

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von klonaler Hämatopoese unbekanntem Potentials
auf die epigenetische Altersbeschleunigung

The influence of clonal hematopoiesis of indeterminate potential
on epigenetic age acceleration

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jasper David Feldkamp

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung	7
Abstract	8
1 Einleitung	9
1.1 Epigenetische Alterung	9
1.2 Epigenetische Uhren	10
1.3 Minimierte epigenetische Uhren	12
1.4 Klonale Hämatopoese von unbekanntem Potenzial	13
1.5 Aktueller Forschungsstand	14
1.6 Fragestellung	15
2 Methodik	16
2.1 Patientenproben & Kohorte	16
2.2 DNA-Extraktion	16
2.3 Bisulfit-Konvertierung	16
2.4 PCR-Amplifikation und Aufreinigung	17
2.5 <i>Single Nucleotide Pair Extension</i>	17
2.6 Kapillare Sequenzierung	18
2.7 Aufbereitung der Sequenzierdaten	18
2.8 Mutationsscreening	18
2.9 Statistische Analyse	19
3 Ergebnisse	22
3.1 Kohorten Beschreibung	22
3.2 Klinische Charakteristika und epigenetische Altersbeschleunigung	24

3.3 Individuelle Mutationen, funktionelle Gruppen und epigenetische Altersbeschleunigung.....	27
3.4 CHIP Klongröße und epigenetische Altersbeschleunigung.....	30
4 Diskussion.....	32
4.1 Vergleich der Studie mit vorbestehenden Publikationen.....	32
4.2 Einfluss der Klongröße auf mit klonaler Hämatopoese assoziierte Krankheitsbilder.....	33
4.3 Mögliche molekulare Zusammenhänge von klonaler Hämatopoese und epigenetischer Altersbeschleunigung.....	34
4.4 Die 7-CpG-Uhr.....	35
4.5 Limitationen.....	35
5 Schlussfolgerungen.....	37
6 Literaturverzeichnis.....	38
7 Eidesstattliche Versicherung.....	47
8 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen.....	48
9 Auszug aus der Journal Summary List.....	49
10 Druckexemplar der Publikation.....	50
11 Lebenslauf.....	56
12 Komplette Publikationsliste.....	58
13 Danksagung.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligonukleotide der ms-SNuPE-Methode. Primersequenzen für mPCR und ms-SNuPE nach Vidal-Bralo et al. ²³ und zugehörige Konzentrationen pro Probenansatz nach Vetter et al. ¹⁶	20
Tabelle 2: Demographische, klinische und klonale Hämatopoese-Daten. Charakteristika von 381 Teilnehmer*innen mit erfolgreicher Analyse des DNA-Methylierungsalters. Wenn nicht anders ausgewiesen, sind Fälle als n (%) dargestellt. Modifiziert aus Feldkamp <i>et al.</i> ¹	23
Tabelle 3: Epigenetische Altersbeschleunigung unter Berücksichtigung von demographischen und klinischen Daten. Vergleich zwischen der Altersbeschleunigung (AA und IEAA) anhand von Risikofaktoren und Komorbiditäten in unserer Kohorte. P-Werte wurden durch Mann-Whitney-Tests ermittelt.....	26

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Epigenetische gegen chronologische Alterung.** Schematische Darstellung möglicher Entwicklungen des epigenetischen Alters gegenüber dem chronologischen Alter. Eigene Darstellung.....13
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der ms-SNuPE-Methode.** Sequenzierersymbol aus „3730/3730xl DNA Analyzer Getting Started“. ⁶⁴ Eigene Darstellung.21
- Abbildung 3: Dichtediagramme zur Verteilung von epigenetischer Altersbeschleunigung in ausgewählten demographischen und klinischen Charakteristika.** Gestrichelte Linien zeigen Mittelwerte. P-Werte wurden durch Mann-Whitney-Tests ermittelt. **A** Geschlecht **B** CHIP **C** Maligner Tumor **D** Koronare Herzkrankheit **E** Niereninsuffizienz **F** Hyperurikämie.....25
- Abbildung 4: CHIP-Mutationen und epigenetische Altersbeschleunigung.** A, C und E modifiziert aus Feldkamp et al.¹ **A und B** Streudiagramm von AA (**A**) und IEAA (**B**) für CHIP-Mutationen nach betroffenen Genen. **C und D** Streudiagramm von AA (**C**) und IEAA (**D**) für CHIP-Mutationen nach funktionellen Gengruppen. **E und F** Streudiagramm von AA (**E**) und IEAA (**F**) nach Anzahl von CHIP-Mutationen. Mittelwert und Standardabweichung sind für alle Diagramme in Schwarz dargestellt.29
- Abbildung 5: CHIP-Klongröße und epigenetische Altersbeschleunigung.** Modifiziert aus Feldkamp et al.¹ **A und B** Streudiagramme von Age Acceleration (AA) und Intrinsic Epigenetic Age Acceleration (IEAA) für Untergruppen der CHIP-Klongröße gemessen in der varianten Allelfrequenz (VAF) mit Ergebnis der zugehörigen Varianzanalyse (ANOVA) Mittelwert und Standardabweichung sind in Schwarz angegeben. **B und C** Streudiagramm von AA und IEAA gegen VAF mit Ergebnissen der zugehörigen Spearman's Korrelationen. In allen Fällen mit mehreren Mutationen wurde die größte VAF gewählt.31

Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>Age Acceleration</i>
AHT	Arterielle Hypertonie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANCA	Anti-Neutrophile Cytoplasma Antikörper
ANCOVA	<i>Analysis of Covariance</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ASXL1	<i>Additional Sex Combs-Like 1</i>
BASE-II	Berliner Altersstudie II
CHIP	<i>Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential</i>
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotide
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DM II	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNAm Age	<i>DNA methylation age</i>
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EEAA	<i>Extrinsic Epigenetic Age Acceleration</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IEAA	<i>Intrinsic Epigenetic Age Acceleration</i>
JAK2	Janus Kinase 2
KHK	Koronare Herzkrankheit
LTL	Leukozyten-Telomerlänge
mPCR	<i>Multiplex Polymerase Chain Reaction</i>
ms-SNuPE	<i>Methylation sensitive Single Nucleotide Pair Extension</i>
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PPM1D	<i>Protein Phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1D</i>
SF3B1	Splicing-Faktor 3B1
SRSF2	Serin/Arginin-reicher Splicing-Faktor 2
TET	<i>Ten Eleven Translocation</i>
TP53	Tumor Protein P53

U2AF1	<i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1</i>
UV	Ultraviolett
VAF	<i>Variant Allele Frequency</i>
ZRSR2	<i>Zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 2</i>

Zusammenfassung

Das Phänomen der klonalen Hämatopoese von unbekanntem Potenzial (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, CHIP) betrifft einen erheblichen Teil der älteren Bevölkerung und kann mit einer Vielzahl von altersassoziierten Erkrankungen einhergehen, die auf beschleunigte Alterungsprozesse bei den Betroffenen hindeuten können. Die DNA-Methylierung an ausgewählten Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotiden (CpG) korreliert mit dem chronologischen Alter und der Mortalität, was die Etablierung sogenannter epigenetischer Uhren ermöglichte. In dieser Arbeit wurde die Verbindung zwischen CHIP und epigenetischer Altersbeschleunigung in 381 Individuen, deren CHIP-Status durch *targeted sequencing* vorbekannt ist, erforscht.

Achtundzwanzig Prozent der Teilnehmer*innen wiesen CHIP mit einer medianen varianten Allelfrequenz (VAF) von 6% auf. Während CHIP nicht generell mit einer signifikant gesteigerten epigenetischen Altersbeschleunigung (*age acceleration*, AA) assoziiert war (CHIP positiv 1,1 Jahre vs. CHIP negativ -0,4 Jahre, $P=0,183$), zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der CHIP-Klongröße und AA. Träger von großen CHIP-Klonen mit hoher VAF ($\geq 10\%$) hatten eine signifikant höhere AA verglichen mit CHIP-negativen Individuen ($P=0,01$, mittlere Differenz in AA von 4,5 Jahren). Eine signifikant gesteigerte AA wurde ab einer VAF von $\geq 5\%$ erreicht. Eine Spearman's Korrelation zeigte die signifikante Korrelation zwischen AA und CHIP-Klongrößen ($R_S = 0,329$; $P < 0,001$), die auch nach Korrektur für Alter und Geschlecht signifikant war ($R_S = 0,324$; $P < 0,001$).

Diese Ergebnisse deuten auf signifikant beschleunigte Alterungsprozesse in Individuen mit CHIP ab einer Klongröße von 5% VAF hin und erlauben eine neue Perspektive auf die kritische Rolle der CHIP-Klongröße.

Abstract

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) occurs in the blood of a significant proportion of elderly individuals and is associated with various age related conditions, indicating accelerated aging processes. DNA methylation at various CpG loci correlates with chronological age and mortality, which led to the establishment of epigenetic clocks. In this study, we explored associations between CHIP and epigenetic age acceleration in 381 elderly individuals with previously determined CHIP status using a targeted sequencing approach.

CHIP was present in 28% of study participants with a median variant allele frequency (VAF) of 6%. While CHIP in general was not significantly associated with epigenetic age acceleration (AA) (CHIP positive 1.1 vs. CHIP negative -0.4 years, $P=0.183$), epigenetic AA significantly correlated with CHIP clone size. Presence of CHIP clones with large VAF ($\geq 10\%$) significantly correlated with increased AA when compared to CHIP negative individuals ($P=0.01$, mean difference in AA 4.5 years). Statistical significance for AA was reached from a CHIP clone size of $\geq 5\%$ VAF. In Spearman's correlation, we observed a significant, positive correlation between AA and clone size ($R_s = 0.329$; $P < 0.001$) in CHIP positive individuals ($n=106$), which remained significant after adjustment for sex and chronological age ($R_s = 0.324$; $P < 0.001$).

These findings indicate accelerated aging processes in individuals with CHIP of a VAF of 5% and greater. Though cause and consequence relations require further study, these results provide a new perspective on the critical role of CHIP clone size.

1 Einleitung

Alterung ist ein unvermeidbarer, vielschichtiger Prozess, der alle lebenden Organismen betrifft und im Zuge dessen es zum fortschreitenden Verlust der biologischen Integrität auf zellulärer und insbesondere genomischer Ebene kommt.² Im Menschen wird der fortgeschrittene biologische Alterungsprozess häufig durch das Entstehen oder Einsetzen bestimmter Erkrankungen sichtbar. Dazu zählen insbesondere Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, neurodegenerative Erkrankungen und Krebserkrankungen (*reviewed in Franceschi et al.*).³ Die unterschiedliche Verteilung dieser Erkrankungen zwischen einzelnen Personen, sowie der ausgeprägte Einfluss auf die Lebenserwartung, unterstreicht weiter die Wichtigkeit der Differenzierung zwischen rein chronologischer Alterung gegenüber der biologischen Alterung eines Individuums.^{4, 5} Das Messen biologischer Alterung ist sehr komplex. Eine allgemeingültige Definition für den Alterungsprozess konnte bislang nicht gefunden werden, jedoch gibt es immer wieder Bemühungen, diesen zu klassifizieren und somit besser mess- und untersuchbar zu machen. Im Jahr 2013 veröffentlichten López-Otín *et al.* die neun „Kennzeichen des Alterns“, die in der Fachwelt auf breite Akzeptanz treffen. Im Einzelnen sind genomische Instabilität, Telomerverkürzung, epigenetische Veränderungen, Verlust der Proteostase, Deregulation der Nährstoffwahrnehmung, mitochondriale Dysfunktion, zelluläre Seneszenz, Erschöpfung der Stammzellreserve und die Veränderung interzellulärer Kommunikation beschrieben worden.⁶ Die Geschwindigkeit, in der diese Prozesse stattfinden, unterliegt individuellen Schwankungen.

1.1 Epigenetische Alterung

Unter dem Alterungsmerkmal „epigenetische Veränderungen“ versteht man die konstante epigenetische Modifikation des Genoms über die Lebensspanne eines Individuums. Dabei handelt es sich vor allem um Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA, posttranslationale Histonmodifikationen, Chromatinremodellierung und Transkriptionsveränderungen.⁶ Bei Veränderungen im Methylierungsmuster handelt es sich vor allem um altersabhängig wechselnde Anteile von 5-Methylcytosin an Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotiden (CpGs). Das Anfügen von Methylgruppen wird durch DNA Methyltransferasen (DNMT) und deren Entfernung unter Beteiligung der „*Ten Eleven Translocation*“-Familie (TET) katalysiert.^{7, 8} An einzelnen CpGs kommt es zu konstanter Hyper-

oder Hypomethylierung, die mit dem chronologischen Alter korreliert.^{9, 10} Ob die Korrelation des Methylierungsstatus einzelner CpGs mit dem chronologischen Alter selbst ein Prozess ist, der die biologische Alterung vorantreibt oder ob er über zwischengeschaltete Prozesse die Alterung lediglich widerspiegelt, ist gegenwärtig nicht geklärt.¹¹

1.2 Epigenetische Uhren

In diesem Zusammenhang konnten in den letzten Jahren sogenannte epigenetische Uhren (*epigenetic clocks*) etabliert werden. Epigenetische Uhren ermitteln das epigenetische Alter oder DNA-Methylierungsalter (DNAm Age) durch eine multiple, lineare Regression des chronologischen Alters auf die Methylierungsfractionen an vorausgewählten CpGs. Die Methylierungsfractionen können sich dabei kontinuierlich zwischen 0 und 1 bewegen (0= keine Methylierung der gemessenen CpGs, 1= alle gemessenen CpGs methyliert). Die Auswahl der *clock*-CpGs erfolgt zuvor in einer (*penalized*) Regression aus einem Trainingsdatensatz. Diese Auswahl wird zusammen mit der resultierenden Regressionsgleichung anschließend in einem unabhängigen Validierungsdatensatz überprüft.^{12, 13} In den epigenetischen Uhren wird so das chronologische Alter aus dem Anteil der Methylierung an den betreffenden CpGs vorhergesagt. Zur Bestimmung der epigenetischen Altersbeschleunigung erfolgt in einem weiteren Schritt die Regression der resultierenden Residuen auf das chronologische Alter.¹⁴⁻¹⁶ Die epigenetische Altersbeschleunigung bietet gegenüber dem DNAm Age den Vorteil, dass sie unabhängig vom chronologischen Alter des einzelnen Individuums betrachtet werden kann. Mittlerweile existieren eine Reihe an epigenetischen Uhren, die in der Anzahl und in den verwendeten CpGs variieren und mit unterschiedlicher Präzision bestimmte Aspekte biologischer und epigenetischer Alterung beleuchten.^{12, 13, 17-19} Ebenso bestehen Unterschiede in den Anforderungen an das untersuchte Gewebe (gewebespezifische, z.B. Epidermis oder Blut vs. gewebeunabhängige Uhren). Die Spannbreite der Uhren reicht von einzelnen (Weidner *clock*) bis hin zu mehreren tausend CpGs (ZhangAge, *best linear unbiased prediction*-Methode).¹⁹⁻²¹ Die ersten weitreichend angewandten epigenetischen Uhren wurden 2013 von Steve Horvath (353 CpGs) sowie Hannum *et al.* (71 CpGs) veröffentlicht.^{12, 13} Um die Vorhersagegenauigkeit zu verbessern und um auf Veränderungen im Aufbau der gängigen Plattformen zur Messung der Methylierungsfractionen zu reagieren, sind seitdem mehrere weitverbreitete epigenetische Uhren hinzugekommen.^{15, 19} Noch jüngere Ansätze zum epigenetischen Alter versuchen zunächst CpGs auszuwählen, die besonders

gut mit anderen Alterungs-Biomarkern (z.B. Plasmaproteine oder das Abschneiden in funktionellen Tests) korrelieren, um sie dann aus den Methylierungsfractionen dieser CpGs vorherzusagen. In einem zweiten Schritt erfolgt dann eine erneute Regression von der vorbekannten Zeit bis zum Tod der Individuen des Testdatensatzes auf die vorhergesagten Alterungs-Biomarker. Die resultierende Regressionsformel kann dann für unabhängige Kohorten zur epigenetischen Mortalitätsvorhersage genutzt werden.^{17, 18}

