

Altersassoziierte und strahleninduzierte Veränderungen des genomweiten DNA-Methylierungs-Profiles



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Anna Maierhofer

geboren in
Würzburg

Würzburg, 2018

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Charlotte Förster

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2014 bis Oktober 2018 am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg unter Betreuung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Altersassoziierte und strahleninduzierte Veränderungen des genomweiten DNA-Methylierungs-Profiles“ eigenständig, das heißt insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten, bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen beziehungsweise Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Am 28.08.2012 wurde mir von der Universität Regensburg der akademische Grad „Bachelor of Science“ und am 20.11.2014 von der Julius-Maximilians-Universität Würzburg der akademische Grad „Master of Science“ verliehen. Weitere akademische Grade habe ich nicht erworben.

Ort, Datum

Anna Maierhofer

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Epigenetik	5
1.1.1 DNA-Methylierung.....	6
1.1.2 Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung.....	8
1.2 Repetitive Elemente	8
1.2.1 Sich tandemartig wiederholende repetitive Elemente	8
1.2.2 Im Genom verstreute repetitive Elemente	9
1.2.3 Repetitive Elemente und DNA-Methylierung.....	10
1.3 Altern	11
1.3.1 Die Kennzeichen des Alterns	11
1.3.2 Altersassoziierte Veränderungen der DNA-Methylierung	14
1.3.3 Biomarker für die Altersbestimmung – die epigenetische Uhr.....	17
1.3.4 Vorzeitiges Altern – das Werner-Syndrom.....	19
1.4 Krebs.....	21
1.4.1 Krebsentstehung.....	21
1.4.2 Krebs und DNA-Methylierung.....	22
1.4.3 Kandidaten-Tumorsuppressor-Gene	23
1.5 Ionisierende Strahlung	24
1.5.1 Strahlentherapie und Krebsrisiko	24
1.5.2 Ionisierende Strahlung und DNA-Methylierung.....	25
1.6 Fibroblasten als Modellsystem.....	27
1.7 Zielsetzung der Arbeit	28
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Biologisches Material.....	30
2.1.1.1 Fetale Fibroblasten	30
2.1.1.2 DNA aus Gesamtblut	30
2.1.2 Material für die Durchführung und Auswertung der Versuche	30
2.1.2.1 Chemikalien	31

2.1.2.2	Kommerzielle Kits, Puffer und Medien.....	31
2.1.2.3	Apparaturen.....	32
2.1.2.4	Selbst hergestellte Puffer und Medien.....	33
2.1.2.5	Für Zellkultur verwendete Verbrauchsmaterialien	33
2.1.2.6	Programme und Datenbanken	33
2.1.3	Primersequenzen	34
2.1.3.1	Für Pyrosequenzierung verwendete Primer	34
2.1.3.2	Für Deep Bisulfite Sequencing verwendete Primer	35
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	Methoden zu den Experimenten mit Fibroblasten	37
2.2.1.1	Kultivierung der Zellen.....	37
2.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	37
2.2.1.3	Bestrahlung von Zellen	38
2.2.1.4	Isolierung von Einzelzellen	38
2.2.1.5	Erstellung der Einzelzell-Klone – <i>in vitro</i> Alterung	38
2.2.1.6	Isolierung genomischer DNA aus Zellen.....	38
2.2.2	Quantifizierung genomischer DNA.....	39
2.2.3	Natriumbisulfit-Konvertierung genomischer DNA	39
2.2.4	Locus-spezifische DNA-Methylierungs-Analyse durch Pyrosequenzierung	40
2.2.4.1	Prinzip der Pyrosequenzierung.....	40
2.2.4.2	Protokoll	41
2.2.4.3	Datenauswertung	44
2.2.5	Genomweite DNA-Methylierungs-Analyse durch Infinium Methylierungs-Arrays. 45	
2.2.5.1	Prinzip der Illumina Infinium Methylierungs-Array-Technologie.....	45
2.2.5.2	Generationen der Infinium Methylierungs-Arrays.....	47
2.2.5.3	Protokoll	48
2.2.5.4	Datenauswertung	50
2.2.6	Locus-spezifische DNA-Methylierungs-Analyse durch Deep Bisulfite Sequencing mit dem Illumina MiSeq.....	54
2.2.6.1	Prinzip des Deep Bisulfite Sequencings.....	54
2.2.6.2	Protokoll	58
2.2.6.3	Datenauswertung	61

3 Ergebnisse	62
3.1 Fibroblasten als <i>in vitro</i> Modell zur Untersuchung altersassoziierter und strahleninduzierter Veränderungen der DNA-Methylierung.....	62
3.1.1 Direkte Effekte ionisierender Strahlung auf das genomweite DNA-Methylierungs-Profil.....	62
3.1.1.1 Pyrosequenzierungs-Ergebnisse: DNA-Methylierung repetitiver Elemente....	63
3.1.1.2 Ergebnisse der Infinium 450K-Methylierungs-Arrays	66
3.1.1.3 Ergebnisse der epigenetischen Uhr.....	67
3.1.2 Effekte der Langzeit-Kultivierung und Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung auf das genomweite DNA-Methylierungs-Profil.....	68
3.1.2.1 Pyrosequenzierungs-Ergebnisse: DNA-Methylierung repetitiver Elemente....	70
3.1.2.2 Ergebnisse der Infinium 450K-Methylierungs-Arrays	71
3.1.2.3 Ergebnisse der epigenetischen Uhr.....	79
3.1.2.4 Ergebnisse des Deep Bisulfite Sequencings: DNA-Methylierung von Tumorsuppressor-Genen.....	80
3.2 Veränderungen der DNA-Methylierung in Gesamtblut von WS-Patienten.....	88
3.2.1 Pyrosequenzierungs-Ergebnisse - DNA-Methylierung repetitiver Elemente.....	88
3.2.2 Ergebnisse der epigenetischen Uhr.....	89
4 Diskussion	92
4.1 Veränderungen der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit <i>in vitro</i> Alterung und ionisierender Strahlung	92
4.1.1 Effekte der <i>in vitro</i> Alterung auf die DNA-Methylierung.....	92
4.1.1.1 Globale Hypomethylierung durch <i>in vitro</i> Alterung.....	93
4.1.1.2 Erhöhte DNA-Methylierung der rDNA durch <i>in vitro</i> Alterung	94
4.1.1.3 Locus-spezifische DNA-Methylierungs-Veränderungen altersassoziierter Gene und Signalwege durch <i>in vitro</i> Alterung	95
4.1.1.4 Erhöhtes epigenetisches Alter durch <i>in vitro</i> Alterung	99
4.1.1.5 Zunahme der DNA-Methylierung des Tumorsuppressor-Gens <i>RAD51C</i> durch <i>in vitro</i> Alterung.....	101
4.1.2 Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung	104
4.1.2.1 Globale Hypomethylierung als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung	105
4.1.2.2 Erhöhte DNA-Methylierung der rDNA als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung.....	107

4.1.2.3 Locus-spezifische DNA-Methylierungs-Veränderungen durch ionisierende Strahlung.....	108
4.1.2.4 Erhöhtes epigenetisches Alter als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung ..	110
4.1.2.5 Zunahme der DNA-Methylierung des Tumorsuppressor-Gens <i>RAD51C</i> als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung	111
4.1.3 Schlussfolgerung und Ausblick	112
4.2 Veränderungen der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit vorzeitigem Altern in WS-Patienten.....	116
4.2.1 Globale DNA-Methylierung in WS-Patienten	116
4.2.2 Erhöhte DNA-Methylierung der rDNA in WS-Patienten.....	117
4.2.3 Beschleunigung des epigenetischen Alterns in WS-Patienten.....	117
4.2.4 Schlussfolgerung und Ausblick	120
5 Referenzen.....	122
5.1 Literaturverzeichnis.....	122
5.2 Elektronische Quellen.....	134
6 Verzeichnisse	135
6.1 Abbildungsverzeichnis.....	135
6.2 Tabellenverzeichnis	137
6.3 Abkürzungsverzeichnis	138
7 Publikationen und Kongressbeiträge.....	141
7.1 Publikationen.....	141
7.2 Kongressbeiträge.....	143
Danksagung.....	144
Anhang.....	145

Zusammenfassung

Der Prozess des Alterns ist ein komplexer multifaktorieller Vorgang, der durch eine sukzessive Verschlechterung der physiologischen Funktionen charakterisiert ist. Ein hohes Alter ist der Hauptrisikofaktor für die meisten Krankheiten, einschließlich Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Das Verständnis der epigenetischen Mechanismen, die in den Prozess des Alterns involviert sind, könnte zur Entwicklung pharmakologischer Interventionen beitragen, die nicht nur die Lebenserwartung erhöhen, sondern auch den Beginn des altersassoziierten funktionellen Abbaus verzögern könnten. Durch die Langzeit-Kultivierung primärer humaner Fibroblasten wurde ein *in vitro* Modell für das Altern etabliert, das die Identifizierung altersassoziiertes DNA-Methylierungs-Veränderungen ermöglichte. Die *in vitro* Alterung konnte mit einer globalen Hypomethylierung und einer erhöhten DNA-Methylierung der ribosomalen DNA assoziiert werden. Darüber hinaus konnten DNA-Methylierungs-Veränderungen in Genen und Signalwegen, die für das Altern relevant sind, und ein erhöhtes epigenetisches Alter nachgewiesen werden.

Das *in vitro* Modell für das Altern wurde verwendet, um neben den direkten Effekten ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung auch deren Langzeit-Effekte zu untersuchen. Die Strahlentherapie ist ein entscheidendes Element der Krebstherapie, hat aber auch negative Auswirkungen und kann unter anderem das Risiko für die Entwicklung eines Zweittumors erhöhen. Bei externer Bestrahlung wird neben dem Tumor auch gesundes Gewebe ionisierender Strahlung ausgesetzt. Daher ist es wichtig zu untersuchen, wie Zellen mit intakten DNA-Reparatur-Mechanismen und funktionierenden Zellzyklus-Checkpoints durch diese beeinflusst werden. In der frühen Phase der DNA-Schadensantwort auf Bestrahlung wurden in normalen Zellen keine wesentlichen DNA-Methylierungs-Veränderungen beobachtet. Mehrere Populations-Verdoppelungen nach Strahlenexposition konnten dagegen eine globale Hypomethylierung, eine erhöhte DNA-Methylierung der ribosomalen DNA und ein erhöhtes epigenetisches Alter detektiert werden. Des Weiteren zeigten Gene und Signalwege, die mit Krebs in Verbindung gebracht wurden, Veränderungen in der DNA-Methylierung. Als Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung traten somit die mit der *in vitro* Alterung assoziierten DNA-Methylierungs-Veränderungen verstärkt auf und ein epigenetisches Muster, das stark an das DNA-Methylierungs-Profil von Tumorzellen erinnert, entstand. Man geht davon aus, dass Veränderungen der DNA-Methylierung eine aktive Rolle in der Entwicklung eines Tumors spielen. Die durch ionisierende Strahlung induzierten

DNA-Methylierungs-Veränderungen in normalen Zellen könnten demnach in die Krebsentstehung nach Strahlenexposition involviert sein und zu dem sekundären Krebsrisiko nach Strahlentherapie beitragen. Es ist bekannt, dass Patienten unterschiedlich auf therapeutische Bestrahlung reagieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die individuelle Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung auch auf epigenetischer Ebene beobachtet werden kann.

In einem zweiten Projekt wurden Gesamtblutproben von Patienten mit Werner-Syndrom, einer segmental progeroiden Erkrankung, und gesunden Kontrollen analysiert, um mit dem vorzeitigen Altern in Verbindung stehende DNA-Methylierungs-Veränderungen zu identifizieren. Werner-Syndrom konnte nicht mit einer globalen Hypomethylierung, jedoch mit einer erhöhten DNA-Methylierung der ribosomalen DNA und einem erhöhten epigenetischen Alter assoziiert werden. Das vorzeitige Altern geht demzufolge mit spezifischen epigenetischen Veränderungen einher, die eine Beschleunigung der mit dem normalen Altern auftretenden DNA-Methylierungs-Veränderungen darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bedeutung epigenetischer Mechanismen im Prozess des Alterns hervorgehoben werden und gezeigt werden, dass sowohl exogene Faktoren, wie ionisierende Strahlung, als auch endogene Faktoren, wie das in Werner-Syndrom-Patienten mutiert vorliegende *WRN*-Gen, altersassoziierte DNA-Methylierungs-Veränderungen beeinflussen können.

Abstract

Aging is a complex, multifactorial process that is characterized by the successive deterioration of normal physiological functions. Age is the main risk factor for most diseases, including cancer. Understanding the epigenetic mechanisms that are involved in the aging process could contribute to the development of pharmacological interventions not only increasing lifespan but also delaying the onset of age-dependent functional decline. An *in vitro* model for aging was established by long-term culturing of primary human fibroblasts and used to identify age-associated changes in DNA methylation. *In vitro* aging could be linked to global hypomethylation, elevated DNA methylation of ribosomal DNA, a higher epigenetic age and alterations in DNA methylation of genes and pathways being relevant for aging.

The *in vitro* model for aging allowed to analyse the long-term effects of ionizing radiation on DNA methylation in addition to their direct effects. Radiotherapy is an important element of cancer treatment but can also have negative effects and increase the risk of second cancers. Although radiotherapy is targeted to the tumour, it also affects the surrounding healthy tissue. Therefore, it is important to analyse the impacts of ionizing radiation on normal cells with intact DNA repair and cell cycle checkpoints. The early phase of DNA damage response to radiation does not seem to include great changes in DNA methylation in normal cells. In contrast, several population doublings after radiation exposure, global hypomethylation and DNA methylation changes of genes and pathways being linked to tumorigenesis were detected. Furthermore, DNA methylation of ribosomal DNA and the epigenetic age were increased. Thus, as long-term effects of ionizing radiation the age-associated changes in DNA methylation were enhanced and an epigenetic pattern strongly resembling the DNA methylation profile of tumour cells was observed. It is assumed that alterations in DNA methylation are not only side effects of carcinogenesis but rather play an active role during this process. Radiation-induced changes in DNA methylation could thus be involved in tumour development and contribute to the secondary cancer risk after radiotherapy. It is well known that patients react differently to therapeutic radiation. The results of this study suggest that individual radiation sensitivity is also reflected on epigenetic level.

