

Aus der Medizinischen Klinik für Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Epigenetische Uhr und relative Leukozyten-Telomerlänge
repräsentieren weitgehend unterschiedliche Aspekte des Alterns in der
Berliner Altersstudie II (BASE-II)

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Valentin Max Vetter

aus Stuttgart

Datum der Promotion: 05.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract in englischer Sprache	3
1.1 Introduction.....	3
1.2 Methods.....	3
1.3 Results	3
2. Abstract in deutscher Sprache	5
2.1 Hintergrund und Ziele.....	5
2.2 Methoden	5
2.3 Ergebnisse	5
3. Manteltext	7
3.1 Hintergrund.....	7
3.1.1 Die epigenetische Uhr	7
3.1.2 Die relative Leukozyten-Telomerlänge (rLTL)	11
3.2 Zielstellung	12
3.3 Vertiefung der Methodik	12
3.3.1 Bisulfit-Konversion	13
3.3.2 Multiplex-Polymerasekettenreaktion (mPCR).....	13
3.3.3 Single Nucleotide Primer Extension (SNUPE)	14
3.3.4 Versuchsschritt-übergreifende Etablierungen.....	16
3.3.5 Beurteilung der Messqualität	17
3.3.6 Mess- und Versuchswiederholungen.....	20
3.3.7 Die Erfassung der Methylierungsfraktion.....	22
3.4 Klinische Anwendungen	23
3.5 Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen	25
3.6 Quellenverzeichnis	27
4. Eidesstattliche Versicherung	31
5. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	32
6. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)	34
7. Druckexemplar der Publikation	35
8. Supplementary Material	41
9. Lebenslauf	48
10. Komplette Publikationsliste	50
11. Danksagung	51

1. Abstract in englischer Sprache

1.1 Introduction

Relationships between DNA methylation and age-associated phenotypes are known for many years, but only recently, studies were able to estimate chronological age based on methylation status in different sets of Cytosin-Phosphate-Guanin dinucleotides (CpG sites) in proliferating and non-proliferating tissue. It was suggested that DNA methylation age (DNAm age, *epigenetic clock*), similar to relative leukocyte telomere length (rLTL), could represent biological age. Indeed, associations between DNAm age and frailty, cognitive impairment, cardiovascular disease and other age-associated phenotypes have been described.

Since the first *epigenetic clock* was published, there is a continuous endeavor to simplify the estimation of DNAm age in larger cohorts by reducing the required number of CpG sites. The goal of this study was the adaption and validation of the recently published DNAm age estimation method by Vidal-Bralo et al. and to investigate the relationship of DNAm age, DNAm age acceleration and rLTL.

1.2 Methods

We determined the DNAm age and DNAm age acceleration based on seven CpG sites in 1,895 DNA samples from participants of the Berlin Aging Study II (BASE-II).

The assay included a bisulfite conversion followed by a multiplex polymerase chain reaction (mPCR). The final methylation fraction of the specific CpG sites was determined by a methylation-sensitive single nucleotide primer extension (SNuPE).

1.3 Results

Our results showed a highly significant association between DNAm age and chronological age (N=1895, $R^2=0.47$), which persisted after adjustment for covariates (sex, leukocyte distribution, alcohol, smoking). In this study, we were able to reduce the number of CpG sites from the eight sites described in the original protocol to seven sites, without a significant loss in the degree of chronological age prediction. The accuracy of our age estimation was assessed by the mean difference (mean difference=-0.3) and mean absolute deviation (MAD=6.3) between DNAm age and chronological age.

DNAm age acceleration is the proportion of the DNAm age that could neither be explained by chronological age nor by age related changes in the leukocyte cell distribution. We investigated the relationship between DNAm age acceleration and rLTL and were able to show a weak but significant negative association between these biomarkers of biological age ($\beta=-0.002$, $p=0.007$).

DNAm age seems to be a sensitive biomarker that could be very valuable in examining phenotypes of aging which are not related to pathways affected by mitotic age as measured through rLTL. The data collected in this study will enable analyses with a high potential to get further insight into the relationship between DNAm age, DNAm age acceleration and biological age.

2. Abstract in deutscher Sprache

2.1 Hintergrund und Ziele

Zusammenhänge zwischen DNA-Methylierungsmustern und altersassoziierten Phänotypen und Erkrankungen sind schon längere Zeit bekannt. Neuere Studien konnten eine Vorhersage des chronologischen Alters basierend auf dem Methylierungsstatus unterschiedlicher Subgruppen von Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotiden (CpG sites) in proliferierendem und nicht-proliferierendem Gewebe treffen. Daraufhin wurde vermutet, dass das DNA Methylierungsalter (DNAm age, *epigenetic clock*) und dessen Abweichung vom chronologischen Alter (*DNAm acceleration*), neben anderen Biomarkern wie der relativen Leukozyten-Telomerlänge (rLTL), zumindest teilweise, das biologische Alter reflektiert. Studien konnten Assoziationen zwischen Methylierungsalter und Gebrechlichkeit, kognitiven Einschränkungen, kardiovaskulären Erkrankungen und weiteren Phänotypen zeigen. Um die Bestimmung des Methylierungsalters für große Kohorten zu vereinfachen, gibt es ein kontinuierliches Bestreben die Anzahl der notwendigen CpG-Dinukleotide zu reduzieren. Das Ziel dieser Studie war die Adaptierung und Optimierung der kürzlich von Vidal-Bralo et al. veröffentlichten Methodik und die Validierung des resultierenden Methylierungsalters, sowie die Untersuchung der Beziehung zwischen DNAm age, DNAm acceleration und rLTL.

2.2 Methoden

Wir bestimmten das Methylierungsalter basierend auf sieben CpG-Dinukleotiden in 1.895 DNA-Proben von Probanden der Berliner Altersstudie II (BASE-II).

Nach einer Bisulfit-Konversion erfolgt eine Amplifizierung der zu analysierenden DNA-Abschnitte durch eine Multiplex-Polymerasekettenreaktion (mPCR). Die Bestimmung der Methylierungsfractionen der einzelnen CpG-Dinukleotide erfolgt über eine Primerverlängerung mit fluoreszierenden ddNTPs (methylation-sensitive single nucleotide primer extension, SNUPE).

2.3 Ergebnisse

Die für die Messung des Methylierungsalters notwendige Anzahl der CpG-Dinukleotide konnten wir für diese Studie von acht auf sieben reduzieren. Im Ergebnis zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen Methylierungsalter und

chronologischem Alter ($N=1.895$, $R^2=0,47$, $p<0,001$), die auch nach Kontrolle für relevante Kovariablen (Geschlecht, Leukozytenverteilung, Alkoholkonsum und Rauchen) besteht. Die Genauigkeit der Altersschätzung kontrollierten wir über die Mittelwertdifferenz (mean difference = $-0,3$) und mittlere absolute Abweichung (mean absolute deviation = $6,3$) zwischen Methylierungsalter und chronologischem Alter.

Die DNAm age acceleration beschreibt den Anteil des gemessenen Methylierungsalters, der weder durch das chronologische Alter noch durch eine altersbedingte Veränderung der Leukozytenverteilung erklärt werden kann. Eine lineare Regressionsanalyse, die Alter, Geschlecht, Alkohol und Rauchen als Kovariablen einschließt, zeigt eine signifikante, aber schwach negative, Assoziation zwischen DNAm age acceleration und rLTL ($\beta=-0,002$, $p=0,007$).

Unsere Analysen weisen auf ein hohes Potential des Methylierungsalters als Biomarker für biologisches Alter hin. Mit den im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten sind Analysen möglich, die wichtige Einblicke in den Zusammenhang zwischen Methylierungsalter und biologischem Alter erwarten lassen.

3. Manteltext

3.1 Hintergrund

Durch einen hohen Lebensstandard und immer besser werdende medizinische Versorgung steigt die Lebenserwartung großer Teile der Weltbevölkerung kontinuierlich (Jylhava, Pedersen, & Hagg, 2017). Obwohl zwei Individuen desselben Geburtsjahres per Definition das gleiche chronologische Alter haben, können sie sich im Verlauf ihres Lebens jedoch sehr in Bezug auf Gesundheit, Lebensqualität und ihrem biologischem Alter unterscheiden (Lowsky, Olshansky, Bhattacharya, & Goldman, 2014). Basierend auf dieser Erkenntnis wurde bereits früh die Notwendigkeit eines Biomarkers formuliert, der die Abnahme der Funktionalität im Alter besser als das chronologische Alter beschreibt (Baker & Sprott, 1988). Eine präzisere Definition wurde durch die *American Federation for Aging Research* (AFAR) definiert. Neben einer Überlegenheit gegenüber dem chronologischen Alter in Bezug auf die Vorhersage der Mortalität, soll ein entsprechender Biomarker den dem Altern zugrunde liegenden Prozess und nicht etwa daraus resultierende Erkrankungen oder Effekte abbilden. Außerdem sollte der Biomarker wiederholt und ohne größere Belastung des Probanden messbar sein und sowohl bei Labortieren als auch beim Menschen zu validen Ergebnissen führen (Butler et al., 2004; Johnson, 2006; Simm et al., 2008). Obwohl es noch keinen Biomarker gibt, der alle diese Kriterien vorbehaltlos erfüllt (Jylhava, 2017), existieren einige Parameter, deren Potential eingehend untersucht wird.