Für die technische Messung der Methylierungsfractionen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Am häufigsten werden *bead-arrays* verwendet. Dabei werden bisulfit-konvertierte DNA-Fragmente an CpG-Locus-spezifische Oligonukleotide, die wiederum an Silika-*beads* auf einem *bead-chip* gebunden sind, hybridisiert. Diese Oligonukleotide werden anschließend abhängig davon, ob der CpG-Locus vor der Bisulfit-Konvertierung methyliert war, um eine fluoreszenzmarkierte Nukleobase verlängert. Das Lichtsignal wird erfasst und in die Methylierungsfraction am CpG-Locus übersetzt^{12, 13, 19} Eine weitere Möglichkeiten zur Messung ist *Pyrosequencing*, bei dem die bisulfit-konvertierte DNA um die CpG-Loci herum Echtzeit-sequenziert wird (Pyrophosphatabhängige Lichtreaktion nach Verlängerung einer einzelnen Nukleobase).²² Ebenfalls möglich ist eine Messung über eine *methylation sensitive Single Nucleotide Primer Extension* (ms-SNuPE) mit kapillarer Sequenzierung, die ähnlich den *bead-Arrays* auf einer Hybridisierung von CpG-Locus-spezifischen Oligonukleotiden an bisulfit-konvertierte DNA-Fragmente beruht, die anschließend durch fluoreszenzmarkierte Nukleobasen verlängert werden, deren Signal im Zuge einer elektrophoretischen Auftrennung im Sequenzierer ausgelesen wird.²³

Die epigenetische Altersbeschleunigung korreliert mit altersassoziierten Erkrankungen wie kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen, malignen Neoplasien oder HIV-Infektionen sowie mit und altersassoziierten Phänotypen wie Gebrechlichkeit (*frailty*) oder dem Nachlassen kognitiver Fähigkeiten.²⁴⁻³⁰ Vor allem aber weisen Menschen mit positiver, epigenetischer Altersbeschleunigung eine generell erhöhte Mortalität auf.^{14, 31, 32} Im Gegensatz dazu zeigen Menschen mit außergewöhnlich langer Lebensdauer (≥ 100 Jahre) und deren Nachkommen eine negative epigenetische Altersbeschleunigung.³³ Abbildung 1 zeigt die Gegenüberstellung von chronologischem Alter und epigenetischem Alter. Zudem zeigt sich eine unterschiedliche Messbarkeit der epigenetischen Altersbeschleunigung für bestimmte physiologische Gegebenheiten. So lässt sich für Kinder und junge Erwachsene (0 bis 20 Jahre) eine deutlich stärkere Dynamik in der Hyper-/Hypo-

methylierung derselben CpGs feststellen, die in Erwachsenen (>20 Jahre) kontinuierliche/monotone Veränderung über die Zeit aufweisen. Diese Besonderheit führt dazu, dass nicht alle epigenetischen Uhren auch für Kinder und Jugendliche pauschal anwendbar sind.^{12, 34} Aufgrund der sehr hohen Korrelation mit der Mortalität wie auch verschiedenen, alters-assoziierten Zuständen, wird die epigenetische Altersbeschleunigung weitläufig als quantifizierbare Annäherung an das biologische Alter einer (erwachsenen) Person verstanden.^{12, 17, 35}

1.3 Minimierte epigenetische Uhren

Aktuell steht rund ein Dutzend verschiedener epigenetischer Uhren zur Verfügung. Am häufigsten stützen sie sich auf Methylierungs-*arrays* (z.B. Illumina 450k- oder 850k/EPIC *arrays*; 450.000 und 850.000 gemessene CpGs), die zwar umfangreiche Daten ermitteln, aber auch (kosten)-aufwändiger sind. Selbst die umfangreichsten epigenetischen Uhren benötigen nur einen Bruchteil der mit dieser Methode generierten Informationen zu den so ermittelten CpG-Methylierungsfractionen (z.B. Horvath's *clock*: 353 CpGs, Hannum's *clock*: 71 CpGs, SkinBlood *clock*: 391 CpGs).^{12, 13, 15} Um den technischen und kostspieligen Aufwand zu verringern und epigenetische Altersvorhersagen für ein breiteres Spektrum von Individuen im klinischen, forensischen oder wissenschaftlichen Kontext zu ermöglichen, wurden sogenannte minimierte epigenetische Uhren entwickelt. Diese Uhren zeichnen sich vor allem durch ihre Unabhängigkeit von Methylierungs-*arrays* zur Bestimmung der Methylierungsfractionen aus.^{36, 37} Vidal-Bralo *et al.* entwickelten eine minimierte epigenetische Uhr auf Basis der kapillaren Sequenziermethode, die mit vertretbarem experimentellen und finanziellen Aufwand die Bestimmung des epigenetischen Alters ermöglicht.²³ Die Vergleichbarkeit dieser Uhr mit der gemeinhin als Goldstandard verstandenen Uhr nach Horvath sowie die Vergleichbarkeit der ms-SNuPE Methode mit Methylierungs-*Arrays* wurde bereits demonstriert.^{38, 39} Vetter *et al.* adaptierten die Uhr (als sogenannte „7-CpG-Uhr“) für eine Berliner Kohorte aus der Berliner Altersstudie II (BASE-II).^{16, 40}

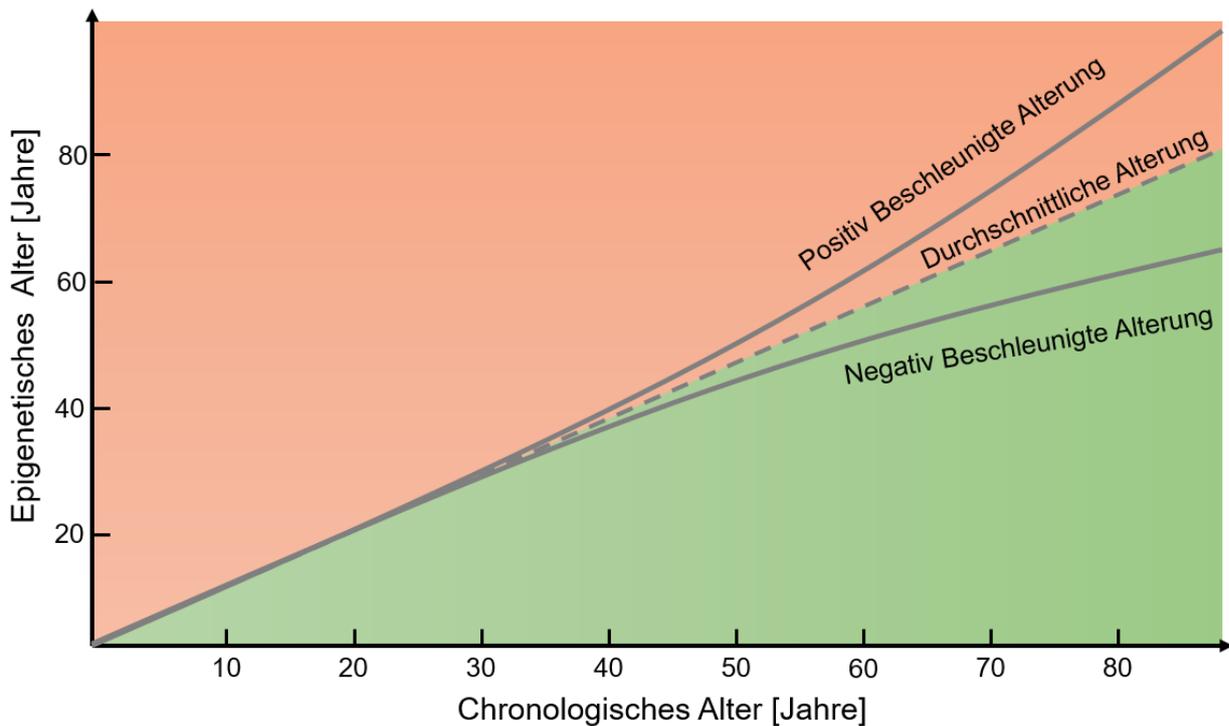


Abbildung 1: Epigenetische gegen chronologische Alterung. Schematische Darstellung möglicher Entwicklungen des epigenetischen Alters gegenüber dem chronologischen Alter. Eigene Darstellung.

1.4 Klonale Hämatopoese von unbekanntem Potenzial

Ein weiteres Alterungsmerkmal ist die genomische Instabilität. Im Verlauf eines Lebens ist die DNA einer Vielzahl von intrinsischen (z.B. reaktiven Sauerstoffspezies, spontane Hydrolyse oder DNA-Replikationsfehler) und extrinsischen (z.B. karzinogene Umweltsstoffe, UV- oder Röntgenstrahlung, zytostatische Therapien) Faktoren ausgesetzt, die sie potentiell beschädigen können. Sofern diese Schäden den Reparaturmechanismen entgehen, werden sie mit jeder Zellreplikation weitergegeben und überdauern im Organismus.⁴¹ Auf diese Weise bilden sich in Geweben mit fortschreitender Zeit somatische Mosaik aus. Im hämatopoetischen System kann sich diese Form der Alterung in klonaler Hämatopoese äußern. Unter klonaler Hämatopoese versteht man klonale Blutzellen aus einer hämatopoetischen Stammzelle (*hematopoietic stem cell*, HSC) oder einem *Pool* von HSCs, die eine oder auch mehrere Mutationen aufweisen.⁴² Grenzt man diese Mutationen auf solche ein, die im Zusammenhang mit Blutkrebs beschrieben sind, spricht man von klonaler Hämatopoese von unbekanntem Potenzial (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, CHIP). CHIP entspricht, der gängigen Definition entsprechend, dem Auftreten von Blutkrebs-assoziierten somatischen Mutationen mit einer Varianten-

Allelfrequenz (VAF) von $\geq 2\%$ in den hämatopoetischen Zellen in Menschen, die keine maligne hämatologische Neoplasie aufweisen.⁴³ Die VAF drückt hierbei den Anteil von Allelen mit einer Mutation in Bezug auf alle analysierten Allele an diesem Locus aus. Mehrere Studien konnten den Einfluss von CHIP auf das Vorkommen verschiedener alters-bezogener Erkrankungen darstellen.⁴⁴⁻⁴⁸ Während CHIP, bei jüngeren Menschen kaum zu finden ist, steigt ihre Prävalenz mit höherem Lebensalter deutlich an. So sind ab dem 60. Lebensjahr, abhängig von der untersuchten Bevölkerung und der Sequenzier-technik, etwa 15-20% der Menschen CHIP-Träger.^{44, 45, 47} Zu den am häufigsten in CHIP mutierten Genen gehören die *DNMT3A*, *TET2* und *Additional Sex Combs-Like 1 (ASXL1)*, die funktionell den epigenetischen Modifikatoren zuzuordnen sind. Andere in CHIP häufig mutierte funktionelle Gengruppen sind Gene des Spliceosoms (z.B. Splicing-Faktor 3B1 (*SF3B1*), Serin/Arginin-reicher Splicing-Faktor 2 (*SRSF2*), U2 *small nuclear RNA auxiliary factor 1 (U2AF1)* und *Zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 2 (ZRSR2)*, DNA Reparatur Gene (*Protein Phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1D (PPM1D)* und Tumor Protein P53 (*TP53*)) und Gene mit Verbindung zu verschiedenen Signalwegen (z.B. Janus Kinase 2 (*JAK2*)).^{44, 45, 47, 49, 50} Ein gehäuftes Auftreten von CHIP ist für verschiedene Krankheitsentitäten wie kardiovaskuläre Erkrankungen, die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease, COPD*), Autoimmunerkrankungen (Anti-Neutrophile Cytoplasmatische Antikörper (ANCA)-Vaskulitis und Systemischer Lupus Erythematoses) oder HIV nachgewiesen worden.^{46, 48, 51-53} Zudem gibt es Hinweise, dass CHIP bei einigen Erkrankungen wie soliden malignen Tumoren, COPD, Herzinsuffizienz oder chronischer Niereninsuffizienz zu einem beschleunigten Krankheitsverlauf führt.⁵⁴⁻⁵⁷ Ebenso ist bekannt, dass das Risiko, beim Vorliegen von CHIP eine hämatologische Neoplasie zu entwickeln, erhöht ist.⁴³⁻⁴⁵ Die Summe all dieser Faktoren resultiert schließlich in einer allgemein erhöhten Sterblichkeit im Vergleich zu Individuen ohne CHIP.^{44, 45}

1.5 Aktueller Forschungsstand

Basierend auf dem höheren Vorkommen von altersassoziierten Erkrankungen und Mortalität in CHIP-Trägern ist es von großem Interesse potenzielle Verbindungen zwischen CHIP und epigenetischer Altersbeschleunigung zu erforschen. Zwei jüngst veröffentlichte Studien widmen sich diesem Thema.^{58, 59} Robertson *et al.* beschrieben für zwei untersuchte Geburtskohorten eine beschleunigte epigenetische Alterung beim Vorliegen von

CHIP gemessen mit Horvath's *clock* und ZhangAge. Nachun *et al.* zeigten eine beschleunigte epigenetische Alterung für CHIP-Träger für Horvath's *clock*, Hannum's *clock*, Skin-BloodClock, PhenoAge und GrimAge aus epigenetischen Daten von Individuen aus mehreren epidemiologischen Kohorten des „*Trans-Omics for Precision Medicine*“-Programms. Allerdings beruhen beide Studien auf der Detektion von CHIP-Mutationen mittels *whole genome sequencing*, wodurch bei der Methoden-bedingten, vergleichsweise niedrigen Sequenziertiefe kleinere und mittelgroße CHIP-Klone weniger sicher detektiert werden können und somit ein Teil der CHIP-Träger möglicherweise nicht entdeckt wurden.⁶⁰

1.6 Fragestellung

Diese Studie soll untersuchen, ob CHIP-positive Personen eine beschleunigte epigenetische Alterung aufweisen und wenn ja, ob bestimmte CHIP-Charakteristika im besonderen Maße dazu beitragen. Wir haben dafür eine etablierte Methode zur Bestimmung des epigenetischen Alters, die 7-CpG-Uhr (modifizierte epigenetische Uhr nach Vidal-Bralo *et al.*), in einer Kohorte von 381 Menschen angewandt, deren CHIP-Status durch *targeted sequencing* bereits bestimmt worden war.^{16, 23, 49}

2 Methodik

2.1 Patientenproben & Kohorte

Für diese Studie wurden zwischen Juni 2015 und Oktober 2017 Vollblutproben von Patient*innen gesammelt, die in dieser Zeit in der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin, am Centrum für muskuloskeletale Chirurgie oder der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie an der Charité – Universitätsmedizin Berlin hospitalisiert waren. Studienteilnehmer*innen mit der Diagnose eines soliden Tumors wurden vor dem Start einer (Radio-)Chemotherapie eingeschlossen. Patient*innen mit einer hämatologischen Neoplasie wurden nicht in die Studienkohorte aufgenommen. Zusätzlich wurden demographische und klinische Daten erhoben. Die Studie ist in Einklang mit der Erklärung von Helsinki durchgeführt worden und durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin bewilligt worden (Antragsnummer EA1/271/14). Alle Studienteilnehmer*innen haben schriftlich ihr Einverständnis mit den Rahmenbedingungen dieser Studie erklärt.

2.2 DNA-Extraktion

Aus Vollblut-EDTA-Proben wurde mit dem „QIAamp DNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) genomische DNA gewonnen. Die erforderliche DNA-Quantität (500 ng) wurde mit dem „QuantiFluor dsDNA System“ (Promega, Fitchburg, USA) überprüft. Um die Methylierungsfractionen an 7 CpG-Loci zu ermitteln, wurde ein durch Vidal-Bralo *et al.* entwickeltes Protokoll verwendet, das durch Vetter *et al.* adaptiert wurde.^{16, 23}

2.3 Bisulfit-Konvertierung

In der Bisulfit-Konvertierung erfolgt durch eine Reaktion mit Bisulfit (Natriumhydrogensulfit) eine Deaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil, während methyliertes Cytosin unverändert erhalten bleibt. Im hier angewandten Protokoll wurden 500 ng genomischer DNA durch das „EZ DNA Methylation-Lightning Kit“ (ZymoResearch, Irvine, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers bisulfit-konvertiert. Kurz gefasst erfolgt zunächst die Sulfidierung von in der DNA enthaltenem, nicht-methyliertem Cytosin zu 5,6-Dihydrocytosin-6-Sulphonat und anschließend eine Deaminierung von 5,6-Dihydrocytosin-6-

Sulphonat zu 5,6-Dihydrouracil-6-Sulfonat in einem Inkubationsschritt. Es folgt eine Aufreinigung und Bindung an eine Silikonsäule, mit folgender Desulfidierung zu 5,6-Dihydrouracil. Abschließend wird die bisulfit-konvertierte DNA erneut aufgereinigt und von der Säule gelöst.

