen zwischen 65 und 81 Jahren mit insuffizienter Vitamin-D-Serumkonzentration (≤ 30 ng/mL) aus der „NutriAging D“-Studie analysiert.

Zusätzlich wurden im Rahmen des ABCD-Projekts Expressionslevels von 45 COVID-19-Patient*innen mit 45 geschlechts- und altersentsprechenden gesunden Kontrollen verglichen, um eventuell durch SARS-CoV-2-induzierte Unterschiede zu quantifizieren und mögliche Korrelationen zwischen Genen zu identifizieren.

Methoden

Hierzu wurden für insgesamt 18 Gene Primerpaare erstellt und evaluiert. Aus venösen Blutproben extrahierte RNA wurde einer reversen Transkription unterzogen und die Genexpressionslevels anschließend mittels qPCR analysiert.

Ergebnisse

Innerhalb der Teilstichprobe der „NutriAging D“-Studie konnten deutliche Expressionsunterschiede der Gene FOXO1 und MAPRE2 mit einem Anstieg in der gesamten Stichprobe über den vollen Untersuchungszeitraum hinweg um 21 Prozent ($p = 0,012$) und 29 Prozent ($p = 0,001$), respektive, sowie CYP27A1 mit einer Reduktion von 21 Prozent ($p = 0,010$) in der Kontrollgruppe und konstanten Werten bei Vitamin-D-Supplementation festgestellt werden. Zwischen täglichem und monatlichem Dosierungsschema konnten keine signifikanten Unterschiede in der gesamten Stichprobe gezeigt werden.

Im ABCD-Projekt wurden relevante Hochregulationen sowie eine höhere Expressionsvariabilität der Chemokine CXCL10, CCL2 und des Rezeptors CCR2 bei COVID-19-Patient*innen beobachtet. CCL2 und CXCL10 zeigten mit einem Spearman-Rho von 0,791 ($p < 0,001$) auch die stärkste Korrelation. Schwächer ausgeprägte Genexpressionsdifferenzen wurden für NF- κ B1 (+22 %; $p = 0,012$), IKK- γ (+33 %; $p = 0,041$) und Nrf2 (+44 %; $p < 0,001$) eruiert.

Schlussfolgerung

Obwohl zwischen den beiden Vitamin-D-Verabreichungsschemata keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden, konnten Effekte der Interventionen in FOXO1-, MAPRE2- und CYP27A1-Expression detektiert werden.

SARS-CoV-2-Infektionen sind mit einer höheren Genexpression von CCL2, CXCL10, CCR2, NF- κ B1, IKK- γ und Nrf2 assoziiert.

8. Summary

Introduction

In the current work, potential sole effects of daily or monthly vitamin D supplementation as well as additional effects of vitamin D administration with resistance training on the gene expression of 20 community-dwelling older adults between 65 and 81 years of age with insufficient vitamin D levels (≤ 30 ng/mL) from the “NutriAging D” study were analysed.

Furthermore, as part of the ABCD project, expression levels of 45 COVID-19 patients were compared with 45 gender- and age-matched healthy controls to quantify potential differences induced by SARS-CoV-2 and to identify possible correlations between the genes.

Methods

For this purpose, primer pairs were designed and evaluated for a total of 18 genes. RNA extracted from venous blood samples was converted to cDNA via reverse transcription and gene expression levels were then analysed using qPCR.

Results

Within the subsample of the “NutriAging D” study, significant differences in expression of the genes FOXO1 and MAPRE2 were observed, with an increase in the entire sample over the full study period of 21 percent ($p = 0.012$) and 29 percent ($p = 0.001$), respectively. CYP27A1 showed a reduction of 21 percent ($p = 0.010$) in the control group but constant levels under vitamin D supplementation. No significant differences were found between daily and monthly supplementation regimens in the whole sample.

In the ABCD project, relevant upregulation and higher expression variability of the chemokines CXCL10, CCL2 and the receptor CCR2 were detected in COVID-19 patients. CCL2 and CXCL10 also showed the strongest correlation with a Spearman’s rho of 0.791 ($p < 0.001$). Less pronounced gene expression differences were determined for NF- κ B1 (+22%; $p = 0.012$), IKK- γ (+33%; $p = 0.041$) and Nrf2 (+44%; $p < 0.001$).

Conclusion

Although no significant differences were found between the two vitamin D administration schedules, effects of the interventions could be identified for FOXO1, MAPRE2 and CYP27A1 expression.

SARS-CoV-2 infection is associated with higher gene expression of CCL2, CXCL10, CCR2, NF- κ B1, IKK- γ and Nrf2.

Literaturverzeichnis

- Abdul Rahman, A., Abdul Karim, N., Abdul Hamid, N. A., Harun, R., & Wan Ngah, W. Z. (2013). Senescence-Related Changes in Gene Expression of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Octo/Nonagenarians Compared to Their Offspring. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 189129. <https://doi.org/10.1155/2013/189129>
- Alikhani, M., Alikhani, Z., & Graves, D. T. (2005). FOXO1 functions as a master switch that regulates gene expression necessary for tumor necrosis factor-induced fibroblast apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12096-12102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412171200>
- Andersen, C. L., Gundesen, C., & Adolf, K. (2010). Documentation for NormFinder version 20.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245-5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-0496>
- Angiolillo, A. L., Sgadari, C., Taub, D. D., Liao, F., Farber, J. M., Maheshwari, S., Kleinman, H. K., Reaman, G. H., & Tosato, G. (1995). Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(1), 155-162. <https://doi.org/10.1084/jem.182.1.155>
- Antoniak, A. E., & Greig, C. A. (2017). The effect of combined resistance exercise training and vitamin D3 supplementation on musculoskeletal health and function in older adults: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 7(7), e014619. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-014619>
- Aschauer, R., Unterberger, S., Zöhrer, P. A., Draxler, A., Franzke, B., Strasser, E.-M., Wagner, K.-H., & Wessner, B. (2022). Effects of Vitamin D3 Supplementation and Resistance Training on 25-Hydroxyvitamin D Status and Functional Performance of Older Adults: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*, 14(1), 86. <https://doi.org/10.3390/nu14010086>
- Asghari, S., Hamed-Shahraki, S., & Amirkhizi, F. (2021). Vitamin D status and systemic redox biomarkers in adults with obesity. *Clinical Nutrition ESPEN*, 45, 292-298. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.07.032>
- Aspell, N., Laird, E., Healy, M., Lawlor, B., & O'Sullivan, M. (2019). Vitamin D Deficiency Is Associated With Impaired Muscle Strength And Physical Performance In Community-Dwelling Older Adults: Findings From The English Longitudinal Study Of Ageing. *Clinical Interventions in Aging*, 14, 1751-1761. <https://doi.org/10.2147/CIA.S222143>
- Attig, A., Yao, L. J., Afzal, S., & Khan, M. A. (2021). The triumvirate of NF-κB, inflammation and cytokine storm in COVID-19. *International Immunopharmacology*, 101 (Pt B), 108255. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108255>
- Bailey, C. L., Birch, L., & McDowell, D. G. (2008). PCR: Factors Affecting Reliability and Validity. In J. T. Keer & L. Birch (Eds.), *Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach* (pp. 101-131). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847558213-00101>
- Bamias, G., Goukos, D., Laoudi, E., Balla, I. G., Siakavellas, S. I., Daikos, G. L., & Ladas, S. D. (2013). Comparative study of candidate housekeeping genes for quantification of target gene messenger RNA expression by real-time PCR in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(13), 2840-2847. <https://doi.org/10.1097/01.mib.0000435440.22484.e8>
- Baserga, R. (1999). The IGF-I receptor in cancer research. *Experimental Cell Research*, 253(1), 1-6. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4667>

- Beaudart, C., Buckinx, F., Rabenda, V., Gillain, S., Cavalier, E., Slomian, J., Petermans, J., Reginster, J.-Y., & Bruyère, O. (2014). The effects of vitamin D on skeletal muscle strength, muscle mass, and muscle power: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(11), 4336-4345. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1742>
- Bedada, F. B., Ntekim, O. E., O., E., Fungwe, T. V., Nadarajah, S. R., & Obisesan, T. O. (2021). Exercise Training-Increased FBXO32 and FOXO1 in a Gender-Dependent Manner in Mild Cognitively Impaired African Americans: GEMS-1 Study. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13(641758). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.641758>
- Bertoni, A. P. S., Iser, I. C., de Campos, R. P., & Wink, M. R. (2020). Normalization in Human Glioma Tissue. In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (2 ed., Vol. 2065, pp. 175-190). Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_13
- Biassoni, R., & Raso, A. (2020). A Quarter Century of PCR-Applied Techniques and Their Still-Increasing Fields of Use. In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (2 ed., Vol. 2065, pp. 1-4). Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_1
- Bikle, D. D. (2014). Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry and Biology*, 21(3), 319-329. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>
- Bischoff-Ferrari, H. A., Borchers, M., Gudat, F., Dürmüller, U., Stähelin, H. B., & Dick, W. (2004). Vitamin D receptor expression in human muscle tissue decreases with age. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(2), 265-269. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2004.19.2.265>
- Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, 214(2), 149-160. <https://doi.org/10.1002/path.2287>
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*, 16(7), 407-420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
- Budzinska, M., Owczar, M., Pawlik-Pachucka, E., Roszkowska-Gancarz, M., Slusarczyk, P., & Puzianowska-Kuznicka, M. (2016). miR-96, miR-145 and miR-9 expression increases, and IGF-1R and FOXO1 expression decreases in peripheral blood mononuclear cells of aging humans. *BMC Geriatrics*, 16(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12877-016-0379-y>
- Bunnell, T. M., Burbach, B. J., Shimizu, Y., & Ervasti, J. M. (2011). β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular Biology of the Cell*, 22(21), 4047-4058. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-06-0582>
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169-193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), 597-601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>
- Bustin, S. A., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>