In a second project whole blood samples from patients with Werner syndrome, a segmental progeroid syndrome, and healthy controls were analysed to identify changes in DNA methylation associated with premature aging. Werner syndrome could not be linked to global hypomethylation, but to an increased epigenetic age and elevated methylation levels of

ribosomal DNA. Hence, premature aging seems to be accompanied by specific alterations in DNA methylation representing an acceleration of the DNA methylation changes associated with normal aging.

This work outlines the importance of epigenetic mechanisms in the aging process and shows that not only exogenous factors like ionizing radiation but also endogenous factors like Werner syndrome causing mutations in the *WRN* gene can influence age-associated changes in DNA methylation.

1 Einleitung

1.1 Epigenetik

Verschiedene Zelltypen eines multizellulären Organismus unterscheiden sich phänotypisch voneinander, obwohl sie die gleiche genetische Information enthalten. Die unterschiedlichen Phänotypen werden durch epigenetische Mechanismen hervorgerufen. Die Epigenetik befasst sich mit vererbaren Prozessen, die die Genaktivität beeinflussen, ohne die zugrundeliegende genetische Sequenz zu verändern [1, 2]. Epigenetische Modifikationen können an die Tochterzellen weitergegeben werden. Die wesentlichen epigenetischen Mechanismen sind DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und kleine nicht-kodierende RNAs (Abbildung 1).

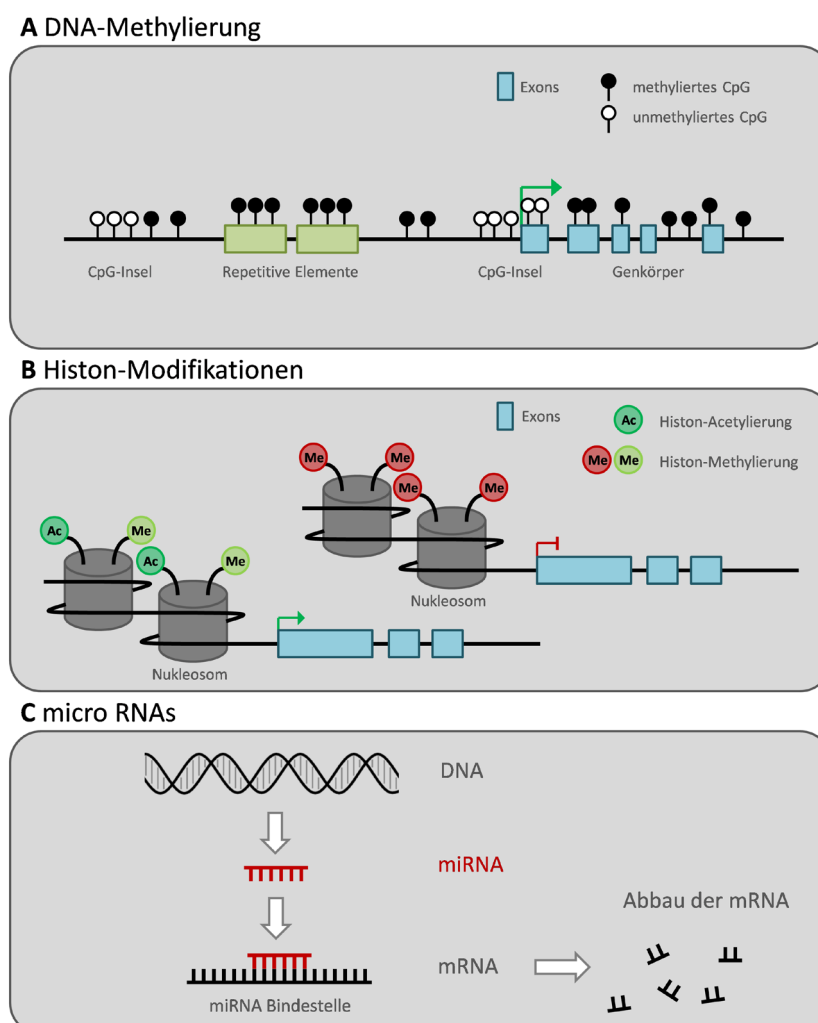


Abbildung 1: Epigenetische Mechanismen. (A) Die Methylierung der DNA erfolgt an Cytosinen innerhalb von Cytosinphosphatidyl-Guanin (CpG)-Dinucleotiden. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription und in der Stilllegung repetitiver Elemente zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität [3, 4]. (B) Verschiedene kovalente Modifikationen werden an den N-terminalen Enden der Histone angebracht [5]. Die Einheit aus DNA und dem Histon-Oktamer wird als Nucleosom bezeichnet. (C) Micro RNAs (miRNAs) sind kurze nicht-kodierende RNAs, die gezielt messenger RNAs (mRNAs) binden und zu deren Abbau und somit zur posttranskriptionellen Stilllegung von Genen führen [6]. Abbildung erstellt nach [7].

Die DNA-Methylierung ist der bisher am besten untersuchte epigenetische Mechanismus [8] und wird im nächsten Abschnitt ausführlicher behandelt. Histon-Modifikationen werden an den N-terminalen Enden der Histone angebracht und führen abhängig von der Art der Modifikation und der Aminosäure, die modifiziert wird, zur Gentranskription durch Relaxation des Chromatins oder zur Repression der Genaktivität durch Kompaktierung des Chromatins [5]. Häufig auftretende Histon-Modifikationen sind die Acetylierung von Lysinen und die Methylierung, die an Lysinen und Argininen gefunden werden kann. Weitere Modifikationen sind zum Beispiel die Phosphorylierung und die Ubiquitinylierung von Histonen [9]. Micro RNAs (miRNAs) sind nicht-kodierende RNAs, die nur 18 bis 20 Nukleotide lang sind. Sie binden gezielt messenger RNAs (mRNAs) und leiten so deren Abbau und somit die posttranskriptionelle Stilllegung der entsprechenden Gene ein [6, 7]. Zusammen regulieren die epigenetischen Mechanismen die räumliche und zeitliche Genexpression und erlauben Zellen, die die gleiche DNA enthalten, die Differenzierung in verschiedene Zelltypen und den Erhalt des differenzierten Zustands [10].

Aberrante epigenetische Modifikationen können viele Auswirkungen zur Folge haben, denn sie wurden zum Beispiel mit Krebs und zahlreichen anderen Erkrankungen in Verbindung gebracht [11, 12].

1.1.1 DNA-Methylierung

Die Methylierung der DNA erfolgt durch die kovalente Bindung einer Methylgruppe an das 5'-Kohlenstoffatom eines Cytosins, wodurch 5-Methylcytosin (5mC) entsteht. Dieser Vorgang geschieht meist innerhalb eines Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Dinukleotids und wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert (Abbildung 2). Die Methylgruppe wird dabei von S-Adenosylmethionin auf das Cytosin in der DNA übertragen [13]. Während DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L bei der *de novo* Methylierung in der Entwicklung der Keimzellen und in der Embryogenese eine Rolle spielen, ist DNMT1 wichtig für den Erhalt der DNA-Methylierung während der Zellteilung [14]. Bei der DNA-Replikation erkennt DNMT1 hemimethylierte CpGs und kopiert das DNA-Methylierungs-Muster von dem alten auf den neu synthetisierten DNA-Strang [15].

Werden während der DNA-Replikation keine neuen Methylgruppen angehängt, kommt es zum passiven Verlust der DNA-Methylierung. Die DNA-Methylierung wird nicht direkt entfernt, in den Tochterzellen ist die DNA aber durch eine fehlende oder reduzierte Aktivität der DNMT1 hypomethyliert. Neben der passiven Demethylierung kann 5mC auch aktiv in

nicht-modifiziertes Cytosin umgewandelt werden. Die aktive Demethylierung geschieht durch die von ten-eleven translocation (TET)-Proteinen vermittelte Oxidation von 5mC zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxylcytosin (5caC). Eine durch Replikation bedingte Verdünnung dieser oxidierten Formen von 5mC oder die durch die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) vermittelte Basen-Exzisions-Reparatur von 5fC und 5caC haben die Demethylierung zur Folge [16] (Abbildung 2).

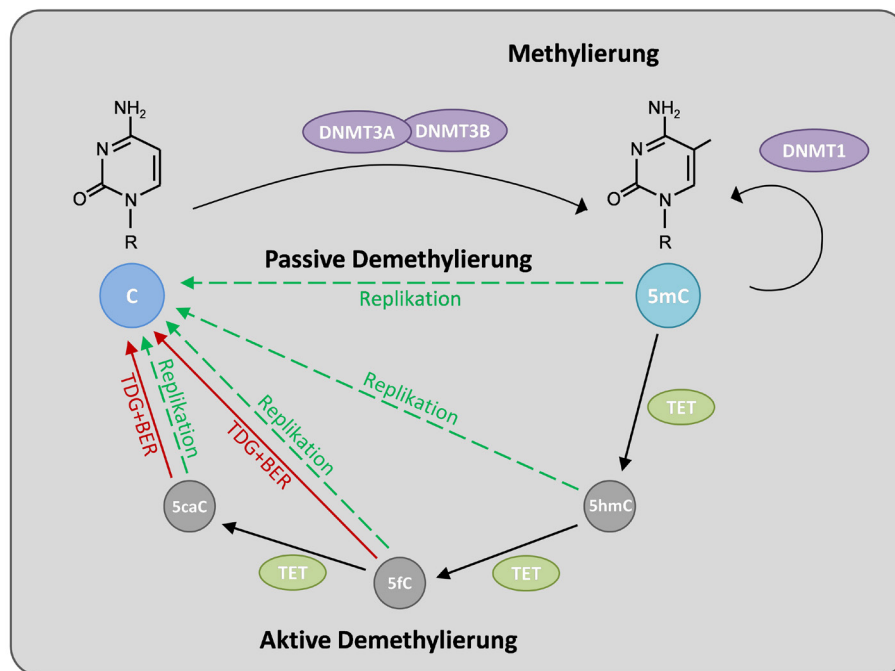


Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der Methylierung und der Demethylierung der DNA. Die Methylierung der DNA wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. DNMT3A und DNMT3B sind für die *de novo* Methylierung verantwortlich, DNMT1 für den Erhalt der DNA-Methylierung. Werden nach der Replikation keine Methylgruppen an den neu synthetisierten DNA-Strang angefügt, kommt es zur passiven Demethylierung. Die aktive Demethylierung wird durch die ten-eleven translocation (TET)-Proteine vermittelt, enthält die Zwischenstufen 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), 5-Formylcytosin (5fC) sowie 5-Carboxylcytosin (5caC) und hängt mit der Replikation (passive Verdünnung) und mit der durch die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) vermittelten Basen-Exzisions-Reparatur (BER) (aktive Entfernung) zusammen. Abbildung erstellt nach [16].

Die aktive Demethylierung erfolgt im Kontext vieler biologischer Prozesse, wie zum Beispiel während der Entwicklung der primordialen Keimzellen oder dem Erhalt und der Differenzierung embryonaler Stammzellen. Reguliert wird die aktive Demethylierung auf vielen Ebenen, unter anderem über die Verfügbarkeit von Substrat oder Cofaktoren sowie über die genomische Lokalisation der Demethylierungs-Maschinerie oder über die posttranskriptionelle und posttranslationale Regulation der TET-Proteine und der TDG [16].

Die DNA-Methylierung spielt eine essentielle Rolle in der Regulation der Transkription und in der Stilllegung repetitiver Elemente zur Bewahrung der genomischen Stabilität [3, 17, 18]. Zu den weiteren Funktionen gehören die genomische Prägung, die Inaktivierung des

X-Chromosoms sowie die Aufrechterhaltung der Chromatin-Struktur und eines epigenetischen Gedächtnisses [19-21].

1.1.2 Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung

Liegt in einem Abschnitt des Genoms eine hohe Dichte an CpGs vor, spricht man von CpG-Inseln [22]. Diese kommen vor allem in Promotorregionen oder im ersten Exon von Genen vor [23]. Die DNA-Methylierung von CpG-Inseln führt zur Repression der Aktivität eines entsprechenden Gens, indem die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert wird oder Proteine, die methyliertes CpG binden und mit repressiven histon-modifizierenden Enzymen interagieren, rekrutiert werden [24, 25]. Über einen langen Zeitraum stillgelegte Gene sind zum Beispiel geprägte Gene sowie Gene, die auf dem inaktivierten X-Chromosom liegen, oder gewebsspezifisch exprimierte Gene in Geweben, in welchen das Gen nicht aktiv ist [23]. Gene, die transkribiert werden, zeichnen sich dagegen durch ein geringes DNA-Methylierungs-Level an der Transkriptions-Startstelle aus. CpG-Inseln in den Promotorregionen vieler Housekeeping- und Tumorsuppressor-Gene liegen unmethyliert vor [26, 27].

Die DNA-Methylierung innerhalb des Genkörpers ist gewöhnlich mit aktiven Genen assoziiert [23, 28]. Hier trägt die DNA-Methylierung vermutlich zur Elongation und zum Spleißen oder zur Verhinderung der aberranten Initiation der Transkription von einer alternativen Transkriptions-Startstelle bei [23, 29, 30].

Auch die DNA-Methylierung von Enhancer-Elementen beeinflusst die Aktivität dieser weit von der Transkriptions-Startstelle entfernt liegenden regulatorischen Regionen und spielt somit eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression [31, 32].

1.2 Repetitive Elemente

Repetitive Elemente machen mehr als die Hälfte des menschlichen Genoms aus [33, 34]. Anhand ihrer Struktur können sie in sich tandemartig wiederholende Elemente und in einzeln im Genom verstreute Elemente eingeteilt werden.

1.2.1 Sich tandemartig wiederholende repetitive Elemente

Eine komplexe Familie sich tandemartig wiederholender repetitiver Sequenzen ist die α -Satelliten-DNA, die etwa 5 % des humanen Genoms einnimmt, aus etwa 170 Basenpaare (base pairs, bp) langen Einheiten besteht und vor allem in zentromerischen und perizentromerischen Regionen jedes Chromosoms zu finden ist [35, 36]. Die α -Satelliten-DNA

ist in die Bildung der Kinetochore involviert und spielt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und bei der Bildung des perizentromerischen Heterochromatins. Das latente transkriptionelle Potential der perizentromerischen Elemente wird durch DNA-Methylierung unterdrückt, um eine korrekte Anordnung, Segregation und Integrität der Chromosomen während der Mitose zu erreichen [37].