Neben der bekannten und häufig verwendeten Telomerlänge (Jylhava et al., 2017; Lopez-Otin, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013) und unterschiedlichen Blutparametern (Belsky et al., 2015; Levine, 2013) scheint auch die *epigenetische Uhr* ein solcher Marker des biologischen Alterns zu sein.

3.1.1 Die epigenetische Uhr

Steve Horvath von der University of California beschrieb 2013 erstmals ein Set von Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotiden (CpG-Dinukleotide, CpG sites), deren Methylierungsstatus zur Berechnung einer *epigenetischen Uhr* verwendet werden konnte (Horvath, 2013). Das entsprechende und mutmaßlich das biologische Alter reflektierende Methylierungsmuster konnte er in einer Vielzahl

unterschiedlicher, sowohl proliferierender als auch nicht-prolierender, Gewebe nachweisen. Da die Horvath-Uhr allerdings auf der Auswertung von 353 CpG-Dinukleotiden basiert (Horvath, 2013), ist sie für die Analyse großer Kohorten häufig zu aufwändig und teuer. Nicht zuletzt auch aus diesen Gründen haben sich seit der ersten Beschreibung des Methylierungsalters mehrere Arbeitsgruppen mit der Vereinfachung der Methodik und Reduktion der notwendigen CpG-Stellen beschäftigt (Hannum et al., 2013; Vidal-Bralo, Lopez-Golan, & Gonzalez, 2016; Weidner et al., 2014). Die für die unterschiedlichen *epigenetischen Uhren* verwendeten CpG-Dinukleotide überlappen sich dabei interessanterweise nur zum Teil (Tabelle 1).

Obwohl noch nicht bekannt ist, welche Mechanismen schlussendlich zu den altersassoziierten Veränderungen in den spezifischen CpG-Dinukleotiden

Tabelle 1

CpG-Dinukleotide	Horvath et al., 2013	Hannum et al., 2013	Weidner et al., 2014	Vidal-Bralo et al., 2016	Vetter et al., 2018
cg16386080	×	×	×	✓	✓
cg24768561	×	×	×	✓	✓
cg19761273	✓	×	×	✓	✓
cg25809905	✓	×	✓	✓	✓
cg09809672	✓	✓	×	✓	✓
cg02228185	×	×	✓	✓	✓
cg17471102	×	×	×	✓	✓
cg10917602	×	×	×	✓	×
CpG-Positionen insgesamt	353	71	3	8	7

führen, sind die biochemischen Prozesse, welche die Änderung des Methylierungsstatus hervorrufen, weitestgehend bekannt.

In einem enzymatischen Prozess wird das Cytosin in einem CpG-Dinukleotid an der C5 Position des Pyrimidinrings um eine Methylgruppe erweitert oder reduziert (Adams, 1995). Dies geschieht nicht in allen Zellen simultan, so dass bei einem Teil der Zellen die DNA an einer spezifischen Stelle ein CpG-Dinukleotid methyliert vorliegt, während in einem anderen Teil der Zellen dieses CpG-Dinukleotid unmethyliert ist. Aufgrund dieser binären Einteilung eines CpG-Dinukleotides in methyliert und unmethyliert lässt sich die Methylierungsfraction berechnen, die den Anteil der methylierten CpG-Dinukleotide eines Zelltyps oder Gewebes beschreibt.

Im Detail werden diese epigenetischen Veränderungen durch Enzyme katalysiert, die der Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMT) und der Gruppe der ten-eleven translocation (TET) Enzyme angehören. Während DNMT1 die Übertragung des Methylierungsstatus auf den neu synthetisierten Strang bei der Zellteilung übernimmt, sorgen DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L für neue Methylierungen in nicht-proliferierendem Gewebe (Field et al., 2018; Schubeler, 2015). Der Demethylierungsprozess wird vor allem über die TET-Enzyme (TET1, TET2, und TET3) katalysiert oder tritt als Resultat ein unvollständigen Übertragung des Methylierungsstatus im Rahmen der Zellteilung auf (Wu & Zhang, 2017).

Der Anteil der CpG-Dinukleotide der gesamten DNA, die sich während des Alterungsprozesses verändern, ist relativ groß. Etwa ein Drittel der wahrscheinlich 28 Millionen CpG-Dinukleotide scheint betroffen zu sein, wobei bei 60% davon eine Abnahme und bei 40% davon eine Zunahme der Methylierung im Verlauf des chronologischen Alters zu beobachten ist (Johansson, Enroth, & Gyllenstein, 2013). Der Anteil der CpG-Stellen, deren altersassoziierte Veränderungen in einem linearen Verhältnis zum chronologischen Altern stehen, sind in beiden Gruppen etwa gleich (Hannum et al., 2013; Horvath, 2013; Weidner et al., 2014).

Inwieweit die beschriebenen Mechanismen allerdings von einem dem Altern zugrundeliegenden Prozess beeinflusst werden und in der Folge für die

Ausprägung von altersassoziierten Methylierungsänderungen relevant sind, ist noch nicht ausreichend untersucht. Die bisher vorliegenden Studien legen nahe, dass es sich bei der *epigenetischen Uhr* um einen Biomarker handelt, der nicht primär mit der Zellteilung, mitotischem Alter oder zellulärer Seneszenz zusammenhängt [(Horvath, 2013; Lowe, Horvath, & Raj, 2016; Lu et al., 2018), Übersicht in (Field et al., 2018)]. Unsere eigenen und in der vorliegenden Arbeit dargelegten Analysen, in denen wir den Zusammenhang zwischen Methylierungsalter und relativer Leukozyten-Telomerlänge (rLTL) untersuchten, unterstützen diese Annahmen.

Horvath postulierte 2013 den Zusammenhang zwischen dem Methylierungsalter und einem „Epigenetic Maintenance System“ (EMS), welches die epigenetische Stabilität erhalte und für die altersassoziierten Veränderungen im Methylierungsstatus bestimmter CpG-Stellen verantwortlich sei (Horvath, 2013). Die Geschwindigkeit im Fortschreiten der *epigenetischen Uhr* („ticking rate“) beschreibt er als Änderungsrate der durch das EMS verbrauchten Energie über die Zeit. Somit ist in Zellen, die aufgrund besonderer äußerer oder innerer Einflüsse gestresst werden oder die sich in einer teilungsintensiven Phase befinden, ein höherer Energieverbrauch des EMS zu erwarten, um die epigenetische Stabilität in der Zelle zu erhalten. Diese erhöhte Änderungsrate des Energieverbrauchs zeichnet sich als Änderung des Methylierungsstatus in den entsprechenden Positionen ab (Horvath, 2013). Eine Bestätigung dieser Hypothese steht noch aus.

Levine und Kollegen konnten den Einfluss von hormonellen Veränderungen auf die *epigenetische Uhr* feststellen. In ihrer 2016 veröffentlichten Studie zeigten sie, dass eine späte Menopause mit einem niedrigen Methylierungsalter assoziiert ist. Außerdem scheint die *epigenetische Uhr* während der Menopause besonders schnell zu ticken (Levine et al., 2016). Wie groß ein potentieller Einfluss einer interindividuellen genetischen Variabilität auf die *epigenetische Uhr* ist, wurde noch nicht gut untersucht. Allerdings konnte im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) ein Zusammenhang zwischen Varianten der Gene *MLST8* und *DHX57* (Lu et al., 2016) sowie *TERT* (Lu et al., 2018) und dem Methylierungsalter gezeigt werden.

3.1.2 Die relative Leukozyten-Telomerlänge (rLTL)

Bei der relativen Leukozyten-Telomerlänge (rLTL) handelt es sich um einen gut etablierten und häufig verwendeten Biomarker, der in vielen und teilweise sehr großen Studien ($n > 100.000$) untersucht wurde (Jylhava et al., 2017; Lapham et al., 2015).

Telomere sind repetitive, guaninreiche Sequenzen (5'-TTAGGG-3') an den Enden der Chromosomen, die in einem etwa zwölf bis sechzehn Nucleotide langen Einzelstrang enden. An Telomere binden sowohl Shelterin-Proteine als auch Einzelstrang-DNA-bindende Proteinkomplexe. Sie sorgen dafür, dass die Enden der linearen chromosomalen DNA nicht als Strangbruch identifiziert werden und unterbinden damit eine ungewollte DNA-Reparatur, z.B. durch nicht homologes Verknüpfen freier DNA-Enden (non-homologous end joining, NHEJ) (Blackburn, Epel, & Lin, 2015). Aufgrund einer unvollständigen Replikation der Telomeren, kommt es bei jeder DNA-Replikation vor einer Zellteilung zu einer Telomerverkürzung (Watson, 1972; Olovnikov, 1973). Dementsprechend ist die Telomerlänge ein Marker für die ungefähre Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen und damit dem mitotischen Alter einer Zelle (Blackburn, Greider, & Szostak, 2006; Lopez-Otin et al., 2013). Die Verkürzung der Telomere führt bei humanen Zellen in Kultur zur Seneszenz (Hayflick, & Moorhead, 1961). Zellen, die nicht die Möglichkeit haben die Telomerverkürzung enzymatisch auszugleichen, werden über die Telomerlänge in ihrer Teilungsfähigkeit begrenzt (Olovnikov, 1973).

In einer Vielzahl unterschiedlicher Studien konnten Assoziationen zwischen Telomerlänge und unterschiedlichen altersassoziierten Erkrankungen und Phänotypen nachgewiesen werden. Der Zusammenhang zwischen kürzeren Telomeren und Mortalität, myokardialen Ereignissen, Hypertonie, Diabetes Mellitus Typ 2 und vielen weiteren Phänotypen wurde dabei ausführlich beschrieben ((Buxton et al., 2014; Haycock et al., 2014; Huzen et al., 2014; Muezzinler, Zaineddin, & Brenner, 2014; Rode, Bojesen, Weischer, Vestbo, & Nordestgaard, 2013; Shen et al., 2012; Weischer et al., 2012), reviewed in (Bojesen, 2013)).