- Bustin, S. A., Mueller, R., & Nolan, T. (2020). Parameters for Successful PCR Primer Design. In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (2 ed., Vol. 2065, pp. 5-22). Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2
- Bustin, S. A., & Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, 15(3), 155-166.
- Chapman, J. R., & Waldenström, J. (2015). With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLOS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141853>
- Charo, I. F., & Taubman, M. B. (2004). Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circulation Research*, 95(9), 858-866. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000146672.10582.17>
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology letters*, 35(10), 1541-1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Cruceriu, D., Baldasici, O., Balacescu, O., & Berindan-Neagoe, I. (2020). The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cellular Oncology*, 43(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00489-1>
- Cuadrado, A., Pajares, M., Benito, C., Jiménez-Villegas, J., Escoll, M., Fernández-Ginés, R., Garcia Yagüe, A. J., Lastra, D., Manda, G., Rojo, A. I., & Dinkova-Kostova, A. T. (2020). Can Activation of NRF2 Be a Strategy against COVID-19? *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(9), 598-610. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.07.003>
- D'haene, B., Vandesompele, J., & Hellems, J. (2010). Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods*, 50(4), 262-270. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.007>
- De Keyser, E., Desmet, L., Losschaert, M., & De Riek, J. (2020). A General Protocol for Accurate Gene Expression Analysis in Plants. In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (2 ed., Vol. 2065, pp. 105-118). Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_9
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*, 3(3), 30-37. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.s30>
- Dominy, K., Mokretar, K., Reid, A. G., & Khorashad, J. S. (2020). Molecular Monitoring of Chronic Myeloid Leukemia. In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (2 ed., Vol. 2065, pp. 153-173). Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_12
- Done, A. J., & Traustadóttir, T. (2016). Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biology*, 10, 191-199. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.003>
- Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bishop, E. S., Strouse, R. J., Schenerman, M. A., & Geddes, C. D. (2012). SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*, 22(4), 1189-1199. <https://doi.org/10.1007/s10895-012-1059-8>
- Drewes, G., Ebner, A., & Mandelkow, E.-M. (1998). MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(8), 307-311. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01245-6](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01245-6)
- Dzik, K. P., & Kaczor, J. J. (2019). Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. *European Journal of Applied Physiology*, 119(4), 825-839. <https://doi.org/10.1007/s00421-019-04104-x>

- Eijkelenboom, A., & Burgering, B. M. T. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(2), 83-97.
<https://doi.org/10.1038/nrm3507>
- El Kazafy, S. A., Fouad, Y. M., Said, A. F., Assal, H. H., Ahmed, A. E., El Askary, A., Ali, T. M., & Ahmed, O. M. (2023). Relation between Cytokine Levels and Pulmonary Dysfunction in COVID-19 Patients: A Case-Control Study. *Journal of Personalized Medicine*, 13(1), 34.
<https://doi.org/10.3390/jpm13010034>
- Elbrecht, V., Hebert, P. D. N., & Steinke, D. (2018). Slippage of degenerate primers can cause variation in amplicon length. *Scientific Reports*, 8(10999).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29364-z>
- Elkins, K. M. (2015). Primer Design for PCR Reactions in Forensic Biology. In C. Basu (Ed.), *PCR Primer Design* (2 ed., Vol. 1275, pp. 17-30). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_2
- Emanuele, S., Celesia, A., D'Anneo, A., Lauricella, M., Carlisi, D., De Blasio, A., & Giuliano, M. (2021). The Good and Bad of Nrf2: An Update in Cancer and New Perspectives in COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7963.
<https://doi.org/10.3390/ijms22157963>
- Escher, G., Krozowski, Z., Croft, K. D., & Sviridov, D. (2003). Expression of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) enhances cholesterol efflux. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11015-11019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212780200>
- Esposito, S., Leonardi, A., Lanciotti, L., Cofini, M., Muzi, G., & Penta, L. (2019). Vitamin D and growth hormone in children: a review of the current scientific knowledge. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1840-4>
- Fernandes, R., & Skiena, S. (2007). MultiPrimer: A System for Microarray PCR Primer Design. In A. Yuryev (Ed.), *PCR Primer Design* (1 ed., Vol. 402, pp. 305-314). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_15
- Ferreira, G. S., Pinto, P. R., Iborra, R. T., Del Bianco, V., Santana, M. F. M., Nakandakare, E. R., Nunes, V. S., Negrão, C. E., Catanozi, S., & Passarelli, M. (2017). Aerobic Exercise Training Selectively Changes Oxysterol Levels and Metabolism Reducing Cholesterol Accumulation in the Aorta of Dyslipidemic Mice. *Frontiers in Physiology*, 8(644).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00644>
- Galvan, V., Logvinova, A., Sperandio, S., Ichijo, H., & Bredesen, D. E. (2003). Type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). *The Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 13325-13332.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M211398200>
- Gómez, J. M. (2006). The role of insulin-like growth factor I components in the regulation of vitamin D. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(2), 125-132.
<https://doi.org/10.2174/138920106776597621>
- Gu, Y., Tang, S., Wang, Z., Cai, L., Lian, H., Shen, Y., & Zhou, Y. (2021). A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of β -actin (ACTB) in human cancers. *Bioengineered*, 12(1), 6166-6185. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1973220>
- Gudowska-Sawczuk, M., & Mroczko, B. (2022). The Role of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in Development and Treatment of COVID-19: Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5283. <https://doi.org/10.3390/ijms23095283>
- Gümüş, H., Erat, T., Öztürk, İ., Demir, A., & Koyuncu, I. (2022). Oxidative stress and decreased Nrf2 level in pediatric patients with COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 94(5), 2259-2264. <https://doi.org/10.1002/jmv.27640>
- Hao, Q., Vadgama, J. V., & Wang, P. (2020). CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00589-8>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2012). NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes and Development*, 26(3), 203-234.
<https://doi.org/10.1101/gad.183434.111>

- Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199-218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
- He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4777. <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
- Hellemans, J., & Vandesompele, J. (2014). Selection of Reliable Reference Genes for RT-qPCR Analysis. In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (1 ed., Vol. 1160, pp. 19-26). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0733-5_3
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology*, 10(4), 413-417. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, 11(9), 1026-1030. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
- Hirose, Y., Onishi, T., Miura, S., Hatazawa, Y., & Kamei, Y. (2018). Vitamin D Attenuates FOXO1-Target Atrophy Gene Expression in C2C12 Muscle Cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64(3), 229-232. <https://doi.org/10.3177/jnsv.64.229>
- Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, 12(86). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S.-i., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 49(7), 1215-1228. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
- Houston, D. K., Cesari, M., Ferrucci, L., Cherubini, A., Maggio, D., Bartali, B., Johnson, M. A., Schwartz, G. G., & Kritchevsky, S. B. (2007). Association between vitamin D status and physical performance: the InCHIANTI study. *The Journals of Gerontology*, 62(4), 440-446. <https://doi.org/10.1093/gerona/62.4.440>
- Houston, D. K., Marsh, A. P., Neiberg, R. H., Demons, J. L., Campos, C. L., Kritchevsky, S. B., Delbono, O., & Tooze, J. A. (2023). Vitamin D Supplementation and Muscle Power, Strength and Physical Performance in Older Adults: A Randomized Controlled Trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 117(6), 1086-1095. <https://doi.org/10.1016/j.ajcnut.2023.04.021>
- Hsu, R.-J., Yu, W.-C., Peng, G.-R., Ye, C.-H., Hu, S., Chong, P. C. T., Yap, K. Y., Lee, J. Y. C., Lin, W.-C., & Yu, S.-H. (2022). The Role of Cytokines and Chemokines in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infections. *Frontiers in Immunology*, 13, 832394. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.832394>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., . . . Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223), 497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Hue, S., Beldi-Ferchiou, A., Bendib, I., Surenaud, M., Fourati, S., Frapard, T., Rivoal, S., Razazi, K., Carreaux, G., Delfau-Larue, M. H., Mekontso-Dessap, A., Audureau, E., & de Prost, N. (2020). Uncontrolled Innate and Impaired Adaptive Immune Responses in Patients with COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 202(11), 1509-1519. <https://doi.org/10.1164/rccm.202005-1885OC>
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. A., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6(4), 279-284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>

- Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS Journal*, 285(16), 2944-2971. <https://doi.org/10.1111/febs.14466>
- Idriss, H. T., & Naismith, J. H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, 50(3), 184-195. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H)
- Information, N. C. f. B. (2024). *RPS9 ribosomal protein S9 [Homo sapiens (human)]*. Retrieved 14. Mai 2024 from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6203>
- Jang, D.-i., Lee, A.-H., Shin, H.-Y., Song, H.-R., Park, J.-H., Kang, T.-B., Lee, S.-R., & Yang, S.-H. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
- Kang, S., Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2019). Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity*, 50(4), 1007-1023. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.026>
- Keer, J. T. (2008). Quantitative Real-time PCR Analysis. In J. T. Keer & L. Birch (Eds.), *Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach* (pp. 132-166). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847558213-00132>
- Khalil, B. A., Elemam, N. M., & Maghazachi, A. A. (2021). Chemokines and chemokine receptors during COVID-19 infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 976-988. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.034>
- Khan, N. A., Stopsack, K. H., Allott, E. H., Gerke, T., Giovannucci, E. L., Mucci, L. A., & Kantoff, P. W. (2019). Intratumoral Sterol-27-Hydroxylase (CYP27A1) Expression in Relation to Cholesterol Synthesis and Vitamin D Signaling and Its Association with Lethal Prostate Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 28(6), 1052-1058. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-1083>
- Kim, J.-E., You, D.-J., Lee, C., Ahn, C., Seong, J. Y., & Hwang, J.-I. (2010). Suppression of NF- κ B signaling by KEAP1 regulation of IKK β activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cellular Signalling*, 22(11), 1645-1654. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.06.004>
- Kirchner, B., Paul, V., Riedmaier, I., & Pfaffl, M. W. (2014). mRNA and microRNA Purity and Integrity: The Key to Success in Expression Profiling. In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (1 ed., Vol. 1160, pp. 43-53). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0733-5_5
- Kishimoto, T., Akira, S., & Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*, 258(5082), 593-597. <https://doi.org/10.1126/science.1411569>
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., & Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of molecular biology*, 56(2), 341-361. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90469-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90469-4)
- Kord-Varkaneh, H., Rinaldi, G., Hekmatdoost, A., Fatahi, S., Tan, S. C., Shadnough, M., Khani, V., Mousavi, S. M., Zarezadeh, M., Salamat, S., Bawadi, H., & Rahmani, J. (2020). The influence of vitamin D supplementation on IGF-1 levels in humans: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, 57(100996). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100996>
- Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 397-411. <https://doi.org/10.1038/nri3452>
- Laurell, H., Iacovoni, J. S., Abot, A., Svec, D., Maoret, J.-J., Arnal, J.-F., & Kubista, M. (2012). Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime. *Nucleic Acids Research*, 40(7), e51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1259>

- Lee, D.-F., Kuo, H.-P., Liu, M., Chou, C. K., Xia, W., Du, Y., Shen, J., Chen, C.-T., Huo, L., Hsu, M.-C., Li, C.-W., Ding, Q., Liao, T.-L., Lai, C.-C., Lin, A.-C., Chang, Y.-H., Tsai, S.-F., Li, L.-Y., & Hung, M.-C. (2009). KEAP1 E3 Ligase-Mediated Down-Regulation of NF- κ B Signaling by Targeting IKK β . *Molecular Cell*, 36(1), 131-140.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.025>
- Lim, J., Shin, S. G., Lee, S., & Hwang, S. (2011). Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 5(1), 28-39. <https://doi.org/10.1007/s11783-011-0302-x>
- Lippi, G., Sanchis-Gomar, F., & Montagnana, M. (2014). Biological Markers in Older People at Risk of Mobility Limitations. *Current Pharmaceutical Design*, 20(19), 3222-3244.
<https://doi.org/10.2174/13816128113196660697>
- Livak, K. J., & Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 401-426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- Mallona, I., Weiss, J., & Marcos, E.-C. (2011). pcrEfficiency: a Web tool for PCR amplification efficiency prediction. *BMC Bioinformatics*, 12, 404.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-404>
- Marshall, O. (2007). Graphical Design of Primers with PerlPrimer. In A. Yuryev (Ed.), *PCR Primer Design* (1 ed., Vol. 402, pp. 403-414). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_21
- Maubach, G., Schmädicke, A.-C., & Naumann, M. (2017). NEMO Links Nuclear Factor- κ B to Human Diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 23(12), 1138-1155.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.10.004>
- Maza-Márquez, P., Aranda, E., González-López, J., & Rodelas, B. (2020). Evaluation of the Abundance of Fungi in Wastewater Treatment Plants Using Quantitative PCR (qPCR). In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (2 ed., Vol. 2065, pp. 79-94). Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_7
- Merad, M., & Martin, J. C. (2020). Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nature Reviews. Immunology*, 20(6), 355-362.
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>
- Mészáros, É. (2022). *How to design primers for PCR*. Retrieved 23. Mai 2024 from <https://www.integra-biosciences.com/china/en/blog/article/how-design-primers-pcr>
- Mihić, D., Loinjak, D., Maričić, L., Smolić, R., Šahinović, I., Steiner, K., Viland, S., Šerić, V., & Duvnjak, M. (2022). The Relationship between Nrf2 and HO-1 with the Severity of COVID-19 Disease. *Medicina*, 58(11), 1658. <https://doi.org/10.3390/medicina58111658>
- Miller, M. C., & Mayo, K. H. (2017). Chemokines from a Structural Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2088. <https://doi.org/10.3390/ijms18102088>
- Molecular Probes Inc. (2006). SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain.
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp07567.pdf>
- Montenegro, K. R., Cruzat, V., Carlessi, R., & Newsholme, P. (2019). Mechanisms of vitamin D action in skeletal muscle. *Nutrition Research Reviews*, 32(2), 192-204.
<https://doi.org/10.1017/S0954422419000064>
- Morier, D. (2024). reverse transcriptase. In The Editors of Encyclopaedia Britannica (Ed.), *Encyclopaedia Britannica*: Encyclopaedia Britannica, Inc.
- Morris, B. J., Willcox, D. C., Donlon, T. A., & Willcox, B. J. (2015). FOXO3: A Major Gene for Human Longevity--A Mini-Review. *Gerontology*, 61(6), 515-525.
<https://doi.org/10.1159/000375235>

- Muchtaridi, M., Amirah, S. R., Harmonis, J. A., & Ikram, E. H. K. (2022). Role of Nuclear Factor Erythroid 2 (Nrf2) in the Recovery of Long COVID-19 Using Natural Antioxidants: A Systematic Review. *Antioxidants*, 11(8), 1551. <https://doi.org/10.3390/antiox11081551>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, 51 Pt 1, 263-273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Mussack, V., Hermann, S., Buschmann, D., Kirchner, B., & Pfaffl, M. W. (2020). MIQE-Compliant Validation of MicroRNA Biomarker Signatures Established by Small RNA Sequencing. In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (2 ed., Vol. 2065, pp. 23-38). Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_3
- Nasif, W. A., Mukhtar, M. H., El-Emshaty, H. M., & Alwazna, A. H. (2018). Redox State of Human Serum Albumin and Inflammatory Biomarkers in Hemodialysis Patients with Secondary Hyperparathyroidism During Oral Calcitriol Supplementation for Vitamin D. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, 12, 98-110. <https://doi.org/10.2174/1874104501812010098>
- Nassiri, M., Torshizi, M. E., Ghovvati, S., & Doosti, M. (2018). Evaluation of different statistical methods using SAS software: an in silico approach for analysis of real-time PCR data. *Journal of Applied Statistics*, 45(2), 306-319. <https://doi.org/10.1080/02664763.2016.1276890>
- Nieri, D., Neri, T., Barbieri, G., Moneta, S., Morelli, G., Mingardi, D., Spinelli, S., Ghiadoni, L., Falcone, M., Tiseo, G., Menichetti, F., Franzini, M., Caponi, L., Paolicchi, A., Pancani, R., Pistelli, F., Carrozzi, L., Celi, A., & Pisa COVID group. (2021). C-C motive chemokine ligand 2 and thromboinflammation in COVID-19-associated pneumonia: A retrospective study. *Thrombosis Research*, 204, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2021.06.003>
- Nikooyeh, B., Neyestani, T. R., Tayebinejad, N., Alavi-Majd, H., Shariatzadeh, N., Kalayi, A., Zahedirad, M., Heravifard, S., & Salekzamani, S. (2014). Daily intake of vitamin D- or calcium-vitamin D-fortified Persian yogurt drink (doogh) attenuates diabetes-induced oxidative stress: evidence for antioxidative properties of vitamin D. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 27 (Suppl 2), 276-283. <https://doi.org/10.1111/jhn.12142>
- Nilsson-Payant, B. E., Uhl, S., Grimont, A., Doane, A. S., Cohen, P., Patel, R. S., Higgins, C. A., Acklin, J. A., Bram, Y., Chandar, V., Blanco-Melo, D., Panis, M., Lim, J. K., Elemento, O., Schwartz, R. E., Rosenberg, B. R., Chandwani, R., & tenOever, B. R. (2021). The NF- κ B transcriptional footprint is essential for SARS-CoV-2 replication. *Journal of Virology*, 95(23), e0125721. <https://doi.org/10.1128/JVI.01257-21>
- Nobel Prize Outreach AB. (1993, 13. Oktober). *Decisive progress in gene technology through two new methods: the polymerase chain reaction (PCR) method and site-directed mutagenesis*. NobelPrize.org. Retrieved 13. Mai 2024 from <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/press-release/>
- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559-1582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- Nolan, T., Huggett, J., & Sanchez, E. (2013). *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)*. LGC. <https://www.gene-quantification.de/national-measurement-system-qpcr-guide.pdf>
- NutriAging. (29. Dezember 2022). Retrieved 14. Mai 2024 from <http://www.nutriaging.eu/>
- Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(4), a000034. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>