Zu den sich tandemartig wiederholenden repetitiven Elementen gehört auch die ribosomale DNA (rDNA), die die ribosomale RNA (rRNA) kodiert. Eine Transkriptions-Einheit macht etwa 13 Kilobasen (kb) aus und enthält die Sequenz für die kleine (5,8 S) und die großen (18 S und 28 S) rRNA-Moleküle. Die Einheiten werden durch einen nicht-transkribierten Spacer mit einer Länge von etwa 30 kb voneinander getrennt [38]. Das menschliche Genom enthält etwa 400 Kopien der rDNA-Einheit. Diese bilden auf den fünf akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 Cluster mit einer hoch repetitiven Struktur [39]. Neben den ribosomalen Proteinen ist die rRNA ein essentieller Bestandteil der Ribosomen, an welchen die Proteinsynthese erfolgt. Die Ribosomen-Biogenese beginnt im Nukleolus, in dem die rRNA transkribiert, prozessiert und mit den ribosomalen Proteinen zusammengefügt wird [40]. Die Ribosomen-Biogenese und die Proteinsynthese sind eng verknüpft mit dem Zellmetabolismus und essentiell für das Wachstum, die Proliferation und die Homöostase von Zellen [41]. Die Fehlregulation dieser organisierten und streng regulierten Vorgänge könnte zur abnormalen Zellproliferation und zur Entwicklung pathologischer Zustände wie hämatologischen, kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen oder Krebs beitragen [42]. Neben ihrer primären Rolle die rRNA zu kodieren ist die rDNA auch in andere wichtige biologische Prozesse, wie die Stabilität des Genoms und den Zellzyklus, involviert [43].

1.2.2 Im Genom verstreute repetitive Elemente

Zu den im Genom verstreuten repetitiven Elementen zählen zum Beispiel Transposons und prozessierte Pseudogene [44]. Transposons sind Elemente, die durch Transposition ihre Position innerhalb des Genoms ändern können. Sie machen mehr als 45 % des menschlichen Genoms aus [45]. Retrotransposons sind Transposonklassen, deren Namensteil „Retro“ durch die Anlehnung an den Mechanismus der reversen Transkriptase zustande kommt. Retrotransposons können sich vermehren, indem sie sich über einen „copy and paste“-Mechanismus selbst neu in das Genom inserieren. Entsprechend ihrer Länge können sie in zwei Gruppen eingeteilt werden.

Lange eingestreute Elemente (long interspersed elements, LINEs) sind Retrotransposons mit einer Länge von 6 bis 8 kb. Sie repräsentieren etwa 20 % des menschlichen Genoms und zählen zu den autonomen Transposons, da sie aktiv Gene transkribieren. Mit einer Kopienzahl von über einer halben Million sind LINE-1 die größte Gruppe der LINE-Familie. Die Konsensussequenz der LINE-1 enthält zwei offene Leserahmen, die ein RNA-bindendes Protein und eine reverse Transkriptase kodieren [46].

Die zweite Gruppe der Retrotransposons sind die kurzen eingestreuten Elemente (short interspersed elements, SINEs), die eine Länge von 500 bp nicht überschreiten und nicht-autonome Transposons darstellen, da sie keine Proteine kodieren. Eine Klasse der SINEs sind die ALU-Elemente, die eine Länge von etwa 300 bp aufweisen und gewöhnlich in Introns, 3'-untranslatierten Regionen von Genen oder in intergenischen Regionen lokalisiert sind [44]. Ihre Kopienzahl hat sich auf nahezu 1,4 Millionen Elemente ausgeweitet, die mehr als 10 % des menschlichen Genoms ausmachen [47].

1.2.3 Repetitive Elemente und DNA-Methylierung

Aktive Transposons sind mutagen, da sie oft protein-kodierende Gene als Ziel für die Insertion haben. Sie können auch zu Chromosomenbrüchen, falscher Rekombination und zur Reorganisation des Genoms führen. Außerdem können sie benachbarte Gene durch Verändern des Spleißens und der Polyadenylierungs-Muster oder durch das Übernehmen einer Enhancer-Funktion beeinflussen [48]. Um die Aktivität von Retrotransposons zu verhindern und die genomische Stabilität zu bewahren, liegen Transposons stark methyliert vor [49, 50]. Eine reduzierte DNA-Methylierung der Transposons kann in deren Aktivierung und in der Retrotransposition resultieren. Dies wurde bereits im Zusammenhang mit Krebs sowie als Reaktion auf Umwelt-Stressoren dokumentiert [51, 52].

Da repetitive Elemente mehr als die Hälfte des menschlichen Genoms ausmachen und stark methyliert sind, repräsentiert ihre DNA-Methylierung mehr als ein Drittel der gesamten genomischen DNA-Methylierung [3, 53]. Daher können die DNA-Methylierungs-Level der repetitiven Elemente α -Satelliten-DNA, ALU und LINE-1 als Marker für Veränderungen der globalen DNA-Methylierung verwendet werden [54]. Eine wichtige Eigenschaft der LINEs und SINEs ist der Gegensatz in der genomischen Verteilung der Elemente. Während LINEs eher in AT-reichen Regionen vorkommen, liegen SINEs vor allem in GC-reichen Regionen. Werden also beide Arten repetitiver Elemente untersucht, kann eine breit über das Genom verteilte Evaluierung der globalen DNA-Methylierung erfolgen [55].

1.3 Altern

Der Prozess des Alterns ist ein komplexer multifaktorieller Vorgang, der durch eine zeitabhängige sukzessive Verschlechterung der physiologischen Funktionen charakterisiert ist. Das Alter ist der Hauptrisikofaktor für die meisten Krankheiten, einschließlich Krebs, Herz-Kreislauf- oder Stoffwechsel-Erkrankungen und neurodegenerativer Krankheiten [56, 57].

1.3.1 Die Kennzeichen des Alterns

López-Otín *et al.* identifizierten neun zelluläre und molekulare Kennzeichen, die gemeinsame Merkmale des Prozesses des Alterns in verschiedenen Organismen repräsentieren [56] (Abbildung 3).

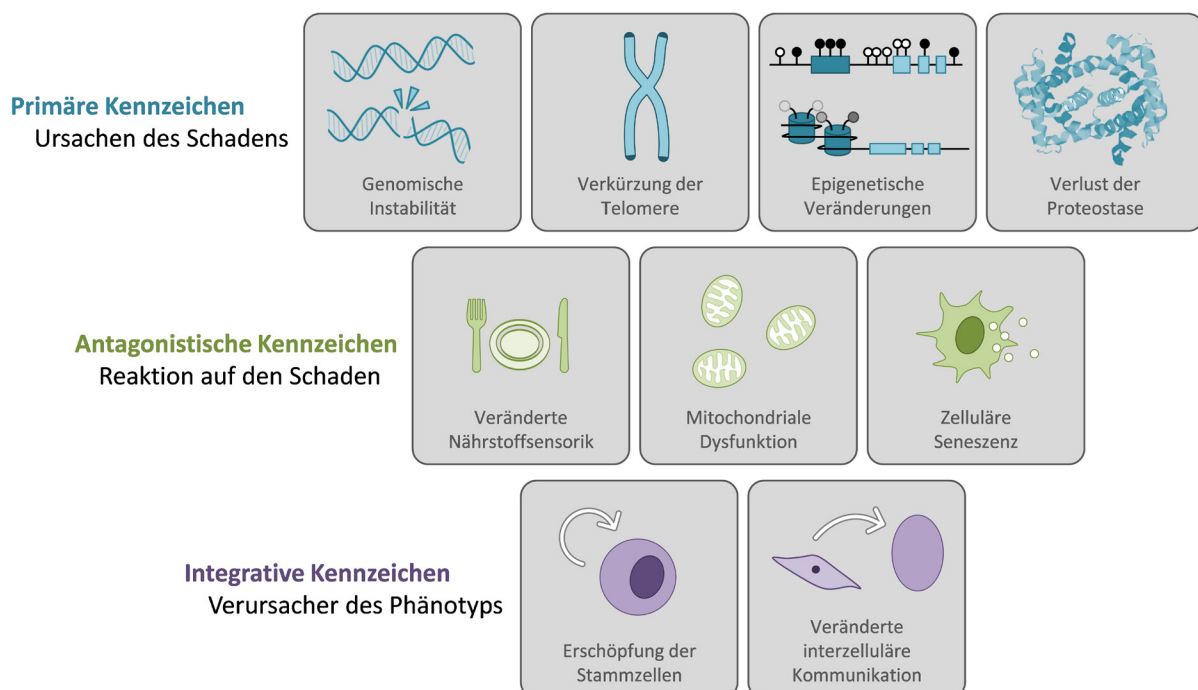


Abbildung 3: Die Kennzeichen des Alterns. Das Schema zeigt die neun Kennzeichen, die von López-Otín *et al.* über verschiedene Organismen hinweg als gemeinsame Merkmale des Prozesses des Alterns identifiziert wurden. Auch wenn alle Merkmale eng miteinander vernetzt sind, können sie hierarchisch in drei Hauptkategorien gegliedert werden. Abbildung erstellt nach [56].

Die Kennzeichen des Alterns können in die drei Hauptkategorien primäre, antagonistische und integrative Kennzeichen eingeteilt werden. Die primären Kennzeichen des Alterns sind diejenigen Mechanismen, die den Schaden verursachen. Zu dieser Kategorie gehören die genomische Instabilität, die Verkürzung der Telomere, epigenetische Veränderungen und der Verlust der Proteostase.

Genomische Instabilität steht für die Ansammlung genetischer Schäden, die zum Prozess des Alterns beitragen. Die Integrität und die Stabilität der DNA wird kontinuierlich durch endogene

Bedrohungen, wie Replikations-Fehler, spontane hydrolytische Reaktionen und reaktive Sauerstoffspezies sowie durch von außen wirkende physische, chemische und biologische Wirkstoffe herausgefordert. Dadurch können verschiedene DNA-Schäden, wie Translokationen, Gewinn oder Verlust von Chromosomenmaterial, Punktmutationen, Telomerverkürzung oder die Unterbrechung eines Gens durch die Integration von Virus-DNA oder Transposons, entstehen [58]. Die Stabilität des Genoms wird durch ein komplexes Netzwerk aus DNA-Reparatur-Mechanismen unterstützt, die die Anzahl der DNA-Schäden minimieren [58, 59]. Allerdings werden nicht alle Läsionen repariert und so häufen sich mit der Zeit Schäden am genetischen Material an [60].

Bei jeder Zellteilung kommt es zur Verkürzung der Telomere, da die replikativen DNA-Polymerasen nicht die Fähigkeit besitzen die terminalen Enden linearer DNA-Moleküle vollständig zu replizieren. Diese Funktion besitzt nur die Telomerase, eine spezielle DNA-Polymerase, die in den meisten somatischen Zellen nicht exprimiert wird. Der progressive Verlust der Telomersequenz der Chromosomenenden wurde mit der limitierten Proliferations-Kapazität von Zellen in Verbindung gebracht [57]. Die Verkürzung der Telomere wird auch im Zusammenhang mit dem Altern im Organismus, zum Beispiel in Menschen und Mäusen, beobachtet [61, 62].

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass epigenetischen Modifikationen eine wichtige Rolle in der zellulären Seneszenz und im Prozess des Alterns eines Organismus spielen [63, 64]. Neben altersabhängigen Veränderungen der DNA-Methylierung, die im nächsten Abschnitt detailliert beschrieben werden, konnten auch Veränderungen der Modifikationen der Histon-Proteine und anderer chromatin-remodellierender Proteine sowie der Expression von miRNAs mit dem Altern assoziiert werden [65, 66].

Proteostase setzt sich aus den Worten Protein und Homöostase zusammen und steht für das Konzept, dass es innerhalb der Zelle Signalwege gibt, die die Biogenese, die Faltung, den Transport und den Abbau von Proteinen kontrollieren [67]. Endogene und exogene Stressfaktoren führen zur Entfaltung von Proteinen oder stören die richtige Proteinfaltung während der Proteinsynthese. Die Akkumulation und die Aggregation von falsch gefalteten Proteinen sind die Hauptursachen für viele altersassoziierte Krankheiten, einschließlich Alzheimer [57].

Die antagonistischen Kennzeichen des Alterns erfolgen als Reaktion auf den Schaden. Dieser Kategorie werden die zelluläre Seneszenz, die deregulierte Nährstoffsensorik und die

veränderte mitochondriale Funktion zugeordnet. Während alle primären Kennzeichen negative Effekte haben, wirken sich die antagonistischen Kennzeichen abhängig von ihrer Intensität gegensätzlich aus. Bei einem niedrigen Level haben sie einen positiven Effekt, bei einem hohen Level dagegen zerstörerische Auswirkungen. Die zelluläre Seneszenz beschützt zum Beispiel den Organismus vor Krebs, kann aber im Übermaß den Prozess des Alterns fördern.

Zelluläre Seneszenz ist der irreversible Prozess, in dem die Zelle aufhört sich zu teilen und spezifischen Veränderungen des Phänotyps durchläuft, einschließlich der Veränderungen des Chromatins und des Sekretoms [57, 68]. Das Altern und altersassoziierte Krankheiten wurden mit zellulärer Seneszenz in Verbindung gebracht [68, 69].

Eine regulierte Nährstoffsensorik und ein regulierter Energiemetabolismus hält die Homöostase im Organismus aufrecht. Exzessiver Konsum von Energie beschleunigt den Prozess des Alterns, wohingegen die Kalorienrestriktion ein robuster und evolutionär konservierter Mechanismus ist, der die Langlebigkeit sicherstellt [70]. Kalorienrestriktion wird definiert als die Reduzierung der Nahrungsaufnahme auf ein Level über dem Hungern und unter der Menge, die ein Organismus *ad libitum* konsumieren würde. Sie resultiert in der genetischen Herunterregulierung von nahrungssensitiven Signalwegen, wie dem Insulin/insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-Signalweg [71]. Zu den zahlreichen, dem Insulin/IGF-1-Signalweg nachgeschalteten Komponenten zählen die SIRT-1-Aktivierung sowie der PI3K-Akt-, der AMPK-mTOR- und der Ras-Erk-Signalweg [72-74].

