

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Glanemann

**Genomweite Untersuchung altersassoziierter DNA-
Methylierungsunterschiede zur Identifizierung altersassoziiert
differenziell exprimierter Gene**

Dissertation zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2025

vorgelegt von Laura Kim Feiner
Geb. am 15.06.1993 in Quierschied

Tag der Promotion: 20. August 2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Claudia Rubie

Prof. Dr. rer. nat. Andreas Keller

Meiner Familie in tiefer Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung und Zielsetzung	5
1.1 Einführung	5
1.2 Definition von Seneszenz und Alterung	7
1.3 Alterungstheorien	8
1.3.1 <i>Proximate</i> Theorien	9
1.3.2 <i>Ultimate</i> Theorien	11
1.4 Anti-Aging-Mechanismen / mTOR-Signalweg	13
1.5 Epigenetische Mechanismen	14
1.5.1 RNA-Interferenz.....	15
1.5.2 Histonmodifikation	16
1.5.3 DNA-Methylierung	17
1.6 DNA-Methylierung und Alterung	19
1.7 Nachweis von DNA-Methylierung	20
1.8 <i>Homeobox-Protein A5 (HOXA5), Tumorsuppressor-Protein p53 (TP53) und Phosphatase and Tensin Homolog, deleted on chromosome 10 (PTEN)</i>	22
1.9 <i>Four and a half LIM domains protein 2 (FHL2)</i>	23
1.10 <i>Replication Protein A2 (RPA2)</i>	23
1.11 Ziel der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Kommerzielle Kits	25
2.1.2 ELISA Kits	25
2.1.3 <i>TaqMan® Gene Expression Assays</i>	26
2.1.4 <i>Custom TaqMan® Assays</i>	27

Inhaltsverzeichnis

2.1.5	Primer.....	27
2.1.6	Probenmaterial	28
2.1.7	Antikörper, rekombinante Proteine, Peptide und Zelllysate	29
2.1.8	Reagenzien	30
2.1.9	Selbst hergestellte Puffer und Lösungen	32
2.1.10	Verbrauchsmaterialien.....	34
2.1.11	Geräte und Apparaturen	36
2.1.12	Software, Programme und Datenbanken	37
2.2	Methoden	39
2.2.1	Probandenakquise und Blutentnahme	39
2.2.2	Separation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus Vollblut 39	
2.2.3	Monozytenseparation	39
2.2.4	Durchflusszytometrische Bestimmung der Monozyten.....	41
2.2.5	DNA-Isolation	44
2.2.6	RNA-Isolation	44
2.2.7	Protein-Isolation.....	46
2.2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	47
2.2.9	Gelelektrophorese zur Überprüfung der DNA-Integrität	47
2.2.10	Bisulfit-Konversion.....	48
2.2.11	Illumina <i>MethylationEPIC BeadChip</i> Microarray.....	49
2.2.12	Datensatzanalyse mit <i>RnBeads</i>	51
2.2.13	Validierung mittels <i>Deep Bisulfite Sequencing</i>	53
2.2.14	Umschreibung von RNA in cDNA	55
2.2.15	qRT-PCR zur Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene.....	57
2.2.16	Proteinbestimmung mittels <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i> 59	
2.2.17	Proteinbestimmung mittels Western Blot	62

2.2.18	Statistische Auswertung	64
3	Ergebnisse.....	65
3.1	Genomweite DNA-Methylierungsmuster der Proben.....	65
3.2	DMCG und assoziierte Gene	69
3.3	<i>Deep Bisulfite Sequencing</i> der DMCG	75
3.4	Untersuchung der mRNA-Expression	78
3.5	Untersuchung der Proteinexpression.....	79
3.6	Altersassoziierte Korrelation der <i>HOXA5</i> -Expression mit <i>TP53</i> und <i>PTEN</i> ...	81
4	Diskussion	86
4.1	Einfluss des Monozytengehalts der Proben	86
4.2	Genomweite DNA-Methylierungsmuster der Proben.....	86
4.3	Validierung der DMCG.....	88
4.4	Differentiell methylierte CpG-Stellen und assoziierte Gene.....	89
4.5	Untersuchung der mRNA- und Proteinexpression unter Betrachtung epigenetischer Faktoren.....	90
4.6	Altersassoziierte Korrelation der <i>HOXA5</i> -Expression mit <i>TP53</i> und <i>PTEN</i> ...	94
4.7	Bedeutung der altersassoziierten, reduzierten Genexpression von <i>HOXA5</i> , <i>FHL2</i> und <i>RPA2</i>	96
4.8	Schlussfolgerung und Ausblick	98
5	Verzeichnisse	100
5.1	Abkürzungsverzeichnis.....	100
5.2	Abbildungsverzeichnis	103
5.3	Tabellenverzeichnis	104
5.4	Literaturverzeichnis.....	106
6	Danksagung	122
7	Publikationen	123
7.1	Publikationen aus dieser Dissertation	123
7.2	Weitere Publikationen.....	123

Inhaltsverzeichnis

7.3	Kongressbeiträge	123
8	Lebenslauf	127
	Anhang	129

Zusammenfassung

Genomweite Untersuchung altersassoziierter DNA-Methylierungsunterschiede zur Identifizierung altersassoziiert differenziell exprimierter Gene

Der Alterungsprozess ist bei Wirbeltieren ein komplexer, physiologischer Prozess, der mit einem allgemein erhöhten Krankheitsrisiko, sowie einer erhöhten Anfälligkeit für altersbedingte Erkrankungen einhergeht. Der Prozess des Alterns wurde außerdem mit Veränderungen der DNA-Methylierung in Verbindung gebracht, welche wiederum die Genexpression beeinflussen. Mit steigendem Alter kommt es dabei zu einer Verringerung der genomweiten DNA-Methylierung, während es in spezifischen regulatorischen Regionen zu einer Hypermethylierung kommt. Bislang ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, welche spezifischen Gene durch altersabhängige Veränderungen der DNA-Methylierung betroffen sind und welche Konsequenz dies für die Genexpression hat. In der hier vorliegenden Arbeit sollten deshalb altersabhängige Veränderungen in der DNA-Methylierung untersucht werden, um Gene mit signifikanten altersabhängigen Methylierungsunterschieden zu identifizieren und ihr Expressionsprofil zu untersuchen. Mit Hilfe des *Infinium[®] MethylationEPIC BeadChip* Arrays von Illumina wurde eine genomweite Methylierungsanalyse durchgeführt, die zu dem Ergebnis kam, dass die Mehrzahl der 853.307 untersuchten CpG-Dinukleotide im Alter hypermethyliert ist. Dies ist vorrangig auf die Tatsache zurückzuführen, dass bei dem *Infinium[®] MethylationEPIC BeadChip* Array vor allem regulatorische, tumorrelevante CpG-Stellen untersucht werden. Außerdem wurden durch die genomweite Methylierungsanalyse sowie durch anschließendes *Deep Bisulfite Sequencing* regulatorisch relevante CpG-Stellen identifiziert, die zwischen jungen und alten Probanden hoch signifikant unterschiedlich methyliert sind. Die CpG-Stellen wurden ihren assoziierten Genen zugeordnet. Die Mehrzahl dieser Gene übt eine regulatorische Funktion im Bereich Zellwachstum, Zellteilung und Genexpression aus. Besonders die Gene *FHL2*, *HOXA5* und *RPA2* wiesen bei älteren Probanden eine signifikant erhöhte DNA-Methylierung sowie eine signifikant verminderte Genexpression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auf. Zahlreiche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren um die entsprechenden CpG-Stellen der drei Gene sprechen dafür, dass hier eine funktionelle repressive Wirkung der Methylierung auf die Genexpression vorliegt. Für die Gene *ASH1L*, *ASCL2* und *NWD1* zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression, allerdings konnte die Proteinebene aufgrund fehlender Expression im verwendeten Monozytenlysat nicht untersucht werden. Ergänzend

wurde die altersassoziierte Genexpression von *TP53* und *PTEN* analysiert, da *HOXA5* bekanntlich als deren Regulator fungiert. Auch hier zeigte sich bei *TP53* ein signifikanter Expressionsverlust im Alter, während *PTEN* eine ähnliche, aber nicht signifikante Tendenz aufwies. Besonders relevant ist die reduzierte Expression von *HOXA5* im Kontext seiner tumorsuppressiven Rolle als Aktivator von *TP53*, was einen möglichen Mechanismus für die erhöhte Tumoranfälligkeit im Alter darstellen könnte. Ebenso könnte die altersbedingte Reduktion von *FHL2* zur Krebsentstehung beitragen, da dessen Expression in zahlreichen Tumorarten verändert ist. *RPA2* wiederum ist essenziell für DNA-Reparatur und Telomerstabilität – eine verminderte Expression könnte somit zu genomischer Instabilität im Alter führen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine tiefgreifende epigenetische Umstrukturierung im Alter mit funktionellen Auswirkungen auf die Genexpression, die sowohl für das bessere Verständnis epigenetischer Mechanismen im Alter als auch für das Verständnis von altersassoziierten Erkrankungen von Bedeutung sind.

Summary

Genome-wide investigation of age-associated DNA methylation differences to identify age-associated differentially expressed genes

The aging process in vertebrates is a complex physiological phenomenon that is associated with an overall increased risk of disease and a heightened susceptibility to age-related disorders. Aging has also been linked to alterations in DNA methylation, which in turn affect gene expression. With increased age, global DNA methylation levels tend to decrease, while hypermethylation occurs in specific regulatory regions. However, it is not yet fully understood which specific genes are affected by age-dependent changes in DNA methylation and what consequences these changes have for gene expression. This study therefore aimed to investigate age-related changes in DNA methylation in order to identify genes with significant age-related differences in DNA methylation and to examine their expression profiles. A genome-wide methylation analysis was conducted using the Illumina *Infinium*[®] *MethylationEPIC BeadChip* Array, which revealed that the majority of the 853,307 analyzed CpG dinucleotides were hypermethylated with age. This is primarily due to the fact that the *Infinium*[®] *MethylationEPIC BeadChip* Array mainly investigates regulatory, tumor-related CpG sites. Moreover, genome-wide methylation analysis and subsequent Deep Bisulfite Sequencing revealed regulatory CpG sites that were significantly differentially methylated between young and old participants. These CpG sites were assigned to their associated genes. The majority of these genes play a regulatory role in cell growth, cell division, and gene expression. Particularly, the genes *FHL2*, *HOXA5* and *RPA2* showed significantly increased DNA methylation and significantly reduced gene expression at both the mRNA and protein levels in older participants. Numerous transcription factor binding sites around the corresponding CpG sites of these three genes suggest that there is a functional repressive effect of DNA methylation on gene expression. For the genes *ASH1L*, *ASCL2* and *NWD1*, significant differences in mRNA expression were also observed. However, protein levels could not be investigated due to the absence of expression in monocytes. Additionally, age-associated gene expression of *TP53* and *PTEN* was analyzed, as *HOXA5* is known to act as their regulator. Here, a significant loss of *TP53* expression with age was observed, while *PTEN* showed a similar but not significant trend. Particularly relevant is the reduced expression of

HOXA5 in the context of its tumor-suppressive role as an activator of *TP53*, which could represent a possible mechanism for the increased susceptibility to tumors with age. Similarly, the age-related reduction of *FHL2* could contribute to cancer development, as its expression is altered in several tumor types. *RPA2*, in turn, is essential for DNA repair and telomere stability. A reduced *RPA2* expression could therefore lead to genomic instability with age. Overall, the results of this study show a profound epigenetic restructuring with functional consequences for gene expression, which is important both for a better understanding of epigenetic mechanisms in aging and for understanding age-associated diseases.

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Erforschung des Alterungsprozesses ist ein zunehmend beliebter werdender Bestandteil der modernen Biologie und Medizin. Mit steigendem Alter treten in allen Wirbeltieren charakteristische Veränderungen auf, die nicht nur das äußere Erscheinungsbild betreffen, sondern auch die Funktionen der Zellen und damit den gesamten Organismus beeinträchtigen. Eine zentrale Rolle bei der Regulation der Genexpression und somit auch bei der Regulation des Alterungsprozesses spielen epigenetische Mechanismen. Ein Beispiel hierfür ist die DNA-Methylierung (DNAm). Diese Arbeit beschäftigt sich mit diesen epigenetischen Veränderungen und ihrem Einfluss auf den Alterungsprozess.

1.1 Einführung

Der Traum von der ewigen Jugend ist so alt wie die Menschheit. Auch wenn die Wissenschaft noch weit davon entfernt ist, diesen Traum Wirklichkeit werden zu lassen, ist die durchschnittliche Lebenserwartung – also die Lebenserwartung einer gesamten Bevölkerungsgruppe unter Berücksichtigung aller Sterblichkeitszahlen – insbesondere in den entwickelten Ländern signifikant gestiegen (Mooney, 2004; World Health Organization, 2020).

Trotz des weltweiten Anstiegs der durchschnittlichen Lebenserwartung hat sich die maximal erreichbare Lebensspanne des Menschen – verstanden als das höchste nachgewiesene Alter eines Individuums einer Art, welches zur Zeit 122 Jahre beträgt – nicht verändert (Vaupel, 2010; Modig *et al.*, 2017; Olshansky & Carnes, 2019; Robine *et al.*, 2019). Die Lebensspanne beschreibt die tatsächliche Lebensdauer eines Individuums, im Gegensatz zur durchschnittlichen Lebenserwartung, die auf die Gesamtbevölkerung bezogen ist. In Bezug auf die maximale Lebensspanne des Menschen vertreten manche Wissenschaftler die Ansicht, dass unter einer optimalen medizinischen Versorgung kein Limit für die maximale Lebensspanne zu erwarten ist (Blagosklonny, 2021). Andere Studien legen jedoch nahe, dass es ein natürliches Limit für die menschliche Lebensspanne gibt (Dong *et al.*, 2016, Modig *et al.*, 2017, Olshansky & Carnes, 2019).

Während heute signifikant mehr Menschen ein hohes Alter erreichen als frühere Generationen (World Health Organization, 2020), zeigen globale demographische Daten, dass dies an der Mortalität der hochbetagten Menschen nichts geändert hat (Dong *et al.*, 2016). Bereits in der Antike existierten Berichte über Individuen, die ein Alter erreichten,

das mit dem Alter heutiger hochbetagter Menschen vergleichbar ist. Eine Analyse von Montagu im Jahr 1994 konnte zeigen, dass historische Persönlichkeiten aus dem antiken Griechenland, die nach 100 v. Chr. geboren wurden und deren Geburts- und Sterbedaten dokumentiert wurden, über 70 Jahre alt wurden (Montagu, 1994). Dies deutet darauf hin, dass die obere Grenze der menschlichen Lebensspanne seit langem relativ stabil ist (Harlow, 2004). Die Archäologin Christine Cave entwickelte eine Methode zur Altersbestimmung anhand des Zahnabriebs, mit der sie über 300 Skelette menschlichen Ursprungs aus angelsächsischen Gräbern (475–625 n. Chr.) untersuchte. Die Analyse der Zahnabriebe ergab, dass mehrere der Verstorbenen ein Alter von über 75 Jahren erreicht hatten (Cave, 2021; McKinnon, 2018).

Der Mensch als Individuum wurde im Verlauf der Evolution daher nicht langlebiger. Vielmehr senkte vor allem eine im Vergleich zu heute signifikant höhere Kindersterblichkeit sowie eine signifikant höhere Sterbequote im Kindsbett die durchschnittliche Lebenserwartung (Knapp, 1998; World Health Organization, 2022). Anhand eines Beispiels wird diese Problematik verdeutlicht: Verlor eine Frau im 19. Jahrhundert zwei Kinder im Kindsbett und ein weiteres überlebendes Kind wurde 78 Jahre alt, ergibt dies einen Durchschnittswert von nur 26 Jahren, obwohl der überlebende Nachkomme tatsächlich 78 Jahre alt wurde. Somit wird ersichtlich, dass die durchschnittliche Lebenserwartung ein statistisches Konstrukt ist. Die Steigerung der durchschnittlichen Lebenserwartung der modernen Gesellschaft ist in erster Linie auf Fortschritte in den Bereichen medizinische Versorgung, Gesundheit und Ernährung sowie auf eine substantielle Verbesserung der allgemeinen Lebensbedingungen zurückzuführen. Diese Entwicklung hat dazu geführt, dass ein größerer Anteil der Bevölkerung ein höheres Alter erreicht (Rafi & Alavi, 2017).

Nichtsdestotrotz kommt es häufig schon in der Präseneszenz aufgrund einer Akkumulation verschiedener Veränderungen in der Funktion von Zellen und Geweben zu einer Schädigung von Organen und Organsystemen, da der menschliche Körper immer weniger befähigt wird, sich selbst zu reparieren. Mit dem Eintritt in die Seneszenz nimmt die Häufigkeit Seneszenz-assoziiierter Erkrankungen exponentiell zu (He & Sharpless, 2017). Eine ähnliche Entwicklung lässt sich bei nahezu allen Säugetieren beobachten. Zu den klassischen Seneszenz-assoziierten Erkrankungen gehören Tumore, Alzheimer, Parkinson, Infektionskrankheiten und Demenz, aber auch kardiovaskuläre Erkrankungen oder chronisches Nierenversagen (Kaeberlein *et al.*, 2015). In der Forschung wird

das Altern daher zunehmend als eine eigenständige Krankheit betrachtet, für deren Verlangsamung schon jetzt molekulare Therapien sowie Therapien im Bereich der regenerativen Medizin entwickelt werden (Neves *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2022). Diese Perspektive erscheint sinnvoll, da mit solchen therapeutischen Ansätzen nicht nur mehrere altersbedingte Erkrankungen gleichzeitig behandelt werden, sondern diesen auch aktiv vorgebeugt werden kann (Abbildung 1).

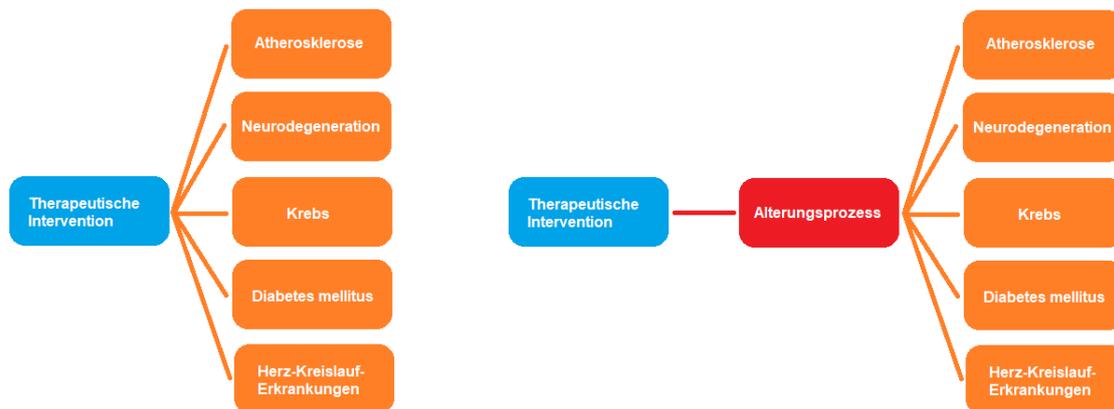


Abbildung 1: Vergleich zwischen krankheitsspezifischer Therapie und interventionsbasiertem Ansatz zur Verzögerung des Alterungsprozesses. Bisherige Therapien haben individuelle Krankheiten isoliert als Ziel. Therapien, die den Alterungsprozess direkt ansteuern, behandeln parallel mehrere Krankheiten bzw. beugen diesen vor (modifiziert nach Niccoli & Partridge, 2012).

1.2 Definition von Seneszenz und Alterung

Seneszenz ist nicht gleichbedeutend mit Altern. Das Altern oder der Alterungsprozess ist bei den meisten mehrzelligen Organismen ein fortschreitender biologischer Prozess, der sich an die Entwicklungsprozesse anschließt. Entwicklung kann daher auch als eine Form des Alterns angesehen werden, beziehungsweise Altern als eine Fortsetzung der Entwicklung. Letztlich endet der Alterungsprozess jedoch mit dem Verlust gesunder Körper- und Organfunktionen und terminal mit dem biologischen Tod.

Seneszenz kann auf zellulärer Ebene und der Ebene des Organismus definiert werden.

Auf zellulärer Ebene beschreibt die Seneszenz einen irreversiblen Wachstumsstillstand einer Zelle von Wirbeltieren, bei dem sich die Zelle nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen (Mitosen) in der Zellkultur nicht mehr weiter teilt. Man spricht hier auch von

der Hayflick-Grenze oder der replikativen Seneszenz, die auch ein Erklärungsmodell des zellulären Alterns darstellt (vgl. Kapitel 1.3.1.3) (Harley *et al.*, 1990). Zelluläre Seneszenz kann durch Medikamente wie Chemotherapeutika induziert werden (Saleh *et al.*, 2020). So wird beispielsweise in den Schleimhautzellen des Darms oder der Mundhöhle eine zelluläre Seneszenz nach einer Chemotherapie ausgelöst. Eine wesentliche Rolle der zellulären Seneszenz besteht darin, die Proliferation geschädigter Zellen zu hemmen und damit die Entstehung von malignen Tumorzellen zu verhindern (Zeng *et al.*, 2018).

Auf der Ebene des Organismus beschreibt die Seneszenz eine Zeitspanne am Ende des Alterungsprozesses, die im Allgemeinen mit der Akkumulation von Schadstoffen, Gewebeveränderungen sowie dem allmählichen Verlust von vielen physiologischen Funktionen einhergeht. Diese Prozesse führen zu einer verringerten Fähigkeit des Organismus sich an Umwelteinflüsse anzupassen, was zu diversen Seneszenz-assoziierten Erkrankungen und schließlich unwiderruflich zum Tod des Individuums durch Organversagen führt (López-Otín *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2018).

Auch auf der Ebene des ganzen Organismus kann die Seneszenz vorzeitig induziert werden, beispielsweise durch Mutationen wie sie bei Erkrankungen der beschleunigten Alterung auftreten (K. Cao *et al.*, 2011). Beispiele für solche Erkrankungen sind das Progerie-Syndrom, das Werner-Syndrom oder das Down-Syndrom, bei denen durch seltene genetische Veränderungen der Alterungsprozess beschleunigt wird (Davis *et al.*, 2007; Sinha *et al.*, 2014; Franceschi *et al.*, 2019; Meharena *et al.*, 2022; Tsuge & Shimamoto, 2022).

Allerdings gibt es auch zahlreiche Beispiele in der Natur, in denen Alterungsprozesse ablaufen, ohne dass eine klassische Seneszenz auftritt. In vielen Spezies, etwa dem Pazifischen Lachs, laufen Alterungsprozesse im Sinne eines genetischen Programms ab, das unmittelbar nach erfolgreicher Fortpflanzung den Tod des Individuums herbeiführt (Longo *et al.*, 2005) (vgl. Kapitel 1.3.2.1).

1.3 Alterungstheorien

Während sich eine Vielzahl von Theorien entwickelt hat, die versuchen, den komplexen Prozess des Alterns zu erklären, ist die eigentliche Ursache des biologischen Alterungsprozesses nach wie vor ungeklärt.

Während die sogenannten *proximaten* Theorien versuchen, das *Wie* des Alternsvorgangs zu erklären, widmen sich die *ultimaten* Theorien der Frage nach dem *Warum*. *Ultimate* Theorien versuchen zu erklären, weshalb der Alterungsprozess evolutionär entstanden ist und warum es zwischen verschiedenen Arten – darunter auch nahe verwandte Arten – signifikante Unterschiede hinsichtlich der Lebensspanne und dem zeitlichen Ablauf von Entwicklung und Fortpflanzung gibt.

Ultimate Theorien lassen sich am ehesten unter phylogenetischen Aspekten begründen und setzen bei der sogenannten *life history strategy* an. Darunter versteht man die Gesamtheit der evolutionär entwickelten Strategien eines Organismus, mit denen er sein Überleben und vor allem seine Fortpflanzung unter bestimmten Umweltbedingungen, wie beispielsweise Nahrung, Klima und Feinde optimiert (Stott *et al.*, 2024). Im Mittelpunkt steht dabei die reproduktive Fitness. Dies ist die Fähigkeit eines Individuums, sein Erbmaterial (Gene) an die nächste Generation weiterzugeben. Diese Fitness, auch *inclusive* Fitness genannt, beschreibt, wie oft ein Individuum (direkt oder indirekt über Verwandte) im Genpool der nächsten Generation vertreten ist. Sie lässt sich in vielen Modellen sogar mathematisch bestimmen (Wakano *et al.*, 2012).

1.3.1 *Proximate* Theorien

Die bekanntesten *proximaten* Theorien umfassen Theorien, die grundsätzlich den sogenannten Verschleißtheorien zuzuordnen sind. Ihnen ist gemeinsam, dass sie die im Laufe der Zeit akkumulierenden Schäden und den damit einhergehenden Abbau von Organen und Organsystemen für die Alterung eines Organismus verantwortlich machen. Die *proximaten* Theorien betrachten den Verschleiß somit als die Ursache und nicht als die Folge des Alterungsprozesses.

Zu diesen Verschleißtheorien gehören unter anderem die Theorie der freien Radikale (*engl. Free Radical Theory of Aging*), der Verlust der Genomstabilität (DNA-Reparatur-Theorie des Alterns), die Telomer-Hypothese sowie die bereits in Kapitel 1.2 aufgeführte Replikative Seneszenz.

1.3.1.1 Theorie der freien Radikale

Die Theorie der Freien Radikale wurde erstmals von Denham Harman im Jahr 1956 beschrieben (Harman, 1956). Diese Theorie geht davon aus, dass Organismen altern, weil sich oxidative Schäden akkumulieren die von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) herbeigeführt werden. ROS sind Radikale wie beispielsweise das Hydroxyl-Radikal, das

Hyperoxid-Anion und Wasserstoffperoxid. ROS entstehen in Zellen als Stoffwechselprodukte aus molekularem Sauerstoff und schädigen laut dieser Theorie Moleküle wie DNA, RNA sowie Proteine und Lipide, die für die Funktion von Zellen wichtig sind. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass die Bildung von ROS und die damit verbundenen oxidativen Schäden im Alter zunehmen und dass ihre Reduktion die Lebensspanne von Modellorganismen wie Hefe, Fruchtfliegen und Mäusen verlängert (Stadtman, 1992; Kirkwood & Kowald, 2012). Die aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse legen jedoch nahe, dass ROS-bedingte oxidative Schäden nicht die primäre Ursache, sondern eher eine Folge des Alterungsprozesses sind (Kirkwood & Kowald, 2012). Zudem zeigen einige neuere Studien widersprüchliche Ergebnisse zu der Theorie der freien Radikale. So konnte von Schulz *et al.* gezeigt werden, dass freie Radikale notwendig sind, um die Mitohormesis zu aktivieren (Schulz *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um einen biochemischen Prozess, bei dem geringe Mengen an mitochondrialem Stress, unter anderem induziert durch ROS, positive Anpassungsreaktionen im Körper auslösen und die zelleigene Abwehr triggern (Bárcena *et al.*, 2018). Schulz *et al.* zeigten zudem, dass beispielsweise eine Reduktion der Glukoseaufnahme die Lebensspanne verlängern kann, da eine geringere Glukosezufuhr die Freisetzung von ROS fördert und somit eine Stressresistenz bewirkt (Schulz *et al.*, 2007).

1.3.1.2 Verlust der Genomstabilität

DNA-Reparaturprozesse sind essenziell um die genetische Stabilität aufrecht zu erhalten. Diese Mechanismen schützen die Zellen vor Schäden, die durch Fehler bei der DNA-Replikation, aber auch durch Mutationen oder Umwelteinflüsse entstehen können (J. Chen *et al.*, 2024).

Unter Betrachtung dieser zentralen Rolle der DNA ist es zunächst naheliegend, die Ansammlung von DNA-Schäden als elementare Ursache des Alterungsprozesses zu betrachten.

Tatsächlich zeigen zahlreiche Studien, dass sich in der Senezenz DNA-Schäden und Mutationen in Säugetiergeweben häufen (Cabelof *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2014; Vlachogiannis *et al.*, 2023) – ein Phänomen, welches auch in den vorzeitig gealterten Geweben von Menschen mit progeroiden Syndromen zu beobachten ist (Musich & Zou, 2011). Eine Verbindung zwischen altersbedingter Schädigung der DNA und einer verminderten Effizienz der Reparaturmechanismen erscheint somit naheliegend.

Jedoch stellt sich auch hier wieder die Frage, ob DNA-Schäden als Ursache der Alterung zu betrachten sind oder ob nicht vielmehr der Alterungsprozess selbst und schließlich die Seneszenz – ob nun erreicht im Rahmen des normalen Alterungsprozesses oder im Rahmen eines genetisch beschleunigten Prozesses in progeroiden Patienten – die Ursache der akkumulierten Schäden darstellt (Soares *et al.*, 2014).

1.3.1.3 Telomer-Hypothese

Die Telomer-Hypothese des Alterns wurde 1990 von Calvin Harley aufgestellt und basiert auf der Beobachtung von Leonard Hayflick im Jahr 1965 (Hayflick, 1965; Harley *et al.*, 1990). Harley entdeckte, dass Telomere – die schützenden Endkappen der Chromosomen – sich mit jeder Zellteilung verkürzen (Harley *et al.*, 1990; Mercado-Sáenz *et al.*, 2010). Sobald die Telomere eine kritische Länge erreicht haben, kann die Zelle sich nicht mehr teilen, was zum Zelltod oder zu einer seneszenten Phase führt. Diese Begrenzung der Zellteilung bei Eukaryoten wird als Hayflick-Grenze bezeichnet (Hayflick, 1965). Die Hypothese wird durch Studien gestützt, die zeigen, dass Stressfaktoren wie Gewalterfahrungen in der Kindheit mit einer beschleunigten Verkürzung der Telomere assoziiert sind (Tyrka *et al.*, 2009; Kananen *et al.*, 2010). Die Telomerlänge wird demnach als ein Indikator für die Lebenserwartung einer Zelle sowie als Alterungsfaktor des gesamten Organismus angesehen (Malberg, 2012). Allerdings ist auch die Telomerlänge eher als Indikator denn als Ursache des Alterns zu betrachten.

1.3.2 *Ultimate* Theorien

Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten *proximaten* Theorien (Kapitel 1.3.1), die sich mit der Frage „Wie altert ein Organismus?“ beschäftigen, untersuchen die *ultimaten* Theorien die Frage „Warum altert ein Organismus?“. *Ultimate* Theorien gehen davon aus, dass das Altern ein Ergebnis des Evolutionsprozesses ist, da die ersten Lebewesen auf der Erde nicht alterten und das Altern eine Eigenschaft höherer Lebewesen ist (Ackermann *et al.*, 2007). Die bekannteste evolutionäre Theorie des Alterns ist das im folgenden Kapitel beschriebene programmierte bzw. altruistische Altern.

1.3.2.1 Programmiertes Altern

Programmiertes Altern bezeichnet die Theorie, dass die Seneszenz bei Menschen und anderen komplexen Organismen durch evolutionär entstandene und genetisch festgelegte biologische Mechanismen verursacht wird und die Lebensdauer somit intern festgelegt wird (Goldsmith, 2016). Ein unsterblicher Organismus wäre nach dieser Theorie aus evolutionsbiologischer Sicht nachteilig, da die genetische Vielfalt, die als treibende

Kraft der Evolution gilt, nur durch das Absterben erwachsener Individuen und das Entstehen neuer, genetisch durchmischter Generationen aufrechterhalten werden kann (Skulachev, 2011).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Evolution Mechanismen hervorgebracht hat, die die Lebensspanne einer Art kontrollieren (Muntané *et al.*, 2018). Diese Mechanismen begrenzen artspezifisch aktiv die Lebensdauer jedes einzelnen Organismus. Dazu gehören bei den höheren Organismen auch der Alterungsprozess und die damit einhergehenden altersassoziierten Erkrankungen. Eine Neukonstruktion ist evolutionsbiologisch effektiver als das „dauernde Verbessern“ des Vorhandenen (Rose *et al.*, 2008).

Die Natur bietet anschauliche Beispiele für die Theorie des programmierten Alterns. Der Pazifische Lachs ist eines der am besten untersuchten Beispiele für programmiertes Altern, bzw. für einen programmierten Tod. Pazifische Lachse sterben nach dem Ablai-chen, also nach der Eiablage und dienen anschließend als Dünger für das Ökosystem, in dem ihr Nachwuchs aufwächst (Longo *et al.*, 2005). Ein weiteres Beispiel ist das Weibchen des *Octopus hummelincki*. Nachdem dieses seine Eier gelegt und ausgebrütet hat, reduziert es seine Nahrungsaufnahme und stirbt, nachdem die Jungen geschlüpft sind (Wodinsky, 1977).

Verschiedene, auch nahe verwandte Säugetierarten, haben unterschiedliche Lebensspannen und altern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die potenzielle maximale Lebensspanne reicht beispielsweise innerhalb der Primaten von etwa 8 Jahren bei den Tupaias bis zu 122 Jahren beim Menschen (Weon & Je, 2008; Dong *et al.*, 2016; Vijg & Bourg, 2017). Dabei besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der maximalen Lebensspanne einer Art und ihrer Alterungsrate. Die Geschwindigkeit, mit der physiologische Funktionen im Laufe des Lebens abnehmen, korreliert also mit der maximalen Lebensspanne einer Art. Dieses Konzept der maximalen Lebensspanne und der damit verbundenen Alterungsrate wurde in zahlreichen Studien untersucht (Finch & Austad, 2012; C. Xia & Møller, 2021; Yuan *et al.*, 2023)

Mit zunehmender maximaler Lebensspanne verlängern sich demnach alle Lebensabschnitte proportional und nicht nur die Seneszenzphase (Yuan *et al.*, 2023). Die aufgeführten Beispiele lassen sich nur durch *ultimate* Theorien und nicht durch Verschleißtheorien erklären.

1.3.2.2 Theorie des verzichtbaren Körpers (*Disposable Soma Theory*)

Eine weitere *ultimate* Theorie des Alterns ist die Theorie des verzichtbaren Körpers. Diese Theorie wurde 1979 von Kirkwood aufgestellt und argumentiert, dass Organismen begrenzte Ressourcen zwischen Reproduktion und Erhaltung des Körpers (*Soma*) aufteilen müssen (Kirkwood & Holliday, 1979). Ein höherer Ressourceneinsatz für die Reproduktion geht nach dieser Theorie zulasten des Körpers und dessen Regeneration, was im Laufe der Zeit zur Akkumulation von Schäden und somit zum Altern führt.

1.3.2.3 Theorie der antagonistischen Pleiotropie

Die Theorie der antagonistischen Pleiotropie geht davon aus, dass bestimmte Gene mehrere, verschiedene Effekte (pleiotrope Effekte) auf den Körper ausüben können, die in jungen Jahren vorteilhaft sind, aber im späteren Leben nachteilige Auswirkungen haben (Williams, 1957). Da die natürliche Selektion in erster Linie auf die reproduktive Fitness in jungen Jahren wirkt, könnten solche Gene trotz ihrer negativen Effekte im Alter in der Population erhalten bleiben (Austad & Hoffman, 2018). Ein anschauliches Beispiel für ein Gen mit pleiotropen Effekten ist *Insulin-like growth factor 1 (IGF1)*. *IGF1* fördert in jungen Jahren das Wachstum und die Entwicklung, was zu einer höheren körperlichen Fitness führt (Ashpole *et al.*, 2014). Im späteren Leben kann *IGF1* jedoch auch das Tumorstromwachstum fördern, was das Risiko für Krebs erhöht (Werner, 2020).

1.4 Anti-Aging-Mechanismen / mTOR-Signalweg

Bislang sind keine Arzneistoffe oder Behandlungsmethoden bekannt, die den Alterungsprozess beim Menschen nachweislich verzögern. In einigen Tiermodellen konnte jedoch das Altern sowie altersassoziierte Leiden durch Kalorienrestriktion sowie die Gabe von Rapamycin, einem für Transplantationspatienten zugelassenen Immunsuppressivum, hinausgezögert werden. Beide Mechanismen basieren auf der Hemmung des *mammalian target of rapamycin (mTOR)*-Signalweges.

Der mTOR-Signalweg spielt eine zentrale Rolle im Zellwachstum und Stoffwechsel, insbesondere in Abhängigkeit von Nahrungsverfügbarkeit (Kapahi *et al.*, 2010). Das Enzym mTOR wurde 1994 als Zielstruktur des Rapamycin-FKBP12-Komplexes identifiziert (Brown *et al.*, 1994; Sabatini *et al.*, 1994; Sabers *et al.*, 1995).

Studien zeigen, dass die Hemmung des mTOR-Signalwegs die Lebensspanne verschiedener Modellorganismen verlängern kann (Jia *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2013). Beispielsweise konnte bereits in verschiedenen Tiermodellen belegt werden,

dass eine Kalorienrestriktion die maximale Lebensspanne verlängern kann (Liang *et al.*, 2021). Es wird angenommen, dass die Lebensspanne unter anderem dadurch verlängert werden könnte, indem eine Kalorienrestriktion die mTOR-Signalkaskade herunterreguliert und somit der mTOR-Signalweg auf Kosten eines reduzierten Wachstums gehemmt wird. Dabei konnte das Risiko für altersassoziierte Krankheiten wie Krebs, neurodegenerative und kardiovaskuläre Erkrankungen gesenkt werden. Die Lebensspanne stieg dabei um bis zu 30 % bei Ratten und 15 % bei Mäusen (T. A. Davis *et al.*, 1983; Bonkowski *et al.*, 2006; Speakman *et al.*, 2016; Hwangbo *et al.*, 2020). Zudem konnte gezeigt werden, dass Modellorganismen, bei denen Zielgene des mTOR-Signalweges mutiert waren, durch eine Kalorienrestriktion keine verlängerte Lebensspanne aufweisen (Kapahi *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008).

Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass eine Kalorienrestriktion über Signalwege, Enzyme und zelluläre Prozesse wirkt, die nährstoff- und stressabhängig sind. Dazu zählen u. a. der IGF1-, mTOR-, *Forkhead box O* (FOXO)-, *AMP-activated protein kinase* (AMPK)- und *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2)-Signalweg, sowie Sirtuine und die Autophagie (Hwangbo *et al.*, 2020).

Studien haben außerdem gezeigt, dass mTOR durch epigenetische Mechanismen, beispielsweise durch *microRNAs* (miRNAs), reguliert werden kann (Rubie *et al.*, 2016; Y. Zhang *et al.*, 2017). So deutet eine Studie von Rubie *et al.* darauf hin, dass die miRNA miR-496 die mTOR-Expression in älteren Menschen mit Adipositas und *Typ-2-Diabetes mellitus* reguliert (Rubie *et al.*, 2019).

1.5 Epigenetische Mechanismen

Der Begriff „Epigenetik“ wurde erstmals von Conrad Waddington im Jahre 1942 eingeführt und bedeutet wortwörtlich „zusätzlich zur Genetik“ (Waddington, 2011). Das biologische Fachgebiet der Epigenetik beschäftigt sich mit der Fragestellung, welche Faktoren die Aktivität eines Gens beeinflussen, und untersucht Veränderungen der Genfunktion, die nicht auf Mutationen der DNA beruhen (Tronick & Hunter, 2016).

Epigenetische Veränderungen sind die Hauptursache dafür, dass sich die Zellen eines Organismus trotz dem Vorhandensein von identischer genetischer Information in ihrem Phänotyp unterscheiden und unterschiedliche Funktionen ausüben (Barski *et al.*, 2014; Ivashkiv & Park, 2016). In den Zellen wird jeweils immer nur ein Teil der vorhandenen

Gene abgelesen und aktiviert, der Rest der Gene ist inaktiv. In verschiedenen Zelltypen sind unterschiedliche Gene aktiv oder inaktiv, was zu einem veränderten Genexpressionsmuster führt (Handy *et al.*, 2011).

Epigenetische Markierungen sind mitotisch vererbbar und werden von der Mutterzelle auf die Tochterzellen weitervererbt (Bostick *et al.*, 2007; A. Wei & Wu, 2022). Eine transgenerationale epigenetische Vererbung, d. h. eine Übertragung der epigenetischen Merkmale auf die nächste Generation ist jedoch nach heutigem Kenntnisstand in Säugtieren unwahrscheinlich. In der frühen Embryogenese kommt es zu einer Auslöschung der epigenetischen Muster und damit zu einer Reprogrammierung des gesamten Epigenoms, die für die Ausbildung eines totipotenten Entwicklungspotentials notwendig ist (Mann & Bartolomei, 2002; Heard & Martienssen, 2014; Xia & Xie, 2020). In anderen Organismen konnte jedoch eine transgenerationale Vererbung gezeigt werden. In mehreren Studien zu *Drosophila melanogaster* wurde festgestellt, dass einige Phänotypen nicht nach den Mendelschen Regeln vererbt wurden und nicht auf Mutationen in der DNA-Sequenz, sondern auf epigenetische Modifikationen zurückzuführen sind (Seong *et al.*, 2011; Felsenfeld, 2014).

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass epigenetische Mechanismen an allen biologischen Prozessen von der Empfängnis bis zum Tod beteiligt sind (Delcuve *et al.*, 2009; Moosavi & Ardekani, 2016). Dazu gehören beispielsweise die frühe Embryogenese und Gametogenese, die Zelldifferenzierung sowie die Aufrechterhaltung der Zellidentität (Bunkar *et al.*, 2016; Aref-Eshghi *et al.*, 2018). Störungen der epigenetischen Mechanismen und damit fehlerhafte epigenetische Muster führen dagegen zu Geburtsfehlern und Krankheiten wie Krebs (Yu *et al.*, 2024).

Die epigenetische Genregulation beruht auf drei verschiedenen bekannten Mechanismen, der RNA-Interferenz (RNAi), der Histonmodifikation und der DNAm (Barter *et al.*, 2012; J. Wei *et al.*, 2016; D. Wang *et al.*, 2023). Die DNAm war bisher am häufigsten Gegenstand der Forschung (Jones *et al.*, 2015).

1.5.1 RNA-Interferenz

Die RNAi, auch RNA-Silencing genannt, ist ein epigenetischer Mechanismus, der die Genregulation beeinflussen kann (J. Wei *et al.*, 2016).

Dabei wird die *messenger RNA* (mRNA) durch kurze RNA-Moleküle gezielt abgebaut oder in ihrer Translation gehemmt (Bartel, 2004). Zu diesen Molekülen gehören unter

anderem die sogenannten *small interfering RNAs* (siRNAs) und miRNAs, wobei miRNAs für die Regulation der Genexpression eine zentrale Rolle spielen (Scacheri *et al.*, 2004; L. He & Hannon, 2004; Vicinus *et al.*, 2011). MiRNAs binden meist unvollständig komplementär an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) der Ziel-mRNAs und können dadurch die Translation hemmen oder den Abbau der mRNA fördern (Filipowicz *et al.*, 2008; Carthew & Sontheimer, 2009). So konnte gezeigt werden, dass miR-496 an die 3'-UTR von mTOR bindet und dessen Expression negativ reguliert (Rubie *et al.*, 2016). Die 3'-UTR bezeichnet dabei einen Bereich am 3'-Ende einer mRNA, der nicht für das eigentliche Protein codiert, jedoch eine wichtige Rolle bei zahlreichen regulatorischen Prozessen spielt (Barrett *et al.*, 2012).

1.5.2 Histonmodifikation

Histone sind basische Proteine im Zellkern von Eukaryoten und Bestandteil des Chromatins, das die etwa zwei Meter lange DNA im Nukleus verpackt (Carter, 1978; Piovesan *et al.*, 2019). Die kleinste Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, ein Oktamer aus je zwei der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4, um das sich 147 bp DNA winden (Peterson & Laniel, 2004). Zwischen DNA und Histonen besteht eine elektrostatische Anziehung, da die DNA negativ geladen ist und die Histone viele basische, positiv geladene Aminosäuren enthalten. Über die sogenannte Linker-DNA und mit Hilfe des Linker-Histon H1 sind benachbarte Nukleosome miteinander verbunden (Lee & Hayes, 1998).

Histone dienen nicht nur der Organisation der DNA, sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der Genregulation. Durch chemische, posttranslationale Modifikationen an den N-terminalen Enden der vier Kernhistone, z. B. Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung, kann die Transkription inhibiert oder aktiviert werden (Kouzarides, 2007).

Bei der Acetylierung übertragen Histon-Acetyltransferasen (HATs) Acetylgruppen auf Lysinreste der Histone, wodurch die positive Ladung neutralisiert wird. Dies lockert die Bindung zur DNA und erhöht die Genaktivität, da die DNA zugänglicher für Transkriptionsfaktoren wird. Histon-Deacetylasen (HDACs) können diesen Vorgang rückgängig machen (X. Zhang *et al.*, 2024).

Die Histon-Methylierung erfolgt durch die Übertragung von Methylgruppen durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) auf Lysin- und Arginin-Reste der Histone. Je nach Position kann dies die Transkription hemmen oder aktivieren. Die Methylierung ist durch Histon-Demethylasen (HDMs) reversibel (Y. Zhang & Reinberg, 2001; Alam *et al.*, 2015).

Die Histon-Phosphorylierung betrifft vor allem die Serin-Seitenketten der Histone H2A und H3. Dieser Mechanismus ist relevant bei der Reparatur von DNA-Schäden und beim Chromatin-Remodelling. Die Phosphorylierung wird durch spezielle Proteinkinasen katalysiert und kann durch Protein-Phosphatasen wieder rückgängig gemacht werden (Rossetto *et al.*, 2012).

1.5.3 DNA-Methylierung

Bei der DNAm handelt es sich um eine chemische Modifikation der DNA, bei der Methylgruppen auf bestimmte Nukleobasen übertragen werden. Bei Säugetieren ist nur die Nukleobase Cytosin betroffen (E. Li & Zhang, 2014). Die Methylgruppe ragt in die DNA-Helix hinein und kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern, was eine Veränderung der Genexpression zur Folge haben kann (Moore *et al.*, 2012).

Dieser Effekt beruht zum einen auf einer direkten strukturellen Behinderung. Die Methylierung verändert die chemischen Eigenschaften der DNA, so dass die Erkennungssequenz für bestimmte Transkriptionsfaktoren gestört oder unzugänglich gemacht werden (Yin *et al.*, 2017). Zum anderen wirken Methyl-bindende Proteine wie *Methyl-CpG-binding protein 2* (MeCP2) als Vermittler der Transkriptionsrepression, indem sie an methyliertes Cytosin binden und Corepressor-Komplexe rekrutieren, welche die Chromatinstruktur verdichten und den Zugang zu regulatorischen Sequenzen weiter einschränken (Jones, 2012).

Die DNAm wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert (Goll & Bestor, 2005). Diese Enzyme transferieren eine Methylgruppe vom Methylgruppendonor S-Adenosyl-Methionin (SAM) zum fünften Kohlenstoffatom eines Cytosin-Restes, wodurch 5-Methylcytosin entsteht (Moore *et al.*, 2012). Der DNAm unterliegen jene Cytosine, die innerhalb eines Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Dinukleotids vorkommen (E. Li & Zhang, 2014). Hierbei handelt es sich um das CG innerhalb eines DNA-Strangs und nicht die CG-Basenpaarung innerhalb eines DNA-Doppelstranges.

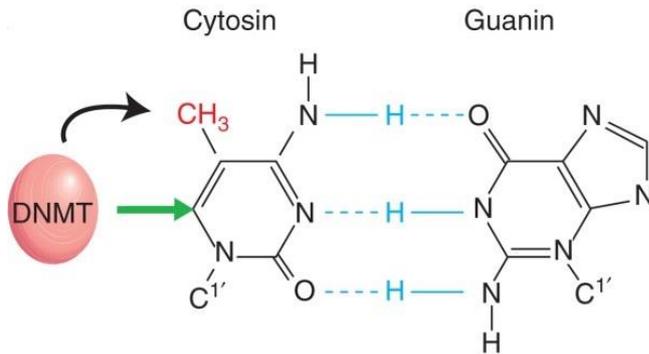


Abbildung 2: Darstellung der Cytosin-Methylierung in der DNA. DNMTs binden während der Methylierungsübertragung kovalent an das C6-Atom des Cytosinrings (grüner Pfeil). Die Übertragung einer Methylgruppe (CH₃, rot) erfolgt an das C5-Atom des Cytosinrings (schwarzer Pfeil) und beeinträchtigt die CG-Basenpaarung (Wasserstoffbrückenbindungen, blaue Linien) nicht. (modifiziert nach E. Li Zang, 2014).

Bestimmte Regionen des Genoms enthalten *Cluster* von CpG-Sequenzen, die als CpG-Inseln (CGI) bezeichnet werden. Diese DNA-Abschnitte befinden sich vorwiegend in Promotor-Regionen und weisen einen CG-Gehalt von mindestens 55 % auf (Takai & Jones, 2002). Obwohl etwa 70–80 % der CpG-Dinukleotide in Säugern methyliert sind, sind CGI überwiegend befreit von DNAm (Jabbari & Bernardi, 2004; Deaton & Bird, 2011). Ungefähr 60 % der annotierten Genpromotoren sind mit einer CGI assoziiert, diese werden auch CGI-Promotoren genannt (Steinhaus *et al.*, 2020). CGI spielen eine entscheidende Rolle bei der Genregulation. Ist eine CGI in einem Promotor methyliert, hat dies meist eine Repression der Genexpression zur Folge (Cain *et al.*, 2022). In Tumoren findet sich beispielsweise oftmals eine Hypermethylierung in CGI von Tumorsuppressorgenen (Esteller, 2002; McCabe *et al.*, 2009).

In Säugetieren sind die *de novo* DNMTs DNMT3A, DNMT3B und der Cofaktor DNMT3L für die Bildung genomischer Methylierungsmuster nach der Befruchtung verantwortlich (Chédin *et al.*, 2002; Yagi *et al.*, 2020). DNMT1 und dessen Cofaktor *Ubiquitin-like with PHD and RING Finger domains 1* (UHRF1) sind an der Replikationsgabel lokalisiert. In dieser Lokalisation tragen UHRF1 und DNMT1 zur Erhaltung bereits bestehender Methylierungsmuster auf dem neu synthetisierten DNA-Strang während der Replikation bei (Boland *et al.*, 2014). Somit wird die DNAm auch während der Zellteilung aufrechterhalten und auf die Tochterzelle weitergegeben.

Die DNAm reguliert die Transkription nicht nur durch Verhinderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA, sondern steht auch in Verbindung mit anderen epigenetischen Mechanismen. Beispielsweise können Methyl-DNA-bindende Proteine an

5-Methylcytosin binden und anschließend HDACs und HMTs rekrutieren, welche wiederum die Transkription unterdrücken (Klose & Bird, 2006).

1.6 DNA-Methylierung und Alterung

Der biologische Prozess des Alterns führt zu vielen Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene. Dazu zählen unter anderem Telomerverkürzungen und Veränderungen der Genexpression, welche wiederum auf epigenetische Veränderungen zurückzuführen sind (López-Otín *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2015). Denn mit zunehmendem Alter findet eine deutliche Umgestaltung genomischer DNA-Methylierungsmuster statt (Jones *et al.*, 2015).

Bereits mehrere Studien zeigten eine altersassoziierte Veränderung der DNAm sowohl genomweit als auch in spezifischen Regionen des Genoms (Drinkwater *et al.*, 1989; Fuke *et al.*, 2004; Kwabi-Addo *et al.*, 2007). Dabei gibt es Regionen, bei denen die Methylierung mit der Zeit zunimmt und solche bei denen sie mit der Zeit abnimmt. Viele Studien weisen darauf hin, dass insbesondere regulatorische Regionen wie CGI, welche allgemein eher eine niedrige Methylierung aufweisen, im Alter eine Zunahme der Methylierung erfahren, während es bei Regionen wie CpGs außerhalb von CGI, die allgemein ein höheres Methylierungslevel aufweisen, zu einem Verlust an Methylierung kommt (Heyn *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2012; Florath *et al.*, 2014; Weidner *et al.*, 2014; Jung & Pfeifer, 2015; Jain *et al.*, 2024). Insgesamt kommt es dabei zu einer Abnahme der DNA-Methylierungsrate ab dem späteren Erwachsenenalter (Jones *et al.*, 2015). Dieser genomweite Rückgang der DNAm lässt sich darauf zurückführen, dass die Methylierungsmuster über die Zellteilung hinweg nicht immer vollständig aufrechterhalten werden können, was zu einem allmählichen Verlust der DNAm führt (Zhou *et al.*, 2018; Endicott *et al.*, 2022). Dieses Phänomen wird auch als epigenetischer Drift bezeichnet (Martin, 2005).