2.4 PCR-Amplifikation und Aufreinigung

Zur Amplifikation der Regionen mit den CpG-Loci von Interesse erfolgte eine Multiplex-Polymerasekettenreaktion (mPCR). Dafür wurden jeweils 3,32 µl *Ultrapure*-Wasser (Bio&Sell, Feucht bei Nürnberg, Deutschland), 3 µl 5x KAPA2G Buffer A (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland), 1 µl Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs, 2 mM, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland), 1 µl mPCR-primer-*premix*, 0,08 µl KAPA2G *Fast Hot-Start Polymerase* (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) und 1,6 µl bisulfit-konvertierte DNA verwendet. Alle Oligonukleotid-Sequenzen innerhalb dieses Protokolls wurden gemäß Vidal-Bralo *et al.*²³ genutzt, während Oligonukleotid-Konzentrationen gemäß Vetter *et al.*¹⁶ genutzt wurden (Tabelle 1). Anschließend erfolgten nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten jeweils 30 Zyklen bei 95°C für 30 Sekunden, 60°C für 90 Sekunden und 72°C für 90 Sekunden. Abschließend folgte ein Zyklus bei 72°C für 10 Minuten. Alle Inkubations-/Cycling-Schritte wurden im Thermocycler "MyCycler Thermal Cycler" (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt. Zur enzymatischen Aufreinigung wurde das mPCR-Produkt anschließend mit 0,075 µl *Ultrapure*-Wasser (Bio&Sell, Feucht bei Nürnberg, Deutschland), 0,3 µl 10x *Shrimp Alkaline Phosphatase Reaction Buffer* (Affymetrix, Santa Clara, USA), 0,3 µl 10x *Exonuclease I Reaction Buffer* (New England Biolabs, Ipswich, USA), 1,3 µl *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Affymetrix, Santa Clara, USA) und 0,025 µl *Exonuclease I* (New England Biolabs, Ipswich, USA) gemischt und über 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der beteiligten Enzyme bei 80°C über 20 Minuten.

2.5 Single Nucleotide Pair Extension

In der *Single Nucleotide Pair Extension* (SNUPE) erfolgte zunächst die Hybridisierung der Primer, die in ihrer Sequenz genau vor den jeweiligen CpG-Loci von Interesse enden. Anschließend erfolgte die Verlängerung des Primers mit fluoreszierenden Dideoxynukleosid-Triphosphaten (ddNTP), wodurch gleichzeitig eine weitere Polymerisation hinter dem markierten Nukleosid verhindert wurde. Hierfür wurden 1,2 µl *Betaine Solution*

(Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland), 1 μl *SNaPshot Multiplex Kit* (Applied Biosystems, Waltham, USA), 0,8 μl SNUPE-Primerpremix und 2 μl des enzymatisch aufgereinigten mPCR-Amplikons verwendet. Es folgte ein Cycling-Protokoll bestehend aus 25 Zyklen von jeweils 10 Sekunden bei 95°C, 5 Sekunden bei 50°C und 30 Sekunden bei 60°C. Anschließend wurden zur enzymatischen Aufreinigung 5 μl des SNUPE-Produkts zu 2 μl *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Affymetrix, Santa Clara, USA) gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Abschließend folgte eine Hitze-Inaktivierung des Enzyms bei 75°C für 15 Minuten.

2.6 Kapillare Sequenzierung

Die Messung der jeweiligen SNUPE-Fluoreszenz erfolgte in einer kapillaren Sequenzierung. In dieser Methode werden DNA-Fragmente in einer Elektrophorese aufgetrennt und nach Induktion durch einen Laser die Fluoreszenzsignale ausgelesen. Zur Vorbereitung auf die Messung im „3730 DNA Analyzer“ (Applied Biosystems, Waltham, USA) wurden 0,05 μl „GeneScan 120 LIZ Size Standard“ (Applied Biosystems), 9,95 μl „HiDi Formamide“ (Applied Biosystems) zu 0,1 μl des enzymatisch gereinigten SNUPE-Produkts gegeben. Eine schematische Darstellung der wichtigsten Aspekte des experimentellen Ablaufs bis zur Sequenzierung ist Abbildung 2 zu entnehmen.

2.7 Aufbereitung der Sequenzierdaten

Aus der Höhe der resultierenden Fluoreszenzspitzen in Kombination mit den Informationen über die Größe der SNUPE-Fragmente kann auf das Verhältnis von methyliertem zu unmethyliertem Cytosin an den jeweiligen CpG-Loci geschlossen werden. Die aus der Sequenzierung resultierenden Daten wurden in der „GeneMapper Software 5“ (Applied Biosystems) aufbereitet.

2.8 Mutationsscreening

Die Ermittlung und Veröffentlichung des CHIP-Mutationsstatus erfolgte bereits durch Arends *et al.*⁴⁹ Dabei wurde genomische DNA mit dem (adaptierten) „TruSight Myeloid Sequencing Panel“ (Illumina, San Diego, USA) auf das Vorhandensein von CHIP untersucht und in einer unabhängigen ultra-tiefen Sequenzierung überprüft.

2.9 Statistische Analyse

Das DNA-Methylierungsalter (DNAm *age*) wurde anhand der Regressionsformel der Berliner Altersstudie II aus den Methylierungsfractionen an 7 der 8 ermittelten CpGs berechnet. Details zur zugrundeliegenden Kohorte, die Regressionskoeffizienten und Auswahl der 7 CpGs sind in Vetter *et al.* beschrieben.¹⁶ Die *Age Acceleration* (AA) wurde in einer Regression von DNAm *age* auf das chronologische Alter bestimmt.^{14, 24, 61} Um den Einfluss Blutbild-abhängiger Veränderungen auf das epigenetische Alter zu minimieren, wurde die sogenannte intrinsische epigenetische *Age Acceleration* (IEAA) in einer Regression von DNAm *age* auf das chronologische Alter und Zellzahl mehrerer Blutzelllinien (Neutrophile, Basophile und Eosinophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) bestimmt.^{62, 63}

Unterschiede zwischen Gruppen wurden über Varianz- und Kovarianzanalysen (ANOVA und ANCOVA) mit Welch-Test sowie folgender Kontrastbildung ermittelt. Falls ANOVA/ANCOVA-Voraussetzungen nicht erfüllt waren, wurden Kruskal-Wallis-Tests mit anschließenden Mann-Whitney-Tests angewandt. Korrelationen wurden mittels (partieller) Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizienten bestimmt. Als Signifikanzniveau wurde 0,05 festgelegt. Statistische Analysen wurden in „*IBM SPSS Statistics*“ Version 27 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt.

Tabelle 1: Oligonukleotide der ms-SNuPE-Methode. Primersequenzen für mPCR und ms-SNuPE nach Vidal-Bralo *et al.*²³ und zugehörige Konzentrationen pro Probenansatz nach Vetter *et al.*¹⁶

CpG site	Forward-Sequenz	Reverse-Sequenz	c-mPCR [μM]	SNuPE-Sequenz	c-SNuPE [μM]
cg09809672	TGAGAAATT-TAGGAA-GATAGTAAAT-GTTTA	AATT-TATCCTCCCAC-CTACAAATTCC	4	TAACCAAACAACCAA-CIAACATCTTCTC	12,5
cg24768561	GTTTTGAGG-TAAATGG-GATTTT	CCCAACCA-ATAAACCAACAC	2	ATAACTAAAAACA AAAACTCA-ACCAATATCCTCAATCCAAAAC-CTTATAAAACC	15
cg16386080	TTGGGG-TAGGG-GATTAAGT-TAGTT	TCCCTTTTTA-CATCCAATACAA TTTT	0,75	gccagcgtcagacatcatatgcagatac-CCAATACAATTTTTAAAAC-CTACTCATATT-CTAAACCTACTTTAAACC	7,5
cg10917602	TAG-GAAGGTGG-GAAGGGT	CATCCCCACCA-AATTCTC	4	gatacCCCTCCAAACCA-ATCTAAACACCCTAAAATAACI-ACTACAAATAAACAAAAAC	17,5
cg02228185	AATTATTT-GGTGAAAT-GATTTTTGT-TATA	AATAATTTTAC-CTCCAAC-CCTATTCTCTA	2	GGAGTATTTTTGGTTAAGTATT-GGTTAGAGAATGG	7,5
cg25809905	GGGTTTTGTT-TAGGGGAGTT-TTT	TTT-CCATCCAATCTT-TCAACAATAC	4	attgatcgtggtgatccgATAAATAA-TATACTCAATACTATACCTACI-TATATTAACCCAC	15
cg19761273	GGAGGTTTT-GATGTT-TAGTTTGAAG	TCCACTCCT-TATTTCTTTA-CAAA	0,75	AACATTCA-AATCCAACACAAATAAAAAATA-TTAACTCCITCTCCAAACC	5
cg17471102	GAAAGATTTT-TGTTTGTGAT-TAGGG	AATTATCCCATT-CTACCTTTTCCC	2	ATAAACCCCTAATTCATAATA-TAACTAAACTAACACAAAATCC C	2,5

c = Konzentration in mPCR- beziehungsweise SNuPE-Primer-Premix.

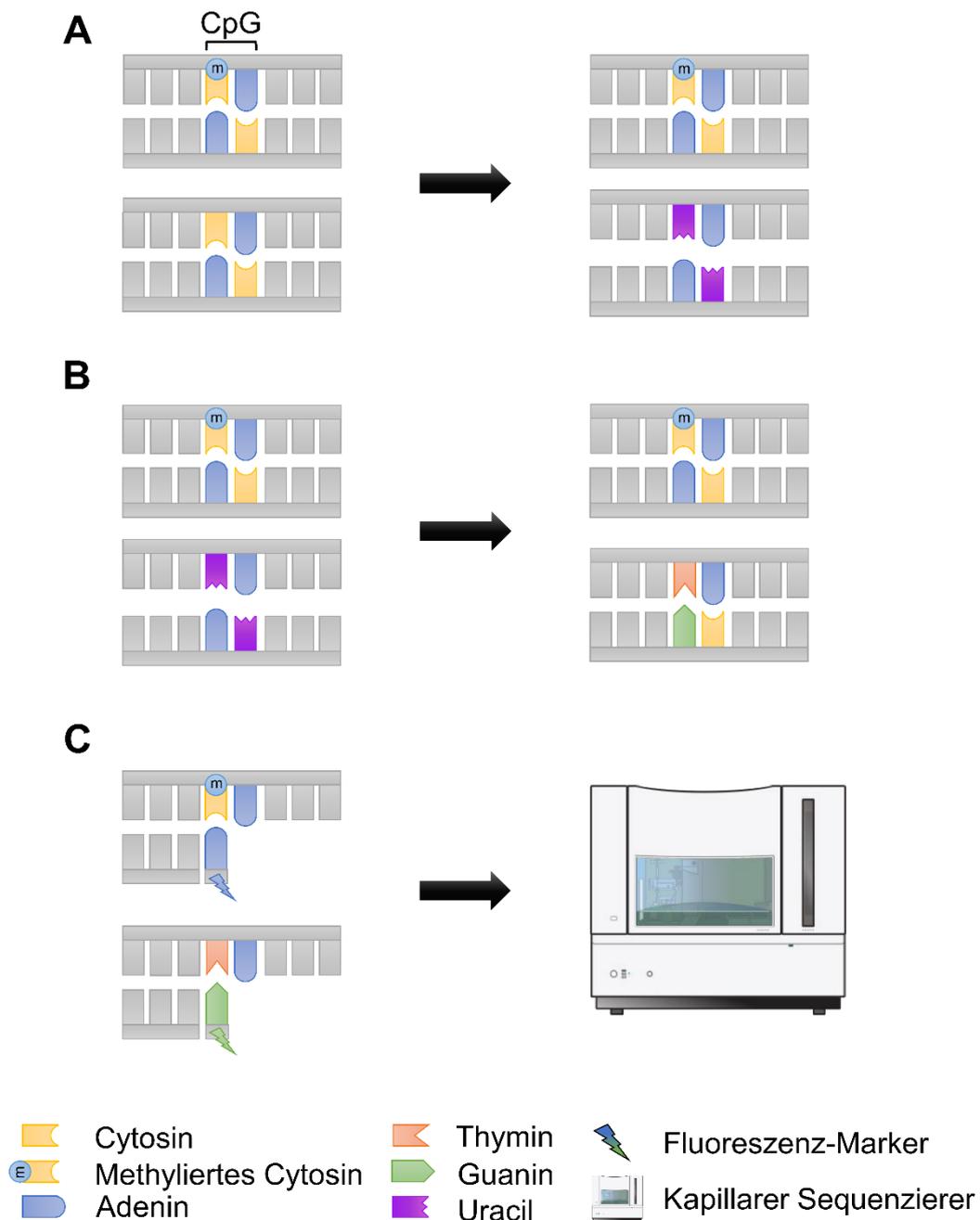


Abbildung 2: Schematische Darstellung der ms-SNuPE-Methode. Sequenzierersymbol aus „3730/3730xl DNA Analyzer *Getting Started*“.⁶⁴ Eigene Darstellung.

A Bisulfit-Konvertierung. Umwandlung von nicht-methyliertem Cytosin zu Uracil. Methyliertes Cytosin verbleibt unverändert.

B mPCR. Vervielfältigung der DNA-Abschnitte um die 8 CpGs mit Übersetzung von Uracil zu Thymin.

C SNuPE & Sequenzierung. Primerhybridisierung vor CpG-Loci und Verlängerung um passende fluoreszenzmarkierte Nukleobase. Auslesen des Fluoreszenzsignals in einem kapillären Sequenziergerät.

3 Ergebnisse

3.1 Kohorten Beschreibung

Methylierungsfractionen konnten erfolgreich für 381 von 417 (= 91%) Studienteilnehmer*innen ermittelt werden. Dabei mussten 31 Teilnehmer*innen auf Grund unzureichender DNA-Quantität ausgeschlossen werden. Die Sequenziererergebnisse von fünf weiteren Teilnehmer*innen erfüllten nicht die Kriterien der internen Qualitätskontrolle. Das mittlere chronologische Alter betrug 74,7 Jahre (Standardabweichung $\pm 7,82$ Jahre, Spannweite 55-98 Jahre) und 209 (= 55%) der Studienteilnehmer*innen waren männlich. 183 Teilnehmer*innen wiesen eine koronare Herzkrankheit (KHK= 49%) auf, 69 eine peripher arterielle Verschlusskrankheit (pAVK= 18%), 307 eine arterielle Hypertonie (AHT= 81%), 113 einen Diabetes mellitus Typ II (DM II= 30%) und 87 waren mit einem BMI ≥ 30 adipös (= 23%). Zusätzlich hatten 149 Teilnehmer*innen eine chronische Niereninsuffizienz (CNI= 40%) und 39 benötigten in diesem Zusammenhang eine Hämodialyse (= 10%). 69 Teilnehmer*innen hatten die Erstdiagnose eines soliden Tumors (= 18%). Insgesamt war eine hohe Prävalenz klinisch relevanter (Ko-)Morbiditäten in der Kohorte zu verzeichnen. Eine detaillierte Darstellung der klinischen und demographischen Eigenschaften der untersuchten Kohorte ist in Tabelle 2 dargestellt.