Die Telomerlänge gilt als ein gut etablierter Biomarker zur Bestimmung des biologischen Alters (Lopez-Otin et al., 2013; Mather, Jorm, Parslow, & Christensen, 2011).

3.2 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung und Validierung der von Vidal-Bralo et al. publizierten Methode zur Messung des Methylierungsalters basierend auf acht CpG-Dinukleotiden (Vidal-Bralo et al., 2016) in der Berliner Altersstudie II.

Ein besonderer Fokus dieser Studie lag auf der Optimierung des beschriebenen Methylierungsassays für die im Labor vorliegenden Versuchskomponenten sowie eine Anpassung des Versuchsablaufs an die verfügbaren Geräte.

Die Etablierung der Methodik erfolgte zum Zweck der Messung der etwa 2.000 DNA-Proben der Probanden der Berliner Altersstudie II (BASE-II). Dabei war unser Ziel eine durchgehend hohe Messqualität für möglichst viele der verfügbaren Proben zu erreichen und potentiell notwendige Mess- und Versuchswiederholungen so effizient und kostengünstig wie möglich zu gestalten. Ein Schwerpunkt lag in diesem Abschnitt der Studie auf der lückenlosen Dokumentation aller Mess- und Versuchswiederholungen zur eindeutigen Identifizierung der Parameter, die zum Ein- oder Ausschluss in die abschließenden Analysen geführt haben.

Die Ermittlung eines Verfahrens zur Berechnung des Methylierungsalters (DNAm age) und des Abweichens des Methylierungsalters vom chronologischen Alter (DNAm age acceleration) in unserer Probandengruppe, war ein weiterer Zielpunkt der vorliegenden Arbeit. Hierbei lag ein besonderer Fokus auf der Anpassung der für die Berechnung verwendeten Formel und der Identifizierung und Anwendung eines statistischen Verfahrens zur Erhebung der Abweichung des Methylierungsalters vom chronologischen Alter unter Einbeziehung relevanter Kofaktoren.

Den Abschluss der Arbeit bilden Analysen, in denen wir die Assoziation der *epigenetischen Uhr* mit der relativen Leukozyten-Telomerlänge (rLTL), die anhand der gleichen DNA-Proben ermittelt wurde, die auch für die Bestimmung des Methylierungsalters verwendet wurden, untersuchten.

3.3 Vertiefung der Methodik

Der von Laura Vidal-Bralo und Kollegen veröffentlichte und in dieser Studie verwendete Methylierungsassay gliedert sich in drei große Versuchsabschnitte

(Abbildung 1). Der erste Schritt im Versuchsablauf ist die *Bisulfit-Konversion* der DNA, gefolgt von einer Multiplex-Polymerasekettenreaktion. Im dritten und letzten Versuchsabschnitt erfolgt die Messung der Methylierungsfraction der untersuchten CpG-Dinukleotide nach einer methylierungssensitiven Einzelnukleotid-Primerextension (methylation-sensitive single nucleotide primer extension, SNuPE).

3.3.1 Bisulfit-Konversion

Bei der Bisulfit-Konversion handelt es sich um eine chemische Reaktion zwischen der Nukleobase Cytosin und Natriumhydrogensulfit (Bisulfit). In Abhängigkeit des Methylierungsstatus erfolgt eine Veränderung der DNA-Primärsequenz. Methyliertes Cytosin bleibt erhalten, während unmethyliertes Cytosin durch Deaminierung zu Uracil wird (Cmet->C; C->T; siehe Abbildung 1). Im Detail erfolgt im ersten Reaktionsteilschritt eine Sulfidierung von Cytosin zu 5,6-Dihydrocytosin-6-Sulphonat. Der daran anschließenden hydrolytischen Deaminierung zu 5,6-Dihydrouracil-6-Sulfonat folgt die alkalische Desulfidierung. Als Resultat steht an der Stelle des unmethylierten Cytosin das Uracil.

Die Bisulfit-Konversion wurde mit dem „EZ-96 DNA Methylation-Lightning™ Kit „ (D5032, Shallow-Well Format) der Firma ZYMO RESEARCH durchgeführt. Das Versuchsprotokoll besteht neben der Vorbereitung des M-Wash-Puffers aus vier großen Abschnitten. Nach einer Inkubation der DNA-Proben mit dem „Lightning Conversion Reagent“ im Thermocycler (3 Schritt-Thermoprofil) erfolgt die Fixierung und Reinigung der Proben in den Silikonsäulen der „Binding Plates“. Darauf folgt die Desulfidierung mit dem „L-Desulphonation Buffer“ bei Raumtemperatur und eine erneute Reinigung der Proben. Schlussendlich werden die konvertierten DNA-Proben aus den Silikonsäulen mit dem „M-Elution Buffer“ in die „Elution Plates“ zentrifugiert.

3.3.2 Multiplex-Polymerasekettenreaktion (mPCR)

Die der Bisulfit-Konversion nachfolgende Multiplex-Polymerasekettenreaktion (mPCR) amplifiziert alle acht DNA-Abschnitte, welche die zu untersuchenden CpG-Positionen umgeben, in einem Reaktionsschritt.

Das Protokoll für die Multiplex-Polymerasekettenreaktion unterscheidet sich in einigen Punkten von einer normalen Singleplex-Polymerasekettenreaktion, in der nur ein einzelner DNA-Abschnitt amplifiziert wird. Da in unserem Assay eine mPCR mit acht Primerpaaren mit Unterschieden in der optimalen Annealing-Temperatur durchgeführt wird, wurden im Rahmen der Etablierung, die Teil der vorliegenden Arbeit war, einige Anpassungen des Assays vorgenommen. Neben der Testung von unterschiedlichen Temperaturprofilen (Touchdown-PCR-Profil, unterschiedliche Annealing-Temperaturen) und Thermocyclern (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) wurde die Funktion zweier Polymerasen (FIREPOL von Solis BioDyne, KAPA2G hotstart von KAPA BIOSYSTEMS) verglichen. Im Bestreben die Kosteneffizienz des Methylierungsassays zu erhöhen, wurden die Enzyme in Bezug auf ihr Potential bei HPLC- und Kartusche-gereinigten PCR-Primern untersucht.

Basierend auf der Auswertung der Testreihen fiel für die nachfolgenden Bestimmungen die Entscheidung zur Verwendung der KAPA2G hotstart Polymerase (ZYMO RESEARCH) mit HPLC-gereinigten Oligonukleotiden. Die Wahl dieser Komponenten steht im Einklang mit Empfehlungen aus den Herstellermanuals „DNA Fragment Analysis User Guide“ (Pub. no. 4474504, Rev. B, Applied Biosystems), „Instruction Manual EZ96 DNA Methylation-Ligthing™ Kit, (Zymo Research) und „A comprehensive Guide to bisulfite-converted DNA Amplification“ (Zymo Research). Alle thermosensitiven Versuchsschritte wurden in dem Thermocycler mit den besten Ergebnissen (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, laborinterne Bezeichnung: „Goldfisch“) durchgeführt.

Alle acht Primerpaare wurden sowohl in Singleplex-PCRs als auch in Multiplex-PCRs auf ihre Funktionalität getestet.

3.3.3 Single Nucleotide Primer Extension (SNUPE)

Vor Durchführung der Single Nucleotide Primer Extension (SNUPE) im letzten Versuchsschritt, wurden die mPCR-Produkte enzymatisch von Oligonukleotiden und dNTPs gereinigt. Dieser Schritt ist notwendig, da bei Verbleib von dNTPs und Oligonukleotide in der Probe bei der folgenden SNUPE ungewollte Reaktionsprodukte entstünden, die das Messergebnis maßgeblich verfälschen

würden. Der Reinigungsschritt wurde mit Exonuclease I (EXO I, New England Biolab) und alkalischer Phosphatase (isoliert aus Garnelen, Shrimp Alkaline Phosphatase, Affymetrix) durchgeführt.

Bei der SNUPE handelt es sich um ein Verfahren, mit dem eine Nukleobase in einer genau definierten Position in der DNA bestimmt werden kann und welches zur Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNP) verwendet wird (Kaminsky, Assadzadeh, Flanagan, & Petronis, 2005).

Dies geschieht über eine Oligonukleotid-Sonde, die an die DNA bindet und genau vor der Position in der Sequenz endet, die untersucht werden soll. Um mehrere Position simultan und in einem Reaktionsschritt messen zu können, ist es möglich mehrere Sonden zur selben Zeit für eine SNUPE zu verwenden. Eine Polymerase erweitert nun die Oligonukleotid-Sonde mit einem komplementären fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleosid-Triphosphat (ddNTP). Da aufgrund der Molekülstruktur des ddNTP keine weitere Prolongation möglich ist, bricht an dieser Stelle die Verlängerung der Oligonukleotid-Sonde ab.

Um bei der Messung der Proben die durch nicht eingebaute ddNTPs provozierten Störungen zu minimieren, erfolgt anschließend eine enzymatische Reinigung mit alkalischer Phosphatase (isoliert aus Garnelen, Shrimp Alkaline Phosphatase, Affymetrix). Damit die DNA für die Messung im Sequenziergerät linear vorliegt und ein unkontrolliertes Annealing der Primer vermieden wird, werden die Proben mit stark entionisiertem Formamid (highly deionized formamide, Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) versetzt.