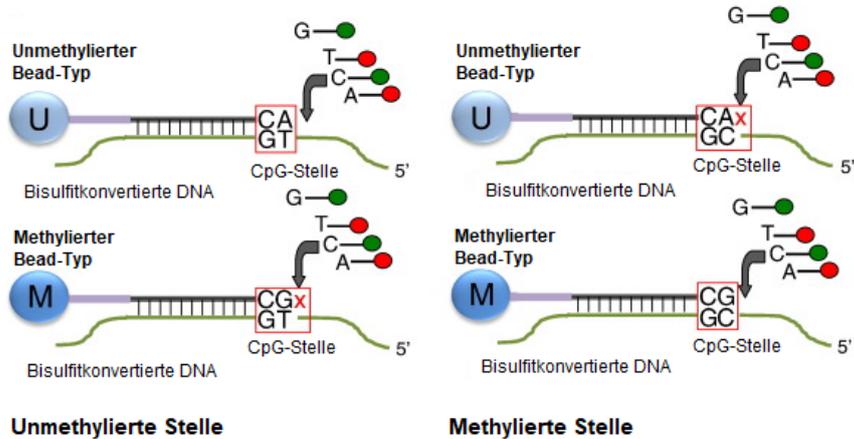
Die epigenetischen Veränderungen sind nicht nur ein passives Ergebnis des Alterns, sondern können selbst Alterungsprozesse verstärken (M. J. Jones *et al.*, 2015; K. Wang *et al.*, 2022). Somit ist die DNAm selbst auch ein aktiver Treiber des Alterns (Jung & Pfeifer, 2015). Damit geht auch ein erhöhtes Krebsrisiko einher, insbesondere dadurch, dass eine altersassoziierte Hypermethylierung vorwiegend in regulatorischen Regionen auftritt. In vielen Fällen kommt es zudem zu einer Stilllegung essenzieller Tumorsuppressorgene (Jung & Pfeifer, 2015).

1.7 Nachweis von DNA-Methylierung

Die Grundlage für eine Analyse der DNAm ist eine Behandlung der genomischen DNA (gDNA) mit Natriumbisulfit zur Herstellung von bisulfitkonvertierter DNA (BS-DNA) (Patterson *et al.*, 2011). Dadurch werden bei unmethylierter DNA die Cytosine zu Uracilen konvertiert, wohingegen 5-Methylcytosine resistent gegen die Bisulfit-Konversion sind (Grunau, 2001). Das Ergebnis ist eine Umwandlung der nicht nachweisbaren epigenetischen Informationen in nachweisbare Sequenzinformationen. In einer nachfolgenden Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (*engl. Polymerase Chain Reaction*, PCR) werden Uracil in Thymin und 5-Methylcytosin in Cytosin umgewandelt. Anschließend ist es möglich, zwischen methylierter und unmethylierter DNA zu differenzieren (Y. Li & Tollefsbol, 2011).

Mit Hilfe von Oligonukleotid-Microarrays ist es heutzutage möglich, ein DNA-Methylierungsprofiling des gesamten Genoms und somit ein umfangreiches Screening epigenetisch relevanter Biomarker durchzuführen (Dirks *et al.*, 2016). Das *Infinium*[®] *MethylationEPIC BeadChip* Microarray von Illumina ermöglicht die Analyse des Methylierungsstatus von 853.307 CpG-Dinukleotiden, welche sich hauptsächlich in tumorrelevanten regulatorischen Regionen wie Enhancern, Promotoren und CGIs befinden. Diese wurden hauptsächlich im ENCODE- und im FANTOM5-Projekt identifiziert (Pidsley *et al.*, 2016). Bei diesem Microarray werden sogenannte *Beads* verwendet. Diese sind mit Oligonukleotidsequenzen versehen, die komplementär zu den zu untersuchenden DNA-Fragmenten sind. Der *MethylationEPIC BeadChip* von Illumina vereint dabei zwei verschiedene Assay-Techniken, das *Infinium I* und das *Infinium II Assay* (Abbildung 3):

Infinium I



Infinium II

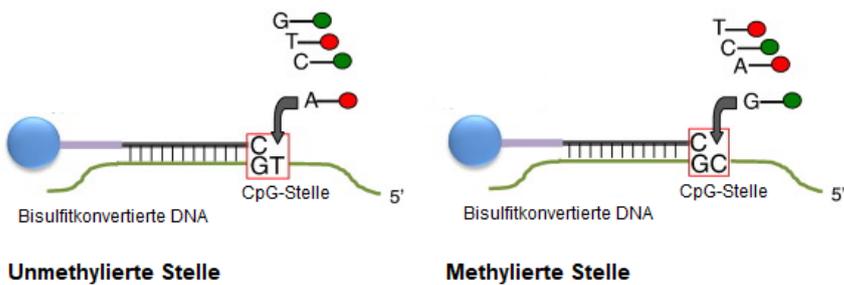


Abbildung 3: Schematische Darstellung der *Infinium I* und *II* Techniken des *Infinium*[®] *MethylationEPIC BeadChip*. Der *MethylationEPIC BeadChip* vereint beide Techniken (*Infinium I* und *II*). Beim *Infinium I* Assay werden zwei verschiedene *Bead*-Typen pro CpG-Stelle verwendet, je ein *Bead* für unmethylierte (U) und ein *Bead* für methylierte (M) Stellen. Die *Infinium II* Technik verwendet nur einen *Bead*-Typ für jede CpG-Stelle. Hier wird nach einer Einzelbasenextension mit fluoreszenzmarkierten dNTPs detektiert, welche Base eingebaut wurde. (modifiziert nach Bibikova *et al.* (2011)).

Beim *Infinium I* Assay kommen pro CpG-Stelle zwei Typen von *Beads* zum Einsatz, die sich in ihrem 3'-Ende unterscheiden. *Beads* vom Typ U können nur unmethylierte DNA binden, in der das Cytosin zu Thymin konvertiert wurde. *Beads* vom Typ M binden ausschließlich methylierte DNA, in der das Cytosin erhalten geblieben ist. Ein DNA-Fragment kann je nachdem, ob ein Cytosin oder Thymin an der Zielstelle vorliegt, nur an einem der beiden *Bead*-Typen binden. Nach der Hybridisierung erfolgt eine Einzelbasenverlängerung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddNTPs). Die Fluoreszenzsignale ermöglichen die Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA an der jeweiligen CpG-Stelle.

Beim *Infinium* II Assay wird nur ein *Bead*-Typ verwendet. Dieser bindet beide Arten von DNA gleichermaßen, da bei diesem Typ die letzte komplementäre Base fehlt. Die Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA erfolgt durch eine Einzelbasenverlängerung, bei der unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingebaut werden. Der Einbau von Didesoxyriboguanosintriphosphat (ddGTP) (grün fluoreszierend) weist auf methylierte Cytosinreste hin, während der Einbau von Didesoxyriboadenosintriphosphat (ddATP) (rot fluoreszierend) auf unmethylierte Cytosinreste hinweist, die zu Uracil und dann zu Thymin konvertiert wurden (Bibikova *et al.*, 2011; Pidsley *et al.*, 2016). Aus den gemessenen Daten aller *Reads* (Signalmessungen) eines CpGs wird ein Mittelwert gebildet, der den Methylierungsstatus der Ziel-CpG-Stelle in Prozent wiedergibt.

Um die Ergebnisse eines solchen Microarrays zu validieren, eignet sich ein anschließendes *Next-Generation-Sequencing* (NGS)-basiertes *Deep Bisulfite Sequencing* (DBS). Dieses kann detailliertere Informationen über den Grad der DNAm und über das Methylierungsmuster einzelner Loci (Genorte) liefern. Bei diesem Verfahren werden Amplikons von ausgewählten Genregionen rund um eine Ziel-CpG-Stelle erstellt, bisulfitkonvertiert und anschließend mittels NGS-Technologie tiefensequenziert (Miyata *et al.*, 2017).

1.8 *Homeobox-Protein A5 (HOXA5), Tumorsupressor-Protein p53 (TP53) und Phosphatase and Tensin Homolog, deleted on chromosome 10 (PTEN)*

Basierend auf den zuvor beschriebenen Methoden wurden in dieser Arbeit verschiedene Gene identifiziert, von denen sich *HOXA5*, ein antiangiogenes Mitglied der HOX-Familie, als sehr interessanter Kandidat herausstellte. Die *HOXA5*-Genexpression spielt in der Tumorprädisposition und -entwicklung eine wichtige Rolle und kann durch epigenetische Mechanismen moduliert werden (Watson *et al.*, 2004; Strathdee *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Yoo *et al.*, 2010). Es ist bekannt, dass *HOXA5* die Gefäßstabilität durch die Herunterregulierung von pro-angiogenen Faktoren sowie die Hochregulierung von anti-angiogenen Faktoren wie *TP53* erhöht (Rhoads *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2017). Neben der etablierten Rolle bei der Tumorentstehung wurde *TP53* auch mit dem Altern in Verbindung gebracht und kann als Schlüsselfaktor zum Schutz vor Krankheiten und Krebs bei Hundertjährigen beitragen (Salvioli *et al.*, 2009). *TP53* wiederum ist in ein komplexes

Netzwerk von Wechselwirkungen mit *PTEN* involviert. *PTEN* ist ein wirksamer Tumorsuppressor und fördert in einem wechselseitigen Zusammenspiel die Stabilität und transkriptionelle Aktivität von *TP53*, während *TP53* die *PTEN*-Transkription verstärkt (Stambolic *et al.*, 2001; Freeman *et al.*, 2003).

1.9 *Four and a half LIM domains protein 2 (FHL2)*

Ein weiteres Gen, welches in dieser Arbeit eine hohe differentielle DNAm zwischen Alt und Jung aufwies, ist *FHL2*. *FHL2* ist ein Schlüsselregulator von intrazellulären Signaltransduktionswegen. Die *FHL2*-Expression ist bei Krebs häufig dereguliert, einschließlich Hoch- und Herunterregulierung bei verschiedenen Krebsarten (Kleiber *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die *FHL2*-Expression auf Transkriptionsebene durch *TP53* reguliert wird (Xu *et al.*, 2014). *FHL2* ist bereits als eines der am stärksten hypermethylierten Gene im höheren Alter bekannt (Habibe *et al.*, 2021, Garagnani *et al.*, 2012). Die CGI von *FHL2* ist Teil verschiedener minimierter epigenetischer CpG-Uhren, sogenannte *epigenetic clocks*, die im forensischen Bereich entwickelt wurden und für an Tatorten gefundene Spuren wie Blut, Speichel und Sperma bestimmt sind. Beispielsweise basiert die epigenetische Uhr von Zbiec'-Piekarska *et al.* auf fünf von acht CpGs, die zuvor von Hannum *et al.* identifiziert wurden, da diese den stärksten Zusammenhang mit dem Alter aufweisen (Hannum *et al.*, 2012; Zbiec'-Piekarska *et al.*, 2015). Diese epigenetische Uhr hat einen Standardfehler von 4,5 Jahren. Die mit diesen fünf CpGs assoziierten Gene sind neben *FHL2* auch *ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14*.

1.10 *Replication Protein A2 (RPA2)*

Ein weiteres Gen, das in dieser Arbeit identifiziert wurde, ist *RPA2*, manchmal auch als *RPA32* bezeichnet. *RPA2* bezeichnet eine der drei Untereinheiten des *Replication Protein A* (RPA)-Komplexes. Es ist an der chromosomalen DNA-Replikation, Reparatur und Telomererhaltung in eukaryotischen Zellen beteiligt (Fanning *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2019). Beispielsweise wird die Hyperphosphorylierung von *RPA2* an Serin 4 und Serin 8 (S4, S8) als Marker für die Aktivierung der DNA-Schadensantwort verwendet. Diese Hyperphosphorylierung führt zu einer Verzögerung des Beginns der Mitose und verhindert eine außerplanmäßige homologe Rekombination an kollabierten DNA-Replikationsgabeln (Liaw *et al.*, 2011). *RPA2* scheint auch bei menschlichen Tumoren eine Rolle zu spielen und ist daher ein vielversprechendes therapeutisches Ziel. *RPA2* zeigt eine weit

verbreitete nukleäre Expression bei mehreren Krebsarten wie Magen-, Dickdarm-, Blasen-, Eierstock- und astrozytischen Tumoren (Givalos *et al.*, 2007; Levidou *et al.*, 2010; Kanakis *et al.*, 2011).

1.11 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen in der DNAm zu untersuchen, die mit dem Alterungsprozess in Verbindung stehen und dabei Gene zu identifizieren, die einen altersabhängigen Methylierungsunterschied aufweisen, um dabei langfristig zur Entwicklung potenzieller diagnostischer Marker beizutragen und potenzielle Zusammenhänge zur altersassoziierten Tumorentstehung aufzudecken.

Dabei lagen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Welche genomweiten Unterschiede weist die DNAm zwischen jungen und alten Probanden auf?
2. Welche Gene sind besonders signifikant differenziell methyliert zwischen den Probandengruppen?
3. Führt die veränderte DNAm dieser Gene im Alter auch zu einer veränderten Genexpression?

Dazu wurde zunächst anhand der DNA-Proben von jungen und alten Probanden überprüft, welche regulatorisch relevanten CpG-Stellen im Alter signifikant unterschiedlich methyliert sind und welchen Genen sie zugeordnet sind. Die genomweite DNA-Methylierungsanalyse erfolgte dabei mit dem *Infinium® MethylationEPIC BeadChip* Array von Illumina und ergab mehrere differenziell methylierte CpG-Stellen. Die CpG-Stellen, die die auffälligste differentielle Methylierung zwischen Jung und Alt aufwiesen, wurden den dazugehörigen Genen zugeordnet. Von diesen Genen wurden rund um die CpG-Stelle Amplikons erstellt, welche einem DBS unterzogen wurden, um die Ergebnisse des *MethylationEPIC BeadChip* Arrays zu validieren. Anschließend wurde die Expression dieser Gene auf mRNA- und Proteinebene mithilfe von *Real-Time-PCR*, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und Western Blot-Analysen untersucht und überprüft, ob mit der altersassoziierten veränderten DNAm eine Veränderung der Genexpression einhergeht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Kommerzielle Kits

Tabelle 1: Verwendete kommerzielle Kits.

Bezeichnung	Firma (Sitz)
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	Zymo Research (Freiburg, Deutschland)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Infinium® Methylation EPIC BeadChip Kit	Illumina, Inc. (San Diego, USA)
MagniSort™ Human CD14 Positive Selection Kit (STEMCELL Technologies)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles)	Illumina, Inc. (San Diego, USA)
NucleoSpin® miRNA	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Pierce™ BCA™ Protein-Assay	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

2.1.2 ELISA Kits

Tabelle 2: Verwendete ELISA-Kits.

Bezeichnung	Firma (Sitz)
Human Four And A Half LIM Domains Protein 2 (FHL2) ELISA Kit	Abnova Ltd (Cambridge, UK)
Human PTEN ELISA Kit	Abcam plc (Cambridge, UK)
Human homeobox A5 ELISA Kit	MyBioSource (San Diego, CA, USA)

2.1.3 *TaqMan*[®] Gene Expression Assays

Tabelle 3: Verwendete *TaqMan*[®] Gene Expression Assays.

Zielgen	Assay ID	Firma (Sitz)
ASH1L	Hs00218516_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
AKT	Hs00178289_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
CEBPG	Hs00156454_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
DNAH9	Hs01017753_g1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
DUSP3	Hs01115776_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
HOXA5	Hs00430330_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
OTUD7A	Hs00370128_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
PMM1	Hs00160195_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
POLR2A	Hs00172187_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
PRR16	Hs00706472_s1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
PTEN	Hs02621230_s1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
RPA2	Hs00989573_g1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
RTKN	Hs00899574_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
RYR1	Hs01062613_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
TP53	Hs01034249_m1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

2.1.4 Custom TaqMan® Assays

Tabelle 4: Verwendete TaqMan® Gene Expression Assays, designt mit dem Custom TaqMan® Assay Design Tool.

Zielgen	Assay ID	Genomposition	Amplikon- größe	Firma (Sitz)
FHL2	ARZTE6C	2:105399118-105396647 GRCh38	70	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
PDE1C	AR7DR2E	7:32298771-32209489 GRCh38	65	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

2.1.5 Primer

Tabelle 5: Region-spezifische Primer, die für das Deep Bisulfite Sequencing verwendet wurden.

Zielgen	Vorwärts-Primer 5`-3`Richtung	Rückwärts-Primer 5`-3`Richtung	Firma (Sitz)
PRRT1	GTATGATTGTAG- AAAGAGT	AAAACAAAAAATT- CTAAA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
FHL2	TTTGGGAGTATAG- TAGTTAT	CACCTTACAAATATA- TCCCA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
DNAH9	GGGTTAAAGTTTTTGT- TATTTGT	ATATCTATTAAC- CTACCTCTCTTC	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
DUSP3	TTTATTATTATGGGTG- GAAGGTA	TCCCTTTCTT- TAACTAACAA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
HOXA5	AGTTTTTTTTTTGTTTT- GGG	AACTCCTATACTAA- TATCTCTAA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
RYR1	TTTTTGTAGGAGTTTG- GATA	TTCTCA- CTAACTAAAATTCC	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
ASH1L	aaaatgggtTataaagTagtgg	TCACACATCA- CAATCTAAAAAA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
PDE1C	GTTTTTAGTATTGGTTT- GGAGTT	CTACAAAACCA- ATACTAACTTA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
CADPS2	AGGTATTGTTGGTTTT- TATTGTT	ACATCTATCTTTTTT- CTTCCATC	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

Zielgen	Vorwärts-Primer 5`-3`Richtung	Rückwärts-Primer 5`-3`Richtung	Firma (Sitz)
TMTC1	gtgtaaattgtaaaat- gaaTTaag	CCCCTACTAAAACAA AATAT	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
RPA2	GTTTGTTTTTTTATA- TAGGAGG	CAAACCCCATTTA- CTAAATT	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
ASCL2	GGTTTTTGGGAGTAG- TATTT	AAAATCTTAAACCT- CACCTC	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
CEBPG	AGTTTTAAGTTATATTG- GAT	CCAAATATTTCA- CACATAAA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
DDO	TGTGTTTTGG- TATAGTGGTT	ATCCTAAATCAAAT- CACCAATA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
NWD1	GTTAAGTTGGTGTTT- TAGTGT	ACAAAAACCCTTTA- CAATATCAA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
PRR16	TGAGAGTGGTTGTTAG- TATAT	TTAATCTCAACCTCA- TAAAAACA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
RTKN	TTTAATTTGGTAAGTTT- GGTTTT	ATCAATTATAACCA- CTAAACTTAA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

2.1.6 Probenmaterial

Tabelle 6: Verwendetes Probenmaterial.

Bezeichnung	Herkunft	Nr. Zustimmung Ethikkommission
EDTA-Vollblut	Junge (zwischen 18 und 25 Jahren) und ältere (ab 75 Jahren) freiwillige Probanden aus Bekanntschaft und Klinik. Eine Tabelle mit wichtigen Daten der einzelnen Probanden ist in Tabelle 24 im Anhang zu finden	241/19

2.1.7 Antikörper, rekombinante Proteine, Peptide und Zelllysate

Tabelle 7: Verwendete Antikörper, rekombinante Proteine, Peptide und Zelllysate.

Bezeichnung	Firma (Sitz)
Anti-beta Actin antibody 1:5000	Abcam plc (Cambridge, UK)
Anti-HOXA5 antibody 1:500	Abcam plc (Cambridge, UK)
Anti-Human CD14 Antibody, Clone M5E2, PE	STEMCELL Technologies GmbH (Köln, Deutschland)
Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30, FITC	STEMCELL Technologies GmbH (Köln, Deutschland)
Anti-PTEN antibody monoclonal 1:1000	Abcam plc (Cambridge, UK)
HeLa whole cell lysate	Abcam plc (Cambridge, UK)
Recombinant Anti-FHL2 antibody 1:1000	Abcam plc (Cambridge, UK)
Recombinant Anti-RPA32/RPA2 antibody [4E4] – BSA and Azide free	Abcam plc (Cambridge, UK)
Recombinant Anti-RPA32/RPA2 antibody [EPR2876(2)] - BSA and Azide free	Abcam plc (Cambridge, UK)
Recombinant Anti-RPA32/RPA2 antibody [EPR22950-81] - BSA and Azide free 1:5000	Abcam plc (Cambridge, UK)
Recombinant Human RPA32/RPA2 pro- tein	Abcam plc (Cambridge, UK)
Replication Protein A2, 32kDa (RPA2) (C-Term) peptide	Aviva Systems Biology Corporation (San Diego, CA, USA)
Replication Protein A2, 32kDa (RPA2) (N-Term) peptide	Aviva Systems Biology Corporation (San Diego, CA, USA)
IRDye® 680RD Goat anti-Mouse 1:12000	LI-COR Biosciences Inc. (Lincoln, Ne- braska, USA)
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit 1:12000	LI-COR Biosciences Inc. (Lincoln, Ne- braska, USA)

2.1.8 Reagenzien

Tabelle 8: Verwendete Reagenzien mit Herstellerangabe.

Bezeichnung	Firma (Sitz)
5x HOT FIREPol® GC Master Mix, 1 ml	Solis BioDyne OÜ (Tartu, Estland)
Agarose DNA Grade, Electran®	Avantor (Radnor, PA, USA)
Ammoniumperoxodisulfat, ≥ 98 %, p.a., ACS	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
AMRESCO® Sodium Dodecyl Sulfate (10 % SDS), Proteomics Grade	Avantor (Radnor, PA, USA)
BD Cytifix™ Fixation Buffer	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
BD Cytometer Setup and Tracking <i>Beads</i>	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Bidestilliertes Wasser	Hauseigene Anlage
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Biotinylation Kit / Biotin Conjugation Kit (Fast, Type A) - Lightning-Link®	Abcam plc (Cambridge, UK)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Bovine Serum, Heat Inactivated	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Destilliertes Wasser	Hauseigene Anlage
DNA-Leiter, 50 bp, peqGOLD	Avantor (Radnor, PA, USA)
DNA-Leiter, Lambda DNA-HindIII Digest	New England Biolabs, Inc. (NEB) (Ipswich, MA, USA)
BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
EDTA 0,5 M pH 8,0	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Electran® for electrophoresis, TEMED	Avantor (Radnor, PA, USA)
Ethanol absolut EMPROVE®	Avantor (Radnor, PA, USA)
Glycin, PUFFERAN®, ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Bezeichnung	Firma (Sitz)
GoTaq [®] Probe qPCR Master Mix	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
Halt [™] Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Hydrochloric acid 37% AnalAR NORMA-PUR [®] Reag. Ph. Eur.	Avantor (Radnor, PA, USA)
Isopropanol (2-Propanol) 70 %	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
MagSi-NGSPREP Plus Beads	Steinbrenner Laborsysteme GmbH (Sinsheim, Deutschland)
Methanol ≥ 99.8 % AnalAR NORMA-PUR [®] Reag. Ph. Eur.	Avantor (Radnor, PA, USA)
Milchpulver, Blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid, > 99,8 %, mit Antitackmittel	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
PeqGREEN DNA/RNA Dye	Avantor (Radnor, PA, USA)
Precision Plus Protein [™] Standards; All Blue	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Laemmli SDS sample buffer, reducing (6X)	Avantor (Radnor, PA, USA)
Rotiphorese [®] 10X SDS PAGE Laufpuffer	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Rotiphorese [®] 10x TAE-Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Rotiphorese [®] 10x TBE-Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Rotiphorese [®] Gel 30 (37, 5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
BD Pharmigen [™] Stain Buffer (BSA)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Stop Solution 2N Sulfuric Acid	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)
Substrate Reagent Pack	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)
TRIS Ultra Qualität, PUFFERAN [®] , ≥ 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tween [®] 20, Ph.Eur.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Bezeichnung	Firma (Sitz)
Water, Sterile, Nuclease-free	Avantor (Radnor, PA, USA)

2.1.9 Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen mit Angabe der jeweiligen Zusammensetzung.

Bezeichnung	Reagenzien	Mengen
0,5 % SDS	AMRESCO® Sodium Dodecyl Sulfate (10 % SDS), Proteomics Grade	2 ml
	Bidestilliertes Wasser	38 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	Ammoniumperoxodisulfat, ≥ 98 %, p.a., ACS	1 g
	Bidestilliertes Wasser	10 ml
10 x TBS (Tris Buffered Saline)-Puffer für ELISA (pH 7,6)	TRIS Ultra Qualität, PUFFERAN®, ≥ 99,9 %	24 g
	Natriumchlorid, > 99,8 %, mit Antbackmittel	88 g
	Bidestilliertes Wasser	Ad 1 L
	Hydrochloric acid 37% AnalaR NORMAPUR® Reag. Ph. Eur.	pH-Wert-Einstellung
1,88 M Tris/HCl (pH 8,8)	TRIS Ultra Qualität, PUFFERAN®, ≥ 99,9 %	227,74 g
	Destilliertes Wasser	ad 1 L
	Hydrochloric acid 37% AnalaR NORMAPUR® Reag. Ph. Eur.	pH-Wert-Einstellung
0,625 M Tris/HCl (pH 6,8)	TRIS Ultra Qualität, PUFFERAN®, ≥ 99,9 %	75,71 g
	Destilliertes Wasser	ad 1 L
	Hydrochloric acid 37% AnalaR NORMAPUR® Reag. Ph. Eur.	pH-Wert-Einstellung
Blockinglösung für ELISA	1 x TBS-Puffer für ELISA	100 ml

Bezeichnung	Reagenzien	Mengen
	Bovines Serumalbumin (BSA)	1 g
Blockinglösung für Western Blot	TBS-Puffer für Western Blot	50 ml
	Tween [®] 20, Ph.Eur.	0,1 ml (0,2 %)
	Milchpulver, Blotting grade, pulv., fettarm	2,5 g (5 %)
Blottingpuffer für Western Blot	TRIS Ultra Qualität, PUFFERAN [®] , ≥ 99,9 %	3,03 g
	Glycin, PUFFERAN [®] , ≥ 99 %, p.a.	14,4 g
	Methanol ≥ 99,8 % AnalaR NORMAPUR [®] Reag. Ph. Eur.	200 ml
	Destilliertes Wasser	ad 1 L
Coatingpuffer für ELISA (sterilfiltriert)	Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	740 mg
	Sodium Carbonate (Na ₂ CO ₃)	128 mg
	Bidestilliertes Wasser	200 ml
Laufpuffer für SDS-Page	Rotiphorese 10X SDS PAGE Laufpuffer	50 ml
	Bidestilliertes Wasser	450 ml
PBS + 1 mM EDTA	DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	500 ml
	EDTA 0,5 M pH 8,0	1 ml
Probenpuffer für ELISA	Blockingpuffer für ELISA	50 ml
	Tween [®] 20, Ph.Eur.	250 µl
Separationspuffer für Monozytenseparation	DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	500 ml
	EDTA 0,5 M pH 8,0	1 ml
	HI Bovine Serum, Heat Inactivated	1 ml
Stocklösung (1) 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5)	TRIS Ultra Qualität, PUFFERAN [®] , ≥ 99,9 %	121,114 g

Bezeichnung	Reagenzien	Mengen
	Destilliertes Wasser	ad 1 L
	Hydrochloric acid 37% AnalaR NORMAPUR® Reag. Ph. Eur.	pH-Wert-Einstellung
Stocklösung (2) 1 M NaCl	Natriumchlorid, > 99,8 %, mit Antibackmittel	58,44 g
	Destilliertes Wasser	ad 1 L
TAE-Puffer (1X) für Gel- elektrophorese	Rotiphorese® 10x TAE- Puffer	100 ml
	Destilliertes Wasser	Ad 1 L
TBE-Puffer (0,5X) für Gel- elektrophorese	Rotiphorese® 10x TBE- Puffer	50 ml
	Destilliertes Wasser	Ad 1 L
TBS-Puffer für Western Blot	Stocklösung (1) 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5)	100 ml
	Stocklösung (2) 1 M NaCl	150 ml
	Destilliertes Wasser	ad 1 L
TBST-Waschpuffer für ELISA	1 x TBS-Puffer für ELISA	900 ml
	Tween®20, Ph.Eur.	450 µl
TBST-Waschpuffer für Western Blot	TBS-Puffer für Western Blot	500 ml
	Tween®20, Ph.Eur.	1 ml (0,2 %)

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Firma (Sitz)
0,2 ml Thin-walled Tube with Flat Cap	Avantor (Radnor, PA, USA)
96 Well Platte für BCA Assay: Nunc Max- iSorp™ flat-bottom, Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

Bezeichnung	Firma (Sitz)
Amersham™ Hybond™ blotting paper	Avantor (Radnor, PA, USA)
Amersham™ Protran™ Premium 0,45 µm Nitrocellulose Blotting Membrane	Avantor (Radnor, PA, USA)
S-Monovette®, 9ml K3E	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Klebefolie für BCA Assay: Nunc™ Dichtungsbänder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Kryoröhrchen, 5ml, Außengewinde, Standring	Avantor (Radnor, PA, USA)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film (PCR Compatible, DNA/RNA/RNase-free)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Pipettenspitzen, 0.1 – 10 µl	Avantor (Radnor, PA, USA)
Pipettenspitzen, 20 – 200 µl	Avantor (Radnor, PA, USA)
Pipettenspitzen, 100 – 1250 µl	Avantor (Radnor, PA, USA)
Falcon™ Rundboden-Polystyrolröhrchen, 5 ml	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Reaktionsgefäße 3810X, g-Safe®, 1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Schraubgefäße, konisch, steril, 1,5 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Schraubgefäße, konisch, steril, 2 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Safe-Lock Tubes, 2 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Spritzenfilter ROTILABO® CME, 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Falcon™ Rundboden-Teströhrchen aus Polystyrol mit Schnappverschluss und Zellsieb, 5 ml	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

2.1.11 Geräte und Apparaturen

Tabelle 11: Verwendete Geräte und Apparaturen.

Bezeichnung	Firma (Sitz)
7500 Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Black Western Blot Incubation Boxes	LI-COR Biosciences Inc. (Lincoln, Nebraska, USA)
Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
DS-11 Spectrophotometer	DeNovix Inc. (Wilmington, DE, USA)
Durchflusszytometer, BD FACS Canto™ II	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Gefrierschrank (-20 °C), Premium NoFrost	Liebherr-Hausgeräte GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
Gel-Dokumentations-System, E.A.S.Y® Doc plus	Herolab GmbH & Co. KG (Wiesloch, Deutschland)
Gelelektrophorese-Kammer	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Gel Releasers	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
HB-1000 Hybridization oven	UVP, LLC (Upland, CA, USA)
HiScan System	Illumina, Inc. (San Diego, USA)
Kühlschrank (4 °C), Gastro Line	Liebherr-Hausgeräte GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
Labortiefkühlschrank (-20 °C), Mediline Lgex 3410	Liebherr-Hausgeräte GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
Magnet, EasySep™	STEMCELL Technologies GmbH (Köln, Deutschland)
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon Instruments Inc. (Melville, NY, USA)
Mini Centrifuge ROTILABO® with butterfly rotor	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Microplate Reader EL800	BioTek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA)
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)

Bezeichnung	Firma (Sitz)
MiSeq® System	Illumina, Inc. (San Diego, USA)
Neubauer-Zählkammer, Neubauer Improved	LO-Laboroptik GmbH (Denzlingen, Deutschland)
ODYSSEY® CLx Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences Inc. (Lincoln, Nebraska, USA)
Owl Semi-Dry Blotter	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Pipetten, Reference/Research/Research Plus	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Simpli Amp™ Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Ultratiefkühlschrank UF V	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Platform Rocker, PMR-30	Avantor (Radnor, PA, USA)
Vortex-Schüttler, Lab Dancer S40	Avantor (Radnor, PA, USA)

2.1.12 Software, Programme und Datenbanken

Tabelle 12: Verwendete Software, Programme und Datenbanken.

Bezeichnung	Firma (Sitz)/Hersteller
7500 Software For 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems v.2.3	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
BD FACSDiva	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
BiSearch	Biomax Informatics AG, Planegg, Deutschland (http://bisearch.enzim.hu/)
BiQ Analyzer HT	Charité, Universitätsmedizin Berlin, AG Epigenetik
E.A.S.Y.® Win32-Software Modul A plus	Herolab GmbH & Co. KG (Wiesloch, Deutschland)
GeneCards®	Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
Image Studio™ Lite	LI-COR Biosciences Inc. (Lincoln, Nebraska, USA)
Microsoft Excel (Version Microsoft Office Professional Plus 2019)	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)

Material und Methoden

Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
RnBeads	Computational Epigenetic Groups/ Bio-conductor
UCSC Genome Browser	University of California, Santa Cruz, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Probandenakquise und Blutentnahme

Als Grundlage für die Untersuchungen dieser Arbeit diente EDTA-Blut von freiwilligen Probanden. Dabei wurden Menschen im Alter von 18 bis 25 Jahren und ab einschließlich 75 Jahren etwa 40 ml peripheres Vollblut entnommen. Menschen, bei denen im Laufe des Lebens eine Krebserkrankung diagnostiziert wurde, wurden dabei als Probanden ausgeschlossen. Ebenso wurden Probanden mit schwerwiegenden Stoffwechselerkrankungen oder Adipositas ausgeschlossen. Das Blut wurde schnellstmöglich nach der Entnahme weiterverarbeitet, in der Regel innerhalb einer Stunde.

2.2.2 Separation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus Vollblut

Zunächst wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus dem frisch entnommenen Blut isoliert, um im nächsten Schritt die Monozyten mit Hilfe sogenannter magnetischer *Beads* aus den PBMCs separieren zu können.

Um die PBMCs aus 40 ml frischem Vollblut zu isolieren, wurden zunächst 4 x 50 ml Falcons mit je 15 ml Biocoll bereitgestellt. Das Blut wurde 1:1 mit PBS + 1 mM EDTA verdünnt und dann gleichmäßig, also jeweils 20 ml des verdünnten Blutes, auf 15 ml Biocoll geschichtet. Die Proben wurden bei 1200 xg für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandene weiß-trübe Interphase enthielt die PBMCs, welche von den restlichen Bestandteilen des Blutes durch die Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt wurden. Die Interphase jedes der vier Falcons wurde mit einer 5 ml-Pipette abgenommen und in vier neue 50 ml Falcons überführt. Diese wurden mit PBS + 1 mM EDTA auf 50 ml aufgefüllt und dann bei 600 xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die entstandenen Zellpellets vereinigt und mit 20 ml PBS + 1 mM EDTA resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden 1:10 mit 450 µl Trypanblau verdünnt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt.

2.2.3 Monozytenseparation

Im nächsten Schritt wurden die Monozyten aus den PBMCs separiert, da die folgenden epigenetischen Untersuchungen nur mit der DNA und RNA der Monozyten erfolgen sollten. Dies hat den Hintergrund, dass die DNA in unterschiedlichen Zelltypen unterschied-

liche Methylierungsmuster aufweisen kann (Zhang *et al.*, 2013). Daher sollte nur ein Zelltyp verwendet werden. Monozyten sind für ein solches Vorhaben geeignet, denn sie weisen eine geringere Heterogenität als andere Immunzellen auf und exprimieren als einziger Zelltyp im peripheren Blut das Oberflächen-Protein CD14, wodurch sie zum einen leicht mit Hilfe von Antikörpern in Verbindung mit magnetischen *Beads* zu isolieren sind und zum anderen einfach durch Durchflusszytometrie nachzuweisen und auf Reinheit überprüfbar sind.

Die Zellsuspension der PBMCs wurde bei 600 xg für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Separationspuffer (100 µl pro 1×10^7 Zellen) resuspendiert und in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Anschließend wurde das *MagniSort™ Human CD14 Positive Selection Kit* (STEMCELL Technologies) zur Monozytenseparation verwendet. Dazu wurde der *EasySep™ Human CD14 Positive Selection Cocktail II* (10 µl pro 1×10^7 Zellen) zur Probe gegeben, vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die *EasySep™ Dextran RapidSpheres™* für 30 s vortexiert und zur Probe gegeben, vermischt und für 3 min bei RT inkubiert. Die Probe im Rundbodenröhrchen wurde dann mit Separationspuffer auf 2,5 ml aufgefüllt. Das Röhrchen wurde für 3 min bei RT ohne Deckel in einen *EasySep™* Magneten gesteckt. Während diesem Schritt ziehen die magnetischen *RapidSpheres* die Monozyten an die Wand des Rundbodenröhrchens, welches von dem Magnet umgeben ist. Nach der Inkubationszeit von 3 min wurde der Magnet samt Röhrchen vorsichtig in einer kontinuierlichen Bewegung invertiert, so dass der Überstand herausfloss, aber die Monozyten durch den Magneten an der Röhrchenwand haften blieben. Das Röhrchen wurde dann aus dem Magneten entfernt, wieder mit Separationspuffer auf 2,5 ml aufgefüllt und in den Magneten gesteckt. Dieser Separationsschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Separationsschritt, nachdem das Röhrchen fast ausschließlich die isolierten Monozyten enthielt, wurden die Monozyten in 3 ml PBS + 1 mM EDTA resuspendiert und in Trypanblau gezählt.

Die Monozyten wurden für eine DNA-Isolation, eine RNA-Isolation und eine Protein-Lyse aufgeteilt. Für die DNA- und RNA-Isolation wurden etwa gleich viele Monozyten verwendet, für die Protein-Lyse etwa doppelt so viele Zellen. Beispielsweise wurden bei einer Menge von 8×10^6 Monozyten jeweils etwa 2×10^6 Zellen für die DNA- und RNA-Isolation verwendet und etwa 4×10^6 Zellen für die Protein-Lyse. Von den Monozyten, deren DNA für das *Infinium® MethylationEPIC BeadChip* Array (Illumina) verwendet werden sollte, wurden außerdem 1×10^6 Zellen für eine Durchflusszytometrie verwendet.

2.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Monozyten

Im nächsten Schritt wurde die Reinheit der separierten Monozyten mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Dazu wurde ein Teil (1×10^6 Zellen) der separierten Monozyten zunächst mittels Immunfluoreszenz gefärbt, mit Formalin fixiert und dann mit einem Durchflusszytometer analysiert. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte dabei mit *Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30, FITC* (CD45-FITC, STEMCELL Technologies) und *Anti-Human CD14 Antibody, Clone M5E2, PE* (CD14-PE, STEMCELL Technologies). Bei CD45-FITC handelt es sich um einen mit Fluorescein (FITC) konjugierten Anti-Human CD45 Antikörper, der alle Leukozyten färbt, da alle Leukozyten das Oberflächenprotein CD45 exprimieren. CD14-PE ist ein mit Phycoerythrin (PE) konjugierter Anti-Human CD14 Antikörper, der nur Monozyten färbt. Schließlich wurden nur solche Proben weiterverwendet, bei denen der Monozyten-Anteil mindestens 95 % der enthaltenden Leukozyten betrug, da eine zu große Verunreinigung mit anderen Leukozyten die Ergebnisse der folgenden epigenetischen Untersuchungen verfälschen könnte.

Die Monozyten-Suspension wurde nach der Separation mit Hilfe eines Zellsiebes von Zellklumpen befreit und in ein frisches 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Die Zellsuspension im Rundbodenröhrchen wurde anschließend für 5 min bei 300 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 μ l *BD Pharmigen™ Stain Buffer* (BSA) (BD Biosciences) resuspendiert. Anschließend wurden 5 μ l CD45-FITC und 5 μ l CD14-PE zur Probe pipettiert, um die Zellen zu färben. Die Probe wurde auf Eis gestellt und für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Probe wurde anschließend zweimal mit jeweils 1 ml *Stain Buffer* gewaschen. Dazu wurde 1 ml *BD Pharmigen™ Stain Buffer* (BSA) zur Probe pipettiert, die Probe für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und der Vorgang wiederholt.

Anschließend erfolgte die Fixierung der gefärbten Monozyten, um diese bis zur durchflusszytometrischen Bestimmung für bis zu einer Woche aufbewahren zu können. Dazu wurde das Zellpellet nach dem letzten Waschschrift in 100 μ l *BD Cytifix™ Fixation Buffer* (BD Biosciences) resuspendiert, auf Eis gestellt und für 15–30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation gewaschen, indem 1 ml *BD Pharmigen™ Stain Buffer* (BSA) zur Probe pipettiert wurde und die Probe für 5 min bei 300 xg zentrifugiert wurde. Das Zellpellet wurde in 500 μ l BSA resuspendiert. Die gefärbten und fixierten Monozyten wurden bis zur Durchflusszytometrie, höchstens jedoch eine Woche, bei 4 °C und vor Licht geschützt gelagert.

Die Durchflusszytometrie erfolgte auf einem *BD FACS Canto II* (BD Biosciences). Dabei erfolgte zunächst eine Kompensation anhand von Kontrollen, die entweder nur mit CD45-FITC oder nur mit CD14-PE gefärbt waren, da sich die Fluoreszenzspektren von FITC und PE überlappen. Ohne Kompensation würde ein Teil der FITC-gefärbten Zellen auch im PE-Kanal als positiv erscheinen, was in einer falsch doppelt positiven Zellpopulation resultieren würde. Schließlich wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmessung bestimmt, wie groß der Anteil der Monozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten in der Probe ist (siehe Abbildung 4). Dazu wurde das FITC-Fluoreszenzsignal nach der Messung als Elternpopulation für das PE-Fluoreszenzsignal ausgewählt. Der Prozentsatz der Monozyten wurde nur auf die Leukozyten und nicht auf die Gesamtprobe bezogen, da eventuell in der Probe vorkommende Erythrozyten und Thrombozyten aufgrund ihrer fehlenden DNA die anschließenden epigenetischen Untersuchungen nicht verfälschen würden.

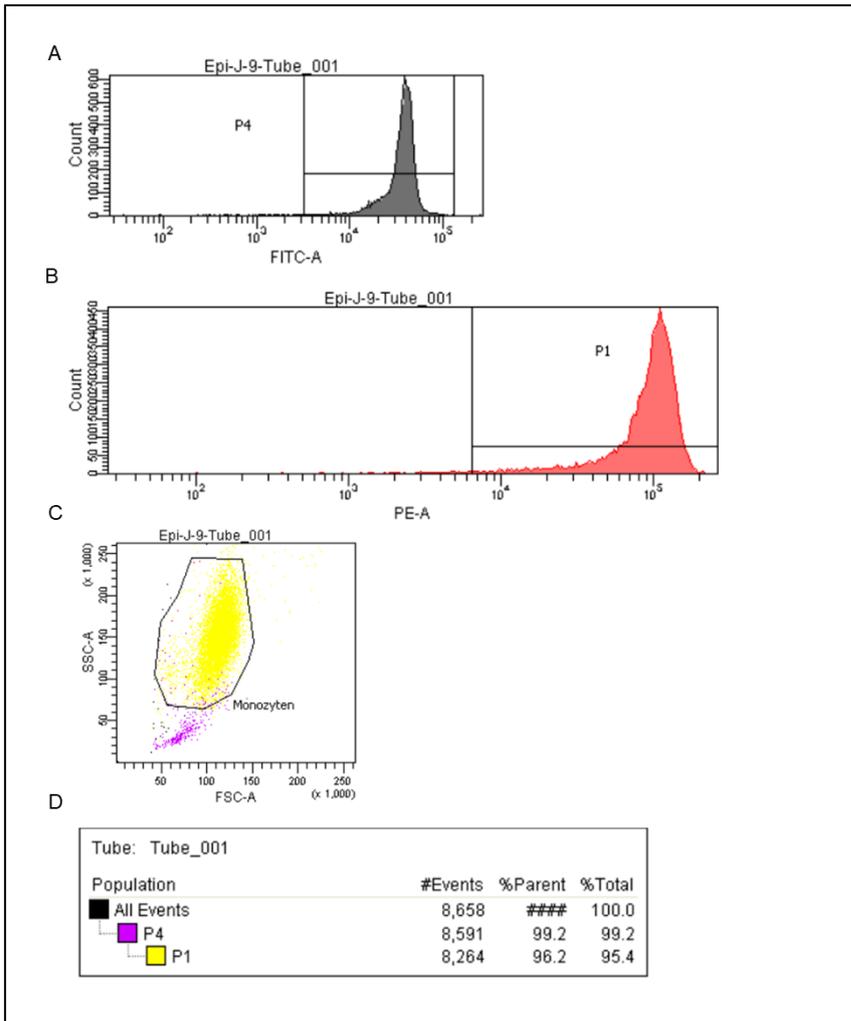


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Bestimmung der Monozyten am Beispiel der Probe Epi-J-9. (A) Häufigkeitsverteilung der gemessenen FITC-Fluoreszenzsignale. Die horizontale Achse gibt die Fluoreszenzintensität der Einzelmessungen wieder, die vertikale Achse gibt die Anzahl der gemessenen Zellen wieder. Zu sehen ist außerdem der als CD45-positiv festgelegte Bereich, der durch Schwellenmarker begrenzt wird. (B) Häufigkeitsverteilung der gemessenen PE-Fluoreszenzsignale. Gezeigt ist außerdem der als CD14-positiv festgelegte Bereich, der durch Schwellenmarker begrenzt wird. (C) Streulicht-Dot-Plot der gemessenen Zellen. Jeder Punkt entspricht einem gemessenen Ereignis. Die horizontale Achse zeigt die Intensität des Vorwärtsstreulicht (FSC), die vertikale Achse zeigt die Intensität des Seitenstreulicht (SSC). (Gelb = CD14-PE-positive Zellen, Violett = CD45-FITC-positive Zellen). (D) Das als CD45-positiv festgelegte FITC-Fluoreszenzsignal (violett) wurde als Elterngeneration für das als CD14-positiv festgelegte PE-Signal (gelb) ausgewählt. In diesem Beispiel beträgt der Anteil der Monozyten 96,2 % der Leukozyten der gemessenen Probe (Abbildung erstellt mit der Software BD FACSDiva).

2.2.5 DNA-Isolation

Aus einem Teil der separierten Monozyten, mindestens jedoch aus 1×10^6 Zellen, wurde die gDNA isoliert. Die gDNA wurde im späteren Verlauf bisulfitkonvertiert und für die Analyse der DNAm verwendet. Die DNA-Isolation wurde mit Hilfe des *NucleoSpin[®] Tissue Kits* von Macherey-Nagel durchgeführt.

Die Monozyten-Suspension wurde direkt nach der Separation in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 200 μ l *Lysis Buffer T1* aus dem Kit resuspendiert. Es wurden 25 μ l Proteinase K sowie 200 μ l *Lysis Buffer B2* hinzupipettiert und die Probe anschließend vortexiert und für 10–15 min bei 70 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 210 μ l Ethanol (100 %) zur Probe pipettiert und für 5 s vortexiert. Je Probe wurde eine Säule (*NucleoSpin[®] Tissue Column*) auf ein Sammelröhrchen gesteckt. Die Probe wurde auf die Säule aufgetragen und dann für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Das Sammelröhrchen mit dem enthaltenen Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein neues Sammelröhrchen gesteckt. Dann wurden 500 μ l *Wash Buffer BW* auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wieder auf das Sammelröhrchen platziert. Im letzten Waschschriff wurden 600 μ l *Wash Buffer B5* auf die Säule pipettiert und wiederum für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zurück in das Sammelröhrchen gesteckt. Anschließend wurde die Säulenmembran getrocknet und von restlichem Ethanol befreit, indem diese wieder für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert wurde. Um die an der Säule gebundene DNA zu eluieren wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und je nach eingesetzter Monozytenanzahl 30–40 μ l *Elution Buffer BE* direkt auf die Säule pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 min bei RT wurde die Probe dann für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert.

Die eluierte gDNA wurde anschließend mit Hilfe eines Spektrophotometers vermessen, um die Reinheit und die Konzentration zu bestimmen. Das Eluat wurde bis zur Bisulfit-Konversion bei –20 °C gelagert.

2.2.6 RNA-Isolation

Aus einem Teil der separierten Monozyten, mindestens jedoch aus 1×10^6 Zellen, wurde die RNA mit Hilfe des *NucleoSpin[®] miRNA Kits* von Macherey-Nagel isoliert. Die RNA

wurde im späteren Verlauf zu cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben, um anschließend mit Hilfe einer quantitativen *Real-Time* PCR (qRT-PCR) die mRNA-Expression von ausgewählten Genen zu untersuchen.

Die Monozyten-Suspension wurde direkt nach der Separation in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 300 µl *Lysis Buffer ML* aus dem Kit resuspendiert und anschließend vortexiert. Das Lysat wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Um die RNA-Isolation fortzusetzen, wurde das Lysat bei RT aufgetaut und anschließend für zusätzliche 5 min bei RT inkubiert. Pro Probe wurde ein *NucleoSpin*[®] Filter in ein 2 ml Sammelröhrchen mit Deckel gesteckt. Das Lysat wurde auf die Filtersäule pipettiert und für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Wenn im Durchfluss ein Pellet sichtbar war, wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der *NucleoSpin*[®] Filter wurde entsorgt. Anschließend wurden 150 µl Ethanol (100 %) zum homogenisierten Lysat zugegeben. Die Probe wurde direkt für 5 s vortexiert und dann für 5 min bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurde eine *NucleoSpin*[®] *RNA Column* in ein 2 ml Sammelröhrchen mit Deckel gesteckt. Die Säule wurde mit dem kompletten Lysat inklusive Präzipitate geladen und für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss, der nun die kleinen RNAs enthielt, wurde zur Seite gestellt. Die Säule wurde in ein frisches Sammelröhrchen ohne Deckel gesteckt. Auf die Säule wurde nun 350 µl *Membrane Desalting Buffer MDB* pipettiert und die Probe anschließend für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule anschließend wieder auf das Sammelröhrchen gesteckt. Dann wurden 100 µl rDNase direkt auf die Säule pipettiert und die Probe für 15 min bei RT inkubiert.

Während dieser Inkubationszeit wurde der zur Seite gestellte Durchfluss, der die kleinen RNAs enthielt, weiterverarbeitet. Dabei wurden zunächst 300 µl *Protein Precipitation Buffer MP* zum Durchfluss pipettiert und die Probe für 5 s vortexiert. Die Probe wurde für 3 min bei 11.000 xg zentrifugiert, um die restlichen Proteine zu fällen. Anschließend wurde eine *NucleoSpin*[®] *Protein Removal Column* in ein Sammelröhrchen mit Deckel gesteckt und der Überstand nach der Zentrifugation auf diese Säule pipettiert. Die Probe wurde für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert, die Säule anschließend verworfen und der

Durchfluss aufgehoben. Zum Durchfluss wurden 800 µl *Binding Buffer MX* pipettiert und die Probe für 5 s vortexiert.

Nach der 15-minütigen Inkubationszeit wurden 600 µl der Probe auf die *NucleoSpin® RNA Column* pipettiert, welche noch die großen RNAs enthielt. Die Probe wurde für 30 s bei 11.000 xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule wieder aufgesteckt. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis die Probe komplett auf die Säule geladen wurde. Die Säule enthielt nun sowohl die kleinen wie auch die großen RNAs. Zum Waschen wurden anschließend 600 µl *Wash Buffer MW 1* auf die Säule pipettiert und die Probe für 30 s bei 11.000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wieder aufgesteckt. Dann wurden 700 µl *Wash Buffer MW2* auf die Säule gegeben, die Probe wieder für 30 s bei 11.000 xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule wieder auf das Sammelröhrchen gesteckt. Für den letzten Waschschrift wurden 250 µl *Wash Buffer MW2* auf die Säule gegeben und die Probe für 2 min bei 11.000 xg zentrifugiert, um die Säule zu trocknen.

Um die RNA zu eluieren, wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Säule pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 min bei RT wurde die Probe für 30 s bei 11.000 xg zentrifugiert. Das 1,5 ml Reaktionsgefäß enthielt nun das Eluat, welches anschließend mit Hilfe eines Spektrophotometers vermessen wurde, um die Reinheit und die Konzentration zu bestimmen. Das Eluat wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.7 Protein-Isolation

Aus einem Teil der separierten Monozyten, mindestens jedoch aus 2×10^6 Zellen, wurden die Proteine in *RIPA Lysis and Extraction Buffer* (Thermo Fisher Scientific) lysiert. Diese wurden im späteren Verlauf der Arbeit verwendet, um die Expression ausgewählter Gene auf Proteinebene mittels ELISA und Western Blot Analysen zu untersuchen.

Die Monozyten-Suspension wurde dazu nach der Separation in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in RIPA Puffer resuspendiert und anschließend vortexiert. Dabei wurde pro 1×10^6 Zellen 50–100 µl RIPA Puffer verwendet. Das Lysat wurde dann 15 min auf Eis gestellt und anschließend für 15 min bei 13.500 xg zentrifugiert, wobei die Zentrifuge zuvor auf 4 °C heruntergekühlt wurde. Der Überstand enthielt nun das

Proteinlysate. Dieser wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Proteinlysate wurde mit Hilfe des *Pierce™ BCA™ Protein-Assay Kits* nach Herstellerprotokoll bestimmt.

Der BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay beruht dabei auf einer zweistufigen Reaktion, die zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt wird. Zunächst reagieren Proteine mit Kupfer(II)-Ionen in einer alkalischen Umgebung (Biuret-Reaktion) (Hoffmann & Richterich, 1970). Dabei werden die Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Die Menge an reduziertem Kupfer(I) ist dabei proportional zur Anzahl der Peptidbindungen im Protein und somit zur Proteinkonzentration. Im zweiten Schritt reagiert das Kupfer(I) mit Bicinchoninsäure (BCA). Diese Reaktion führt zur Bildung eines violetten Farbstoffs, dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann. Die Intensität der Farbe ist direkt proportional zur Menge des gebildeten Kupfer(I)-BCA-Komplexes und somit zur Proteinkonzentration in der Probe (Baur & Trümpler, 1914). Der BCA Protein Assay ermöglicht somit eine präzise Quantifizierung der Proteinkonzentration.

2.2.9 Gelelektrophorese zur Überprüfung der DNA-Integrität

Vor der Bisulfit-Konversion wurde die gDNA auf ihre Integrität überprüft. Dabei war eine dicke Bande bei etwa 23 kb zu erwarten.