Die Effektivität der Mitochondrien nimmt mit dem Alter ab [75]. Die Theorie der freien Radikale besagt, dass die altersassoziierte progressive Dysfunktion der Mitochondrien zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt, wodurch ein globaler zellulärer Schaden verursacht und der Prozess des Alterns gefördert wird [76, 77]. Inzwischen gibt es jedoch Hinweise darauf, dass das zunehmende Level an Sauerstoffradikalen mit dem Alter assoziiert ist, da diese in die Stressreaktion auf den altersabhängigen Schaden involviert sind und dass die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies nicht die primäre Ursache für das Altern ist [77]. Die Dysfunktion der Mitochondrien trägt demzufolge über einen anderen Mechanismus zum Altern bei [78].

Die integrativen Kennzeichen des Alterns sind schließlich die Übeltäter, die zu den phänotypischen Veränderungen führen und direkt die Homöostase und die Funktion eines

Gewebes betreffen: die Erschöpfung des Stammzellreservoirs und eine veränderte interzelluläre Kommunikation [56, 57].

Die Abnahme des regenerativen Potentials eines Gewebes ist eines der offensichtlichsten Charakteristika des Alterns. Die Verringerung der Stammzellen ist eine integrative Konsequenz der verschiedenen altersassoziierten Schäden und stellt wahrscheinlich eine der grundlegendsten Ursachen des Alterns eines Gewebes oder eines Organismus dar [79, 80]. Die Erschöpfung der hämatopoetische Stammzellen resultiert zum Beispiel in Anämie und myeloiden Malignomen und der Abbau der mesenchymalen Stammzellen in Osteoporose und Knochenbrüchen [81, 82]. Eine unzureichende Proliferation der Stamm- und Vorläuferzellen ist offensichtlich schädlich für den Erhalt eines Organismus über eine längere Zeit, eine exzessive Proliferation dieser Zellen kann jedoch ebenfalls zerstörerisch sein, da sie die Erschöpfung des Stammzellreservoirs beschleunigt. Die kontrollierte Proliferations-Aktivität der Stammzellen ist demnach wichtig für deren Funktionalität [79].

Neben zellautonomen Veränderungen beinhaltet das Altern auch Veränderungen auf dem Level der interzellulären Kommunikation, einschließlich endokriner, neuroendokriner und neuronaler Signale. Die neurohormonale Signalweiterleitung, zum Beispiel des Renin-Angiotensin-Systems, scheint mit dem Alter fehlreguliert zu sein, da Entzündungsreaktionen zunehmen und die Immunüberwachung gegen Pathogene und prä-maligne Zellen abnimmt, wodurch opportunistische Infektionen und das Wachstum maligner Zellen auftreten können [56, 57]. Zu den Hauptursachen einer chronischen Entzündung gehören altersassoziierte Veränderungen des Immunsystems, bekannt als Immunoseneszenz, und die erhöhte Sekretion von Zytokinen [83]. Eine chronische systemische Entzündung verursacht andere altersassoziierte Krankheiten, wie Arthritis, Krebs, Osteoporose, Diabetes oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen [84].

1.3.2 Altersassoziierte Veränderungen der DNA-Methylierung

Altersassoziierte epigenetische Veränderungen werden allgemein zusammengefasst in einem Phänomen, das als epigenetische Drift bezeichnet wird. Epigenetische Drift ist charakterisiert durch mit dem Alter fortschreitende DNA-Methylierungs-Veränderungen, die durch Umweltfaktoren beeinflusst werden oder durch spontane zufällige Ereignisse bedingt sind. Dieses Phänomen führt zu Unterschieden im DNA-Methylierungs-Profil von alternden Individuen.

In einer Studie von Heyn *et al.* wurden die Genome von einem Neugeborenen und einem Hundertjährigen verglichen. Komplet-Genom-Bisulfitsequenzierung (whole genome bisulfite sequencing, WGBS) erlaubte die Analyse der DNA-Methylierungs-Profile dieser extremen Zeitpunkte des menschlichen Lebens auf Einzelnukleotid-Ebene und zeigte, dass das Genom des Hundertjährigen im Vergleich zum Genom des Neugeborenen einen geringeren DNA-Methylierungs-Gehalt aufwies. Außerdem war die Korrelation zwischen den DNA-Methylierungs-Level benachbarter CpGs im Epigenom des Hundertjährigen reduziert, die DNA des Neugeborenen war dagegen homogener methyliert. In einer größeren Kohorte aus Neugeborenen und Neunzigjährigen wurden diese Beobachtungen unter Verwendung des Infinium 450K-Methylierungs-Arrays bestätigt [85].

Fraga *et al.* analysierten DNA-Methylierungs-Profile und die Histon-Acetylierung eineiiger Zwillinge und fanden heraus, dass junge Zwillings-Paare epigenetisch nicht unterscheidbar waren, ältere Zwillings-Paare dagegen bemerkenswerte Unterschiede in ihrem Epigenom aufwiesen [86]. Diese Divergenz im DNA-Methylierungs-Muster war deutlicher in Zwillingen erkennbar, die eine lange Zeit ihres Lebens getrennt verbracht hatten [87, 88].

Diese Studien zeigen, dass Ähnlichkeiten im epigenetischen Profil junger Individuen mit der Zeit verloren gehen und durch auseinanderdriftende Methylome in der älteren Population ersetzt werden sowie dass das vorherrschende Ereignis, das mit dem Alter in Verbindung steht, die globale Abnahme der DNA-Methylierung ist.

Zusätzlich zu der globalen Hypomethylierung wurden auch spezifische Hypo- und Hypermethylierungs-Ereignisse mit dem Altern assoziiert [85, 86] (Abbildung 4). Einige dieser DNA-Methylierungs-Veränderungen involvieren spezifische Regionen des Genoms und sind gerichtet [89]. Es gibt folglich auch DNA-Methylierungs-Veränderungen, die nicht stochastisch sind, sondern mit biologischen Mechanismen, die am Prozess des Alterns beteiligt sind, in Verbindung gebracht werden können.

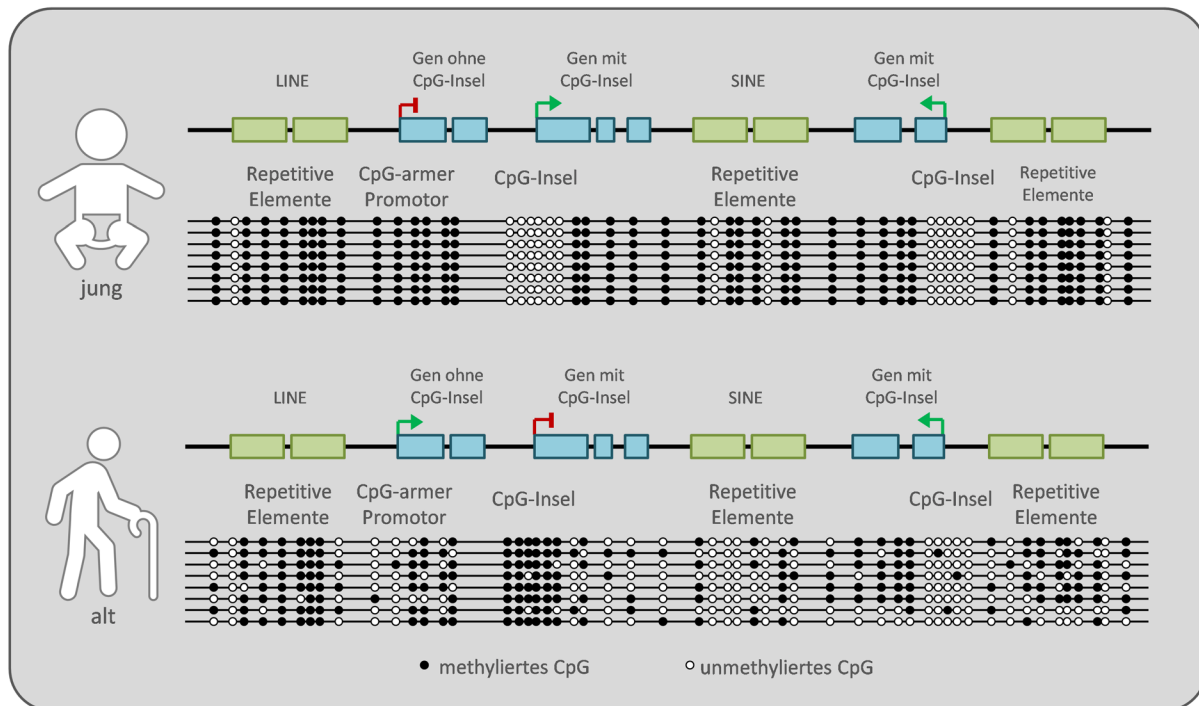


Abbildung 4: Schematische Darstellung der altersassoziierten DNA-Methylierungs-Veränderungen. In Zellen von jungen Individuen liegt eine Hypermethylierung des Genoms vor. Vor allem repetitive Elemente sind stark methyliert, um die Retrotransposition zu verhindern. CpG-Inseln in Promotorbereichen von exprimierten Genen liegen dagegen unmethyliert vor. Während des Alterns kommt es zu einer allgemeinen Hypomethylierung. Der Verlust der DNA-Methylierung führt zur Aktivierung von stillgelegten DNA-Sequenzen. Es kommt aber auch zu Hypermethylierungs-Ereignissen von CpG-Inseln bestimmter Gene, wodurch diese inaktiviert werden. Abbildung erstellt nach [89].

In der auf WGBS basierenden Studie von Heyn *et al.* zeigten nur 13 % der altersassoziierten DMRs eine zunehmende DNA-Methylierung [85]. Altersassoziierte Hypermethylierungs-Ereignisse sind demnach ein Phänomen von eher geringem Ausmaß. Sie betreffen Gene, die mit altersabhängigen Phänotypen oder Krankheiten in Verbindung stehen und in Signalwege involviert sind, die mit Langlebigkeit, Seneszenz oder Neurodegeneration assoziiert sind [90-93]. Die lokale *de novo* Methylierung während des Alterns betrifft zum Beispiel Promotoren von Tumorsuppressor-Genen, was zur Stilllegung dieser Gene und zur Krebsentstehung beitragen kann.

Altersassoziierte Veränderungen der DNA-Methylierung tragen durch die Dysregulation des Genexpressions-Musters sowie durch die Reaktivierung von Transposons und genomischer Instabilität zum Prozess des Alterns bei. Die Lebensdauer eines Organismus ist demzufolge nicht nur genetisch festgelegt, sondern wird zum Teil auch durch epigenetische Modifikationen bestimmt. Neben den genetischen Faktoren, die 20 bis 30 % der Unterschiede in der Lebensspanne monozygoter Zwillinge erklären können, ist ein weiterer Teil dieser Unterschiede durch epigenetische Drift verursacht [89, 94]. Umweltfaktoren haben Auswirkungen auf die Etablierung und die Aufrechterhaltung epigenetischer Modifikationen

und können so die Genaktivität und die Ausprägung des Phänotyps beeinflussen. Neben sich zufällig ereignenden Ereignissen können demnach auch exogene Faktoren die Lebensdauer beeinflussen, indem sie das epigenetische Profil ändern.

Die Reproduzierbarkeit der altersassoziierten Veränderungen der DNA-Methylierung ist an manchen Positionen des Genoms so hoch, dass anhand der DNA-Methylierungs-Level dieser Sites eine ziemlich genaue Altersvorhersage gemacht werden kann. Daher wird die DNA-Methylierung inzwischen als Biomarker für die Schätzung des Alters verwendet.

1.3.3 Biomarker für die Altersbestimmung – die epigenetische Uhr

Menschen altern unterschiedlich schnell. Frauen haben zum Beispiel eine höhere Lebenserwartung als Männer [95]. Außerdem weiß man, dass die individuelle Lebensweise und somit Umweltfaktoren den Prozess des Alterns beeinflussen können. Während Rauchen das Altern beschleunigt, wird es durch Sport verzögert [96]. Es gibt also einen dem Altern zugrundeliegenden Prozess, der in manchen Individuen schneller oder langsamer abläuft als in anderen und der dazu führt, dass das biologische Alter nicht immer dem chronologischen Alter entspricht. Molekulare Marker, die zur Vorhersage des biologischen Alters verwendet werden können, sind daher von hoher Relevanz.

Es wäre interessant zu untersuchen, wie sich das durch einen Biomarker vorhergesagte Alter von chronologisch gleichaltrigen Individuen unterscheidet, um den Einfluss endogener oder exogener Faktoren auf das biologische Alter messen zu können. Biomarker für das Alter könnten so dazu beitragen den Prozess des Alterns und altersassoziierte Krankheiten zu verstehen und zu beeinflussen [97].

Es gibt unterschiedliche Ansätze das biologische Alter zu bestimmen. Kürzlich wurde festgestellt, dass unter verschiedenen potentiellen Biomarkern (Telomerlänge, epigenetische Uhren, Proteom-, Transkriptom- oder Metabolom-basierte Schätzer sowie kombinierte Biomarker) die epigenetische Uhr der vielversprechendste molekulare Kalkulator des biologischen Alters ist [97]. Auch der Vergleich verschiedener forensischer Methoden ergab, dass die DNA-Methylierung ein besonders zuverlässiger Biomarker für die Altersvorhersage ist [98].

Epigenetische Schätzungen des Alters beruhen auf der DNA-Methylierung eines Sets von CpGs, die mit einem mathematischen Algorithmus gekoppelt werden, um das Alter einer DNA-Quelle, wie Zellen oder Gewebe, zu bestimmen. Das geschätzte Alter wird als epigenetisches Alter oder DNA-Methylierungs-Alter bezeichnet [97].