- Olagnier, D., Farahani, E., Thyrssted, J., Blay-Cadanet, J., Herengt, A., Idorn, M., Hait, A., Hernaez, B., Knudsen, A., Iversen, M. B., Schilling, M., Jørgensen, S. E., Thomsen, M., Reinert, L. S., Lappe, M., Hoang, H. D., Gilchrist, V. H., Hansen, A. L., Ottosen, R., . . . Holm, C. K. (2020). SARS-CoV2-mediated suppression of NRF2-signaling reveals potent antiviral and anti-inflammatory activity of 4-octyl-itaconate and dimethyl fumarate. *Nature Communications*, 11(1), 4938. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18764-3>
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufo, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., . . . Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733-D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Ostrom, E. L., & Traustadóttir, T. (2020). Aerobic exercise training partially reverses the impairment of Nrf2 activation in older humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 160, 418-432. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.016>
- Page, R. B., & Stromberg, A. J. (2011). Linear methods for analysis and quality control of relative expression ratios from quantitative real-time polymerase chain reaction experiments. *TheScientificWorldJournal*, 11, 1383-1393. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.124>
- Papa, L., Manfredi, G., & Germain, D. (2014). SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. *Genes and Cancer*, 5(1-2), 15-21. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.4>
- Pfaffl, M. W. (2013). In *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)* (pp. 99). LGC. <https://www.gene-quantification.de/national-measurement-system-qpcr-guide.pdf>
- Pierce, K. E., & Wangh, L. J. (2015). Low-Concentration Initiator Primers Improve the Amplification of Gene Targets with High Sequence Variability In C. Basu (Ed.), *PCR Primer Design* (2 ed., Vol. 1275, pp. 73-89). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_5
- Pojednic, R. M., & Ceglia, L. (2014). The emerging biomolecular role of vitamin D in skeletal muscle. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 42(2), 76-81. <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000013>
- Presby, D. M., Checkley, L. A., Jackman, M. R., Higgins, J. A., Jones, K. L., Giles, E. D., Houck, J. A., Webb, P. G., Steig, A. J., Johnson, G. C., Rudolph, M. C., & MacLean, P. S. (2019). Regular exercise potentiates energetically expensive hepatic de novo lipogenesis during early weight regain. *American Journal of Physiology*, 317(5), R684-R695. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00074.2019>
- QIAGEN. (2010). *Critical Factors for Successful Real-Time PCR* <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=f7efb4f4-fbcf-4b25-9315-c4702414e8d6&lang=en>
- Raso, A., & Biassoni, R. (2014). Twenty Years of qPCR: A Mature Technology? In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (1 ed., Vol. 1160, pp. 1-3). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0733-5_1
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., & Cartuyvels, R. (2009). Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(3), 145-151. <https://doi.org/10.1002/jcla.20307>
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In C. Basu (Ed.), *PCR Primer Design* (2 ed., Vol. 1275, pp. 31-56). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2013). Real-Time PCR in Food Science: Introduction. *Current Issues in Molecular Biology*, 15(2), 25-38. <https://doi.org/10.21775/cimb.015.025>

- Roy, J. G., McElhaney, J. E., & Verschoor, C. P. (2020). Reliable reference genes for the quantification of mRNA in human T-cells and PBMCs stimulated with live influenza virus. *BMC Immunology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12865-020-0334-8>
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>
- Sarfstein, R., & Werner, H. (2015). The INSR/IGF1R Receptor Family. In D. L. Wheeler & Y. Yarden (Eds.), *Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies* (1 ed.). Springer Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11888-8_7
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(5), 878-888. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>
- Scholten, S. D., Sergeev, I. N., Song, Q., & Birger, C. B. (2015). Effects of vitamin D and quercetin, alone and in combination, on cardiorespiratory fitness and muscle function in physically active male adults. *Open Access Journal of Sports Medicine*, 6, 229-239. <https://doi.org/10.2147/OAJSM.S83159>
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46(5), 705-716. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90346-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90346-6)
- Sepp-Lorenzino, L. (1998). Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Research and Treatment*, 47(3), 235-253. <https://doi.org/10.1023/a:1005955017615>
- Shab-Bidar, S., Neyestani, T. R., & Djazayeri, A. (2014). The interactive effect of improvement of vitamin D status and VDR FokI variants on oxidative stress in type 2 diabetic subjects: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 69(2), 216-222. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.240>
- Sharif, D. A. (2022). The Effectiveness of Vitamin D Supplementation on Oxidative and Inflammatory Markers in Patients Suffering from End-stage Renal Disease, a Randomized Controlled Trial. *Cellular and Molecular Biology*, 68(5), 7-15. <https://doi.org/10.14715/cmb/2022.68.5.2>
- Sidahmed, A. M. E., León, A. J., Bosinger, S. E., Banner, D., Danesh, A., Cameron, M. J., & Kelvin, D. J. (2012). CXCL10 contributes to p38-mediated apoptosis in primary T lymphocytes in vitro. *Cytokine*, 59(2), 433-441. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.05.002>
- Simonsson, T., Pecinka, P., & Kubista, M. (1998). DNA tetraplex formation in the control region of c-myc. *Nucleic Acids Research*, 26(5), 1167-1172. <https://doi.org/10.1093/nar/26.5.1167>
- Singh, A., & Pandey, G. K. (2015). Primer Design Using Primer Express® for SYBR Green-Based Quantitative PCR. In C. Basu (Ed.), *PCR Primer Design* (2 ed., Vol. 1275, pp. 153-164). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_11
- Singh, V. K., Govindarajan, R., Naik, S., & Kumar, A. (2000). The Effect of Hairpin Structure on PCR Amplification Efficiency. *Molecular Biology Today*, 1(3), 67-69.
- Smith, R., & Stern, G. (1967). Myopathy, osteomalacia and hyperparathyroidism. *Brain*, 90(3), 593-602. <https://doi.org/10.1093/brain/90.3.593>
- Sohl, E., de Jongh, R. T., Heijboer, A. C., Swart, K. M., Brouwer-Brolsma, E. M., Enneman, A. W., de Groot, C. P., van der Velde, N., Dhonukshe-Rutten, R. A., Lips, P., & van Schoor, N. M. (2013). Vitamin D status is associated with physical performance: the results of three independent cohorts. *Osteoporosis International*, 24(1), 187-196. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2124-5>

- Sohn, K. M., Lee, S. G., Kim, H. J., Cheon, S., Jeong, H., Lee, J., Kim, I. S., Silwal, P., Kim, Y. J., Paik, S., Chung, C., Park, C., Kim, Y. S., & Jo, E. K. (2020). COVID-19 Patients Upregulate Toll-like Receptor 4-mediated Inflammatory Signaling That Mimics Bacterial Sepsis. *Journal of Korean Medical Science*, 35(38), e343. <https://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e343>
- Ståhlberg, A., Håkansson, J., Xian, X., Semb, H., & Kubista, M. (2004). Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry*, 50(3), 509-515. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.026161>
- Sugihara, Y., Taniguchi, H., Kushima, R., Tsuda, H., Kubota, D., Ichikawa, H., Sakamoto, K., Nakamura, Y., Tomonaga, T., Fujita, S., & Kondo, T. (2012). Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. *Journal of Proteomics*, 75(17), 5342-5355. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.06.013>
- Sun, X., Tanisawa, K., Zhang, Y., Ito, T., Oshima, S., Higuchi, M., & Cao, Z.-B. (2019). Effect of Vitamin D Supplementation on Body Composition and Physical Fitness in Healthy Adults: A Double-Blind, Randomized Controlled Trial. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 75(4), 231-237. <https://doi.org/10.1159/000504873>
- Suzuki, T., Higgins, P. J., & Crawford, D. R. (2000). Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques*, 29(2), 332-337. <https://doi.org/10.2144/00292rv02>
- Suzuki, T., & Yamamoto, M. (2015). Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine*, 88 (Pt B), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006>
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- Swords, C. (2020, 13. Mai 2024). DNA polymerases – The mighty writers of the genome. <https://nebula.org/blog/dna-polymerase/>
- Taguchi, K., & Yamamoto, M. (2017). The KEAP1-NRF2 System in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7(85). <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00085>
- Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 7-11. <https://doi.org/10.1172/JCI11830>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>
- The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2024). polymerase chain reaction. In *Encyclopaedia Britannica*: Encyclopaedia Britannica, Inc.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (o.J.) a *How is Hot-Start Technology Beneficial For Your PCR?* Retrieved 13. Mai 2024 from <https://www.thermofisher.com/at/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/hot-start-technology-benefits-PCR.html>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (o.J.) b *Essentials of Real-Time PCR*. Retrieved 13. Mai 2024 from <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2014). *Real-time PCR handbook* <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>

- Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145-154.
<https://doi.org/10.1002/bmb.20461>
- Toffanello, E. D., Perissinotto, E., Sergi, G., Zambon, S., Musacchio, E., Maggi, S., Coin, A., Sartori, L., Corti, M. C., Baggio, G., Crepaldi, G., & Manzato, E. (2012). Vitamin D and physical performance in elderly subjects: the Pro.V.A study. *PLOS ONE*, 7(4), e34950.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034950>
- Trist, B. G., Hilton, J. B., Dominic J. Hare, D. J., Crouch, P. J., & Double, K. L. (2021). Superoxide Dismutase 1 in Health and Disease: How a Frontline Antioxidant Becomes Neurotoxic. *Angewandte Chemie*, 60(17), 9215-9246.
<https://doi.org/10.1002/anie.202000451>
- Tuckey, R. C., Cheng, C. Y. S., & Slominski, A. T. (2019). The serum vitamin D metabolome: What we know and what is still to discover. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 186, 4-21. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.09.003>
- Uciechowski, P., & Dempke, W. C. M. (2020). Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology*, 98(3), 131-137. <https://doi.org/10.1159/000505099>
- Valiron, O., Caudron, N., & Job, D. (2001). Microtubule dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(14), 2069-2084. <https://doi.org/10.1007/PL00000837>
- van der Vorst, E. P. C., Döring, Y., & Weber, C. (2015). Chemokines. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(11), e52-e56.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306359>
- van der Vos, K. E., & Coffey, P. J. (2011). The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(4), 579-592.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3419>
- Van Raemdonck, K., Van den Steen, P. E., Liekens, S., Van Damme, J., & Struyf, S. (2015). CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 26(3), 311-327.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.11.009>
- Vautrot, V., & Behm-Ansmant, I. (2020). Enhanced Probe-Based RT-qPCR Quantification of MicroRNAs Using Poly(A) Tailing and 5' Adaptor Ligation. In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (2 ed., Vol. 2065, pp. 39-54). Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_4
- Vo, T. K. D., Godard, P., de Saint-Hubert, M., Morrhaye, G., Bauwens, E., Debacq-Chainiaux, F., Glupczynski, Y., Swine, C., Geenen, V., Martens, H. J., & Toussaint, O. (2010). Transcriptomic biomarkers of human ageing in peripheral blood mononuclear cell total RNA. *Experimental Gerontology*, 45(3), 188-194.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.12.001>
- Vomund, S., Schäfer, A., Parnham, M. J., Brüne, B., & von Knethen, A. (2017). Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2772. <https://doi.org/10.3390/ijms18122772>
- Wang, X., & Seed, B. (2003). A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(24), e154. <https://doi.org/10.1093/nar/gng154>
- Wang, Y., Zhou, X., Zhu, H., Liu, S., Zhou, C., Zhang, G., Xue, L., Lu, N., Quan, L., Bai, J., Zhan, Q., & Xu, N. (2005). Overexpression of EB1 in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) may promote cellular growth by activating beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene*, 24(44), 6637-6645. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208819>
- Wang, Y., Zhou, Y., & Graves, D. T. (2014). FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. *BioMed Research International*, 925350.
<https://doi.org/10.1155/2014/925350>
- Wilhelm, J. (2021). *Re: What is an ideal threshold for log2(Fold Change)?*
https://www.researchgate.net/post/What_is_an_ideal_threshold_for_log2Fold_Change/60b62ae2f526cc39c7087a95/citation/download

- Wilund, K. R., Feeney, L. A., Tomayko, E. J., Chung, H. R., & Kim, K. (2008). Endurance exercise training reduces gallstone development in mice. *Journal of Applied Physiology*, 104(3), 761-765. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01292.2007>
- World Health Organization (WHO). (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *WHO Technical Report Series*, 894, i-253. <https://iris.who.int/handle/10665/42330>
- Xing, Y.-q., Li, A., Yang, Y., Li, X.-x., Zhang, L.-n., & Guo, H.-c. (2018). The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. *Life Sciences*, 193, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.030>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(134). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yin, K., You, Y., Swier, V., Tang, L., Radwan, M. M., Pandya, A. N., & Agrawal, D. K. (2015). Vitamin D Protects Against Atherosclerosis via Regulation of Cholesterol Efflux and Macrophage Polarization in Hypercholesterolemic Swine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(11), 2432-2442. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306132>
- Yiu, Y.-F., Yiu, K.-H., Siu, C.-W., Chan, Y.-H., Li, S.-W., Wong, L.-Y., Lee, S. W. L., Tam, S., Wong, E. W. K., Lau, C.-P., Cheung, B. M. Y., & Tse, H.-F. (2013). Randomized controlled trial of vitamin D supplement on endothelial function in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 227(1), 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.12.013>
- Zhang, H., Davies, K. J. A., & Forman, H. J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 88 (Pt B), 314-336. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036>
- Zhang, X., Jiang, L., & Liu, H. (2021). Forkhead Box Protein O1: Functional Diversity and Post-Translational Modification, a New Therapeutic Target? *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 1851-1860. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S305016>
- Zhou, Y., Zhao, L.-J., Xu, X., Ye, A., Travers-Gustafson, D., Zhou, B., Wang, H.-W., Zhang, W., Hamm, L. L., Deng, H.-W., Recker, R. R., & Lappe, J. M. (2014). DNA methylation levels of CYP2R1 and CYP24A1 predict vitamin D response variation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144 Pt A, 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.10.004>
- Zhu, H., Wang, X., Shi, H., Su, S., Harshfield, G. A., Gutin, B., Snieder, H., & Dong, Y. (2013). A genome-wide methylation study of severe vitamin D deficiency in African American adolescents. *The Journal of Pediatrics*, 162(5), 1004-1009.e1001. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.10.059>
- Zlotnik, A., & Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2), 121-127. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80165-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80165-x)

Anhänge

Primerliste

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Code	Produktlänge	Effizienz [%]
CYP27A1	GCTGCGCTTCTCTTTTCAGC	GCTCCATGTCGTTCCGTACT	NM_000784.4	200	98,6
ASC	CTACCTGGAGACCTACGGCG	TATAAAGTGCAGGCCCTGGTG	NM_145182.3	112	96,2
MAPRE2	CCAGCTGTCAGCAGAGGAAGG	GCCATTCCCCAACTTGAGCAT	NM_001143826.3	115	101,4
SOD1	GAAGGTGTGGGGAAGCATTA	CCACCGTGTCTTCTGGATAGA	NM_000454.5	132	97,5
IGF-1R	TGAAAGTGACGTCTGCAATTC	GGTACCGGTGCCAGGTTATG	NM_000875.5	74	101,9
FOXO1	TGGACATGCTCAGCAGACATC	TTGGGTCAGGCGGTTCA	NM_002015.4	97	93,9
FOXO3	GAACGTGGGGAACCTCACTGGTGCTA	GGTCTGCTTTGCCACACTTCCCCCTT	NM_001455.4	98	92,5
Nrf2	AACTACTCCCAGGTTGCCCA	CTACAAACGGGAATGTCTGCG	NM_006164.5	91	102,8
CCL2	CAATCAATGCCCCAGTCACC	CCTGAACCCCACTTCTGCTTG	NM_002982.4	174	95,6
CCR2	GGAGACTGCTGAGTCAACCC	GATGACAGCGATGGAGCGTA	NM_001123041.3	140	98,4
CXCL10	GGAATCTTTCTGCTTTTGGG	GGCAGTGAAGTCCCATGAAG	NM_001565.4	114	101,1
NF-κB1	CACAAGGCAGCAAATAGACGAG	AGAGTTAGCAGTAGGCACC	NM_003998.4	123	98,3
IKK-γ	TTGTGATGGAGACCGTTCCG	CTCATGTCCTCGATCCTGGC	NM_001321396.3	193	101,5
KEAP1	TACATGCATTTTGGGAGGTGG	GTTGATGCAGGCGTGAAGA	NM_203500.2	132	104,8
IL6	AGCCCTGAGAAAGGAGACAT	GGTTGTTTTCTGCCAGTGCC	NM_000600.5	74	104,4
TNF-α	CTGCTGCACCTTTGGAGTGAT	AGATGATCTGACTGCCCTGGG	NM_000594.4	93	103,7
			Quelle		
ACBT	CCTGGACTTCGAGCAAGAGAT	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGT	Vo et al., 2010		97,7
RPS9	CTGGATGAGGGCAAGATGAAG	GTCTGCAGGCGTCTCTCTAAGAA	Abdul Rahman et al., 2013		99,4

Genexpressionsunterschiede der „NutriAging D“-Studie in den Interventionsgruppen als FD