Zur Anfertigung des Agarosegels wurde eine 1%ige Agarose-Lösung hergestellt. Dazu wurden 100 ml TAE-Puffer (1X) und 1 g Agarose in einem Glaskolben gemischt und für 3 min in einer Mikrowelle erhitzt. Zwischendurch wurde der Kolben aus der Mikrowelle entnommen und geschwenkt, um Blasen zu entfernen. Nachdem die Agarose-Lösung auf etwa $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt war, wurde *PeqGREEN DNA/RNA Dye* (Avantor; $6\text{ }\mu\text{l}/100\text{ ml}$ Gel) DNA-Färbemittel zugegeben und die Lösung zum Vermischen mehrmals geschwenkt. Die Agarose-Lösung wurde in einen Kunststoffschlitten gegossen, der an den beiden offenen Seiten mit Klebeband abgeklebt wurde. Anschließend wurde der Kamm eingesteckt. Sobald das Gel ausgehärtet war, wurden Klebestreifen und Kamm entfernt und das Gel im Schlitten in die Gelkammer gesetzt. Die Kammer wurde mit 1X TAE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel komplett bedeckt war.

Pro Probe wurde 300 ng gDNA verwendet. Dazu wurde jeweils 1 µl *BlueJuice™ Gel Loading Buffer* (10X) (Invitrogen) pipettiert und mit *Elution Buffer BE* aus dem *Nucleo-Spin® Tissue Kit* auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Als DNA-Leiter wurden 2 µl der *Lambda DNA-HindIII Digest* (New England Biolabs) verwendet und 1 µl *BlueJuice™ Gel Loading Buffer* (10X) sowie 7 µl *Elution Buffer BE* hinzupipettiert. Nachdem die Proben auf das Gel geladen wurden, wurde die Gelelektrophorese bei 75 V für 1 h durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe eines Gel-Dokumentations-Systems dokumentiert, wobei die Software *E.A.S. Y® Win32-Software Modul A plus* verwendet wurde.

Abbildung 5 zeigt die gelelektrophoretische Trennung zur Überprüfung der Integrität der gDNA, die aus den Monozyten der acht Probanden isoliert wurde.

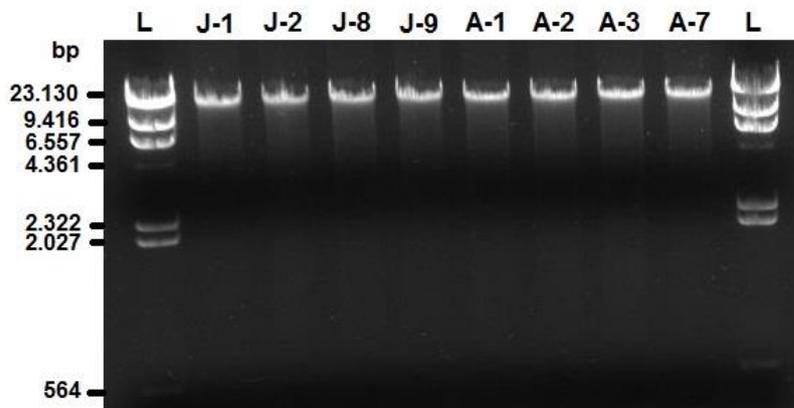


Abbildung 5: Gelelektrophoretische Trennung der gDNA nach Silika-basierter Isolation aus Monozyten zur Überprüfung der Integrität. Links und rechts wurde eine DNA-Leiter aufgetragen (L), zwischen den Leitern sind die acht Proben aufgetragen (J-1 bis A-7; J = „Jung“, A = „Alt“).

Es ist zu sehen, dass alle Proben eine distinkte Bande bei etwa 23 kb zeigen. Intakte doppelsträngige gDNA hat eine Größe von etwa 23 kb (Georgiou & Papapostolou, 2006), somit deuten die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Trennung auf eine intakte gDNA hin, die sich somit für die darauffolgenden Analysen eignet.

2.2.10 Bisulfit-Konversion

Um die DNAm im Rahmen der folgenden epigenetischen Untersuchungen zu bestimmen, ist eine Bisulfit-Konversion der DNA-Proben notwendig. Dabei handelt es sich um eine biochemische Methode, bei der die gDNA mit Natriumbisulfit behandelt wird. Durch die Bisulfit-Reaktion werden unmethylierte Cytosine zu Uracilen konvertiert, während

5-Methylcytosin nicht mit Bisulfit reagiert. Die Bisulfit-Konversion erfolgte mit Hilfe des *EZ DNA Methylation-Gold™ Kits* (Zymo Research).

Pro DNA-Probe wurden 500 ng DNA in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Zur Probe wurden 130 µl *CT Conversion Reagent* aus dem *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* pipettiert und die Probe durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Durch kurzes Zentrifugieren des PCR-Reaktionsgefäßes wurde sichergestellt, dass sich die Flüssigkeit komplett am Boden des Reaktionsgefäßes befindet. Das Reaktionsgefäß wurde in einen Thermocycler platziert und die folgenden Schritte durchgeführt:

1. 98 °C für 10 min
2. 64 °C für 2,5 h
3. 4 °C Lagerung bis zu 20 h

Nachfolgend wurde pro Probe eine *Zymo-Spin IC Column* in ein Sammelröhrchen gesteckt und 600 µl *M-Bindung Buffer* auf die Säule pipettiert. Die DNA-Probe wurde dann auf die Säule pipettiert, welche schon den *M-Bindung Buffer* enthält. Der Deckel wurde geschlossen und die Säule mehrmals invertiert. Die Probe wurde für 30 s bei 14.000 xg zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun wurden 100 µl *M-Wash Buffer* auf die Säule pipettiert und für 30 s bei 14.000 xg zentrifugiert. Dann wurden 200 µl *M-Desulphonation Buffer* auf die Säule gegeben und die Probe bei RT für 15–20 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Probe wieder für 30 s bei 14.000 xg zentrifugiert. Zum Waschen wurden 200 µl *M-Wash Buffer* zur Säule pipettiert und für 30 s bei 14.000 xg zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Zum Eluieren der BS-DNA wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert, 10 µl *M-Elution Buffer* direkt auf die Säulenmatrix pipettiert und für 30 s bei 14.000 xg zentrifugiert. Die BS-DNA wurde bei –20 °C gelagert.

2.2.11 Illumina *MethylationEPIC BeadChip* Microarray

Das *Infinium® MethylationEPIC BeadChip* Array (Illumina) ist ein Microarray, das zur Analyse des Methyloms verwendet wird. Dabei kann der Methylierungsstatus von 853.307 CpG-Dinukleotiden untersucht werden, welche sich in regulatorischen Regionen wie z.B. Enhancern, Promotoren und CGIs befinden.

Die bisulfitkonvertierten DNA-Proben von vier jungen (Gruppe „Jung“) und vier alten Probanden (Gruppe „Alt“) wurden mit Hilfe des *Illumina® HiScan Systems* hinsichtlich ihres

Methyloms analysiert. Dafür wurde das *Infinium® MethylationEPIC BeadChip* Array von Illumina verwendet und nach *InfiniumHD Assay Methylation* Protokoll vorgegangen (Illumina.com). Tabelle 13 zeigt wichtige Daten zu den Probanden, deren DNA-Proben für das Microarray eingesetzt wurden.

Tabelle 13: Wichtige Daten zu den Probanden, deren BS-DNA für das *MethylationEPIC BeadChip* Array eingesetzt wurde. Die Tabelle zeigt die Bezeichnung der Proben, sowie das Alter, Geburtsdatum, Geschlecht, BMI und vorliegende klinische Diagnose der Probanden.

Probenbezeichnung	Alter	Geburtsdatum	Geschlecht	BMI	Bekannte klinische Diagnosen
Probandengruppe „Jung“					
Epi-J-1	24	14.09.1993	m	27	–
Epi-J-2	25	04.08.1992	m	24,8	Herzfehler/ Engstelle in Arterie
Epi-J-8	24	30.06.1993	m	25,6	Neurodermitis
Epi-J-9	22	01.12.1995	m	26,8	–
Probandengruppe „Alt“					
Epi-A-1	80	12.03.1938	m	26,8	–
Epi-A-2	78	30.04.1940	m	28,7	–
Epi-A-3	79	24.04.1939	m	29	–
Epi-A-7	89	02.01.2029	m	30	Altersdemenz

Zusammenfassend wurden dazu 200 ng der BS-DNA amplifiziert, enzymatisch fragmentiert, ausgefällt und resuspendiert. Die resuspendierten Proben wurden 16 h bei 48 °C auf dem *Illumina® BeadChip* hybridisiert und gewaschen. Anschließend wurde eine Einzelbasenverlängerung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs durchgeführt, sowie wiederholte Färbungen mit einer Kombination aus Biotin- und DNP-markierten Antikörpern. Die genomweite DNA-Methylierungsanalyse wurde mit Hilfe des *Illumina® HiScan Systems* am Lehrstuhl für Genetik und Epigenetik (Prof. Dr. Jörn Walter), Universität des Saarlandes, durchgeführt

2.2.12 Datensatzanalyse mit *RnBeads*

RnBeads ist ein Software-Tool für die Analyse und Interpretation von DNA-Methylierungsdaten im großen Maßstab (Assenov *et al.*, 2014). Mit dem *RnBeads*-Programm wurden die im *MethylationEPIC BeadChip* Microarray erhaltenen Daten bioinformatisch behandelt. Dabei wurde aus den gemessenen Signalen aller *Reads* eines CpGs ein mittlerer Methylierungswert berechnet, der sogenannte β -Wert. Dieser gibt das Verhältnis von methylierten zu unmethylierten CpG-Stellen an. Mit Hilfe des Programms können verschiedene Analysen durchgeführt und in Form von verschiedenen Diagrammen, Plots und Tabellen mit differentiellen Methylierungsdaten dargestellt werden. Es wurde eine paarweise Analyse durchgeführt, bei der die Methylierungswerte aller Proben miteinander verglichen wurden.

Die Daten wurden durch *RnBeads* außerdem einer referenzfreien und einer referenzbasierten Normalisierung unterzogen, um die Zelltypzusammensetzung der eingesetzten Proben zu erhalten. Dadurch kann weitestgehend ausgeschlossen werden, dass Effekte einer differentiellen Methylierung auf Unterschieden in der Zellzusammensetzung basieren (Assenov *et al.* 2014, Aran *et al.* 2015). *RnBeads* erkennt Unterschiede in der Zellzusammensetzung und berücksichtigt diese bei der statistischen Auswertung und bei der Berechnung des p-Wertes. Abbildung 6 zeigt die berechnete Zelltypzusammensetzung der eingesetzten Proben.

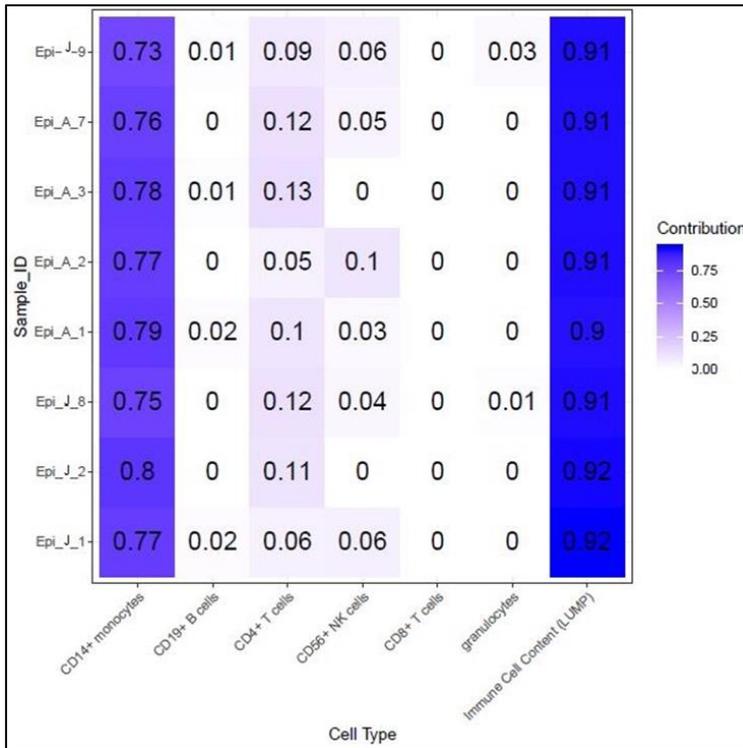


Abbildung 6: Zelltypzusammensetzung der eingesetzten Proben. Die Abbildung zeigt den Gehalt an spezifischen Immunzelltypen sowie den Gesamtgehalt an Immunzellen in jeder Probe als Dezimalzahl. Ein weißes Quadrat repräsentiert einen Anteil von 0 %, je dunkler die Farbe, desto höher ist der jeweilige Anteil.

Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, beträgt der Gesamtanteil an Immunzellen in den Proben 90–92 %. Der Anteil an CD14+ Monozyten liegt zwischen 73 % und 80 % und unterliegt somit keinen großen Schwankungen. Die Zellen, die neben den Monozyten am zweithäufigsten vertreten sind, sind CD4+ T-Zellen mit einem Anteil von 5–13 %. Die jeweiligen Anteile der Immunzellen in den Proben wurden vom *RnBeads*-Programm bei der Analyse der differentiellen DNAm berücksichtigt, indem sie in die Berechnung des p-Wertes miteinbezogen wurden.

Durch das *RnBeads*-Programm wurde eine Tabelle generiert, welche die Methylierungswerte jeder CpG-Stelle der beiden Gruppen vergleicht. Dabei wurde für jede CpG-Stelle der differentielle Methylierungswert, der fdr-normalisierte (*false discovery rate adjusted*) p-Wert, die Standardabweichung, die gemessene *Bead*-Anzahl (Abdeckung, *engl. Coverage*) sowie die Genregion angegeben. Aus dieser Tabelle wurden für die weiteren Untersuchungen annotierte Gene herausgefiltert, bei denen die Ziel-CpG-Stelle eine absolute differentielle Methylierung von mehr als 15 %, eine minimale gemessene *Coverage* von fünf und ein fdr-adjustierten p-Wert < 0,05 aufweist. Die Tabelle ist in reduzierter Ausführung im Anhang unter Angabe der CG-ID, der Chromosomenlokalisierung

der CpG-Stelle, des annotierten Gens und der Methylierungsdifferenz (MD) zwischen den Probandengruppen aufgeführt (Tabelle 26).

2.2.13 Validierung mittels *Deep Bisulfite Sequencing*

Nachdem mit Hilfe eines Microarray die DNAm genomweit untersucht wurde, können bestimmte ausgesuchte Genregionen mittels DBS validiert werden. Dabei werden in der Regel Genregionen mit CpG-Stellen ausgesucht, bei denen das Microarray eine möglichst hohe differentielle Methylierung im Vergleich zur Referenzprobe ergab.

DBS ist ebenso wie das *MethylationEPIC BeadChip* Microarray eine Methode zur Untersuchung von DNA-Methylierungsmustern. *Deep Bisulfite Sequencing* (DBS) ermöglicht die Analyse einzelner CpG-Dinukleotide über Sequenzierung und liefert somit detaillierte Informationen über die Methylierungszustände von DNA. Im Gegensatz zum Microarray, der zur genomweiten Untersuchung der DNAm eingesetzt werden kann, wird bei dem DBS ein Amplikon mit maximal 500 bp Länge, in dem die Ziel-CpG-Stelle liegt, über NGS-Technologie sequenziert. Dazu erfolgt nach erfolgreicher Bisulfit-Konversion der DNA zunächst eine PCR-Amplifikation mit Hilfe ausgewählter regionspezifischer Primer. Bei der Sequenzierung erfolgen dann laut Empfehlung mindestens 500–1000 *Reads* pro Amplikon, wodurch hochauflösendere Informationen über die DNAm im Vergleich zum Microarray geliefert werden (Gries *et al.*, 2013). Damit dient DBS als wertvolle Validierungsmethode für das *MethylationEPIC BeadChip* Microarray. Durch die Kombination beider Methoden kann somit eine zuverlässige und umfassende Aussage über die DNAm getroffen werden.

Um den Methylierungsstatus der Genregionen mit den gewünschten CpG-Stellen mittels DBS untersuchen zu können, wurden zunächst Bisulfit-Primer erstellt, mit denen die Genregion amplifiziert werden soll. Um die benötigten Bisulfit-Primer zu erstellen, wurde die Vorgehensweise nach Tusnáy *et al.* und das Online-Tool *BiSearch* verwendet (Tusnáy *et al.*, 2005). Die individuell erstellten Bisulfit-Primer wurden dann an ihrem 5´-Ende um eine Adaptersequenz ergänzt, die notwendig ist, damit die Amplikons an der Durchflusszelle des *Illumina*® *MiSeq* binden und Cluster erzeugen. Die Primer wurden entsprechend bei Thermo Fisher Scientific bestellt (vgl. Tabelle 5). Anschließend erfolgte eine PCR zur Amplifizierung der ausgewählten Genregionen. Als Probenmaterial diente die bereits mit Bisulfit behandelte DNA. Für den PCR-Ansatz wurde der *5x HOT FIREPol GC Master Mix* (Solis BioDyne) verwendet. Dieser enthält bereits eine Polymerase, MgCl₂, dNTPs und BSA.

Der PCR-Ansatz enthält folgende Komponenten pro Reaktion:

BS-DNA	2 μ l
5x HOT FIREPol GC Master Mix	6 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 μ l
Foreward-Primer (10 μ M)	0,5 μ l
Reverse-Primer (10 μ M)	0,5 μ l
H ₂ O (nukleasefrei)	19,8 μ l
Endvolumen	30 μl

Die Laufbedingungen für die PCR lauten wie folgt:

Tabelle 14: Laufbedingungen für die PCR zur Erstellung von Amplikons zur Bisulfidsequenzierung

Schritt	Initiale Denaturierung	Denaturierung	<i>Annealing</i>	Elongation	Finale Elongation
	42 Zyklen				
Temperatur	95 °C	95 °C	54 °C	72 °C	72 °C
Zeit	15 min	1 min	1 min 30 s	45 s	10 min

Um zu prüfen, ob die PCR erfolgreich war und alle Amplikons die korrekte Länge haben, wurde eine Gelelektrophorese mit den PCR-Produkten durchgeführt. Dazu wurde ein 2,5%iges Agarosegel aus Agarose und 0,5X TBE Puffer verwendet, die Laufzeit betrug 1,5–2 h unter einer angelegten Spannung von 50 V. Als DNA-Farbstoff diente *peqGREEN* (6 μ l/100 ml Gel). Als Probenmaterial wurden jeweils 5 μ l der PCR-Produkte zusammen mit jeweils 1 μ l *BlueJuice Gel Loading Buffer* verwendet. Anhand einer Leiter (0,05–1,0 kb *PeQ*, Avantor) konnten anschließend die Proben ihrer Größe zugeordnet und so kontrolliert werden.

Wenn eine Bande nicht zu sehen war und folglich die PCR für die jeweilige Probe nicht erfolgreich war, wurde die PCR mit veränderten Bedingungen wiederholt. Die PCR zeigte dann meist Erfolg, wenn die Annealingtemperatur von 54 °C auf 58 °C angehoben wurde und/oder die Elongationszeit von 45 s auf 1 min 30 s verlängert wurde.

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte aufgereinigt, um Primer- und Enzymreste zu entfernen. Bei einer Aufreinigung mit magnetischen Kugeln, sogenannten *Beads*, bindet die DNA direkt an der Oberfläche der Kugeln, während die sonstigen Bestandteile in der Lösung verbleiben und ausgewaschen werden. Zur Aufreinigung der synthetisierten PCR-Produkte wurden *MagSi-NGSPREP Plus Beads* (Steinbrenner) verwendet. Die Aufreinigung wurde laut Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die Quantifizierung der DNA-Konzentration erfolgte mithilfe des *Quant-iTTM dsDNA HS Assay Kits* (Thermo Fisher Scientific) und einem Qubit-Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Die Messung wurde laut den Protokollen der Hersteller durchgeführt.

Die Sequenzierung erfolgte anschließend mit dem *MiSeq* System von Illumina nach dem von Gries *et al.* veröffentlichten Arbeitsablauf (Gries *et al.*, 2013) am Lehrstuhl für Genetik und Epigenetik (Prof. Dr. Jörn Walter), Universität des Saarlandes. Um eine zuverlässige und quantitative Methylierungsanalyse auf Einzel-CpG-Ebene zu gewährleisten, wurde beim DBS eine Sequenziertiefe von bis zu 20.000 *Reads* pro Amplikon angestrebt. Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung der *BiQ Analyzer HT* Software (Charité, Universitätsmedizin Berlin, AG Epigenetik) am Lehrstuhl für Genetik und Epigenetik (Prof. Dr. Jörn Walter), Universität des Saarlandes.

2.2.14 Umschreibung von RNA in cDNA

Um die Genexpression der ausgewählten differentiell methylierten Gene auf mRNA-Ebene untersuchen zu können, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Vorbereitend für die qRT-PCR wurde die RNA der jeweils 30 jungen und alten Probanden zunächst in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Tabelle 24 im Anhang zeigt Daten zu den Probanden, deren RNA-Proben für die cDNA-Umschreibung eingesetzt wurden.

Dazu wurde die Konzentration der RNA-Proben nach dem Auftauen mit Hilfe eines Spektrophotometers erneut vermessen. Dann wurde das Probenvolumen berechnet, welches bei der cDNA-Synthese eingesetzt werden muss, um später eine cDNA-Konzentration von 50 ng/µl zu erhalten. Anschließend wurde ein Mastermix-Ansatz mit Hilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific) erstellt. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

10X RT Buffer	2 µl
10X RT Random Primers	2 µl
25X dNTP Mix	0,8 µl
MultiScribe® Reverse Transcriptase	1 µl
Endvolumen	5,8 µl

Der PCR-Ansatz wurde in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen wie folgt pipettiert und anschließend resuspendiert:

Mastermix-Ansatz (siehe oben)	5,8 µl
Probanden-RNA	Zuvor berechnete Menge
Nukleasefreies Wasser	Ad 20 µl
Endvolumen	20 µl

Bei jedem PCR-Durchlauf wurde außerdem jeweils eine noRT-Kontrolle (no RNA template-Kontrolle) als Negativkontrolle erstellt, bei der nukleasefreies Wasser statt RNA in den Ansatz pipettiert wurde. Die PCR-Ansätze in den 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen wurden kurz bei 6000 rpm zentrifugiert und dann in einen Thermocycler eingesetzt. Das Programm zur Umschreibung von RNA in cDNA war wie folgt programmiert:

Tabelle 15: Ablauf der cDNA-Synthese im Thermocycler.

	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4	Deckel	Volumen
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C	105 °C	20 µl
Zeit	10 min	2 h	5 min	<i>Infinite hold</i>		
Wiederholung	1X	1X	1X	1X		

Die cDNA (50 ng/µl) wurde anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.15 qRT-PCR zur Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene

Mit der zuvor umgeschriebenen cDNA der beiden Probandenkollektive wurde die mRNA-Expression der ausgewählten Gene mittels qRT-PCR und mit Hilfe von entsprechenden *Gene Expression Assays* (vgl. Tabelle 3 und Tabelle 4) untersucht.

Für eine relative Quantifizierung der Zielgene ist die Durchführung eines zusätzlichen *Gene Expression Assays* für ein sogenanntes *Housekeeping-Gen* unerlässlich (Rubie *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde das *Housekeeping-Gen DNA-gerichtete RNA-Polymerase II Untereinheit A (POLR2A)* ausgewählt. *POLR2A* dient als Referenzgen, da es in Monozyten unabhängig von Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird und somit genutzt werden kann, um Messungen der Genexpression zu normalisieren (Eisenberg und Levanon, 2003; Brunssen *et al.*, 2017).

Zunächst wurde ein Mastermixansatz aus *Gene Expression Master Mix* (GE-Master Mix), *Gene Expression Assay* (GE-Assay) des jeweils zu untersuchenden Gens und nukleasefreiem Wasser vorbereitet. Der Mastermixansatz wurde zusammen mit der jeweiligen cDNA in 1,5 ml Reaktionsgefäßen pipettiert. Das pipettierte Volumen pro Reaktionsgefäß ergab sich dabei wie folgt:

GE-Master Mix	21 µl
GE-Assay	2,1 µl
Nukleasefreies Wasser	16,8 µl
cDNA	2,1 µl
Endvolumen	42 µl

Es wurden außerdem zwei Negativkontrollen erstellt. Bei der ersten Negativkontrolle wurde eine noRT-Kontrolle anstatt cDNA in den Ansatz pipettiert, bei der zweiten Negativkontrolle wurde nukleasefreies Wasser anstatt cDNA verwendet.

Als *Stock-Standard* (100 ng/µl) wurde eine zuvor in großem Volumen von RNA in cDNA umgeschriebene Probandenprobe verwendet. Es wurden vier Vorverdünnungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen angesetzt, indem der Stock Standard mit nukleasefreiem Wasser verdünnt wurde (siehe nachfolgende Tabelle 16).

Tabelle 16: Zusammensetzung der Vorverdünungen für die Standardreihe der qRT-PCR.

Vorverdün- nung (VVD)	Verdünntes Volumen (µl)	Volumen Wasser (µl)	Volumen insgesamt (µl)	Endkonzentra- tion (ng/µl)
#1	5 (aus Stock)	5	10	50
#2	1 (aus Stock)	9	10	10
#3	1 (aus VVD #1)	9	10	5
#4	1 (aus VVD #2)	9	10	1

Es wurde eine Standardreihe aus sechs Standards erstellt. Dazu wurden zunächst jeweils der *Stock*-Standard und die Vorverdünungen mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen pipettiert. Anschließend wurde ein Maternmixansatz hinzupipettiert, der sich wie folgt zusammensetzte:

GE-Master Mix	21 µl
GE-Assay	2,1 µl
Endvolumen/ Standardprobe	23,1 µl

Der Pipettieransatz für die Standardreihe ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 17: Pipettierschema für die Standardreihe der qRT-PCR.

Stan- dard (STD)	Verdünntes Volumen (µl)	Volumen Wasser (µl)	Volumen Mastermix- ansatz (µl)	Volumen insge- samt (µl)	Endkon- zentration (ng/µl)
#1	9,45 (aus Stock)	9,45	23,1	18,9	22,5
#2	2,1 (aus Stock)	16,8	23,1	18,9	5
#3	2,1 (aus VVD #1)	16,8	23,1	18,9	2,5
#4	5,25 (aus VVD #2)	13,65	23,1	18,9	1,25
#5	2,1 (aus VVD #3)	16,8	23,1	18,9	0,25
#6	2,1 (aus VVD #4)	16,8	23,1	18,9	0,05

Alle Proben und Standards in den 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden vortexiert und abzentrifugiert. Anschließend wurde eine PCR-Platte vorbereitet und je 20 µl Volumen pro *Well* pipettiert. Alle Proben, Standards und Kontrollen wurden dabei in Duplikaten auf die Platte pipettiert. Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen, für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und dann in einem *7500 Real Time PCR System* (Thermo Fisher

Scientific) vermessen. Dazu wurde die in Tabelle 18 **Tabelle 18** aufgeführte Programmierung verwendet.

Tabelle 18: Programmierung des 7500 Real Time PCR Systems für die qRT-PCR.

Schritt	UDG Inkubation	Enzyme Activation	PCR	
	HOLD	HOLD	Cycle (40 Cycles)	
			Denature	Anneal/Extend
Temperatur	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Zeit	2 min	10 min	15 sec	60 sec

Die erzielten Ergebnisse der qRT-PCR wurden auf Basis der relativen *Quantity*-Werte (Qty) ausgewertet. Die *Quantities* wurden mit Hilfe der Software des *7500 Real-Time PCR Systems* nach der relativen Standardkurvenmethode nach Livak und Schmittgen bestimmt (Livak & Schmittgen, 2001).

Da die *Quantities* als Doppelbestimmung gemessen wurden, wurde das arithmetische Mittel (MW) berechnet. Dieses wurde dann in Relation zur gemessenen Expression des *Housekeeping*-Gens *POLR2A* gesetzt, wie in Formel 1 dargestellt.

Formel 1: Berechnung der relativen Zielgenexpression.

$$\frac{Qty (MW) Zielgen}{Qty (MW) POLR2A}$$

2.2.16 Proteinbestimmung mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Um die Genexpression auf Proteinebene zu bestimmen, wurden verschiedene ELISA Kits verwendet (vgl. Tabelle 2). Ein ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren für Proteine, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht (Lequin, 2005). Die Durchführung erfolgte jeweils wie im beigelegten Protokollheft vorgegeben. Die Extinktion wurde jeweils bei 450 nm auf einem *Microplate Reader EL800* (BioTek Instruments) gemessen. Für das Protein RPA2 wurde selbst ein Sandwich-ELISA etabliert. Die Etablierung und Durchführung wird nachfolgend erläutert.

Für die Etablierung wurden verschiedene Antikörper als Primär- und Sekundärantikörper sowie verschiedene Proteine bzw. Peptide als Standard auf ihre Tauglichkeit im ELISA getestet. Dabei handelte es sich um die Antikörper *Rabbit monoclonal [EPR2876(2)] to RPA32/RPA2* (Abcam), *Rabbit monoclonal [EPR22950-81] to RPA32/RPA2* (Abcam) und *Rat monoclonal [4E4] to RPA32/RPA2* (Abcam). Bei denen für den Standard geprüften Peptiden und Proteinen handelt es sich um das rekombinante Protein *Recombinant Human RPA32/RPA2 protein* (Abcam) sowie um die Peptide *Replication Protein A2, 32kDa (RPA2) (N-Term) peptide* (Aviva Systems Biology) und *Replication Protein A2, 32kDa (RPA2) (C-Term) peptide* (Aviva Systems Biology).

Die Antikörper, die als Sekundärantikörper getestet wurden, wurden zuvor mit Hilfe des *Biotinylation Kit / Biotin Conjugation Kit (Fast, Type A) - Lightning-Link®* (Abcam) einer Biotinylierung unterzogen. Bei diesem Vorgang wird Biotin kovalent an die Antikörper gebunden und dient später einer Biotin-vermittelten Signalverstärkung, indem Streptavidin nicht-kovalent an Biotin bindet.

In mehreren Durchläufen wurden verschiedene Kombinationen und Konzentrationen der Antikörper, Proteine und Peptide sowie verschiedene Inkubationszeiten getestet. Die beiden Peptide erwiesen sich als nicht geeignet für diesen ELISA, da in jeglicher Konzentration und Kombination mit den verschiedenen Antikörpern eine Extinktion erreicht wurde, die keinen Unterschied zum Blank zeigte.

Zuletzt erwies sich eine Kombination des Antikörpers *Rat monoclonal [4E4] to RPA32/RPA2* als Primärantikörper, des rekombinanten Proteins *Recombinant Human RPA32/RPA2 protein* und des Antikörpers *Rabbit monoclonal [EPR2876(2)] to RPA32/RPA2* als Sekundärantikörper als geeignet.

Nach erfolgreicher Etablierung wurde der ELISA für das Protein RPA2 wie folgt durchgeführt:

Zuerst wurde der Primärantikörper in *Coating*-Puffer verdünnt, so dass eine Konzentration von 1,5 µg/ml erreicht wurde. Von diesem verdünnten Primärantikörper wurden 100 µl in jedes *Well* einer *Nunc MaxiSorp™ 96-Well*-ELISA-Platte (Invitrogen) pipettiert. Nach einer Inkubation für 1 h bei RT wurde die Platte dreimal mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 200 µl Blockinglösung in jedes *Well* pipettiert, die Platte für 45 min bei RT inkubiert und dann dreimal mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden der Standard und die Proben angesetzt. Bei den Proben handelte

es sich um isoliertes Gesamtprotein aus Monozyten, lysiert in RIPA-Puffer. Diese wurden in einem Verhältnis von 1:6 in Probenpuffer verdünnt. Als Standard wurde das Rekombinante RPA2 Protein verwendet. Die Standardreihe wurde wie folgt angesetzt:

Ursprüngliche Konzentration Standard: 5 mg/ml

Tabelle 19: Pipettierschema für die Vorverdünnung des ELISA-Standards.

Standard (STD)	Verdünntes Volumen (µl)	Volumen Probenpuffer (µl)	Volumen insgesamt (µl)	Endkonzentration (ng/ml)
Vorverdünnung (VVD)	1 (aus Stock)	249	250	2000

Tabelle 20: Pipettierschema für die Standardreihe des ELISA.

Standard (STD)	Verdünntes Volumen (µl)	Volumen Probenpuffer (µl)	RIPA-Puffer (µl)	Volumen insgesamt (µl)	Endkonzentration (ng/ml)
#1	12,5 (aus VVD)	404	83	500	50
#2	250 (aus STD #1)	208	42	500	25
#3	250 (aus STD #2)	208	42	500	12,5
#4	250 (aus STD #3)	208	42	500	6,25
#5	250 (aus STD #4)	208	42	500	3,125
#6	250 (aus STD #5)	208	42	500	1,56
#7	250 (aus STD #6)	208	42	500	0,78
Blank	0	208	42	250	0

Die angesetzten Proben, die Standardreihe und der Blank wurden nun in Duplikaten auf die Platte pipettiert, wobei jeweils ein Volumen von 100 µl pro *Well* pipettiert wurde. Die Platte wurde über Nacht bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Biotin-konjugierte Sekundärantikörper in Probenpuffer verdünnt, so dass eine Konzentration von 1,5 µg/ml erreicht wurde. Von dem verdünnten Sekundärantikörper wurden 100 µl in jedes *Well* der Platte pipettiert. Nach einer Inkubation für 1 h bei RT im Dunkeln wurde die Platte dreimal mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das Streptavidin-HRP (R&D Sys-

tems) nach Herstellerangabe 1:200 in Probenpuffer verdünnt und 100 µl pro *Well* pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT im Dunkeln wurde die Platte dreimal mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurde das Substratreagens (R&D Systems) nach Herstellerangabe angesetzt, wobei beide beiliegenden Lösungen in gleichen Volumenmengen miteinander vermischt wurden. Von der angesetzten Substratlösung wurden 100 µl pro *Well* pipettiert und die Platte für 25–30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Inkubationszeit hat sich hierbei nach der Intensität der Farbentwicklung gerichtet, die in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur schwanken kann. Zum Abstoppen der Enzym-Substrat-Reaktion wurden 50 µl *Stop Solution* (R&D Systems) in jedes *Well* pipettiert. Die Extinktion wurde unmittelbar nach dem Abstoppen bei 450 nm auf einem *Microplate Reader EL800* (BioTek Instruments) gemessen.

2.2.17 Proteinbestimmung mittels Western Blot

2.2.17.1 Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden ein 5%iges Trenngel und ein 10%iges Sammelgel angesetzt. Tabelle 21 zeigt das Pipettierschema für die zwei Gele. Der Bereich der Proteinauftrennung liegt bei 16 bis 70 kDa.

Tabelle 21: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel mit verschiedenen Anteilen Acrylamid.

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid-Stammlösung (30 %) (Rotiphorese® Gel 30 (37, 5:1))	0,33 ml	2 ml
0,625 M Tris/HCl (pH 6,8)	0,4 ml	/
1,88 M Tris/HCl (pH 8,8)	/	1,2 ml
0,5 % SDS	0,4 ml	1,2 ml
Bidestilliertes Wasser	0,87 ml	1,6 ml
TEMED	2 µl	5 µl
10 % APS	10 µl	30 µl

2.2.17.2 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese

Nach der Polymerisation des Gels wurde dieses zusammen mit einem gegenüberliegenden Pufferdamm im vertikalen Elektrophoresesystem befestigt. Der SDS-Puffer wurde sowohl zwischen Pufferdamm und Gel, sowie außerhalb eingefüllt. Die Proben, welche

vorher mit Lämmli SDS Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 97 °C erhitzt wurden, wurden in die Probenaschen eingefüllt. Als Protein-Leiter diente die *Precision Plus ProteinTM Standards; All Blue* (Bio RAD). Die Gelelektrophorese wurde für etwa 1,5 h betrieben, wobei am Anfang eine Spannung von 140 V und eine Stromstärke von 15 mA angelegt wurde. Nachdem die Bromphenolblaufront komplett in das Trenngel übergelaufen war, wurde die Stromstärke nach und nach erhöht auf 23 mA.

2.2.17.3 Blotting

Nachdem die gelelektrophoretische Trennung der Proteine erfolgt ist, wurde das Gel aus den Glasplatten entfernt und für 5 min in Blottingpuffer inkubiert. Danach wurden drei Filterpapiere in Blottingpuffer getränkt und auf die Kathodenseite eines *Owl Semi-Dry Blotters* (Thermo Fisher Scientific) gelegt. Darauf wurde das Gel mit den aufgetrennten Proteinen kopfüber gelegt, gefolgt von einer Nitrozellulosemembran, auf die die Proteine übertragen werden sollen. Abschließend wurden wieder drei in Blottingpuffer getränkte Filterpapiere auf die Membran gelegt. Die Oberseite der Blottingkammer, welche die Anode beinhaltet, wurde aufgelegt und festgeschraubt. Anschließend wurde eine Spannung von 19 V und eine Stromstärke von 79 mA für 40–45 min angelegt.

2.2.17.4 Blocken und Antikörperbehandlung

Nach dem Blotten wurde die Membran aus dem *Owl Semi-Dry Blotter* mit der Pinzette entnommen in eine Inkubationsbox gelegt. In die Inkubationsbox wurde Blockinglösung mit einem 5%igen Milchpulveranteil gegeben. Die Nitrocellulosemembran wurde 45–60 min bei Raumtemperatur unter stetigem Schwenken auf einem Schüttler in der Blockinglösung inkubiert.

Zum Ansetzen der Primärantikörperlösung wurde je nach Verdünnung ein berechnetes Volumen des Antikörpers in 10 ml Blockinglösung pipettiert. Die jeweiligen verwendeten Verdünnungen der Antikörper können der Tabelle 7 in Kapitel 2.1.7 entnommen werden. Die Inkubation mit der Primärantikörperlösung erfolgte entweder 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 min mit TBST-Waschpuffer gewaschen.

Anschließend wurde der Sekundärantikörper angesetzt, dieser wurde ebenso in 10 ml Blockinglösung verdünnt. Die Verdünnungen der Sekundärantikörper können der Tabelle 7 entnommen werden. Die Sekundärantikörperlösung wurden zur Membran in eine Inkubationsbox gegeben. Die Inkubation erfolgte bei RT unter stetigem Schwenken und

lichtgeschützt für 45–50 min. Anschließend wurde die Membran erneut mit TBST-Waschpuffer dreimal für 5 min gewaschen.

Die Messung wurde am *ODYSSEY*[®] *CLx* (LI-COR) durchgeführt.

2.2.18 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der erhobenen Daten aus dem DBS, der qRT-PCR sowie der ELISA-Messungen erfolgten mit Microsoft Excel (Version Microsoft Office Professional Plus 2019). Zur Analyse signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde ein ungepaarter *Student's t*-Test verwendet. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet und in den Abbildungen gekennzeichnet. Alle Werte wurden als Mittelwert (MW) \pm *standard error of the mean* (SEM) angegeben. Die biologischen Replikate (n) sind in der jeweiligen Bildunterschrift angegeben.

3 Ergebnisse

Einige Teile der folgenden Abschnitte (Kapitel 3 „Ergebnisse“ bis einschließlich Kapitel 4 „Diskussion“) wurden vorab in folgender Publikation veröffentlicht:

Feiner, L., Tierling, S., Holländer, S., Glanemann, M. & Rubie, C. (2021). An aging and p53 related marker: *HOXA5* promoter methylation negatively correlates with mRNA and protein expression in old age. *Aging* (Albany NY). 2021 Feb 5;13(4).

3.1 Genomweite DNA-Methylierungsmuster der Proben

Um die DNA-Methylierungsmuster in den Monozyten der Probanden genomweit zu untersuchen, wurde die gDNA zunächst mit Natriumbisulfit behandelt und anschließend auf dem *Infinium*[®] *MethylationEPIC BeadChip* Microarray von Illumina hybridisiert. Die gDNA der Monozyten stammt dabei aus jeweils einer Kohorte junger (Durchschnittsalter: 23,8 Jahre, Altersspanne: 22–25 Jahre) und älterer Probanden (Durchschnittsalter 81,5 Jahre, Altersspanne: 78–89 Jahre). Die gewonnenen Methylierungsdaten des *MethylationEPIC BeadChip* Arrays wurden mit Hilfe des *RnBeads*-Programms ausgewertet und normalisiert.

Basierend auf definierten Kriterien, die eine gemessene *Coverage* von mindestens fünf und einen p-Wert $< 0,05$ umfassten, ergab die Auswertung durch die *RnBeads*-Software 1481 differentiell methylierte CpGs (DMCG). Diese wurden mit der hg19 Annotation der ENCODE-Datenbank (The ENCODE Project Consortium, 2012) abgeglichen und den assoziierten Genen sowie den jeweiligen Genregionen zugeordnet, in denen sich die CpG-Stellen befinden.

Auf der Grundlage der aus dem *RnBeads*-Softwarepaket abgeleiteten Methylierungswerte (β -Werte) wurde ein Streudiagramm erstellt, das die mittleren Methylierungswerte jeder analysierten CpG-Stelle zwischen der jungen und der alten Kohorte vergleicht. Zusätzlich wurde der Korrelationskoeffizient bestimmt. Das Streudiagramm ist in Abbildung 7 dargestellt. Ein Punkt im Streudiagramm repräsentiert durch die x-Koordinate den mittleren Methylierungswert des jungen Kollektivs und durch die y-Koordinate den mittleren Methylierungswert des älteren Kollektivs der jeweiligen CpG-Stelle.

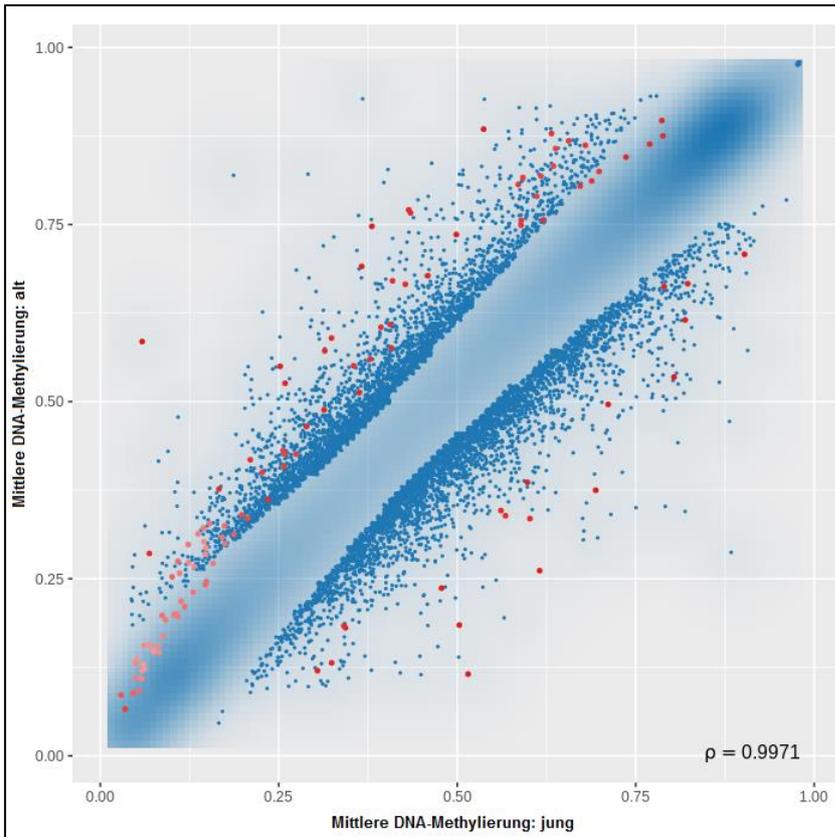


Abbildung 7: Streudiagramm basierend auf den β -Werten der analysierten CpG-Stellen der jungen und alten Probanden. Verglichen wird die mittlere Methylierungsrate einzelner CpG-Stellen zwischen den beiden Probandengruppen. (rot = p-Wert < 0,05). Der Korrelationskoeffizient beträgt $\rho = 0,9971$.

Abbildung 7 kann entnommen werden, dass eine starke Korrelation zwischen den Methylierungswerten der beiden Probandengruppen gemessen wurde ($\rho = 0,9971$). Es fanden sich 1481 CpG-Stellen, die die zuvor genannten Filterkriterien erfüllten und eine signifikante MD > 5 % zwischen jungen und alten Probanden aufwiesen. Diese sind durch rote Punkte dargestellt. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die meisten DMCG (rot gepunktet) oberhalb der Korrelationsgerade liegen.

Beim Vergleich der Anzahl hypo- und hypermethylierter DMCG in der älteren Probandengruppe versus der jungen Probandengruppe stellte sich heraus, dass 1286 der 1481 DMCG (86,8 %) hypermethyliert waren, während 195 DMCG (13,2 %) bei den älteren Probanden hypomethyliert waren (Abbildung 8).

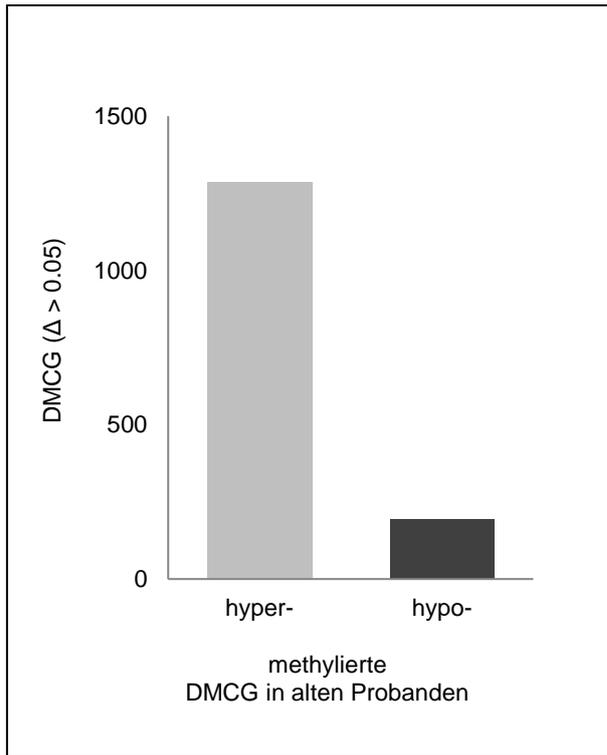


Abbildung 8: Anzahl der hyper- und hypomethylierten DMCG in alten Probanden. Es zeigen sich 1286 hypermethylierte DMCG und 195 hypomethylierte DMCG in alten Probanden im Vergleich zur jungen Probandenkohorte.

Die hypo- und hypermethylierten DMCG wurden hinsichtlich genregulatorischer Regionen, CGIs und CGI-flankierenden Regionen annotiert. Die Annotation und Verteilung der DMCG ist in Form von Kreisdiagrammen in Abbildung 9 dargestellt. Die Definitionen der Genregionen sind in Tabelle 22 aufgeführt.

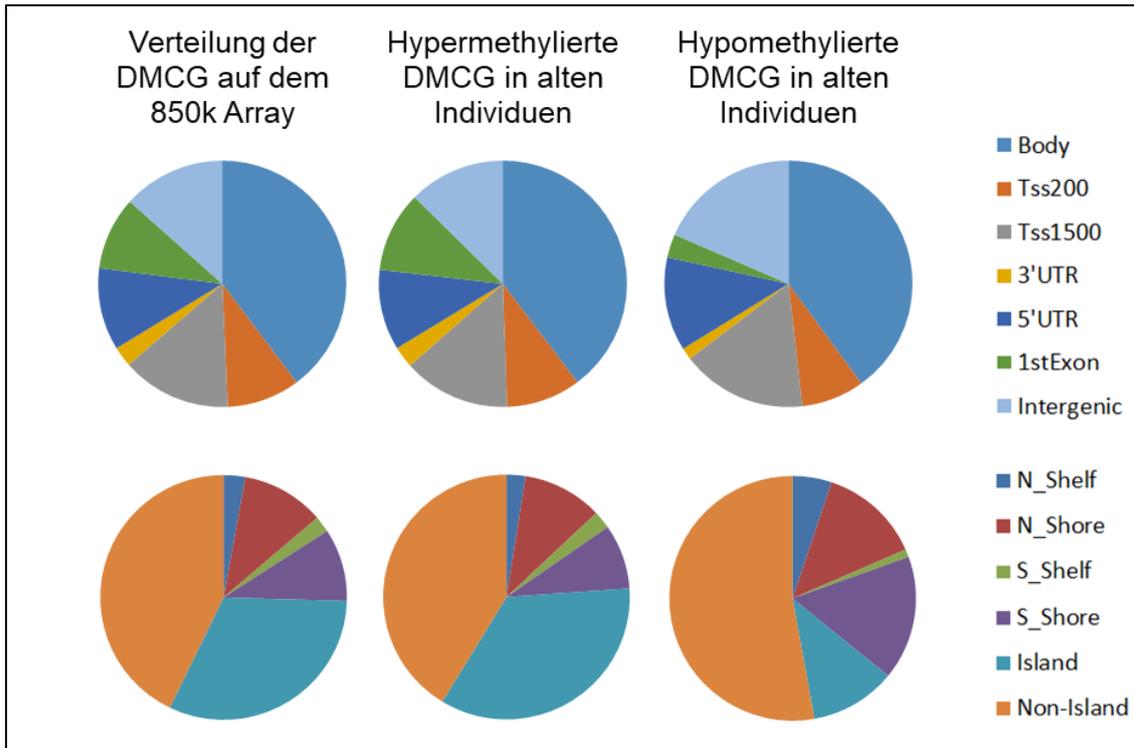


Abbildung 9: Annotation und Verteilung der DMCG. Hypo- und hypermethylierte DMCG in alten Individuen sind annotiert in Bezug auf genregulatorische Regionen (intergenische Regionen, 1. Exon, 3' und 5' untranslatierte Region (UTR), Genkörper (*Body*), Promotorbereiche: Transkriptionsstartstellen (TSS) 1500 und 200; obere Kreisdiagramme), CGIs sowie CGI-flankierende Regionen (Regionen vor (*N_Shelf*, *N_Shore*) und nach (*S_Shelf*, *S_Shore*) den CGIs; untere Kreisdiagramme) im Vergleich zur Gesamtverteilung der DMCG auf dem gesamten *MethylationEPIC BeadChip* Array (linke Tortendiagramme).

Die Annotation von hypo- und hypermethylierten CpGs in Bezug auf Genregulationsregionen ergab, dass ein Großteil der DMCG im Genkörper (*Body*) lokalisiert war, während 13,6 % der CpGs um Transkriptionsstartstellen herum lokalisiert waren, wie im oberen Feld von Abbildung 9 gezeigt. In CGIs der älteren Kohorte zeigten sich mehr hypermethylierte CpGs (27,7 %) im Vergleich zur jungen Kohorte (18,3 %), wie im unteren Bereich von Abbildung 9 dargestellt. Bei den älteren Probanden zeigten sich entsprechend auch mehr hypomethylierte CpGs, die sich in Regionen außerhalb von CGIs (*Non-Island*) befanden (Abbildung 9, unteres Feld). In Bezug auf die Lokalisierung fanden sich 589 (38,5 %) DMCG lokalisiert im *Body*, 141 (9,2 %) DMCG befanden sich zwischen 1 und 200 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstellen (TSS) und 212 (13,9 %) DMCG waren lokalisiert zwischen 1 und 1500 bp stromaufwärts der TSS. Es befanden sich 39 (2,5 %) DMCG in der 3'-UTR und 160 (10,5 %) DMCG in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR). 142 (9,3 %) DMCG befanden sich im ersten Exon, während sich (16,1 %) DMCG fanden, die keiner Transkriptionseinheit zugeordnet waren.

Tabelle 22: Nomenklatur und Definitionen für die Genregionen der CpG-Stellen.

Bezeichnung der Genregion	Definition
<i>1stExon</i>	Erstes Exon eines Gens
3`UTR	Sequenz auf der DNA, die für die 3`UTR codiert
5`UTR	Sequenz auf der DNA, die für die 5`UTR codiert
<i>Body</i>	Bezeichnet das gesamte Gen von der Transkriptionsstartstelle bis zum Ende des Transkripts
<i>Intergenic</i>	Sequenz auf der DNA zwischen zwei Genen. Gehört nicht zum transkribierten Bereich, kann aber regulatorische Elemente wie <i>Enhancer</i> enthalten.
<i>Island</i>	Kurze CpG-reiche Region mit einem CG-Gehalt von mehr als 55%
<i>Non-Island</i>	Regionen außerhalb von CGIs.
<i>S_Shore/ N_Shore</i>	Regionen mit niedrigerer CpG-Dichte, die innerhalb von 2 kb oberhalb (<i>N_Shore</i>) oder unterhalb (<i>S_Shore</i>) einer CGI liegen
<i>S_Shelve/ N_Shelve</i>	Regionen, die 2 kb außerhalb eines <i>Shore</i> liegen (<i>S_Shelve</i> : unterhalb, <i>N_Shelve</i> : oberhalb)
TSS1500	promotornahen Region bis -1500 bp vor TSS
TSS200	promotornahen Region bis -200 bp vor TSS

3.2 DMCG und assoziierte Gene

Die DMCG, die durch das *MethylationEPIC BeadChip* Microarray gefunden wurden, wurden gegen die Hg19-Annotation der ENCODE-Datenbank (Becker, 2011) abgeglichen. Auf diese Weise wurden die assoziierten Gene sowie die jeweilige Genregion, in der sich die CpG-Stellen befinden, annotiert. Eine detaillierte Tabelle mit den Positionen aller 1481 differentiell methylierten CpG-Stellen mit Angabe des zugeordneten Gens, der chromosomalen Position und der jeweiligen Genregion sowie der oben beschriebenen überlappenden DMCG befindet sich im Anhang (Tabelle 26).