Unter Verwendung von 450K-Methylierungs-Array-Daten, die von Gesamtblutproben von 656 zwischen 19 und 101 Jahre alten Individuen erhoben worden waren, entwickelten Hannum und seine Kollegen ein Modell, das das Alter basierend auf den DNA-Methylierungs-Werten von 71 CpGs mit einer hohen Genauigkeit schätzen kann. Fast alle dieser CpGs liegen in oder nahe bei Genen, die eine bekannte Funktion in altersassoziierten Bedingungen, wie Alzheimer, Krebs, Gewebeerstörung, DNA-Schaden oder oxidativem Stress haben [92].

Dr. Steve Horvath entwickelte eine epigenetische Uhr, um das epigenetische Alter der meisten humanen Gewebe- und Zelltypen bestimmen zu können („Horvath’s clock“). Zur Entwicklung dieser epigenetischen Uhr wurden 8.000 Proben aus 82 Illumina Methylierungs-Array-Datensätzen, die 51 Gewebe- und Zelltypen umfassten, verwendet. Diese epigenetische Uhr ist definiert als der gewichtete Mittelwert über 353 CpG-Stellen, die durch die Illumina Infinium Methylierungs-Arrays abgedeckt sind. Die CpGs, auf deren DNA-Methylierungs-Level die „Horvath’s clock“ basiert, haben eine zumindest indirekte Verbindung zu biologischen Prozessen, die der Entwicklung, der Zelldifferenzierung und der Aufrechterhaltung der zellulären Identität zugrunde liegen. Die altersassoziierten DNA-Methylierungs-Veränderungen der CpGs der epigenetischen Uhr scheinen die Arbeit eines epigenetischen Aufrechterhaltungs-Systems im Zusammenhang mit diesen biologischen Prozessen zu reflektieren [99]. Tritt auf genomischer oder epigenomischer Ebene Instabilität auf, wird vermutlich das epigenetische Aufrechterhaltungs-System aktiviert, um somatische Mutationen zu limitieren und eine stabile Zelldifferenzierung zu ermöglichen. Das epigenetische Alter könnte demnach als eine Art Dokumentation der Aktivität des epigenetischen Aufrechterhaltungs-Systems betrachtet werden [97].

Der auf Blut basierende Kalkulator von Hannum *et al.* und die „Horvath’s clock“, die auf nahezu alle Gewebe angewendet werden kann, erzeugen Altersschätzungen, die bereits in vielen epidemiologischen Studien eingesetzt wurden [97, 100].

In manchen Geweben, wie zum Beispiel in dermalen Fibroblasten, berechnet die ursprüngliche „Horvath’s clock“ das epigenetische Alter nur unzureichend. Daher wurde eine weitere epigenetische Uhr entwickelt, die als „skin & blood clock“ bezeichnet wird, auf 391 CpGs basiert und für verschiedene Zellen, einschließlich Fibroblasten, Keratinozyten, Mundschleimhaut- und Blutzellen, verwendet werden kann. Diese epigenetische Uhr ermöglicht die Bestimmung des epigenetischen Alters in *ex vivo* Studien mit menschlichen Zellen [101].

Die mathematische Adjustierung der Altersschätzungen im Zusammenhang mit dem chronologischen Alter der entsprechenden Proben ergibt eine Messung zur Rate des epigenetischen Alterns, die als Beschleunigung des epigenetischen Alterns bezeichnet wird und positive oder negative Werte annehmen kann. Positive Werte repräsentieren eine hohe Rate des epigenetischen Alterns und wurden bereits häufig mit altersassoziierten Krankheiten in Verbindung gebracht [97, 100]. Das epigenetische Alter ist nicht nur die alternative Messung des chronologischen Alters, sondern auch ein Indikator für den Gesundheitszustand und repräsentiert somit das biologische Alter [101].

1.3.4 Vorzeitiges Altern – das Werner-Syndrom

Progeroide Erkrankungen zeichnen sich dadurch aus, dass Patienten älter erscheinen als sie chronologisch sind und bereits zu einem frühen Zeitpunkt in ihrem Leben viele Symptome und klinische Merkmale des normalen Alterns aufweisen. Einige progeroide Syndrome sind mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert. Progeroide Syndrome werden als segmental bezeichnet, wenn zwar viele, aber nicht alle Kennzeichen des Prozesses des Alterns betroffen sind [102].

Das Werner Syndrom (WS) ist eine segmental progeroide Erkrankung, die in der Adoleszenz oder im frühen Erwachsenenalter beginnt. Das Syndrom wurde nach dem deutschen Mediziner Otto Werner (1879-1936) benannt, der es 1904 erstmals in seiner medizinischen Dissertation beschrieb. WS ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, deren Prävalenz in den meisten Populationen auf ungefähr 1:200.000 geschätzt wird. In Japan (1:10.000 - 1:40.000) und Sardinien (1:50.000) liegt eine deutlich höhere Prävalenz vor, was wahrscheinlich durch lokale Gründermutationen bedingt ist [103]. Etwa 1.200 Fälle von WS wurden weltweit beschrieben [104].

Klassisches WS wird durch Mutationen im *Werner syndrome RecQ like helicase (WRN)*-Gen verursacht. *WRN* umfasst etwa 150 kb, besitzt 35 Exons und kodiert ein Protein, das sich aus 1.432 Aminosäuren zusammensetzt [105]. Bisher wurden über 80 verschiedene krankheitsverursachende Mutationen im *WRN*-Gen identifiziert [106]. Die meisten dieser Mutationen resultieren in einem verkürzten Protein, dem das C-terminale Kernlokalisierungssignal fehlt. Das verkürzte Protein kann nicht mehr in den Zellkern gelangen und somit seine Funktion nicht mehr ausüben [107, 108]. Dass unabhängig von der Mutation stets ein Funktionsverlust vorliegt, erklärt, warum keine bemerkenswerten Unterschiede im WS-Phänotyp zwischen Patienten mit unterschiedlichen zugrundeliegenden Mutationen

beobachtet werden können [109]. WRN gehört zur Familie der RecQ-Helikasen. Es besitzt Helikase- und Exonuklease-Aktivität und ist an verschiedenen zellulären Abläufen beteiligt. Das Protein ist in die Prozesse der DNA-Reparatur, der Rekombination, der Transkription und der Replikation sowie in die Erhaltung der Telomere involviert [110-116].

Die diagnostischen Kriterien für WS wurden 1994 festgelegt und 2012 von Takemoto *et al.* auf der Grundlage einer epidemiologischen Studie, die von 2009 bis 2011 in Japan durchgeführt wurde, aktualisiert. Kardinalsymptome für WS sind demnach progeroide Veränderungen des Haares (Ergrauung und Verlust der Haare, *etc.*), bilateraler Katarakt, Veränderungen der Haut (atrophische Haut, straffe Haut, Hühneraugen, Schwielen, hartnäckige Hautgeschwüre), Verkalkung des Weichgewebes (Achilles-Sehne, *etc.*), ein vogelartiges Gesicht und eine abnormale Stimme (hohe, piepsige, heisere Stimme). Weitere Symptome und Zeichen für WS sind ein abnormaler Glukose- und/oder Fett-Metabolismus, Deformierung und Abnormalität der Knochen (Osteoporose, *etc.*), maligne Tumore (nicht-epitheliale Tumore, Schilddrüsen-Krebs, *etc.*), verfrühte Atherosklerose (Angina pectoris, Herzinfarkt), Hypogonadismus, eine kleine Statur und geringes Körpergewicht [117]. Auf zellulärer Ebene wird WS mit genomischer Instabilität assoziiert, da vermehrt chromosomale Rearrangements, Chromosomenaberrationen und Aneuploidien sowie große spontane DNA-Deletionen auftreten [118-120]. Die Haupttodesursachen unter Patienten mit WS sind Krebs und Herzinfarkt [121]. Das durchschnittliche Sterbealter von WS-Patienten liegt bei 54 Jahren [109].

Es gibt bereits Studien, die zeigen konnten, dass WS mit Veränderungen der DNA-Methylierung assoziiert werden kann. Die Gruppe um Heyn untersuchte das DNA-Methylierungs-Muster in lymphoblastoiden Zelllinien von Patienten mit *WRN*-Mutation unter Verwendung des Infinium 450K-Methylierungs-Arrays und beobachteten DNA-Methylierungs-Veränderungen in altersassoziierten Genen und Prozessen [122]. Guastafierro *et al.* analysierten mit dem Infinium EPIC-Methylierungs-Array das genomweite DNA-Methylierungs-Profil in Gesamtblut von WS-Patienten. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen konnten hyper- und hypomethylierte CpGs detektiert werden, die mit verschiedenen Signalwegen, wie dem Insulin- und dem PI3K-Akt-Signalweg in Verbindung stehen [123].

1.4 Krebs

Ein Tumor (lateinisch für Schwellung) oder eine Neoplasie (griechisch für Neubildung) ist eine abnormale Masse eines Gewebes, die entsteht, wenn Zellen sich öfter teilen als sie sollten oder nicht sterben, wenn sie sollten. Die Bezeichnung Krebs steht für bösartige/maligne Tumoren. Im Gegensatz zu gutartigen/benignen Geschwülsten wachsen maligne Zellen ungeordnet, sind häufig nicht vollständig differenziert und verändern sich schnell, manchmal mit jeder Zellteilung. Krebszellen haben also eine hohe Mutationsrate, wodurch sie sehr wandlungsfähig sind und sich schnell an neue Bedingungen anpassen können [Internet-Referenz 1].

1.4.1 Krebsentstehung

Die Krebsentstehung ist ein vielstufiger Prozess. Verschiedene Schritte führen dazu, dass gesunde Zellen bestimmte Eigenschaften verlieren oder neue hinzugewinnen und schließlich zu Zellen werden, die sich eigenständig, fortschreitend und überschießend teilen.

Die sechs von Hanahan und Weinberg identifizierten Kennzeichen eines malignen Tumors umfassen biologische Fähigkeiten, die während der mehrstufigen Tumorentwicklung erworben werden. Sie beinhalten die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit gegenüber Signalen, die das Wachstum hemmen oder den Zelltod bewirken sowie ein unbegrenztes Wachstumspotential. Außerdem werden die mangelnde Fähigkeit zur Apoptose, die Induktion der Angiogenese sowie die Invasion und Bildung von Metastasen dazu gezählt [124].

Bereits gut erforschte Mechanismen, die dazu beitragen, dass aus gesunden Zellen maligne Zellen werden, sind nicht oder fehlerhaft reparierte DNA-Schäden, die zur Deregulation der zellulären Funktionen führen. Mutationen können zum Beispiel zur abnormalen Aktivierung von Onkogenen oder zum Verlust der Funktion von Tumorsuppressor-Genen führen [124, 125]. Inzwischen weiß man, dass auch epigenetische Veränderungen mit Krebs assoziiert werden können. Es gibt sogar immer mehr Evidenz dafür, dass DNA-Methylierungs-Veränderungen nicht nur ein Nebenprodukt der malignen Transformation sind, sondern eine aktive Rolle bei der Tumorprogression spielen. Veränderungen der DNA-Methylierung werden demnach als ein frühes Ereignis in der Entwicklung eines Tumors betrachtet [126].

1.4.2 Krebs und DNA-Methylierung

Menschliche Krebszellen zeigen dramatische Veränderungen der DNA-Methylierung [127]. Im Vergleich zu normalen Zellen sind Tumorzellen des gleichen Gewebetyps durch eine globale Hypomethylierung sowie durch die spezifische Hypo- und Hypermethylierung bestimmter genomischer Regionen charakterisiert (Abbildung 5).

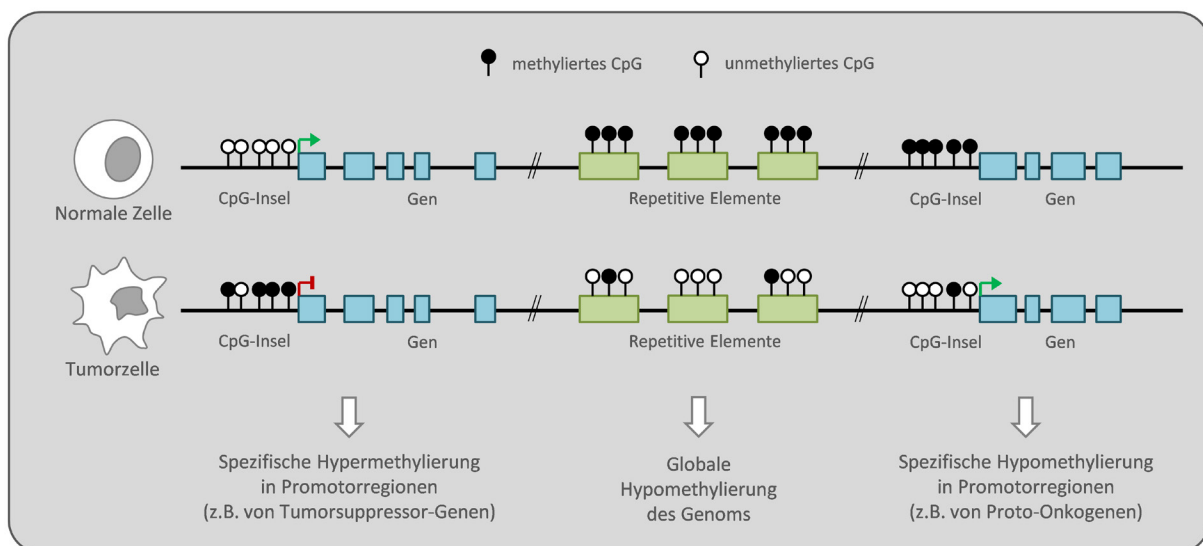


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Unterschiede im DNA-Methylierungs-Profil zwischen normalen Zellen und Krebszellen. In Tumorzellen liegt eine globale Hypomethylierung vor, die vor allem auf die repetitiven Elemente zurückgeführt werden kann. Es kommt aber auch zu spezifischen Hyper- und Hypomethylierungs-Ereignissen. Abbildung erstellt nach [128].