Parameter	Gruppe	T2	Signifikanz	T3	Signifikanz
FD ASC	1	1,200±0,35	0,123	1,079±0,22	0,674
	2	0,935±0,13	0,273	0,841±0,11	0,068
	3	0,989±0,18	0,889	0,998±0,09	0,889
	gesamt	1,063±0,27	0,550	0,999±0,17	0,433
FD SOD1	1	1,139±0,28	0,199	1,126±0,33	0,318
	2	1,012±0,12	0,858	1,146±0,30	0,403
	3	1,213±0,27	0,058	1,146±0,21	0,085
	gesamt	1,143±0,25	0,019	1,138±0,27	0,031
FD CYP27A1	1	0,969±0,23	0,709	0,791±0,15	0,006
	2	1,055±0,25	0,695	0,938±0,35	0,744
	3	0,983±0,21	0,823	1,050±0,25	0,596
	gesamt	0,992±0,21	0,864	0,924±0,26	0,200
FD IGF-1R	1	1,152±0,47	0,263	1,768±1,52	0,208
	2	0,938±0,28	0,715	1,077±0,27	0,465
	3	1,176±0,25	0,123	1,146±0,20	0,093
	gesamt	1,119±0,36	0,079	1,381±0,99	0,040
FD FOXO1	1	1,171±0,32	0,172	1,383±0,61	0,069
	2	1,050±0,17	0,597	1,116±0,10	0,068
	3	1,173±0,28	0,122	1,075±0,15	0,263
	gesamt	1,147±0,27	0,024	1,206±0,41	0,010
FD FOXO3	1	0,944±0,16	0,348	1,387±1,20	0,889
	2	0,949±0,17	0,595	0,914±0,20	0,465
	3	1,027±0,15	0,625	0,969±0,15	0,484
	gesamt	0,978±0,15	0,535	1,125±0,77	0,433
FD MAPRE2	1	1,159±0,31	0,191	1,409±0,39	0,021
	2	1,310±0,14	0,020	1,213±0,19	0,115
	3	1,236±0,48	0,206	1,205±0,33	0,120
	gesamt	1,220±0,36	0,012	1,288±0,33	0,001
FD Nrf2	1	1,463±1,18	0,575	1,531±1,52	0,674
	2	1,047±0,09	0,465	0,833±0,15	0,144
	3	0,996±0,33	0,575	0,867±0,29	0,401
	gesamt	1,193±0,78	0,433	1,126±1,00	0,079

Genexpressionsunterschiede Vitamin D vs. Kontrolle als Δ Ct-Werte nach Geschlecht

Parameter	Geschlecht	Gruppe	T1	T2	T3	Zeitpunkt	Zeitpunkt × Gruppe	n.p.
Δ Ct ASC	weiblich	Vitamin D	7,24±0,26	7,23±0,25	7,39±0,15	0,270		
		Kontrolle	7,43±0,31	7,29±0,10	7,31±0,27	0,683		
		gesamt	7,31±0,27	7,26±0,20	7,36±0,19	0,602	0,353	
	männlich	Vitamin D	7,20±0,28	7,31±0,38	7,25±0,32	0,551		
		Kontrolle	7,55±0,35	7,28±0,13	7,48±0,21	0,265		
		gesamt	7,35±0,34	7,30±0,29	7,35±0,30	0,595	0,113	
Δ Ct SOD1	weiblich	Vitamin D	3,97±0,20	3,97±0,15	3,88±0,24	0,724		
		Kontrolle	4,30±0,17	3,77±0,14	3,79±0,25	0,006		
		gesamt	4,10±0,24	3,90±0,17	3,85±0,23	0,014	0,036	
	männlich	Vitamin D	4,44±0,16	4,15±0,20	4,21±0,23	0,022		
		Kontrolle	4,13±0,27	4,20±0,17	4,25±0,13	0,617		
		gesamt	4,31±0,26	4,17±0,18	4,23±0,19	0,380	0,042	
Δ Ct CYP27A1	weiblich	Vitamin D	6,07±0,50	6,09±0,37	6,16±0,25	0,837		
		Kontrolle	5,68±0,33	5,95±0,44	5,94±0,61	0,201		
		gesamt	5,92±0,46	6,04±0,37	6,08±0,40	0,302	0,570	
	männlich	Vitamin D	6,19±0,73	6,21±0,66	6,18±0,80	0,985		
		Kontrolle	6,22±0,58	6,18±0,44	6,65±0,39	0,034		
		gesamt	6,21±0,64	6,20±0,55	6,37±0,68	0,144	0,099	
Δ Ct IGF-1R	weiblich	Vitamin D	6,52±0,25	6,70±0,31	6,58±0,22	0,508		0,819
		Kontrolle	7,13±0,35	6,63±0,29	6,63±0,45	0,201		0,097
		gesamt	6,75±0,41	6,67±0,29	6,60±0,29	0,288	0,067	0,687
	männlich	Vitamin D	7,13±0,28	6,86±0,34	6,85±0,38	0,023		0,018
		Kontrolle	6,77±0,23	6,90±0,42	6,28±1,25	0,346		0,549
		gesamt	6,98±0,31	6,88±0,36	6,61±0,85	0,107	0,262	0,125
Δ Ct FOXO1	weiblich	Vitamin D	4,68±0,19	4,72±0,13	4,63±0,14	0,243		0,247
		Kontrolle	4,98±0,55	4,59±0,31	4,57±0,32	0,092		0,097
		gesamt	4,80±0,36	4,67±0,21	4,61±0,20	0,009	0,012	0,044
	männlich	Vitamin D	5,24±0,27	4,96±0,45	5,09±0,27	0,068		0,102
		Kontrolle	4,98±0,36	4,94±0,37	4,64±0,94	0,482		0,819
		gesamt	5,13±0,33	4,95±0,40	4,90±0,64	0,209	0,330	0,125
Δ Ct FOXO3	weiblich	Vitamin D	6,16±0,31	6,32±0,11	6,32±0,13	0,300		0,165
		Kontrolle	6,27±0,21	6,27±0,08	6,25±0,32	0,898		0,717
		gesamt	6,20±0,26	6,30±0,10	6,29±0,20	0,656	0,557	0,417
	männlich	Vitamin D	6,31±0,12	6,23±0,20	6,36±0,21	0,287		0,102
		Kontrolle	6,21±0,18	6,37±0,29	5,89±1,00	0,433		0,247
		gesamt	6,27±0,15	6,29±0,24	6,16±0,67	0,452	0,188	0,558
Δ Ct MAPRE2	weiblich	Vitamin D	9,68±0,33	9,54±0,23	9,41±0,57	0,412		
		Kontrolle	9,65±0,75	9,32±1,04	9,06±0,88	0,018		
		gesamt	9,67±0,47	9,46±0,59	9,28±0,66	0,027	0,542	
	männlich	Vitamin D	9,55±0,41	9,19±0,51	9,34±0,37	0,119		
		Kontrolle	9,69±0,44	9,62±0,42	9,32±0,19	0,255		
		gesamt	9,61±0,41	9,36±0,51	9,33±0,30	0,099	0,246	
Δ Ct Nrf2	weiblich	Vitamin D	4,51±0,91	4,79±0,73	5,14±0,81	0,203		0,022
		Kontrolle	5,10±0,22	3,96±0,82	3,85±1,07	0,147		0,717
		gesamt	4,73±0,77	4,48±0,83	4,66±1,07	0,310	0,045	0,197
	männlich	Vitamin D	5,34±0,29	5,24±0,14	5,42±0,21	0,187		0,368
		Kontrolle	4,81±0,85	5,29±0,23	5,49±0,36	0,185		0,247
		gesamt	5,12±0,62	5,26±0,17	5,45±0,27	0,067	0,104	0,174