Anschließend wurden 18 annotierte Gene ausgesucht, bei denen eine analysierte korrespondierende CpG-Stelle eine differentielle Methylierung von mehr als 15 %, eine gemessene *Coverage* von mindestens fünf und einen p-Wert < 0,05 aufweist. Dabei wurden Gene bevorzugt ausgewählt, deren Ziel-CpG-Stelle im Promotorbereich liegt. Die nach diesen Kriterien ausgewählten DMCG mit Angabe des korrespondierenden Gens und dessen Funktion sowie der Position der Ziel-CpG-Stelle, sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die 18 ausgewählten CpGs wurden anschließend mittels DBS validiert. Zusätzlich wurde die Genexpression der assoziierten Gene untersucht.

Tabelle 23: Ausgewählte DMCG für weiterführende Untersuchungen. Die Tabelle enthält die Positionen der DMCG mit Angabe des dort befindlichen Gens, der Genregion, der Beschreibung und Funktion des Gens laut der „*ALLIANCE of GENOME RESOURCES*“ Datenbank (Alliance Of Genome Resources, o. D.) und dem Methylierungsunterschied zwischen der jungen und alten Probandengruppe. Eine Nomenklatur für die Genregionen aus der zweiten Spalte ist in Tabelle 22 zu finden.

Gen	Position der Ziel-CpG-Stelle	Beschreibung	Tendenz der Methylierung mit zunehmendem Alter	Methylierungsdifferenz
<i>Proline Rich Transmembrane Protein 1 (PRRT1)</i>	chr6: nt32117049, <i>Body/Island</i>	Transmembranprotein und Bestandteil des äußeren Kerns des AMPAR-Komplexes	Hypermethyliert	33,9 %
<i>FHL2</i>	chr2: nt10601576, TSS200	Molekularer Transmitter, reguliert den transkriptionellen Repressor E4F1 negativ, spielt eine Rolle beim Zellwachstum	Hypermethyliert	32,5 %
<i>Dynein Axonemal Heavy Chain 9 (DNAH9)</i>	chr17: nt11608711, <i>Body</i>	Codiert für die Untereinheit der schweren Kette von axonemalem Dynein	Hypomethyliert	31,8 %
<i>Dual Specificity Phosphatase 3 (DUSP3)</i>	chr17: nt41843967, 3'-UTR	Negative Regulation von Mitgliedern der MAP-Kinase-Superfamilie (MAPK / ERK, SAPK / JNK, p38)	Hypermethyliert	29,8 %

Ergebnisse

Gen	Position der Ziel-CpG-Stelle	Beschreibung	Tendenz der Methylierung mit zunehmendem Alter	Methylierungs-differenz
<i>HOXA5</i>	chr7: nt27184737, TSS1500/ <i>Island</i>	DNA-bindender Transkriptionsfaktor. Reguliert Genexpression, Morphogenese und Differenzierung. Reguliert den Tumorsuppressor <i>TP53</i> hoch	Hypermethyliert	25,7 %
<i>Proline Rich 16</i> (<i>PRR16</i>)	Chr5: nt11979938, TSS1500/ <i>N_Shore</i>	Beteiligt an der positiven Regulierung der Zellgröße und der positiven Translation.	Hypomethyliert	24,1 %
<i>Ryanodine Receptor 1</i> (<i>RYR1</i>)	chr19: nt38943525, <i>Body</i>	Codiert für einen Ryanodinrezeptor, der in Skelettmuskeln vorkommt	Hypermethyliert	22,4 %
<i>D-Aspartate Oxidase</i> (<i>DDO</i>)	Chr6: nt11073677, TSS200	Peroxisomales Flavoprotein, das die oxidative Desaminierung von D-Aspartat und N-Methyl-D-Aspartat katalysiert. Als Cofaktor in dieser Reaktion können Flavinadenin-dinukleotid oder 6-Hydroxyflavinadenin-dinukleotid dienen.	Hypomethyliert	22,1 %
<i>ASH1 Like Histone Lysine Methyltransferase</i> (<i>ASH1L</i>)	chr1: nt15548460, <i>Body</i>	Histon-Methyltransferase, die spezifisch "Lys-36" von Histon H3 (H3K36me) methyliert	Hypermethyliert	21,9 %
<i>OTU Deubiquitinase 7A</i> (<i>OTUD7A</i>)	chr15: nt31775895, <i>Body/Island</i>	Codiert für ein Deubiquitinierungsenzym und ist ein möglicher Tumorsuppressor	Hypermethyliert	21,7 %

Ergebnisse

Gen	Position der Ziel-CpG-Stelle	Beschreibung	Tendenz der Methylierung mit zunehmendem Alter	Methylierungs-differenz
<i>Phosphodiesterase 1C</i> (<i>PDE1C</i>)	chr7: nt32339213, Tss200/ S_Shore	Zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase mit doppelter Spezifität für cAMP und cGMP, die Schlüsselregulatoren wichtiger physiologischer Prozesse sind	Hypomethyliert	21,5 %
<i>NACHT And WD Repeat Domain Containing 1</i> (<i>NWD1</i>)	Chr19: nt16830749, TSS200	Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um ein zytosolisches Protein. In einigen Prostatakrebs-Zelllinien wurde eine erhöhte Expression dieses Gens beobachtet. Die Unterdrückung der Expression dieses Gens führt zu verringerten Androgenrezeptor-Proteinspiegeln, was darauf hindeutet, dass dieses Gen möglicherweise für die Modulation der Androgenrezeptoraktivität wichtig ist.	Hypomethyliert	21,5 %
<i>Calcium Dependent Secretion Activator 2</i> (<i>CADPS2</i>)	chr7: nt12207844, <i>Body</i>	Beteiligt an der Exozytose von mit Neurotransmittern und Neuropeptiden gefüllten Vesikeln. Mutationen in diesem Gen können zur Autismus-Anfälligkeit beitragen	Hypermethyliert	20,3 %
<i>Transmembrane And Tetratricopeptide Repeat Containing 1</i> (<i>TMTC1</i>)	chr12: nt29903855, <i>Body</i>	Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums (ER), das an der zellulären Calciumhomöostase beteiligt ist	Hypermethyliert	20,1 %

Ergebnisse

Gen	Position der Ziel-CpG-Stelle	Beschreibung	Tendenz der Methylierung mit zunehmendem Alter	Methylierungsdifferenz
<i>RPA2</i>	Chr1: nt28241577, TSS1500/ S_Shore	Untereinheit des RPA-Komplexes, dieser bindet an ssDNA und bildet einen Nukleoproteinkomplex, welcher eine wichtige Rolle im DNA-Metabolismus spielt und an der DNA-Replikation, -Reparatur und -Rekombination beteiligt ist. Der RPA-Komplex schützt ssDNA auch vor Nukleasen.	Hypermethyliert	19,1 %
<i>Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 2</i> (<i>ASCL2</i>)	Chr11: nt2293211, TSS1500/ S_Shore	Gehört zur Familie der Basis-Helix-Loop-Helix (BHLH)-Transkriptionsfaktoren und aktiviert die Transkription durch Bindung an die E-Box (5'-CANNTG-3').	Hypermethyliert	18,1 %
<i>Rhotekin</i> (<i>RTKN</i>)	Chr2: nt74669375, TSS1500/ Island	Gerüstprotein, interagiert mit GTP-gebundenen Rho-Proteinen. Durch Bindung kann es die GTPase-Aktivität der Rho-Proteine unterdrücken und deren Umwandlung von der aktiven GTP-gebundenen in die inaktive GDP-gebundene Form durch RhoGAP stören. Rho-Proteine spielen eine zentrale Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen, darunter Zellteilung (Zytokinese), Genexpression, Kontraktion glatter Muskelzellen und Zellwachstum. Eine gestörte Regulation dieses Signalwegs wird mit vielen Krebsarten verbunden.	Hypomethyliert	17,0 %
<i>CCAAT Enhancer Binding Protein Gamma</i> (<i>CEBPG</i>)	Chr19: nt33863876, TSS1500/ N_Shore	Transkriptionsfaktor, der an die Promotor- und Enhancer-Regionen von Zielgenen bindet.	Hypermethyliert	16,7 %

Die in der Methylierungsanalyse gefundenen 1481 DMCG wurden außerdem mit den CpGs der Horvath *Clock* (Horvath, 2013) sowie mit einer *RnBeads*-Pipeline, bestehend aus Horvath-CpGs und zusätzlichen „Altersvorhersage“-CpGs aus verschiedenen Geweben, abgeglichen. Zehn der DMCG überschnitten sich mit den 353 CpGs der Horvath *Clock*, während 29 der gefundenen DMCG mit den 761 CpGs der *RnBeads*-Pipeline überlappten. Vier der 18 untersuchten DMCG überlappten mit einem der beiden Datensätze. Das Ziel-CpG von *FHL2* überlappte mit der Horvath *Clock*. Die Ziel-CpGs von *ASH1L*, *CADPS2* und *TMTC1* überschnitten sich mit der *RnBeads*-Pipeline. Eine detaillierte Tabelle mit den Positionen aller 1481 DMCG mit Angabe des zugeordneten Gens, der chromosomalen Position und der jeweiligen Genregion sowie der oben beschriebenen überlappenden DMCG befindet sich im Anhang (Tabelle 26).

Die mittleren DNA-Methylierungswerte der ausgewählten CpG-Stellen der jungen und der älteren Probandengruppe, die die genomweite Untersuchung mit dem *MethylationEPIC BeadChip* Microarray ergab, wurden anhand eines Säulendiagramms miteinander verglichen (Abbildung 10). Zu sehen sind die mittleren Methylierungswerte der CpG-Stellen unter Zuordnung der assoziierten Gene.

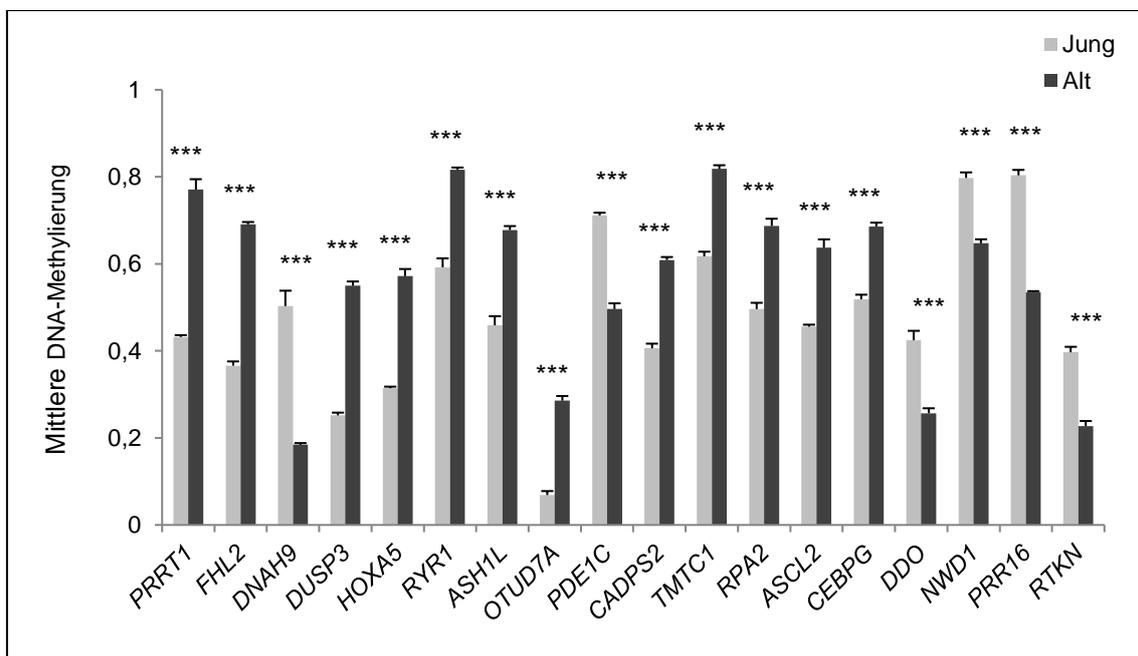


Abbildung 10: Ergebnisse des *MethylationEPIC BeadChip* Microarray. Gezeigt sind die mittleren DNA-Methylierungswerte der differentiell methylierten CpG-Stellen im jungen und alten Kollektiv unter Zuordnung zu den assoziierten Genen. Eingetragen ist außerdem der Standardfehler der Mittelwerte der jeweils vier jungen und alten Probanden sowie das Signifikanzniveau ($n = 4$; Durchschnittliches Alter der Probandengruppen: 23,8 Jahre und 81,4 Jahre; p-Wert, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Es fällt auf, dass bei 12 der 18 CpG-Stellen eine höhere Methylierung im hohen Alter vorlag. Nur bei sechs CpG-Stellen nahm die Methylierung im Alter ab.

3.3 Deep Bisulfite Sequencing der DMCG

Zur Validierung der Ergebnisse des *MethylationEPIC BeadChip* Microarrays wurde ein DBS durchgeführt. Das Probenkollektiv umfasste hierbei jeweils 20 junge und alte Probanden. Zwei DMCG konnten dem DBS nicht unterzogen werden. Für die DMCG, die den Genen *PRRT1* und *OTUD7A* zugeordnet waren, konnten keine geeigneten bzw. funktionierenden Primerpaare für die anschließende Sequenzierung erstellt werden. Die Ergebnisse des DBS sind in Abbildung 11 in Form eines Säulendiagramms dargestellt ist. Zu entnehmen sind die mittleren Methylierungswerte der CpG-Stellen unter Zuordnung der assoziierten Gene.

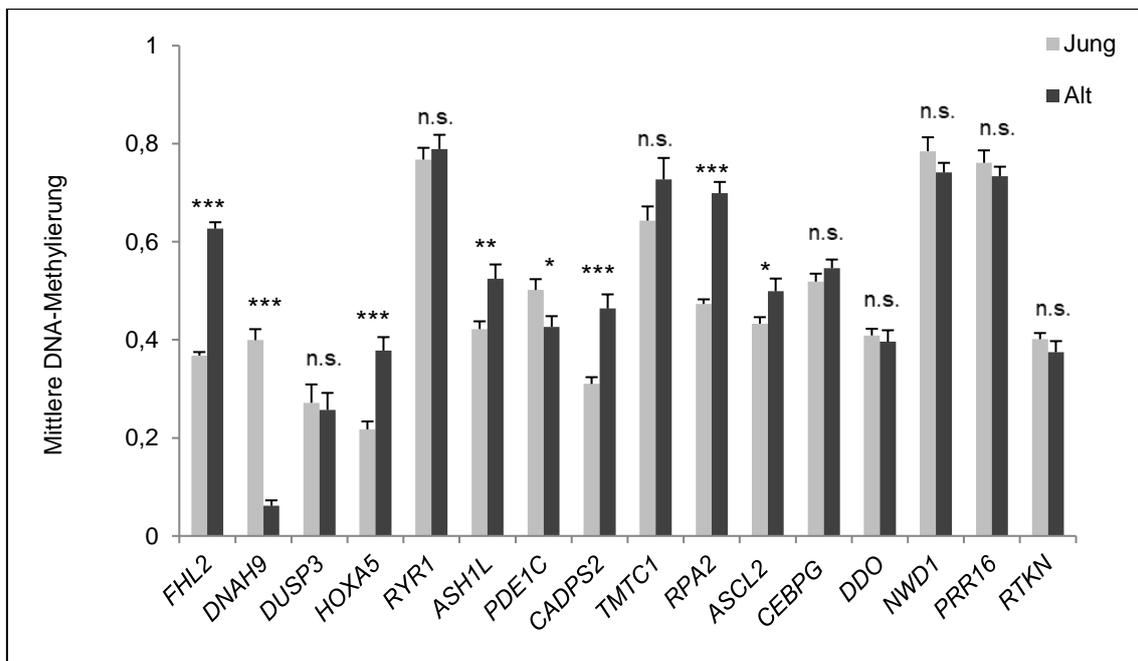


Abbildung 11: Ergebnisse des Deep Bisulfite Sequencing. Gezeigt sind die mittleren DNA-Methylierungswerte der DMCG im jungen und alten Kollektiv unter Zuordnung zu den assoziierten Genen. Eingetragen ist außerdem der Standardfehler der mittleren Methylierungswerte Probanden sowie das Signifikanzniveau ($n = 20$; Durchschnittliches Alter der Probandengruppen: 23,4 Jahre und 79,6 Jahre; p -Wert, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant).

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, wiesen acht der 16 CpG-Stellen nach der Überprüfung durch DBS nun keine signifikanten MDs mehr auf.

Neben der Tatsache, dass DBS generell genauere Ergebnisse über den Grad der DNAm liefert, wurden beim Microarray aus Kostengründen pro Probandengruppe $n = 4$ und bei der anschließenden Validierung $n = 20$ BS-DNA-Proben von Probanden untersucht. Für die Gene *FHL2*, *HOXA5*, *RPA2*, *DUSP3*, *RYR1* und *TMTC1* wurden beispielhaft die einzelnen Methylierungswerte der Probanden nach DBS in jeweils einem Streudiagramm in Abbildung 12 aufgezeigt. Die rot markierten Punkte stellen dabei jeweils die Methylierungswerte der vier jungen und vier alten Probanden dar, die ebenso für die genomweite Methylierungsanalyse via Microarray verwendet wurden.

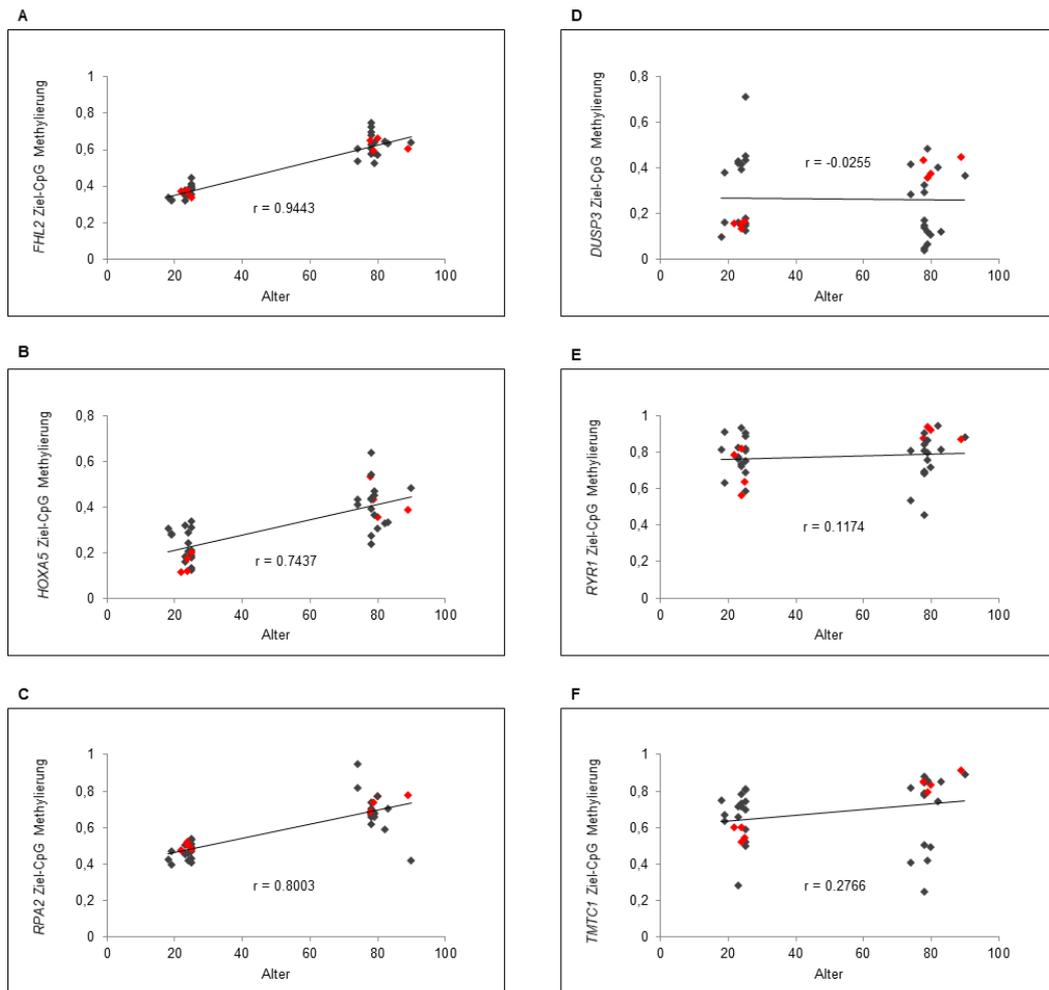


Abbildung 12: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationen zwischen der Methylierung der jeweiligen Ziel-CpG-Stelle der Gene *FHL2*, *HOXA5*, *RPA2*, *DUSP3*, *RYR1* und *TMTC1* und dem Alter der Probanden. Jeder Punkt stellt den validierten, mittleren Methylierungswert der Ziel-CpG-Stelle eines Probanden dar, insgesamt wurden 20 junge und 20 alte Probanden untersucht. Die Methylierungswerte der 8 Probanden, die für die genomweite Methylierungsanalyse via Microarray verwendet wurden, sind durch rote Punkte hervorgehoben. Der Nachweis der mittleren DNAm erfolgte durch DBS von gDNA, die aus den Monozyten der Probanden gewonnen wurde. (A) Gezeigt ist eine lineare Korrelation zwischen der Methylierung der Ziel-CpG-Stelle von *FHL2* und dem Alter der Probanden. Mit steigendem Probandenalter stiegen die mittleren Methylierungswerte, was sich in einem hohen Korrelationskoeffizient ($r = 0,9443$) widerspiegelt. (B) Dargestellt ist eine lineare Korrelation zwischen der Methylierung der Ziel-CpG-Stelle von *HOXA5* und dem Alter der Probanden. Mit steigendem Probandenalter stiegen die mittleren Methylierungswerte, was sich im Korrelationskoeffizient ($r = 0,7437$) widerspiegelt. (C) Lineare Korrelation zwischen der Methylierung der Ziel-CpG-Stelle von *RPA2* und dem Alter der Probanden. Auch hier lag ein Anstieg der Methylierung mit steigendem Alter vor, was sich im Korrelationskoeffizient ($r = 0,7437$) widerspiegelt. (D) Zu sehen ist die Korrelation zwischen der Methylierung der Ziel-CpG-Stelle von *DUSP3* und dem Alter der Probanden mit einem niedrigen Korrelationskoeffizient ($r = -0,0255$). (E) Gezeigt ist die Korrelation zwischen der Methylierung der Ziel-CpG-Stelle von *RYR1* und dem Alter der Probanden. Auch hier lag ein niedriger Korrelationskoeffizient vor ($r = 0,1174$) (F) Auch hier lag eine sehr schwache Korrelation zwischen der Methylierung der Ziel-CpG-Stelle von *TMTC1* und dem Alter der Probanden vor, die sich im niedrigen Korrelationskoeffizient ($r = 0,1174$) widerspiegelt.

3.4 Untersuchung der mRNA-Expression

Mittels qRT-PCR wurde die mRNA-Expression der Gene untersucht, die den untersuchten Ziel-CpG-Stellen zugeordnet sind. Das Ziel war, festzustellen, ob und inwieweit die altersassoziierten Veränderungen der DNAm der CpG-Stellen mit Änderungen der mRNA-Expression der entsprechenden Gene einhergeht. Es wurden ebenfalls die Gene untersucht, deren MD nach dem DBS nicht als signifikant validiert werden konnte. Für die Untersuchung der mRNA-Expression wurde die gleiche Probandengruppe verwendet, die für DBS verwendet wurde, jeweils erweitert um zehn zusätzliche Probanden. Somit bestand jede Kohorte aus 30 Probanden. Die Ergebnisse der qRT-PCR sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Gene *DNAH9*, *PDE1C*, *CADPS2* und *TMTC1* fehlen in dieser Abbildung, da laut integrierten Transkriptomdaten (*GTEX*, *Illumina*, *BioGPS*, *SAGE*), zusammengefasst in *GeneCards*[®] (Stelzer *et al.*, 2016), in Monozyten keine relevante mRNA-Expression nachgewiesen wurde. Folglich wurde für diese Gene keine qRT-PCR durchgeführt.

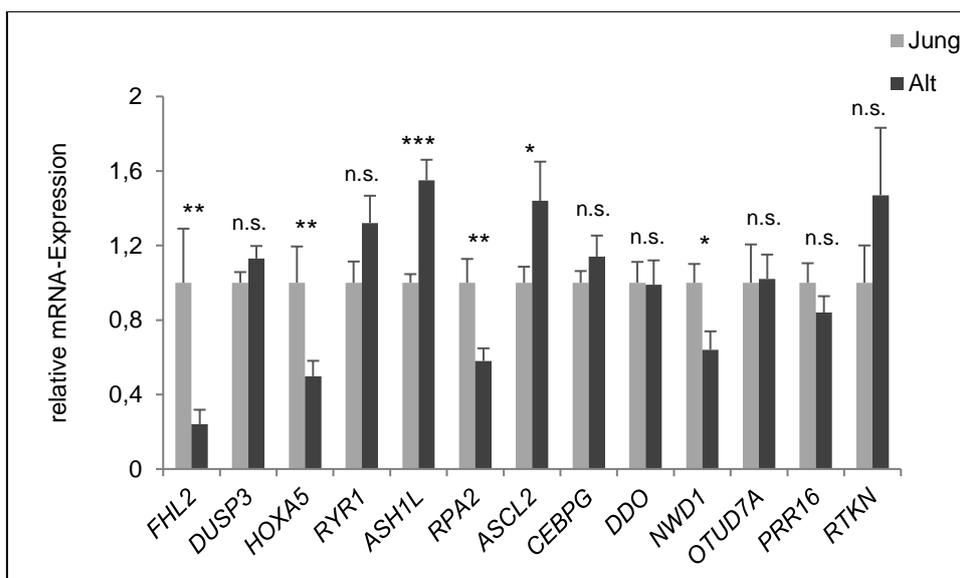


Abbildung 13: Ergebnisse der qRT-PCR der ausgewählten Gene. Zu entnehmen sind die mRNA-Expressionswerte der älteren Probandengruppe im Verhältnis zu der jungen Probandengruppe. Die Proben wurden in zwei Replikaten aufgetragen. Die mRNA-Expressionswerte junger Probanden wurden auf 1 normiert. Eingetragen sind die Standardfehler der Mittelwerte sowie das Signifikanzniveau ($n = 30$; Durchschnittliches Alter der Probandengruppen: 23,0 Jahre und 81,1 Jahre; p-Wert, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$, n.s = nicht signifikant).

Abbildung 13 ist zu entnehmen, dass bei den drei Genen *FHL2*, *HOXA5* und *RPA2* eine signifikant verminderte mRNA-Expression im alten Probandenkollektiv gemessen wurde ($p = 0,0113$, $p = 0,0053$ und $p = 0,0056$), während die DNAm der entsprechenden CpG-

Stellen im gleichen Kollektiv erhöht war. Bei den Genen *ASH1L* und *ASCL2* lag eine signifikant erhöhte mRNA-Expression ($p = 0,00003$ und $p = 0,4123$) und gleichzeitig eine signifikant erhöhte DNAm der CpG-Stellen im alten Probandenkollektiv vor. Die mRNA-Expression von *NWD1* war im alten Kollektiv signifikant vermindert ($p = 0,0140$), während der Methylierungsunterschied der CpG-Stelle in beiden Kollektiven nicht signifikant unterschiedlich war. Bei den Genen *DUSP3*, *RYR1*, *CEBPG*, *DDO*, *PRR16* und *RTKN* lag sowohl für die mRNA-Expression als auch für die Methylierung der CpG-Stelle kein signifikanter Unterschied vor.

3.5 Untersuchung der Proteinexpression

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob die altersassoziierte signifikante Änderung der mRNA-Expression auf die Proteinebene übertragbar ist. Um die Genexpression auf Proteinebene quantitativ zu bestimmen, wurden ELISA-Messungen durchgeführt. Es wurden nur Proteine untersucht, deren mRNA zwischen den beiden Probandenkollektiven signifikant unterschiedlich exprimiert wurde. Für *ASH1L*, *ASCL2* und *NWD1* konnte kein Proteinnachweis erbracht werden, da laut integrierten Proteomdaten (*ProteomicsDB*, *PaxDb*, *MaxQB*, *MOPED*), zusammengefasst in *GeneCards*[®] (Stelzer *et al.*, 2016), in Monozyten keine relevante Proteinexpression nachgewiesen wurde. Für die Untersuchung der Proteinexpression mittels ELISA wurde das gleiche Probandenkollektiv verwendet, das für die Bestimmung der mRNA-Expression diente. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Proteinbestimmung mittels ELISA für die Proteine HOXA5, FHL2 und RPA2 für das junge und alte Probandenkollektiv.

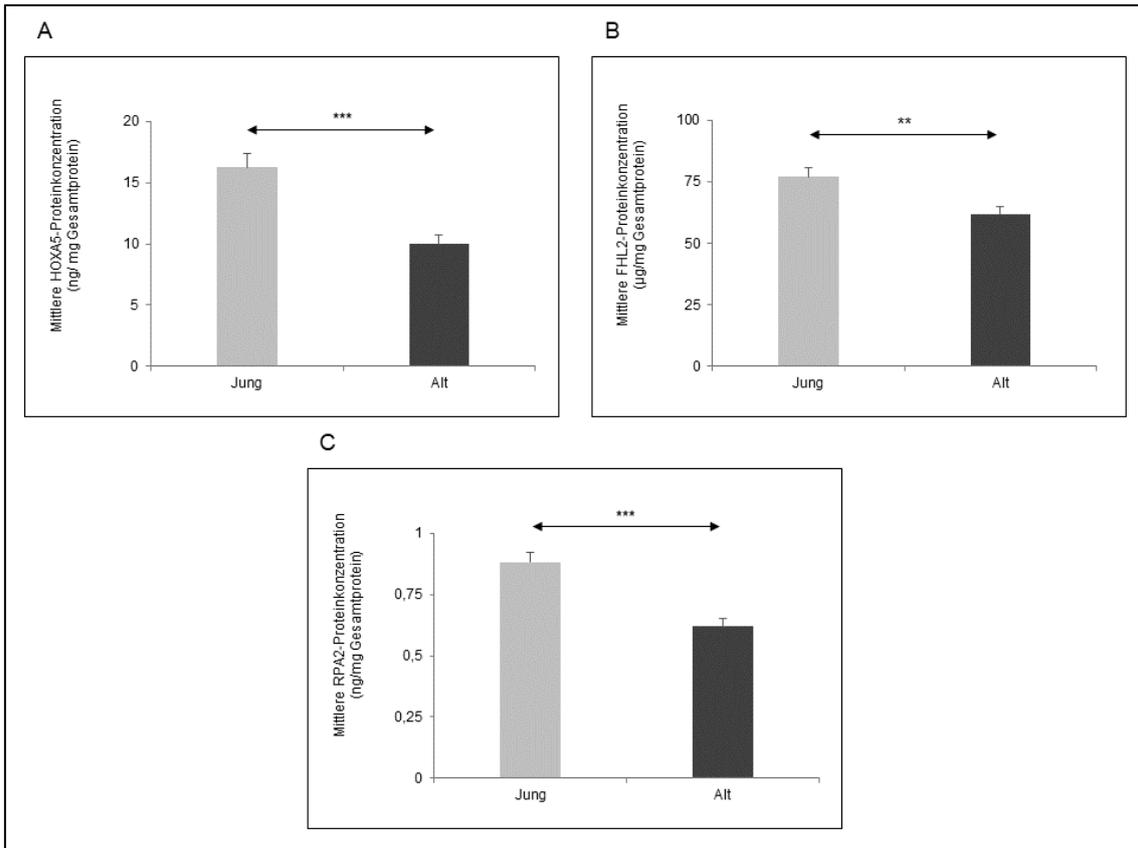


Abbildung 14: Ergebnisse der ELISA-Messungen. Zu entnehmen sind die Proteinkonzentrationen in Monozytenlysaten der jungen Probanden im Vergleich zu denen der alten Probanden. Eingetragen sind jeweils die Standardfehler der Mittelwerte sowie das Signifikanzniveau ($n = 30$; Durchschnittliches Alter der Probandengruppen: 23,0 Jahre und 81,1 Jahre; p -Wert, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$, n.s. = nicht signifikant). (A) Die HOXA5-Proteinexpression war signifikant herunterreguliert bei alten Probanden im Vergleich zu jungen Probanden. (B) Die FHL2-Proteinexpression war signifikant herunterreguliert bei alten Probanden im Vergleich zu jungen Probanden. (C) Die RPA2-Proteinexpression war ebenfalls signifikant herunterreguliert bei alten Probanden im Vergleich zu jungen Probanden.

Wie in Abbildung 14 gezeigt, war die Genexpression auf Proteinebene für *HOXA5*, *FHL2* und *RPA2* im alten Probandenkollektiv signifikant verringert ($p = 0,00003$, $p = 0,0098$ und $p = 0,000009$). Diese Beobachtung korreliert mit der altersassoziierten Reduktion der mRNA-Expression dieser Gene.

Um die Ergebnisse der quantitativen ELISA-Messungen zu stützen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Western Blots für die drei Proteine HOXA5, FHL2 und RPA2 zusammen mit Beta-Aktin (β -Aktin) als Ladekontrolle repräsentativ für jeweils zwei junge und zwei alte Probanden.

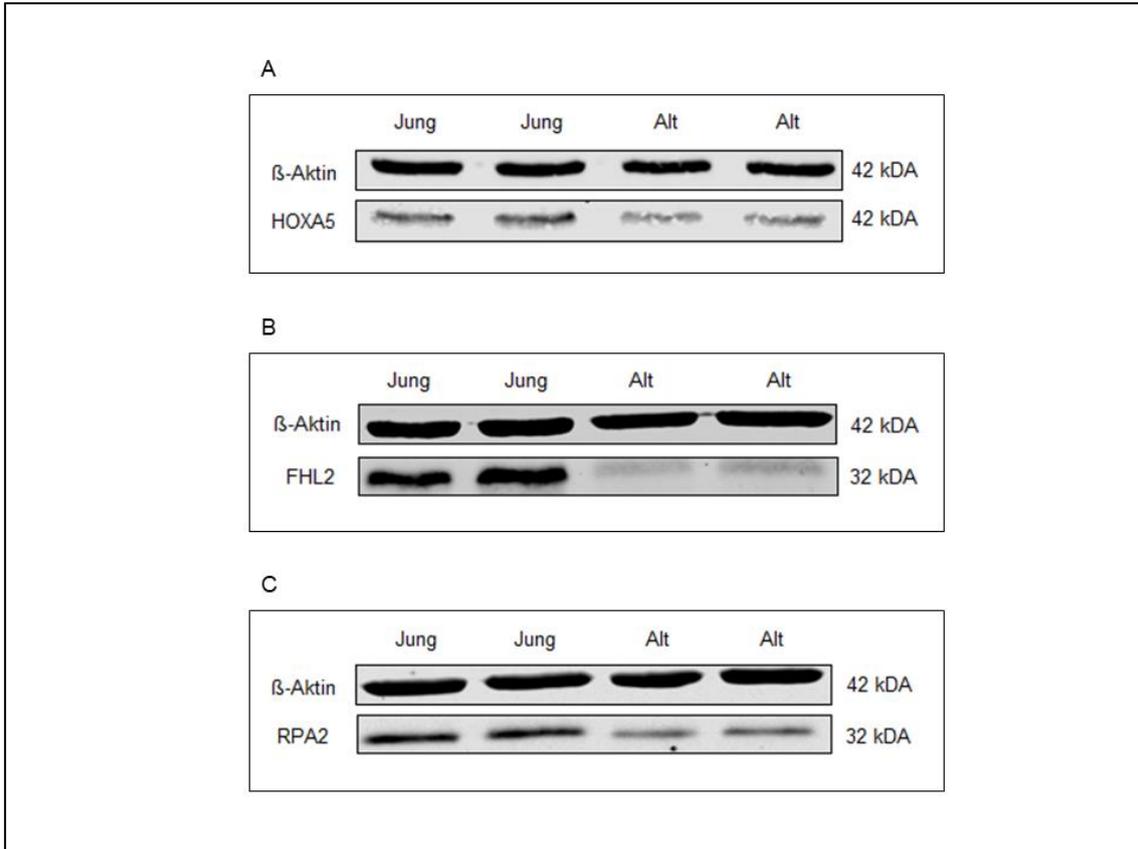


Abbildung 15: Ergebnisse der Western Blot Analysen der Proteine HOXA5, FHL2 und RPA2. Als Ladekontrolle wurde jeweils ein monoklonaler *Mouse Anti-Human* Beta-Aktin-Antikörper verwendet (Verdünnung 1:5000). (A) Für den Nachweis des HOXA5-Proteins wurden pro Geltasche 25 µg des Monozytenlysates aus dem Vollblut von jungen und alten Probanden aufgetragen. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler *Rabbit Anti-Human* HOXA5-Antikörper verwendet (Verdünnung 1:500). (B) Für den Nachweis von FHL2 wurden pro Geltasche jeweils 15 µg des Monozytenlysates aufgetragen. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler *Rabbit Anti-Human* FHL2-Antikörper verwendet (Verdünnung 1:1000). (C) Für den Nachweis von RPA2 wurden pro Geltasche jeweils 15 µg des Monozytenlysates aufgetragen. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler *Rabbit Anti-Human* RPA2-Antikörper verwendet (Verdünnung 1:5000).

3.6 Altersassoziierte Korrelation der *HOXA5*-Expression mit *TP53* und *PTEN*

Da bekannt ist, dass *HOXA5* den Tumorsuppressor *TP53* hochreguliert und *TP53* wiederum mit *PTEN* interagiert (Stambolic *et al.*, 2001; Freeman *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2017), wurde untersucht, ob bei diesen Genen ebenso eine altersassoziierte Änderung der Genexpression auf mRNA- und Proteinebene stattfindet. Die Expressionsanalysen wurden mit den gleichen jungen und alten Probandengruppen untersucht, wie die vorherigen Expressionsanalysen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 16 veranschaulicht.

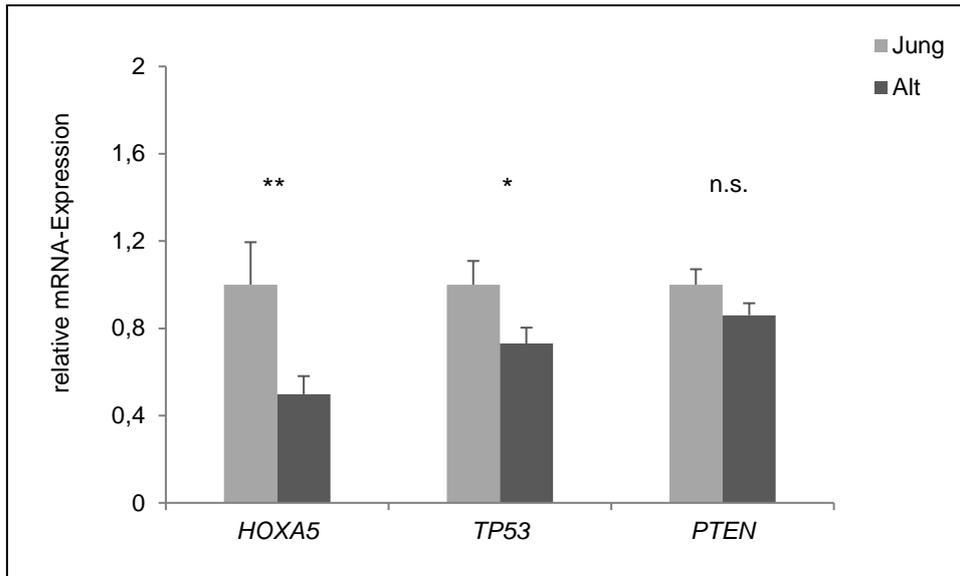


Abbildung 16: Ergebnisse der qRT-PCR der Gene *HOXA5*, *TP53* und *PTEN*. Gezeigt sind mRNA-Expressionswerte der alten Probanden im Verhältnis zu den jungen Probanden für die Gene *HOXA5*, *TP53* und *PTEN*. Pro Probe wurden zwei Replikate aufgetragen. Die mRNA-Expressionswerte junger Probanden wurden auf 1 normiert. Eingetragen sind die Standardfehler der Mittelwerte der jeweils 30 jungen und alten Probanden sowie das Signifikanzniveau ($n = 30$; Durchschnittliches Alter der Probandengruppen: 23,0 Jahre und 81,1 Jahre; p-Wert, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$, n.s. = nicht signifikant).

Wie Abbildung 16 zu entnehmen ist, war die mRNA-Expression für *HOXA5*, *TP53* und *PTEN* in den Monozyten der alten Probandengruppe im Vergleich zur jungen Probandengruppe herunterreguliert. *HOXA5* und *TP53* zeigten jeweils eine signifikante Reduktion der Expression ($p = 0,0053$ und $p = 0,0431$), während *PTEN* nur eine Tendenz in die gleiche Richtung zeigte ($p = 0,0803$).

Im nächsten Schritt wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt, um die altersabhängige Korrelation der drei Gene zu überprüfen. *HOXA5*, *TP53* und *PTEN* zeigten jeweils zueinander eine moderate bis starke Korrelation. Dies ist in der folgenden Abbildung 17 veranschaulicht.

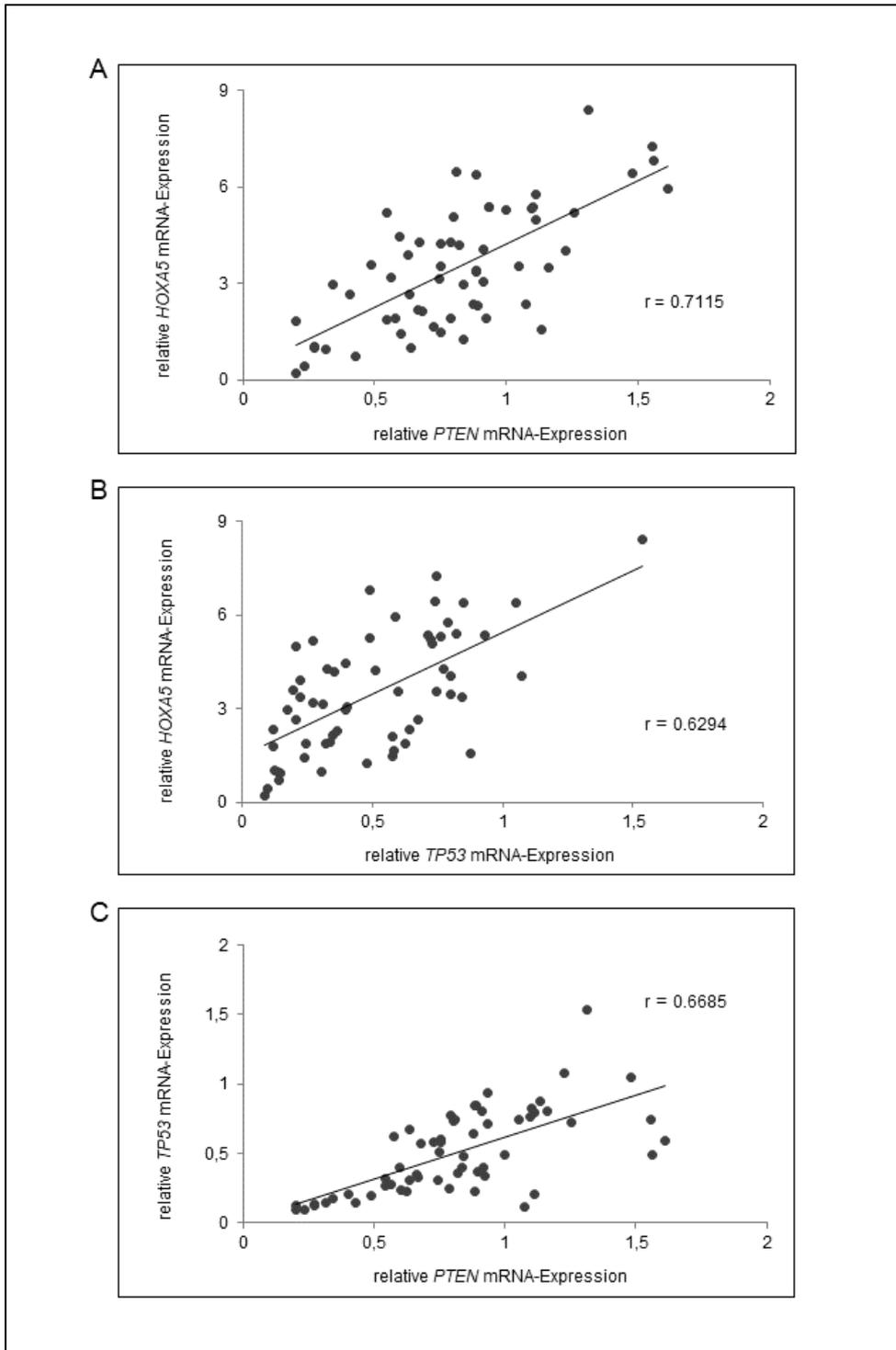


Abbildung 17: Darstellung der altersabhängigen Korrelation der mRNA-Expression von HOXA5, PTEN und TP53. (A) Gezeigt ist eine moderate bis starke lineare Korrelation zwischen der HOXA5 und PTEN mRNA-Expression ($r = 0,7115$). (B) Eine moderate bis starke Korrelation ist ebenso zwischen der HOXA5 und TP53 mRNA-Expression ($r = 0,6294$) und (C) zwischen der TP53 und PTEN mRNA-Expression ($r = 0,6685$) zu beobachten. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR mit zellulärer mRNA aus Monozyten durchgeführt. ($n = 30$; Durchschnittliches Alter der Probandengruppen: 23,0 Jahre und 81,1 Jahre).

Hinsichtlich der Proteinexpression war es nur möglich, *HOXA5* mit *PTEN* zu vergleichen, da das Protein p53 nicht in Monozyten exprimiert wird (Fishilevich *et al.*, 2016). Übereinstimmend mit der Proteinexpression von *HOXA5*, konnte auch bei *PTEN* eine signifikante Verringerung der Proteinexpression ($p = 0,0007$) mittels ELISA in der alten Probandengruppe festgestellt werden (Abbildung 18 A). Um dieses Ergebnis qualitativ zu stützen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt (Abbildung 18 B). Die Korrelationsanalyse zeigte eine moderate lineare Korrelation zwischen *HOXA5*- und *PTEN*-Proteinexpression (Abbildung 18 C).

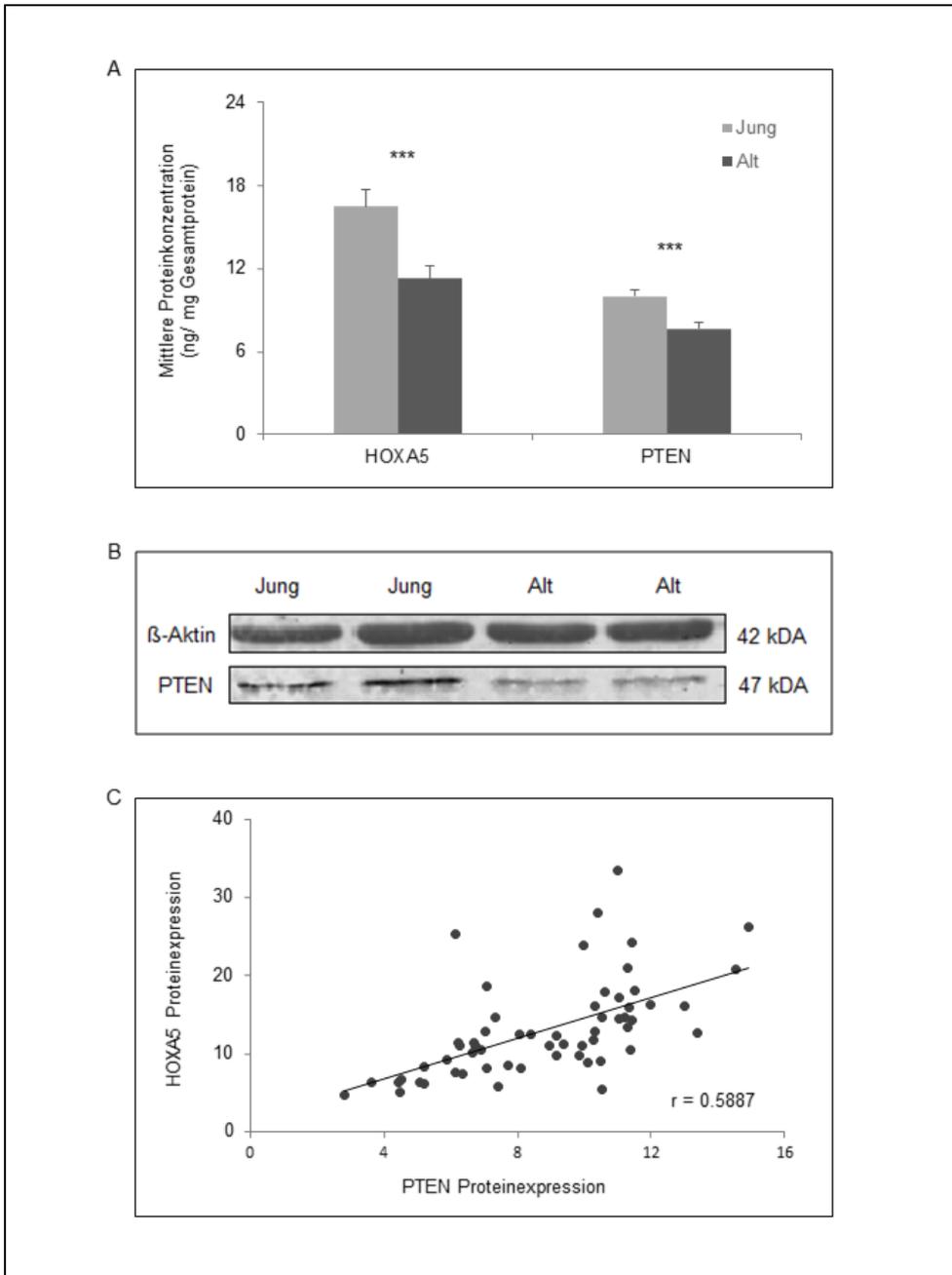


Abbildung 18: Darstellung der altersabhängigen Korrelation der Proteinexpression von HOXA5 und PTEN. (A) Die Proteinexpression von PTEN war wie bei HOXA5 signifikant herunterreguliert in der alten Probandengruppe ($p < 0,0001$ und $p = 0,0007$). Die Proteinexpression wurde mittels ELISA anhand von Monozytenlysaten aus dem Vollblut der Probanden untersucht und ist dargestellt in ng pro mg Totalprotein. ($n = 30$; Durchschnittliches Alter der Probandengruppen: 23,0 Jahre und 81,1 Jahre). (B) Für den Nachweis von PTEN mittels Western Blot-Analyse wurden pro Gelasche 15 μ g des Monozytenlysates aus dem Vollblut von jungen und alten Probanden aufgetragen. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler *Rabbit Anti-Human* PTEN-Antikörper verwendet (Verdünnung 1:10000). (C) Zu sehen ist eine moderate lineare Korrelation zwischen der Proteinexpression von HOXA5 und PTEN, was sich durch den Korrelationskoeffizient von $r = 0,5887$ widerspiegelt.

4 Diskussion

Im Laufe der Alterung spielen epigenetische Mechanismen eine wichtige Rolle. Dabei werden insbesondere Veränderungen der DNAm mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht (Collerton *et al.*, 2014). Die vorliegende Arbeit legte den Fokus darauf, genomweite, altersassoziierte Methylierungsmuster sowie spezifische Gene mit signifikanten altersbedingten MDs zu identifizieren. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob eine veränderte DNAm mit einer veränderten mRNA- oder Proteinexpression einhergeht.

4.1 Einfluss des Monozytengehalts der Proben

In Kapitel 2.2.12 wurde bereits erläutert, dass Unterschiede im Monozytengehalt der Proben potenziell einen Einfluss auf die Methylierungsmuster der analysierten DNA ausüben, da unterschiedliche Zelltypen auch unterschiedliche zelltypspezifische DNA-Methylierungsmuster aufweisen können (Assenov *et al.*, 2014; Aran *et al.*, 2015). **Abbildung 6: Zelltypzusammensetzung der eingesetzten Proben.**Abbildung 6 ist zu entnehmen, dass der Anteil der Monozyten in den Proben zwischen 73 % und 80 % liegt.

Die Analyse der DNA-Methylierungsdaten wurde, wie in Kapitel 2.2.12 erläutert, mithilfe des Software-Tools *RnBeads* durchgeführt. Dieses Programm bietet sowohl referenzbasierte als auch referenzfreie Methoden zur Schätzung der Zellzusammensetzung in gemischten Proben (Assenov *et al.* 2014). *RnBeads* berücksichtigt Unterschiede in der Zellzusammensetzung bei der statistischen Auswertung, wodurch Verzerrungen bei der Identifikation von DMCG vermieden werden (Müller *et al.*, 2019). Da der Monozytenanteil in den analysierten Proben lediglich geringfügig variiert (zwischen 73 % und 80 %) und *RnBeads* diese Information in die Berechnung der p-Werte integriert, ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse nicht durch Unterschiede in der Zellzusammensetzung verfälscht wurden.