106 Teilnehmer*innen (= 28%) hatten einen positiven CHIP-Status. Die am häufigsten betroffenen Gene waren *DNMT3A* (= 13%), *TET2* (= 8%) und *ASXL1* (= 3%). Eine detaillierte Grafik mit der VAF- und Mutationsverteilung ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Demographische, klinische und klonale Hämatopoese-Daten. Charakteristika von 381 Teilnehmer*innen mit erfolgreicher Analyse des DNA-Methylierungsalters. Wenn nicht anders ausgewiesen, sind Fälle als n (%) dargestellt. Modifiziert aus Feldkamp *et al.*¹

Variable	Fehlende Daten	Fälle	%
Demographie			
Weiblich	0	172	45%
Männlich	0	209	55%
Alter, Jahre (Mittel [SA])	0	74,7	±7,9
Alter <61		3	0.8%
Alter 61-70		129	33.9%
Alter 71-80		171	44.9%
Alter >80		78	20.5%
Klinische Daten			
Maligner Tumor	0	69	18%
Koronare Herzkrankheit	4	183	49%
Herzinsuffizienz	4	150	40%
Herzrhythmusstörung (inklusive Vorhofflimmern)	4	193	51%
Peripher arterielle Verschlusskrankheit	4	69	18%
Arterieller Hypertonus	4	307	81%
Typ 2 Diabetes mellitus	4	113	30%
Dyslipidämie	4	207	55%
Adipositas (BMI ≥ 30)	4	87	23%
Hyperurikämie	4	45	12%
Niereninsuffizienz (alle)	4	149	40%
Mit Hämodialyse	4	39	10%
Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung	4	47	12%
Klonale Hämatopoese			
Eine oder mehrere Mutationen mit VAF ≥ 2%	0	106	28%
Mehr als eine Mutation	0	28	7%
Varianten Allelfrequenz (Median)	0		6%
< 10%	0	65	17%
≥ 10%	0	41	11%
Methylierungs-Modifikatoren (<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i>)	0	70	18%
<i>DNMT3A</i>	0	49	13%
<i>TET2</i>	0	29	8%
Chromatin-Modifikatoren (<i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i>)	0	13	3%
<i>ASXL1</i>	0	10	3%
<i>EZH2</i>	0	3	1%
Spliceosome (<i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i>)	0	14	4%
<i>SF3B1</i>	0	8	2%
<i>SRSF2</i>	0	2	1%
<i>U2AF1</i>	0	2	1%
<i>ZRSR2</i>	0	2	1%
DNA Reparatur Gene (<i>TP53</i> , <i>PPM1D</i>)	0	11	3%
<i>TP53</i>	0	7	2%
<i>PPM1D</i>	0	4	1%
Andere	0	15	4%

3.2 Klinische Charakteristika und epigenetische Altersbeschleunigung

Das mittlere DNAm *age* unserer Kohorte betrug 76,2 Jahre (Standardabweichung $\pm 9,7$ Jahre, Spannweite 50 bis 122 Jahre) und die mittlere Altersbeschleunigung (Englisch: *age acceleration* (AA)) betrug $0 \pm 8,4$ Jahre. Die mittlere absolute Abweichung lag bei 6,3 Jahren und die mediane absolute Abweichung ergab 5,4 Jahre. Männliche Teilnehmer zeigten gegenüber weiblichen Teilnehmerinnen eine signifikante positive Altersbeschleunigung (AA: 1,0 vs. -1,2 Jahre, $P = 0,006$). Weitere Unterschiede in der Altersbeschleunigung zeigten sich für chronische Niereninsuffizienz mit Notwendigkeit einer Hämodialyse (AA: 3,5 vs. -0,9 Jahre, $P < 0,001$) und Hyperurikämie (AA: 3,9 vs. -0,4 Jahre, $P = 0,001$). Die Verteilung der AA ist für ausgewählte Merkmale in Abbildung 3 dargestellt.

Die Berechnung der intrinsischen epigenetischen Altersbeschleunigung war für 297 (= 78%) Teilnehmer*innen möglich, da hier die Blutbilder bekannt waren. Die mittlere IEAA betrug $0 \pm 8,0$ Jahre. Entsprechend der Ergebnisse für die AA zeigten sich für die IEAA ebenfalls signifikante Unterschiede für das Geschlecht (IEAA: 1,2 vs -1,8 Jahre, $P = ,001$), für chronische Niereninsuffizienz mit Notwendigkeit einer Hämodialyse (IEAA: 2,76 vs. -0,50 Jahre, $P = 0,018$) und Hyperurikämie (3,42 vs. -0,47 Jahre, $P < 0,001$). Ein Überblick über die gesamte Verteilung von AA und IEAA für klinische und demographische Charakteristika der Kohorte sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

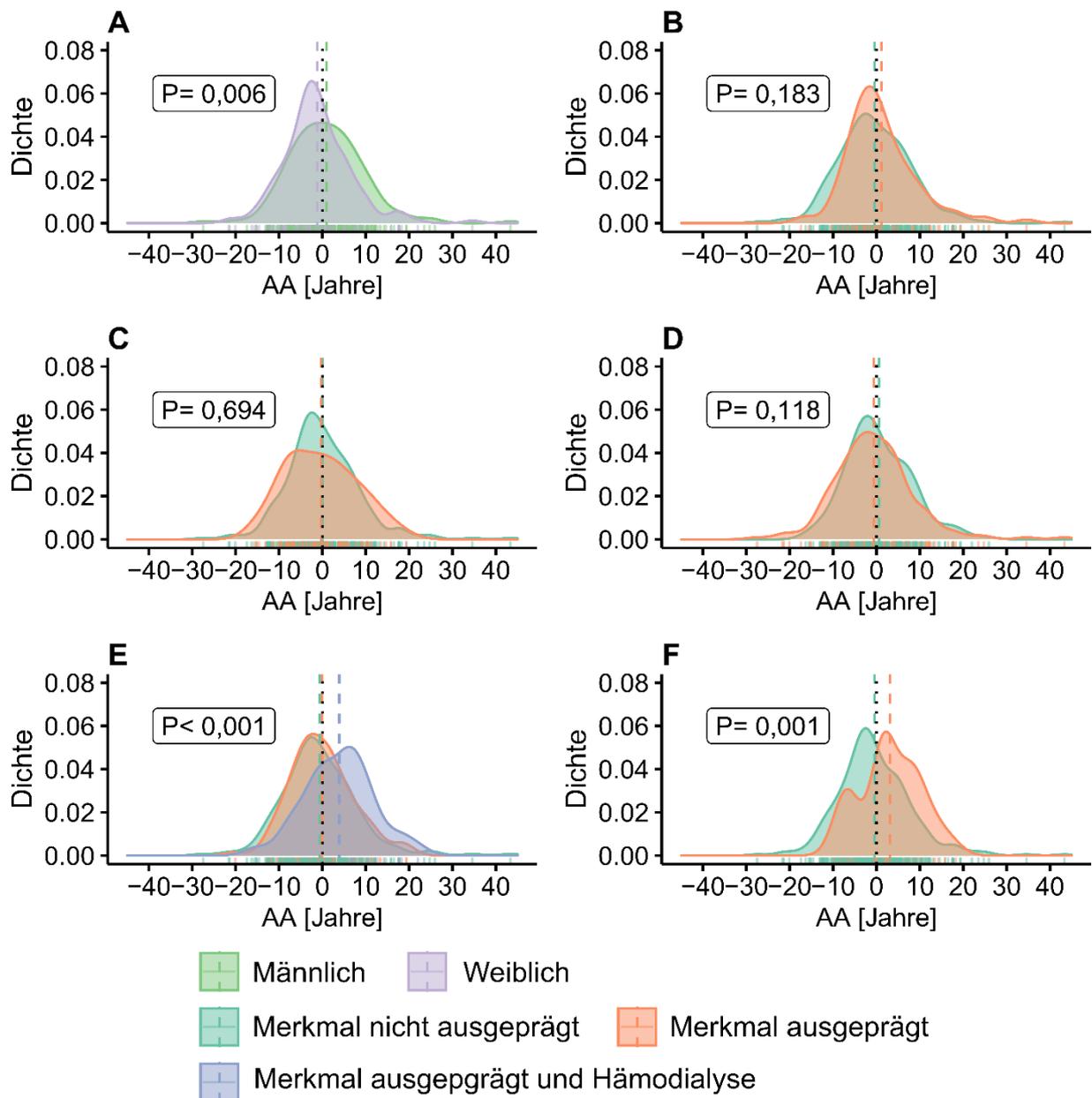


Abbildung 3: Dichtediagramme zur Verteilung von epigenetischer Altersbeschleunigung in ausgewählten demographischen und klinischen Charakteristika. Gestrichelte Linien zeigen Mittelwerte. P-Werte wurden durch Mann-Whitney-Tests ermittelt. **A** Geschlecht **B** CHIP **C** Maligner Tumor **D** Koronare Herzkrankheit **E** Niereninsuffizienz **F** Hyperurikämie.

Tabelle 3: Epigenetische Altersbeschleunigung unter Berücksichtigung von demographischen und klinischen Daten. Vergleich zwischen der Altersbeschleunigung (AA und IEAA) anhand von Risikofaktoren und Komorbiditäten in unserer Kohorte. P-Werte wurden durch Mann-Whitney-Tests ermittelt.

	Variable	Mittlere AA [Jahre]	p-value	Mittlere IEAA [Jahre]	p-value
Geschlecht	Weiblich	-1,19	0,006	-1,75	0,001
	Männlich	0,98		1,22	
Maligner Tumor	Ja	-0,31	0,694	-0,47	0,577
	Nein	0,07		0,13	
CHIP	Ja	1,12	0,183	0,44	0,513
	Nein	-0,43		-0,17	
Koronare Herzkrankheit	Ja	-0,61	0,118	-0,42	0,229
	Nein	0,57		0,46	
Herzinsuffizienz	Ja	0,12	0,842	0,26	0,822
	Nein	-0,08		-0,15	
Herzrhythmusstörung (inklusive Vorhofflimmern)	Ja	0,05	0,645	0,54	0,470
	Nein	-0,05		-0,55	
Peripher arterielle Verschlusskrankheit	Ja	0,11	0,778	0,01	0,924
	Nein	-0,03		0,02	
Arterieller Hypertonus	Ja	0,01	0,621	0,02	0,983
	Nein	-0,07		0,05	
Typ 2 Diabetes mellitus	Ja	0,22	0,833	0,43	0,941
	Nein	-0,10		-0,17	
Dyslipidämie	Ja	-0,02	0,850	-0,00	0,724
	Nein	0,01		0,05	
Adipositas (BMI ≥ 30)	Ja	-0,26	0,979	0,54	0,460
	Nein	0,08		-0,15	
Hyperurikämie	Ja	3,09	0,001	3,42	0,001
	Nein	-0,42		-0,47	
Niereninsuffizienz (ohne Hämodialyse)	Ja	-0,06	0,400	0,21	0,564
	Nein	-0,64		-0,50	
Niereninsuffizient mit Hämodialyse	Ja	3,90	< 0,001	2,76	0,018
	Nein	-0,64		-0,50	
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	Ja	-0,72	0,473	0,06	0,703
	Nein	0,11		0,01	

3.3 Individuelle Mutationen, funktionelle Gruppen und epigenetische Altersbeschleunigung

Auf unsere gesamte Kohorte bezogen war das alleinige Vorhandensein von CHIP nicht mit einer Altersbeschleunigung verbunden (AA 1,1 vs. -0,4 Jahre, $P=0,183$ und IEAA = 0,4 vs. -0,2 Jahre, $P=0,513$). In Hinblick auf einzelne Mutationen wurden Mutationen mit einer Häufigkeit von ≥ 8 Fällen auf die epigenetische Altersbeschleunigung der Teilnehmer*innen hin untersucht und mit CHIP negativen Teilnehmer*innen verglichen. Unterschiede und P-Werte wurden jeweils im Vergleich zu Teilnehmer*innen ohne CHIP in Mann-Whitney-Tests ermittelt. Teilnehmer*innen mit *DNMT3A*-Mutationen zeigten dabei eine mittlere AA von 0,5 Jahren ($P=0,657$), mit *TET2*-Mutationen eine AA von 0,3 Jahren ($P=0,578$), mit *ASXL1*-Mutationen eine AA von 3,8 Jahren ($P=0,134$) und mit *SF3B1*-Mutationen eine AA von 5,4 Jahren ($P=0,283$). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die IEAA mit -0,4 Jahren ($P=0,962$) für *DNMT3A*-Mutationen, 0,1 Jahre ($P=0,603$) für *TET2*-Mutationen und 1,7 Jahre ($P=0,569$) für *ASXL1*-Mutationen (siehe Abbildung 4). Signifikante Änderungen in der epigenetischen Altersbeschleunigung konnten somit für einzelne Gene nicht festgestellt werden (Abbildung 4).

Als nächstes wurde die Altersbeschleunigung in Bezug auf Mutationen in funktionellen Gengruppen untersucht. *DNMT3A* und *TET2* wurden zu den Methylierungs-Modifikatoren, *ASXL1* und *EZH2* zu den Chromatin-Modifikatoren, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* und *ZRSR2* zu den Spleißosom-assoziierten Genen und *TP53* und *PPM1D* zu den DNA Reparatur Genen gezählt. Alle übrigen Gene wurden als „Andere“ eingeordnet. Keine der genannten Gruppen zeigte eine signifikant veränderte Altersbeschleunigung gegenüber Teilnehmer*innen ohne CHIP. Methylierungs-Modifikatoren zeigten eine mittlere AA von 0,2 Jahren ($P=0,701$) und IEAA von -0,6 Jahren ($P=0,946$), Chromatin-Modifikatoren eine AA von 3,2 Jahren ($P=0,132$) und IEAA von 1,8 Jahren ($P=0,417$), Spleißosom-assoziierte Gene eine AA von 5,3 Jahren ($P=0,105$) und eine IEAA von 4,4 Jahren ($P=0,126$), DNA Reparatur Gene eine AA von 2,5 Jahren ($P=0,456$) und IEAA von 2,3 Jahren ($P=0,395$) und alle übrigen Gene eine AA von -1,3 Jahren ($P=0,836$) und IEAA von -3,5 Jahren ($P=0,194$).

Die generelle Anzahl der Mutationen zeigte verglichen mit der CHIP negativen Gruppe ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Altersbeschleunigung in unserer Kohorte. Teilnehmer*innen mit zwei oder mehr CHIP-Mutationen hatten eine mittlere AA von 2,1 Jahren ($P=0,247$) und eine mittlere IEAA von 1,1 Jahren ($P=0,261$) (Abbildung 4).

Von insgesamt 102 Einzelnukleotid-Polymorphismen in unserer Kohorte waren 70% Transitionen (Purinbase zu Purinbase oder Pyrimidinbase zu Pyrimidinbase). Am häufigsten war hierbei eine Transition von Cytosin zu Thymin (n= 45), eine Veränderung, die selbst als Alterungssignatur beschrieben ist.⁶⁵ Für diese Teilnehmer*innen zeigte sich verglichen mit Teilnehmer*innen ohne CHIP-Cytosin/Thymin-Transition ein deutlicher Trend zu beschleunigter, epigenetischer Alterung (AA: 1,8 vs. -0,4 Jahre, P= 0,063 und IEAA: 1,6 vs. -0,2 P= 0,079).