Tumoren weisen eine globale Hypomethylierung auf, die vor allem durch den Verlust der DNA-Methylierung an repetitiven Elementen, aber auch durch Hypomethylierungs-Ereignisse an spezifischen Loci bedingt ist [129]. Der Verlust der globalen DNA-Methylierung resultiert in der Reaktivierung transposabler Elemente und trägt somit zur genomischen Instabilität bei [127, 130]. Die locus-spezifische Hypomethylierung von Proto-Onkogenen, wie *HOX11*, *BCL-2* oder *R-RAS* und die in manchen Fällen daraus resultierende aberrante Expression dieser die Krebsentstehung fördernden Gene wurde in mehreren Tumoren beschrieben [131-133]. Die Hypermethylierungs-Ereignisse in Tumoren betreffen häufig Tumorsuppressor-Gene. Eine Hypermethylierung der Promotorregionen dieser Gene kann zur Stilllegung der Transkription führen. Nach der 2-Treffer-Hypothese, die 1971 das erste Mal von dem Genetiker Alfred Knudson beschrieben wurde, kann eine Zelle erst cancerogen werden, wenn beide Allele eines Tumorsuppressor-Gens mutiert sind [134]. Wird ein Allel eines bestimmten Tumorsuppressor-Gens inaktiviert, verbleibt noch das zweite aktive Allel in der Zelle. Erst der Funktionsverlust des zweiten Allels führt zur Krebsentstehung. Für die Störung bestimmter Funktionen durch

die Inaktivierung eines Tumorsuppressor-Gens ist somit der komplette Funktionsverlust beider Kopien des involvierten Gens nötig. Neben den klassischen Genmutationen können auch andere Ereignisse, wie zum Beispiel epigenetische Mechanismen, zur Inaktivierung eines Allels führen. Eine aberrante DNA-Methylierung, die in der Stilllegung des Gens resultiert, kann als erster oder zweiter Treffer wirken und so zur malignen Transformation einer Zelle beitragen [135, 136]. Die Stilllegung verschiedener Tumorsuppressor-Gene durch Hypermethylierung wurde bereits oft mit Krebs in Verbindung gebracht [127, 137, 138].

1.4.3 Kandidaten-Tumorsuppressor-Gene

Tumorsuppressor-Gene kodieren Proteine, die die unkontrollierte Teilung genomisch geschädigter Zellen unterdrücken. Sie spielen eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur sowie in der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität und Stabilität [139].

Das *Ataxia telangiectasia mutated (ATM)*-Gen ist ein Tumorsuppressor-Gen, das eine Serin-/Threonin-Proteinkinase kodiert. Es wird angenommen, dass ATM und die eng verwandte Kinase ATR die Master-Kontrolleure der Zellzyklus-Checkpoint-Signalwege sind, die für die Zellreaktion auf DNA-Schäden benötigt werden. ATM fungiert als Regulator zahlreicher nachgeschalteter Proteine, einschließlich der Tumorsuppressor-Proteine p53 und BRCA1 [Internet-Referenz 2]. Eine Fehlregulation des von ATM abhängigen p53-Signalwegs kann zu pathologischen Veränderungen, wie unkontrollierter Proliferation und Tumorwachstum, beitragen. Das *Breast cancer 1 (BRCA1)*-Gen ist ein gut etabliertes Tumorsuppressor-Gen, das in Fällen von familiärem Brust- und Eierstockkrebs häufig mutiert vorliegt [140]. Neben seiner wichtigen Funktion in der DNA-Reparatur ist BRCA1 auch in die Ubiquitylierung von Proteinen, die Chromatin-Umstrukturierung sowie in die transkriptionelle Regulation und die Apoptose involviert [141]. Das *RAD51 paralog C (RAD51C)*-Gen ist ein Mitglied der RAD51-Familie, die an der homologen Rekombination und an der DNA-Reparatur beteiligt ist [Internet-Referenz 3]. Das *tumor protein p53 (TP53)*-Gen kodiert ein Tumorsuppressor-Protein, das auf zellulären Stress reagiert und in die Regulation des Zellzyklus, der Apoptose, der Seneszenz, der DNA-Reparatur und des Metabolismus involviert ist [Internet-Referenz 4]. Mutationen in diesem Gen wurden mit zahlreichen Krebsarten in Verbindung gebracht [142]. Auf epigenetischem Level wurde die Hypermethylierung der Promotorregionen von *ATM*, *BRCA1*, *RAD51C* und *TP53* mit Brust- und Eierstock-Krebs sowie mit weiteren Tumoren assoziiert [143-148].

Da Tumorsuppressor-Proteine essentiell für die DNA-Reparatur sind, werden sie vor allem benötigt, wenn DNA-Schäden durch exogene Faktoren hervorgerufen werden. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, die zum Beispiel durch ionisierende Strahlung induziert werden [149].

1.5 Ionisierende Strahlung

Strahlung wird als ionisierende Strahlung bezeichnet, wenn sie beim Durchdringen von Materie so viel Energie abgibt, dass Atome oder Moleküle ionisiert werden. Unter Ionisation versteht man, dass die Elektronen, durch deren Wechselwirkung die Bindung zwischen den Atomen eines Moleküls entsteht, aus der Hülle herausgedrängt werden, woraufhin dieses kurzzeitig elektrisch positiv geladen ist [150].

Röntgenstrahlen spielen eine wichtige Rolle in der medizinischen Diagnostik und Behandlung. Bei Röntgenstrahlung wird die Energie in Form elektromagnetischer Wellen transportiert. Da in der Zielmaterie im Mittel geringe Energiemengen deponiert werden, sind Röntgenstrahlen locker ionisierende Strahlen. Die Energie, die beim Durchgang durch Materie deponiert wird, wird als absorbierte Energie pro Masseinheit definiert und die absorbierte Dosis wird in Gray (Gy) gemessen [Internet-Referenz 5].

Ionisierende Strahlung kann durch das Einfügen von DNA-Brüchen, insbesondere von Doppelstrangbrüchen, die DNA-Struktur direkt schädigen. Indirekte oder sekundäre Effekte werden durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies hervorgerufen, die Proteine und Lipide oxidieren und ebenfalls schwere Schäden, wie Einzelstrangbrüche und die Generierung von abasischen Sites, verursachen [150]. Auf chromosomaler Ebene treten demnach vor allem Basenschäden, Einzel- oder Doppelstrangbrüche und DNA-Protein-Verlinkungen auf [151, 152]. Diese Schäden resultieren kollektiv im Zelltod oder dem Scheitern der Mitose [150].

1.5.1 Strahlentherapie und Krebsrisiko

Etwa die Hälfte aller Krebspatienten erhält eine Strahlentherapie. Bei den meisten Patienten wird eine äußere Strahlentherapie angewendet. Hier generiert eine externe Strahlenquelle ionisierende Strahlung, die auf den Tumor gerichtet wird. Dies passiert zum Beispiel mit Hilfe eines Linearbeschleunigers, der Hochenergie-Röntgenstrahlen erzeugt [153]. Therapeutische Bestrahlung trifft nicht nur das anvisierte neoplastische Gewebe, sondern auch gesunde Zellen, die den Tumor umgeben. Die Strahlentherapie beruht auf der Annahme, dass

Krebszellen mit gezielter ionisierender Strahlung zerstört werden, wohingegen normale Zellen die Bestrahlung aushalten und sich nach der Strahlenexposition erholen können [154, 155]. Gewöhnlich werden Fraktionen von 1,8 bis 2 Gy über einen Zeitraum von vier bis acht Wochen verabreicht, um die Toxizität für das normale Gewebe zu minimieren [153]. Dennoch hat Strahlentherapie auch viele negative Auswirkungen. Die Ausmaße der Nebenwirkungen hängen von zahlreichen Faktoren, wie zum Beispiel der Art und der Lokalisierung des Tumors, der verabreichten Dosis und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten, ab. Nachteilige Effekte der Strahlentherapie werden in frühe und späte Auswirkungen eingeteilt. Frühe negative Effekte treten während oder kurz nach Beendigung der Therapie auf und verschwinden innerhalb weniger Wochen. Gewöhnlich auftretende Nebenwirkungen sind Veränderungen der Haut und Erschöpfung. Je nachdem, welches Organ betroffen ist, kommen verschiedene Symptome hinzu. Wird beispielsweise eine Region des Abdomens Strahlung ausgesetzt, können Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen auftreten. Späte negative Effekte treten erst Monate oder Jahre nach Abschluss der Therapie in Erscheinung [156]. Mögliche späte Komplikationen einer Strahlentherapie sind Zweittumore, die sich meist erst 10 bis 15 Jahre nach der Behandlung manifestieren [156, 157]. Das Risiko einen durch Strahlentherapie induzierten Zweittumor zu entwickeln wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Einer der wichtigsten Aspekte für die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines Zweittumors ist das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Behandlung. Je jünger ein Patient während der Strahlentherapie ist, desto höher ist das Risiko eines zukünftigen Zweittumors. Außerdem spielen die genetische Prädisposition des Patienten, die Art des betroffenen Gewebes oder Organs und die Strahlendosis eine Rolle [158].

1.5.2 Ionisierende Strahlung und DNA-Methylierung

Die Hauptmechanismen, die zur strahleninduzierten Krebsentstehung beitragen, stehen in Verbindung mit nicht oder fehlerhaft reparierten DNA-Schäden und der Induktion von Mutationen [159]. Die Effekte der Strahlentherapie, die genetische Veränderungen mit sich bringen, wurden ausführlich dokumentiert [160-162]. Inzwischen wurde gezeigt, dass ionisierende Strahlung nicht nur DNA-Schäden, sondern auch epigenetische Veränderungen, insbesondere der DNA-Methylierung, hervorruft [163-166].

Mehrere Studien haben ionisierende Strahlung mit dem Verlust der globalen DNA-Methylierung assoziiert. Das 5mC-Level war in vier verschiedenen kultivierten Zelllinien 24 bis 72 Stunden nach 0,5 bis 10 Gy γ -Strahlung signifikant reduziert [166]. In Mensch-

Hamster-hybriden Zellen wurde gezeigt, dass 2 Gy Röntgenstrahlung eine signifikante Hypomethylierung von ALU und LINE-1 zur Folge haben. Nach 0,5 Gy wurde für LINE-1 dagegen ein signifikant erhöhtes DNA-Methylierungs-Level beobachtet [167]. In humanen Darmkrebszellen wurde 16 bis 20 Populations-Verdoppelungen (PVs) nach 1 Gy Röntgenstrahlung eine Hypomethylierung von LINE-1 detektiert, die selbe Dosis resultierte jedoch in einer Hypermethylierung in primären humanen diploiden Hautfibroblasten [168]. Die Ergebnisse waren also nicht immer konsistent und es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass strahleninduzierte DNA-Methylierungs-Veränderungen von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Studien, die vor allem an Mäusen und Ratten durchgeführt wurden, zeigten immer deutlicher, dass durch ionisierende Strahlung hervorgerufene Veränderungen der DNA-Methylierung nicht nur von der Dosis, dem Geschlecht und dem untersuchten Gewebe- oder Zelltyp, sondern auch von der Art der Strahlung und dem Zeitpunkt nach Bestrahlung abhängig sind [169].

Eine globale Hypomethylierung wurde vor allem in Organen und Systemen beobachtet, die sensitiv für eine strahleninduzierte Krebsentstehung sind [169]. Im Knochenmark von Mäusen lag ein Verlust der DNA-Methylierung nach 3 Gy ionisierender Strahlung vor [170]. Eine reduzierte DNA-Methylierung wurde auch in anderen für Krebs anfälligen Geweben, wie im Thymus, der Brustdrüse und der Milz, aber nicht in der Lunge oder im Muskelgewebe detektiert [171-174]. Die Effekte konnten längere Zeit nach Bestrahlung, sogar wenn der strahleninduzierte DNA-Schaden bereits repariert war, beobachtet werden [171] und auch in Organen, die nicht direkt ionisierender Strahlung ausgesetzt waren. In Milzgewebe von Ratten wurde sieben Monate nach kranialer Bestrahlung mit 20 Gy Röntgenstrahlung eine Hypomethylierung von LINE-1 gefunden [175].

Zusätzlich zur Veränderung des globalen DNA-Methylierungs-Niveaus induziert ionisierende Strahlung auch locus-spezifische DNA-Methylierungs-Veränderungen [176, 177]. Allerdings präsentierten auch Studien, die genspezifische Veränderungen der DNA-Methylierung nach Strahlenexposition untersuchten, kontroverse Ergebnisse. Antwith *et al.* analysierten DNA-Methylierungs-Veränderungen in Brustkrebszellen über einen Zeitraum von 72 Stunden nach Bestrahlung unter Verwendung des 450K-Methylierungs-Arrays. Differentiell methylierte Gene waren angereichert in Kategorien, die mit Signalwegen zur Reaktion auf Strahlung in Zusammenhang stehen [163]. Eine weitere 450K-Methylierungs-Array-Studie mit bestrahlten Darmkrebszellen ergab ebenfalls globale und spezifische DNA-Methylierungs-Veränderungen

[164]. Im Gegensatz dazu fanden Lahtz *et al.* keine signifikanten Veränderungen der DNA-Methylierung in normalen humanen Fibroblasten und bronchialen Epithelzellen sieben Tage nach gering dosierter (0,1 bis 1 Gy) γ -Strahlung [178]. Effekte ionisierender Strahlung konnten also bisher in genetisch instabilen Krebszellen und Zelllinien mit beeinträchtiger DNA-Reparatur, nicht aber in normalen Zellen detektiert werden.

Ionisierende Strahlung kann Schäden direkt in den exponierten Zellen oder indirekt (verspätet) in Zellen einige Generationen nach Exposition hervorrufen. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass strahleninduzierte Genominstabilität (radiation-induced genomic instability, RIGI) in Zellen mehrere Zellteilungen nach Strahlenexposition auftritt [179-181]. RIGI ist durch verschiedene Endpunkte, wie Genmutationen und -amplifikationen, zytogenetische Auffälligkeiten, Micronuclei und/oder verzögerter Zelltod charakterisiert und wird häufig mit strahleninduzierter Krebsentstehung in Zusammenhang gebracht [179, 182]. Obwohl verschiedene Mechanismen, wie Entzündungsreaktionen, der oxidative Stress durch mitochondriale Fehlfunktion sowie die Sekretion von Zytokinen diskutiert wurden [181], müssen die Faktoren, die den Strahleneffekt an die nicht direkt der Strahlung ausgesetzten Nachkommen der bestrahlten Zellen weitergeben, noch geklärt werden. Epigenetische Modifikationen sind vielversprechende Kandidaten für ein Gedächtnis der Strahlenexposition, das über viele Zellteilungen an die klonalen Nachkommen einer direkt exponierten Zelle weitergegeben werden kann [183]. Es gibt zunehmend mehr Hinweise, dass Bestrahlung mit globalen und genspezifischen DNA-Methylierungs-Veränderungen mehrere PVs nach Strahlenexposition assoziiert ist [165, 167, 168, 183]. Ähnlich zur strahleninduzierten Genominstabilität könnte auch die durch ionisierende Strahlung hervorgerufene Instabilität des Epigenoms an der Tumorentstehung beteiligt sein.