4.2 Genomweite DNA-Methylierungsmuster der Proben

Basierend auf den berechneten β -Werten wurde ein Streudiagramm erstellt, welches die mittleren Methylierungswerte jeder analysierten CpG-Stelle zwischen den jeweils vier jungen und alten Probanden vergleicht. Wie das Diagramm in Abbildung 7 zeigt, ist eine

hohe Korrelation zwischen den Werten der jungen und alten Probandengruppe vorhanden, wobei der Korrelationskoeffizient $\rho = 0,9971$ beträgt. Trotz der hohen Korrelation fanden sich 1481 CpG-Stellen, welche die Filterkriterien erfüllten. Die Filterkriterien waren eine gemessene *Coverage* von mindestens fünf und ein *fdr*-normalisierter *p*-Wert $< 0,05$. Der Großteil dieser DMCG, gekennzeichnet als rote Punkte in Abbildung 7, liegen dabei oberhalb der Korrelationsgerade.

Dies deutet auf eine Tendenz zur Hypermethylierung der DMCG bei der alten Probandengruppe im Vergleich zur jungen Probandengruppe hin. Daraus lässt sich ableiten, dass diese CpG-Stellen mit höherem Alter zu einer Zunahme der DNAm tendieren. Diese Tendenz spiegelt sich ebenfalls in Abbildung 8 wider: 1286 der DMCG (86,8 %) waren bei der älteren Probandengruppe im Vergleich zur jungen Probandengruppe hypermethyliert, während bei 195 CpGs (13,2 %) die DNAm in der älteren Probandengruppe reduziert war. Im Mittel lässt sich hier also eine Zunahme der DNAm der jeweiligen DMCG im hohen Alter feststellen.

Ferner veranschaulicht Abbildung 9, dass in den CGIs deutlich mehr hypermethylierte DMCG (27,7 %) in der alten Kohorte im Vergleich zur jungen Kohorte (18,3 %) vorzufinden waren. Gleichzeitig zeigte sich, dass in den sogenannten *Non-Island*-Regionen, also Regionen außerhalb von CGIs, mehr CpGs bei den älteren Probanden hypomethyliert waren. Diese Ergebnisse deuten auf eine altersabhängige Verschiebung der Methylierungsmuster hin, insbesondere in regulatorischen Bereichen des Genoms.

Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen bereits veröffentlichter Studien, die zeigen, dass der Alterungsprozess in der Regel mit einer Hypomethylierung in regulatorischen Regionen außerhalb von CGIs einhergeht, jedoch gleichzeitig eine Hypermethylierung in regulatorischen Regionen und Promotoren von krebsassoziierten Genen stattfindet (Florath *et al.*, 2013; Teschendorff *et al.*, 2013; Li & Tollefsbol, 2016). Jedoch zeigen andere Studien auch insgesamt eine Abnahme der genomweiten DNAm mit zunehmendem Alter, was in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte. Die hier untersuchten 853.307 CpGs stellen jedoch nur einen Bruchteil der im Genom existierenden CpGs dar, welches ca. 28 Millionen CpGs umfasst (Edwards *et al.*, 2010). Des Weiteren liegen die untersuchten CpGs wie bereits erwähnt hauptsächlich in regulatorischen Bereichen. Dies könnte erklären, warum in dieser Arbeit insgesamt eine Zunahme der DNAm in der älteren Probandengruppe zu beobachten war.

Es muss zudem berücksichtigt werden, dass für die genomweite Methylierungsanalyse lediglich die DNA von vier jungen und vier alten Probanden untersucht wurde. Somit ist nicht auszuschließen, dass die beobachteten Ergebnisse durch unbekannte Vorerkrankungen oder die Altersdemenz des Probanden Epi-A-7 beeinflusst wurden. Um diese Unklarheit zu beseitigen, müsste das *Infinium® MethylationEPIC BeadChip* Array mit einer höheren Probandenanzahl durchgeführt werden. Dies war jedoch im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der hohen Kosten nicht umsetzbar.

4.3 Validierung der DMCG

Im Anschluss an die genomweite Methylierungsanalyse wurden die identifizierten DMCG den assoziierten Genen zugeordnet. Anhand der in Kapitel 3.2 beschriebenen Filterkriterien wurden 18 Gene für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt. Zur Validierung der Methylierungsdaten erfolgte ein DBS. Acht der 18 DMCG, die nach der genomweiten Methylierungsanalyse eine signifikante MD zeigten, wiesen nach dem DBS keine signifikante MD mehr auf. Diese acht DMCG umfassten die Ziel-CpGs, die den Genen *DUSP3*, *RYR1*, *TMTC1*, *CEBPG*, *DDO*, *NWD1*, *PRR16* und *RTKN* zuzuordnen sind. Dabei ist zu beachten, dass für die DMCG, die den Genen *PRRT1* und *OTUD7A* zugeordnet waren, keine geeigneten bzw. funktionierenden Primerpaare erstellt werden konnten. Damit blieb eine Validierung für diese DMCG offen.

Wie bereits in Kapitel 1.7 beschrieben, liefert das DBS zuverlässigere Ergebnisse über den Grad der DNAm. Dieses ermöglicht eine genauere, tiefere Methylierungsanalyse einzelner CpG-Dinukleotide und liefert somit detailliertere Informationen im Vergleich zum *MethylationEPIC BeadChip* Microarray, welches zur genomweiten Untersuchung von DNAm eingesetzt wird (Gries *et al.*, 2013).

Des Weiteren wurden beim Microarray aus Kostengründen je Probandengruppe $n = 4$ und bei der anschließenden Validierung $n = 20$ DNA-Proben von Probanden untersucht, was ein weiterer Grund dafür sein könnte, dass sich das Signifikanzniveau einiger Methylierungsdaten nach dem DBS geändert hat.

Für die Gene *FHL2*, *HOXA5*, *RPA2*, *DUSP3*, *RYR1* und *TMTC1* wurden die einzelnen Methylierungswerte der Probanden nach DBS in jeweils einem Streudiagramm in Abbildung 12 aufgezeigt. Die rot markierten Punkte stellen dabei jeweils die Methylierungswerte der vier jungen und vier alten Probanden dar, die ebenso für die genomweite Methylierungsanalyse via Microarray verwendet wurden.

Ein Blick auf die Streudiagramme in Abbildung 12 verdeutlicht, warum sich der Methylierungsunterschied der Gene *DUSP3*, *RYR1* und *TMTC1* zwar in der genomweiten Methylierungsanalyse als signifikant herausstellte, dieser Befund jedoch durch das DBS nicht bestätigt werden konnte. Betrachtet man alle Punkte im Streudiagramm ($n = 20$, je Probandengruppe) ergeben sich niedrige Korrelationskoeffizienten ($< 0,3$). Werden wiederum nur die acht roten Punkte betrachtet – also die Methylierungswerte der Probanden, die für die genomweite Analyse verwendet wurden – ergeben sich sehr hohe Korrelationen ($> 0,7$). Für *DUSP3* beträgt der so errechnete Korrelationskoeffizient $r = 0,9813$, für *RYR1* $r = 0,7710$ und für *TMTC1* $r = 0,9724$.

Diese Beobachtung legt nahe, dass die zuvor gemessenen, signifikanten Methylierungsunterschiede der Gene *DUSP3*, *RYR1* und *TMTC1* in der genomweiten Analyse möglicherweise durch die begrenzte und zufällig gewählte Stichprobe von lediglich acht Probanden beeinflusst wurden. Die hohe Korrelation der Methylierungswerte innerhalb dieser kleinen Gruppe deutet darauf hin, dass diese Stichprobe möglicherweise nicht repräsentativ für die Gesamtheit der untersuchten Probanden war.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen zum einen die Bedeutung einer ausreichenden Stichprobenauswahl bei genomweiten Analysen und zum anderen die Notwendigkeit einer Validierung der Methylierungsdaten mittels DBS.

4.4 Differentiell methylierte CpG-Stellen und assoziierte Gene

Nur die CpG-Stellen, die den Genen *FHL2*, *DNAH9*, *HOXA5*, *ASH1L*, *PDE1C*, *CADPS2*, *RPA2* und *ASCL2* zugeordnet sind, erwiesen sich auch nach Validierung mittels DBS als signifikant differentiell methyliert.

Es fällt auf, dass viele dieser Gene regulatorische Funktionen im Bereich Zellwachstum, Zellteilung und Genexpression aufweisen. So spielt *FHL2* eine Rolle beim Zellwachstum, *ASCL2* und *HOXA5* sind Transkriptionsfaktoren, *ASH1L* zählt zu den Histonmethyltransferasen und *RPA2* ist an DNA-Replikation, -Reparatur und Rekombination beteiligt (vgl. Tabelle 23 in Kapitel 3.2). Alle fünf Gene sind in der älteren Probandengruppe hypermethyliert. Dies ist konsistent mit den bisherigen Erkenntnissen, aus denen hervorgeht, dass im Alter das Zellwachstum langsamer voranschreitet (Tomasetti *et al.*, 2019) und häufiger Fehler in der DNA-Reparatur stattfinden (Nicolai *et al.*, 2015).

Im Hinblick auf die 353 CpGs der Horvath *Clock* sowie die 761 CpGs der *RnBeads*-Pipeline gab es insgesamt vier Überschneidungen mit den in dieser Arbeit untersuchten DMCG. Das Ziel-CpG von *FHL2* zeigte eine Übereinstimmung mit der Horvath *Clock*, während die Ziel-CpGs von *ASH1L*, *CADPS2* und *TMTC1* mit der *RnBeads*-Pipeline überlappten. *FHL2* zählt zu den am stärksten hypermethylierten Genen im höheren Lebensalter (Garagnani *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2020; Habibe *et al.*, 2021) und ist Bestandteil vieler epigenetischer Uhren (Hannum *et al.*, 2012; Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015). Daher erscheint die beobachtete Überlappung des *FHL2*-Ziel-CpGs mit der Horvath *Clock* als naheliegend. Die Ziel-CpGs von *ASH1L*, *CADPS2* und *TMTC1* wiesen jeweils eine MD von über 20 % zwischen der jungen und alten Probandengruppe auf (Tabelle 23). Daher erscheint auch die Überschneidung dieser CpGs mit denen der *RnBeads*-Pipeline erwartbar.

4.5 Untersuchung der mRNA- und Proteinexpression unter Betrachtung epigenetischer Faktoren

Die Untersuchung der mRNA-Expression ergab für *FHL2*, *HOXA5*, *ASH1L*, *RPA2*, *ASCL2* und *NWD1* einen signifikanten Unterschied zwischen den Probandengruppen jung versus alt (Abbildung 13). Weiterhin ergab die Untersuchung der Protein-Expression mittels ELISA ebenso einen signifikanten Unterschied für die Gene *FHL2*, *HOXA5* und *RPA2* (Abbildung 14). Die quantitativen Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen konnten durch qualitative Western Blot-Analysen qualitativ gestützt werden (Abbildung 15). Für *ASH1L*, *ASCL2* und *NWD1* konnte kein Proteinnachweis erbracht werden, da laut integrierten Proteomdaten (ProteomicsDB, PaxDb, MaxQB, MOPED), zusammengefasst in *GeneCards*[®] (Stelzer *et al.*, 2016), in Monozyten keine relevante Proteinexpression nachgewiesen wurde.

Bei Betrachtung der Gene *FHL2*, *HOXA5* und *RPA2* fällt auf, dass die mRNA-Expression sowie die Protein-Expression in der älteren Probandengruppe signifikant herunterreguliert war, während die DNAm dieser Gene in der gleichen Probandengruppe signifikant erhöht war. Es ist anzunehmen, dass die DNAm hier einen repressiven Einfluss auf die Genexpression auf mRNA- und Proteinebene hat. Die epigenetischen Umstände bekräftigen diese Untersuchungsergebnisse. Bei allen drei Genen ist die Ziel-CpG Stelle, welche eine signifikante MD aufweist, im Promotorbereich lokalisiert. In diesem Bereich führt

eine erhöhte Methylierung häufig zu einer verminderten Genexpression, da die Methylierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren stört und dadurch die Rekrutierung der RNA-Polymerase verhindert (Klose & Bird, 2006; Lehmann, 2010).

Mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers*, welcher Daten des ENCODE-Projekts integriert, konnte ermittelt werden, dass *FHL2*, *HOXA5* und *RPA2* Transkriptionsfaktor-Bindestellen (TF-Bindestellen) im entsprechenden Promotorbereich aufweisen (Kent *et al.*, 2002; The ENCODE Project Consortium, 2012). *FHL2* besitzt in der Region um die Ziel-CpG-Stelle zahlreiche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Es handelt sich dabei um Bindestellen für *Transcription Factor AP-2 Alpha (TFAP2A)*, *Transcription Factor AP-2 Beta (TFAP2B)*, *Zinc Finger Protein 123 (ZNF123)* und *Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6)*. Auch *RPA2* weist solche TF-Bindestellen auf, beispielsweise für *RAR-related Orphan Receptor Alpha (RORA)*, *Estrogen Receptor Beta (ESR2)*, *Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1)* und *Zinc Finger Protein 423 (ZNF423)* (Kent *et al.*, 2002; The ENCODE Project Consortium, 2012). Die Tatsache, dass *FHL2* und *RPA2* TF-Bindestellen in den Regionen um die Ziel-CpG-Stelle aufweisen, deutet darauf hin, dass diese Bereiche regulatorisch relevant sind und dass DNAm in diesen Regionen funktionelle Auswirkungen auf die Genexpression haben kann (Moore *et al.*, 2012; Rimoldi *et al.*, 2024).

Insbesondere *HOXA5* besitzt geclusterte TF-Bindungsstellen für *POLR2A*, *Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH)* und *Retinoblastoma-like Protein 2 (RBL2)* (Kent *et al.*, 2002; The ENCODE Project Consortium, 2012). *POLR2A* kodiert für die größte Untereinheit der RNA-Polymerase II, der Polymerase, die für die Synthese von mRNA verantwortlich ist, während *EZH2* an der H3K27-Methylierung und damit an der Transkriptionsrepression beteiligt ist (Cao *et al.*, 2002). Außerdem bindet der Transkriptionsfaktor *RBL2* als Transkriptionsrepressor an methylierte DNA, wo er Chromatin-modifizierende Enzyme für den Promotor rekrutiert, was zu einer epigenetischen Transkriptionsrepression führt und dadurch den Effekt der Abschaltung des Gens verstärkt. Das Vorhandensein dieser geclusterten TF-Bindestellen weist darauf hin, dass sich das Ziel-CpG sowie die angrenzenden *HOXA5*-CpG-Stellen in einer regulatorischen Region in der Promotorregion befinden. Solche Cluster von TF-Bindestellen treten zudem häufig in Enhancer-Regionen auf und spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Genexpression (Zhu *et al.*, 2016).

Bezüglich *FHL2* ist bereits durch andere Studien bekannt, dass es sich um eines der am stärksten hypermethylierten Gene im Alter handelt (Garagnani *et al.*, 2012; Habibe *et al.*,

2021). Dies konnte durch die Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigt werden und unterstreicht wiederum die Zuverlässigkeit der in dieser Arbeit durchgeführten Methylierungsanalysen, insbesondere die Genauigkeit des durchgeführten DBS. Außerdem ist *FHL2* auch Bestandteil verschiedener epigenetischer Uhren, wie bereits in Kapitel 1.9 beschrieben wurde.

Des Weiteren konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass *HOXA5* durch DNAm kontrolliert wird und dass eine erhöhte DNAm mit der Herunterregulierung von *HOXA*-Genen bei verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht werden kann (Dunn *et al.*, 2014). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass *HOXA*-Gene durch Hypermethylierung bei myeloischen und lymphatischen Malignomen inaktiviert werden (Strathdee *et al.*, 2007). Außerdem wurde für *HOXA5* gezeigt, dass eine erhöhte DNAm in der *HOXA5*-Promotorregion mit einer verminderten Expression des Gens während der Tumorprogression korreliert (Watson *et al.*, 2004).

Darüber hinaus liegen die Ziel-CpG-Stellen von *HOXA5*, *FHL2* und *RPA2* in Regionen, die typischerweise die Histonmarkierung H3K27me3 aufweisen (Kent *et al.*, 2002; The ENCODE Project Consortium, 2012). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass sich die Ziel-CpGs innerhalb aktiver regulatorischer Elemente befinden. Auch Rakyan *et al.* sowie Shchukina *et al.* zeigten, dass Hypermethylierungsereignisse in Promotorregionen mit vermehrten H3K27me3 Markierungen assoziiert sind (Rakyan *et al.*, 2010; Shchukina *et al.*, 2020). Diese Beobachtung deckt sich mit den hier gezeigten Ergebnissen, in denen Hypermethylierungen in der Nähe von Promotorregionen nachgewiesen wurden, die assoziiert sind mit H3K27me3 Markierungen und mit einer signifikant niedrigeren Genexpression einhergehen. Das legt die Vermutung nahe, dass die DNAm in diesen Regionen in der Tat einen funktionellen Einfluss auf die mRNA-Expression hat. Die DNAm besitzt eine zentrale Rolle in dem regulatorischen Netzwerk, welches die Genexpression steuert und kann abhängig von der zugrunde liegenden genetischen Sequenz unterschiedliche Einflüsse auf die Genaktivitäten in verschiedenen Genomregionen ausüben (Moore *et al.*, 2012).

Während die Ergebnisse dieser Arbeit eine altersbedingte Hypermethylierung und eine gleichzeitig herunterregulierte Genexpression auf mRNA- und Proteinebene von *HOXA5*, *FHL2* und *RPA2* zeigten, bleiben Schlussfolgerungen hinsichtlich eines kausalen Zusammenhangs zwischen der altersbedingten Hypermethylierung und der Genexpression eher indirekt. Allerdings gibt es, wie zuvor bereits zusammengefasst, verschiedene Hinweise darauf, dass es sich bei den Bereichen um die Ziel-CpG-Stellen von

HOXA5, *FHL2* und *RPA2* um regulatorische Regionen handelt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete altersbedingte Hypermethylierung ursächlich mit der Reduktion der Genexpression mit zunehmendem Alter zusammenhängt. Ein direkter Nachweis für den kausalen Zusammenhang zwischen DNAm und Genregulation erfordert jedoch funktionelle Ansätze wie beispielsweise episomale Reporter-Assays (Klug & Rehli, 2006), gezieltes epigenetisches Editieren mittels dCas9-DNMT3A/TET1-Fusionen (Liu *et al.*, 2016), sowie Methoden wie Methyl-Spec-seq zur Analyse methylierungsabhängiger Transkriptionsfaktorbindung (Zuo *et al.*, 2017). Solche Experimente gehen jedoch über den Rahmen der hier präsentierten Daten hinaus.

Beachtet man hingegen die Gene *ASH1L*, *ASCL2* und *NWD1*, so fällt auf, dass sich die mRNA-Expression gleichläufig zur DNAm verhält (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 13). Die mRNA-Expression von *ASH1L* und *ASCL2* war in älteren Probanden höher, obwohl hier gleichzeitig eine signifikant höhere DNAm vorlag. Bei *NWD1* verhielt es sich umgekehrt. Die DNAm von *NWD1* nahm tendenziell im Alter ab, so wie auch die mRNA-Expression. Eine erhöhte Methylierung führt zwar häufig zu einer verminderten Genexpression, es gibt jedoch Ausnahmen. Es ist bekannt, dass Transkriptionsfaktoren nicht nur als Aktivatoren, sondern ebenso als Repressoren wirken können (Martin, 1986; Ren & Liao, 2001; Boyle & Després, 2010). So kann die DNAm in einigen Fällen sogar die Genexpression aktivieren, wenn die Bindung von Repressoren gehemmt wird (Zhu *et al.*, 2016).

Die Gene *ASCL2* und *NWD1* besitzen ihre Ziel-CpG-Stelle im Promotorbereich, somit ist es möglich, dass hier solch ein Phänomen zugrunde liegt. Beispielsweise befindet sich in der Nähe des Ziel-CpGs von *ASCL2* eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor *Hes Family BHLH Transcription Factor 6 (HES6)* der als Transkriptionsrepressor agiert (Gao *et al.*, 2001; Kent *et al.*, 2002; The ENCODE Project Consortium, 2012; Krossa *et al.*, 2022). Des Weiteren besitzt *ASCL2* in dem entsprechenden Bereich des Genoms häufig repressive Chromatin-Konfigurationen (Kent *et al.*, 2002; The ENCODE Project Consortium, 2012). Dies ist häufig auch ein Grund für eine geringe Genexpression. Es ist bekannt, dass sich im Alter häufig Chromatin-Modifikationen ändern können, wodurch bestimmte Gene trotz repressiver Markierung reaktiviert werden können (Wang *et al.*, 2022).

Des Weiteren kann die Methylierung in anderen Bereichen des Gens, wie beispielsweise im *Body* oder in der 3'-UTR unterschiedliche Effekte auf die Genexpression haben. Auch

hier wurden einige Fälle beobachtet, in denen die Methylierung die Genexpression aktivieren kann. So wurde gezeigt, dass die DNAm am 3'-Ende einer CGI eine gewebespezifische Transkriptionsaktivierung während der Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen bewirken kann (Zhu *et al.*, 2016). Das Gen *ASH1L* besitzt seine Ziel-CpG-Stelle im *Body*. So lässt sich in diesem Fall erklären, dass die DNAm zusammen mit der mRNA-Expression im Alter anstieg.

4.6 Altersassoziierte Korrelation der *HOXA5*-Expression mit *TP53* und *PTEN*

Wie im vorherigen Kapitel 4.5 bereits diskutiert wurde, hat die DNAm für das Gen *HOXA5* mutmaßlich einen repressiven Einfluss und führt bei älteren Probanden zu einer verringerten Genexpression auf mRNA- und Proteinebene. Aufgrund der bekannten Interaktion von *HOXA5* mit *TP53* und *PTEN* (Stambolic *et al.*, 2001; Freeman *et al.*, 2003; Arderiu *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2017) wurde untersucht, ob bei diesen Genen auch eine altersassoziierte Änderung der Genexpression auf mRNA- und Proteinebene vorzuweisen ist.

HOXA5 und *TP53* zeigten eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression in der älteren Probandengruppe, während *PTEN* eine nicht signifikante Tendenz in die gleiche Richtung zeigte (Abbildung 16). Des Weiteren zeigte die Korrelationsanalyse eine moderate lineare Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *TP53* und *PTEN* mit *HOXA5* sowie zwischen *TP53* und *PTEN* (Abbildung 17). Auf Proteinebene war es nur möglich, *HOXA5* mit *PTEN* zu vergleichen. Wie auch bei *HOXA5* wurde bei *PTEN* eine signifikante Verringerung der Proteinexpression in der alten Probandengruppe festgestellt, zudem zeigten die beiden Gene eine moderate altersabhängige Korrelation auf Proteinebene zueinander (Abbildung 18).

Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die drei Gene *HOXA5*, *PTEN* und *TP53* mit zunehmendem Alter herunterreguliert werden. Die Resultate der Korrelationsanalysen werden durch Ergebnisse anderer Studien gestützt, welche eine Erhöhung der Stabilität, der Transkriptionsaktivität und des p53-Proteinspiegels durch sowohl direkte Bindung an *PTEN* als auch durch indirekte Bindung an *PTEN* über den Transkriptionskoaktivator *E1A-binding Protein p300/CREB-binding Protein (p300/CBP)* belegen (Freeman *et al.*, 2003; A. G. Li *et al.*, 2006).

Andere Studien zeigen wiederum eine Hochregulierung von *TP53* in Abwesenheit von *PTEN* (Chen *et al.*, 2005) bzw. eine regulierte Herunterregulierung von *PTEN* durch *HOXA5* in murinen Hämangiomzelllinien (Arderiu *et al.*, 2007). Allerdings wurden solche Studien nur in murinen Systemen und unter Krankheitszuständen wie induziertem Krebs durchgeführt und nicht unter physiologischen Bedingungen an menschlichen Probanden.

Bisher ist bekannt, dass *HOXA5* an der Regulation von *TP53* bei mehreren Krebsarten beteiligt ist. *HOXA5* fördert die Apoptose von Osteosarkomzellen und unterdrückt die Invasion von Lungenkrebszellen über den *TP53*-Signalweg (Chang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). Es wurde außerdem gezeigt, dass *HOXA5* als Tumorsuppressor bei Brustkrebs agiert, indem es die *TP53*-Transkription durch die Bindung an den *TP53*-Promotor transaktiviert (Raman *et al.*, 2000). Zudem ist die Promotorregion von *HOXA5* bei den meisten *TP53*-negativen Brusttumorproben methyliert. Es wird folglich angenommen, dass eine eingeschränkte Expression von *HOXA5* die Funktion von *TP53* einschränkt. Auch bei anderen Krebsentitäten wurde eine Korrelation zwischen der DNAm und der Expression von *HOXA5* beschrieben (Raman *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 2004). Beispielsweise ist eine Runterregulierung von *HOXA5* durch fehlerhafte DNAm im Promotorbereich in den meisten Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen beschrieben und bei der Entwicklung von Akuter Myeloischer Leukämie (AML) nachgewiesen worden (Strathdee *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008). *HOXA5* wurde außerdem als differentieller epigenetischer Biomarker zwischen malignen und benignen Gallengeweben diskutiert (Shu, 2011).

Die DNAm von *HOXA5* wurde nicht nur mit Krebs selbst in Verbindung gebracht, sondern auch mit dem Alter von Darmkrebspatienten (D. Li *et al.*, 2019). Bisher berichten jedoch nicht viele Studien über die altersbedingte DNAm oder mRNA-Expression von *HOXA5*, insbesondere nicht unter physiologischen Bedingungen in Studien mit gesunden Studienteilnehmern. Eine frühe Studie beschrieb eine altersbedingte verminderte Expression von Homöobox-Genen, wodurch sich fötale von erwachsenen menschlichen glatten Muskelzellen unterschieden (Miano *et al.*, 1996). Eine andere Studie, die *HOXA5* mit dem Altern in Verbindung brachte, zeigte, dass *HOXA5* bei der Lichtalterung der Haut unterschiedlich stark exprimiert wird (Yan *et al.*, 2013).

In Übereinstimmung mit Erkenntnissen früherer Studien liefern die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise darauf, dass die DNAm im Promotorbereich von *HOXA5* signifikant mit dem Alter zunimmt. Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an Monozyten von jungen

und alten Individuen durchgeführt, die im Alter mindestens 50 Jahre auseinander lagen. Es konnte nicht nur die Hypermethylierung des *HOXA5*-Promotors im Alter nachgewiesen werden, sondern auch gezeigt werden, dass diese Hypermethylierung mit einem gleichzeitigen Rückgang der *HOXA5*-Expression auf mRNA- und Proteinebene einhergeht. Dabei ist es nicht die Regel, anhand des Methylierungsstatus eines Gens Rückschlüsse auf dessen Proteinexpression ziehen zu können, da es viele weitere Faktoren gibt, die die Translation beeinflussen können, wie beispielsweise miRNAs (Bartel, 2004; He & Hannon, 2004; Oliveto *et al.*, 2017). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die Proteinexpression von *HOXA5* negativ mit dem Alter und der Methylierung der Promotorregion von *HOXA5* korreliert. Daher kann *HOXA5* als geeigneter Alterungsmarker qualifiziert werden.

Folglich kann angenommen werden, dass das Altern die Hauptursache für eine Hypermethylierung von *HOXA5* darstellt, welche eine Herunterregulierung der mRNA- und Proteinexpression von *HOXA5* mit sich bringt. Dies führt wiederum zu einer Herunterregulierung oder einem Verlust der *TP53*-Expression. Eine verminderte *HOXA5*-Expression, und eine folglich verminderte *TP53*-Expression, fördert die Entwicklung und das Fortschreiten verschiedener Krebsarten. Es wird daher postuliert, dass die Hypermethylierung von *HOXA5* in fortgeschrittenem Alter zur Herunterregulierung von *TP53* und in diesem Zusammenhang auch zum steigenden altersabhängigen Krebsrisiko bei älteren Menschen beitragen könnte.

4.7 Bedeutung der altersassoziierten, reduzierten Genexpression von *HOXA5*, *FHL2* und *RPA2*

Wie bereits in Kapitel 4.6 beschrieben, beeinträchtigt die altersbedingte epigenetische Repression von *HOXA5* die Regulation des Tumorsuppressors *TP53*. Da *HOXA5* in mehreren Tumorarten als *TP53*-aktivierender Tumorsuppressor fungiert, stellt eine reduzierte *HOXA5*-Genexpression im Alter einen potenziellen Mechanismus für die altersabhängige Krebsentstehung dar.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene altersabhängige Reduktion der *FHL2*-Expression könnte ebenso zur altersabhängigen Krebsentstehung beitragen, denn die Genexpression von *FHL2* ist bei Krebs häufig dereguliert, einschließlich Hoch- und Herunterregulierung bei verschiedenen Krebsarten (Kleiber *et al.*, 2007). In bestimmten Krebsarten wie Brustkrebs, Prostatakrebs, Rhabdomyosarkom und hepatozellulärem Karzinom

wurde eine reduzierte *FHL2*-Expression beobachtet, was auf eine mögliche tumorsuppressive Funktion hindeutet (J. Yan *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2015). Gleichzeitig wurde festgestellt, dass eine erhöhte *FHL2*-Expression in anderen Krebsarten wie dem Lungenadenokarzinom, dem Ovariakarzinom oder Leukämie mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Habibe *et al.*, 2021; Pan *et al.*, 2023). Zudem konnten Clemente-Olivo *et al.* zeigen, dass eine niedrige *FHL2*-Expression mit einem gesünderen metabolischen Zustand assoziiert ist, insbesondere im Hinblick auf Adipositas und altersbedingten Stoffwechselerkrankungen (Clemente-Olivo *et al.*, 2021).

Darüber hinaus ist *FHL2* an der Regulation zellulärer Signalwege beteiligt, darunter dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg, der eine zentrale Rolle für das Zellwachstum und die Tumorprogression spielt (Dahan *et al.*, 2013). Studien zeigen, dass *FHL2* über Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie β -Catenin und NF- κ B Einfluss auf Zellzyklus, Apoptose und Zelladhäsion nimmt (Huang *et al.*, 2019). Eine verminderte *FHL2*-Expression könnte somit zur Dysregulation dieser Prozesse im Alter führen.

FHL2 zeigt somit gewebs- und kontextabhängige Funktionen und in Abhängigkeit davon sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Eigenschaften, was *FHL2* zu einem besonders interessanten Kandidaten in der epigenetischen Alterungsforschung macht.

RPA2 spielt eine Schlüsselrolle in der DNA-Reparatur und -Replikation (Fanning *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2019). Eine altersabhängige verminderte Expression dieses Gens, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, könnte zur Akkumulation genomischer Schäden im Alter beitragen und die Entstehung altersbedingter Krankheiten, einschließlich Krebs, begünstigen. Außerdem spielt *RPA2* als Teil des RPA-Komplexes eine wichtige Rolle bei der Telomerreplikation und Regulation der Telomerlänge (Kochman *et al.*, 2024). Eine gestörte *RPA2*-Funktion kann daher zu einer Telomerverkürzung führen – ein zentrales Merkmal der zellulären Alterung (Chakravarti *et al.*, 2021).

Trotz der essenziellen Bedeutung von *RPA2* für die genomische Stabilität gibt es Hinweise darauf, dass eine Überexpression von *RPA2* mit dem Wachstum bestimmter Tumorarten assoziiert ist. Studien haben gezeigt, dass *RPA2* in verschiedenen Krebsarten wie Brustkrebs hochreguliert ist (C. Chen *et al.*, 2016; Algethami *et al.*, 2023). Die onkogenen Eigenschaften von *RPA2* resultieren unter anderem aus seiner Fähigkeit, die Zellproliferation zu fördern, Apoptose zu inhibieren und die DNA-Schadenreparatur zu stabilisieren – Prozesse, die auch in Krebszellen eine entscheidende Rolle spielen (C. Chen *et al.*, 2016).

Auch hier lässt sich zusammenfassen, dass die Rolle von *RPA2* als Tumorsuppressor oder Onkogen, ähnlich wie bei *FHL2*, komplex und kontextabhängig ist. Während eine verminderte Expression von *RPA2* zu einer erhöhten genomischen Instabilität führen und potenziell die Tumorentwicklung fördern kann, kann auch eine Überexpression von *RPA2* in Tumoren das Tumorwachstum fördern und die Apoptose unterdrücken.

4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Seneszenz eine Umstrukturierung der DNAm stattfindet, die mit einer signifikant veränderten Expression vieler Gene einhergeht. Ein besonderer Fokus lag dabei auf den Genen *HOXA5*, *FHL2* und *RPA2*, für die nicht nur eine signifikant erhöhte DNAm in der älteren Probandengruppe im Vergleich zur jungen Probandengruppe gezeigt werden konnte, sondern zudem reziprok dazu eine signifikant verminderte Genexpression auf mRNA- und Proteinebene. Diese Beobachtungen legen eine altersassoziierte epigenetische Repression dieser Gene nahe. Besonders bemerkenswert ist dabei, dass alle drei Gene in einem Zusammenhang mit der Entstehung und Progression maligner Tumoren stehen und in verschiedenen Krebsarten eine verminderte oder erhöhte Expression aufweisen. Dies könnte auf einen Mechanismus hinweisen, der sowohl mit dem Alterungsprozess selbst als auch mit der erhöhten Tumoranfälligkeit im Alter in Verbindung steht. Die hier gewonnenen Erkenntnisse könnten somit potenziell zur Identifikation neuer diagnostischer Marker oder therapeutischer Zielstrukturen beitragen, um altersassoziierte Erkrankungen – insbesondere Krebserkrankungen – besser zu verstehen und gezielter zu behandeln.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit die Notwendigkeit einer Validierung genomweiter Methylierungsdaten aufgezeigt werden, insbesondere dann, wenn ein geringer Stichprobenumfang bei der genomweiten Methylierungsanalyse vorliegt. Jedoch ist auch bei ausreichendem Stichprobenumfang eine Validierung in Form eines DBS empfehlenswert, da diese Methode hochauflösendere Informationen über die DNAm im Vergleich zum *MethylationEPIC BeadChip* Array liefert.

Gleichzeitig müssen jedoch ebenfalls die Limitationen dieser Arbeit berücksichtigt werden. Die genomweite Methylierungsanalyse basierte auf der DNA von lediglich vier jungen und vier alten Probanden. Es bleibt daher unklar, ob die beobachtete genomweite Tendenz zur Hypermethylierung tatsächlich altersbedingt ist oder ob sie zufällig mit individuellen Faktoren wie nicht erkannten Vorerkrankungen zusammenhängt. Um diese

Unsicherheit auszuräumen, wäre eine Wiederholung der Untersuchung mit einer größeren Kohorte erforderlich. Der Einsatz des *Infinium*[®] *MethylationEPIC BeadChip* Arrays in einer größeren Stichprobe war im Rahmen dieser Arbeit aus finanziellen Gründen nicht realisierbar.

Zudem bleiben die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich eines kausalen Zusammenhangs zwischen der altersbedingten Hypermethylierung und der verminderten Genexpression von *HOXA5*, *FHL2* und *RPA2* spekulativ. Zwar gibt es deutliche Hinweise darauf, dass die untersuchten CpG-Stellen in regulatorischen Regionen der drei Gene lokalisiert sind, was eine funktionale Relevanz nahelegt. Dennoch kann ein direkter Nachweis der regulatorischen Wirkung der DNAm an diesen Stellen nur durch funktionelle Ansätze wie episodale Reporter-Assays (Klug & Rehli, 2006), gezieltes epigenetisches Editieren mittels *dCas9-DNMT3A/TET1*-Fusionen (Liu *et al.*, 2016), sowie Methoden wie Methyl-Spec-seq zur Analyse methylierungsabhängiger Transkriptionsfaktorbindung (Zuo *et al.*, 2017) erfolgen. Zusätzlich könnte die Untersuchung von Histonmodifikationen weitere Erkenntnisse zur epigenetischen Regulation liefern. Durch den Einsatz von *ChIP-Seq* oder *ChIP-qPCR* könnten spezifische Histonmarkierungen wie H3K27ac oder H3K9me3 identifiziert werden (G. Li *et al.*, 2017; Kuhn & Østergaard, 2020). Solche Analysen waren jedoch aufgrund finanzieller Einschränkungen sowie dem Fehlen der benötigten Ressourcen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Zukünftige Studien sollten nicht nur eine größere Probandenzahl einbeziehen, sondern auch longitudinale Ansätze verfolgen, um individuelle altersbedingte Veränderungen der DNAm und Genexpression im Zeitverlauf zu erfassen. Zudem erscheint es sinnvoll, in künftigen Studien neben Monozyten oder anderen Zellen des peripheren Blutes auch verschiedene Gewebe in den Fokus zu rücken, um die beobachteten DNA-Methylierungsmuster und die einhergehenden Veränderungen in der Genexpression auch in verschiedenen Gewebetypen zu bestätigen.

Insgesamt leistet diese Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis altersassoziierter epigenetischer Veränderungen und bietet neue Erkenntnisse und Grundlagen, um den komplexen Zusammenhang zwischen der Seneszenz und epigenetischen Veränderungen weiter zu untersuchen.

5 Verzeichnisse

5.1 Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
A	Adenin
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ASCL2	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 2
ASH1L	ASH1 Like Histone Lysine Methyltransferase
BCA	Bicinchoninsäure
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CADPS2	Calcium Dependent Secretion Activator 2
CBP	CREB-binding protein
CD	Unterscheidungsgruppen (Engl. Cluster of Differentiation)
CEBPG	CCAAT Enhancer Binding Protein Gamma
CGI	CpG-Insel
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DBS	Deep Bisulfite Sequencing
DDO	D-Aspartate Oxidase
DMCG	differentiell methyliertes CpG
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAH9	Dynein Axonemal Heavy Chain 9
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DUSP3	Dual Specificity Phosphatase 3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
ESR2	Estrogen Receptor Beta
et al.	und andere (Lat. Et alii)
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FACS	Durchflusszytometrie (Engl. fluorescence-activated cell sorting)
FANTOM	Functional Annotation of the Mammalian Genome
FHL2	Four And A Half LIM Domains 2
FITC	Fluorescein
FOXO	Forkhead-Box-O
FSC	Vorwärtsstreulicht (Engl. Forward Scatter)
G	Guanin

Verzeichnisse

gDNA	genomische DNA
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDM	Histon-Demethylase
HES6	Hes Family BHLH Transcription Factor 6
HIC1	Hypermethylated in Cancer 1
HMT	Histon-Methyltransferase
HOXA5	Homeobox A5
IGF1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (Engl. Insulin-like Growth Factor 1)
IRF6	Interferon Regulatory Factor 6
miRNA	microRNA
MD	Methylierungsdifferenz
mRNA	messengerRNA
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier (Engl. Mammalian Target of Rapamycin)
NGS	Next Generation Sequencing
NRF2	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
Nt	Nukleotid
NWD1	NACHT And WD Repeat Domain Containing 1
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
OTUD7A	OTU Deubiquitinase 7A
PCA	Hauptkomponentenanalyse
P300	E1A binding protein p300 (Engl. Principal Component Analysis)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Engl. Polymerase Chain Reaction)
PDE1C	Phosphodiesterase 1C
PE	Phycoerythrin
POLR2A	DNA-gerichtete RNA-Polymerase II Untereinheit A
PRR16	Proline Rich 16
PRRT1	Proline Rich Transmembrane Protein 1
PTEN	Phosphatase- und Tensin-Homolog
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RBL2	Retinoblastoma-like Protein 2 (p130)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RORA	RAR-related Orphan Receptor Alpha
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPA2	Replication Protein A2
RTKN	Rhotekin
RYR1	Ryanodine Receptor 1
SAM	S-Adenosyl-Methionin
siRNA	Small Interfering RNA
SSC	Seitenstreulicht (Engl. Side Scatter)
T	Thymin

TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TFAP2B	Transcription Factor AP-2 Beta
TMTC1	Transmembrane and Tetratricopeptide Repeat Containing 1
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	Uracil
UCSC	University of California Santa Cruz
UHRF1	Ubiquitin-ähnliches PHD und Ringfingerdomänenenthaltendes Protein
ZNF123	Zinc Finger Protein 123
ZNF423	Zinc Finger Protein 423

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich zwischen krankheitsspezifischer Therapie und interventionsbasiertem Ansatz zur Verzögerung des Alterungsprozesses.	7
Abbildung 2: Darstellung der Cytosin-Methylierung in der DNA. DNMTs binden während der Methylierungsübertragung kovalent an das C6-Atom des Cytosinrings (grüner Pfeil).	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung der <i>Infinium</i> I und II Techniken des <i>Infinium</i> [®] <i>MethylationEPIC BeadChip</i>	21
Abbildung 4: Durchflusszytometrische Bestimmung der Monozyten am Beispiel der Probe Epi-J-9.....	43
Abbildung 5: Gelelektrophoretische Trennung der gDNA nach Silika-basierter Isolation aus Monozyten zur Überprüfung der Integrität.	48
Abbildung 6: Zelltypzusammensetzung der eingesetzten Proben.	52
Abbildung 7: Streudiagramm basierend auf den β -Werten der analysierten CpG-Stellen der jungen und alten Probanden.....	66
Abbildung 8: Anzahl der hyper- und hypomethylierten DMCG in alten Probanden.....	67
Abbildung 9: Annotation und Verteilung der DMCG.	68
Abbildung 10: Ergebnisse des <i>MethylationEPIC BeadChip</i> Microarray.	74
Abbildung 11: Ergebnisse des <i>Deep Bisulfite Sequencing</i>	75
Abbildung 12: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationen zwischen der Methylierung der jeweiligen Ziel-CpG-Stelle der Gene <i>FHL2</i> , <i>HOXA5</i> , <i>RPA2</i> , <i>DUSP3</i> , <i>RYR1</i> und <i>TMTC1</i> und dem Alter der Probanden.....	77
Abbildung 13: Ergebnisse der qRT-PCR der ausgewählten Gene.	78
Abbildung 14: Ergebnisse der ELISA-Messungen.....	80
Abbildung 15: Ergebnisse der Western Blot Analysen der Proteine HOXA5, FHL2 und RPA2.	81
Abbildung 16: Ergebnisse der qRT-PCR der Gene <i>HOXA5</i> , <i>TP53</i> und <i>PTEN</i>	82
Abbildung 17: Darstellung der altersabhängigen Korrelation der mRNA-Expression von <i>HOXA5</i> , <i>PTEN</i> und <i>TP53</i>	83
Abbildung 18: Darstellung der altersabhängigen Korrelation der Proteinexpression von HOXA5 und PTEN.	85

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete kommerzielle Kits.	25
Tabelle 2: Verwendete ELISA-Kits.	25
Tabelle 3: Verwendete <i>TaqMan</i> [®] <i>Gene Expression Assays</i>	26
Tabelle 4: Verwendete <i>TaqMan</i> [®] <i>Gene Expression Assays</i> , designt mit dem <i>Custom TaqMan</i> [®] <i>Assay Design Tool</i>	27
Tabelle 5: Region-spezifische Primer, die für das <i>Deep Bisulfite Sequencing</i> verwendet wurden.	27
Tabelle 6: Verwendetes Probenmaterial.	28
Tabelle 7: Verwendete Antikörper, rekombinante Proteine, Peptide und Zelllysate.	29
Tabelle 8: Verwendete Reagenzien mit Herstellerangabe.	30
Tabelle 9: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen mit Angabe der jeweiligen Zusammensetzung.	32
Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	34
Tabelle 11: Verwendete Geräte und Apparaturen.	36
Tabelle 12: Verwendete Software, Programme und Datenbanken.	37
Tabelle 13: Wichtige Daten zu den Probanden, deren BS-DNA für das <i>MethylationEPIC BeadChip</i> Array eingesetzt wurde.	50
Tabelle 14: Laufbedingungen für die PCR zur Erstellung von Amplikons zur Bisulfite-Sequenzierung.	54
Tabelle 15: Ablauf der cDNA-Synthese im Thermocycler.	56
Tabelle 16: Zusammensetzung der Vorverdünnungen für die Standardreihe der qRT-PCR.	58
Tabelle 17: Pipettierschema für die Standardreihe der qRT-PCR.	58
Tabelle 18: Programmierung des <i>7500 Real Time PCR Systems</i> für die qRT-PCR.	59
Tabelle 19: Pipettierschema für die Vorverdünnung des ELISA-Standards.	61
Tabelle 20: Pipettierschema für die Standardreihe des ELISA.	61
Tabelle 21: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel mit verschiedenen Anteilen Acrylamid.	62
Tabelle 22: Nomenklatur und Definitionen für die Genregionen der CpG-Stellen.	69
Tabelle 23: Ausgewählte DMCG für weiterführende Untersuchungen.	70
Tabelle 24: Wichtige Daten zu den Probanden, die freiwillig Blut für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben.	129
Tabelle 25: Primerdesign für das <i>Deep Bisulfite Sequencing</i>	131

Tabelle 26: Auflistung aller 1481 DMCG, die durch das *Infinium*[®] *MethylationEPIC* *BeadChip* Microarray gefunden wurden..... 133

5.4 Literaturverzeichnis

1. Ackermann, M., Chao, L., Bergstrom, C. T. & Doebeli, M. (2007). On the evolutionary origin of aging. *Aging Cell*, 6(2), 235–244. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00281.x>
2. Alam, H., Gu, B. & Lee, M. G. (2015). Histone methylation modifiers in cellular signaling pathways. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 72(23), 4577–4592. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2023-y>
3. Algethami, M., Toss, M. S., Woodcock, C. L., Jaipal, C., Brownlie, J., Shoqafi, A., Alblihy, A., Mesquita, K. A., Green, A. R., Mongan, N. P., Jeyapalan, J. N., Rakha, E. A. & Madhusudan, S. (2023). Unravelling the clinicopathological and functional significance of replication protein A (RPA) heterotrimeric complex in breast cancers. *Npj Breast Cancer*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41523-023-00524-3>
4. *Alliance of Genome Resources*. (o. D.). <https://www.alliancegenome.org/>
5. Aran, D., Sirota, M. & Butte, A. J. (2015). Systematic pan-cancer analysis of tumour purity. *Nature Communications*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms9971>
6. Arderiu, G., Cuevas, I., Chen, A., Carrio, M., East, L. & Boudreau, N. J. (2007). HOXA5 stabilizes adherens junctions via increased AKT1. *Cell Adhesion & Migration*, 1(4), 185–195. <https://doi.org/10.4161/cam.1.4.5448>
7. Aref-Eshghi, E., Schenkel, L. C., Carere, D. A., Rodenhiser, D. I. & Sadikovic, B. (2018). Epigenomic Mechanisms of Human Developmental Disorders. In *Elsevier eBooks* (S. 837–859). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812215-0.00027-3>
8. Ashpole, N. M., Sanders, J. E., Hodges, E. L., Yan, H. & Sonntag, W. E. (2014). Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging brain. *Experimental Gerontology*, 68, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.10.002>
9. Assenov, Y., Müller, F., Lutsik, P., Walter, J., Lengauer, T. & Bock, C. (2014). Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. *Nature Methods*, 11(11), 1138–1140. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3115>
10. Austad, S. N. & Hoffman, J. M. (2018). Is antagonistic pleiotropy ubiquitous in aging biology? *Evolution Medicine And Public Health*, 2018(1), 287–294. <https://doi.org/10.1093/emph/eoy033>
11. Bárcena, C., Mayoral, P. & Quirós, P. M. (2018). Mitohormesis, an Antiaging Paradigm. *International Review Of Cell And Molecular Biology*, 35–77. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.002>
12. Barrett, L. W., Fletcher, S. & Wilton, S. D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 69(21), 3613–3634. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0990-9>
13. Barski, A., Cuddapah, S., Kartashov, A. V., Imamichi, H., Yang, W., Peng, W., Lane, H. & Zhao, K. (2014). Epigenetic regulation of gene expression and cellular differentiation. *Molecular Pain*, 10(Suppl 1), O20. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-s1-o20>
14. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
15. Barter, M., Bui, C. & Young, D. (2012). Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis And Cartilage*, 20(5), 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.12.012>
16. Baur, E. & Trümppler, G. (1914). Über die colorimetrische Bestimmung von Kreatin. *European Food Research And Technology*, 27(10), 697–713. <https://doi.org/10.1007/bf02079152>
17. Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., Delano, D., Zhang, L., Schroth, G. P., Gunderson, K. L., Fan, J. & Shen, R. (2011). High density DNA methylation

- array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98(4), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.07.007>
18. Boland, M. J., Nazor, K. L. & Loring, J. F. (2014). Epigenetic Regulation of Pluripotency and Differentiation. *Circulation Research*, 115(2), 311–324. <https://doi.org/10.1161/circresaha.115.301517>
 19. Bonkowski, M. S., Rocha, J. S., Masternak, M. M., Regaiey, K. A. A. & Bartke, A. (2006). Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 103(20), 7901–7905. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600161103>
 20. Bostick, M., Kim, J. K., EstèVe, P., Clark, A., Pradhan, S. & Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells. *Science*, 317(5845), 1760–1764. <https://doi.org/10.1126/science.1147939>
 21. Boyle, P. & Després, C. (2010). Dual-function transcription factors and their entourage. *Plant Signaling & Behavior*, 5(6), 629–634. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11570>
 22. Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S. & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature*, 369(6483), 756–758. <https://doi.org/10.1038/369756a0>
 23. Bunkar, N., Pathak, N., Lohiya, N. K. & Mishra, P. K. (2016). Epigenetics: A key paradigm in reproductive health. *Daehan Saengsik Uihak Hoeji/Clinical And Experimental Reproductive Medicine*, 43(2), 59. <https://doi.org/10.5653/cerm.2016.43.2.59>
 24. Cabelof, D. C., Raffoul, J. J., Ge, Y., Van Remmen, H., Matherly, L. H. & Heydari, A. R. (2006). Age-Related Loss of the DNA Repair Response Following Exposure to Oxidative Stress. *The Journals Of Gerontology Series A*, 61(5), 427–434. <https://doi.org/10.1093/gerona/61.5.427>
 25. Cain, J. A., Montibus, B. & Oakey, R. J. (2022). Intragenic CpG Islands and Their Impact on Gene Regulation. *Frontiers in Cell And Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.832348>
 26. Cao, K., Blair, C. D., Faddah, D. A., Kieckhaefer, J. E., Olive, M., Erdos, M. R., Nabel, E. G. & Collins, F. S. (2011). Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *Journal Of Clinical Investigation*, 121(7), 2833–2844. <https://doi.org/10.1172/jci43578>
 27. Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R. S. & Zhang, Y. (2002). Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing. *Science*, 298(5595), 1039–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1076997>
 28. Carter, C. W. (1978). Histone packing in the nucleosome core particle of chromatin. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 75(8), 3649–3653. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.8.3649>
 29. Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
 30. Cave, C. (2021, 8. April). *Think everyone died young in ancient societies? Think again | Aeon Ideas*. Aeon. <https://aeon.co/ideas/think-everyone-died-young-in-ancient-societies-think-again>
 31. Chakravarti, D., LaBella, K. A. & DePinho, R. A. (2021). Telomeres: history, health, and hallmarks of aging. *Cell*, 184(2), 306–322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.028>
 32. Chang, C., Chen, Y., Hsieh, C., Liu, Y., Yu, S., Chen, J. J. & Wang, C. (2017). HOXA5 and p53 cooperate to suppress lung cancer cell invasion and serve as good prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Journal Of Cancer*, 8(6), 1071–1081. <https://doi.org/10.7150/jca.17295>