Genexpressionsunterschiede Vitamin D vs. Kontrolle als log2FD nach Geschlecht

Parameter	Geschlecht	Gruppe	T2	Signifikanz	T3	Signifikanz
log2FD ASC	weiblich	Vitamin D	0,003±0,16	0,968	-0,148±0,27	0,286
		Kontrolle	0,136±0,22	0,390	0,118±0,33	0,599
		gesamt	0,053±0,18	0,437	-0,048±0,30	0,664
	männlich	Vitamin D	-0,106±0,28	0,357	-0,054±0,13	0,332
		Kontrolle	0,267±0,46	0,261	0,068±0,28	0,614
		gesamt	0,049±0,40	0,674	-0,003±0,20	0,960
log2FD SOD1	weiblich	Vitamin D	0,001±0,25	0,995	0,094±0,34	0,574
		Kontrolle	0,530±0,14	0,024	0,512±0,19	0,043
		gesamt	0,199±0,34	0,141	0,251±0,35	0,084
	männlich	Vitamin D	0,291±0,26	0,026	0,226±0,24	0,049
		Kontrolle	-0,075±0,15	0,312	-0,123±0,36	0,482
		gesamt	0,138±0,28	0,119	0,080±0,33	0,421
log2FD CYP27A1	weiblich	Vitamin D	-0,027±0,23	0,805	-0,094±0,43	0,653
		Kontrolle	-0,279±0,19	0,128	-0,261±0,29	0,254
		gesamt	-0,122±0,24	0,196	-0,156±0,37	0,271
	männlich	Vitamin D	-0,016±0,38	0,913	0,013±0,40	0,935
		Kontrolle	0,041±0,35	0,805	-0,423±0,32	0,040
		gesamt	0,008±0,35	0,941	-0,169±0,41	0,185
log2FD IGF-1R	weiblich	Vitamin D	-0,177±0,45	0,500	-0,055±0,30	0,686
		Kontrolle	0,495±0,54	0,109	0,498±0,45	0,109
		gesamt	0,075±0,56	0,401	0,152±0,44	0,401
	männlich	Vitamin D	0,272±0,28	0,063	0,282±0,20	0,018
		Kontrolle	-0,132±0,52	0,893	0,490±1,24	0,686
		gesamt	0,104±0,43	0,182	0,369±0,77	0,071
log2FD FOXO1	weiblich	Vitamin D	-0,037±0,12	0,523	0,050±0,10	0,225
		Kontrolle	0,399±0,36	0,194	0,418±0,29	0,109
		gesamt	0,126±0,31	0,287	0,188±0,26	0,036
	männlich	Vitamin D	0,280±0,34	0,075	0,160±0,20	0,091
		Kontrolle	0,040±0,45	0,852	0,337±0,70	0,345
		gesamt	0,180±0,39	0,141	0,233±0,45	0,099
log2FD FOXO3	weiblich	Vitamin D	-0,157±0,20	0,149	-0,155±0,33	0,345
		Kontrolle	0,001±0,24	0,994	0,026±0,11	1,000
		gesamt	-0,097±0,21	0,233	-0,087±0,27	0,401
	männlich	Vitamin D	0,086±0,21	0,312	-0,050±0,21	0,499
		Kontrolle	-0,161±0,25	0,223	0,322±1,02	0,893
		gesamt	-0,017±0,25	0,817	0,105±0,66	0,530
log2FD MAPRE2	weiblich	Vitamin D	0,145±0,37	0,435	0,275±0,27	0,085
		Kontrolle	0,321±0,28	0,187	0,585±0,13	0,016
		gesamt	0,211±0,33	0,116	0,392±0,27	0,005
	männlich	Vitamin D	0,366±0,47	0,087	0,207±0,40	0,224
		Kontrolle	0,076±0,44	0,720	0,372±0,45	0,137
		gesamt	0,245±0,46	0,095	0,276±0,41	0,041
log2FD Nrf2	weiblich	Vitamin D	-0,286±0,83	0,893	-0,634±0,78	0,043
		Kontrolle	1,146±1,02	0,285	1,252±1,25	0,285
		gesamt	0,251±1,12	0,401	0,073±1,32	0,575
	männlich	Vitamin D	0,104±0,23	0,310	-0,079±0,28	0,866
		Kontrolle	-0,478±0,93	0,686	-0,673±0,82	0,043
		gesamt	-0,138±0,66	0,937	-0,327±0,62	0,071

Genexpressionsunterschiede des ABCD-Projekts als Δ Ct-Werte

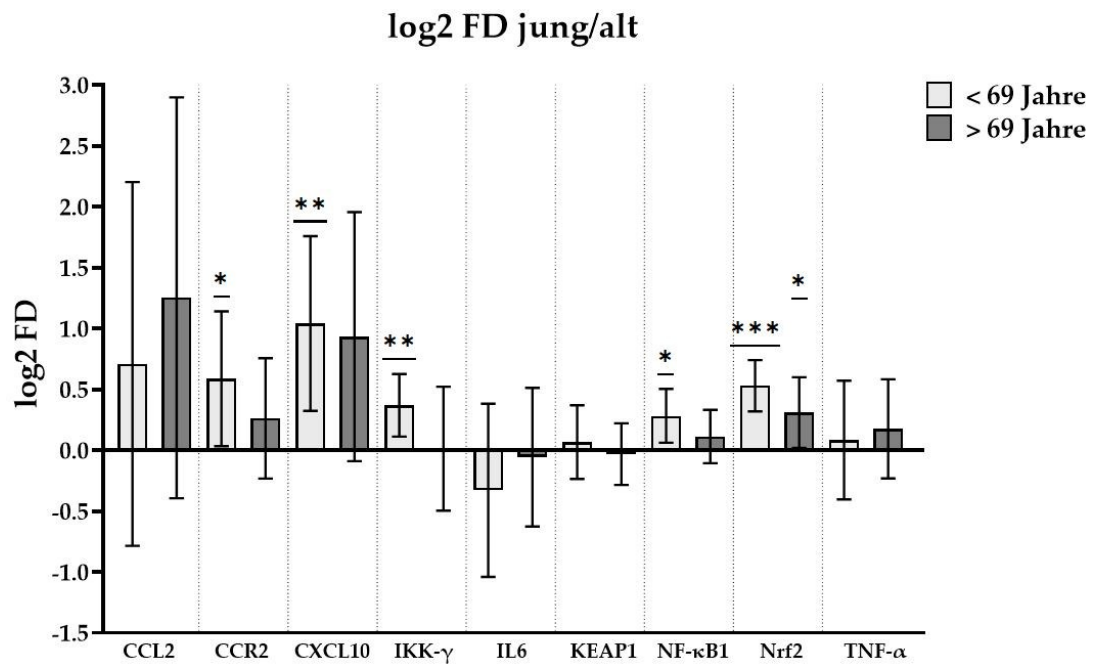
Parameter		gesamt n=90	COVID n=45	Kontrolle n=45	Signifi- kanz
Δ Ct CCL2		11,48 $\pm$ 2,39	10,99 $\pm$ 3,20	11,97 $\pm$ 0,91	0,054
Δ Ct CCR2		5,79 $\pm$ 0,83	5,58 $\pm$ 0,88	5,99 $\pm$ 0,72	0,018
Δ Ct CXCL10		9,39 $\pm$ 1,45	8,91 $\pm$ 1,82	9,87 $\pm$ 0,68	0,001
Δ Ct IKK- γ		4,83 $\pm$ 0,69	4,73 $\pm$ 0,87	4,92 $\pm$ 0,44	0,026
Δ Ct IL6		13,31 $\pm$ 1,13	13,38 $\pm$ 1,06	13,24 $\pm$ 1,21	0,386
Δ Ct KEAP1		6,77 $\pm$ 0,45	6,76 $\pm$ 0,54	6,78 $\pm$ 0,35	0,897
Δ Ct NF- κ B1		5,19 $\pm$ 0,38	5,09 $\pm$ 0,42	5,29 $\pm$ 0,31	0,016
Δ Ct Nrf2		4,47 $\pm$ 0,44	4,26 $\pm$ 0,47	4,68 $\pm$ 0,30	<0,001
Δ Ct TNF- α		6,85 $\pm$ 0,63	6,79 $\pm$ 0,82	6,90 $\pm$ 0,36	0,405

Parameter	Geschlecht	gesamt	COVID	Kontrolle	Signifi- kanz
Δ Ct CCL2	weiblich	11,33 $\pm$ 1,74	10,68 $\pm$ 2,19	11,95 $\pm$ 0,84	0,020
	männlich	11,62 $\pm$ 2,87	11,27 $\pm$ 3,91	12,00 $\pm$ 0,99	0,382
Δ Ct CCR2	weiblich	5,74 $\pm$ 0,70	5,56 $\pm$ 0,64	5,92 $\pm$ 0,73	0,092
	männlich	5,83 $\pm$ 0,93	5,61 $\pm$ 1,06	6,06 $\pm$ 0,72	0,093
Δ Ct CXCL10	weiblich	9,38 $\pm$ 1,29	8,97 $\pm$ 1,67	9,77 $\pm$ 0,57	0,296
	männlich	9,40 $\pm$ 1,59	8,85 $\pm$ 1,97	9,97 $\pm$ 0,76	0,055
Δ Ct IKK- γ	weiblich	4,91 $\pm$ 0,76	4,91 $\pm$ 1,01	4,90 $\pm$ 0,43	0,395
	männlich	4,75 $\pm$ 0,62	4,58 $\pm$ 0,71	4,93 $\pm$ 0,46	0,019
Δ Ct IL6	weiblich	13,06 $\pm$ 0,85	13,23 $\pm$ 0,88	12,89 $\pm$ 0,80	0,185
	männlich	13,53 $\pm$ 1,31	13,50 $\pm$ 1,19	13,57 $\pm$ 1,44	0,983
Δ Ct KEAP1	weiblich	6,76 $\pm$ 0,44	6,79 $\pm$ 0,50	6,73 $\pm$ 0,37	0,673
	männlich	6,78 $\pm$ 0,47	6,74 $\pm$ 0,59	6,81 $\pm$ 0,33	0,584
Δ Ct NF- κ B1	weiblich	5,15 $\pm$ 0,38	5,08 $\pm$ 0,45	5,22 $\pm$ 0,29	0,223
	männlich	5,23 $\pm$ 0,39	5,11 $\pm$ 0,41	5,35 $\pm$ 0,32	0,030
Δ Ct Nrf2	weiblich	4,50 $\pm$ 0,45	4,37 $\pm$ 0,54	4,62 $\pm$ 0,31	0,099
	männlich	4,45 $\pm$ 0,44	4,17 $\pm$ 0,38	4,74 $\pm$ 0,28	<0,001
Δ Ct TNF- α	weiblich	6,92 $\pm$ 0,46	6,85 $\pm$ 0,56	6,97 $\pm$ 0,32	0,396
	männlich	6,78 $\pm$ 0,76	6,74 $\pm$ 1,01	6,83 $\pm$ 0,38	0,268