Im Sequenziergerät erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der SNUPE-Reaktionsprodukte, die mit einem bei jeder Messung mitlaufenden Größenstandard (GeneScan LIZ120 Size Standard, Applied Biosystems) abgeglichen wird. Auf diese Weise kann jedes gemessene Fluoreszenzsignal über die Position in der elektrophoretischen Auftrennung (und im Abgleich mit dem Größenstandard) einer Sondenlänge und damit Sonde zugeordnet werden. Sollten sich während des Sondendesigns zwei Sonden ergeben, die ähnlich lang sind, kann einem der beiden Oligonukleotide beliebig Nukleobasen hinzugefügt werden, die nicht komplementär zur DNA Sequenz sind. Sie beeinflussen nicht das Bindungsverhalten der Sonde sondern verändern lediglich die

Flussgeschwindigkeit in der Elektrophorese, wodurch eine bessere Abgrenzbarkeit möglich wird.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm „Gene Mapper“ (Applied Biosystems), welches die Signalstärke der jeweiligen Sonden quantifizieren kann und bei der Abschätzung der Messqualität behilflich ist.

3.3.4 Versuchsschritt-übergreifende Etablierungen

Die vom Sequenziergerät gemessenen Proben können nur ausgewertet werden, wenn sich die Stärke der Fluoreszenzsignale aller zu messenden SNUPE-Sonden in einem definierten Bereich befindet. Liegt die Signalstärke darüber oder darunter kann sie nicht eindeutig bestimmt werden und die Messung oder der gesamte Versuch müssen wiederholt werden. Da sich die unterschiedlichen Sequenziergerät-Modelle in ihrer Sensitivität unterscheiden, konnten die von Vidal-Bralo und Kollegen (Vidal-Bralo et al., 2016) verwendeten Primer- und Sondenkonzentrationen nicht übernommen werden. Aus diesem Grund wurden Versuchsreihen durchgeführt, in denen das Konzentrationsverhältnis der PCR-

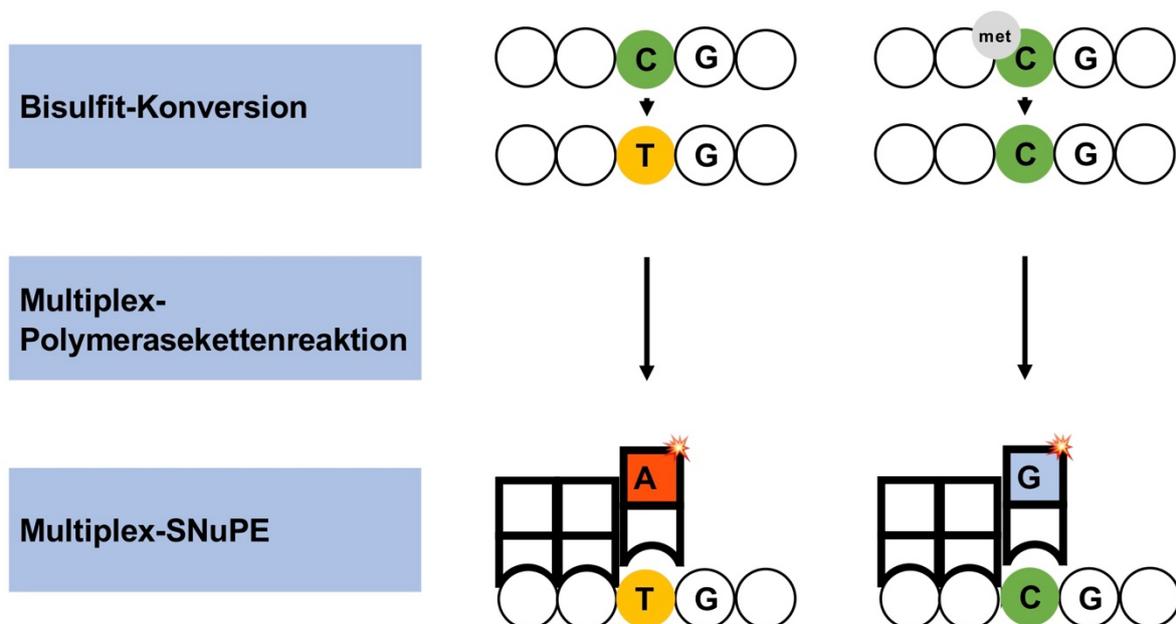


Abbildung 1: Schematische Übersicht der Methylierungsassays. Nachdem eine Veränderung der Basensequenz der DNA in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus erfolgt ist, werden die entsprechenden DNA-Abschnitte durch eine Multiplex-Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Im letzten Versuchsabschnitt, der single-nucleotide Primer Extension (SNUPE), erfolgt die Verlängerung einer Oligonukleotid-Sonde mit einem fluoreszenzmarkierten ddNTP.

Primer und der SNUPE-Sonden variierte wurde. In diesem Zusammenhang ist besonders hervorzuheben, dass es Interaktionen zwischen den Oligonukleotiden zu geben scheint, die Einfluss auf die jeweilige Reaktionsproduktemenge haben. Reduziert man beispielsweise die Konzentration eines einzigen PCR-Primerpaares, kann dies dazu führen, dass eine andere CpG-Position ein überschießend hohes Signal zeigt. Basierend auf den Vorversuchen wurde die Konzentration der Oligonukleotide für cg24768561, cg16386080, cg10917602 und cg19761273 angepasst.

Zusätzlich kann die Signalstärke der Proben im Sequenziergerät über die Menge der Reaktionsprodukte beeinflusst werden, die zur Messung verwendet werden. Um hier regelmäßig zu auswertbaren Ergebnissen zu kommen, wurde die Messung unterschiedlicher Probenmengen hinsichtlich ihrer Signalstärke bewertet. Eine Beladung des Sequenziergerätes mit 0,1 µL der Reaktionsprodukte zeigte die gleichmäßigsten und am besten auswertbarsten Messerergebnisse.

3.3.5 Beurteilung der Messqualität

Obwohl es sich bei dem verwendeten Methylierungsassay um ein robustes Verfahren handelt, kann es vorkommen, dass einzelne Proben nicht für alle zu analysierenden CpG-Positionen ein Messergebnis liefern oder aus anderen Gründen nicht auswertbar sind.

Um nun für alle 2.000 Proben eine einheitliche Bewertung der Messergebnisse zu garantieren, wurde ein Bewertungsalgorithmus entwickelt, der die von „Gene Mapper“ bereitgestellten Qualitätsparameter und einige weitere Kriterien berücksichtigt.

Im Rahmen dieses Algorithmus wurde jede Probe in drei Schritten (Auswertung.A, Auswertung.B, Auswertung.C) in Bezug auf ihre Auswertbarkeit beurteilt und einer der folgenden Kategorien zugeordnet (Auswertung.D, Auswertung.E):

- „Auswerten“ (Auswertung.E=1): die Probe erfüllt in allen CpG-Positionen alle Qualitätskriterien und es besteht kein Zweifel an der Validität der Messung

- „Wiederholung der Sequenzer-Messung (Messwiederholung)“ (Auswertung.E=2): es gilt als wahrscheinlich, dass eine Wiederholung der Sequenzer-Messung ausreicht, um ein auswertbares Ergebnis zu erhalten
- „Wiederholung der mPCR“ (Auswertung.E=3): es gilt als wahrscheinlich, dass nach einer erneut durchgeführten Multiplex-PCR ein auswertbares Ergebnis gemessen werden kann
- „Individuelle Beurteilung“ (Auswertung.E=4): die Messung entspricht nicht den festgelegten Qualitätsparametern, aber basierend auf den in den Algorithmus eingeschlossenen Daten ist die Feststellung der Ursache für die fehlerhafte Messung nicht eindeutig erfassbar. Eine individuelle Untersuchung der Messergebnisse kann in diesem Fall dazu führen, dass die Probe manuell einer der übrigen Kategorien („Auswerten“, „Messwiederholung“, „Wiederholung mPCR“ oder „Wiederholung des gesamten Versuchsablaufs“) zugeordnet wird.
- „Wiederholung des gesamten Versuchsablaufs“ (Auswertung.E=5): die Messung kann nicht ausgewertet werden und nur eine komplette Versuchswiederholung ermöglicht eine erneute Messung. Eine Einordnung in diese Kategorie kann beispielsweise als Resultat eines Pipettierfehlers erfolgen.

Im ersten Schritt des Bewertungsalgorithmus (Auswertung A) werden gegebenenfalls aufgetretene Probleme während der praktischen Durchführung des Versuchs kodiert. So kann hier beispielsweise ein Pipettierfehler (A=2) oder eine zu niedrige DNA-Konzentration (A=1) erfasst werden. Der Code A=0 bedeutet, dass die Probe basierend auf den in diesem Bewertungsschritt untersuchten Daten als auswertbar gilt.

Daraufhin erfolgt eine Beurteilung der vom Sequenzer ausgegeben Rohdaten basierend auf den in „GeneMapper“ definierten Qualitätskriterien (Auswertung B). Hier können Proben markiert werden, die aufgrund zu starker (B=1) oder zu schwacher (B=2) Signalstärke in einer oder mehreren Positionen nicht ausgewertet werden können. Zusätzlich werden weitere Parameter, wie eine zu niedrige „Genotype Quality“ (B=4) oder komplett fehlende Signale in einer oder

mehrerer Positionen (B=3), erfasst. Proben, deren Messergebnis fehlerfrei ist, werden mit einer Null kodiert (B=0).