33. Chédin, F., Lieber, M. R. & Hsieh, C. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99(26), 16916–16921. <https://doi.org/10.1073/pnas.262443999>
34. Chen, C., Juan, C., Chen, K., Chang, Y., Lee, J. & Chang, M. (2016). Upregulation of RPA2 promotes NF- κ B activation in breast cancer by relieving the antagonistic function of menin on NF- κ B-regulated transcription. *Carcinogenesis*, bgw123. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw123>
35. Chen, J., Potlapalli, R., Quan, H., Chen, L., Xie, Y., Pouriyeh, S., Sakib, N., Liu, L. & Xie, Y. (2024). Exploring DNA Damage and Repair Mechanisms: A Review with Computational Insights. *BioTech*, 13(1), 3. <https://doi.org/10.3390/biotech13010003>
36. Chen, Y., Yang, T., Zhou, B., Yang, M., Feng, H. & Wang, Y. (2018). HOXA5 overexpression promotes osteosarcoma cell apoptosis through the p53 and p38 α MAPK pathway. *Gene*, 689, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.081>
37. Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P. P. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436(7051), 725–730. <https://doi.org/10.1038/nature03918>
38. Clemente-Olivo, M. P., Habibe, J. J., Vos, M., Ottenhoff, R., Jongejan, A., Herrema, H., Zelcer, N., Kooijman, S., Rensen, P. C., Van Raalte, D. H., Nieuwdorp, M., Eringa, E. C. & De Vries, C. J. (2021). Four-and-a-half LIM domain protein 2 (FHL2) deficiency protects mice from diet-induced obesity and high FHL2 expression marks human obesity. *Metabolism*, 121, 154815. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154815>
39. Collerton, J., Gautrey, H. E., Van Otterdijk, S. D., Davies, K., Martin-Ruiz, C., Von Zglinicki, T., Kirkwood, T. B. L., Jagger, C., Mathers, J. C. & Strathdee, G. (2014). Acquisition of aberrant DNA methylation is associated with frailty in the very old: findings from the Newcastle 85+ Study. *Biogerontology*, 15(4), 317–328. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9500-9>
40. Dahan, J., Nouët, Y., Jouvion, G., Levillayer, F., Adib-Conquy, M., Cassard-Doulcier, A., Tebbi, A., Blanc, F., Remy, L., Chen, J., Cairo, S., Werts, C., Si-Tahar, M., Tordjmann, T., Buendia, M. & Wei, Y. (2013). LIM-Only Protein FHL2 Activates NF- κ B Signaling in the Control of Liver Regeneration and Hepatocarcinogenesis. *Molecular And Cellular Biology*, 33(16), 3299–3308. <https://doi.org/10.1128/mcb.00105-13>
41. Davis, T. A., Bales, C. W. & Beauchene, R. E. (1983). Differential effects of dietary caloric and protein restriction in the aging rat. *Experimental Gerontology*, 18(6), 427–435. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(83\)90021-9](https://doi.org/10.1016/0531-5565(83)90021-9)
42. Davis, T., Wyllie, F. S., Rokicki, M. J., Bagley, M. C. & Kipling, D. G. (2007). The Role of Cellular Senescence in Werner Syndrome. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1100(1), 455–469. <https://doi.org/10.1196/annals.1395.051>
43. Deaton, A. M. & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25(10), 1010–1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
44. Delcuve, G. P., Rastegar, M. & Davie, J. R. (2009). Epigenetic control. *Journal Of Cellular Physiology*, 219(2), 243–250. <https://doi.org/10.1002/jcp.21678>
45. Dias, H. C., Cunha, E., Real, F. C. & Manco, L. (2020). Age prediction in living: Forensic epigenetic age estimation based on blood samples. *Legal Medicine*, 47, 101763. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2020.101763>
46. Dirks, R. A. M., Stunnenberg, H. G. & Marks, H. (2016). Genome-wide epigenomic profiling for biomarker discovery. *Clinical Epigenetics*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0284-4>
47. Dong, X., Milholland, B. & Vijg, J. (2016). Evidence for a limit to human lifespan. *Nature*, 538(7624), 257–259. <https://doi.org/10.1038/nature19793>

-
48. Drinkwater, R. D., Blake, T. J., Morley, A. A. & Turner, D. R. (1989). Human lymphocytes aged in vivo have reduced levels of methylation in transcriptionally active and inactive DNA. *Mutation Research/DNAging*, 219(1), 29–37. [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(89\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0921-8734(89)90038-6)
 49. Dunn, J., Qiu, H., Kim, S., Jjingo, D., Hoffman, R., Kim, C. W., Jang, I., Son, D. J., Kim, D., Pan, C., Fan, Y., Jordan, I. K. & Jo, H. (2014). Flow-dependent epigenetic DNA methylation regulates endothelial gene expression and atherosclerosis. *Journal Of Clinical Investigation*, 124(7), 3187–3199. <https://doi.org/10.1172/jci74792>
 50. Edwards, J. R., O'Donnell, A. H., Rollins, R. A., Peckham, H. E., Lee, C., Milekic, M. H., Chanrion, B., Fu, Y., Su, T., Hibshoosh, H., Gingrich, J. A., Haghghi, F., Nutter, R. & Bestor, T. H. (2010). Chromatin and sequence features that define the fine and gross structure of genomic methylation patterns. *Genome Research*, 20(7), 972–980. <https://doi.org/10.1101/gr.101535.109>
 51. Endicott, J. L., Nolte, P. A., Shen, H. & Laird, P. W. (2022). Cell division drives DNA methylation loss in late-replicating domains in primary human cells. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34268-8>
 52. Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21(35), 5427–5440. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205600>
 53. Fanning, E., Klimovich, V. & Nager, A. R. (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Research*, 34(15), 4126–4137. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl550>
 54. Feiner, L., Tierling, S., Holländer, S., Glanemann, M. & Rubie, C. (2021). An aging and p53 related marker: HOXA5 promoter methylation negatively correlates with mRNA and protein expression in old age. *Aging*, 13(4), 4831–4849. <https://doi.org/10.18632/aging.202621>
 55. Felsenfeld, G. (2014). The Evolution of Epigenetics. *Perspectives in Biology And Medicine*, 57(1), 132–148. <https://doi.org/10.1353/pbm.2014.0004>
 56. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>
 57. Finch, C. E. & Austad, S. N. (2012). Primate aging in the mammalian scheme: the puzzle of extreme variation in brain aging. *AGE*, 34(5), 1075–1091. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9355-9>
 58. Fishilevich, S., Zimmerman, S., Kohn, A., Stein, T. I., Olender, T., Kolker, E., Safran, M. & Lancet, D. (2016). Genic insights from integrated human proteomics in GeneCards. *Database*, 2016, baw030. <https://doi.org/10.1093/database/baw030>
 59. Florath, I., Butterbach, K., Muller, H., Bewerunge-Hudler, M. & Brenner, H. (2013). Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Human Molecular Genetics*, 23(5), 1186–1201. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt531>
 60. Franceschi, C., Garagnani, P., Gensous, N., Bacalini, M. G., Conte, M. & Salvioli, S. (2019). Accelerated bio-cognitive aging in Down syndrome: State of the art and possible deceleration strategies. *Aging Cell*, 18(3). <https://doi.org/10.1111/accel.12903>
 61. Freeman, D. J., Li, A. G., Wei, G., Li, H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A. D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R. D., Liu, X. & Wu, H. (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*, 3(2), 117–130. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00021-7](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00021-7)

62. Fuke, C., Shimabukuro, M., Petronis, A., Sugimoto, J., Oda, T., Miura, K., Miyazaki, T., Ogura, C., Okazaki, Y. & Jinno, Y. (2004). Age Related Changes in 5-methylcytosine Content in Human Peripheral Leukocytes and Placentas: an HPLC-based Study. *Annals Of Human Genetics*, 68(3), 196–204. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2004.00081.x>
63. Gao, X., Chandra, T., Gratton, M., QuéLo, I., Prud'homme, J., Stifani, S. & St-Arnaud, R. (2001). HES6 acts as a transcriptional repressor in myoblasts and can induce the myogenic differentiation program. *The Journal Of Cell Biology*, 154(6), 1161–1172. <https://doi.org/10.1083/jcb.200104058>
64. Garagnani, P., Bacalini, M. G., Pirazzini, C., Gori, D., Giuliani, C., Mari, D., Di Blasio, A. M., Gentilini, D., Vitale, G., Collino, S., Rezzi, S., Castellani, G., Capri, M., Salvioli, S. & Franceschi, C. (2012). Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell*, 11(6), 1132–1134. <https://doi.org/10.1111/accel.12005>
65. Georgiou, C. D. & Papapostolou, I. (2006). Assay for the quantification of intact/fragmented genomic DNA. *Analytical Biochemistry*, 358(2), 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.07.035>
66. Givalos, N., Gakiopoulou, H., Skliri, M., Bousboukea, K., Konstantinidou, A. E., Korkolopoulou, P., Lelouda, M., Kouraklis, G., Patsouris, E. & Karatzas, G. (2007). Replication protein A is an independent prognostic indicator with potential therapeutic implications in colon cancer. *Modern Pathology*, 20(2), 159–166. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800719>
67. Goldsmith, T. C. (2016). Evolution of aging theories: Why modern programmed aging concepts are transforming medical research. *Biochemistry (Moscow)*, 81(12), 1406–1412. <https://doi.org/10.1134/s0006297916120026>
68. Goll, M. G. & Bestor, T. H. (2005). EUKARYOTIC CYTOSINE METHYLTRANSFERASES. *Annual Review Of Biochemistry*, 74(1), 481–514. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721>
69. Gries, J., Schumacher, D., Arand, J., Lutsik, P., Markelova, M. R., Fichtner, I., Walter, J., Sers, C. & Tierling, S. (2013). Bi-PROF. *Epigenetics*, 8(7), 765–771. <https://doi.org/10.4161/epi.25242>
70. Grunau, C. (2001). Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Research*, 29(13), 65e–665. <https://doi.org/10.1093/nar/29.13.e65>
71. Guo, J., Huang, X., Dou, L., Yan, M., Shen, T., Tang, W. & Li, J. (2022). Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01251-0>
72. Habibe, J. J., Clemente-Olivo, M. P. & De Vries, C. J. (2021). How (Epi)Genetic Regulation of the LIM-Domain Protein FHL2 Impacts Multifactorial Disease. *Cells*, 10(10), 2611. <https://doi.org/10.3390/cells10102611>
73. Handy, D. E., Castro, R. & Loscalzo, J. (2011). Epigenetic modifications. *Circulation*, 123(19), 2145–2156. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.956839>
74. Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T. & Zhang, K. (2012). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Molecular Cell*, 49(2), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>
75. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458–460. <https://doi.org/10.1038/345458a0>
76. Harlow, M. (2004). K. Cokayne, Experiencing Old Age in Ancient Rome. London: Routledge, 2003. Pp. ix + 238, 14 pls. ISBN 0-415-29914-4. £50.00. - T. G. Parkin, Old Age in the Roman World. A Cultural and Social History. Baltimore/London: Johns Hopkins University Press, 2003. Pp. xiii + 495, 9 tables, 3 figs, ISBN 0-8018-7128-X. £40.50. *The Journal Of Roman Studies*, 94, 196–197. <https://doi.org/10.2307/4135020>

77. Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal Of Gerontology*, 11(3), 298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
78. Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., Nadon, N. L., Wilkinson, J. E., Frenkel, K., Carter, C. S., Pahor, M., Javors, M. A., Fernandez, E. & Miller, R. A. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460(7253), 392–395. <https://doi.org/10.1038/nature08221>
79. Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
80. He, L. & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522–531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>
81. He, S. & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*, 169(6), 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
82. Heard, E. & Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. *Cell*, 157(1), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045>
83. Heyn, H., Li, N., Ferreira, H. J., Moran, S., Pisano, D. G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J. V., Setien, F., Carmona, F. J., Puca, A. A., Sayols, S., Pujana, M. A., Serra-Musach, J., Iglesias-Platas, I., Formiga, F., Fernandez, A. F., Fraga, M. F., Heath, S. C., . . . Esteller, M. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(26), 10522–10527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120658109>
84. Hoffmann, J. P. & Richterich, R. (1970). Die Eliminierung von Trübungen bei der Bestimmung von Plasma-Proteinen mit dem Biuret-Reagenz. *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine (CCLM)*, 8(6), 595–598. <https://doi.org/10.1515/cclm.1970.8.6.595>
85. Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*, 14(10). <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
86. Huang, Z., Li, Q., Luo, K., Zhang, Q., Geng, J., Zhou, X., Xu, Y., Qian, M., Zhang, J., Ji, L. & Wu, J. (2019). miR-340-FHL2 axis inhibits cell growth and metastasis in ovarian cancer. *Cell Death And Disease*, 10(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1604-3>
87. Hwangbo, D., Lee, H., Abozaid, L. S. & Min, K. (2020). Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. *Nutrients*, 12(4), 1194. <https://doi.org/10.3390/nu12041194>
88. Ivashkiv, L. B. & Park, S. H. (2016). Epigenetic Regulation of Myeloid Cells. *Microbiology Spectrum*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mchd-0010-2015>
89. Jabbari, K. & Bernardi, G. (2004). Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene*, 333, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.02.043>
90. Jain, N., Li, J. L., Tong, L., Jasmine, F., Kibriya, M. G., Demanelis, K., Oliva, M., Chen, L. S. & Pierce, B. L. (2024). DNA methylation correlates of chronological age in diverse human tissue types. *Epigenetics & Chromatin*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13072-024-00546-6>
91. Jia, K., Chen, D. & Riddle, D. L. (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development*, 131(16), 3897–3906. <https://doi.org/10.1242/dev.01255>
92. Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L. P., Mohan, S., Rataul, M., O’Keefe, C., Sekeres, M., Sauntharajah, Y. & Maciejewski, J. P. (2008). Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*, 113(6), 1315–1325. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-163246>
93. Johnson, A. A., Akman, K., Calimport, S. R., Wuttke, D., Stolzing, A. & De Magalhães, J. P. (2012). The Role of DNA Methylation in Aging, Rejuvenation, and Age-Related Disease. *Rejuvenation Research*, 15(5), 483–494. <https://doi.org/10.1089/rej.2012.1324>
94. Jones, M. J., Goodman, S. J. & Kobor, M. S. (2015). DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell*, 14(6), 924–932. <https://doi.org/10.1111/accel.12349>

95. Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
96. Jung, M. & Pfeifer, G. P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0118-4>
97. Kaeberlein, M., Rabinovitch, P. S. & Martin, G. M. (2015). Healthy aging: The ultimate preventative medicine. *Science*, 350(6265), 1191–1193. <https://doi.org/10.1126/science.aad3267>
98. Kanakis, D., Levidou, G., Gakiopoulou, H., Eftichiadis, C., Thymara, I., Fragkou, P., Trigka, E., Boviatsis, E., Patsouris, E. & Korkolopoulou, P. (2011). Replication protein A: a reliable biologic marker of prognostic and therapeutic value in human astrocytic tumors. *Human Pathology*, 42(10), 1545–1553. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.12.018>
99. Kananen, L., Surakka, I., Pirkola, S., Suvisaari, J., Lönnqvist, J., Peltonen, L., Ripatti, S. & Hovatta, I. (2010). Childhood Adversities Are Associated with Shorter Telomere Length at Adult Age both in Individuals with an Anxiety Disorder and Controls. *PLoS ONE*, 5(5), e10826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010826>
100. Kapahi, P., Chen, D., Rogers, A. N., Katewa, S. D., Li, P. W., Thomas, E. L. & Kockel, L. (2010). With TOR, Less Is More: A Key Role for the Conserved Nutrient-Sensing TOR Pathway in Aging. *Cell Metabolism*, 11(6), 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.001>
101. Kapahi, P., Zid, B. M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V. & Benzer, S. (2004). Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Current Biology*, 14(10), 885–890. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.059>
102. Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M. & Haussler, A. D. (2002). The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research*, 12(6), 996–1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
103. Kim, D., Kim, M., Lee, J., Lee, S., Choi, J., Yoon, G., Na, Y., Hong, H., Kim, S., Choi, J., Lee, S. & Park, J. (2009). Epigenetic inactivation of Homeobox A5 gene in nonsmall cell lung cancer and its relationship with clinicopathological features. *Molecular Carcinogenesis*, 48(12), 1109–1115. <https://doi.org/10.1002/mc.20561>
104. Kirkwood, T. B. L. & Holliday, R. (1979). The evolution of ageing and longevity. *Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B, Biological Sciences*, 205(1161), 531–546. <https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0083>
105. Kirkwood, T. B. L. & Kowald, A. (2012). The free-radical theory of ageing – older, wiser and still alive. *BioEssays*, 34(8), 692–700. <https://doi.org/10.1002/bies.201200014>
106. Kleiber, K., Strebhardt, K. & Martin, B. T. (2007, 1. Januar). *The Biological Relevance of FHL2 in Tumour Cells and its Role as a Putative Cancer Target*. Anticancer Research. <https://ar.iijournals.org/content/27/1A/55.long>
107. Klose, R. J. & Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.12.008>
108. Klug, M. & Rehli, M. (2006). Functional Analysis of Promoter CPG-Methylation using a CpG-Free Luciferase Reporter Vector. *Epigenetics*, 1(3), 127–130. <https://doi.org/10.4161/epi.1.3.3327>
109. Knapp, V. J. (1998). Life Expectancy, Infant Mortality and Malnutrition in Preindustrial Europe: A Contemporary Explanation. *Nutrition And Health*, 12(2), 89–95. <https://doi.org/10.1177/026010609801200201>
110. Kochman, R., Ba, I., Yates, M., Pirabakaran, V., Gourmelon, F., Churikov, D., Lafaille, M., Kermasson, L., Hamelin, C., Marois, I., Jourquin, F., Braud, L., Bechara, M., Lainey, E., Nunes, H., Breton, P., Penhouet, M., David, P., Géli, V., . . . Coulon, S. (2024). Heterozygous RPA2 variant as a novel genetic cause of telomere biology disorders. *Genes & Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.352032.124>

111. Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
112. Krossa, I., Strub, T., Martel, A., Nahon-Esteve, S., Lassalle, S., Hofman, P., Baillif, S., Ballotti, R. & Bertolotto, C. (2022). Recent advances in understanding the role of HES6 in cancers. *Theranostics*, 12(9), 4374–4385. <https://doi.org/10.7150/thno.72966>
113. Kuhn, A. & Østergaard, L. (2020). Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) to Assess Histone Marks in Auxin-treated Arabidopsis thaliana Inflorescence Tissue. *BIO-PROTOCOL*, 10(23). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3832>
114. Kwabi-Addo, B., Chung, W., Shen, L., Ittmann, M., Wheeler, T., Jelinek, J. & Issa, J. J. (2007). Age-Related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Clinical Cancer Research*, 13(13), 3796–3802. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-0085>
115. Lai, Y., Zhu, M., Wu, W., Rokutanda, N., Togashi, Y., Liang, W. & Ohta, T. (2019). HERC2 regulates RPA2 by mediating ATR-induced Ser33 phosphorylation and ubiquitin-dependent degradation. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50812-x>
116. Lee, K. & Hayes, J. J. (1998). Linker DNA and H1-Dependent Reorganization of Histone–DNA Interactions within the Nucleosome. *Biochemistry*, 37(24), 8622–8628. <https://doi.org/10.1021/bi980499y>
117. Lehmann, U. (2010). DNA-Methylierung. *Der Pathologe*, 31(S2), 274–279. <https://doi.org/10.1007/s00292-010-1300-7>
118. Lequin, R. M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12), 2415–2418. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>
119. Levidou, G., Gakiopoulou, H., Kavantzias, N., Saetta, A. A., Karlou, M., Pavlopoulos, P., Thymara, I., Diamantopoulou, K., Patsouris, E. & Korkolopoulou, P. (2010). Prognostic significance of replication protein A (RPA) expression levels in bladder urothelial carcinoma. *BJU International*, 108(2b). <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.2010.09828.x>
120. Li, A. G., Piluso, L. G., Cai, X., Wei, G., Sellers, W. R. & Liu, X. (2006). Mechanistic Insights into Maintenance of High p53 Acetylation by PTEN. *Molecular Cell*, 23(4), 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.028>
121. Li, D., Bai, Y., Feng, Z., Li, W., Yang, C., Guo, Y., Lin, C., Zhang, Y., He, Q., Hu, G. & Li, X. (2019). Study of Promoter Methylation Patterns of HOXA2, HOXA5, and HOXA6 and Its Clinicopathological Characteristics in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00394>
122. Li, E. & Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5), a019133. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133>
123. Li, G., Jagadeeswaran, G., Mort, A. & Sunkar, R. (2017). ChIP-Seq Analysis for Identifying Genome-Wide Histone Modifications Associated with Stress-Responsive Genes in Plants. *Methods in Molecular Biology*, 139–149. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7136-7_8
124. Li, Y. & Tollefsbol, T. O. (2011). DNA methylation detection: Bisulfite Genomic sequencing analysis. *Methods in Molecular Biology*, 11–21. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_2
125. Li, Y. & Tollefsbol, T. O. (2016). Age-Related Epigenetic Drift and Phenotypic Plasticity Loss: Implications in Prevention of Age-Related Human Diseases. *Epigenomics*, 8(12), 1637–1651. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0078>
126. Liang, Y., Gao, Y., Hua, R., Lu, M., Chen, H., Wang, Z., Li, L., Hu, K., Yin, Y., Xu, K., Gao, H., Liu, Q., Qiu, Y. & Wang, Z. (2021). Calorie intake rather than food quantity consumed is the key factor for the anti-aging effect of calorie restriction. *Aging*, 13(17), 21526–21546. <https://doi.org/10.18632/aging.203493>

-
127. Liaw, H., Lee, D. & Myung, K. (2011). DNA-PK-Dependent RPA2 Hyperphosphorylation Facilitates DNA Repair and Suppresses Sister Chromatid Exchange. *PLoS ONE*, 6(6), e21424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021424>
128. Liu, X. S., Wu, H., Ji, X., Stelzer, Y., Wu, X., Czauderna, S., Shu, J., Dadon, D., Young, R. A. & Jaenisch, R. (2016). Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell*, 167(1), 233–247.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.056>
129. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
130. Longo, V. D., Mitteldorf, J. & Skulachev, V. P. (2005). Programmed and altruistic ageing. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 866–872. <https://doi.org/10.1038/nrg1706>
131. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
132. Maeder, M. L., Angstman, J. F., Richardson, M. E., Linder, S. J., Cascio, V. M., Tsai, S. Q., Ho, Q. H., Sander, J. D., Reyon, D., Bernstein, B. E., Costello, J. F., Wilkinson, M. F. & Joung, J. K. (2013). Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nature Biotechnology*, 31(12), 1137–1142. <https://doi.org/10.1038/nbt.2726>
133. Malberg, K. (2012). Stress im Kindesalter beschleunigt das Altern. *MMW - Fortschritte der Medizin*, 154(9), 41. <https://doi.org/10.1007/s15006-012-0583-4>
134. Mann, M. R. & Bartolomei, M. S. (2002). Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biology*, 3(2), reviews1003.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-2-reviews1003>
135. Martin, D. W. (1986). Regulation der Genexpression. In *Springer eBooks* (S. 473–490). https://doi.org/10.1007/978-3-662-07733-7_31
136. Martin, G. M. (2005). Epigenetic drift in aging identical twins. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 102(30), 10413–10414. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504743102>
137. McCabe, M. T., Brandes, J. C. & Vertino, P. M. (2009). Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Clinical Cancer Research*, 15(12), 3927–3937. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2784>
138. McKinnon, M. (2018, 10. Januar). New Research Dispels the Myth That Ancient Cultures Had Universally Short Lifespans. *Smithsonian Magazine*. <https://www.smithsonian-mag.com/smartnews-history-archaeology/identifying-elderly-remains-just-got-easier-180967789/>
139. Meharena, H. S., Marco, A., Dileep, V., Lockshin, E. R., Akatsu, G. Y., Mullahoo, J., Watson, L. A., Ko, T., Guerin, L. N., Abdurrob, F., Rengarajan, S., Papanastasiou, M., Jaffe, J. D. & Tsai, L. (2022). Down-syndrome-induced senescence disrupts the nuclear architecture of neural progenitors. *Cell Stem Cell*, 29(1), 116–130.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.12.002>
140. Mercado-Sáenz, S., Ruiz-Gómez, M. J., Morales-Moreno, F. & Martínez-Morillo, M. (2010). Cellular aging: theories and technological influence. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 53(6), 1319–1332. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132010000600008>
141. Miano, J. M., Firulli, A. B., Olson, E. N., Hara, P., Giachelli, C. M. & Schwartz, S. M. (1996). Restricted expression of homeobox genes distinguishes fetal from adult human smooth muscle cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 93(2), 900–905. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.900>
142. Miyata, K., Naito, M., Miyata, T., Mokuda, S. & Asahara, H. (2017). Bisulfite Sequencing for DNA Methylation Analysis of Primary Muscle Stem Cells. *Methods in Molecular Biology*, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7283-8_1

143. Modig, K., Andersson, T., Vaupel, J., Rau, R. & Ahlbom, A. (2017). How long do centenarians survive? Life expectancy and maximum lifespan. *Journal Of Internal Medicine*, 282(2), 156–163. <https://doi.org/10.1111/joim.12627>
144. Montagu, J. D. (1994, 1. Januar). *Length of life in the ancient world: a controlled study*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1294277/>
145. Mooney, G. (2004). James C Riley, *Rising life expectancy: a global history*, Cambridge University Press, 2001, pp. xii, 243, £30.00, US\$49.95 (0-521-80245-8), £11.95, US\$16.95 (paperback 0-521-00281-8). *Medical History*, 48(3), 378–379. <https://doi.org/10.1017/s0025727300007729>
146. Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. (2012). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
147. Moosavi, A. & Ardekani, A. M. (2016). Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *PubMed*, 20(5), 246–258. <https://doi.org/10.22045/ibj.2016.01>
148. Müller, F., Scherer, M., Assenov, Y., Lutsik, P., Walter, J., Lengauer, T. & Bock, C. (2019). RnBeads 2.0: comprehensive analysis of DNA methylation data. *Genome Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1664-9>
149. Muntané, G., Farré, X., Rodríguez, J. A., Pegueroles, C., Hughes, D. A., De Magalhães, J. P., Gabaldón, T. & Navarro, A. (2018). Biological Processes Modulating Longevity across Primates: A Phylogenetic Genome-Phenome Analysis. *Molecular Biology And Evolution*, 35(8), 1990–2004. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy105>
150. Musich, P. R. & Zou, Y. (2011). DNA-damage accumulation and replicative arrest in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Biochemical Society Transactions*, 39(6), 1764–1769. <https://doi.org/10.1042/bst20110687>
151. Neves, J., Sousa-Victor, P. & Jasper, H. (2017). Rejuvenating Strategies for Stem Cell-Based Therapies in Aging. *Cell Stem Cell*, 20(2), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.01.008>
152. Niccoli, T. & Partridge, L. (2012). Ageing as a Risk Factor for Disease. *Current Biology*, 22(17), R741–R752. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.024>
153. Nicolai, S., Rossi, A., Di Daniele, N., Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M. & Raschellà, G. (2015). DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging*, 7(12), 1050–1065. <https://doi.org/10.18632/aging.100858>
154. Oliveto, S., Mancino, M., Manfrini, N. & Biffo, S. (2017). Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World Journal Of Biological Chemistry*, 8(1), 45. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i1.45>
155. Olshansky, S. J. & Carnes, B. A. (2019). Inconvenient truths about human longevity. *The Journals Of Gerontology Series A*, 74(Supplement_1), S7–S12. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz098>
156. Pan, B., Wan, L., Li, Y., Yang, J., Chen, Z., Tong, X., Zhao, J. & Li, C. (2023). Comprehensive pan-cancer analysis identifies FHL2 associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Translational Cancer Research*, 12(6), 1516–1534. <https://doi.org/10.21037/tcr-22-2786>
157. Patterson, K., Molloy, L., Qu, W. & Clark, S. (2011). DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *Journal Of Visualized Experiments*, 56. <https://doi.org/10.3791/3170>
158. Peterson, C. L. & Laniel, M. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology*, 14(14), R546–R551. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.007>
159. Pidsley, R., Zotenko, E., Peters, T. J., Lawrence, M. G., Risbridger, G. P., Molloy, P., Van Dijk, S., Muhlhäusler, B., Stirzaker, C. & Clark, S. J. (2016). Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1066-1>

160. Piovesan, A., Pelleri, M. C., Antonaros, F., Strippoli, P., Caracausi, M. & Vitale, L. (2019). On the length, weight and GC content of the human genome. *BMC Research Notes*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4137-z>
161. Rafi, M. A. & Alavi, A. (2017). Debate on human aging and lifespan. *Bioimpacts*, 7(3), 135–137. <https://doi.org/10.15171/bi.2017.16>
162. Rakyan, V. K., Down, T. A., Maslau, S., Andrew, T., Yang, T., Beyan, H., Whittaker, P., McCann, O. T., Finer, S., Valdes, A. M., Leslie, R. D., Deloukas, P. & Spector, T. D. (2010). Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Research*, 20(4), 434–439. <https://doi.org/10.1101/gr.103101.109>
163. Raman, V., Martensen, S. A., Reisman, D., Evron, E., Odenwald, W. F., Jaffee, E., Marks, J. & Sukumar, S. (2000). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*, 405(6789), 974–978. <https://doi.org/10.1038/35016125>
164. Rang, F. & Boonstra, J. (2014). Causes and Consequences of Age-Related Changes in DNA Methylation: A Role for ROS? *Biology*, 3(2), 403–425. <https://doi.org/10.3390/biology3020403>
165. Ren, Y. & Liao, W. S. (2001). Transcription Factor AP-2 Functions as a Repressor That Contributes to the Liver-specific Expression of Serum Amyloid A1 Gene. *Journal Of Biological Chemistry*, 276(21), 17770–17778. <https://doi.org/10.1074/jbc.m010307200>
166. Rhoads, K., Arderiu, G., Charboneau, A., Hansen, S. L., Hoffman, W. & Boudreau, N. (2005). A Role for Hox A5 in Regulating Angiogenesis and Vascular Patterning. *Lymphatic Research And Biology*, 3(4), 240–252. <https://doi.org/10.1089/lrb.2005.3.240>
167. Rimoldi, M., Wang, N., Zhang, J., Villar, D., Odom, D. T., Taipale, J., Flicek, P. & Roller, M. (2024). DNA methylation patterns of transcription factor binding regions characterize their functional and evolutionary contexts. *Genome Biology*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-024-03218-6>
168. Robine, J., Allard, M., Herrmann, Jeune, B. & Herrmann, F. R. (2019). The Real Facts Supporting Jeanne Calment as the Oldest Ever Human. *The Journals Of Gerontology Series A*, 74(Supplement_1), S13–S20. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz198>
169. Rose, M. R., Burke, M. K., Shahrestani, P. & Mueller, L. D. (2008). Evolution of ageing since Darwin. *Journal Of Genetics*, 87(4), 363–371. <https://doi.org/10.1007/s12041-008-0059-6>
170. Rossetto, D., Avvakumov, N. & Côté, J. (2012). Histone phosphorylation. *Epigenetics*, 7(10), 1098–1108. <https://doi.org/10.4161/epi.21975>
171. Rubie, C., Kempf, K., Hans, J., Su, T., Tilton, B., Georg, T., Brittner, B., Ludwig, B. & Schilling, M. (2004). Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Molecular And Cellular Probes*, 19(2), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.10.001>
172. Rubie, C., Kölsch, K., Halajda, B., Eichler, H., Wagenpfeil, S., Roemer, K. & Glanemann, M. (2016). microRNA-496 – A new, potentially aging-relevant regulator of mTOR. *Cell Cycle*, 15(8), 1108–1116. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1158360>
173. Rubie, C., Zimmer, J., Lammert, F., Gross, J. C., Weber, S. N., Kruse, B., Halajda, B., Wagner, M., Wagenpfeil, S. & Glanemann, M. (2019). MicroRNA-496 and Mechanistic Target of Rapamycin Expression are Associated with Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity in Elderly People. *Annals Of Nutrition And Metabolism*, 74(4), 279–286. <https://doi.org/10.1159/000499576>
174. Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P. & Snyder, S. H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78(1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90570-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90570-3)

175. Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G. & Abraham, R. T. (1995). Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells. *Journal Of Biological Chemistry*, 270(2), 815–822. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.2.815>
176. Saleh, T., Bloukh, S., Carpenter, V. J., Alwohoush, E., Bakeer, J., Darwish, S., Azab, B. & Gewirtz, D. A. (2020). Therapy-Induced Senescence: An “Old” Friend Becomes the Enemy. *Cancers*, 12(4), 822. <https://doi.org/10.3390/cancers12040822>
177. Salviooli, S., Capri, M., Bucci, L., Lanni, C., Racchi, M., Uberti, D., Memo, M., Mari, D., Govoni, S. & Franceschi, C. (2009). Why do centenarians escape or postpone cancer? The role of IGF-1, inflammation and p53. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 58(12), 1909–1917. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0639-6>
178. Scacheri, P. C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N. J., Wolfsberg, T. G., Umayam, L., Lee, J. C., Hughes, C. M., Shanmugam, K. S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M. & Collins, F. S. (2004). Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 101(7), 1892–1897. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308698100>
179. Schulz, T. J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M. & Ristow, M. (2007). Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metabolism*, 6(4), 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.011>
180. Seong, K., Li, D., Shimizu, H., Nakamura, R. & Ishii, S. (2011). Inheritance of Stress-Induced, ATF-2-Dependent Epigenetic Change. *Cell*, 145(7), 1049–1061. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.029>
181. Shchukina, I., Bagaitkar, J., Shpynov, O., Loginicheva, E., Porter, S., Mogilenko, D. A., Wolin, E., Collins, P., Demidov, G., Artomov, M., Zaitsev, K., Sidorov, S., Camell, C., Bambouskova, M., Arthur, L., Swain, A., Panteleeva, A., Dievskii, A., Kurbatsky, E., . . . Artyomov, M. N. (2020). Enhanced epigenetic profiling of classical human monocytes reveals a specific signature of healthy aging in the DNA methylome. *Nature Aging*, 1(1), 124–141. <https://doi.org/10.1038/s43587-020-00002-6>
182. Shu, Y. (2011). Identification of methylation profile of HOX genes in extrahepatic cholangiocarcinoma. *World Journal Of Gastroenterology*, 17(29), 3407. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i29.3407>
183. Sinha, J. K., Ghosh, S. & Raghunath, M. (2014, 1. Mai). *Progeria: A rare genetic premature ageing disorder*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4140030/>
184. Skulachev, V. P. (2011). Aging as a particular case of phenoptosis, the programmed death of an organism (A response to Kirkwood and Melov “On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history”). *Aging*, 3(11), 1120–1123. <https://doi.org/10.18632/aging.100403>
185. Soares, J. P., Cortinhas, A., Bento, T., Leitão, J. C., Collins, A. R., Gaivã, I. & Mota, M. P. (2014). Aging and DNA damage in humans: a meta-analysis study. *Aging*, 6(6), 432–439. <https://doi.org/10.18632/aging.100667>
186. Speakman, J., Mitchell, S. & Mazidi, M. (2016). Calories or protein? The effect of dietary restriction on lifespan in rodents is explained by calories alone. *Experimental Gerontology*, 86, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.03.011>
187. Stadtman, E. R. (1992). Protein Oxidation and Aging. *Science*, 257(5074), 1220–1224. <https://doi.org/10.1126/science.1355616>
188. Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S. & Mak, T. (2001). Regulation of PTEN Transcription by p53. *Molecular Cell*, 8(2), 317–325. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00323-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00323-9)

189. Steinhaus, R., Gonzalez, T., Seelow, D. & Robinson, P. N. (2020). Pervasive and CpG-dependent promoter-like characteristics of transcribed enhancers. *Nucleic Acids Research*, 48(10), 5306–5317. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa223>
190. Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T. I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M. & Lancet, D. (2016). The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>
191. Stott, I., Salguero-Gómez, R., Jones, O. R., Ezard, T. H., Gamelon, M., Lachish, S., Lebreton, J., Simmonds, E. G., Gaillard, J. & Hodgson, D. J. (2024). Life histories are not just fast or slow. *Trends in Ecology & Evolution*, 39(9), 830–840. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2024.06.001>
192. Strathdee, G., Holyoake, T. L., Sim, A., Parker, A., Oscier, D. G., Melo, J. V., Meyer, S., Eden, T., Dickinson, A. M., Mountford, J. C., Jorgensen, H. G., Soutar, R. & Brown, R. (2007). Inactivation of HOXA Genes by Hypermethylation in Myeloid and Lymphoid Malignancy is Frequent and Associated with Poor Prognosis. *Clinical Cancer Research*, 13(17), 5048–5055. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-0919>
193. Takai, D. & Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99(6), 3740–3745. <https://doi.org/10.1073/pnas.052410099>
194. Teschendorff, A. E., West, J. & Beck, S. (2013). Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Human Molecular Genetics*, 22(R1), R7–R15. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt375>
195. The ENCODE Project Consortium. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
196. Tomasetti, C., Poling, J., Roberts, N. J., London, N. R., Pittman, M. E., Haffner, M. C., Rizzo, A., Baras, A., Karim, B., Kim, A., Heaphy, C. M., Meeker, A. K., Hruban, R. H., Iacobuzio-Donahue, C. A. & Vogelstein, B. (2019). Cell division rates decrease with age, providing a potential explanation for the age-dependent deceleration in cancer incidence. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 116(41), 20482–20488. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905722116>
197. Tran, M. K., Kurakula, K., Koenis, D. S. & De Vries, C. J. M. (2015). Protein–protein interactions of the LIM-only protein FHL2 and functional implication of the interactions relevant in cardiovascular disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(2), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.002>
198. Tronick, E. & Hunter, R. G. (2016). Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00107>
199. Tsuge, K. & Shimamoto, A. (2022). Research on Werner Syndrome: Trends from Past to Present and Future Prospects. *Genes*, 13(10), 1802. <https://doi.org/10.3390/genes13101802>
200. Tusnády, G. E., Simon, I., Váradi, A. & Arányi, T. (2005). BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(1), e9. <https://doi.org/10.1093/nar/gni012>
201. Tyrka, A. R., Price, L. H., Kao, H., Porton, B., Marsella, S. A. & Carpenter, L. L. (2009). Childhood Maltreatment and Telomere Shortening: Preliminary Support for an Effect of Early Stress on Cellular Aging. *Biological Psychiatry*, 67(6), 531–534. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.014>
202. Vaupel, J. W. (2010). Biodemography of human ageing. *Nature*, 464(7288), 536–542. <https://doi.org/10.1038/nature08984>

203. Vicinus, B., Rubie, C., Faust, S. K., Frick, V. O., Ghadjar, P., Wagner, M., Graeber, S. & Schilling, M. K. (2011). miR-21 functionally interacts with the 3'UTR of chemokine CCL20 and down-regulates CCL20 expression in miR-21 transfected colorectal cancer cells. *Cancer Letters*, 316(1), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.10.031>
204. Vijg, J. & Bourg, E. L. (2017). Aging and the Inevitable Limit to Human Life Span. *Gerontology*, 63(5), 432–434. <https://doi.org/10.1159/000477210>
205. Vlachogiannis, N. I., Ntouros, P. A., Pappa, M., Kravvariti, E., Kostaki, E. G., Fragoulis, G. E., Papanikolaou, C., Mavroei, D., Bournia, V., Panopoulos, S., Laskari, K., Arida, A., Gorgoulis, V. G., Tektonidou, M. G., Paraskevis, D., Sfikakis, P. P. & Souliotis, V. L. (2023). Chronological Age and DNA Damage Accumulation in Blood Mononuclear Cells: A Linear Association in Healthy Humans after 50 Years of Age. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(8), 7148. <https://doi.org/10.3390/ijms24087148>
206. Waddington, C. H. (2011). The epigenotype. *International Journal Of Epidemiology*, 41(1), 10–13. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
207. Wakano, J. Y., Ohtsuki, H. & Kobayashi, Y. (2012). A mathematical description of the inclusive fitness theory. *Theoretical Population Biology*, 84, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2012.11.007>
208. Wang, D., Zhang, Y., Li, Q., Li, Y., Li, W., Zhang, A., Xu, J., Meng, J., Tang, L. & Lyu, S. (2023). Epigenetics: Mechanisms, potential roles, and therapeutic strategies in cancer progression. *Genes & Diseases*, 11(5), 101020. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.04.040>
209. Wang, K., Liu, H., Hu, Q., Wang, L., Liu, J., Zheng, Z., Zhang, W., Ren, J., Zhu, F. & Liu, G. (2022). Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01211-8>
210. Watson, R. E., Curtin, G. M., Hellmann, G. M., Doolittle, D. J. & Goodman, J. I. (2004). Increased DNA methylation in the HoxA5 promoter region correlates with decreased expression of the gene during tumor promotion. *Molecular Carcinogenesis*, 41(1), 54–66. <https://doi.org/10.1002/mc.20043>
211. Wei, A. & Wu, H. (2022). Mammalian DNA methylome dynamics: mechanisms, functions and new frontiers. *Development*, 149(24). <https://doi.org/10.1242/dev.182683>
212. Wei, J., Huang, K., Yang, C. & Kang, C. (2016). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncology Reports*, 37(1), 3–9. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>
213. Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L. & Longo, V. D. (2008). Life Span Extension by Calorie Restriction Depends on Rim15 and Transcription Factors Downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genetics*, 4(1), e13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040013>
214. Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D. O., Jöckel, K., Erbel, R., Mühleisen, T. W., Zenke, M., Brümmendorf, T. H. & Wagner, W. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biology*, 15(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>
215. Weon, B. M. & Je, J. H. (2008). Theoretical estimation of maximum human lifespan. *Biogerontology*, 10(1), 65–71. <https://doi.org/10.1007/s10522-008-9156-4>
216. Werner, H. (2020). Insulin-Like Growth Factors in Development, Cancers and Aging. *Cells*, 9(10), 2309. <https://doi.org/10.3390/cells9102309>
217. Williams, G. C. (1957). PLEIOTROPY, NATURAL SELECTION, AND THE EVOLUTION OF SENESCENCE. *Evolution*, 11(4), 398–411. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1957.tb02911.x>
218. Wodinsky, J. (1977). Hormonal Inhibition of Feeding and Death in Octopus : Control by Optic Gland Secretion. *Science*, 198(4320), 948–951. <https://doi.org/10.1126/science.198.4320.948>

-
219. World Health Organization. (2020). *GHE: Life expectancy and healthy life expectancy*. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-life-expectancy-and-healthy-life-expectancy>
220. World Health Organization. (2022). *Child mortality (under 5 years)*. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/child-mortality-under-5-years?utm_source=chatgpt.com
221. Wu, J. J., Liu, J., Chen, E. B., Wang, J. J., Cao, L., Narayan, N., Fergusson, M. M., Rovira, I. I., Allen, M., Springer, D. A., Lago, C. U., Zhang, S., DuBois, W., Ward, T., deCabo, R., Gavrilova, O., Mock, B. & Finkel, T. (2013). Increased Mammalian Lifespan and a Segmental and Tissue-Specific Slowing of Aging after Genetic Reduction of mTOR Expression. *Cell Reports*, 4(5), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.030>
222. Xia, C. & Møller, A. P. (2021). Linking the maximum reported life span to the aging rate in wild birds. *Ecology And Evolution*, 11(10), 5682–5689. <https://doi.org/10.1002/ece3.7471>
223. Xia, W. & Xie, W. (2020). Rebooting the Epigenomes during Mammalian Early Embryogenesis. *Stem Cell Reports*, 15(6), 1158–1175. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.09.005>
224. Xu, J., Zhou, J., Li, M., Ng, C., Ng, Y., Lai, P. B. & Tsui, S. K. (2014). Transcriptional Regulation of the Tumor Suppressor FHL2 by p53 in Human Kidney and Liver Cells. *PLoS ONE*, 9(8), e99359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099359>
225. Yagi, M., Kabata, M., Tanaka, A., Ukai, T., Ohta, S., Nakabayashi, K., Shimizu, M., Hata, K., Meissner, A., Yamamoto, T. & Yamada, Y. (2020). Identification of distinct loci for de novo DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B during mammalian development. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16989-w>
226. Yan, J., Zhu, J., Zhong, H., Lu, Q., Huang, C. & Ye, Q. (2003). BRCA1 interacts with FHL2 and enhances FHL2 transactivation function. *FEBS Letters*, 553(1–2), 183–189. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00978-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00978-5)
227. Yan, W., Zhang, L., Yan, L., Zhang, F., Yin, N., Lin, H., Huang, C., Wang, L., Yu, J., Wang, D. & Zhao, Z. (2013). Transcriptome Analysis of Skin Photoaging in Chinese Females Reveals the Involvement of Skin Homeostasis and Metabolic Changes. *PLoS ONE*, 8(4), e61946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061946>
228. Yin, Y., Morgunova, E., Jolma, A., Kaasinen, E., Sahu, B., Khund-Sayeed, S., Das, P. K., Kivioja, T., Dave, K., Zhong, F., Nitta, K. R., Taipale, M., Popov, A., Ginno, P. A., Domcke, S., Yan, J., Schübeler, D., Vinson, C. & Taipale, J. (2017). Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science*, 356(6337). <https://doi.org/10.1126/science.aaj2239>
229. Yoo, K. H., Park, Y., Kim, H., Jung, W. & Chang, S. (2010). Epigenetic inactivation of HOXA5 and MSH2 gene in clear cell renal cell carcinoma. *Pathology International*, 60(10), 661–666. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2010.02578.x>
230. Yu, X., Zhao, H., Wang, R., Chen, Y., Ouyang, X., Li, W., Sun, Y. & Peng, A. (2024). Cancer epigenetics: from laboratory studies and clinical trials to precision medicine. *Cell Death Discovery*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01803-z>
231. Yuan, R., Hascup, E., Hascup, K. & Bartke, A. (2023). Relationships among Development, Growth, Body Size, Reproduction, Aging, and Longevity – Trade-Offs and Pace-Of-Life. *Biochemistry (Moscow)*, 88(11), 1692–1703. <https://doi.org/10.1134/s0006297923110020>
232. Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Parys-Proszek, A., Makowska, Ż., Pałeczka, A., Kucharczyk, K., Płoski, R. & Branicki, W. (2015). Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International Genetics*, 17, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.001>
233. Zeng, S., Shen, W. H. & Liu, L. (2018). Senescence and Cancer. *Cancer Translational Medicine*, 4(3), 70. https://doi.org/10.4103/ctm.ctm_22_18

-
234. Zhang, B., Zhou, Y., Lin, N., Lowdon, R. F., Hong, C., Nagarajan, R. P., Cheng, J. B., Li, D., Stevens, M., Lee, H. J., Xing, X., Zhou, J., Sundaram, V., Elliott, G., Gu, J., Shi, T., Gascard, P., Sigaroudinia, M., Tlsty, T. D., . . . Wang, T. (2013). Functional DNA methylation differences between tissues, cell types, and across individuals discovered using the M&M algorithm. *Genome Research*, 23(9), 1522–1540. <https://doi.org/10.1101/gr.156539.113>
235. Zhang, X., Zhou, Y., Liu, Y., Li, B., Tian, S. & Zhang, Z. (2024). Research Progress on the Mechanism and Function of Histone Acetylation Regulating the Interaction between Pathogenic Fungi and Plant Hosts. *Journal Of Fungi*, 10(8), 522. <https://doi.org/10.3390/jof10080522>
236. Zhang, Y., Huang, B., Wang, H., Chang, A. & Zheng, X. F. S. (2017). Emerging Role of MicroRNAs in mTOR Signaling. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 74(14), 2613–2625. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2485-1>
237. Zhang, Y. & Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*, 15(18), 2343–2360. <https://doi.org/10.1101/gad.927301>
238. Zhou, W., Dinh, H. Q., Ramjan, Z., Weisenberger, D. J., Nicolet, C. M., Shen, H., Laird, P. W. & Berman, B. P. (2018). DNA methylation loss in late-replicating domains is linked to mitotic cell division. *Nature Genetics*, 50(4), 591–602. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0073-4>
239. Zhu, H., Wang, G. & Qian, J. (2016). Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nature Reviews Genetics*, 17(9), 551–565. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.83>
240. Zuo, Z., Roy, B., Chang, Y. K., Granas, D. & Stormo, G. D. (2017). Measuring quantitative effects of methylation on transcription factor–DNA binding affinity. *Science Advances*, 3(11). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao1799>

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Glanemann und Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Rubie sowohl für die Möglichkeit zur Promotion im Forschungslabor der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie als auch für die Bereitstellung aller benötigten Materialien und Geräte bedanken.

Mein tiefster Dank gilt dabei vor allem Frau PD Dr. rer. nat. Rubie für Ihre fachliche und hervorragende Betreuung, Ihr stets offenes Ohr und die Korrektur dieser Arbeit als Gutachterin. Ihre Expertise und Ideen, sowie unsere konstruktiven Diskussionen waren überaus wertvoll für mich. Vielen Dank für die großartige Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie. Besonders möchte ich mich bei Frau Bianca Kruse für die uneingeschränkte Hilfe im Labor und die großartige Zusammenarbeit, sowie bei Frau Evelyn Marth für die Unterstützung bei der Probenakquise bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Dr. rer. nat. Sascha Tierling und seinem Team aus dem Lehrstuhl für Genetik und Epigenetik für die Unterstützung und Durchführung der epigenetischen Analyse. Ohne diese Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zuletzt gilt mein tiefster Dank meinen Freunden, meinem Partner und meiner Familie. Ihre stetige Unterstützung und Ermutigung haben mir in herausfordernden Zeiten Rückhalt und Kraft gegeben.

7 Publikationen

7.1 Publikationen aus dieser Dissertation

Feiner, L. K.*, Tierling, S.* , Holländer, S., Glanemann, M., & Rubie, C. (2021). An aging and p53 related marker: HOXA5 promoter methylation negatively correlates with mRNA and protein expression in old age. *Aging*, 13(4), 4831–4849. <https://doi.org/10.18632/aging.202621>

*Geteilte Erstautorenschaft

7.2 Weitere Publikationen

Helmus, J., Pfeifer, M., **Feiner, L. K.**, Krause, L. J., Bajanowski, T., & Poetsch, M. (2019). Unintentional effects of cleaning a crime scene-when the sponge becomes an accomplice in DNA transfer. *International journal of legal medicine*, 133(3), 759–765. <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1983-5>

Wang, S., Link, F., Han, M., Chaudhary, R., Asimakopoulos, A., Liebe, R., Yao, Y., Hamad, S., Dropmann, A., Krizanac, M., Rubie, C., **Feiner, L. K.**, Glanemann, M., Ebert, M. P. A., Weiskirchen, R., Henis, Y. I., Ehrlich, M., & Dooley, S. (2024). The Interplay of TGF- β 1 and Cholesterol Orchestrating Hepatocyte Cell Fate, EMT, and Signals for HSC Activation. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 17(4), 567–587. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2023.12.012>

7.3 Kongressbeiträge

Feiner L. K., Thomas A., Rubie C., Zimmer J., Glanemann M. (2019). Diabetes mellitus Typ 2 und Fettleibigkeit werden mutmaßlich durch den mTOR Signalweg unter der Kontrolle der miRNA-496 reguliert.

„Best Poster“-Preis für die Posterpräsentation auf dem 136. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in München, 26.–29. März 2019.

Feiner L. K., Thomas A., Rubie C., Glanemann M. (2019). Evaluierung des Expressionsprofils altersassoziierter Plasmaproteine.

Posterpräsentation auf dem 136. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in München, 26.–29. März 2019.

Feiner L. K., Rubie C., Glanemann M. (2019). Ein neuer regulatorischer Mechanismus, der an Alterungsprozessen beteiligt ist.

Vortrag auf dem 136. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in München, 26.–29. März 2019.

Feiner L. K., Thomas A., Rubie C., Glanemann M. (2019). A new regulatory mechanism associated with aging.

Vortrag im Rahmen der 23. Chirurgischen Forschungstage in Aachen, 12.–14. September 2019.

Feiner L. K., Thomas A., Rubie C., Glanemann M. (2019). Regulation of Diabetes Type 2 and Obesity by the mTOR pathway.

Vortrag im Rahmen der 23. Chirurgischen Forschungstage in Aachen, 12.–14. September 2019.

Feiner L. K., Thomas A., Rubie C., Glanemann M. (2019). Age-associated changes in the expression profile of aging related plasmaproteins.

Vortrag im Rahmen der 23. Chirurgischen Forschungstage in Aachen, 12.–14. September 2019.

Feiner L. K., Tierling S., Glanemann M., Rubie C. (2021). HOXA5 methylation differences correlate with age and gene expression.

Vortrag im Rahmen der 3rd World AGING & REJUVENATION CONFERENCE digital aus Barcelona, Spanien, 20.–22. September 2021.

Feiner L. K., Tierling S., Glanemann M., Rubie C. (2022). HOXA5 promoter methylation negatively correlates with mRNA and protein expression in old age.

Posterpräsentation im Rahmen der Systems Aging Gordon Research Conference (GRC): Systemic Processes, Omics Approaches and Biomarkers in Aging in Newry, Maine, USA, 29. Mai – 3. Juni 2022.

Feiner L. K., Tierling S., Glanemann M., Rubie C. (2022). HOXA5 promoter methylation negatively correlates with mRNA and protein expression in old age.

Posterpräsentation im Rahmen der 2022 IMB Conference "Epigenetics of Ageing: Responses to Adversity across Scales" in Mainz, 28. Juni – 01. Juli 2022.

Feiner L. K., Wagner W., Perez-Correa J. F., Glanemann M., Rubie C. (2023). DNA methylation in lymphoblastic cell lines of Werner syndrome patients.

Posterpräsentation im Rahmen des EMBO | EMBL Symposium: The ageing genome: from mechanisms to disease in Heidelberg, 04.–07. Juni 2023.

Feiner L. K., Tierling S., Glanemann M., Rubie C. (2023). HOXA5: EIN ALTERUNGS- UND P53-ASSOZIIERTER BIOMARKER.

Vortrag im Rahmen der 23. Konferenz der GSAAM e.V. in München, 07.–09. Juli 2023.

Feiner L. K., Wagner W., Perez-Correa J. F., Glanemann M., Rubie C. (2023). DAS BIOLOGISCHE EPIGENETISCH MESSBARE ALTER VON PATIENTEN MIT WERNER SYNDROM IST SIGNIFIKANT HÖHER ALS IHR CHRONOLOGISCHES ALTER.

Vortrag im Rahmen des Young Research Award der 23. Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Prävention und Anti-Aging-Medizin (GSAAM 2023) in München, 07.–09. Juli 2023.

Feiner L. K., Wagner W., Perez-Correa J. F., Glanemann M., Rubie C. (2023). DNA methylation in lymphoblastic cell lines of patients with Werner Syndrome.

Vortrag im Rahmen der 5th World Aging and Rejuvenation Conference digital aus Frankfurt, 17.–18. Juli 2023

Feiner L. K., Schwörer I., Holländer S., Glanemann M., Rubie C. (2023). Bariatric surgery counteracts insulin dependency of adipose patients under the simultaneous significant reduction of mTOR gene expression.

Posterpräsentation im Rahmen des Mittelrheiner (MRC 2023) in Würzburg, 12.–13. Oktober 2023.

Feiner L. K., Zimmer J., Lammert F., Glanemann M., Rubie C. (2023). Adipositas and Diabetes mellitus type 2 are potentially regulated by the mTOR pathway under the control of miR-496.