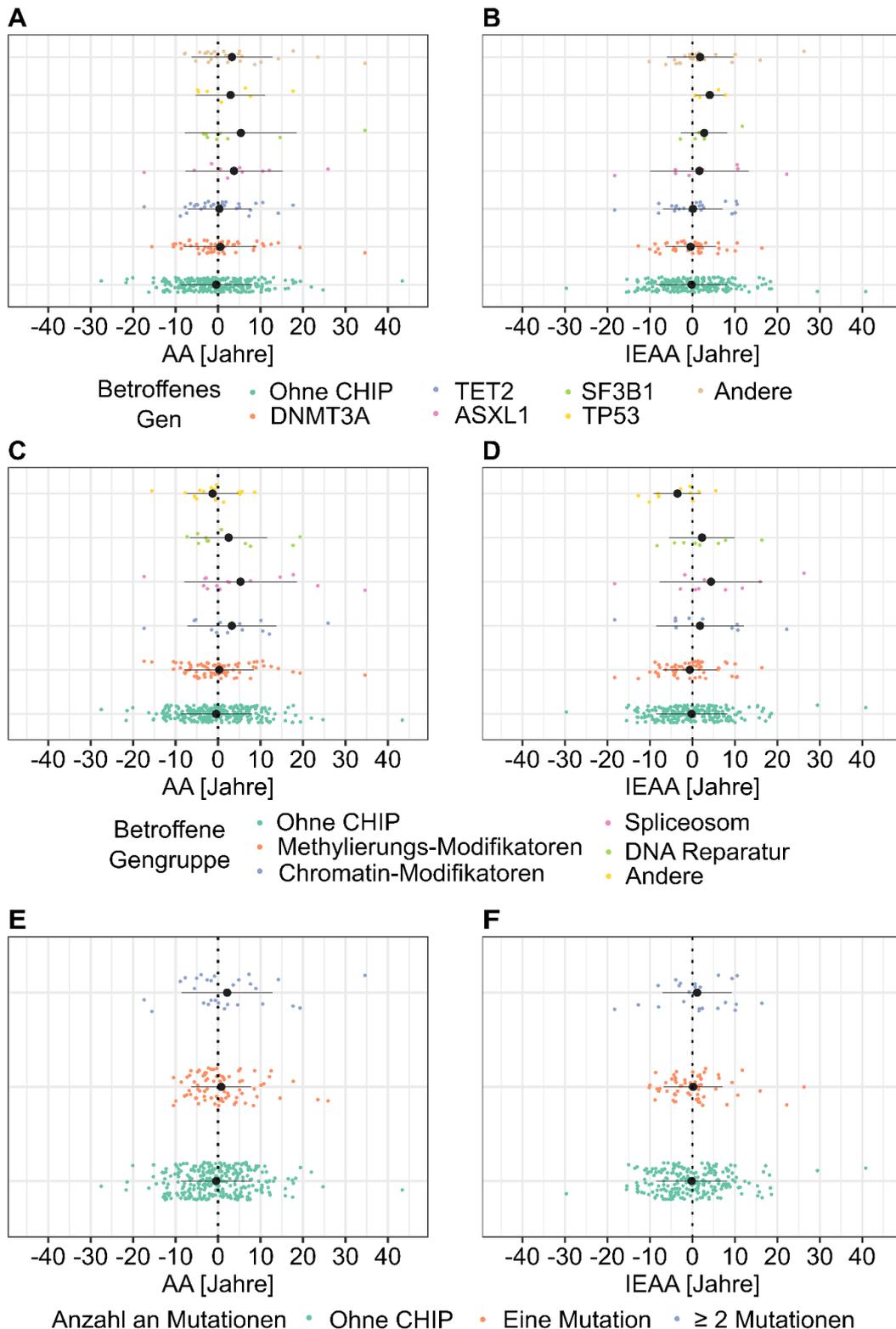


Abbildung 4: CHIP-Mutationen und epigenetische Altersbeschleunigung. A, C und E modifiziert aus Feldkamp *et al.*¹ **A und B** Streudiagramm von AA (**A**) und IEAA (**B**) für CHIP-Mutationen nach betroffenen Genen. **C und D** Streudiagramm von AA (**C**) und IEAA (**D**) für CHIP-Mutationen nach funktionellen Gengruppen. **E und F** Streudiagramm von AA (**E**) und IEAA (**F**) nach Anzahl von CHIP-Mutationen. Mittelwert und Standardabweichung sind für alle Diagramme in Schwarz dargestellt.

3.4 CHIP Klongröße und epigenetische Altersbeschleunigung

Um den Einfluss der Größe eines jeweiligen CHIP-Klons auf die Altersbeschleunigung zu ermitteln, wurden Patienten zunächst anhand der VAF eingeteilt. CHIP positive Teilnehmer*innen wurde bei einer VAF < 10% zur Gruppe mit kleinen Klonen und bei einer VAF von $\geq 10\%$ zur Gruppe mit größeren Klonen gezählt. Von 106 (= 28%) Teilnehmer*innen mit positivem CHIP-Status fielen 65 (= 17%) in die Gruppe der kleinen Klone und 41 in die Gruppe der größeren Klone (= 11%).

Die mittlere AA und IEAA für CHIP-negative Teilnehmer*innen betrug -0,4 und -0,2 Jahre, für kleinere Klone -0,8 und -1,6 Jahre und für größere Klone 4,1 und 3,8 Jahre. In einer Varianzanalyse (ANOVA) konnten signifikante Unterschiede in der AA ($P= 0,023$) und auch in der IEAA ($P= 0,008$) zwischen den VAF-Stufen und Teilnehmer*innen ohne CHIP festgestellt werden. In einer anschließenden Kontrastanalyse zeigten sich eine nicht signifikante Differenz in der AA von CHIP-negativen Teilnehmer*innen und CHIP-positiven Teilnehmer*innen mit einer VAF < 10% von -0,3 Jahren ($P= 0,718$) und eine Differenz in der IEAA von -1,5 Jahren ($P= 0,104$). Für den Kontrast von CHIP-negativen Teilnehmer*innen gegenüber CHIP-positiven Teilnehmer*innen mit größeren CHIP-Klonen (VAF $\geq 10\%$) zeigte sich eine signifikante höhere AA ($P= 0,010$) und IEAA ($P= 0,024$) für Individuen mit größeren Klonen. Die Differenzen zwischen Individuen ohne CHIP-Mutation und Individuen mit großem CHIP-Klon beliefen sich für die AA auf 4,5 Jahre und für die IEAA auf 4,0 Jahre. In einem nächsten Schritt versuchten wir zu ermitteln bis zu welcher Klongröße AA und IEAA gleichermaßen signifikant gegenüber CHIP negativen Teilnehmer*innen erhöht sind. Die niedrigste VAF, für die sich mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Mann-Whitney-Test eine signifikante höhere AA und IEAA zeigte, war $\geq 5\%$ (Kruskal-Wallis-Test: AA $P= 0,008$ und IEAA $P= 0,016$; Mann-Whitney-Test: AA $P= 0,008$ und IEAA $P= 0,044$) (Abbildung 6).

Um die hier beschriebene Assoziation zwischen epigenetischer Altersbeschleunigung und CHIP-Klongröße weiter zu quantifizieren, wurden diese zwei Parameter auf ihre Korrelation hin untersucht. Die Spearman's Korrelationen von jeweils AA beziehungsweise IEAA und CHIP VAF ergaben eine signifikante, positive Abhängigkeit (AA: $R_s= 0,329$, $P< 0,001$, IEAA: $R_s= 0,420$, $P< 0,001$). Diese Korrelation blieb auch nach einer Korrektur für das Geschlecht und das chronologische Alter der Patienten erhalten (AA: $R_s= 0,324$, $P< 0,001$, IEAA: $R_s= 0,411$, $P< 0,001$) (Abbildung 6).

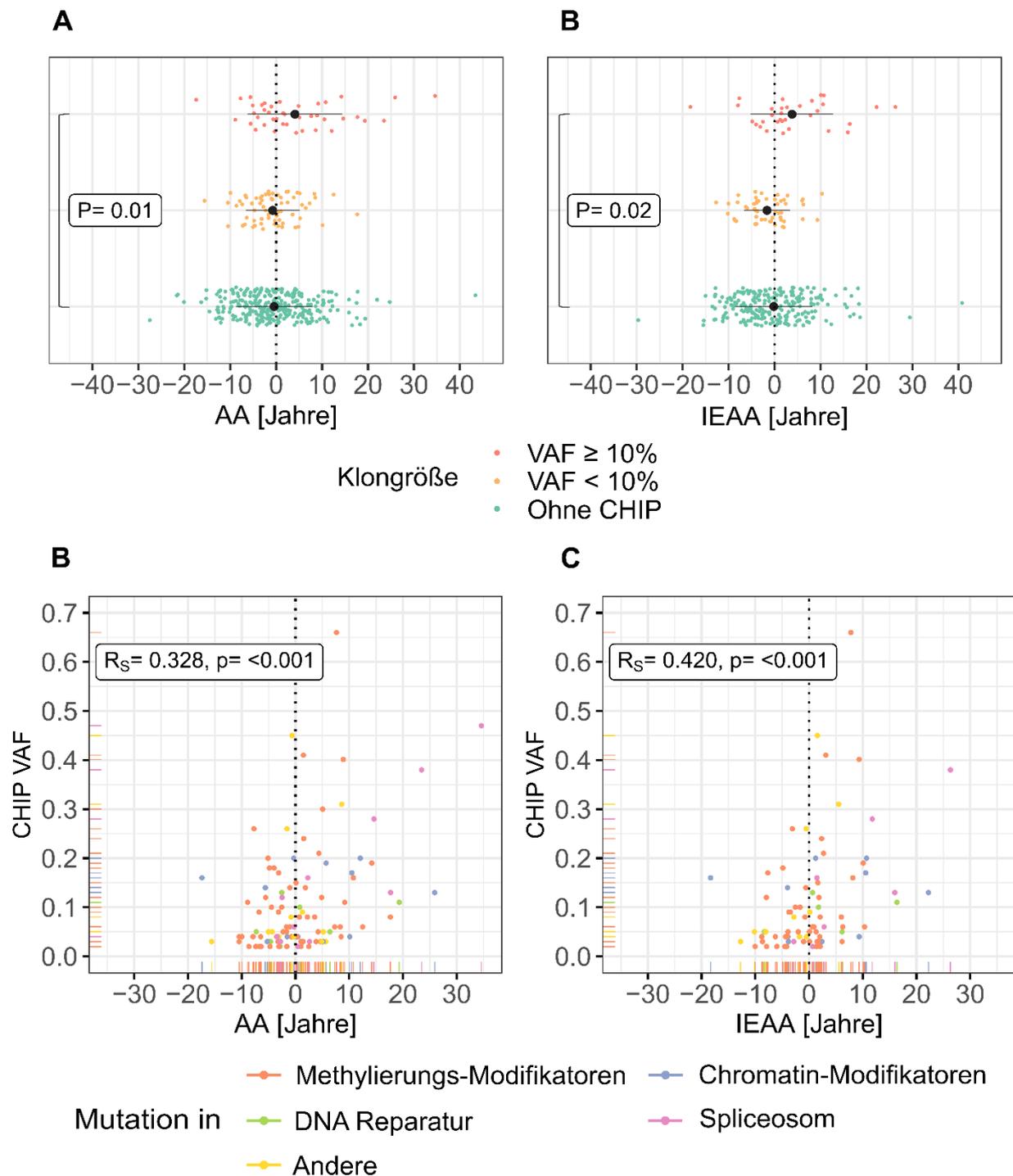


Abbildung 5: CHIP-Klonggröße und epigenetische Altersbeschleunigung. Modifiziert aus Feldkamp *et al.*¹ **A und B** Streudiagramme von Age Acceleration (AA) und Intrinsic Epigenetic Age Acceleration (IEAA) für Untergruppen der CHIP-Klonggröße gemessen in der varianten Allelfrequenz (VAF) mit Ergebnis der zugehörigen Varianzanalyse (ANOVA) Mittelwert und Standardabweichung sind in Schwarz angegeben. **B und C** Streudiagramm von AA und IEAA gegen VAF mit Ergebnissen der zugehörigen Spearman's Korrelationen. In allen Fällen mit mehreren Mutationen wurde die größte VAF gewählt.

4 Diskussion

Durch die hohe Prävalenz von CHIP in der älteren Bevölkerung ist der Zusammenhang von CHIP und biologischer Alterung von großem klinischen Interesse. Es existieren verschiedene Ansätze wie beispielsweise die Messung der Leukozyten-Telomerlänge (LTL) zur Bemessung des biologischen Alters einer Person.⁶⁶ Allerdings kamen bisherige Studien zur Verbindung von CHIP und LTL nicht zu eindeutigen Ergebnissen.^{59, 67} Mit der Etablierung von epigenetischen Uhren steht nun eine relativ neue, robuste Möglichkeit zur Messung des biologischen Alters zur Verfügung. Mit dieser Arbeit versuchen wir die Erkenntnisse zur Verbindung von epigenetischer Alterung und CHIP zu erweitern.

Das wahrscheinlich wichtigste Ergebnis innerhalb dieser Studie ist die positive Korrelation von CHIP-Klongröße – gemessen in der VAF – und der epigenetischen Altersbeschleunigung (7-CpG-clock; AA und IEAA). In der von uns verwendeten Methode zeigte sich eine signifikante epigenetische Altersbeschleunigung ab einer VAF von $\geq 5\%$, während bei kleineren Klonen kein signifikanter Effekt auf die epigenetische Alterung verzeichnet werden konnte.

4.1 Vergleich der Studie mit vorbestehenden Publikationen

Zwei weitere Studien konnten einen signifikanten Anstieg der epigenetischen Altersbeschleunigung in Individuen mit bekannter klonaler Hämatopoese darstellen. Robertson *et al.* konnten eine generelle epigenetische Altersbeschleunigung für 73 Individuen mit CHIP in Horvath's *clock*, IEAA, *Extrinsic Epigenetic Age Acceleration* (EEAA), GrimAge, PhenoAge und ZhangAge, jeweils zeigen, wobei der Effekt teilweise abhängig von der Alterskohorte war.⁵⁸ Nachun *et al.* konnten eine generelle epigenetische Altersbeschleunigung für 319 Individuen mit CHIP in Horvath's *clock*, IEAA, Hannum's *clock*, EEAA, PhenoAge, SkinBloodClock und GrimAge feststellen.⁵⁹

Ein wesentlicher Unterschied in beiden Veröffentlichungen zu dieser Arbeit ist der „*whole genome sequencing*“-Ansatz (entspricht der Sequenzierung des kompletten Genoms) zur Bestimmung von CHIP-Mutationen. Für die Bewertung dieser Daten ist in diesem Fall von besonderer Bedeutung, dass „*whole genome sequencing*“-Daten im Vergleich zu dem in unserer Studie verfügbaren „*targeted sequencing*“-Daten (Arends *et al.*, x2400 reads), eine relativ niedrige Erfassungstiefe oder „*coverage*“ aufweisen (Robertson *et al.*

x34 reads, Nachun *et al.* x40 reads), was zu einer eingeschränkten Erfassung von kleineren CHIP-Klonen führt.^{49, 58, 59, 68} Eine durch die Methode bedingte falsch niedrige Angabe der CHIP-Prävalenz aufgrund der Nicht-Erfassung kleinerer Klone ist für beide Studien aufgrund einer insgesamt niedrigen CHIP-Prävalenz von 6% wahrscheinlich (*reviewed* durch Jaiswal und Ebert).⁶⁹ Die von Robertson *et al.* analysierten Kohorten waren im Mittel 70, 79 und 87 Jahre alt, was eine deutlich höhere CHIP-Prävalenz erwarten ließe.^{44, 45, 70} In die Arbeit von Nachun *et al.* wurden zudem keine Klone mit einer VAF < 6% erkannt, was nicht der zu erwartenden rechtsschiefen Verteilung der Klonegröße von CHIP Fällen entspricht.^{45, 70} So entspricht zum Vergleich der Anteil von CHIP-VAFs zwischen 2 und 6% in unserer Arbeit mit 65 Teilnehmer*innen einem Anteil von 54% aller CHIP-Fälle. Unsere Daten lassen deshalb umfassendere Rückschlüsse auf den Einfluss von CHIP und CHIP-Klonegröße auf die epigenetische Alterung auch mit Hinblick auf kleinere CHIP-Klone zu.