Schlussendlich wurde jedes einzelne der über 2.000 Messergebnisse visuell überprüft (Auswertung C). Dieser Schritt ist notwendig um den sehr seltenen Fall einer fehlerhaften Messung, die nicht über die vom Hersteller festgelegten Parameter identifiziert werden kann, zu erkennen und zu markieren (Fehler gefunden: C=1; fehlerfreie Probe: C=0).

Für jede der in den einzelnen Bewertungsschritten erfassten Variablen ergeben sich unterschiedliche Konsequenzen bezüglich des Weiteren Verfahrens mit der entsprechenden Probe. Um auch im Nachhinein eindeutig nachvollziehen zu können auf welchen Entscheidungsschritten letztendlich die Einordnung einer Probe in die oben genannten Kategorien (Auswertung.E) basierte, gibt es eine eigene Variable (Auswertung.D). Sie nimmt Werte von eins bis elf an und lässt eindeutige Rückschlüsse auf die Ergebnisse aus Auswertung.A bis

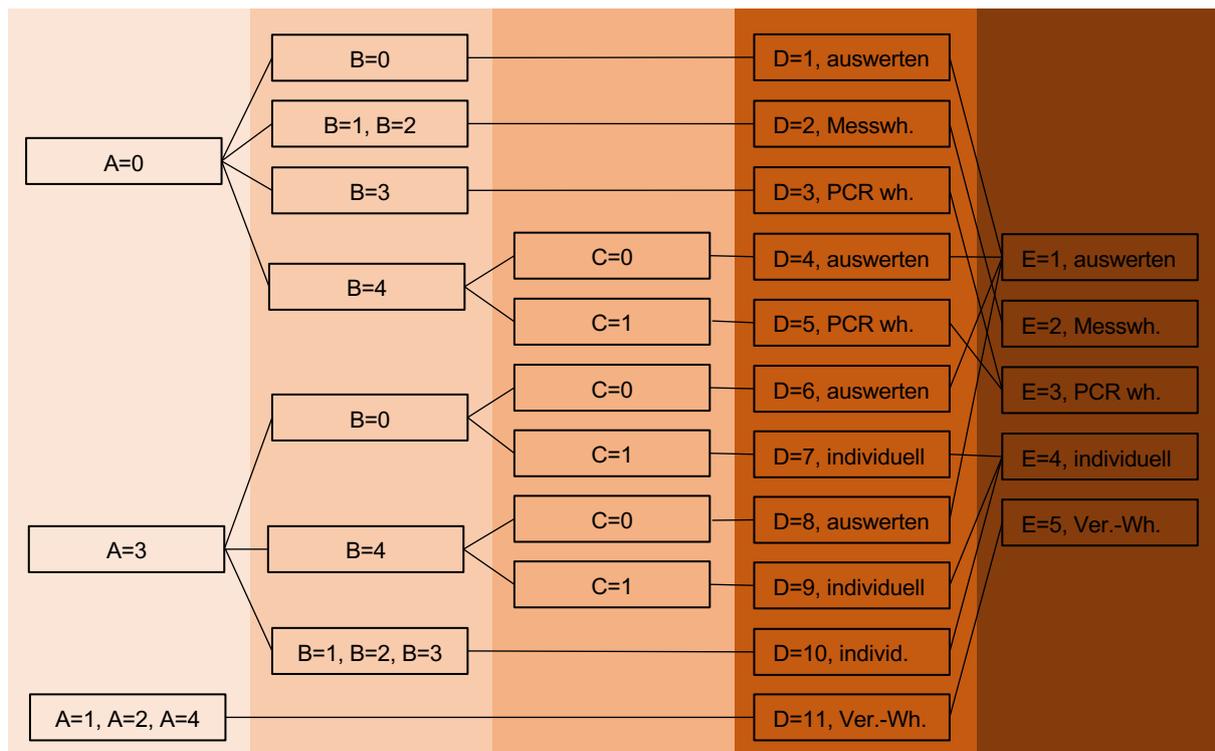


Abbildung 2: Flussdiagramm des Bewertungsalgorithmus. In diesem Diagramm ist der Entscheidungsbaum dargestellt, auf dem die Einteilung jedes Messergebnisses in eine der beschriebenen Kategorien (Auswertung.E) beruhte. *Messwh.*=Messwiederholung, *PCR wh.*=Polymerasekettenreaktion wiederholen, *individ.*=individuell, *Ver.-Wh.*= Versuchswiederholung.

Auswertung.C zu. Eine detaillierte Darstellung des im Bewertungsalgorithmus verwendeten Entscheidungsbaums, lässt sich durch Abbildung 2 nachvollziehen.

3.3.6 Mess- und Versuchswiederholungen

Entsprechend der durch den oben beschriebenen Algorithmus erfolgten Bewertung wurden Mess- oder Versuchswiederholungen für Proben durchgeführt, die nicht direkt als „auswertbar“ klassifiziert werden konnten. Insgesamt wurden zwei Messwiederholungszyklen und eine Wiederholung des Versuchsablaufs ab der Multiplex-PCR durchgeführt. Als Resultat konnten für über 95% der verfügbaren DNA-Proben (N=1.995) auswertbare Ergebnisse ermittelt werden.

Um für jeden Messwert, der in die Analysen eingeschlossen wurde, zweifelsfrei nachverfolgen zu können wie er erhoben wurde, wurde eine fünfstelliger Fallcode entwickelt. Anhand dieses Codes ist es möglich nachzuvollziehen, wie die entsprechende Probe nach der ersten Messung bewertet wurde und welches Ergebnis die gegebenenfalls durch den Algorithmus vorgegebene Mess- oder Versuchswiederholung ergab.

Die erste Position des Codes gibt an, ob die DNA-Probe vorhanden und messbar (Code 1) oder nicht verwertbar (Code 2) war, oder aus anderen Gründen eine Versuchswiederholung stattfinden musste (Code 3, Code 4). Die darauffolgende Position im Fallcode verschlüsselt das Ergebnis des Bewertungsalgorithmus nach der ersten Messung. In der dritten Position werden die Ergebnisse der ersten Messwiederholung kodiert, während die Positionen vier und fünf die Resultate der Versuchswiederholung und der zweiten Messwiederholung beschreiben. Eine genaue Aufschlüsselung des Fallcodes zeigt Abbildung 3.

Eine Null im Fallcode dient als Platzhalter und wird verwendet, wenn für die entsprechende Position nichts kodiert werden muss. Dies ist der Fall, wenn bereits eine Einteilung in die Kategorie „Auswertung“ oder „ausgeschlossen“

stattgefunden hat. Der Fallcode „11000“ würde beispielsweise für eine Probe kodieren, die zur Messung zugelassen ist und direkt nach der ersten Messung ein auswertbares Ergebnis liefert. Eine Null wird auch verwendet, wenn die entsprechende Codeposition „übersprungen“ wurde. Eine Probe, die mit dem

Fallcode „13010“ beschrieben ist, wurde nach der ersten Messung der Kategorie „mPCR Wiederholen“ zugeordnet (Code 3 in dritter Position). Das danach gemessene Ergebnis war auswertbar und die Probe wurde der Kategorie „Auswertung“ zugeordnet (Code 1 in vierter Position).