1.6 Fibroblasten als Modellsystem

Fibroblasten sind ein häufig untersuchter Zelltyp, da sie eine wichtige Rolle im Organismus spielen. Sie sind ein Hauptbestandteil des Bindegewebes, in dem sie vereinzelt in der die Grundsubstanz bildenden extrazellulären Matrix vorliegen. Durch die Produktion von Kollagen und andere Komponenten sind sie am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt [184].

In vitro bilden Fibroblasten Zellverbände und zeigen eine begrenzte Lebensdauer. Nimmt die Teilungsaktivität ab, haben sie die replikative Seneszenz erreicht, die sich durch einen irreversiblen Arrest auszeichnet [185]. Zelluläre Seneszenz repräsentiert eine Basis des Alterns eines Organismus und weist viele Ähnlichkeiten zum *in vivo* Altern auf. Daher können

Fibroblasten durch die Kultivierung über einen langen Zeitraum als Modellsystem für das Altern verwendet werden [186]. Dermale Fibroblasten, die durch Langzeit-Kultivierung gealtert werden, weisen die meisten der Kennzeichen des Alterns, die von López-Otín *et al.* erstellt wurden [56], auf. Es gibt aber auch Eigenschaften, die klar mit der *in vitro* Alterung assoziiert sind, jedoch noch nicht als allgegenwärtige Kennzeichen des Alterns anerkannt sind: Veränderungen der Zellplastizität, der Zytoskelett-Funktion und der prä-mRNA-Prozessierung [186]. Vergleichbar mit dem Altern des Organismus gibt es auch während der replikativen Seneszenz globale und spezifische Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster. Die Anzahl der Passagen sowie die PVs können anhand des DNA-Methylierungs-Levels spezifischer CpG-Stellen vorhergesagt werden [187].

Als Bestandteil des Bindegewebes werden Fibroblasten bei externer Bestrahlung immer auch ionisierender Strahlung ausgesetzt. Daher werden Fibroblasten in der strahlenbiologischen Forschung oft als *in vitro* Modell verwendet [188].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ein hohes Alter ist der größte Risikofaktor für viele Krankheiten, einschließlich Stoffwechselerkrankungen und Krebs [189]. Um zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die dem Prozess des Alterns zugrunde liegen, beizutragen, sollte basierend auf primären humanen Fibroblasten ein *in vitro* Modell etabliert werden, das es ermöglicht DNA-Methylierungsveränderungen im Zusammenhang mit dem Altern zu untersuchen.

Das *in vitro* Modell für das Altern sollte außerdem verwendet werden, um die Latenzzeit nach Strahlentherapie nachzuahmen und so neben den DNA-Methylierungs-Veränderungen direkt nach Bestrahlung auch den Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung analysieren zu können. Strahlentherapie ist eine der wichtigsten Säulen der Krebstherapie. Allerdings besteht das Risiko einen strahleninduzierten Zweittumor zu entwickeln. Die Mechanismen, die der strahleninduzierten Tumorgenese zugrunde liegen, sind noch nicht gut verstanden. Während der Strahlentherapie werden nicht nur Krebszellen des anvisierten neoplastischen Gewebes, sondern auch normale Zellen des umliegenden gesunden Gewebes ionisierender Strahlung ausgesetzt. Daher ist es wichtig zu untersuchen, wie normales Gewebe durch die Strahlentherapie beeinflusst wird. Ziel war es die Hypothese zu testen, dass epigenetische Mechanismen an der Krebsentstehung nach Bestrahlung beteiligt sein könnten. Zunächst sollte die DNA-Methylierung innerhalb des ersten Zellzyklus nach Strahlenexposition analysiert werden, um DNA-Methylierungs-Veränderungen, die im Zusammenhang mit der

direkten DNA-Schadensantwort stehen, zu detektieren. Da sich strahleninduzierte Zweittumore erst mehrere Jahre nach der Strahlentherapie bilden, sollte anschließend die Hypothese untersucht werden, dass auch strahleninduzierte Veränderungen der DNA-Methylierung erst längere Zeit nach Strahlenexposition in Erscheinung treten könnten.

Im Rahmen eines zweiten Projektes sollten Gesamtblutproben von WS-Patienten und gesunden Kontrollen analysiert werden. Patienten mit WS, einer segmental progeroiden Erkrankung, sehen älter aus als sie chronologisch sind und weisen klinische Merkmale eines frühzeitigen Alterns auf. DNA-Methylierungs-Veränderungen, die an dem vorzeitigen Altern beteiligt sein könnten, sollten identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

2.1.1.1 Fetale Fibroblasten

Für die Experimente mit primären humanen Fibroblastenlinien wurde anonymisiertes, überschüssiges Material aus Fruchtwasseruntersuchungen der zytogenetischen Pränatal-Diagnostik des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg verwendet. Die schriftliche Einwilligungserklärung über die Verwendung dieses Materials für Forschungszwecke wurde eingeholt. Für die Fibroblastenlinien, die für diese Arbeit verwendet wurden, waren zuvor pathologische Chromosomenbefunde ausgeschlossen worden.

2.1.1.2 DNA aus Gesamtblut

Für die vorliegende Arbeit wurde DNA aus Gesamtblutproben von Patienten mit Werner-Syndrom und gesunden Kontrollen untersucht. Die Patientenproben wurden vom International Registry of Werner Syndrome [Internet-Referenz 6] zur Verfügung gestellt. Die Patienten trugen Mutationen im *WRN*-Gen. Die Kontrollproben waren im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg gesammelt worden und wurden sorgfältig ausgewählt, so dass Alter und Geschlecht mit den Patientenproben übereinstimmten.

2.1.2 Material für die Durchführung und Auswertung der Versuche

Im Folgenden sind verwendete Chemikalien, kommerzielle Kits, Puffer und Medien, Apparaturen sowie Programme und Datenbanken jeweils in alphabetischer Reihenfolge und mit Informationen zu der vertreibenden Firma aufgelistet. Für die selbst hergestellten Puffer und Medien ist die genaue Zusammensetzung angegeben. Verbrauchsmaterialien, die für die Zellkultur verwendet wurden, sind ebenfalls aufgelistet. Weitere Einwegartikel und Verbrauchsmaterialien, die zur allgemeinen Laborausstattung zählen, sind hier nicht explizit erwähnt.

2.1.2.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Firma (Sitz)
0,5 % Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
6xLoading Dye	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Alconox Detergent	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Promega (Madison, USA)
Ethanol (absolute)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Fetal Bovine Serum (FBS), 25 min bei 56 °C inaktiviert	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Formamide (Deionized)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
GeneRuler DNA Ladder Mix (100 bp ladder)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
HD Green Plus	INTAS Science Imaging (Göttingen, Deutschland)
Methanol, ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin (PS) (10.000 U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
peqGold Universal Agarose	peqLab (Erlangen, Deutschland)
Sodium hydroxide (NaOH)	Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare (München, Deutschland)
Tris	Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

2.1.2.2 Kommerzielle Kits, Puffer und Medien

Tabelle 2: Verwendete kommerzielle Kits, Puffer und Medien.

Kit/Puffer/Medium	Firma (Sitz)
AMPure XP Beads	Beckmann Coulter, Krefeld (GER)
Chang Medium D	Irvine Scientific (Santa Ana, USA)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1X) + GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Elution Buffer	Qiagen Sciences Inc. (Hilden, Deutschland)
EZ DNA Methylation-Direct Kit	Zymo Research (Freiburg, Deutschland)
EZ DNA Methylation Kit	Zymo Research (Freiburg, Deutschland)
FastStart Taq DNA Polymerase System	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
High Sensitivity DNA Analysis Kit	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Infinium Human Methylation 450K BeadChip Kit	Illumina (San Diego, USA)
Infinium Human MethylationEPIC BeadChip Kit	Illumina (San Diego, USA)
MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles)	Illumina, San Diego (USA)
NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
PhiX Control v3	Illumina, San Diego (USA)
PyroMark Annealing buffer	Qiagen Sciences Inc. (Hilden, Deutschland)
PyroMark Binding buffer	Qiagen Sciences Inc. (Hilden, Deutschland)
PyroMark® Gold Q96 CDT Reagents (6x96)	Qiagen Sciences Inc. (Hilden, Deutschland)
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Quick-gDNA MiniPrep Kit	Zymo Research (Freiburg, Deutschland)

2.1.2.3 Apparaturen

Tabelle 3: Verwendete Apparaturen.

Bezeichnung	Firma (Sitz)
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
AirClean 600 PCR Workstation UV-Bench	AirClean Systems (Raleigh, USA)
ALPS 25 Manual Heat Sealer	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Bandelin Sonorex RK 52 Ultraschallbad	Bandelin electronics (Berlin, Deutschland)
Delta Range PM 460	Mettler Toledo (Giessen, Deutschland)
DNA Engine Tetrad 2 Thermal Cycler	Bio-Rad (München, Deutschland)
EG4200-2NM Präzisionswaage	Kern&Sohn (Balingen, Deutschland)
Elektrophoresis Power Supply	Bio-Rad (München, Deutschland)
Exsikkator	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Gel iX Imager	Intas Science Imager Instruments (Göttingen, Deutschland)
GENE Mate Gelelektrophoresekammern	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Hera cell 240 Inkubator	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Heraeus Lamin Air HB2448 Sterilwerkbank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Heraeus Megafuge 1.0 und 11	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Heraeus Multifuge 3SR+, X1R und X3	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Hettich Zentrifugen Mikro 20	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
High-Speed Microplate Shaker	Illumina (San Diego, USA)
Hybex Microsample Incubator	SciGene (Sunnyvale, USA)
Hybridization Oven	Illumina (San Diego, USA)
iScan System	Illumina (San Diego, USA)
Linearbeschleuniger Siemens Primus L	Siemens (Concord, USA)
Magnetständer DynaMag-2	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
MiSeq	Illumina (San Diego, USA)
Olympus GK2	Olympus (Hamburg, Deutschland)
PCR-Plattenzentrifuge Perfect Spin	VWR (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter inoLab	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipetten Brand Transferpetten (20-1.000 µl)	Brand (Wertheim, Deutschland)
Pipetten Eppendorf Multichannel Plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten Eppendorf Research Plus (0,1-1.000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
POWER PAC 1000	Bio-Rad (München, Deutschland)
PyroMark Q96 Capillary/Reagent Tips/Capillary Tip Holder	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PyroMark Q96 MD Pyrosequencer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PyroMark Q96 MD Vacuum Workstation System	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qubit Fluorometer	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Rack Chamber 48 Pos. Te-Flow with consumables	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge Galaxy 16 DH	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Wasserbad GFL 1003	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Zellsortier-System FACS Aria III	BD Biosciences (San Jose, USA)

2.1.2.4 Selbst hergestellte Puffer und Medien

Tabelle 4: Selbst hergestellte Puffer und Medien.

Puffer/Medium	Zusammensetzung
1xTris-EDTA-Puffer	1 ml 1M Tris (pH 8,0); 0,2 ml 0,5 M EDTA; 98,8 ml dH ₂ O
50xTris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	242 g Tris; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); 57,1 ml Essigsäure; 9.943 ml dH ₂ O; autoklaviert
Abstopp-Medium	30 ml FBS; 170 ml DMEM; 1 ml PS
Denaturierungs-Puffer	8 g NaOH; 1 L dH ₂ O
Einfrier-Medium	7,5 ml FBS; 40 ml DMEM; 5 ml DMSO
Trypsin-Lösung (100 ml)	0,5 g Trypsin (1:250), 100 ml DPBS
Wasch-Puffer	1,21 g Tris; 1 L dH ₂ O (pH 7,6)

2.1.2.5 Für Zellkultur verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Für Zellkultur verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Firma (Sitz)
Klonierungsringe	Wissenschaftliche Werkstätten im Theodor-Boveri-Institut (Würzburg, Deutschland)
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
KORASILON-Paste	Kurt Obermeier GmbH & Co. KG (Bad Berleburg, Deutschland)
Multi-Well-Platten (6, 12, 24, 48 Well)	Greiner Bio-One (Frickenhäuser, Deutschland)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Corning (New York, USA)
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

2.1.2.6 Programme und Datenbanken

Tabelle 6: Verwendete Programme und Datenbanken.

Programm/Datenbank	Verwendung	Entwickler/Firma (Sitz)/Internetseite
Amplifyer2 1.2.0	Analyse von Illumina MiSeq Daten	Prof. Dr. Sven Rahmann (Universität Duisburg-Essen, Deutschland)
BiSearch	Primerdesign und Größenbestimmung von Amplikons	http://bisearch.enzim.hu/
Chip Analysis Methylation Pipeline (ChAMP)	Auswertung der Infinium 450K-Methylierungs-Array-Daten	https://www.bioconductor.org/packages/3.7/bioc/vignettes/ChAMP/inst/doc/ChAMP.html
DNA methylation age calculator	Bestimmung des epigenetischen Alters	https://dnamage.genetics.ucla.edu/
Enrichr	Genset-Anreicherungs-Analysen	http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/
ENSEMBL-Datenbank	Lokalisierung von Amplikons	https://www.ensembl.org/index.html
GenAge-Datenbank	Datenbank altersassoziierter Gene	http://genomics.senescence.info/genes/
Genome Studio	Vorbereitung der EPIC-Methylierungs-Array-Daten für die epigenetische Uhr	Illumina (San Diego, USA)
Illumina Experiment Manager	Generierung des Sample Sheets für die MiSeq-Sequenzierung	Illumina (San Diego, USA)
Intas GDS	Visualisierung von Gelbildern	Intas (Göttingen, Deutschland)
PyroMark Assay Design v2.0	Assaydesign für bisulfit-konvertierte DNA	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Pyro Q-CpG 1.0.9	Auswertung der Pyrosequenzierungs-Daten	Biotage AB (Uppsala, Schweden)
R version 3.4.2	Statistische Daten-Auswertung	https://www.r-project.org/
SPSS Statistics 23-24	Statistische Daten-Auswertung	IBM (Armonk, USA)

2.1.3 Primersequenzen

Primer wurden bei Metabion (Martinsried, Deutschland) bestellt. Als Aufreinigungs-Methode wurde grundsätzlich Entsalzung gewählt, die biotinylierten Pyrosequenzierungs-Primer und die Primer für Deep Bisulfite Sequencing (DBS) wurden jedoch durch Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie aufgereinigt. Die lyophilisiert gelieferten Primer wurden in entsalztem Wasser gelöst. Die Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/μl wurde bei -20 °C gelagert. Vor der Verwendung der Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) wurden diese auf 10 pmol/μl verdünnt.