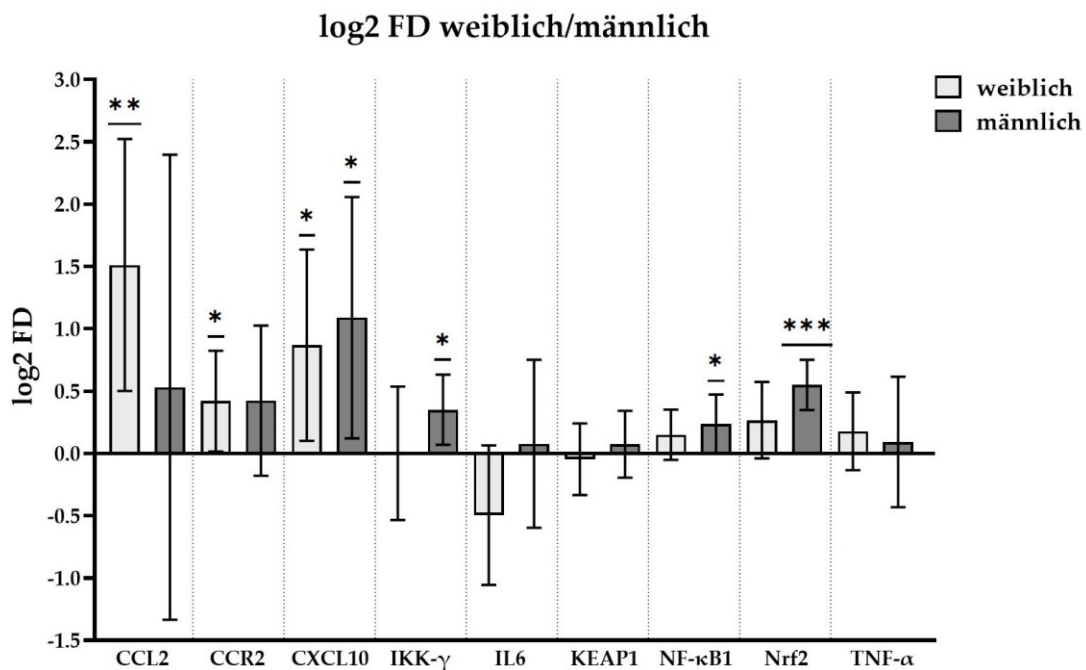
Parameter	Alters- gruppe	gesamt	COVID	Kontrolle	Signifi- kanz
Δ Ct CCL2	< 69 Jahre	11,58 $\pm$ 2,36	11,22 $\pm$ 3,18	11,96 $\pm$ 0,88	0,295
	> 69 Jahre	11,38 $\pm$ 2,45	10,75 $\pm$ 3,29	11,99 $\pm$ 0,96	0,256
Δ Ct CCR2	< 69 Jahre	5,81 $\pm$ 0,86	5,52 $\pm$ 0,87	6,12 $\pm$ 0,76	0,019
	> 69 Jahre	5,77 $\pm$ 0,80	5,65 $\pm$ 0,90	5,88 $\pm$ 0,68	0,351
Δ Ct CXCL10	< 69 Jahre	9,52 $\pm$ 1,15	9,00 $\pm$ 1,30	10,05 $\pm$ 0,64	0,005
	> 69 Jahre	9,27 $\pm$ 1,70	8,81 $\pm$ 2,27	9,71 $\pm$ 0,67	0,540
Δ Ct IKK- γ	< 69 Jahre	4,68 $\pm$ 0,54	4,51 $\pm$ 0,54	4,86 $\pm$ 0,49	0,017
	> 69 Jahre	4,97 $\pm$ 0,80	4,97 $\pm$ 1,08	4,97 $\pm$ 0,39	0,540
Δ Ct IL6	< 69 Jahre	13,22 $\pm$ 1,30	13,32 $\pm$ 1,18	13,11 $\pm$ 1,43	0,388
	> 69 Jahre	13,39 $\pm$ 0,94	13,43 $\pm$ 0,94	13,36 $\pm$ 0,97	0,807
Δ Ct KEAP1	< 69 Jahre	6,65 $\pm$ 0,46	6,62 $\pm$ 0,55	6,67 $\pm$ 0,35	0,729
	> 69 Jahre	6,89 $\pm$ 0,42	6,91 $\pm$ 0,51	6,87 $\pm$ 0,32	0,789
Δ Ct NF- κ B1	< 69 Jahre	5,16 $\pm$ 0,41	5,03 $\pm$ 0,43	5,30 $\pm$ 0,34	0,023
	> 69 Jahre	5,22 $\pm$ 0,36	5,16 $\pm$ 0,42	5,27 $\pm$ 0,29	0,297
Δ Ct Nrf2	< 69 Jahre	4,44 $\pm$ 0,45	4,17 $\pm$ 0,44	4,71 $\pm$ 0,25	<0,001
	> 69 Jahre	4,51 $\pm$ 0,44	4,36 $\pm$ 0,48	4,65 $\pm$ 0,33	0,023
Δ Ct TNF- α	< 69 Jahre	6,84 $\pm$ 0,65	6,82 $\pm$ 0,84	6,86 $\pm$ 0,40	0,818
	> 69 Jahre	6,86 $\pm$ 0,62	6,76 $\pm$ 0,83	6,94 $\pm$ 0,31	0,180

Parameter	Alters- gruppe	Geschlecht	gesamt	COVID	Kontrolle	Signifi- kantz
Δ Ct CCL2	< 69 Jahre	weiblich	11,21±1,60	10,76±2,06	11,65±0,84	0,229
		männlich	11,88±2,82	11,58±3,88	12,21±0,85	0,574
	> 69 Jahre	weiblich	11,43±1,89	10,61±2,39	12,19±0,80	0,059
		männlich	11,33±2,97	10,90±4,11	11,76±1,11	0,512
Δ Ct CCR2	< 69 Jahre	weiblich	6,01±0,57	5,87±0,54	6,14±0,60	0,304
		männlich	5,65±1,02	5,25±0,99	6,09±0,89	0,036
	> 69 Jahre	weiblich	5,51±0,74	5,27±0,60	5,74±0,80	0,137
		männlich	6,03±0,79	6,03±1,02	6,03±0,51	1,000
Δ Ct CXCL10	< 69 Jahre	weiblich	9,57±1,00	9,18±1,17	9,97±0,60	0,096
		männlich	9,47±1,28	8,87±1,42	10,12±0,69	0,011
	> 69 Jahre	weiblich	9,21±1,50	8,78±2,07	9,61±0,51	1,000
		männlich	9,32±1,92	8,83±2,55	9,81±0,83	0,248
Δ Ct IKK- γ	< 69 Jahre	weiblich	4,63±0,43	4,49±0,46	4,77±0,36	0,145
		männlich	4,72±0,62	4,52±0,60	4,94±0,58	0,022
	> 69 Jahre	weiblich	5,15±0,90	5,29±1,23	5,02±0,46	0,854
		männlich	4,78±0,64	4,64±0,83	4,93±0,33	0,309
Δ Ct IL6	< 69 Jahre	weiblich	12,83±0,89	12,87±0,81	12,79±1,00	0,848
		männlich	13,53±1,49	13,67±1,32	13,37±1,71	0,384
	> 69 Jahre	weiblich	13,25±0,77	13,56±0,84	12,97±0,61	0,064
		männlich	13,54±1,10	13,29±1,05	13,78±1,13	0,307
Δ Ct KEAP1	< 69 Jahre	weiblich	6,56±0,43	6,55±0,46	6,58±0,43	0,859
		männlich	6,72±0,48	6,68±0,62	6,75±0,27	0,741
	> 69 Jahre	weiblich	6,93±0,37	7,01±0,45	6,86±0,26	0,345
		männlich	6,84±0,47	6,80±0,56	6,89±0,38	0,679
Δ Ct NF- κ B1	< 69 Jahre	weiblich	5,04±0,37	4,86±0,40	5,22±0,22	0,021
		männlich	5,26±0,42	5,16±0,41	5,37±0,41	0,229
	> 69 Jahre	weiblich	5,24±0,37	5,28±0,40	5,22±0,35	0,705
		männlich	5,18±0,36	5,04±0,42	5,33±0,21	0,053
Δ Ct Nrf2	< 69 Jahre	weiblich	4,38±0,51	4,09±0,56	4,67±0,21	0,008
		männlich	4,48±0,40	4,24±0,33	4,74±0,29	0,001
	> 69 Jahre	weiblich	4,60±0,37	4,63±0,39	4,57±0,37	0,721
		männlich	4,41±0,48	4,09±0,42	4,74±0,28	<0,001
Δ Ct TNF- α	< 69 Jahre	weiblich	6,88±0,50	6,76±0,60	6,99±0,37	0,324
		männlich	6,81±0,76	6,86±1,00	6,75±0,41	0,736
	> 69 Jahre	weiblich	6,95±0,42	6,93±0,54	6,96±0,30	0,885
		männlich	6,76±0,78	6,59±1,05	6,92±0,33	0,331

Genexpressionsunterschiede des ABCD-Projekts als log2FD



Mittlere Genexpressionsunterschiede als log2FD nach Altersgruppen mit 95 % KI als Balken dargestellt



Mittlere Genexpressionsunterschiede als log2FD nach Geschlecht mit 95 % KI als Balken dargestellt