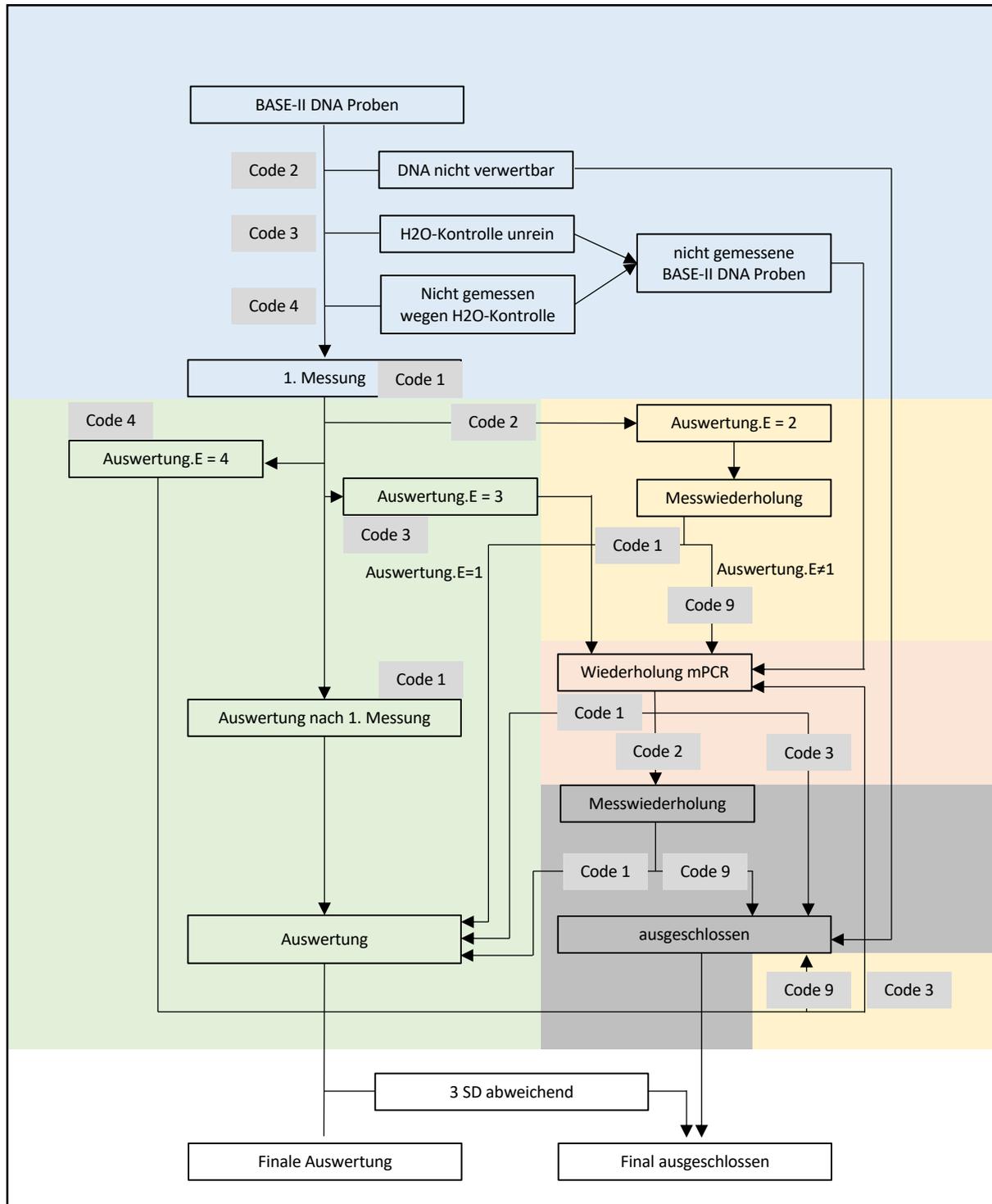


Abbildung 3: Flussdiagramm zur Auswertung des Fallcodes. Die Codeposition im fünfstelligen Fallcode ist farblich markiert (Position 1: blau; Position 2: grün, Position 3: gelb, Position 4: rot; Position 5: grau). Die Pfeile sind mit der Zahl beschriftet durch welche im Fallcode das Ergebnis des Bewertungsalgorithmus an der definierten Stelle im Mess- beziehungsweise Versuchswiederholungszyklus beschrieben wird.

3.3.7 Die Erfassung der Methylierungsfraction

Um die Methylierungsfraction der einzelnen CpG-Dinukleotide auszuwerten, stehen unterschiedliche Daten aus der Messung des Sequenziergeräts zu Verfügung. Die gemessene Lichtintensität der fluoreszierenden ddNTPs wird durch den Sequenzer als Kurve dargestellt, die die gemessene Lichtintensität (y-Achse) über die Zeit (x-Achse) darstellt. Zur Quantifizierung des Methylierungsanteils kann entweder die „Fläche unter der Kurve“ oder die „Höhe der Kurve“ als Parameter verwendet werden. Wir haben uns in dieser Studie für die Verwendung der „Höhe der Kurve“ entschieden, was im Einklang mit Empfehlungen von Kaminsky und Kollegen (Kaminsky et al., 2005) und Herstellerinformationen steht. Der Vorteil im Gegensatz zur „Fläche unter der Kurve“ besteht in der Unabhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit der fluoreszenzmarkierten SNUPE-Sonde. Selbst der Unterschied einer einzigen Nukleobase sorgt dafür, dass sich die Sonden in der Kapillare des Sequenziergerätes im gleichen elektrischen Feld und bei gleicher Anzahl an Nukleobasen unterschiedlich schnell bewegen. Da es nun das Ziel der SNUPE ist, die Sonden mit unterschiedlichen ddNTPs um eine Position zu verlängern, ist eine Variabilität der Basensequenz in einer Position durch den Versuch bedingt und bei jeder Messung vorhanden.

Während sich also die Geschwindigkeit unterscheidet, mit der die Sonden den Laser passieren, hat die Basensequenz keinen Einfluss auf die Lichtintensität des fluoreszenzmarkierten ddNTPs am Ende der Sonde. Die „Höhe der Kurve“ bietet also einen wesentlich verlässlicheren und von der Basensequenz unabhängigeren Parameter als die „Fläche unter der Kurve“.

Die Methylierungsfraction, also der Anteil des methylierten Cytosins in der DNA, kann berechnet werden indem man die Menge des gemessenen Cytosins (entspricht dem Anteil des methylierten Cytosins) durch die Menge des gemessenen Cytosins und des gemessenen Thymins (entspricht dem gesamten Cytosin) teilt.

Methylierungsfraction = $\text{Cytosin} / (\text{Cytosin} + \text{Thymin})$

Es ist wichtig zu wissen, dass je nachdem an welchem Strang die SNUPE-Sonden binden, auch die Kombination Adenin und Guanin auftreten kann.

Der erhaltene Wert liegt zwischen 0 und 1 und wird für alle weiteren Analysen und die Berechnung des Methylierungsalters verwendet. Da wir ein Verhältnis berechnen, also lediglich ein Vergleich zweier Werte innerhalb einer Messung stattfindet, kann man davon ausgehen, dass es sich bei den Messergebnissen um gut vergleichbare Werte handelt. Da nicht wie bei der Erhebung anderer Biomarker, wie beispielsweise der rLTL, ein Vergleich zu Eichproben erfolgt, ist das beschriebene Methylierungsassay sehr robust und potentielle Messfehler können eindeutig identifiziert werden. Es ist also sehr unwahrscheinlich, dass Ungenauigkeiten in der Messung das Ergebnis beeinflussen.

3.4 Klinische Anwendungen

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Studie aus dem Bereich der Grundlagenforschung, weshalb die Erlangung von Ergebnissen mit direktem Bezug zu einer klinischen Anwendung nicht im unmittelbaren Fokus stand. Basierend auf denen im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten und den Analysen, die das Methylierungsalter in Bezug zu chronologischem Alter und rLTL setzten, werden sich aber Aussagen ableiten lassen, die möglicherweise zu klinischen Konsequenzen führen werden.

Wie oben bereits beschrieben, sind zahlreiche Zusammenhänge zwischen Änderungen des Methylierungsstatus und klinischen Parametern und Erkrankungen bekannt (Jylhava et al., 2017). Inwieweit es einen Bezug zwischen den mit Methylierungsveränderungen assoziierten Erkrankungen und der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen und berechneten *epigenetischen Uhr* basierend auf sieben CpG-Dinukleotiden gibt, werden zukünftige Studien zeigen.

Um den klinischen Nutzen der *epigenetischen Uhr* besser beurteilen zu können, fehlen noch experimentelle Studien, die den Ursache-Wirkungs-Bezug zwischen dem Methylierungsalter und den beschriebenen assoziierten Phänotypen erklären. Erst, wenn der biochemische Mechanismus, der zu den altersassoziierten Veränderungen des Epigenoms führt, besser verstanden wird, können wir die *epigenetische Uhr* in Bezug auf ihren klinischen Nutzen endgültig einordnen.

Eine Reihe von Studien zeigt einen Zusammenhang zwischen Genen, die für die Enzyme kodieren, die am Methylierungs- und Demethylierungsprozess beteiligt sind. *DNMT3B* wurde als Onkogen bei Darmkrebs (Lin et al., 2006) und *DNMT3A* als Tumorsupressorgen bei malignen hämatologischen Erkrankungen (Mayle et al., 2015) identifiziert. Mutationen in Genen aus der TET-Familie führen zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für unterschiedliche maligne Erkrankungen (Rasmussen & Helin, 2016). Eine Verbindung zwischen TET2 und hämatologischen malignen Erkrankungen ist beschrieben worden (Rasmussen & Helin, 2016), wohingegen *DNMT1*-Mutationen bei der Entwicklung von altersassoziierten neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle zu spielen scheinen (Baets et al., 2015). Der kausale Zusammenhang zwischen der Methylierung bestimmter Gene und der Entwicklung von malignen Erkrankungen ist ebenfalls publiziert worden (Ohm et al., 2007). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass altersassoziierte Phänotypen oder Erkrankungen durch eine Methylierungsveränderung beeinflusst werden. Inwieweit sich diese Vermutung allerdings für die in den *epigenetischen Uhren* verwendeten CpG-Dinukleotide bestätigt und wie groß der potentielle Einfluss auf das Altern ist, kann basierend auf den bisher durchgeführten Studien noch nicht erklärt werden. Sollte sich ein ursächlicher Zusammenhang zwischen den epigenetischen Veränderungen und den untersuchten Phänotypen bestätigen, kann die Methylierung der DNA möglicherweise auch als Therapieziel bei der Behandlung oder Prävention altersassoziierter Erkrankungen dienen (Field et al., 2018; Jylhava et al., 2017; Weidner & Wagner, 2014).

Es ist allerdings auch möglich, dass das Methylierungsalter die Konsequenzen eines ablaufenden biologischen Alterungsprozesses abbildet (Horvath, 2013). In diesem Sinne ist es denkbar, dass das Methylierungsalter als Parameter eines Screeningverfahrens zur Beurteilung des Risikos für entsprechende altersassoziierte Erkrankungen oder Phänotypen verwendet werden kann. Da es sich bei dem in dieser Studie verwendeten Methylierungsassay um eine kostengünstige Methode handelt, die auch in kleineren Laboren durchführbar ist, wäre die Anwendung für eine große Probandengruppe im Rahmen eines Screenings oder mit diagnostischem Ziel denkbar. Da die Messung des Methylierungsalters auf dem Verhältnis von methylierten zu unmethylierten CpG-Dinukleotiden basiert (und nicht wie bei der Messung der rLTL auf Eichproben angewiesen ist), lassen sich die Ergebnisse unterschiedlicher Labore

gut vergleichen. Zusätzlich ist die für den Patienten zu erwartende Belastung als gering einzuschätzen, da die Bestimmung des Methylierungsalters auf der Basis von DNA-Proben erfolgt, die aus Vollblut gewonnen werden.