4.2 Einfluss der Klonegröße auf mit klonaler Hämatopoese assoziierte Krankheitsbilder

Die positive Assoziation zwischen epigenetischer Altersbeschleunigung und CHIP-Klonegröße fügt sich gut in mehrere Studien ein, die ein vermehrtes Auftreten gesundheitlicher Probleme und Ereignisse bei CHIP positiven Individuen mit größeren Klonen dokumentieren. So zeigten Abelson *et al.* und Desai *et al.*, dass Individuen mit größeren CHIP-Klonen häufiger im Verlauf eine akute myeloische Leukämie (AML) entwickeln. Durch Abelson *et al.* wurde eine mittlere VAF von 9,8% in der pre-AML-Kohorte gegenüber einer mittleren VAF von 2,9% in der Kontroll-Kohorte beobachtet. Für Desai *et al.* erwies sich ein VAF-Schwellenwert von $\geq 10\%$ als zusätzlicher Risikofaktor für die Studienteilnehmer im Verlauf eine AML zu entwickeln.^{71, 72} Ebenso zeigten Jaiswal *et al.* in Individuen mit einer CHIP-Klonegröße von $\geq 10\%$ ein signifikant erhöhtes Risiko für koronare Atherosklerose und eine erhöhte Inzidenz für koronare Herzkrankheit gegenüber Individuen mit kleineren CHIP-Klonen.^{45, 46} Saiki *et al.* konnten darüberhinausgehend eine signifikant erhöhte kardiovaskuläre und generelle Mortalität für CHIP-Klone ab einer VAF $\geq 5\%$ darstellen.⁷³ Letztlich sollte auch darauf hingewiesen werden, dass mit steigender Sequenziertiefe CHIP-Mutationen in 95% der Untersuchten mit größtenteils sehr kleinen Klonen (mediane VAF: 0,0024) nachgewiesen werden können.⁷⁴ Dies verdeutlicht, dass der Übergang von klinisch inapparenter zu klinisch relevanter klonaler Hämatopoese fließend

ist und eine kritische Bewertung der Klongröße dementsprechend unentbehrlich ist, um mögliche Folgen differenziert zu betrachten.

4.3 Mögliche molekulare Zusammenhänge von klonaler Hämatopoese und epigenetischer Altersbeschleunigung

Der direkte molekulare Zusammenhang zwischen klonaler Hämatopoese und epigenetischer Alterung ist weitgehend unklar. Es existieren mehrere Studien zum Zusammenhang von CHIP und deren chronisch entzündlicher Effekte.^{46, 75-77} Ebenso wurden für mehrere altersassoziierte Erkrankungen eine chronisch entzündliche Komponente beschrieben.^{24-27, 78-82}

Die Auswirkung schwelender Entzündungsreaktionen auf die biologische Alterung sind unter dem Konzept des *InflammAging* zusammengefasst, das eine chronische niedriggradige Entzündung als einen Treiber biologischer Alterung identifiziert. Als mögliche Effektoren werden insbesondere die direkte Schädigung von Geweben durch aktivierte Leukozyten sowie indirekte Effekte durch inflammatorische Zytokine vermutet (*reviewed* von Franceschi und Campisi).⁸³ So konnte beobachtet werden, dass eine verstärkte Ausschüttung inflammatorischer Zytokine (C-Reaktives Protein, Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist, Interleukin-6, Interleukin-18 und löslicher Tumornekrosefaktor-Alpha-1) mit einer erhöhten Mortalität 5 und 10 Jahren nach der Blutentnahme einhergeht. Eine Interleukin-6-Erhöhung zeigte sich als einer der ausgeprägtesten Mortalitätsprädiktoren.⁸⁴

Passend hierzu führen die in CHIP häufigen *TET2*-Mutationen zu einer veränderten Makrophagenfunktion mit einer gesteigerten Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Interleukin-6 und -8) und einer verminderten Phagozytosefunktion, was eine Beschleunigung des Progresses von artherosklerotischen Erkrankungen wie KHK oder zerebrovaskulären Erkrankungen zur Folge hat.^{46, 77} Ebenso zeigen CHIP-Träger mit *DNMT3A*-Mutationen eine Erhöhung von Tumornekrosefaktor- α sowie eine beeinträchtigte Mastzellfunktion. Auffällig ist hierbei, dass der Anstieg proinflammatorischer Zytokine ebenfalls mit der Klongröße korreliert und in Individuen mit einer VAF $\geq 10\%$ ausgeprägter ist.^{46, 75, 76, 85} Ein Zusammenhang zwischen beschleunigter epigenetischer Alterung und proinflammatorischer Zustände in Folge klonaler Hämatopoese erscheint vor diesem Hintergrund plausibel und ist auch für andere Erkrankungen mit einer entzündlichen Komponente mit Verbindungen zu beschleunigter Alterung denkbar. Zu nennen wären beispielsweise *frailty*, Neurodegeneration, Krebserkrankungen oder HIV-Infektionen, für die sowohl eine

chronisch entzündliche Komponente als auch eine Beschleunigung der epigenetischen Alterung bekannt ist.^{24-28, 78-82, 86}

4.4 Die 7-CpG-Uhr

Obwohl die 7-CpG-Uhr bereits erfolgreich angewandt wurde, stellt sich die Frage wie präzise das epigenetische Alter beziehungsweise dessen Beschleunigung in unserer Studie abgebildet wurde.^{16, 87} Die mediane absolute Abweichung erscheint in dieser Studie mit 5,4 Jahren etwas höher als bei den größeren array-basierten Uhren, wie z.B. der Horvath's *clock* mit einer medianen absoluten Abweichung von 3,6 Jahren oder der Skin&Blood *clock* mit einer medianen absoluten Abweichung von 2,9 Jahren.^{12, 15} Die leicht vergrößerte Streuung erklärt sich durch die niedrigere Anzahl an CpGs, die zu Gunsten der praktikableren und kosteneffizienteren Anwendbarkeit in Kauf genommen wird. Im Vergleich mit anderen minimierten epigenetischen Uhren wie der Weidner *clock* (3 CpGs) mit einer mittleren absoluten Abweichung von 4,5 Jahren, der Zbieć-Piekarska *clock* (5 CpGs) mit einer mittleren absoluten Abweichung von 3,9 Jahren, der Dias-Blood *clock* (3 CpGs) mit einer mittleren absoluten Abweichung von 4,8 Jahren oder der ursprünglichen Validierung der Vidal-Bralo *clock* mit einer mittleren absoluten Abweichung von 6,1 Jahren, erscheint die 7-CpG-Uhr in unserer Studie mit einer mittleren absoluten Abweichung von 6,3 Jahren angemessen kompetitiv.^{21, 23, 37, 88} Zusätzlich zu beachten ist an dieser Stelle die höhere Grundmorbidität unserer Kohorte, die zu einer vergrößerten Abweichung des DNAm Age beitragen könnte. Eine leicht erhöhte Varianz im epigenetischen Alter wäre dementsprechend gegenüber den Validierungskohorten, die eher einen Querschnitt durch die Bevölkerung abbilden, zu erwarten. Die genannten medianen beziehungsweise mittleren absoluten Abweichungen beziehen sich, soweit sie verfügbar waren auf die Ergebnisse der Validierungskohorten der genannten Uhren. Neben diesem Vergleich auf Ebene der Vorhersagegenauigkeit konnten vorbekannte Assoziation von epigenetischer Alterung zu den genannten Charakteristika bestätigt (Geschlecht, Nierenversagen) und im Fall der klonalen Hämatopoese weiter vertieft werden.

4.5 Limitationen

Die Methylierungs-Modifikatoren *DNMT3A* und *TET2* sind die am häufigsten mutierten Gene in von CHIP betroffenen Individuen.⁴⁴⁻⁴⁷ Da epigenetische Uhren den Methylier-

rungsstatus nutzen, um das epigenetische Alter abzuleiten, könnten Mutationen und somit potenzielle Funktionsänderungen in den (de)-methylierenden Genen das Methylom und entsprechend solche Uhren potenziell verzerren. Nach aktuellem Wissensstand scheint aber keiner der in dieser Studie genutzten CpG-Loci von den in CHIP häufig betroffenen Methylierungs-Modifikatoren *DNMT3A* oder *TET2* modifiziert zu werden.^{89, 90} Ebenso könnten größere CHIP-Klone auf einen gesteigerten Zellzyklus und dadurch auf eine vorzeitige Alterung der zugehörigen HSCs unabhängig von der Alterung des Gesamtorganismus hindeuten. Epigenetische Alterungsprozesse zeigen sich allerdings mindestens teilweise unabhängig von der Anzahl der Zellzyklen, da die Messung des epigenetischen Alters auch in mitotisch wenig aktiven Geweben, wie zum Beispiel neuronalem Gewebe, möglich ist.¹² Zudem zeigen sich Surrogatparameter mitotischer Aktivität wie LTL teilweise unabhängig vom epigenetischen Alter.^{16, 61} Beschleunigte epigenetische Alterungsprozesse in CHIP-Trägern sind demnach kein Korrelat einer verstärkten mitotischen Aktivität in den betroffenen Blutzellen.

Im Gegensatz zu einer Reihe von vorangegangenen Publikationen, zeigte sich in Hinblick auf einige klinische Charakteristika wie KHK, COPD oder Krebs in unserer Kohorte keine epigenetische Altersbeschleunigung.^{25, 27, 91} Diese Auffälligkeit erklärt sich mit der hohen Gesamtmorbidität unserer Kohorte. Alle Patienten waren bei Einschluss stationäre Patienten in einem Universitätsklinikum der Maximalversorgung. Aus dieser Besonderheit ergibt sich eine mangelnde Abgrenzbarkeit der einzelnen Krankheitsentitäten gegenüber einer in nicht-erkrankten Vergleichsgruppe innerhalb der Kohorte, da dadurch immer eine erkrankte Subgruppe einer anderen, anderweitig vorerkrankten Subgruppe gegenübergestellt wird. Die Vergleichbarkeit von CHIP-Trägern gegenüber Individuen ohne CHIP bleibt derweil durch die ähnliche Verteilung von Komorbiditäten in beiden Gruppen sowie durch die beschriebenen statistischen Kontrollmöglichkeiten, erhalten. Zusätzlich sollte beachtet werden, dass verschiedene epigenetische Uhren eine unterschiedliche Sensitivität für bestimmte Erkrankungen beziehungsweise Zustände aufweisen.³⁸ Ungeachtet dieser Überlegungen zeigte sich in Teilnehmer*innen mit Nierenversagen verglichen mit der relativ vorerkrankten Vergleichsgruppe eine vorbeschriebene epigenetische Altersbeschleunigung.⁹² Die weitreichend vorbeschriebene Assoziation zwischen epigenetischer Altersbeschleunigung und dem Geschlecht konnte ebenfalls festgestellt werden.^{38,}

5 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigte sich in unserer Studie zur Verbindung von CHIP und epigenetischer Alterung eine positive Korrelation zwischen CHIP-Klongröße und beschleunigter epigenetischer Alterung in der 7-CpG-Uhr sowie als Schwelle für den Einfluss von CHIP auf positive epigenetische Altersbeschleunigung eine VAF von $\geq 5\%$. Dieses Ergebnis erweitert den bisherigen Kenntnisstand zur Rolle der CHIP-Klongröße und ihre Korrelation mit verschiedenen klinischen Parametern und Zuständen und kann als Grundlage zur Vertiefung unseres Wissens über CHIP und Alterungsprozesse dienen. Zukünftige Studien zu klonaler Hämatopoese sollten CHIP-bezogene Effekte verstärkt in Bezug auf die Klongröße untersuchen beziehungsweise deren Effekte gesondert einbeziehen. Weiterhin zeigt auch diese Studie, dass die 7-CpG-Uhr als praktikable und effiziente Methode betrachtet werden kann, um die epigenetische Altersbeschleunigung eines Individuums zu messen.

6 Literaturverzeichnis

1. Feldkamp JD, Vetter VM, Arends CM, Lang TJL, Bullinger L, Damm F, Demuth I, Frick M. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential-related epigenetic age acceleration correlates with clonal hematopoiesis of indeterminate potential clone size in patients with high morbidity. *Haematologica*. 2022;107(7):1703-1708. DOI:10.3324/haematol.2021.280021.
2. Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell*. 2005;120(4):437-447. DOI:10.1016/j.cell.2005.01.027.
3. Franceschi C, Garagnani P, Morsiani C, Conte M, Santoro A, Grignolio A, Monti D, Capri M, Salvioli S. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5(61). DOI:10.3389/fmed.2018.00061.
4. Baker GT, 3rd, Sprott RL. Biomarkers of aging. *Exp Gerontol*. 1988;23(4-5):223-239. DOI:10.1016/0531-5565(88)90025-3.
5. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40(5):373-383. DOI:10.1016/0021-9681(87)90171-8.
6. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-1217. DOI:10.1016/j.cell.2013.05.039.
7. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-257. DOI:10.1016/s0092-8674(00)81656-6.
8. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-935. DOI:10.1126/science.1170116.
9. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Weisenberger DJ, Shen H, Campan M, Noushmehr H, Bell CG, Maxwell AP, Savage DA, Mueller-Holzner E, Marth C, Kocjan G, Gayther SA, Jones A, Beck S, Wagner W, Laird PW, Jacobs IJ, Widschwendter M. Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res*. 2010;20(4):440-446. DOI:10.1101/gr.103606.109.
10. Bell JT, Tsai PC, Yang TP, Pidsley R, Nisbet J, Glass D, Mangino M, Zhai G, Zhang F, Valdes A, Shin SY, Dempster EL, Murray RM, Grundberg E, Hedman AK, Nica A, Small KS, Mu TC, Dermitzakis ET, McCarthy MI, Mill J, Spector TD, Deloukas P. Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genet*. 2012;8(4):e1002629. DOI:10.1371/journal.pgen.1002629.
11. Simpson DJ, Chandra T. Epigenetic age prediction. *Aging Cell*. 2021;20(9):e13452. DOI:10.1111/accel.13452.
12. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14(10):R115. DOI:10.1186/gb-2013-14-10-r115.
13. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell*. 2013;49(2):359-367. DOI:10.1016/j.molcel.2012.10.016.
14. Chen BH, Marioni RE, Colicino E, Peters MJ, Ward-Caviness CK, Tsai PC, Roetker NS, Just AC, Demerath EW, Guan W, Bressler J, Fornage M, Studenski S,

- Vandiver AR, Moore AZ, Tanaka T, Kiel DP, Liang L, Vokonas P, Schwartz J, Lunetta KL, Murabito JM, Bandinelli S, Hernandez DG, Melzer D, Nalls M, Pilling LC, Price TR, Singleton AB, Gieger C, Holle R, Kretschmer A, Kronenberg F, Kunze S, Linseisen J, Meisinger C, Rathmann W, Waldenberger M, Visscher PM, Shah S, Wray NR, McRae AF, Franco OH, Hofman A, Uitterlinden AG, Absher D, Assimes T, Levine ME, Lu AT, Tsao PS, Hou L, Manson JE, Carty CL, LaCroix AZ, Reiner AP, Spector TD, Feinberg AP, Levy D, Baccarelli A, van Meurs J, Bell JT, Peters A, Deary IJ, Pankow JS, Ferrucci L, Horvath S. DNA methylation-based measures of biological age: meta-analysis predicting time to death. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(9):1844-1865. DOI:10.18632/aging.101020.
15. Horvath S, Oshima J, Martin GM, Lu AT, Quach A, Cohen H, Felton S, Matsuyama M, Lowe D, Kabacik S, Wilson JG, Reiner AP, Maierhofer A, Flunkert J, Aviv A, Hou L, Baccarelli AA, Li Y, Stewart JD, Whitsel EA, Ferrucci L, Matsuyama S, Raj K. Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(7):1758-1775. DOI:10.18632/aging.101508.
16. Vetter VM, Meyer A, Karbasiyan M, Steinhagen-Thiessen E, Hopfenmuller W, Demuth I. 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*. 2019;74(1):27-32. DOI:10.1093/gerona/gly184.
17. Lu AT, Quach A, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Raj K, Hou L, Baccarelli AA, Li Y, Stewart JD, Whitsel EA, Assimes TL, Ferrucci L, Horvath S. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(2):303-327. DOI:10.18632/aging.101684.
18. Belsky DW, Caspi A, Arseneault L, Baccarelli A, Corcoran DL, Gao X, Hannon E, Harrington HL, Rasmussen LJ, Houts R, Huffman K, Kraus WE, Kwon D, Mill J, Pieper CF, Prinz JA, Poulton R, Schwartz J, Sugden K, Vokonas P, Williams BS, Moffitt TE. Quantification of the pace of biological aging in humans through a blood test, the DunedinPoAm DNA methylation algorithm. *Elife*. 2020;9(DOI:10.7554/eLife.54870).
19. Zhang Q, Vallerga CL, Walker RM, Lin T, Henders AK, Montgomery GW, He J, Fan D, Fowdar J, Kennedy M, Pitcher T, Pearson J, Halliday G, Kwok JB, Hickie I, Lewis S, Anderson T, Silburn PA, Mellick GD, Harris SE, Redmond P, Murray AD, Porteous DJ, Haley CS, Evans KL, McIntosh AM, Yang J, Gratten J, Marioni RE, Wray NR, Deary IJ, McRae AF, Visscher PM. Improved precision of epigenetic clock estimates across tissues and its implication for biological ageing. *Genome Med*. 2019;11(1):54. DOI:10.1186/s13073-019-0667-1.
20. Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Gori D, Giuliani C, Mari D, Di Blasio AM, Gentilini D, Vitale G, Collino S, Rezzi S, Castellani G, Capri M, Salvioli S, Franceschi C. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell*. 2012;11(6):1132-1134. DOI:10.1111/accel.12005.
21. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jockel KH, Erbel R, Muhleisen TW, Zenke M, Brummendorf TH, Wagner W. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol*. 2014;15(2):R24. DOI:10.1186/gb-2014-15-2-r24.
22. Kuzub N, Smialkovska V, Momot V, Moseiko V, Lushchak O, Koliada A. Evaluation of Epigenetic Age Based on DNA Methylation Analysis of Several CpG Sites in Ukrainian Population. *Front Genet*. 2021;12(772298). DOI:10.3389/fgene.2021.772298.
23. Vidal-Bralo L, Lopez-Golan Y, Gonzalez A. Simplified Assay for Epigenetic Age Estimation in Whole Blood of Adults. *Front Genet*. 2016;7(126). DOI:10.3389/fgene.2016.00126.

24. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Ritchie SJ, Muniz-Terrera G, Harris SE, Gibson J, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Taylor A, Murphy L, Starr JM, Horvath S, Visscher PM, Wray NR, Deary IJ. The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *Int J Epidemiol.* 2015;44(4):1388-1396. DOI:10.1093/ije/dyu277.
25. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, Hou L, Baccarelli AA, Stewart JD, Li Y, Whitsel EA, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Lohman K, Liu Y, Ferrucci L, Horvath S. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY).* 2018;10(4):573-591. DOI:10.18632/aging.101414.
26. Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning. *Aging (Albany NY).* 2015;7(12):1198-1211. DOI:10.18632/aging.100864.
27. Dugue PA, Bassett JK, Joo JE, Jung CH, Ming Wong E, Moreno-Betancur M, Schmidt D, Makalic E, Li S, Severi G, Hodge AM, Buchanan DD, English DR, Hopper JL, Southey MC, Giles GG, Milne RL. DNA methylation-based biological aging and cancer risk and survival: Pooled analysis of seven prospective studies. *Int J Cancer.* 2018;142(8):1611-1619. DOI:10.1002/ijc.31189.
28. Horvath S, Levine AJ. HIV-1 Infection Accelerates Age According to the Epigenetic Clock. *J Infect Dis.* 2015;212(10):1563-1573. DOI:10.1093/infdis/jiv277.
29. Horvath S, Stein DJ, Phillips N, Heany SJ, Kobor MS, Lin DTS, Myer L, Zar HJ, Levine AJ, Hoare J. Perinatally acquired HIV infection accelerates epigenetic aging in South African adolescents. *AIDS.* 2018;32(11):1465-1474. DOI:10.1097/QAD.0000000000001854.
30. Breitling LP, Saum KU, Perna L, Schottker B, Holleczeck B, Brenner H. Frailty is associated with the epigenetic clock but not with telomere length in a German cohort. *Clin Epigenetics.* 2016;8(21). DOI:10.1186/s13148-016-0186-5.
31. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, Gibson J, Henders AK, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Murphy L, Martin NG, Montgomery GW, Feinberg AP, Fallin MD, Multhaup ML, Jaffe AE, Joehanes R, Schwartz J, Just AC, Lunetta KL, Murabito JM, Starr JM, Horvath S, Baccarelli AA, Levy D, Visscher PM, Wray NR, Deary IJ. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol.* 2015;16(25). DOI:10.1186/s13059-015-0584-6.
32. Christiansen L, Lenart A, Tan Q, Vaupel JW, Aviv A, McGue M, Christensen K. DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study. *Aging Cell.* 2016;15(1):149-154. DOI:10.1111/acer.12421.
33. Horvath S, Pirazzini C, Bacalini MG, Gentilini D, Di Blasio AM, Delledonne M, Mari D, Arosio B, Monti D, Passarino G, De Rango F, D'Aquila P, Giuliani C, Marasco E, Collino S, Descombes P, Garagnani P, Franceschi C. Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany NY).* 2015;7(12):1159-1170. DOI:10.18632/aging.100861.
34. Snir S, Farrell C, Pellegrini M. Human epigenetic ageing is logarithmic with time across the entire lifespan. *Epigenetics.* 2019;14(9):912-926. DOI:10.1080/15592294.2019.1623634.
35. Jylhava J, Pedersen NL, Hagg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine.* 2017;21(29-36). DOI:10.1016/j.ebiom.2017.03.046.
36. Eipel M, Mayer F, Arent T, Ferreira MR, Birkhofer C, Gerstenmaier U, Costa IG, Ritz-Timme S, Wagner W. Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures. *Aging (Albany NY).* 2016;8(5):1034-1048. DOI:10.18632/aging.100972.

37. Zbiec-Piekarska R, Spolnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, Makowska Z, Paleczka A, Kucharczyk K, Ploski R, Branicki W. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;17(173-179). DOI:10.1016/j.fsigen.2015.05.001.
38. Crimmins EM, Thyagarajan B, Levine ME, Weir DR, Faul J. Associations of Age, Sex, Race/Ethnicity, and Education With 13 Epigenetic Clocks in a Nationally Representative U.S. Sample: The Health and Retirement Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2021;76(6):1117-1123. DOI:10.1093/gerona/glab016.
39. Vetter VM, Kalies CH, Sommerer Y, Bertram L, Demuth I. Seven-CpG DNA Methylation Age Determined by Single Nucleotide Primer Extension and Illumina's Infinium MethylationEPIC Array Provide Highly Comparable Results. *Front Genet.* 2021;12(759357). DOI:10.3389/fgene.2021.759357.
40. Demuth I, Banszerus V, Drewelies J, Duzel S, Seeland U, Spira D, Tse E, Braun J, Steinhagen-Thiessen E, Bertram L, Thiel A, Lindenberger U, Regitz-Zagrosek V, Gerstorf D, Additional B-ILGi. Cohort profile: follow-up of a Berlin Aging Study II (BASE-II) subsample as part of the GendAge study. *BMJ Open.* 2021;11(6):e045576. DOI:10.1136/bmjopen-2020-045576.
41. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(15):1475-1485. DOI:10.1056/NEJMra0804615.
42. Fey M, Liechti-Gallati S, von Rohr A, Borisch B, Theilkas L, Schneider V, Oestreicher M, Nagel S, Ziemiecki A, Tobler A. Clonality and X-inactivation patterns in hematopoietic cell populations detected by the highly informative M27 beta DNA probe [see comments]. *Blood.* 1994;83(4):931-938. DOI:10.1182/blood.V83.4.931.931.
43. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015;126(1):9-16. DOI:10.1182/blood-2015-03-631747.
44. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landen M, Hoglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Gronberg H, Hultman CM, McCarroll SA. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-2487. DOI:10.1056/NEJMoa1409405.
45. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2488-2498. DOI:10.1056/NEJMoa1408617.
46. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, McConkey M, Gupta N, Gabriel S, Ardissino D, Baber U, Mehran R, Fuster V, Danesh J, Frossard P, Saleheen D, Melander O, Sukhova GK, Neuberg D, Libby P, Kathiresan S, Ebert BL. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(2):111-121. DOI:10.1056/NEJMoa1701719.
47. Buscarlet M, Provost S, Zada YF, Barhdadi A, Bourgoin V, Lepine G, Mollica L, Szuber N, Dube MP, Busque L. DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. *Blood.* 2017;130(6):753-762. DOI:10.1182/blood-2017-04-777029.

48. Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, Frigge ML, Magnusson OT, Jonsdottir I, Thorgeirsson TE, Sigurdsson A, Gudjonsson SA, Gudmundsson J, Jonasson JG, Tryggvadottir L, Jonsson T, Helgason A, Gylfason A, Sulem P, Rafnar T, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson DF, Masson G, Kong A, Stefansson K. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood*. 2017;130(6):742-752. DOI:10.1182/blood-2017-02-769869.
49. Arends CM, Galan-Sousa J, Hoyer K, Chan W, Jager M, Yoshida K, Seemann R, Noerenberg D, Waldhueter N, Fleischer-Notter H, Christen F, Schmitt CA, Dorken B, Pelzer U, Sinn M, Zemojtel T, Ogawa S, Mardian S, Schreiber A, Kunitz A, Kruger U, Bullinger L, Mylonas E, Frick M, Damm F. Hematopoietic lineage distribution and evolutionary dynamics of clonal hematopoiesis. *Leukemia*. 2018;32(9):1908-1919. DOI:10.1038/s41375-018-0047-7.
50. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, Dpersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. 2014;20(12):1472-1478. DOI:10.1038/nm.3733.
51. Arends CM, Weiss M, Christen F, Eulenberg-Gustavus C, Rousselle A, Kettritz R, Eckardt KU, Chan W, Hoyer K, Frick M, Bullinger L, Bieringer M, Schreiber A, Damm F. Clonal hematopoiesis in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Haematologica*. 2020;105(6):e264-e267. DOI:10.3324/haematol.2019.223305.
52. David C, Duployez N, Eloy P, Belhadi D, Chezel J, Le Guern V, Laouenan C, Fenwarth L, Rouzard D, Mathian A, de Almeida Chaves S, Duhaut P, Fain O, Galicier L, Ghillani-Dalbin P, Kahn JE, Morel N, Perard L, Pha M, Sarrot-Reynauld F, Aumaitre O, Chasset F, Limal N, Desmurs-Clavel H, Ackermann F, Amoura Z, Papo T, Preudhomme C, Costedoat-Chalumeau N, Sacre K. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and cardiovascular events in systemic lupus erythematosus (HEMATOPLUS study). *Rheumatology (Oxford)*. 2022;DOI:10.1093/rheumatology/keac108.
53. Dharan NJ, Yeh P, Bloch M, Yeung MM, Baker D, Guinto J, Roth N, Ftouni S, Ognenovska K, Smith D, Hoy JF, Woolley I, Pell C, Templeton DJ, Fraser N, Rose N, Hutchinson J, Petoumenos K, Dawson SJ, Polizzotto MN, Dawson MA, Group AS. HIV is associated with an increased risk of age-related clonal hematopoiesis among older adults. *Nat Med*. 2021;27(6):1006-1011. DOI:10.1038/s41591-021-01357-y.
54. Coombs CC, Zehir A, Devlin SM, Kishtagari A, Syed A, Jonsson P, Hyman DM, Solit DB, Robson ME, Baselga J, Arcila ME, Ladanyi M, Tallman MS, Levine RL, Berger MF. Therapy-Related Clonal Hematopoiesis in Patients with Non-hematologic Cancers Is Common and Associated with Adverse Clinical Outcomes. *Cell Stem Cell*. 2017;21(3):374-382.e374. DOI:10.1016/j.stem.2017.07.010.
55. Miller PG, Qiao D, Rojas-Quintero J, Honigberg MC, Sperling AS, Gibson CJ, Bick AG, Niroula A, McConkey ME, Sandoval B, Miller BC, Shi W, Viswanathan K, Leventhal M, Werner L, Moll M, Cade BE, Barr RG, Correa A, Cupples LA, Gharib SA, Jain D, Gogarten SM, Lange LA, London SJ, Manichaikul A, O'Connor GT, Oelsner EC, Redline S, Rich SS, Rotter JI, Ramachandran V, Yu B, Sholl L, Neuberg D, Jaiswal S, Levy BD, Owen CA, Natarajan P, Silverman EK, van Galen P, Tesfaigzi Y, Cho MH, Ebert BL, Copdgene Study Investigators NHL, Blood Institute Trans-Omics for Precision Medicine C. Association of clonal hematopoiesis with chronic obstructive pulmonary disease. *Blood*. 2022;139(3):357-368. DOI:10.1182/blood.2021013531.
56. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, Ortman CA, Ecke A, Abou-El-Ardat K, Schmid T, Brune B, Wagner S, Serve H, Hoffmann J, Seeger F, Dimmeler S, Zeiher AM,

- Rieger MA. Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol.* 2019;4(1):25-33. DOI:10.1001/jamacardio.2018.3965.
57. Vlasschaert C, McNaughton A, Chong M, Cook E, Hopman W, Kestenbaum B, Robinson-Cohen C, Garland J, Moran S, Pare G, Clase C, Tang M, Levin A, Holden R, Rauh M, Lanktree M. Association of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential with Worse Kidney Function and Anemia in Two Cohorts of Patients with Advanced Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2022;DOI:10.1681/ASN.2021060774.
58. Robertson NA, Hillary RF, McCartney DL, Terradas-Terradas M, Higham J, Sproul D, Deary IJ, Kirschner K, Marioni RE, Chandra T. Age-related clonal haemopoiesis is associated with increased epigenetic age. *Curr Biol.* 2019;29(16):R786-R787. DOI:10.1016/j.cub.2019.07.011.
59. Nachun D, Lu AT, Bick AG, Natarajan P, Weinstock J, Szeto MD, Kathiresan S, Abecasis G, Taylor KD, Guo X, Tracy R, Durda P, Liu Y, Johnson C, Rich SS, Van Den Berg D, Laurie C, Blackwell T, Papanicolaou GJ, Correa A, Raffield LM, Johnson AD, Murabito J, Manson JE, Desai P, Kooperberg C, Assimes TL, Levy D, Rotter JI, Reiner AP, Whitsel EA, Wilson JG, Horvath S, Jaiswal S, Consortium NT-OfPM. Clonal hematopoiesis associated with epigenetic aging and clinical outcomes. *Aging Cell.* 2021;20(6):e13366. DOI:10.1111/accel.13366.
60. Jaiswal S. Clonal hematopoiesis and nonhematologic disorders. *Blood.* 2020;136(14):1606-1614. DOI:10.1182/blood.2019000989.
61. Marioni RE, Harris SE, Shah S, McRae AF, von Zglinicki T, Martin-Ruiz C, Wray NR, Visscher PM, Deary IJ. The epigenetic clock and telomere length are independently associated with chronological age and mortality. *Int J Epidemiol.* 2018;45(2):424-432. DOI:10.1093/ije/dyw041.
62. Quach A, Levine ME, Tanaka T, Lu AT, Chen BH, Ferrucci L, Ritz B, Bandinelli S, Neuhauser ML, Beasley JM, Snetselaar L, Wallace RB, Tsao PS, Absher D, Assimes TL, Stewart JD, Li Y, Hou L, Baccarelli AA, Whitsel EA, Horvath S. Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors. *Aging (Albany NY).* 2017;9(2):419-446. DOI:10.18632/aging.101168.
63. Horvath S, Gurven M, Levine ME, Trumble BC, Kaplan H, Allayee H, Ritz BR, Chen B, Lu AT, Rickabaugh TM, Jamieson BD, Sun D, Li S, Chen W, Quintana-Murci L, Fagny M, Kobor MS, Tsao PS, Reiner AP, Edlefsen KL, Absher D, Assimes TL. An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex, and coronary heart disease. *Genome Biol.* 2016;17(1):171. DOI:10.1186/s13059-016-1030-0.
64. Biosystems A. 3730/3730xl DNA Analyzer Getting Started - <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4478016A.pdf>. 2014 [cited 2022 25.03.2022 - 15:00]; 4359476 Revision E:[Available from:
65. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Borresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjord JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Illicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jager N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, Lopez-Otin C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt AN, Valdes-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Australian Pancreatic Cancer Genome I, Consortium IBC, Consortium IM-S, PedBrain I, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ,