Posterpräsentation im Rahmen des Mittelrheiner (MRC 2023) in Würzburg, 12.–13. Oktober 2023.

Feiner L. K., Glanemann M., Rubie C. (2024). Isolation of primary human hepatocytes from surgical liver specimens.

Vortrag auf dem 141. Deutschen Chirurgie Kongress (DCK.digital 2024) digital aus Leipzig, 16.–18.04.2024.

Feiner L. K., Thomas A., Rubie C., Glanemann M. (2024). Altersabhängige Veränderungen im Expressionsprofil altersassoziierter Plasmaproteine.

Posterpräsentation im Rahmen des Mittelrheiner (MRC 2024) in Homburg, 26.–27. September 2024.

Feiner L. K., Tierling S., Glanemann M., Rubie C. (2024). DNA methylation analysis reveals HOXA5 as an aging and p53 related marker.

Vortrag im Rahmen der Aging and Longevity Conference (ALC 2024) digital aus Berlin, 03.–04. Oktober 2024.

Feiner L. K., Wagner W., Perez-Correa J. F., Glanemann M., Rubie C. (2023). WERNER SYNDROM KORRELIERT MIT EINEM HÖHEREN EPIGENETISCHEN ALTER UND DER GENEXPRESSION VON ALZHEIMER- UND TUMORASSOZIIERTEN GENEN.

Vortrag im Rahmen des Young Research Award der 24. Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Prävention und Anti-Aging-Medizin (GSAAM 2024) in Köln, 01.–02. Juni 2024.

Feiner L. K., Zimmer J., Glanemann M., Rubie C. (2025). Diabetes Type 2 and Obesity are regulated by the mTOR pathway (under the control of miR-496).

Vortrag auf dem 142. Deutschen Chirurgie Kongress (DCK.digital 2025) digital aus München, 18.–20. März 2025.

8 Lebenslauf

Name	Laura Kim Feiner
Geburtsdatum	15. Juni 1993
Geburtsort	Quierschied

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Anhang

Tabelle 24: Wichtige Daten zu den Probanden, die freiwillig Blut für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben. Die Tabelle zeigt die Bezeichnung der Proben, sowie das Alter, Geburtsdatum, Geschlecht, BMI und vorliegende klinische Diagnose der Probanden. Eine fett formatierte Probenbezeichnung kennzeichnet Probanden, deren gDNA für die genomweite Methylierungsanalyse verwendet wurde (n.b. = nicht bekannt).

Proben- bezeichnung	Alter	Geburts- datum	Ge- schlecht	BMI	Klinische Diagnosen
Probandengruppe „Jung“					
Epi-J-1	24	14.09.1993	m	27	–
Epi-J-2	25	04.08.1992	m	24,8	Herzfehler/ Engstelle in Arterie
Epi-J-3	19	10.12.1998	m	23,2	–
Epi-J-4	25	07.01.1993	m	29,1	–
Epi-J-6	23	18.10.1994	m	20,3	–
Epi-J-7	24	18.06.1993	m	43,1	–
Epi-J-8	24	30.06.1993	m	25,6	Neurodermitis
Epi-J-9	22	01.12.1995	m	26,8	–
Epi-J-10	25	21.12.1992	w	21,4	–
Epi-J-11	25	23.07.1992	w	n.b.	Struma multinodosa
Epi-J-12	25	15.06.1993	w	21,3	–
Epi-J-13	25	07.06.1993	m	n.b.	Perianale Fistel
Epi-J-14	25	21.10.1992	w	20,5	–
Epi-J-15	23	19.10.1994	w	21,5	–
Epi-J-16	25	16.05.1993	w	21,8	–
Epi-J-17	19	28.09.1998	w	22	–
Epi-J-18	23	25.09.1994	m	22,6	–
Epi-J-19	24	05.06.1994	w	19,4	–

Anhang

Epi-J-20	18	19.08.1999	m	25,1	–
Epi-J-21	24	20.08.1993	w	22,1	–
Epi-J-22	24	15.07.1994	w	23,4	–
Epi-J-23	23	14.07.1995	w	21,1	–
Epi-J-24	24	30.08.1994	m	22,6	–
Epi-J-25	23	05.06.1995	w	21,6	–
Epi-J-26	21	22.07.1997	w	20,1	–
Epi-J-27	22	01.08.1996	w	16,6	–
Epi-J-28	23	19.10.1995	w	19,7	–
Epi-J-29	23	08.04.1995	w	23,5	–
Epi-J-30	23	24.06.1995	w	20,3	–
Epi-J-31	22	16.02.1996	w	29	–
Probandengruppe „Alt“					
Epi-A-1	80	12.03.1938	m	26,8	–
Epi-A-2	78	30.04.1940	m	28,7	–
Epi-A-3	79	24.04.1939	m	29	–
Epi-A-5	78	26.12.1939	m	26,6	Cholezystolithiasis
Epi-A-6	78	04.01.1940	m	24,7	Leistenhernie
Epi-A-7	89	02.01.2029	m	30	Altersdemenz
Epi-A-8	79	25.02.1939	m	31	Herzinfarkt (vor 10 Jahren)
Epi-A-9	78	09.07.1939	w	29,7	–
Epi-A-10	79	27.07.1939	m	29,7	Parkinson
Epi-A-11	78	11.02.1940	m	n.b.	Leistenhernie
Epi-A-12	80	11.05.1938	m	26,4	–
Epi-A-13	78	03.02.1940	m	n.b.	Leistenhernienrezidiv
Epi-A-14	90	22.11.1927	m	27	–
Epi-A-15	83	19.07.1934	w	27,9	–

Anhang

Epi-A-16	74	26.02.1944	m	n.b.	Infrarenales Aortenaneurysma
Epi-A-17	78	12.04.1940	m	25,5	Herzinfarkt (vor 20 Jahren)
Epi-A-18	79	25.08.1939	m	24,5	–
Epi-A-21	74	06.08.1943	m	n.b.	Sympt. Leistenhernie rezidiv
Epi-A-22	78	13.01.1940	w	28,3	–
Epi-A-23	82	21.02.1936	m	26,1	–
Epi-A-24	83	08.06.1935	w	19,3	Hirnfarkt
Epi-A-25	81	22.12.1936	m	26,1	HNO Polyp
Epi-A-27	81	05.01.1937	m	28,1	Schlaganfall
Epi-A-28	75	19.04.1943	m	30,1	Rheuma
Epi-A-30	79	16.11.1939	w	20,2	Myopathie
Epi-A-32	79	30.11.1938	w	26	Sehstörungen
Epi-A-35	82	04.06.1936	w	21	v.a. RLS
Epi-A-36	81	09.12.1937	w	20,1	pavK IV rechts
Epi-A-37	73	10.02.1945	m	27,2	Leistenhernie
Epi-A-38	80	05.08.1938	m	26,4	Zirkuläre Hämorrhoiden

Tabelle 25: Primerdesign für das *Deep Bisulfite Sequencing*. Zu dem assoziierten Gen wurde ein Vorwärtsprimer (MiSeq-F) und Rückwärtsprimer (MiSeq-R) erstellt. Die hier aufgelisteten Primer enthalten zusätzlich die Adaptersequenz am 5'-Ende.

Primer-bezeichnung	Primersequenz	Assoziiertes Gen
CG24125828-Mi-Seq-F	TCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTG-TATGATTGTAGAAAGAGT	PRRT1
CG24125828-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT-CCGATCTAAAACAAAAATTCTAAA	
CG22454769-Mi-Seq-F	TCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTT-TGGGAGTATAGTAGTTAT	FHL2
CG22454769-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT-CCGATCTCACCTTACAAATATATCCCA	

Anhang

CG13108341-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTT- CCGATCTGGGTTAAAGTTTTTGTATTTGT	DNAH9
CG13108341-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCTATATCTATTAACCTACCTCTCTTC	
CG26893861-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTT- TATTATTATGGGTGGAAGGTA	DUSP3
CG26893861-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCTTCCCTTTCTTTAACTAACAA	
CG03744763-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTT- CCGATCTAGTTTTTTTTTTGTTTTGGG	HOXA5
CG03744763-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCTAACTCCTATACTAATATCTCTAA	
CG02753903-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTT- TTTGTAGGAGTTTGGATA	RYR1
CG02753903-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCTTCTCACTAACTAAAATTCC	
CG23589035-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTT- CCGATCTaaaatgggtTataaagTagtgg	ASH1L
CG23589035-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCTTCACACATCACAATCTAAAAAA	
CG04455146-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTT- CCGATCTAGGTATTGTTGGTTTTTATTGTT	CADPS2
CG04455146-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCTACATCTATCTTTTTTCTTCCATC	
CG02910018-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTgtg- taaatgtaaaatgaaaTTaag	TMTC1
CG02910018-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCTCCCCTACTAAAACAAAATAT	
CG25410668-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTT- CCGATCTGTTTGTTTTTTATATAGGAGG	RPA2
CG25410668-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCTCAAACCCCATTTACTAAATT	
CG09394785-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTT- CCGATCTGGTTTTTGGGAGTAGTATTT	ASCL2
CG09394785-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCTAAAATCTTAAACCTCACCTC	
CG15046693-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTT- CCGATCTAGTTTTAAGTTATATTGGAT	CEBPG
CG15046693-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCTCCAAATATTTACACATAAA	
CG02872426-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TGTGTTTTGGTATAGTGGTT	DDO
CG02872426-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCT ATCCTAAATCAAATCACCAATA	

CG19344626-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GTAAAGTTGGTGTTTTAGTGT	NWD1
CG19344626-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCT ACAAAAACCCTTTACAATATCAA	
CG01256539-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TGAGAGTGGTTGTTAGTATAT	PRR16
CG01256539-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCT TTAATCTCAACCTCATAAAAACA	
CG14481208-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TTTAATTTGGTAAGTTTGGTTTT	RTKN
CG14481208-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCT ATCAATTATAACCACTAACTTAA	
CG16789844-Mi-Seq-F	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GTTTTTAGTATTGGTTTGGAGTT	PDE1C
CG16789844-Mi-Seq-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT- CCGATCT CTACAAAACCAATAACTAACTTA	

Tabelle 26: Auflistung aller 1481 DMCG, die durch das *Infinium® MethylationEPIC Bead-Chip* Microarray gefunden wurden.

		Überlappung mit <i>RnBeads</i> Pipeline	
		Überlappung mit der Horvath <i>Clock</i>	
		Überlappung mit beiden Datensätzen	
		Untersuchte Ziel-CpGs (falls nicht schon in einem Datensatz vorhanden)	
CG-ID	Chromosom	Annotation	Methylierungs-differenz
cg09780150	chr18	CABLES1,CABLES1,CABLES1,CABLES1/Body,Body,Body,Body/-	0,63283043
cg21139150	chr21	-/-/Island	0,526240385
cg16361921	chr5	-/-	0,412189072
cg07158505	chr18	-/-	0,37172593
cg03192186	chr7	-/-	0,366972519
cg20004147	chr2	-/-	0,353998467
cg10511229	chr20	-/-	0,347642437
cg24125828	chr6	PRRT1/Body/Island	0,338684779
cg22454769	chr2	FHL2,FHL2,FHL2,FHL2/TSS200,TSS200,5'-UTR,TSS200/Island	0,324628479
cg06856169	chr5	-/-	0,318543141
cg13108341	chr17	DNAH9/Body/-	0,318361513
cg25340709	chr20	RRBP1,RRBP1/Body,Body/S_Shore	0,305745214
cg04876534	chr4	CLRN2/Body/S_Shelf	0,303897554
cg07971513	chr8	EXTL3,EXTL3,EXTL3/Body,Body,Body/-	0,303680515
cg10444583	chr16	NOD2,NOD2/5'-UTR,1stExon/-	0,297866678
cg26893861	chr17	DUSP3/3'-UTR/-	0,297855381
cg25751474	chr14	-/-	0,295634868

Anhang

cg04547000	chr16	-/-	0,290352069
cg01256539	chr5	PRR16/5'-UTR/S_Shore	0,268929655
cg07553761	chr3	TRIM59/TSS1500/Island	0,267034141
cg11847992	chr5	-/-	0,266958941
cg14021929	chr7	TYW1/Body/-	0,265864402
cg06639320	chr2	FHL2,FHL2,FHL2,FHL2/TSS200,TSS200,5'-UTR,TSS200/Island	0,261120449
cg27520474	chr16	CES1,CES1,CES1/TSS1500,TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,260200714
cg21184711	chr7	CADPS2,CADPS2,CADPS2/Body,Body,Body/-	0,258155301
cg24969716	chr11	LOC399886/Body/-	0,257516145
cg09417038	chr21	C21orf57/Body/N_Shore	0,257447867
cg03744763	chr7	HOXA5/TSS1500/Island	0,257278379
cg03792936	chr2	CCDC148,CCDC148/Body,Body/-	0,254868239
cg16532938	chr2	FIGN/Body/-	0,252011128
cg03876418	chr11	-/-	0,25166042
cg10834425	chr12	INHBC/Body/-	0,248307091
cg07909165	chr6	CD164,CD164,CD164,CD164,CD164/Body,Body,Body,Body,Body/-	0,247614558
cg09732868	chr4	COX7B2/5'-UTR/-	0,246862256
cg21358336	chr17	-/-/Island	0,24631216
cg23174406	chr12	NEDD1,NEDD1,NEDD1,NEDD1/Body,Body,Body,5'-UTR/S_Shelf	0,245988077
cg07183775	chr7	-/-/N_Shelf	0,242988102
cg10243322	chr19	KDM4B/Body/N_Shelf	0,241981847
cg06526721	chr5	PRR16/TSS1500/N_Shore	0,241239142
cg02140579	chr4	FAM198B,FAM198B,FAM198B/Body,Body,Body/-	0,239831566
cg11128862	chr1	SOX13/5'-UTR/-	0,239098174
cg17268658	chr2	FHL2,FHL2,FHL2,FHL2/TSS200,TSS200,TSS200,5'-UTR/Island	0,238271114
cg18645241	chr21	-/-	0,228634654
cg21758126	chr2	NR4A2/Body/N_Shore	0,22749978
cg11883129	chr2	FOXN2/5'-UTR/-	0,226960804
cg14222729	chr2	-/-/N_Shore	0,226467098
cg14886849	chr14	TRAF3,TRAF3,TRAF3/Body,Body,Body/-	0,225936512
cg06090322	chr3	-/-	0,225843317
cg06895752	chr14	-/-	0,225329278
cg02753903	chr19	RYR1,RYR1/Body,Body/Island	0,224310009
cg02872426	chr6	DDO,DDO/TSS200,TSS200/-	0,22123608
cg11236452	chr5	PCDHGA2,PCDHGA3,PCDHGA3,PCDHGA1/Body,1stExon,1stExon,Body/N_Shore	0,221112348
cg14679668	chr8	-/-	0,221046975
cg02008229	chr15	ANPEP/Body/-	0,221001874
cg02486239	chr1	-/-	0,220084819
cg27262717	chr20	TNNC2/Body/Island	0,219781146
cg21770758	chr10	RBM20/Body/-	0,219543966

Anhang

cg16769658	chr1	MAEL,MAEL,MAEL/Body,Body,Body/-	0,1995585
cg24690094	chr11	-/-/Island	0,199039489
cg24869272	chr11	TSPAN4,TSPAN4,TSPAN4,TSPAN4,TSPAN4,/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,/Island	0,198671969
cg19663246	chr7	-/-/S_Shore	0,198266069
cg09359064	chr9	NTNG2/5'-UTR/Island	0,197865915
cg08952306	chr7	SH2B2/3'-UTR/Island	0,197759095
cg15852440	chr6	DNAH8/Body/-	0,197055079
cg02846841	chr6	-/-	0,195699715
cg27380997	chr15	-/-/S_Shore	0,195626907
cg03468072	chr12	-/-/Island	0,194757447
cg12080266	chr21	CLIC6/Body/-	0,194454962
cg27142377	chr12	-/-	0,193599581
cg22805485	chr11	SPON1/TSS200/N_Shore	0,193113168
cg05130482	chr8	-/-	0,19280779
cg15417294	chr10	SLC18A2/Body/-	0,192723041
cg04352272	chr17	-/-/Island	0,191979578
cg05217193	chr22	DENND6B,DENND6B/ExonBnd,Body/-	0,191511458
cg25410668	chr1	RPA2/TSS1500/S_Shore	0,191225533
cg09137095	chr5	-/-	0,190897965
cg23972165	chr2	-/-	0,190804639
cg19873923	chr14	TC2N,TC2N,TC2N/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/N_Shore	0,189764533
cg10089963	chr2	NR4A2/Body/N_Shore	0,189741905
cg17113038	chr5	PRR16,PRR16,PRR16,PRR16/Body,5'-UTR,Body,5'-UTR/-	0,187989401
cg16538682	chr7	CADPS2,CADPS2,CADPS2/Body,Body,Body/-	0,187818108
cg19317830	chr3	VGLL4,VGLL4,VGLL4/Body,Body,Body/-	0,187606026
cg03052078	chr6	STXBP5,STXBP5/Body,Body/S_Shore	0,187590351
cg20398091	chr19	NWD1,NWD1/TSS1500,TSS1500/-	0,187048079
cg12256845	chr6	PTCHD4,PTCHD4/TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,185819262
cg12158483	chr22	BAIAP2L2/Body/Island	0,184808122
cg10919664	chr6	-/-	0,184801665
cg18345561	chr15	-/-	0,184754687
cg17035899	chr4	MYL5/Body/Island	0,184010796
cg24102222	chr12	SLC15A4/Body/Island	0,183742751
cg11204139	chr17	-/-/Island	0,183371304
cg04559928	chr7	LOC100630923,PRKRIP1/Body,Body/-	0,183235463
cg27151303	chr7	-/-/Island	0,183189595
cg14812628	chr19	-/-	0,18271898
cg17514249	chr13	COL4A1,COL4A1/Body,Body/-	0,182570316
cg12031275	chr15	-/-/N_Shore	0,182381006

Anhang

cg03338962	chr14	KIAA0391,KIAA0391,KIAA0391,KIAA0391,KIAA0391/Body,Body,Body,Body,Body/-	0,181982123
cg03807316	chr19	DLL3,DLL3/Body,Body/Island	0,181491374
cg13721246	chr12	DNAH10/Body/-	0,18126554
cg09394785	chr11	ASCL2/TSS1500/S_Shore	0,181261219
cg12800028	chr6	GPR6/TSS200/Island	0,181229677
cg03324695	chr1	-/-	0,180134378
cg01088900	chr8	ST3GAL1,ST3GAL1/5'-UTR,5'-UTR/-	0,179542123
cg01265905	chr20	-/-	0,178678193
cg16505764	chr5	PCDHGA4,PCDHGA7,PCDHGA6,PCDHGA1,PCDHGA5/Body,1stExon,Body,Body,Body/N_Shore	0,178653852
cg19439768	chr7	REPIN1,REPIN1,REPIN1,REPIN1,REPIN1/1stExon,3'-UTR,3'-UTR,3'-UTR,3'-UTR/S_Shore	0,178503253
cg02048733	chr3	-/-	0,178165974
cg11084334	chr3	LHFPL4/Body/Island	0,177872063
cg17293161	chr10	-/-	0,177600897
cg06291867	chr10	HTR7,HTR7,HTR7/1stExon,1stExon,1stExon/Island	0,177389161
cg25258740	chr12	KCNC2,KCNC2,KCNC2,KCNC2,KCNC2,KCNC2/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/Island	0,177322842
cg07910479	chr6	LY86,LY86-AS1/TSS1500,Body/-	0,177061383
cg07547549	chr20	SLC12A5,SLC12A5/Body,Body/Island	0,176327748
cg08551532	chr19	DLL3,DLL3/Body,Body/Island	0,176303691
cg16658255	chr5	-/-/N_Shelf	0,176292145
cg05542681	chr16	FBXL16/Body/Island	0,176182248
cg12841266	chr3	LHFPL4/Body/Island	0,176106801
cg00563701	chr18	-/-	0,176054956
cg21862353	chr2	MYT1L/Body/Island	0,17601322
cg09936799	chr5	PCDHA6,PCDHA2,PCDHA1,PCDHA9,PCDHA7,PCDHA1/Body,Body,Body,Body,Body,Body/N_Shore	0,175986113
cg27398495	chr3	-/-	0,175625791
cg23758309	chr12	-/-	0,175567337
cg00329615	chr3	IGSF11,IGSF11/Body,Body/-	0,175455861
cg05767720	chr6	PRRT1/Body/N_Shore	0,175414419
cg01748892	chr7	HOXA5/TSS1500/Island	0,175237406
cg15922174	chr9	CRB2/Body/Island	0,175060518
cg16464373	chr8	-/-/S_Shelf	0,175035293
cg17110586	chr19	-/-/S_Shelf	0,175006501
cg13694927	chr7	HOXA5/TSS1500/Island	0,174956657
cg08264839	chr11	-/-	0,174820419
cg03162326	chr6	SOBP/Body/Island	0,174529385
cg06375806	chr22	DENND6B,DENND6B/ExonBnd,Body/-	0,174386902
cg08057120	chr11	-/-	0,174201424
cg06975979	chr7	LRRC61,ACTR3C,LRRC61/TSS1500,5'-UTR,TSS1500/Island	0,173613293
cg16627090	chr7	PGAM2/1stExon/Island	0,173392703
cg03032497	chr14	-/-/N_Shore	0,173310895

Anhang

cg17391820	chr16	-/-N_Shore	0,172519428
cg27601844	chr18	SKOR2,SKOR2/TSS200,TSS200/S_Shore	0,172222724
cg21159778	chr9	DFNB31,DFNB31/TSS1500,1stExon/Island	0,172128251
cg04193160	chr1	OBSCN,OBSCN/Body,Body/Island	0,17174993
cg15167429	chr10	-/-Island	0,170945825
cg05573844	chr12	-/-Island	0,170166102
cg14481208	chr2	RTKN/TSS1500/Island	0,169638271
cg15011409	chr19	ICAM5/Body/Island	0,169306154
cg05179035	chr3	-/-N_Shore	0,168677944
cg14798125	chr1	GPR52,RABGAP1L/1stExon,Body/-	0,168594262
cg11876952	chr12	-/-	0,168581471
cg16574737	chr5	PCDHGB1,PCDHGA2,PCDHGA1,PCDHGB1,PCDHGA3/1stExon,Body,Body,1stExon,Body/N_Shore	0,168211727
cg01679206	chr7	WBSCR27/Body/N_Shelf	0,168151417
cg17438696	chr1	-/-	0,168053235
cg15773296	chr14	SYNE2,SYNE2,MIR548AZ/Body,Body,Body/-	0,167940639
cg10012273	chr5	PDE4D,PDE4D,PDE4D,PDE4D,PDE4D,PDE4D/TSS1500,Body,Body,Body,Body,Body/-	0,167937478
cg07164639	chr6	DDO,DDO/TSS1500,TSS1500/-	0,167757927
cg15549544	chr15	-/-	0,167438634
cg15046693	chr19	CEBPG/TSS1500/N_Shore	0,167250512
cg06532574	chr5	ELL2/Body/N_Shore	0,167196175
cg24101670	chr5	PCDHGB3,PCDHGB3,PCDHGA1,PCDHGA2,PCDHGA3/TSS1500,TS1500,Body,Body,Body/N_Shore	0,167113639
cg19935040	chr17	FAM171A2/Body/Island	0,166799409
cg02016419	chr17	TEKT3/TSS1500/S_Shore	0,166737607
cg03764753	chr2	-/-	0,166426144
cg11291003	chr5	-/-N_Shore	0,166197661
cg09366265	chr17	EZH1/Body/-	0,1661891
cg15672768	chr5	PCDHGA4,PCDHGA2,PCDHGB2,PCDHGA1,PCDHGB1/Body,Body,1stExon,Body,Body/Island	0,166084771
cg21570988	chr6	PRRT1/3'-UTR/Island	0,165900136
cg08296461	chr9	MVB12B/Body/-	0,165547648
cg25478614	chr3	SST/Body/N_Shore	0,165420155
cg23825213	chr18	KCNG2/TSS200/Island	0,164841994
cg06527016	chr16	CES1,CES1,CES1/Body,Body,Body/-	0,163967946
cg16164607	chr1	-/-	0,163858898
cg02282631	chr5	-/-S_Shore	0,163780041
cg08076830	chr18	-/-Island	0,163676449
cg07584066	chr17	DHX40,DHX40/TSS200,TSS200/Island	0,163069631
cg14498475	chr8	LY6K,LY6K,LY6K,LY6K,LY6K,LY6K/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,1stExon,1stExon,1stExon/Island	0,162774415
cg23149687	chr5	PRR16/5'-UTR/S_Shore	0,162656622
cg05144700	chr6	-/-	0,162280282
cg03481131	chr9	DFNB31,DFNB31,DFNB31/TSS1500,1stExon,1stExon/Island	0,16189612

Anhang

cg05003599	chr7	FBXO24,FBXO24,FBXO24/Body,1stExon,Body/S_Shelf	0,161874902
cg20938085	chr5	PCDHGB4,PCDHGA4,PCDHGA6,PCDHGA1,PCDHGA5/1stExon,Body,Body,Body,Body,/N_Shore	0,161725131
cg20665157	chr7	CADPS2,CADPS2,CADPS2/Body,Body,Body/-	0,16138759
cg25903783	chr17	-/-/Island	0,16120148
cg18158739	chr14	-/-	0,160704151
cg00199091	chr6	TRERF1/Body/S_Shore	0,160663779
cg24866418	chr3	LHFPL4/Body/Island	0,160644319
cg21044139	chr16	PKD1L2,PKD1L2,PKD1L2/TSS200,TSS200,TSS200/-	0,160609177
cg22987448	chr19	MYO1F/Body/Island	0,16030102
cg05365033	chr19	CRTC1,CRTC1/3'-UTR,3'-UTR/S_Shore	0,159597659
cg10184289	chr2	SERTAD2/5'-UTR/-	0,159580313
cg24716530	chr11	LTBP3,LTBP3,LTBP3/Body,Body,Body/Island	0,159550427
cg12357115	chr8	FAM84B/Body/Island	0,159438805
cg26612727	chr17	ZBP2,ZBP2/1stExon,1stExon/Island	0,158890768
cg03483626	chr1	KCNA3/TSS1500/S_Shore	0,158808181
cg26947034	chr7	-/-	0,158794861
cg21572722	chr6	ELOVL2/TSS1500/Island	0,158577815
cg26133418	chr1	-/-	0,15825208
cg09310092	chr19	SCN1B/Body/N_Shelf	0,157946187
cg25516803	chr3	CCK/TSS1500/Island	0,157772199
cg00787180	chr14	CCDC88C/Body/N_Shelf	0,157655261
cg20591472	chr1	SYPL2/TSS200/Island	0,157635317
cg16966496	chr12	-/-N_Shore	0,157604035
cg08754025	chr7	PDE1C/TSS200/S_Shore	0,157296638
cg09118625	chr1	DIRAS3/Body/Island	0,157243805
cg16307919	chr19	ZNF428/Body/-	0,156899672
cg06279276	chr16	B3GNT9/Body/Island	0,15681755
cg23188684	chr11	-/-/Island	0,156699564
cg09372060	chr7	PDE1C/TSS200/S_Shore	0,156524298
cg10323433	chr13	HTR2A,HTR2A/TSS1500,TSS1500/-	0,156420945
cg21915313	chr5	PCDHGA4,PCDHGA6,PCDHGA1,PCDHGA5,PCDHGB1/Body,Body,Body,Body,Body/Island	0,156208344
cg14637125	chr12	-/-	0,155943087
cg06891424	chr19	RYR1,RYR1,RYR1,RYR1/ExonBnd,ExonBnd,Body,Body/-	0,155850951
cg25800500	chr2	ANKRD23/3'-UTR/Island	0,155724811
cg05772939	chr2	LOC101927053,FAM178B/Body,Body/-	0,155364385
cg08796299	chr5	PRR16,PRR16,PRR16/Body,5'-UTR,Body/-	0,155070444
cg11970349	chr4	GPR78/TSS200/Island	0,154050826
cg15367253	chr19	SNAR-G2,CGB2/Body,TSS200/-	0,153945352
cg10478315	chr19	-/-	0,153493381
cg18269963	chr4	-/-N_Shore	0,153475751

Anhang

cg14383544	chr11	KCNJ5/5'-UTR/S_Shelf	0,153393543
cg25003531	chr12	KSR2/Body/-	0,15323077
cg25573114	chr2	RTKN/TSS1500/S_Shore	0,152569975
cg19192159	chr5	PCDHGA5,PCDHGA5,PCDHGA1,PCDHGA2/TSS200,TSS200,Body,Body/N_Shore	0,152551624
cg11945372	chr22	MICAL3,MICAL3,MICAL3/TSS1500,TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,1522244
cg18848419	chr18	CHMP1B,GNAL,GNAL,GNAL/TSS1500,Body,Body,Body/N_Shore	0,151996495
cg18468088	chr6	-/-	0,151976551
cg13085024	chr16	-/-	0,15186983
cg07323488	chr3	EGFEM1P/Body/-	0,151824234
cg00151370	chr6	ATXN1,ATXN1/Body,Body/N_Shelf	0,151706267
cg17560061	chr1	-/-S_Shore	0,151656795
cg21165089	chr11	C11orf85,C11orf85/TSS200,TSS200/Island	0,151654411
cg05993265	chr4	MFSD10,MFSD10/Body,Body/Island	0,151210362
cg06336535	chr19	FCHO1,FCHO1,FCHO1,FCHO1/Body,Body,Body,Body/Island	0,15079334
cg25645064	chr3	-/-	0,150492425
cg17090409	chr11	CHRDL2,CHRDL2/TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,150440459
cg01557798	chr1	OBSCN,OBSCN/Body,Body/Island	0,150404292
cg00059225	chr5	GLRA1,GLRA1,GLRA1,GLRA1/1stExon,1stExon,5'-UTR,5'-UTR/Island	0,150290016
cg20249566	chr19	NWD1/TSS200/-	0,150181794
cg15030397	chr5	PCDHGA4,PCDHGA7,PCDHGA6,PCDHGA1,PCDHGA5/Body,1stExon,Body,Body,Body/Island	0,15017489
cg00979931	chr11	ATG16L2/Body/Island	0,150036563
cg10832308	chr13	ENOX1,ENOX1,ENOX1/Body,Body,Body/-	0,149927785
cg20461188	chr10	-/-/Island	0,149922004
cg22818074	chr15	MAP2K1/Body/-	0,14974854
cg06563300	chr12	SLC17A8,SLC17A8/TSS200,TSS200/-	0,149740353
cg18145105	chr2	NEURL3/Body/Island	0,149723665
cg18071806	chr12	AEBP2,AEBP2,AEBP2/TSS1500,TSS1500,TSS1500/N_Shore	0,149688971
cg06853416	chr1	-/-S_Shore	0,149537561
cg11935615	chr16	KIAA0430,KIAA0430,KIAA0430/Body,Body,Body/-	0,149474698
cg24878173	chr11	ATG16L2/Body/Island	0,149219953
cg24147779	chr15	CRTC3,CRTC3/Body,Body/-	0,149136847
cg11980781	chr14	-/-	0,149114637
cg00571190	chr20	HNF4A,HNF4A,HNF4A,HNF4A,HNF4A/TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500/-	0,149042777
cg24365804	chr19	TTYH1,TTYH1,TTYH1/Body,Body,Body/-	0,148944543
cg20248866	chr17	PCYT2/TSS1500/Island	0,148856701
cg20660424	chr22	TLL12/Body/N_Shelf	0,148780108
cg07231986	chr15	-/-	0,148610332
cg03465894	chr11	-/-	0,148338088
cg22901840	chr1	DIRAS3/Body/Island	0,148237952
cg06677190	chr19	ONECUT3/Body/S_Shore	0,148020867

Anhang

cg10243278	chr14	OTX2,OTX2,OTX2,OTX2/TSS200,TSS200,TSS200,TSS200/S_Shore	0,147907317
cg03461110	chr7	FOXK1/Body/-	0,147784112
cg17621438	chr5	RNF180,RNF180/TSS1500,TSS1500/N_Shore	0,147694427
cg01579024	chr5	RANBP17/TSS1500/N_Shore	0,147634008
cg13327545	chr10	-/-/Island	0,147505434
cg08184159	chr12	TBX5,TBX5,TBX5,TBX5/Body,Body,Body,Body/N_Shore	0,147285554
cg23462697	chr12	-/-/N_Shelf	0,147236541
cg07703654	chr8	GOLSYN,GOLSYN/TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,147155728
cg11734017	chr1	RHD,RHD,RHD,RHD,RHD,RHD,RHD,RHD/5'-UTR,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/-	0,147089074
cg12957265	chr15	ZNF280D,ZNF280D,ZNF280D/TSS1500,TSS1500,TSS1500/Island	0,147024537
cg14522990	chr6	C6orf25,C6orf25,C6orf25,C6orf25,C6orf25,C6orf25/Body,Body,Body,Body,Body,Body/Island	0,146980921
cg00362690	chr15	MIR548H4/Body/-	0,146932528
cg26962778	chr5	PCDHGA4,PCDHGA2,PCDHGB2,PCDHGA1,PCDHGB1/Body,Body,1stExon,Body,Body/N_Shore	0,146927635
cg07442271	chr5	PCDHGA2,PCDHGA4,PCDHGA1,PCDHGB1,PCDHGA3/Body,1stExon,Body,Body,Body/N_Shore	0,146873655
cg22897615	chr6	PRRT1/Body/Island	0,146736839
cg21487550	chr3	-/-/Island	0,146562527
cg00958560	chr4	C4orf50/Body/-	0,14653793
cg14620941	chr9	-/-/N_Shelf	0,146051709
cg26394870	chr1	LOC102724312,LOC102724312,LOC102724312/Body,Body,Body/N_Shelf	0,146001471
cg11372636	chr6	GPR6,GPR6,GPR6,GPR6/1stExon,1stExon,5'-UTR,5'-UTR/Island	0,14594705
cg25345365	chr11	ZBTB16,ZBTB16/Body,Body/-	0,145813071
cg01542019	chr19	TECR/Body/N_Shelf	0,145806438
cg00481259	chr16	DECR2/TSS1500/Island	0,145705054
cg24213248	chr2	AGAP1,AGAP1/Body,Body/-	0,145575459
cg07476379	chr3	SOX2-OT,SOX2-OT,SOX2-OT/Body,Body,Body/-	0,145556104
cg21911021	chr19	ZIK1/TSS1500/Island	0,14545154
cg17473341	chr12	USP44,USP44,USP44/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/N_Shore	0,145307355
cg05339962	chr2	-/-/-	0,145297405
cg15089111	chr14	NPAS3,NPAS3,NPAS3,NPAS3/Body,Body,Body,Body/Island	0,144960841
cg19398269	chr6	-/-/-	0,144833918
cg15190383	chr19	CRTC1,CRTC1/3'-UTR,3'-UTR/Island	0,144458303
cg17434842	chr10	-/-/-	0,144428432
cg25423428	chr22	SULT4A1/Body/N_Shelf	0,1442274
cg18746443	chr5	LOC101929710/Body/-	0,144219715
cg14996263	chr12	ATN1,ATN1/Body,Body/Island	0,144159203
cg10180092	chr3	TNIK,TNIK,TNIK,TNIK,TNIK,TNIK,TNIK,TNIK/Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/-	0,144101912
cg15084543	chr1	ELTD1,ELTD1/5'-UTR,1stExon/Island	0,143992011
cg10313047	chr3	DNAH1/5'-UTR/-	0,143799961
cg12662084	chr6	KIF13A,KIF13A,KIF13A,KIF13A/Body,Body,Body,Body/-	0,143769723
cg27459131	chr3	P3H2,P3H2/Body,5'-UTR/-	0,143734233

Anhang

cg23752752	chr7	FOXK1/Body/-	0,14351107
cg17689735	chr8	SGCZ/TSS200/S_Shore	0,143494611
cg27067781	chr6	PRRT1/3'-UTR/Island	0,143468882
cg06435901	chr11	OPCML/Body/-	0,143398812
cg03845654	chr2	FMNL2/Body/-	0,143317384
cg08662753	chr9	COL5A1,COL5A1/Body,Body/-	0,143017579
cg11847597	chr8	PEBP4/Body/-	0,142986282
cg14767165	chr6	ACAT2/Body/S_Shore	0,142918162
cg24265195	chr2	DYSF,DYSF,DYSF,DYSF,DYSF,DYSF,DYSF,DYSF/Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/-	0,142850576
cg02428792	chr4	-/-S_Shore	0,142663739
cg13696752	chr9	C9orf68,PPAPDC2/Body,1stExon/Island	0,142635079
cg11174855	chr10	NKX6-2/3'-UTR/Island	0,142612271
cg26239485	chr2	AGAP1,AGAP1/Body,Body/-	0,142537805
cg27552418	chr4	-/-	0,142236426
cg08855133	chr1	HIVEP3/Body/-	0,142174514
cg08254359	chr12	-/-N_Shore	0,142091376
cg06335143	chr1	ZYG11A/Body/Island	0,142054057
cg02624047	chr2	STON1,STON1,STON1-GTF2A1L/TSS1500,TSS1500,TSS200/N_Shore	0,141856019
cg12902206	chr3	DNAH1/5'-UTR/-	0,141846447
cg00633552	chr5	PCDHGA4,PCDHGA2,PCDHGB2,PCDHGA1/Body,Body,1stExon,Body/N_Shore	0,1417723
cg05025860	chr4	-/-	0,141611081
cg09526429	chr4	-/-	0,141452943
cg21003654	chr4	JAKMIP1,JAKMIP1/Body,Body/Island	0,141351682
cg12598870	chr11	NELL1,NELL1/Body,Body/-	0,14130708
cg15907944	chr22	-/-Island	0,141146262
cg14696217	chr22	-/-	0,141047334
cg11323285	chr12	TRHDE-AS1,TRHDE-AS1/Body,Body/N_Shelf	0,14088661
cg00513205	chr5	NEUROG1/TSS1500/S_Shore	0,140870554
cg02188818	chr4	TBC1D9/Body/N_Shore	0,140603331
cg04906447	chr1	SLC35F3,SLC35F3/Body,Body/-	0,140448874
cg02605776	chr1	C1orf103,C1orf103/TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,140388739
cg01369611	chr5	LOC101929710/Body/-	0,140385411
cg02063488	chr2	FBXO41/Body/Island	0,140283383
cg04656321	chr19	LOC100128398,LOC100128398,ZNF606/Body,ExonBnd,TSS200/S_Shore	0,140273584
cg25264181	chr8	OXR1,OXR1,OXR1/Body,Body,Body/-	0,140210756
cg08637691	chr9	-/-	0,140194618
cg14003022	chr4	-/-Island	0,140188239
cg04427498	chr7	-/-Island	0,139936783
cg01719405	chr14	-/-	0,139777229
cg06540876	chr6	ZBTB12/TSS1500/S_Shore	0,139444628

Anhang

cg11705975	chr10	PRLHR/Body/Island	0,139353902
cg17885226	chr6	-/-/Island	0,138959963
cg03095642	chr1	SLC5A9,SLC5A9/Body,Body/-	0,138758264
cg08243356	chr18	CTIF,CTIF/Body,Body/-	0,138596808
cg01763090	chr15	OTUD7A/3'-UTR/N_Shore	0,138526242
cg02194492	chr10	MAT1A,MAT1A/1stExon,5'-UTR/-	0,138439925
cg17208001	chr18	PIEZO2/Body/-	0,138417053
cg23614947	chr14	PSMC6/TSS1500/N_Shore	0,138172347
cg20149168	chr1	DIRAS3/Body/Island	0,13811758
cg06448705	chr5	TRPC7,TRPC7,TRPC7,TRPC7,TRPC7,TRPC7/5'-UTR,1stExon,1stExon,1stExon,5'-UTR,5'-UTR/-	0,138102706
cg14951955	chr6	ATG5/TSS1500/S_Shore	0,137878459
cg25936138	chr5	-/-	0,137865574
cg00921839	chr1	-/-	0,137776079
cg16362203	chr18	BOD1L2/TSS200/-	0,137739071
cg14556683	chr19	EPHX3,EPHX3/1stExon,Body/Island	0,137667408
cg19029904	chr13	-/-	0,13756239
cg01207684	chr16	ADCY9/Body/-	0,137532164
cg04503319	chr16	ANKRD11/Body/N_Shelf	0,137260769
cg26290632	chr8	CALB1/1stExon/-	0,137142217
cg03047995	chr14	FITM1/Body/Island	0,136962202
cg13935689	chr1	-/-/S_Shore	0,136853046
cg07893565	chr4	HPSE,HPSE,HPSE,HPSE/Body,Body,Body,Body/-	0,136844989
cg05622025	chr6	-/-	0,136825996
cg25430089	chr9	PBX3,PBX3,PBX3,PBX3/Body,Body,Body,Body/-	0,136600588
cg13696706	chr9	DAB2IP/Body/-	0,13656031
cg14209133	chr5	PCDHGA4,PCDHGA1,PCDHGA6,PCDHGA5,PCDHGB1/Body,Body,1stExon,Body,Body/Island	0,136304877
cg06399965	chr16	-/-	0,136118925
cg14255824	chr9	TJP2,TJP2,TJP2,TJP2/Body,5'-UTR,Body,Body/-	0,136114407
cg01410876	chr19	LMTK3/Body/Island	0,136104072
cg01028526	chr4	TMPRSS11BNL/TSS1500/-	0,135923242
cg13552692	chr18	CCDC102B/5'-UTR/-	0,135918891
cg00481951	chr3	SST/Body/N_Shore	0,135874978
cg26670674	chr14	-/-/N_Shore	0,135803387
cg00663642	chr13	-/-	0,135800738
cg26234795	chr6	-/-/S_Shelf	0,135795959
cg22138393	chr8	PTDSS1/Body/-	0,135780487
cg01011173	chr2	-/-	0,135754402
cg23174607	chr6	PTP4A1/TSS200/N_Shore	0,135694929
cg18259003	chr17	KIF19/Body/Island	0,135653982
cg06784991	chr1	ZYG11A/Body/Island	0,135596158

Anhang

cg22358580	chr12	HOXC4,HOXC5,HOXC5/5'-UTR,TSS200,Body/N_Shore	0,135478867
cg07930159	chr8	TPD52,TPD52,TPD52,TPD52,TPD52,TPD52,TPD52/Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/-	0,135351523
cg24579753	chr13	MTUS2,MTUS2/Body,Body/-	0,13513591
cg18738190	chr10	CHST3/5'-UTR/-	0,135002329
cg08586168	chr3	ADCY5/TSS1500/Island	0,134883092
cg12910087	chr4	-/-	0,134806977
cg06601581	chr16	-/-N_Shelf	0,134800125
cg08119153	chr14	NRXN3,NRXN3/5'-UTR,Body/-	0,134797202
cg11376375	chr1	SUSD4/Body/-	0,134400231
cg23181554	chr10	-/-Island	0,13439203
cg20544848	chr19	ELAVL3,ELAVL3/TSS200,TSS200/Island	0,134367017
cg10211414	chr1	RERE,RERE/5'-UTR,5'-UTR/N_Shore	0,134279641
cg21599943	chr17	-/-	0,134160505
cg07991335	chr10	WDR11-AS1,MIR5694/Body,Body/-	0,134070551
cg12534424	chr7	PRRT4/Body/Island	0,134063319
cg00366917	chr18	MBP,MBP/TSS1500,TSS1500/Island	0,133897907
cg20366299	chr3	DALRD3,DALRD3,DALRD3,NDUFAF3/5'-UTR,TSS1500,TSS1500,TSS1500/N_Shore	0,133875958
cg06648759	chr13	-/-	0,133765696
cg19784428	chr19	NWD1/TSS200/-	0,133636398
cg06726154	chr8	-/-	0,13356041
cg01820962	chr6	NT5DC1/Body/-	0,133455458
cg11954763	chr3	TMEM108,TMEM108,TMEM108/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/-	0,133440736
cg05768419	chr1	GPR52,RABGAP1L/1stExon,Body/-	0,133253133
cg04004558	chr16	SOCS1/3'-UTR/Island	0,132907675
cg20774052	chr7	LOC100505921,GLCCI1/TSS1500,Body/S_Shore	0,132864754
cg11564711	chr18	-/-Island	0,132862532
cg10380546	chr11	AP2A2,AP2A2/Body,Body/N_Shore	0,132733946
cg14179389	chr1	GFI1,GFI1,GFI1/Body,Body,Body/Island	0,132722275
cg19136485	chr14	KIAA0125/Body/-	0,132707241
cg27057509	chr6	VAR2,VAR2,VAR2/Body,Body,Body/S_Shore	0,132601412
cg23294940	chr10	ANAPC16,ANAPC16,ANAPC16,ANAPC16,ASCC1/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,TSS1500/S_Shore	0,132232122
cg19419291	chr5	ELL2/Body/N_Shore	0,132029383
cg09126156	chr9	STXBP1,STXBP1/3'-UTR,Body/N_Shelf	0,132023374
cg12590902	chr1	ERI3/Body/-	0,132015473
cg17592231	chr11	-/-S_Shore	0,131996319
cg18501647	chr6	PRRT1/Body/N_Shore	0,131828127
cg25174343	chr21	RIPK4/Body/N_Shore	0,131625509
cg04265051	chr11	LRP5/TSS1500/N_Shore	0,131619871
cg14961794	chr11	OR9Q1/5'-UTR/-	0,131552321
cg22099081	chr12	-/-	0,131464619

Anhang

cg19135247	chr21	SIK1/Body/S_Shelf	0,131416103
cg15986030	chr19	COMP/TSS200/Island	0,131008265
cg02062744	chr10	ZFAND4,ZFAND4,ZFAND4,ZFAND4,ZFAND4/TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500/Island	0,130961342
cg14600016	chr15	-/-	0,130950884
cg20464360	chr17	HSF5/Body/Island	0,13086298
cg03611029	chr3	IQSEC1/TSS1500/S_Shore	0,130860988
cg13561879	chr8	UNC5D/TSS1500/Island	0,130744864
cg02188411	chr1	ATAD3B/Body/S_Shelf	0,130680806
cg22376913	chr15	IGF1R,IGF1R/Body,Body/-	0,130674211
cg12472449	chr17	BAIAP2,BAIAP2,BAIAP2,BAIAP2/Body,Body,Body,Body/N_Shelf	0,130550766
cg19052410	chr15	PWRN1/Body/-	0,130165347
cg23762517	chr1	HIVEP3,HIVEP3,HIVEP3,HIVEP3/1stExon,1stExon,5'-UTR,5'-UTR/S_Shore	0,130079219
cg03164627	chr19	KDM4B/Body/S_Shore	0,130065049
cg18486590	chr14	HSPA2,HSPA2/3'-UTR,1stExon/S_Shore	0,130041327
cg06742719	chr5	PCDHGA2,PCDHGA3,PCDHGA1,PCDHGA3/Body,TSS200,Body,TSS200/N_Shore	0,130038041
cg00439658	chr17	GRIN2C/Body/Island	0,130008647
cg24633027	chr5	PCDHGA4,PCDHGA1,PCDHGA6,PCDHGA5,PCDHGB1,PCDHGA3,PCDHGA6,PCDHGA2,PCDHGB2,PCDHGB3/Body,Body,1stExon,Body,Body,Body,1stExon,Body,Body,Body/N_Shore	0,129982202
cg08743751	chr5	MAST4,MAST4/Body,Body/S_Shelf	0,129927686
cg04527880	chr8	PEBP4/Body/-	0,129913154
cg24056733	chr5	NA	0,129904297
cg19856897	chr7	-/-S_Shore	0,129810639
cg07734149	chr5	SLC9A3,SLC9A3/Body,Body/S_Shelf	0,129790455
cg05527920	chr4	-/-	0,129639782
cg06096746	chr20	-/-	0,12959457
cg00714115	chr19	-/-Island	0,129565251
cg20079992	chr19	SHANK1/Body/S_Shelf	0,129490599
cg06068362	chr2	LINC00486/Body/-	0,129485124
cg02281167	chr6	TRIM15/Body/Island	0,129417796
cg06893891	chr4	-/-	0,129393785
cg03716852	chr19	TRPM4/Body/Island	0,12935075
cg22736354	chr6	NHLRC1/1stExon/Island	0,128938355
cg01844642	chr3	GPR62/1stExon/Island	0,128757285
cg12868583	chr22	PNPLA3/Body/Island	0,128394279
cg09727935	chr6	LINC00577/TSS200/Island	0,128368406
cg11388320	chr4	PRDM8,PRDM8/5'-UTR,5'-UTR/Island	0,128365764
cg24450548	chr21	-/-	0,128145683
cg08885800	chr1	-/-Island	0,128094284
cg09099868	chr10	-/-N_Shore	0,128029115
cg15255403	chr12	-/-S_Shore	0,127978519
cg20174472	chr20	SLCO4A1/5'-UTR/-	0,127960733
cg26901661	chr10	-/-	0,127751734

Anhang

cg08005858	chr1	CACNA1E,CACNA1E,CACNA1E/Body,Body,Body/-	0,124284782
cg23369111	chr18	C18orf26/TSS200/-	0,124155835
cg27206603	chr16	SHISA9/Body/-	0,124110175
cg01289480	chr15	KLF13,KLF13/Body,Body/-	0,124066231
cg27352764	chr21	SETD4,SETD4,SETD4,SETD4,SETD4/Body,Body,Body,Body,Body/-	0,124016797
cg18459154	chr20	-/-/Island	0,123990152
cg07017875	chr5	PCDHGA4,PCDHGA9,PCDHGA1,PCDHGB1,PCDHGB6,PCDHGB6,PCDHGB3,PCDHGA6,PCDHGA8,PCDHGA5,PCDHGB4,PCDHGA3,PCDHGA2,PCDHGB2,PCDHGA7,PCDHGB5/Body,Body,Body,Body,1stExon,1stExon,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/Island	0,123985684
cg26750073	chr5	-/-	0,123979634
cg24490801	chr8	-/-	0,123952382
cg12959488	chr16	-/-S_Shore	0,123947182
cg00667789	chr1	TACSTD2/1stExon/Island	0,123939658
cg02715006	chr5	PCDHGA4,PCDHGA11,PCDHGA9,PCDHGA1,PCDHGB1,PCDHGB6,PCDHGB3,PCDHGA11,PCDHGB7,PCDHGA6,PCDHGA8,PCDHGA11,PCDHGA10,PCDHGA5,PCDHGB4,PCDHGA3,PCDHGA2,PCDHGB2,PCDHGA7,PCDHGB5/Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,1stExon,Body,Body,Body,1stExon,Body,Body,Body,Body/S_Shore	0,123795064
cg10235817	chr4	ADRA2C/1stExon/Island	0,123690749
cg04007813	chr13	LMO7,LMO7,LMO7/5'-UTR,Body,Body/-	0,123672862
cg02755938	chr18	CHMP1B,GNAL,GNAL,GNAL/TSS1500,Body,Body,Body/N_Shore	0,123652452
cg05064829	chr1	-/-	0,123638781
cg01314359	chr15	PWAR1/Body/-	0,123637119
cg26305174	chr7	SLC12A9,TRIP6/Body,TSS1500/N_Shore	0,123604565
cg22070880	chr22	-/-/Island	0,123484208
cg18393958	chr11	FAM181B,FAM181B/1stExon,3'-UTR/N_Shore	0,123295275
cg22087053	chr5	PCDHGA4,PCDHGB3,PCDHGA1,PCDHGA5,PCDHGB1,PCDHGA3,PCDHGB3,PCDHGA2,PCDHGB2/Body,1stExon,Body,Body,Body,Body,1stExon,Body,Body/Island	0,123276061
cg07573085	chr4	LETM1/Body/S_Shelf	0,123230075
cg16330755	chr10	C10orf32,C10orf32/TSS200,TSS200/N_Shore	0,123166528
cg24077102	chr11	C11orf85,C11orf85/TSS200,TSS200/Island	0,123155077
cg01634328	chr4	-/-	0,123151521
cg21237828	chr16	CNGB1,CNGB1/Body,Body/-	0,123107047
cg20673321	chr19	ZNF541/Body/S_Shore	0,122993862
cg05553829	chr8	SDR16C6/1stExon/-	0,122901807
cg06549686	chr12	LOC100996671,LOC100996671,LOC100996671/Body,Body,Body/-	0,122892024
cg13218710	chr5	SHROOM1/Body/Island	0,122441673
cg19407095	chr13	SOX1/TSS200/Island	0,122268955
cg01327147	chr9	KIAA1161/Body/Island	0,122193019
cg19349362	chr7	CEP41,CEP41,CEP41,CEP41,CEP41/Body,Body,Body,Body,Body/-	0,122149917
cg21921904	chr7	CYTH3/Body/-	0,122052405
cg01205295	chr16	JPH3,JPH3/Body,Body/-	0,122030262
cg08209133	chr4	SLC10A4/1stExon/Island	0,121982406