3.5 Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

Das Methylierungsalter ist im Vergleich zu anderen Biomarkern noch nicht lange bekannt und wird im Moment intensiv untersucht. Ein Kernpunkt der aktuellen Forschung ist die Identifizierung der Prozesse auf zellulärer Ebene, die zu den Methylierungsänderungen führen auf denen die *epigenetische Uhr* basiert. Obwohl bereits Einiges über die biochemischen Mechanismen, die zu einer Methylierung oder Demethylierung der DNA führen, bekannt ist, wissen wir noch nicht wie sie mit dem biologischen Altern in Verbindung stehen (Jylhava et al., 2017). Beispielsweise ist noch unklar, wie groß der Zusammenhang zwischen dem biologischen Alterungsprozess und den epigenetischen Veränderungen der DNA ist und ob es sich bei den Änderungen des Methylierungsstatus um die Folge oder die Ursache der altersbedingten Phänotypen handelt (Field et al., 2018).

Wie bereits beschrieben, gibt es mehrere unterschiedliche *epigenetische Uhren*. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen in den zur Berechnung des Methylierungsalters herangezogenen CpG-Dinukleotiden (Tabelle 1). Obwohl sich die für die jeweilige Uhr verwendeten CpG-Stellen nur teilweise überlappen, liefern sie alle signifikante Ergebnisse in Bezug auf die Vorhersage des chronologischen Alters (Vidal-Bralo et al., 2016). Um den Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen *epigenetischen Uhren* besser zu verstehen, sind weiterführende Studien nötig.

Um die in dieser Studie erstmals verwendeten und auf sieben CpG-Dinukleotiden basierende *epigenetischen Uhr* besser zu verstehen, ist eine Analyse longitudinaler Daten notwendig. Bei einer Bestimmung des Methylierungsalters im Rahmen der zur Zeit laufenden medizinischen Nachfolgeuntersuchungen der BASE-II-Studie, kann das Fortschreiten des Methylierungsalters bestimmt werden. Diese Daten werden Analysen ermöglichen, die zur Identifizierung von

Risikofaktoren für ein schnelleres Fortschreiten des Methylierungsalters beitragen können. Zusätzlich wird sich das Potential der sieben CpG-Uhr in Bezug auf die Vorhersage von Mortalität und der Entwicklung von altersassoziierten Phänotypen und Erkrankungen zeigen. Es wird von besonderem Interesse sein, die Resultate unserer Analysen mit Ergebnissen longitudinaler Analysen anderer *epigenetischer Uhren* zu vergleichen (reviewed in (Marioni et al., 2018)).

3.6 Quellenverzeichnis

- Adams, R. L. (1995). Eukaryotic DNA methyltransferases--structure and function. *Bioessays*, *17*(2), 139-145. doi:10.1002/bies.950170209
- Baets, J., Duan, X., Wu, Y., Smith, G., Seeley, W. W., Mademan, I., Klein, C. J. (2015). Defects of mutant DNMT1 are linked to a spectrum of neurological disorders. *Brain*, *138*(Pt 4), 845-861. doi:10.1093/brain/awv010
- Baker, G. T., 3rd, & Sprott, R. L. (1988). Biomarkers of aging. *Exp Gerontol*, *23*(4-5), 223-239.
- Belsky, D. W., Caspi, A., Houts, R., Cohen, H. J., Corcoran, D. L., Danese, A., Moffitt, T. E. (2015). Quantification of biological aging in young adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(30), E4104-4110. doi:10.1073/pnas.1506264112
- Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, *350*(6265), 1193-1198. doi:10.1126/science.aab3389
- Blackburn, E. H., Greider, C. W., & Szostak, J. W. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med*, *12*(10), 1133-1138. doi:10.1038/nm1006-1133
- Bojesen, S. E. (2013). Telomeres and human health. *J Intern Med*, *274*(5), 399-413. doi:10.1111/joim.12083
- Butler, R. N., Sprott, R., Warner, H., Bland, J., Feuers, R., Forster, M., Wolf, N. (2004). Biomarkers of aging: from primitive organisms to humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *59*(6), B560-567.
- Buxton, J. L., Das, S., Rodriguez, A., Kaakinen, M., Couto Alves, A., Sebert, S., Blakemore, A. I. (2014). Multiple measures of adiposity are associated with mean leukocyte telomere length in the northern Finland birth cohort 1966. *PLoS One*, *9*(6), e99133. doi:10.1371/journal.pone.0099133
- Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., & Adams, P. D. (2018). DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Mol Cell*, *71*(6), 882-895. doi:10.1016/j.molcel.2018.08.008
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Zhang, K. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell*, *49*(2), 359-367. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.016

Haycock, P. C., Heydon, E. E., Kaptoge, S., Butterworth, A. S., Thompson, A., & Willeit, P. (2014). Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, *349*, g4227. doi:10.1136/bmj.g4227

Hayflick L, Moorhead P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, *25*:585–621.

Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, *14*(10), R115. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115

Huzen, J., Wong, L. S., van Veldhuisen, D. J., Samani, N. J., Zwinderman, A. H., Codd, V., van der Harst, P. (2014). Telomere length loss due to smoking and metabolic traits. *J Intern Med*, *275*(2), 155-163. doi:10.1111/joim.12149

Johansson, A., Enroth, S., & Gyllenstein, U. (2013). Continuous Aging of the Human DNA Methylome Throughout the Human Lifespan. *PLoS One*, *8*(6), e67378. doi:10.1371/journal.pone.0067378

Johnson, T. E. (2006). Recent results: biomarkers of aging. *Exp Gerontol*, *41*(12), 1243-1246. doi:10.1016/j.exger.2006.09.006

Jylhava, J., Pedersen, N. L., & Hagg, S. (2017). Biological Age Predictors. *EBioMedicine*, *21*, 29-36. doi:10.1016/j.ebiom.2017.03.046

Kaminsky, Z. A., Assadzadeh, A., Flanagan, J., & Petronis, A. (2005). Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of metC/C in GC-rich regions. *Nucleic Acids Res*, *33*(10), e95. doi:10.1093/nar/gni094

Lapham, K., Kvale, M. N., Lin, J., Connell, S., Croen, L. A., Dispensa, B. P., Blackburn, E. H. (2015). Automated Assay of Telomere Length Measurement and Informatics for 100,000 Subjects in the Genetic Epidemiology Research on Adult Health and Aging (GERA) Cohort. *Genetics*, *200*(4), 1061-1072. doi:10.1534/genetics.115.178624

Levine, M. E. (2013). Modeling the rate of senescence: can estimated biological age predict mortality more accurately than chronological age? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *68*(6), 667-674. doi:10.1093/gerona/gls233

Levine, M. E., Lu, A. T., Chen, B. H., Hernandez, D. G., Singleton, A. B., Ferrucci, L., . . . Horvath, S. (2016). Menopause accelerates biological aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(33), 9327-9332. doi:10.1073/pnas.1604558113

Lin, H., Yamada, Y., Nguyen, S., Linhart, H., Jackson-Grusby, L., Meissner, A., Jaenisch, R. (2006). Suppression of intestinal neoplasia by deletion of Dnmt3b. *Mol Cell Biol*, *26*(8), 2976-2983. doi:10.1128/mcb.26.8.2976-2983.2006

Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039

Lowe, D., Horvath, S., & Raj, K. (2016). Epigenetic clock analyses of cellular senescence and ageing. *Oncotarget*, 7(8), 8524-8531. doi:10.18632/oncotarget.7383

Lowsky, D. J., Olshansky, S. J., Bhattacharya, J., & Goldman, D. P. (2014). Heterogeneity in healthy aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69(6), 640-649. doi:10.1093/gerona/glt162

Lu, A. T., Hannon, E., Levine, M. E., Hao, K., Crimmins, E. M., Lunnon, K., Horvath, S. (2016). Genetic variants near MLST8 and DHX57 affect the epigenetic age of the cerebellum. *Nat Commun*, 7, 10561. doi:10.1038/ncomms10561

Lu, A. T., Xue, L., Salfati, E. L., Chen, B. H., Ferrucci, L., Levy, D., Horvath, S. (2018). GWAS of epigenetic aging rates in blood reveals a critical role for TERT. *Nat Commun*, 9(1), 387. doi:10.1038/s41467-017-02697-5

Marioni, R. E., Suderman, M., Chen, B. H., Horvath, S., Bandinelli, S., Morris, T., Hagg, S. (2018). Tracking the Epigenetic Clock Across the Human Life Course: A Meta-analysis of Longitudinal Cohort Data. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. doi:10.1093/gerona/gly060

Mather, K. A., Jorm, A. F., Parslow, R. A., & Christensen, H. (2011). Is telomere length a biomarker of aging? A review. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 66(2), 202-213. doi:10.1093/gerona/glq180

Mayle, A., Yang, L., Rodriguez, B., Zhou, T., Chang, E., Curry, C. V., Goodell, M. A. (2015). Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation. *Blood*, 125(4), 629-638. doi:10.1182/blood-2014-08-594648

Muezzinler, A., Zaineddin, A. K., & Brenner, H. (2014). Body mass index and leukocyte telomere length in adults: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*, 15(3), 192-201. doi:10.1111/obr.12126

Ohm, J. E., McGarvey, K. M., Yu, X., Cheng, L., Schuebel, K. E., Cope, L., Baylin, S. B. (2007). A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet*, 39(2), 237-242. doi:10.1038/ng1972

Olovnikov A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*, 41:181–190.