- Stratton MR. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-421. DOI:10.1038/nature12477.
66. Belsky DW, Moffitt TE, Cohen AA, Corcoran DL, Levine ME, Prinz JA, Schaefer J, Sugden K, Williams B, Poulton R, Caspi A. Eleven Telomere, Epigenetic Clock, and Biomarker-Composite Quantifications of Biological Aging: Do They Measure the Same Thing? *Am J Epidemiol*. 2018;187(6):1220-1230. DOI:10.1093/aje/kwx346.
67. Boettcher S, Wilk CM, Singer J, Beier F, Burcklen E, Beisel C, Ventura Ferreira MS, Gourri E, Gassner C, Frey BM, Schanz U, Skoda RC, Ebert BL, Brummendorf TH, Beerenwinkel N, Manz MG. Clonal hematopoiesis in donors and long-term survivors of related allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2020;135(18):1548-1559. DOI:10.1182/blood.2019003079.
68. Bick AG, Weinstock JS, Nandakumar SK, Fulco CP, Bao EL, Zekavat SM, Szeto MD, Liao X, Leventhal MJ, Nasser J, Chang K, Laurie C, Burugula BB, Gibson CJ, Lin AE, Taub MA, Aguet F, Ardlie K, Mitchell BD, Barnes KC, Moscati A, Fornage M, Redline S, Psaty BM, Silverman EK, Weiss ST, Palmer ND, Vasani RS, Burchard EG, Kardia SLR, He J, Kaplan RC, Smith NL, Arnett DK, Schwartz DA, Correa A, de Andrade M, Guo X, Konkle BA, Custer B, Peralta JM, Gui H, Meyers DA, McGarvey ST, Chen IY, Shoemaker MB, Peyser PA, Broome JG, Gogarten SM, Wang FF, Wong Q, Montasser ME, Daya M, Kenny EE, North KE, Launer LJ, Cade BE, Bis JC, Cho MH, Lasky-Su J, Bowden DW, Cupples LA, Mak ACY, Becker LC, Smith JA, Kelly TN, Aslibekyan S, Heckbert SR, Tiwari HK, Yang IV, Heit JA, Lubitz SA, Johnsen JM, Curran JE, Wenzel SE, Weeks DE, Rao DC, Darbar D, Moon JY, Tracy RP, Buth EJ, Rafaels N, Loos RJF, Durda P, Liu Y, Hou L, Lee J, Kachroo P, Freedman BI, Levy D, Bielak LF, Hixson JE, Floyd JS, Whitsel EA, Ellinor PT, Irvin MR, Fingerlin TE, Raffield LM, Armasu SM, Wheeler MM, Sabino EC, Blangero J, Williams LK, Levy BD, Sheu WH, Roden DM, Boerwinkle E, Manson JE, Mathias RA, Desai P, Taylor KD, Johnson AD, Consortium NT-OfPM, Auer PL, Kooperberg C, Laurie CC, Blackwell TW, Smith AV, Zhao H, Lange E, Lange L, Rich SS, Rotter JI, Wilson JG, Scheet P, Kitzman JO, Lander ES, Engreitz JM, Ebert BL, Reiner AP, Jaiswal S, Abecasis G, Sankaran VG, Kathiresan S, Natarajan P. Inherited causes of clonal haematopoiesis in 97,691 whole genomes. *Nature*. 2020;586(7831):763-768. DOI:10.1038/s41586-020-2819-2.
69. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science*. 2019;366(6465):DOI:10.1126/science.aan4673.
70. McKerrell T, Park N, Moreno T, Grove CS, Ponstingl H, Stephens J, Understanding Society Scientific G, Crawley C, Craig J, Scott MA, Hodgkinson C, Baxter J, Rad R, Forsyth DR, Quail MA, Zeggini E, Ouwehand W, Varela I, Vassiliou GS. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep*. 2015;10(8):1239-1245. DOI:10.1016/j.celrep.2015.02.005.
71. Abelson S, Collord G, Ng SWK, Weissbrod O, Mendelson Cohen N, Niemeyer E, Barda N, Zuzarte PC, Heisler L, Sundaravadanam Y, Luben R, Hayat S, Wang TT, Zhao Z, Cirlan I, Pugh TJ, Soave D, Ng K, Latimer C, Hardy C, Raine K, Jones D, Hault D, Britten A, McPherson JD, Johansson M, Mbabaali F, Eagles J, Miller JK, Pasternack D, Timms L, Krzyzanowski P, Awadalla P, Costa R, Segal E, Bratman SV, Beer P, Behjati S, Martincorena I, Wang JCY, Bowles KM, Quiros JR, Karakatsani A, La Vecchia C, Trichopoulou A, Salamanca-Fernandez E, Huerta JM, Barricarte A, Travis RC, Tumino R, Masala G, Boeing H, Panico S, Kaaks R, Kramer A, Sieri S, Riboli E, Vineis P, Foll M, McKay J, Polidoro S, Sala N, Khaw KT, Vermeulen R, Campbell PJ, Papaemmanuil E, Minden MD, Tanay A, Balicer RD, Wareham NJ, Gerstung M, Dick JE, Brennan P, Vassiliou GS, Shlush LI. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature*. 2018;559(7714):400-404. DOI:10.1038/s41586-018-0317-6.

72. Desai P, Mencia-Trinchant N, Savenkov O, Simon MS, Cheang G, Lee S, Samuel M, Ritchie EK, Guzman ML, Ballman KV, Roboz GJ, Hassane DC. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med.* 2018;24(7):1015-1023. DOI:10.1038/s41591-018-0081-z.
73. Saiki R, Momozawa Y, Nannya Y, Nakagawa MM, Ochi Y, Yoshizato T, Terao C, Kuroda Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Imoto S, Matsuda K, Morisaki T, Murakami Y, Kamatani Y, Matsuda S, Kubo M, Miyano S, Makishima H, Ogawa S. Combined landscape of single-nucleotide variants and copy number alterations in clonal hematopoiesis. *Nat Med.* 2021;27(7):1239-1249. DOI:10.1038/s41591-021-01411-9.
74. Young AL, Challen GA, Birmann BM, Druley TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat Commun.* 2016;7(12484). DOI:10.1038/ncomms12484.
75. Cook EK, Izukawa T, Young S, Rosen G, Jamali M, Zhang L, Johnson D, Bain E, Hilland J, Ferrone CK, Buckstein J, Francis J, Momtaz B, McNaughton AJM, Liu X, Snetsinger B, Buckstein R, Rauh MJ. Comorbid and inflammatory characteristics of genetic subtypes of clonal hematopoiesis. *Blood Adv.* 2019;3(16):2482-2486. DOI:10.1182/bloodadvances.2018024729.
76. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, Wu CL, Sano S, Muralidharan S, Rius C, Vuong J, Jacob S, Muralidhar V, Robertson AA, Cooper MA, Andres V, Hirschi KK, Martin KA, Walsh K. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science.* 2017;355(6327):842-847. DOI:10.1126/science.aag1381.
77. Bhattacharya R, Zekavat SM, Haessler J, Fornage M, Raffield L, Uddin MM, Bick AG, Niroula A, Yu B, Gibson C, Griffin G, Morrison AC, Psaty BM, Longstreth WT, Bis JC, Rich SS, Rotter JI, Tracy RP, Correa A, Seshadri S, Johnson A, Collins JM, Hayden KM, Madsen TE, Ballantyne CM, Jaiswal S, Ebert BL, Kooperberg C, Manson JE, Whitsel EA, Program NT-OfPM, Natarajan P, Reiner AP. Clonal Hematopoiesis Is Associated With Higher Risk of Stroke. *Stroke.* 2022;53(3):788-797. DOI:10.1161/STROKEAHA.121.037388.
78. Fabbri E, An Y, Zoli M, Simonsick EM, Guralnik JM, Bandinelli S, Boyd CM, Ferrucci L. Aging and the burden of multimorbidity: associations with inflammatory and anabolic hormonal biomarkers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015;70(1):63-70. DOI:10.1093/gerona/glu127.
79. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(6):358-372. DOI:10.1038/nrn3880.
80. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005;7(3):211-217. DOI:10.1016/j.ccr.2005.02.013.
81. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436-444. DOI:10.1038/nature07205.
82. Nasi M, De Biasi S, Gibellini L, Bianchini E, Pecorini S, Bacca V, Guaraldi G, Mussini C, Pinti M, Cossarizza A. Ageing and inflammation in patients with HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 2017;187(1):44-52. DOI:10.1111/cei.12814.
83. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014;69 Suppl 1(S4-9). DOI:10.1093/gerona/glu057.
84. Varadhan R, Yao W, Matteini A, Beamer BA, Xue QL, Yang H, Manwani B, Reiner A, Jenny N, Parekh N, Fallin MD, Newman A, Bandeen-Roche K, Tracy R, Ferrucci L, Walston J. Simple biologically informed inflammatory index of two serum cytokines

- predicts 10 year all-cause mortality in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69(2):165-173. DOI:10.1093/gerona/glt023.
85. Leoni C, Montagner S, Rinaldi A, Bertoni F, Polletti S, Balestrieri C, Monticelli S. Dnmt3a restrains mast cell inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(8):E1490-E1499. DOI:10.1073/pnas.1616420114.
86. Neuhaus J, Jacobs DR, Jr., Baker JV, Calmy A, Duprez D, La Rosa A, Kuller LH, Pett SL, Ristola M, Ross MJ, Shlipak MG, Tracy R, Neaton JD. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J Infect Dis*. 2010;201(12):1788-1795. DOI:10.1086/652749.
87. Vetter VM, Kalies CH, Sommerer Y, Spira D, Drewelies J, Regitz-Zagrosek V, Bertram L, Gerstorf D, Demuth I. Relationship between five Epigenetic Clocks, Telomere Length and Functional Capacity assessed in Older Adults: Cross-sectional and Longitudinal Analyses. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2022;DOI:10.1093/gerona/glab381.
88. Dias HC, Cordeiro C, Pereira J, Pinto C, Real FC, Cunha E, Manco L. DNA methylation age estimation in blood samples of living and deceased individuals using a multiplex SNaPshot assay. *Forensic Sci Int*. 2020;311(110267). DOI:10.1016/j.forsciint.2020.110267.
89. Qu Y, Lennartsson A, Gaidzik VI, Deneberg S, Karimi M, Bengtzen S, Hoglund M, Bullinger L, Dohner K, Lehmann S. Differential methylation in CN-AML preferentially targets non-CGI regions and is dictated by DNMT3A mutational status and associated with predominant hypomethylation of HOX genes. *Epigenetics*. 2014;9(8):1108-1119. DOI:10.4161/epi.29315.
90. Asmar F, Punj V, Christensen J, Pedersen MT, Pedersen A, Nielsen AB, Hother C, Ralfkiaer U, Brown P, Ralfkiaer E, Helin K, Gronbaek K. Genome-wide profiling identifies a DNA methylation signature that associates with TET2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2013;98(12):1912-1920. DOI:10.3324/haematol.2013.088740.
91. Hillary RF, Stevenson AJ, McCartney DL, Campbell A, Walker RM, Howard DM, Ritchie CW, Horvath S, Hayward C, McIntosh AM, Porteous DJ, Deary IJ, Evans KL, Marioni RE. Epigenetic measures of ageing predict the prevalence and incidence of leading causes of death and disease burden. *Clin Epigenetics*. 2020;12(1):115. DOI:10.1186/s13148-020-00905-6.
92. Yusipov I, Kondakova E, Kalyakulina A, Krivonosov M, Lobanova N, Bacalini MG, Franceschi C, Vedunova M, Ivanchenko M. Accelerated epigenetic aging and inflammatory/immunological profile (ipAGE) in patients with chronic kidney disease. *Geroscience*. 2022;DOI:10.1007/s11357-022-00540-4.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jasper David Feldkamp, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von klonaler Hämatopoese unbekanntem Potentials auf die epigenetische Altersbeschleunigung, *the influence of clonal hematopoiesis of indeterminate potential on epigenetic age acceleration*“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

8 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Herr Jasper David Feldkamp hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: **Feldkamp JD**, Vetter VM, Arends CM, Lang TJL, Bullinger L, Damm F, Demuth I, Frick M. **CHIP-related epigenetic age acceleration correlates with CHIP clone size in patients with high morbidity**. *Haematologica*. 2022

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung der Experimente und Auswertungsschritte sowie Adaptation des Protokolls für die genannte Kohorte in Supervision durch PD Dr. Mareike Frick in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ilja Demuth und Dr. Valentin Vetter.
- Vollständige Durchführung und Auswertung der aufgeführten originalen Experimente.
 - o Einstellung der benötigten DNA-Menge/Qualität, in Teilen erneute Aufreinigung
 - o Bisulfit-Konvertierungen
 - o Multiplex PCR-Amplifikation
 - o *Single Nucleotide Pair Extension* und *Loading* für kapillare Sequenzierung
- Vollständige Aufarbeitung und Auswertung der erhobenen Sequenzierdaten.
- Vollständige statistische Auswertung in IBM SPSS *Statistics* (Version 27) und R (Version 4.1.0).
- Vollständige Erstellung der gezeigten Abbildungen und Tabellen unter Ausnahme von Tabelle S2, die, für diese Arbeit adaptiert, aus Arends CM *et al.* (2018) stammt.
- Ausarbeitung des Haupttexts in Zusammenarbeit mit PD Dr. Mareike Frick.

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

9 Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2021** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"HEMATOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 79 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
1	Lancet Haematology	6,730	30.153	0.02102
2	BLOOD	205,606	25.476	0.19561
3	CIRCULATION RESEARCH	72,814	23.213	0.06601
4	Journal of Hematology & Oncology	15,318	23.168	0.02209
5	JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS	30,498	16.036	0.03997
6	AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY	16,620	13.265	0.02639
7	LEUKEMIA	37,644	12.883	0.05281
8	HAEMATOLOGICA	25,703	11.047	0.03813
9	BLOOD REVIEWS	5,014	10.626	0.00601
10	ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY	41,650	10.514	0.02858
11	THROMBOSIS RESEARCH	17,586	10.407	0.02314
12	Blood Cancer Journal	5,662	9.812	0.01211
13	BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY	32,412	8.615	0.03607
14	Experimental Hematology & Oncology	1,325	8.593	0.00159
15	HemaSphere	1,266	8.300	0.00336
16	Blood Advances	13,522	7.637	0.04837
17	TRANSFUSION MEDICINE REVIEWS	2,011	6.969	0.00235
18	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	24,048	6.960	0.01940
19	THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS	19,483	6.681	0.01818
20	CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY HEMATOLOGY	12,063	6.625	0.01274

10 Druckexemplar der Publikation

Feldkamp JD, Vetter VM, Arends CM, Lang TJL, Bullinger L, Damm F, Demuth I, Frick M. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential-related epigenetic age acceleration correlates with clonal hematopoiesis of indeterminate potential clone size in patients with high morbidity. *Haematologica* 2022;107(7):1703-1708;

<https://doi.org/10.3324/haematol.2021.280021>

11 Lebenslauf

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

12 Komplette Publikationsliste

Feldkamp JD, Vetter VM, Arends CM, Lang TJL, Bullinger L, Damm F, Demuth I, Frick M. **CHIP-related epigenetic age acceleration correlates with CHIP clone size in patients with high morbidity.** *Haematologica*. 2022 Mar 3. doi: 10.3324/haematol.2021.280021. Epub ahead of print. PMID: 35236052.

Ossami Saidy RR, Eurich F, Postel MP, Dobrindt EM, **Feldkamp J**, Schaper SJ, Pratschke J, Globke B, Eurich D. **Clinical and Histological Long-Term Follow-Up of De Novo HBV-Infection after Liver Transplantation.** *Medicina (Kaunas)*. 2021 Jul 28;57(8):767. doi: 10.3390/medicina57080767. PMID: 34440973.

13 Danksagung

Ich möchte mich insbesondere für die fortwährende Förderung durch Mareike Frick für dieses und weitere Projekte bedanken. Ohne Ihre Hilfe wäre dieses Projekt in seinem Ausmaß und Erfolg nicht möglich gewesen. Ebenso gilt mein Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Frick/Damm, die mich während meiner Zeit im Labor stets unterstützt haben.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie und besonders Elisa Schumann bedanken, ohne deren Ermutigung und Hilfe ich diese Arbeit kaum bewältigt hätte.