Anhang

cg00075507	chr17	SARM1/Body/Island	0,119149382
cg02299710	chr6	RAET1G,RAET1G/TSS1500,TSS1500/N_Shore	0,118605014
cg16924010	chr3	-/-S_Shelf	0,118495224
cg13307649	chr14	-/-	0,118492293
cg07262635	chr10	CACNB2,CACNB2,CACNB2,CACNB2,CACNB2,CACNB2,CACNB2,CA CNB2,CACNB2/Body,Body,Body,Body,Body,TSS200,Body,Body,Body/ -	0,11848079
cg01049205	chr10	LRIT1/Body/Island	0,118371096
cg20272935	chr11	UNC93B1/Body/S_Shore	0,118280291
cg26685941	chr13	ABCC4,ABCC4/Body,Body/N_Shore	0,118253437
cg22920501	chr2	FAM59B/Body/N_Shore	0,11825017
cg09461530	chr19	-/-S_Shelf	0,118182759
cg08161480	chr1	-/-S_Shelf	0,118072328
cg18546989	chr6	ARID1B,ARID1B/Body,Body/-	0,118048965
cg10036013	chr7	FOXK1/Body/-	0,118029468
cg04208403	chr16	ZNF423/Body/N_Shore	0,11797775
cg01302656	chr14	C14orf23/Body/Island	0,11796083
cg02419123	chr8	-/-	0,117951723
cg14692377	chr17	SLC6A4,SLC6A4/1stExon,5'-UTR/Island	0,117942472
cg15949925	chr19	HSPBP1,HSPBP1,HSPBP1/Body,Body,Body/-	0,117917276
cg01162877	chr1	RERE,RERE/Body,Body/-	0,117902218
cg02204688	chr19	TTYH1,TTYH1,TTYH1/TSS1500,TSS1500,TSS1500/N_Shore	0,117867028
cg06675893	chr18	CELF4,CELF4,CELF4,CELF4/Body,Body,Body,Body/-	0,117813323
cg11659357	chr7	EGFR,EGFR,EGFR,EGFR/Body,Body,Body,Body/-	0,117719654
cg04655320	chr12	-/-	0,117689793
cg14373322	chr19	STRN4,STRN4,STRN4,STRN4/ExonBnd,ExonBnd,Body,Body/-	0,117676086
cg25616918	chr2	-/-	0,117564536
cg23414001	chr20	TRPC4AP,TRPC4AP/TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,117476553
cg16968057	chr6	SOBP/Body/Island	0,117338628
cg08380618	chr14	-/-	0,117324301
cg11209121	chr2	NR4A2,NR4A2/Body,ExonBnd/S_Shore	0,117318899
cg22253012	chr17	-/-	0,117290084
cg06533577	chr7	-/-	0,117242197
cg24368226	chr15	ADAMTS17/Body/-	0,117209532
cg24436365	chr6	-/-	0,117181131
cg03308652	chr3	-/-Island	0,116998426
cg12968684	chr5	EBF1,EBF1,EBF1/Body,Body,Body/-	0,116966121
cg15585987	chr8	SNTG1,SNTG1/5'-UTR,1stExon/S_Shore	0,116953827
cg27515922	chr16	-/-	0,11684983
cg09935512	chr2	TEKT4,TEKT4,LOC442028/TSS1500,TSS1500,Body/N_Shore	0,116776308
cg08424749	chr6	PRRT1/Body/N_Shore	0,116552146
cg27076669	chr12	CPM,CPM,CPM/TSS1500,TSS1500,5'-UTR/Island	0,116337909
cg25654705	chr4	-/-N_Shelf	0,116249287

Anhang

cg12610917	chr19	IRF2BP1/1stExon/Island	0,116212226
cg23268197	chr19	INSL3/1stExon/Island	0,116196679
cg21916100	chr11	APIP,PDHX,PDHX,PDHX/TSS1500,Body,Body,Body/S_Shore	0,116149727
cg02663839	chr16	-/-	0,116078616
cg24415728	chr8	-/-S_Shore	0,116059484
cg06737494	chr3	GHSR,GHSR/TSS1500,TSS1500/Island	0,115937562
cg03169527	chr3	C3orf31/TSS1500/S_Shore	0,115917711
cg18758922	chr22	CACNG2/TSS1500/S_Shore	0,115832354
cg02893550	chr16	-/-Island	0,115824074
cg15194935	chr19	ICAM5/Body/Island	0,115819257
cg23766254	chr17	FAM171A2/Body/Island	0,115761548
cg11210069	chr5	PCDHGA4,PCDHGA6,PCDHGA1,PCDHGA5,PCDHGB1,PCDHGA3,PCDHGA2,PCDHGB2,PCDHGA7,PCDHGA7,PCDHGB3/Body,Body,Body,Body,Body,Body,TSS1500,TSS1500,Body/N_Shore	0,115670845
cg21620282	chr14	CHGA,CHGA,CHGA,CHGA/5'-UTR,5'-UTR,1stExon,1stExon/Island	0,115600787
cg11551901	chr10	SEC31B/Body/-	0,115531498
cg11399640	chr15	-/-	0,115438471
cg27535616	chr15	-/-	0,115355827
cg24380977	chr19	-/-	0,115254991
cg14943847	chr21	RCAN1,RCAN1,RCAN1,RCAN1,RCAN1,RCAN1/TSS1500,TSS1500,Body,Body,Body,5'-UTR/-	0,115244476
cg14570348	chr19	MIR1268A/Body/N_Shelf	0,115183406
cg12802086	chr1	MECR,MECR/TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,115153697
cg23061027	chr6	PRRT1/3'-UTR/N_Shore	0,115144806
cg09616647	chr3	VWA5B2,MIR1224/Body,TSS200/Island	0,115073303
cg01199494	chr20	EMILIN3/Body/N_Shore	0,115040671
cg17588585	chr7	-/-N_Shore	0,115035965
cg04886950	chr10	PRKG1,PRKG1/Body,Body/-	0,114993321
cg14077898	chr12	SLC17A8,SLC17A8/TSS200,TSS200/-	0,114831821
cg27302051	chr12	-/-	0,114773455
cg04807108	chr15	-/-	0,114686397
cg08864344	chr1	-/-Island	0,114652422
cg21763814	chr6	-/-	0,11463671
cg05275277	chr12	RIMBP2/5'-UTR/-	0,114596321
cg17009978	chr3	VWA5B2,MIR1224/Body,TSS200/N_Shore	0,114390772
cg10243030	chr20	-/-	0,114359227
cg04479264	chr19	-/-	0,114352551
cg14359787	chr19	ANGPTL4,ANGPTL4,ANGPTL4/TSS1500,TSS1500,TSS1500/N_Shore	0,114326256
cg18006975	chr5	LOC100505841/Body/-	0,11429544
cg16276053	chr12	TMTC1,TMTC1/Body,Body/-	0,114247792
cg14674720	chr2	-/-Island	0,114018684
cg06470855	chr13	-/-Island	0,113966637
cg21995847	chr1	PSMD4/Body/-	0,113931754
cg03947688	chr5	ANKRD34B/TSS200/Island	0,11391711

Anhang

cg25889998	chr17	-/-	0,113902857
cg04931708	chr7	FEZF1,FEZF1,FEZF1-AS1/TSS200,TSS200,Body/S_Shore	0,113859054
cg11842367	chr1	MGC27382/Body/-	0,113765162
cg25756406	chr10	-/-/Island	0,113742164
cg10192587	chr5	-/-	0,113556104
cg04803208	chr8	LOC100130298/Body/-	0,113543955
cg21771140	chr8	-/-	0,11348931
cg15557036	chr17	-/-/Island	0,113479114
cg10703784	chr12	-/-/N_Shore	0,113316597
cg01754082	chr20	PCSK2,PCSK2,PCSK2/TSS1500,TSS1500,TSS200/Island	0,113204064
cg01895805	chr8	TRAPPC9,TRAPPC9/Body,Body/-	0,113093618
cg16219603	chr8	PENK/TSS1500/Island	0,113091043
cg26387435	chr7	CNTNAP2/Body/-	0,113077272
cg15507683	chr15	TCF12,TCF12,TCF12,TCF12,TCF12,TCF12,TCF12/Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/-	0,112812205
cg07160033	chr1	-/-	0,112804821
cg26333393	chr10	CPXM2/TSS1500/S_Shore	0,11269462
cg10644701	chr12	-/-	0,112641533
cg26375473	chr5	PCDHGA4,PCDHGA11,PCDHGA11,PCDHGA9,PCDHGA1,PCDHGB1,PCDHGB6,PCDHGA12,PCDHGB3,PCDHGB7,PCDHGA6,PCDHGA8,PCDHGA10,PCDHGA12,PCDHGA5,PCDHGB4,PCDHGA3,PCDHGA2,PCDHGA7,PCDHGB2,PCDHGB5/Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,1stExon,Body,Body,Body,Body,Body,1stExon,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/Island	0,112626291
cg21690805	chr22	TRABD/5'-UTR/N_Shore	0,1126047
cg01296603	chr1	LRP8,LRP8,LRP8,LRP8/Body,Body,Body,Body/-	0,112546352
cg09066349	chr20	-/-	0,112444892
cg19392551	chr10	AKR1E2/TSS200/Island	0,112412654
cg19419575	chr12	SP1,SP1,SP1/3'-UTR,3'-UTR,3'-UTR/-	0,112396824
cg11471138	chr5	-/-/N_Shelf	0,112391644
cg07715257	chr1	EPHA2/Body/N_Shelf	0,112267571
cg15389227	chr7	CADPS2,CADPS2,CADPS2/Body,Body,Body/-	0,112111728
cg18158855	chr20	SLC13A3,SLC13A3,SLC13A3,SLC13A3,SLC13A3/Body,Body,Body,Body,Body/-	0,112105263
cg13972648	chr2	-/-	0,112083798
cg22679740	chr3	-/-/S_Shelf	0,112064941
cg04028695	chr10	-/-	0,112009902
cg03653511	chr5	B4GALT7/TSS1500/N_Shore	0,111946323
cg14811319	chr6	SPACA1/TSS200/Island	0,111731169
cg13654588	chr10	PRLHR/Body/Island	0,111729871
cg03235758	chr17	MYCBPAP/Body/-	0,11168211
cg09017434	chr5	MARCH11/1stExon/Island	0,111579827
cg15966954	chr5	IL9/TSS200/-	0,111574075
cg11220950	chr16	SYNGR3/Body/Island	0,111500713
cg14854355	chr17	SARM1/Body/Island	0,111444092

Anhang

cg10784813	chr16	SOCS1/3'-UTR/Island	0,111266668
cg12781086	chr7	BMPER/Body/Island	0,111101029
cg18813588	chr5	MCC,MCC/Body,Body/-	0,11109445
cg24093698	chr11	NTM/Body/-	0,111034503
cg01013171	chr14	-/-	0,110837831
cg16005271	chr10	-/-N_Shore	0,110782997
cg10361013	chr10	RASGEF1A/TSS1500/-	0,110726875
cg07490692	chr21	-/-	0,110590361
cg21093945	chr1	-/-	0,110514099
cg06896909	chr7	TMEM196/TSS1500/S_Shore	0,110405476
cg17152981	chr6	GPR6/TSS1500/Island	0,110326216
cg02911246	chr17	-/-	0,110243744
cg03054277	chr1	OBSCN,OBSCN/Body,Body/Island	0,110132974
cg17923553	chr4	SOD3/TSS200/-	0,110123962
cg04455670	chr4	PALLD,PALLD,PALLD,PALLD/Body,Body,Body,Body/S_Shelf	0,110057778
cg02752915	chr17	DOC2B/1stExon/Island	0,110046803
cg25418748	chr5	RUFY1/TSS1500/N_Shore	0,109847036
cg15504461	chr3	-/-N_Shore	0,109759995
cg09333820	chr3	CD200,CD200/TSS1500,TSS1500/N_Shore	0,109696773
cg19646200	chr12	GALNT9/Body/S_Shore	0,109691633
cg07884764	chr11	CCDC88B/TSS200/N_Shelf	0,10967153
cg15626285	chr12	C1S,C1S/TSS200,TSS200/-	0,109657051
cg23995914	chr4	ZNF518B/TSS200/Island	0,109532515
cg14913178	chr6	-/-	0,109478839
cg06942685	chr19	ZNF542,ZNF542,ZNF542,ZNF542/TSS1500,TSS1500,TSS200,TSS200/Island	0,109365639
cg25414165	chr10	C10orf11/TSS200/-	0,109256386
cg25713558	chr14	DIO2,DIO2,DIO2,DIO2,DIO2,DIO2-AS1/TSS200,TSS1500,TSS1500,TSS1500,5'-UTR,Body/-	0,109151913
cg04858539	chr22	LARGE,LARGE/Body,Body/-	0,109061118
cg24871743	chr1	DIRAS3/Body/Island	0,108902503
cg00417151	chr20	RRBP1,RRBP1/Body,Body/S_Shelf	0,10890121
cg16083551	chr16	-/-Island	0,108795168
cg22201540	chr9	-/-	0,108706216
cg13723336	chr8	-/-	0,108595507
cg19320261	chr1	ROR1,ROR1/Body,Body/-	0,108519219
cg11622231	chr6	SOBP/Body/Island	0,10841769
cg01287975	chr7	TAC1,TAC1,TAC1,TAC1/TSS200,TSS200,TSS200,TSS200/Island	0,108391982
cg19671120	chr2	CNGA3,CNGA3,CNGA3,CNGA3/1stExon,1stExon,5'-UTR,5'-UTR/Island	0,108290914
cg11290378	chr10	CCDC172/5'-UTR/-	0,108206918
cg25983380	chr20	GNAS,GNAS,GNAS,GNAS,GNAS,GNAS,GNAS,GNAS/3'-UTR,TSS1500,TSS1500,Body,TSS1500,3'-UTR,TSS1500,Body/Island	0,108150435

Anhang

cg27631817	chr6	-/-	0,108127892
cg00254679	chr6	MAP3K5/Body/-	0,108019995
cg09530779	chr3	BTLA,BTLA,BTLA,BTLA/1stExon,1stExon,5'-UTR,5'-UTR/-	0,108008483
cg21154795	chr12	-/-	0,107922354
cg07408456	chr19	PGLYRP2/TSS1500/-	0,107906578
cg27570738	chr12	-/-Island	0,10783371
cg20505565	chr2	-/-	0,107808405
cg26277237	chr9	KANK1,KANK1,KANK1/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/-	0,107779638
cg02983424	chr15	-/-	0,107676925
cg08005692	chr1	ASH1L/5'-UTR/-	0,107587068
cg05702347	chr6	-/-	0,107526785
cg09639931	chr17	ZPBP2,ZPBP2/TSS200,TSS200/Island	0,107188044
cg07766263	chr3	SLC7A14/5'-UTR/Island	0,107135531
cg09788125	chr15	-/-	0,10707974
cg11918171	chr3	ZBED2,CD96,CD96/TSS1500,Body,Body/-	0,106954691
cg05404236	chr13	IRS2/1stExon/Island	0,106943541
cg26140120	chr8	FAM83A,FAM83A/Body,Body/Island	0,106694152
cg03975235	chr22	GALR3/Body/Island	0,106507018
cg14968926	chr5	CWC27,CWC27/Body,Body/-	0,106389806
cg12887220	chr1	BPNT1,BPNT1,BPNT1,BPNT1,RNU5F-1/TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,Body/N_Shelf	0,106379422
cg21520111	chr19	TRPM4/Body/Island	0,106221016
cg13673455	chr5	PCSK1,PCSK1,LOC101929710/Body,Body,Body/-	0,106119279
cg21186757	chr2	-/-	0,106015504
cg11432303	chr5	HTR1A/TSS1500/S_Shore	0,105984598
cg03428193	chr12	B4GALNT3/Body/-	0,105973706
cg07892422	chr12	HOXC13/1stExon/Island	0,105809264
cg14043816	chr1	-/-	0,105738767
cg25745729	chr10	-/-	0,105695451
cg26449130	chr4	-/-	0,105649284
cg21822173	chr2	AMMECR1L,AMMECR1L/5'-UTR,5'-UTR/-	0,105568274
cg23900763	chr11	PSMD13,PSMD13/Body,Body/-	0,105538953
cg04584103	chr14	ASB2/Body/Island	0,105537808
cg21931419	chr14	TMEM90A/TSS1500/Island	0,105429162
cg12693179	chr12	LGR5,LGR5,LGR5,LGR5/Body,Body,Body,Body/-	0,10539696
cg02134705	chr3	WWTR1/5'-UTR/-	0,105298022
cg24084872	chr3	ZBTB20-AS3,ZBTB20,ZBTB20,ZBTB20/TSS1500,Body,5'-UTR,5'-UTR/-	0,105254155
cg20751926	chr16	MMP15/Body/Island	0,105208149
cg15851014	chr4	TLR3/TSS1500/-	0,105106893
cg19540560	chr8	SGCZ/TSS1500/S_Shore	0,105106149
cg00688297	chr8	LRRC24,MGC70857/5'-UTR,3'-UTR/Island	0,105097883

Anhang

cg01301252	chr5	PCDHGA2,PCDHGA3,PCDHGA3,PCDHGA1/Body,1stExon,1stExon,Body/N_Shore	0,102096317
cg12081325	chr1	EIF2B3,EIF2B3/Body,Body/-	0,101894244
cg26528357	chr14	-/-	0,101841561
cg10107890	chr2	-/-/Island	0,10174571
cg19190593	chr6	LY86,LOC285780/TSS200,Body/-	0,101651599
cg17903450	chr6	SCGN/TSS200/N_Shore	0,101540014
cg09726198	chr3	-/-	0,101433844
cg11747251	chr11	CREBZF,CREBZF,CREBZF,CREBZF,CREBZF,CREBZF/3'-UTR,1stExon,Body,Body,Body,Body/N_Shore	0,101376082
cg18236477	chr13	ATP8A2/Body/Island	0,101243901
cg21218758	chr19	ELAVL3,ELAVL3/TSS200,TSS200/Island	0,101067578
cg05371578	chr3	ZIC1/1stExon/Island	0,100940303
cg17303833	chr10	ZNF518A/TSS200/N_Shore	0,100919207
cg16544169	chr8	NKX2-6/TSS1500/Island	0,100827542
cg03607117	chr3	SFMBT1,SFMBT1,SFMBT1/TSS1500,TSS1500,TSS1500/Island	0,100795977
cg25045526	chr7	FEZF1,FEZF1,FEZF1,FEZF1,FEZF1-AS1/1stExon,1stExon,5'-UTR,5'-UTR,Body/Island	0,100729108
cg12765028	chr4	-/-/Island	0,100699606
cg14811105	chr2	NR4A2/Body/Island	0,100674773
cg13848598	chr10	ADRB1/1stExon/Island	0,100646186
cg00841760	chr7	PTPRN2,PTPRN2,PTPRN2/Body,Body,Body/Island	0,100626259
cg16456870	chr1	PER3,PER3,PER3,PER3,PER3/TSS200,TSS200,TSS200,TSS200,TS200/Island	0,100540275
cg23680086	chr5	PCDHGA8,PCDHGB5,PCDHGA9,PCDHGB6,PCDHGB6,PCDHGA1,PCDHGA2,PCDHGA3,PCDHGB1,PCDHGA4,PCDHGB2,PCDHGA5,PCDHGB3,PCDHGA6,PCDHGA7,PCDHGB4/Body,Body,Body,TSS200,TSS200,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/Island	0,10038347
cg20742389	chr19	GIPC1,GIPC1,GIPC1,GIPC1,GIPC1,GIPC1/Body,Body,Body,Body,Body,Body/Island	0,100349412
cg03126058	chr1	PRDM16,PRDM16/Body,Body/-	0,100274669
cg15619071	chr14	SLC25A21-AS1,SLC25A21,SLC25A21/Body,TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,100266366
cg26220336	chr20	FAM83D/TSS1500/N_Shore	0,100220734
cg25694790	chr20	DSTN,DSTN/Body,Body/-	0,100044086
cg19146916	chr9	-/-	0,100013651
cg19501858	chr2	ST6GAL2,ST6GAL2,ST6GAL2/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/-	0,099807132
cg06962373	chr13	-/-	0,099801773
cg16306870	chr3	C3orf21/Body/-	0,099789662
cg27530239	chr17	CALCOCO2/5'-UTR/S_Shore	0,099750791
cg05845403	chr13	DZIP1,DZIP1/Body,Body/Island	0,099577286
cg19599611	chr15	AQR/3'-UTR/-	0,099494838
cg04986579	chr19	UNC13A/TSS1500/S_Shore	0,099475742
cg05412028	chr13	ABCC4,ABCC4/Body,Body/N_Shore	0,099418236

Anhang

cg21429394	chr12	SLC17A8,SLC17A8,SLC17A8,SLC17A8/1stExon,5'-UTR,1stExon,5'-UTR/-	0,099386304
cg03028536	chr12	CUX2/Body/-	0,099262696
cg06333233	chr2	CREG2/3'-UTR/-	0,099164076
cg03185704	chr7	LRRC61,ACTR3C,LRRC61/TSS200,5'-UTR,TSS200/Island	0,099087201
cg14105637	chr21	KRTAP12-3,TSPEAR,TSPEAR/TSS200,Body,5'-UTR/-	0,099065432
cg22398259	chr8	-/-	0,098921995
cg14087880	chr10	PPYR1/TSS1500/N_Shore	0,098810307
cg04436818	chr10	PAX2,PAX2,PAX2,PAX2,PAX2/3'-UTR,3'-UTR,3'-UTR,3'-UTR,3'-UTR/N_Shore	0,098796902
cg00247870	chr2	-/-	0,098466453
cg21047367	chr2	GREB1/Body/Island	0,098352434
cg07254032	chr5	HCN1/1stExon/Island	0,098262878
cg03649834	chr1	SELP/Body/-	0,098239688
cg05548469	chr4	TRPC3,TRPC3/1stExon,Body/N_Shore	0,098151882
cg06691343	chr8	-/-	0,098138685
cg19392831	chr10	PRLHR/TSS1500/Island	0,09813267
cg14214717	chr20	-/-	0,098118026
cg05665581	chr10	FAM24A/TSS1500/-	0,098085747
cg10141715	chr12	SLC5A8/1stExon/Island	0,098084983
cg08443492	chr21	KRTAP10-6,TSPEAR,TSPEAR/TSS1500,Body,5'-UTR/-	0,098030949
cg02228185	chr17	ASPA,ASPA/1stExon,Body/-	0,097881828
cg14162806	chr22	PDGFB/TSS1500/S_Shore	0,097862871
cg07758738	chr18	-/-/Island	0,097601681
cg27242132	chr4	PRDM8,PRDM8/5'-UTR,5'-UTR/Island	0,097556344
cg22013249	chr2	KLHL29/Body/-	0,097499387
cg21788281	chr5	-/-/Island	0,097470895
cg07502389	chr8	NEFM,NEFM/TSS200,TSS1500/Island	0,097459666
cg08878263	chr16	SLC9A5/Body/-	0,097446065
cg20558987	chr20	ARFGF2/TSS1500/N_Shore	0,097429411
cg12004295	chr15	FAM189A1/Body/-	0,097396326
cg07719604	chr16	ELMO3,E2F4/TSS1500,3'-UTR/N_Shore	0,09734526
cg15381304	chr6	GPR6/TSS200/Island	0,097228808
cg00151250	chr8	NECAB1/TSS1500/N_Shore	0,097208373
cg17111800	chr12	NINJ2,NINJ2,LOC100049716/Body,5'-UTR,Body/-	0,09703904
cg20058308	chr12	-/-	0,096997747
cg08475411	chr17	-/-	0,096839709
cg15957394	chr4	AFAP1,AFAP1/TSS200,TSS200/Island	0,096828208
cg15726426	chr1	KCNA3/1stExon/Island	0,096715547
cg24061675	chr12	-/-	0,096700803
cg15936446	chr5	-/-/Island	0,096639833
cg00419702	chr22	BAIAP2L2/Body/Island	0,096583814
cg16281776	chr1	PRELP,PRELP/TSS1500,TSS1500/-	0,096509927

Anhang

cg04807694	chr2	UBE2E3,UBE2E3,UBE2E3/5'-UTR,5'-UTR,1stExon/Island	0,096332435
cg00578039	chr6	C6orf25,C6orf25,C6orf25,C6orf25,C6orf25,C6orf25/Body,Body,Body,Body,Body,Body/N_Shore	0,096189783
cg09305680	chr8	UTP23/TSS1500/N_Shore	0,0961039
cg26773506	chr11	UBE4A,UBE4A/TSS1500,TSS1500/N_Shore	0,096042022
cg12094174	chr6	MICB/Body/Island	0,095888529
cg26888530	chr4	AFAP1,AFAP1/TSS200,TSS200/Island	0,095737536
cg15729315	chr4	APBB2,APBB2,APBB2/Body,Body,Body/-	0,095709378
cg09739017	chr17	CACNG1/1stExon/Island	0,09566369
cg08859675	chr19	PDE4A,PDE4A,PDE4A,PDE4A,PDE4A,PDE4A/5'-UTR,1stExon,Body,Body,Body,Body/-	0,095416952
cg21750785	chr6	DCBLD1/Body/-	0,095389854
cg27239981	chr6	-/-N_Shelf	0,095259821
cg04478095	chr6	-/-Island	0,095227281
cg27366532	chr16	CREBBP,CREBBP/Body,Body/-	0,095140274
cg24592370	chr12	GALNT9,LOC100130238/Body,Body/N_Shore	0,095002815
cg17380795	chr3	-/-	0,09458584
cg01295203	chr8	PRDM14/TSS1500/Island	0,094516511
cg27320127	chr2	KCNK12/TSS1500/Island	0,094500596
cg01933040	chr12	TPH2/Body/-	0,094473022
cg05176199	chr15	-/-	0,094337688
cg00237547	chr14	KIAA0125/Body/-	0,0943102
cg27099280	chr15	CELF6,CELF6/1stExon,1stExon/Island	0,094260348
cg18633600	chr12	LRTM2,LRTM2,CACNA2D4,LRTM2/Body,Body,Body,Body/-	0,094201729
cg26975066	chr11	PGR,PGR,PGR,PGR,PGR,PGR,PGR,LOC101054525/TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,Body/S_Shore	0,094165912
cg17679107	chr8	NSMCE2/Body/-	0,093973919
cg01770755	chr15	-/-Island	0,093938416
cg09190051	chr15	ZNF280D,ZNF280D,ZNF280D/TSS1500,TSS1500,TSS1500/Island	0,093904372
cg23270757	chr6	OR2H1/5'-UTR/-	0,093808934
cg13586791	chr1	TPM3,TPM3,TPM3,TPM3,TPM3,TPM3,TPM3,TPM3,TPM3,TPM3,TPM3/TSS1500,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/-	0,093682882
cg02415220	chr19	-/-	0,093655737
cg02305765	chr12	-/-N_Shore	0,093585736
cg08638989	chr11	-/-	0,093551741
cg05519231	chr1	ECHDC2,ECHDC2,ECHDC2/TSS200,TSS200,TSS200/S_Shore	0,093519361
cg01236038	chr14	SLC8A3,SLC8A3,SLC8A3,SLC8A3,SLC8A3,SLC8A3,SLC8A3/5'-UTR,Body,Body,Body,Body,Body,Body/-	0,093488832
cg25955180	chr6	PRRT1/3'-UTR/N_Shore	0,093450259
cg15283904	chr10	PTCHD3/TSS200/Island	0,093425453
cg15480367	chr14	CHGA,CHGA/5'-UTR,1stExon/Island	0,093404061
cg14575215	chr12	ANKLE2/Body/-	0,093300596
cg12757011	chr2	TBR1/3'-UTR/S_Shore	0,093274279

Anhang

cg06024696	chr10	ZNF365,ZNF365/Body,5'-UTR/-	0,084299287
cg12586992	chr11	-/-	0,084150293
cg04310491	chr18	CELF4,CELF4,CELF4,CELF4/Body,Body,Body,Body/S_Shelf	0,083755423
cg24489074	chr10	-/-	0,083705173
cg01368488	chr10	-/Island	0,083644226
cg16345647	chr21	DSCR6/TSS1500/Island	0,083632406
cg10189695	chr4	GPR78,GPR78/1stExon,5'-UTR/Island	0,083564934
cg08534628	chr13	-/Island	0,083534183
cg20022869	chr20	NPEPL1/TSS1500/N_Shore	0,083530667
cg05535335	chr2	-/-	0,083464023
cg00529943	chr21	-/S_Shore	0,083463962
cg07462745	chr6	-/N_Shore	0,083214849
cg23347958	chr17	DHX8/TSS200/Island	0,083002707
cg14120436	chr15	GNB5/5'-UTR/-	0,082816014
cg02855309	chr16	-/Island	0,08278739
cg21090923	chr16	HBQ1/TSS200/Island	0,082787175
cg07169357	chr2	MFSD6/Body/-	0,082729639
cg02771240	chr3	-/S_Shore	0,082645287
cg26747536	chr1	-/-	0,082602021
cg16764274	chr2	SGPP2/Body/S_Shore	0,082584587
cg12564012	chr7	SDK1/Body/-	0,082399636
cg17924854	chr7	CRHR2,CRHR2,CRHR2,CRHR2,CRHR2/Body,Body,Body,Body,Body/-	0,082386704
cg06247406	chr6	GRIK2,GRIK2,GRIK2/TSS200,TSS200,TSS200/Island	0,082382373
cg12445693	chr5	LMNB1,LMNB1/TSS1500,TSS1500/N_Shore	0,082368353
cg12879183	chr7	-/-	0,082353485
cg25417988	chr2	MGAT4A,MGAT4A/TSS1500,Body/-	0,082201234
cg06602847	chr9	DBC1,DBC1/5'-UTR,1stExon/Island	0,082130247
cg25106913	chr6	-/S_Shore	0,082082806
cg03230469	chr5	GDNF/5'-UTR/Island	0,082080234
cg23314866	chr19	NAPA/Body/N_Shore	0,082079136
cg24346905	chr1	NTNG1,NTNG1,NTNG1/Body,Body,Body/Island	0,081858119
cg22603971	chr15	RASGRP1,RASGRP1,RASGRP1/Body,Body,Body/-	0,0818566
cg22353329	chr17	CBX4/TSS1500/Island	0,081853217
cg05337137	chr4	-/N_Shore	0,081784965
cg06624915	chr14	-/-	0,081632669
cg21849875	chr5	ADAMTS2/Body/N_Shore	0,081622001
cg24243287	chr1	ILDR2/Body/-	0,081407417
cg10626750	chr16	-/-	0,081396631
cg07544187	chr19	CILP2/Body/Island	0,081266066
cg14229264	chr3	-/-	0,081225224
cg04792813	chr14	CCDC85C/1stExon/Island	0,081170662
cg24029114	chr6	-/S_Shore	0,081118949
cg25950625	chr5	PLCXD3/Body/Island	0,081031484

Anhang

cg10569244	chr11	CAPN5/5'-UTR/-	0,080994325
cg12971683	chr1	ARID1A,ARID1A/Body,Body/-	0,080835464
cg21116900	chr12	SLC17A8,SLC17A8/TSS200,TSS200/-	0,080830457
cg07576142	chr13	GPC6/1stExon/Island	0,080593035
cg17331032	chr9	FBP1,FBP1/Body,Body/-	0,080448118
cg04528819	chr7	KLF14/1stExon/Island	0,080446396
cg14134497	chr18	DTNA,DTNA,DTNA/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/Island	0,080434999
cg26741530	chr10	C10orf32,C10orf32/TSS200,TSS200/N_Shore	0,080378579
cg21839260	chr1	-/-	0,080295993
cg27462685	chr13	LINC00347,LINC00347/Body,Body/-	0,080266458
cg25988759	chr2	-/-	0,080229004
cg21641634	chr12	NINJ2,NINJ2/Body,5'-UTR/-	0,079991568
cg04347354	chr3	FAM19A4,FAM19A4/TSS1500,TSS1500/Island	0,079984665
cg03523785	chr14	FOXG1/TSS1500/Island	0,079978004
cg04063230	chr7	DNAJB6/Body/-	0,079954672
cg08102508	chr3	IQSEC1/TSS1500/Island	0,079736337
cg05009601	chr7	FEZF1,FEZF1,FEZF1,FEZF1/1stExon,1stExon,5'-UTR,5'-UTR/Island	0,079638997
cg03975694	chr19	ZNF540,ZNF540/5'-UTR,1stExon/S_Shelf	0,079621277
cg18969232	chr2	-/-/Island	0,079603466
cg03095758	chr1	-/-	0,079595318
cg26161329	chr17	PPM1E/TSS1500/Island	0,079541848
cg04150927	chr12	-/-	0,079464327
cg05463027	chr6	KIF13A,KIF13A,KIF13A,KIF13A/TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,07945208
cg13526756	chr2	-/-/S_Shore	0,079451457
cg03240067	chr16	-/-	0,079412552
cg07194694	chr11	-/-	0,079400069
cg17534046	chr19	-/-	0,079309446
cg11545034	chr18	-/-	0,079208531
cg16556679	chr17	SNORD7/TSS1500/-	0,079108826
cg09829319	chr6	GCM2/TSS200/N_Shore	0,079021936
cg20381975	chr13	-/-/Island	0,079004953
cg15149655	chr2	VWA3B,VWA3B/1stExon,5'-UTR/Island	0,079000037
cg10831324	chr15	-/-/S_Shore	0,07888186
cg05675373	chr1	KCNC4,KCNC4,KCNC4/1stExon,1stExon,1stExon/Island	0,07883143
cg17992056	chr1	ICMT/TSS1500/S_Shore	0,078732464
cg05615459	chr16	-/-	0,078674062
cg22804528	chr3	-/-	0,078624289
cg10660256	chr5	BHMT,BHMT/5'-UTR,1stExon/-	0,078611908
cg06488443	chr2	TBR1/Body/Island	0,078582046
cg09208331	chr21	-/-/Island	0,078450352
cg01976224	chr3	FAM19A4,FAM19A4/5'-UTR,5'-UTR/-	0,078382832
cg10521706	chr2	OSR1/5'-UTR/Island	0,078042246
cg02793828	chr16	-/-/N_Shore	0,077969947

Anhang

cg26692749	chr1	RCAN3/3'-UTR/Island	0,077956542
cg25840576	chr1	TMEM200B/Body/Island	0,07789687
cg16336655	chr3	TMF1/TSS200/Island	0,077872304
cg03731131	chr19	KCNN4/Body/Island	0,077841991
cg24322623	chr11	MYOD1/TSS1500/N_Shore	0,077827425
cg23322172	chr10	TMEM180/Body/-	0,077792187
cg06641153	chr18	ST8SIA3/Body/S_Shore	0,077769303
cg09686672	chr12	LRP1/Body/-	0,077704941
cg06207035	chr3	LSAMP/Body/-	0,077566982
cg02574198	chr14	-/-	0,077356296
cg03685475	chr22	-/-/N_Shelf	0,077330429
cg01072786	chr2	GLB1L/Body/Island	0,077307832
cg09966085	chr18	SETBP1/Body/-	0,077282774
cg02954212	chr16	LOC283856,GNAO1,GNAO1/TSS1500,Body,Body/Island	0,077009516
cg00915126	chr5	BTNL9,BTNL9/Body,Body/-	0,076852195
cg16863013	chr15	AGBL1/Body/-	0,076747846
cg12232274	chr6	LRP11/TSS1500/S_Shore	0,07671582
cg00555393	chr10	-/-	0,076645276
cg27414593	chr15	SNORD116-9,SNORD116-3/TSS1500,TSS1500/-	0,076603184
cg05480055	chr12	SLC2A13/TSS1500/S_Shore	0,076470073
cg03598338	chr16	BCAR1,BCAR1,BCAR1,BCAR1,BCAR1/TSS200,TSS200,TSS200,Body,Body/Island	0,076457146
cg01191064	chr5	LOX/Body/N_Shelf	0,076432701
cg10575026	chr11	LOC101929295/Body/S_Shore	0,076296668
cg02452586	chr1	KIAA1804/Body/Island	0,076226273
cg16611727	chr2	OTOF,OTOF/TSS200,TSS200/N_Shelf	0,076187275
cg01743077	chr11	P2RY6,P2RY6,P2RY6,P2RY6,P2RY6,P2RY6,P2RY6,P2RY6/TSS1500,TSS200,1stExon,1stExon,1stExon,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/Island	0,076047448
cg26873338	chr12	CPSF6/Body/S_Shelf	0,075924867
cg11260097	chr7	-/-/Island	0,075901888
cg21215576	chr8	FAM83A,FAM83A/Body,Body/N_Shore	0,07584684
cg23600496	chr2	CCDC141/Body/-	0,075791321
cg27162435	chr17	KCNAB3/TSS1500/Island	0,075681762
cg23289226	chr2	MIR7853,NCKAP5,NCKAP5/Body,Body,Body/-	0,075668122
cg17413943	chr11	BDNF,BDNF,BDNF,BDNF,BDNF/Body,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/N_Shore	0,075661933
cg19558029	chr18	KATNAL2/TSS200/N_Shore	0,075566265
cg06268694	chr22	CELSR1/1stExon/Island	0,075352157
cg27625507	chr11	ETS1/5'-UTR/-	0,075110325
cg08568868	chr9	USP20,USP20,USP20/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/-	0,075058455
cg00004608	chr6	-/-/N_Shore	0,074960913
cg24600422	chr7	TNPO3,TNPO3,TNPO3/Body,Body,Body/-	0,074953032
cg10037316	chr14	-/-	0,074922457
cg17587782	chr10	C10orf120/TSS200/-	0,074894264
cg17621913	chr7	-/-	0,074853337

Anhang

cg03882167	chr2	FAM123C,FAM123C,FAM123C,FAM123C/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/Island	0,072176892
cg22694275	chr15	ANKRD34C/5'-UTR/S_Shore	0,072139884
cg10996675	chr20	TPD52L2,TPD52L2,TPD52L2,TPD52L2,TPD52L2,TPD52L2,TPD52L2,TPD52L2,TPD52L2,TPD52L2/TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,072093515
cg00683788	chr20	PDYN/TSS200/-	0,072064964
cg20782778	chr11	YAP1,YAP1/Body,Body/Island	0,071857861
cg23361092	chr13	-/-/Island	0,071783862
cg01573554	chr1	NFYC,NFYC,NFYC,NFYC,NFYC,NFYC,NFYC/TSS200,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/-	0,071779537
cg02857557	chr10	INPP5F,INPP5F/Body,TSS1500/S_Shore	0,071749536
cg23622047	chr2	RAPGEF4,RAPGEF4/Body,Body/-	0,071586763
cg23828720	chr12	HOXC9/TSS1500/Island	0,071540256
cg11257728	chr22	PARVG,PARVG,PARVG,PARVG,PARVG,PARVG,PARVG/5'-UTR,Body,5'-UTR,Body,Body,5'-UTR,1stExon/-	0,071448767
cg03189652	chr2	PTH2R/TSS200/N_Shore	0,071434884
cg11248845	chr19	STRN4,STRN4,STRN4,STRN4/ExonBnd,ExonBnd,Body,Body/-	0,071362812
cg01552919	chr4	GAK/Body/S_Shore	0,071243092
cg16201354	chr12	HECTD4/Body/-	0,071144815
cg24662139	chr22	LINC01399/Body/-	0,071003831
cg20704342	chr2	C2orf3/TSS200/S_Shore	0,070972321
cg21046148	chr5	-/-/Island	0,07087511
cg13357249	chr1	PIP5K1A,PIP5K1A,PIP5K1A,PIP5K1A/TSS1500,TSS1500,TSS1500,TSS1500/N_Shore	0,070866607
cg00791406	chr12	GRIN2B/5'-UTR/-	0,07061336
cg14454907	chr2	-/-/N_Shelf	0,070603945
cg21377521	chr12	TMTC1/Body/-	0,070599193
cg23163333	chr2	SPHKAP,SPHKAP/TSS200,TSS200/Island	0,070563478
cg02601039	chr10	LINC01516/Body/-	0,070529743
cg18131045	chr5	LOC643201/Body/-	0,070425554
cg24601522	chr4	-/-/-	0,070414095
cg14945834	chr1	SLC2A1,SLC2A1-AS1/TSS200,Body/S_Shore	0,070334443
cg18267374	chr8	NEFM,NEFM,NEFM/TSS1500,5'-UTR,1stExon/Island	0,070258595
cg14315332	chr3	PCNP/Body/S_Shelf	0,070250491
cg08181572	chr5	OSMR,OSMR/5'-UTR,5'-UTR/-	0,070226426
cg24158052	chr10	-/-/-	0,070090973
cg07306469	chr1	-/-/-	0,070088976
cg15824707	chr15	DUOX2/Body/Island	0,070082418
cg05376185	chr1	MOBK2C/TSS1500/S_Shore	0,069996876
cg07132386	chr2	ZDBF2,ZDBF2/TSS1500,TSS200/N_Shore	0,069958392
cg25088279	chr8	-/-/N_Shelf	0,069924492
cg01593013	chr3	PDIA5,PDIA5/Body,Body/-	0,069872344
cg00590036	chr6	TMEM181/TSS200/Island	0,069753752
cg03757784	chr16	HS3ST2/1stExon/Island	0,069712101
cg06034711	chr8	-/-/-	0,069592153
cg14504743	chr14	-/-/-	0,069541287

Anhang

cg18218371	chr8	RIMS2,RIMS2/5'-UTR,1stExon/Island	0,065876646
cg12730047	chr3	-/-	0,065790623
cg06090569	chr4	UBE2K,UBE2K,UBE2K/Body,Body,Body/N_Shore	0,065718756
cg23950461	chr3	CCK/TSS1500/S_Shore	0,065694753
cg09165955	chr5	-/-	0,065654272
cg25236230	chr15	GPR176,GPR176/5'-UTR,1stExon/Island	0,065508639
cg14506657	chr9	-/-/Island	0,065393764
cg04834436	chr16	IRX6/Body/Island	0,065108755
cg25934954	chr11	MAP4K2/Body/N_Shelf	0,065079587
cg18042724	chr11	SLC6A5/Body/S_Shelf	0,065050467
cg12613383	chr1	PLD5/TSS1500/Island	0,064916192
cg07476582	chr2	-/-	0,064783711
cg09662003	chr6	CFB,CFB/ExonBnd,Body/-	0,064758492
cg00631327	chr8	CSMD1/Body/-	0,064740578
cg20471798	chr5	SLC6A3/Body/-	0,064737655
cg15759112	chr12	LOC100507377/TSS1500/-	0,064608411
cg25580825	chr19	COL5A3/Body/N_Shelf	0,064557686
cg17165507	chr19	UNC13A,UNC13A/ExonBnd,Body/-	0,064466105
cg23821943	chr4	SORCS2/Body/-	0,064348043
cg00220737	chr4	KCTD8/Body/N_Shore	0,06414988
cg26923490	chr19	KCNA7/1stExon/Island	0,06405725
cg05531918	chr19	ZNF233,ZNF233/TSS200,TSS200/Island	0,063959602
cg23413924	chr15	DUOX1,DUOX1/Body,Body/Island	0,06391665
cg03539653	chr12	-/-	0,063787501
cg04965050	chr22	SCUBE1/TSS1500/Island	0,063694406
cg16952751	chr2	CFLAR,CFLAR,CFLAR/5'-UTR,TSS200,1stExon/N_Shore	0,063678834
cg22484737	chr7	-/-	0,063674168
cg13902210	chr1	KCNC4,KCNC4,KCNC4/1stExon,1stExon,1stExon/Island	0,063550759
cg04784672	chr14	LRFN5,LRFN5/5'-UTR,1stExon/S_Shore	0,063490563
cg12285737	chr19	-/-/Island	0,063414175
cg23937076	chr20	PTPRT,PTPRT,PTPRT,PTPRT/ExonBnd,ExonBnd,Body,Body/-	0,063285419
cg09571950	chr3	-/-/Island	0,063281148
cg24586039	chr8	RBPMS,RBPMS,RBPMS,RBPMS/Body,Body,Body,Body/-	0,063194991
cg26133164	chr7	-/-	0,062871964
cg13645221	chr6	PHACTR1,PHACTR1/Body,Body/-	0,062808309
cg13246235	chr6	PHACTR1/Body/Island	0,062795271
cg08222153	chr1	CROCC/TSS1500/-	0,062662269
cg07883149	chr1	RGS4,RGS4,RGS4,RGS4/TSS1500,TSS1500,5'-UTR,1stExon/-	0,062604118
cg05546878	chr2	PRKAG3/TSS200/-	0,062499058
cg08319079	chr2	-/-/S_Shore	0,062419028
cg03430846	chr8	NRG1/TSS200/Island	0,062314052

Anhang

cg13436155	chr13	-/-/S_Shore	0,062267193
cg11727282	chr9	ELAVL2/TSS1500/S_Shelf	0,06200843
cg00745389	chr7	-/-/Island	0,061987942
cg04747693	chr16	-/-/S_Shore	0,06195037
cg20399575	chr7	-/-/-	0,061933652
cg25927044	chr10	-/-/N_Shore	0,061873141
cg07006564	chr15	C2CD4A/Body/Island	0,061871001
cg05255275	chr14	C14orf39/5'-UTR/Island	0,061761843
cg09727277	chr7	-/-/Island	0,061748485
cg25926549	chr4	MIR95,ABLIM2,ABLIM2,ABLIM2,ABLIM2,ABLIM2,ABLIM2,ABLIM2/TS S1500,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/-	0,061628653
cg05571970	chr6	-/-/Island	0,061625132
cg06545198	chr11	-/-/-	0,061623744
cg13316116	chr1	-/-/-	0,061570034
cg06166341	chr4	CTBP1,CTBP1/Body,Body/N_Shore	0,061531393
cg22029941	chr11	DLG2,DLG2,DLG2/Body,Body,Body/-	0,061499803
cg25211403	chr21	-/-/Island	0,061499439
cg15873149	chr3	-/-/Island	0,061403034
cg20742415	chr1	METTL11B/TSS1500/-	0,061362794
cg25136068	chr20	ZHX3/5'-UTR/-	0,06126837
cg12284854	chr1	-/-/N_Shelf	0,061221611
cg13920491	chr3	ATP13A4/Body/-	0,061110983
cg18517534	chr10	CCDC7/Body/-	0,061105434
cg13918518	chr17	C17orf82/TSS1500/Island	0,0609724
cg00617867	chr5	PCDHA6,PCDHA2,PCDHA1,PCDHA9,PCDHA7,PCDHA1,PCDHA6,PC DHA5,PCDHA10,PCDHA3,PCDHA4,PCDHA10,PCDHA8/Body,Body,B ody,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/Island	0,060963635
cg11892980	chr16	-/-/N_Shelf	0,060947411
cg03398055	chr17	MSI2,MSI2/Body,Body/-	0,060819786
cg06746968	chr8	-/-/-	0,060776255
cg09583957	chr20	GNAS,GNAS,GNAS,GNAS,GNAS/5'-UTR,5'-UTR,1stExon,1stExon,3' -UTR/Island	0,060751552
cg03453449	chr12	USP44,USP44/1stExon,5'-UTR/S_Shelf	0,060737389
cg21982455	chr5	-/-/S_Shore	0,060669812
cg13449967	chr11	NA	0,060518786
cg17916490	chr2	NTSR2/1stExon/Island	0,060502232
cg16298598	chr19	CHST8,CHST8,CHST8/Body,Body,Body/-	0,060437117
cg18274065	chr18	CYB5A,CYB5A,CYB5A/TSS1500,TSS1500,TSS1500/S_Shore	0,060217217
cg04865692	chr19	KCNC3/1stExon/Island	0,060044312
cg18798248	chr6	HIST1H1B/TSS200/Island	0,060027916
cg03061778	chr10	-/-/-	0,059967688
cg03032214	chr18	GALR1/TSS200/Island	0,059893315
cg03925395	chr8	TRAPPC9,TRAPPC9/Body,Body/-	0,059776156
cg02094774	chr6	-/-/-	0,05977096
cg03060590	chr7	-/-/-	0,059637119

Anhang

cg02625638	chr8	FAM83A,FAM83A/Body,Body/N_Shore	0,0595073
cg09392068	chr17	-/-S_Shore	0,059495346
cg00158333	chr17	IGF2BP1,IGF2BP1/Body,Body/Island	0,059467467
cg25820491	chr1	SDCCAG8/Body/Island	0,059246839
cg19474047	chr19	ANGPTL6/5'-UTR/S_Shore	0,059238871
cg13476469	chr7	-/-	0,059071687
cg01039763	chr9	-/-Island	0,059005942
cg25432913	chr14	BRF1,BRF1,BRF1,BRF1,BRF1,PACS2/TSS1500,TSS1500,TSS1500,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/S_Shore	0,058971554
cg26649752	chr12	SRRM4/TSS1500/N_Shore	0,058832281
cg18954541	chr20	SLC13A3,SLC13A3/1stExon,5'-UTR/Island	0,058670842
cg22743483	chr12	RIMBP2/Body/S_Shore	0,058627272
cg09745331	chr4	ENPP6/Body/-	0,058246576
cg26471191	chr2	MIR7853,NCKAP5,NCKAP5/Body,Body,Body/-	0,058209325
cg09498007	chr2	CREG2/TSS1500/S_Shore	0,05818049
cg03969651	chr17	TBX4/Body/-	0,058151311
cg02238388	chr1	SYPL2/TSS200/Island	0,058095742
cg14839404	chr20	BMP7/TSS200/S_Shore	0,058016987
cg04630292	chr6	PRRT1/3'-UTR/Island	0,058005015
cg16911220	chr12	KRT86/1stExon/Island	0,057957689
cg07799295	chr20	EYA2,EYA2/5'-UTR,5'-UTR/-	0,057858288
cg18446045	chr7	VGFTSS1500/Island	0,057824742
cg15593298	chr3	PAQR9/1stExon/Island	0,057667548
cg07963349	chr17	GALR2/Body/Island	0,057101318
cg04991447	chr5	SEMA6A,SEMA6A,SEMA6A,SEMA6A/1stExon,1stExon,5'-UTR,5'-UTR/Island	0,056998037
cg08470639	chr9	NTRK2,NTRK2,NTRK2,NTRK2,NTRK2/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/Island	0,056970672
cg24158129	chr16	-/-	0,056928212
cg26118906	chr14	-/-Island	0,056906852
cg08381504	chr3	-/-Island	0,056767206
cg04940570	chr11	TEAD1/5'-UTR/Island	0,056676673
cg07212449	chr3	VGLL4,VGLL4,VGLL4/Body,Body,Body/-	0,056543377
cg04514834	chr5	-/-	0,056497841
cg14911690	chr19	PBX4/1stExon/Island	0,056361779
cg08801007	chr1	NID1/Body/-	0,056190037
cg08888412	chr16	DHX38,TXNL4B,TXNL4B,DHX38,TXNL4B,TXNL4B/1stExon,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,TSS200,1stExon/S_Shore	0,056148645
cg03834286	chr5	-/-N_Shore	0,055977775
cg25922163	chr19	GGN/TSS1500/Island	0,055730337
cg00247855	chr5	FSTL4/Body/-	0,055687856
cg12639146	chr8	RGS20,RGS20,RGS20,RGS20,RGS20,RGS20,RGS20/Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body,Body/-	0,055503612
cg05372434	chr10	ZNF25/TSS1500/S_Shore	0,055494704
cg14707092	chr19	TMEM38A/Body/S_Shore	0,055328629
cg10906284	chr12	AVPR1A/1stExon/Island	0,055305102

Anhang

cg04760426	chr1	SLC45A1/Body/Island	0,055097662
cg17069396	chr20	EBF4/Body/Island	0,054590983
cg06726490	chr2	NEURL3/Body/N_Shore	0,054441071
cg16430256	chr10	-/-	0,054389479
cg03672274	chr4	MSX1/TSS1500/N_Shore	0,054110576
cg04563870	chr11	TNNT3,TNNT3,TNNT3,TNNT3,TNNT3/5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR,5'-UTR/-	0,0540894
cg06572160	chr19	KCNC3/1stExon/Island	0,053977631
cg02888131	chr15	ALDH1A2,ALDH1A2/TSS200,TSS200/Island	0,053946004
cg19296405	chr19	KIAA1683,KIAA1683,KIAA1683/Body,Body,Body/Island	0,053917712
cg12389336	chr2	KDM3A,KDM3A/Body,Body/-	0,053764457
cg13358573	chr4	CORIN,CORIN,CORIN/Body,Body,Body/-	0,053602623
cg17422915	chr11	KIRREL3,KIRREL3/Body,Body/-	0,053387771
cg24378439	chr18	-/-S_Shore	0,053302236
cg09444979	chr15	SLC30A4,C15orf21/TSS1500,Body/Island	0,053264921
cg15970686	chr10	TACC2,TACC2,TACC2,TACC2/Body,Body,Body,Body/-	0,05321244
cg16061668	chr11	CTTN,CTTN/Body,Body/N_Shore	0,053198279
cg08620606	chr19	SELV/TSS200/N_Shore	0,053192788
cg07924081	chr19	PPP1R13L,PPP1R13L/Body,Body/Island	0,053170235
cg11699476	chr8	CRH/TSS200/S_Shore	0,053095905
cg04414675	chr7	PTPRN2,PTPRN2,PTPRN2/Body,Body,Body/Island	0,052676122
cg13526492	chr19	CYP2B6/Body/-	0,05188028
cg13486406	chr7	-/-Island	0,051318444
cg01580888	chr19	RHPN2/TSS1500/Island	0,051300506
cg04354077	chr20	PROKR2/TSS200/N_Shore	0,051221553
cg00511674	chr16	-/-Island	0,050904098
cg12034641	chr14	FBXO34,FBXO34/5'-UTR,5'-UTR/-	0,050711544
cg01214817	chr2	-/-	0,050508853
cg19996355	chr19	PBX4/1stExon/Island	0,050507208
cg03730958	chr6	FOXQ1/TSS200/Island	0,050429319
cg11806672	chr13	POU4F1/Body/Island	0,050342357
cg03101422	chr2	CXCR4/TSS1500/Island	0,050014205