- Rasmussen, K. D., & Helin, K. (2016). Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev*, 30(7), 733-750. doi:10.1101/gad.276568.115
- Rode, L., Bojesen, S. E., Weischer, M., Vestbo, J., & Nordestgaard, B. G. (2013). Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46,396 individuals. *Thorax*, 68(5), 429-435. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-202544
- Schubeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517(7534), 321-326. doi:10.1038/nature14192
- Shen, Q., Zhao, X., Yu, L., Zhang, Z., Zhou, D., Kan, M., Liu, Y. (2012). Association of leukocyte telomere length with type 2 diabetes in mainland Chinese populations. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(4), 1371-1374. doi:10.1210/jc.2011-1562
- Simm, A., Nass, N., Bartling, B., Hofmann, B., Silber, R. E., & Navarrete Santos, A. (2008). Potential biomarkers of ageing. *Biol Chem*, 389(3), 257-265. doi:10.1515/bc.2008.034
- Vidal-Bralo, L., Lopez-Golan, Y., & Gonzalez, A. (2016). Simplified Assay for Epigenetic Age Estimation in Whole Blood of Adults. *Front Genet*, 7, 126. doi:10.3389/fgene.2016.00126
- Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, 239(94), 197-201.
- Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Wagner, W. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol*, 15(2), R24. doi:10.1186/gb-2014-15-2-r24
- Weidner, C. I., & Wagner, W. (2014). The epigenetic tracks of aging. *Biol Chem*, 395(11), 1307-1314. doi:10.1515/hsz-2014-0180
- Weischer, M., Bojesen, S. E., Cawthon, R. M., Freiberg, J. J., Tybjaerg-Hansen, A., & Nordestgaard, B. G. (2012). Short telomere length, myocardial infarction, ischemic heart disease, and early death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(3), 822-829. doi:10.1161/atvbaha.111.237271
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*, 18(9), 517-534. doi:10.1038/nrg.2017.33

4. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Valentin Max Vetter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Die Epigenetische Uhr und relative Leukozyten-Telomerlänge repräsentieren weitgehend unterschiedliche Aspekte des Alterns in der Berliner Altersstudie II (BASE-II)“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 01.11.2018

Unterschrift Valentin Max Vetter

5. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation 1: Valentin Max Vetter, Antje Meyer, Mohsen Karbasiyan, Elisabeth Steinhagen-Thiessen, Werner Hopfenmüller und Ilja Demuth,

„Epigenetic Clock and Relative Telomere Length Represent Largely Different Aspects of Aging in the Berlin Aging Study II (BASE-II)“,

Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences,

doi:10.1093/gerona/gly184

18. August 2018

Beitrag im Einzelnen:

- Planung und Ausarbeitung des experimentellen Versuchsablaufs mit Prof. Dr. rer. nat. Ilja Demuth
- Hauptanteil an der Etablierung und Validierung der Methodik in Abstimmung mit Prof. Dr. rer. nat. Ilja Demuth, Mohsen Karbasiyan und Bastian Salewsky. Im Einzelnen:
 - Datenbankrecherche und theoretische Primerkontrolle mit <https://www.ensembl.org>
 - experimentelle Kontrolle der PCR-Primer und Optimierung der Multiplex-PCR (Enzyme, Temperaturprofile, Primerkonzentrationen)
 - experimentelle Kontrolle der SNUPE-Primer und Optimierung der Single Nucleotide Primer Extension (SNUPE; Mengenverhältnis der einzelnen SNUPE-Primer, Entwicklung einer zeitoptimierten Pipettiertechnik)
- Validierung der etablierten Methodik über Proben mit bekannten Methylierungsfractionen
- Selbstständige Durchführung des etablierten Versuchsablaufes mit DNA-Proben der Probanden der BASE-II (N=1895), im Einzelnen:
 - Verdünnung der isolierten DNA
 - Erstellung der des Primer-Premix für die Multiplex-PCR und die SNUPE
 - Durchführung der Bisulfit-Konversion
 - Durchführung der Multiplex-PCR
 - Durchführung der SNUPE

- Durchführung der enzymatischen Reinigungsschritte nach mPCR und SNUPE
- Selbstständige Durchführung der Datenaufbereitung, im Einzelnen:
 - Erstellung des Panels zur Analyse der Rohdaten mit GeneMapper™ Software 5, Applied Biosystems
 - Bereinigung und Exportierung der Daten aus GeneMapper™ Software 5
 - Bestimmung der Qualitätskriterien für den Ein- beziehungsweise Ausschluss der gemessenen Proben
 - Erstellung eines Algorithmus über die Syntax-Funktion von SPSS Version 25, IBM, zur Anwendung der definierten Qualitätskriterien
- Selbstständige Entwicklung und Anwendung eines fünfstelligen Fallcodes zur Dokumentation der Kriterien, die zum Einschluss der Proben in die endgültigen Analysen geführt haben
- Hauptanteil der statistischen Auswertung in Abstimmung mit Prof. Dr. rer. nat. Ilja Demuth und PD Dr. rer. nat, Dr. med. Werner Hopfenmüller
- Hauptanteil an der Anfertigung des Manuskriptes in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Ilja Demuth
- Selbstständige Anfertigung aller Tabellen und Abbildungen, außer Figure 1, die in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Ilja Demuth entstand

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

6. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"GERONTOLOGY"** Selected Category

Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 36 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	JOURNALS OF GERONTOLOGY SERIES A-BIOLOGICAL SCIENCES AND MEDICAL SCIENCES	17,809	4.902	0.023940
2	JOURNAL OF THE AMERICAN GERIATRICS SOCIETY	29,943	4.155	0.036360
3	GERONTOLOGIST	8,922	4.078	0.009260
4	AMERICAN JOURNAL OF GERIATRIC PSYCHIATRY	6,363	3.480	0.010470
5	JOURNALS OF GERONTOLOGY SERIES B-PSYCHOLOGICAL SCIENCES AND SOCIAL SCIENCES	7,444	3.054	0.009140
6	INTERNATIONAL JOURNAL OF GERIATRIC PSYCHIATRY	8,476	2.940	0.010410
7	BMC Geriatrics	3,801	2.866	0.009450
8	AGING & MENTAL HEALTH	4,282	2.663	0.007050
9	Geriatrics & Gerontology International	2,640	2.656	0.006790
10	PSYCHOLOGY AND AGING	8,985	2.361	0.008300
11	INTERNATIONAL PSYCHOGERIATRICS	5,621	2.261	0.010530
12	JOURNAL OF AGING AND HEALTH	2,411	2.134	0.004320
13	JOURNAL OF AGING AND PHYSICAL ACTIVITY	1,661	2.038	0.002540
14	RESEARCH ON AGING	1,657	2.000	0.001620
15	JOURNAL OF APPLIED GERONTOLOGY	1,208	1.992	0.001870
16	Dementia-International Journal of Social Research and Practice	1,087	1.671	0.002120
17	AGEING & SOCIETY	2,791	1.620	0.003040
18	GERIATRIC NURSING	963	1.541	0.001570

7. Druckexemplar der Publikation

Vetter, V. M., Meyer, A., Karbasiyan, M., Steinhagen-Thiessen, E., Hopfenmüller, W., & Demuth, I. (2019). Epigenetic clock and relative telomere length represent largely different aspects of aging in the Berlin Aging Study II (BASE-II). *The Journals of Gerontology: Series A*, 74(1), 27-32.

<https://doi.org/10.1093/gerona/gly184>

8. Supplementary Material

Vetter, V. M., Meyer, A., Karbasiyan, M., Steinhagen-Thiessen, E., Hopfenmüller, W., & Demuth, I. (2019). Epigenetic clock and relative telomere length represent largely different aspects of aging in the Berlin Aging Study II (BASE-II). *The Journals of Gerontology: Series A*, 74(1), 27-32.

<https://doi.org/10.1093/gerona/gly184>

9. Lebenslauf

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

10. Komplette Publikationsliste

Vetter, V. M., Meyer, A., Karbasiyan, M., Steinhagen-Thiessen, E., Hopfenmuller, W., & Demuth, I. (2018). Epigenetic clock and relative telomere length represent largely different aspects of aging in the Berlin Aging Study II (BASE-II). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. doi:10.1093/gerona/gly184

11. Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

In erster Linie gilt mein Dank Prof. Dr. rer. nat. Ilja Demuth für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Die exzellente Betreuung durch Prof. Dr. rer. nat. Ilja Demuth ging weit über das übliche Maß hinaus. Für seine Hilfe bei der Lösung von methodischen, statistischen und strukturellen Problemen und die fachlichen Anregungen bin ich ihm über alle Maßen dankbar.

Des Weiteren danke ich Bastian Salewsky, Mohsen Karbasyian und Gabriele Hildebrand für die hilfreiche Unterstützung bei Fragen zur täglichen Laborarbeit und den konstruktiven Beiträgen im Rahmen der Etablierung der Methodik. PD Dr. rer. nat, Dr. med. Werner Hopfenmüller danke ich für die freundliche und kompetente Unterstützung bei statistischen Fragestellungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Biologie des Alterns“ für die schöne und offene Atmosphäre und die produktive und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.