2.1.3.1 Für Pyrosequenzierung verwendete Primer

Tabelle 7: Primer, die zur DNA-Methylierungs-Analyse durch Pyrosequenzierung verwendet wurden.

Assay	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikonlänge	Anzahl der CpGs	
α-Satelliten-DNA	Forward*	TGTAAGTGGATATTTGGATTATTGG	~160 bp	4	
	Outer reverse	TTTCCAAAAAATCTTCAAAAAAAT			
	Inner reverse	AACAATTTCAAACACTCCATCAA			
	Sequenzierung	CTCAAAAATTTCTAAAAATACTTCTC			
ALU	Outer forward	TGTAATTTTAGTATTTTGGGAGG	~150 bp	3	
	Inner forward	GGGACACCGCTGATCGTATA [#] TTTTTATTAATAAATATAAATAATTAGT			
	Reverse	CCAAACTAAAATACAATAA			
	Universal*	GGGACACCGCTGATCGTATA			
	Sequenzierung	AATAACTAAAATTACAAC			
LINE-1	Forward	TTTTGAGTTAGGTGTGGGATA	~245 bp	4	
	Outer reverse	AATTTCTACATTTCCATCTAAAATAC			
	Inner reverse*	CTCACTAAAAAATACCAACAA			
	Sequenzierung	GTTAGGTGTGGGATATAGTT			
rDNA-Region 1	Forward*	GTTTTYTTGTGAGTTAGGTAGAGTTT	269 bp	9	
	Reverse	AAAAAACRTCCCAACCTCC			
	Sequenzierung	GGTTTATGTGGGGAGAGGTTGT			
rDNA-Region 2	Forward	GTGTTTTGGGTTGATTAGAGG	238 bp	5	
	Reverse*	CATCCCAAAACCAACCTCTCC			
	Sequenzierung 1	GGTTGATTAGAGGTT			13
	Sequenzierung 2	TTTTGGGGATAGGTG			
Sequenzierung 3	TTYGGGGGAGGTATATTTT	8			

* 5'-biotinylierter Primer; [#] Linker-Sequenz, die durch den biotinylierten Universal-Primer erkannt wird.

Während rDNA-Region 1 in einem Bereich distal des rDNA-Promotors liegt, deckt rDNA-Region 2 direkt das Upstream control element und das Core-Promotor-Element ab [190, 191].

2.1.3.2 Für Deep Bisulfite Sequencing verwendete Primer

Bei der Vorbereitung der Library für das Deep Bisulfite Sequencing (DBS) am Illumina MiSeq wurden zwei PCRs durchgeführt. In Abbildung 6 sind die Primer, die für die erste und die zweite PCR verwendet wurden, schematisch dargestellt.

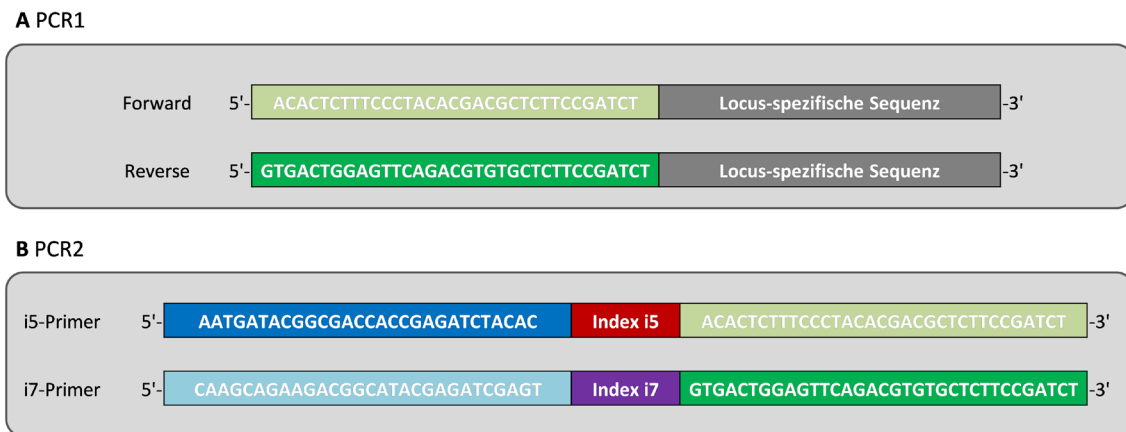


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Primer, die für Deep Bisulfite Sequencing verwendet wurden. (A) Die Primer für die erste PCR setzen sich aus für die Zielregionen spezifischen Sequenzen (grau) und universellen Adapterüberhängen (hell- und dunkelgrün) zusammen. **(B)** Die NEB-Index-Primer, die für die zweite PCR verwendet wurden, enthalten neben den Sequenzen, die zu den Überhängen der Primer der ersten PCR komplementär sind (hell- und dunkelgrün), spezifische Sequenzen zur Indexierung der Proben (rot und lila) und Adaptersequenzen, die das Template für die Flow cell kompatibel machen (hell- und dunkelblau).

Die Sequenzen der Primer, die in den ersten PCRs verwendet wurden, um Zielregionen in den Tumorsuppressor-Genen *ATM*, *BRCA1*, *RAD51C* und *TP53* zu amplifizieren, sind in Tabelle 8 dargestellt.

Für die zweite PCR wurden die NEBNext Multiplex Oligos verwendet. Das Kit enthält acht i5-Index-Primer und 12 i7-Index-Primer für die duale Indexierung. Die Sequenzen der NEBNext Multiplex Oligos werden in Tabelle 9 aufgeführt. Die duale Indexierung wird ermöglicht, indem an beide Enden der Amplikons einer Probe jeweils ein einzigartiger Index angefügt wird, der später sequenziert wird. Durch die Kombination aller zwölf i7-Primer mit jedem der acht i5-Primer können 96 verschiedene Proben einzigartig indiziert werden.

Tabelle 8: Primer, die für die erste PCR der DBS-Library-Präparation verwendet wurden.

Assay	Primer	Sequenz (5'-3')	Chromosomale Position*	Amplikonlänge	Anzahl analysierter CpGs	Promotor
ATM	Forward	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	11:108093647-	385 bp	32	ENSR00000044515
	Reverse	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	108094031:+1			
BRCA1	Forward	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	17:41277078-	410 bp	13	ENSR00000094515
	Reverse	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	41277487:-1			
RAD51C	Forward	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	17:56769832-	494 bp	39	ENSR00000096298
	Reverse	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	56770325:+1			
TP53	Forward	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	17:7590481-	379 bp	15	ENSR00000090892
	Reverse	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	7590859:-1			

* Die genomische Lokalisation beruht auf Ensembl GRCh37 release 92. Die Orientierung auf dem sense- oder antisense-Strang ist mit +1 oder -1 angegeben.

Tabelle 9: NEBNext Multiplex Primer, die für die zweite PCR der DBS-Library-Präparation verwendet wurden.

	Primer	NEB-Nummer	Sequenz (5'-3')	Erwarteter Index-Read
i5-Primer	NEBNext i501 Primer	#E7603A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T	TATAGCCT
	NEBNext i502 Primer	#E7604A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGCACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T	ATAGAGGC
	NEBNext i503 Primer	#E7605A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTATCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T	CCTATCCT
	NEBNext i504 Primer	#E7606A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCTGAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T	GGCTCTGA
	NEBNext i505 Primer	#E7607A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGCGAAGACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T	AGGCGAAG
	NEBNext i506 Primer	#E7608A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAATCTTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T	TAATCTTA
	NEBNext i507 Primer	#E7609A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGGACGTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T	CAGGACGT
	NEBNext i508 Primer	#E7610A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTACTGACACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T	GTACTIONG
i7-Primer	NEBNext i701 Primer	#E7611A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	ATTACTCG
	NEBNext i702 Primer	#E7612A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCGGAGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	TCCGAGA
	NEBNext i703 Primer	#E7613A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAATGAGCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	CGCTCATT
	NEBNext i704 Primer	#E7614A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAATCTCGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	GAGATTCC
	NEBNext i705 Primer	#E7615A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	ATTCAGAA
	NEBNext i706 Primer	#E7616A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAATTCGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	GAATTCGT
	NEBNext i707 Primer	#E7617A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTTCAGGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	CTGAAGCT
	NEBNext i708 Primer	#E7618A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCATTAGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	TAATGCGC
	NEBNext i709 Primer	#E7619A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATAGCCGGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	CGGCTATG
	NEBNext i710 Primer	#E7620A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCCGCGAGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	TCCGCGAA
	NEBNext i711 Primer	#E7621A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCGAGAGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	TCTCGCGC
	NEBNext i712 Primer	#E7622A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTATCGCTGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T	AGCGATAG

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zu den Experimenten mit Fibroblasten

2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Nach Eingang des Fruchtwassers wurde dieses zentrifugiert und der Überstand bis auf 0,5 ml abgenommen. Das Pellet wurde in Suspension gebracht und mit 4 ml Medium in eine 25 cm²-Zellkulturflasche pipettiert. Die Zellen hefteten sich innerhalb weniger Tag an. Die Zellen wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen in Chang-Medium in einem Inkubator bei 37 °C und mit 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Regelmäßig wurden das Adhärenzverhalten und die Zelldichte optisch kontrolliert. Wurde eine Konfluenz von 80 bis 90 % erreicht, wurden die Zellen passagiert. Alle dafür verwendeten Lösungen wurden zuvor bei 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Das Medium wurde abgenommen und der Zellrasen mit etwas DPBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde 1 ml Trypsinlösung hinzugegeben und drei bis vier Minuten inkubiert. Das in der Lösung enthaltene Trypsin baut hierbei die für die Anheftung verantwortlichen Proteine ab und durch EDTA wird das Calcium komplexiert, das für die Bindungen benötigt wird. Mit 4 ml Abstopp-Medium wurde die Enzymreaktion beendet. Um die Zellen von dem Trypsin-/Abstopp-Medium-Gemisch zu trennen, wurde die die Zellen enthaltende Flüssigkeit in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in wenigen ml Chang-Medium resuspendiert und die Zellen in Flaschen mit 4 ml vorgelegtem Chang-Medium pipettiert.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Fibroblasten können über einen langen Zeitraum in einem Flüssigstickstoff-Tank gelagert werden. Dafür erfolgte das Ablösen der Zellen wie oben beschrieben. Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in Einfrier-Medium gelöst und die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt. Das im Einfrier-Medium enthaltene DMSO verhindert die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses und dadurch die Zerstörung der Zellen. Pro 25 cm²-Zellkulturflasche wurden zwei Kryoröhrchen (je 2 ml) befüllt, die dann für etwa 24 Stunden bei - 80 °C und anschließend für lange Zeit in einem Flüssigstickstoff-Tank gelagert wurden. Um Zellen nach der Lagerung in Flüssigstickstoff wieder zu kultivieren, wurden die Kryoröhrchen zunächst im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Flaschen mit vorgelegtem Chang-Medium pipettiert.

2.2.1.3 Bestrahlung von Zellen

Am Tag vor der Bestrahlung der Zellen wurde das Medium gewechselt. Während des Transports wurden die Zellen in einer Styropor-Box mit Wärmekissen konstant auf 37 °C gehalten. Die Zellen wurden an einem medizinischen Siemens Primus L Linearbeschleuniger bei Raumtemperatur einer einzelnen Dosis von 2 oder 4 Gy ionisierender Strahlung (8 Gy/min) ausgesetzt.

2.2.1.4 Isolierung von Einzelzellen

Zellen wurden wie oben beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in DPBS resuspendiert. Einzelzellen wurden mit dem Zellsortier-System FACS Aria III isoliert und in eine 96-Well-Platte mit vorgelegtem DPBS sortiert. Anschließend wurden die Zellen noch am gleichen Tag für die weiteren Experimente verwendet.

2.2.1.5 Erstellung der Einzelzell-Klone – *in vitro* Alterung

Ausgehend von einzelnen Fibroblasten wurden Einzelzell-Klone aus nicht-bestrahlten Zellen und bestrahlten Zellen, 24 Stunden nachdem sie einer einzelnen Strahlendosis von 2 Gy ausgesetzt worden waren, erstellt. Dafür wurden zu Beginn etwa 100 bis 300 Zellen pro 100 mm-Petrischale ausplattiert. Die Zellen wurden kultiviert bis sich Kolonien bildeten. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass später Kolonien gepickt werden, die aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen sind, wurde die Kolonie-Entwicklung unter dem Mikroskop beobachtet und relevante Kolonien markiert. Einzelne Kolonien wurden dann mit Hilfe von Klonierungsringen und Silikon-Paste durch Trypsin wie oben beschrieben gelöst und in 48-Well-Platten umgesetzt. Durch das Umsetzen in 24-Well-Platten, 12-Well-Platten, 6-Well-Platten und schließlich in 25 cm²-Zellkulturflaschen wurden die Klone für mindestens 20 PVs expandiert. Die Zellen wurden somit durch Langzeit-Kultivierung gealtert. Anschließend wurden die Zellen jedes Klons für die Kryokonservierung und für die DNA-Isolierung geerntet.

2.2.1.6 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Die Isolierung der genomischen DNA aus Fibroblasten wurde mit dem Quick-gDNA MiniPrep Kit entsprechend des vom Hersteller vorgegebenen Protokolls durchgeführt. Zu Beginn wurde Genomic Lysis Buffer zu dem Zellpellet hinzugefügt, die Mischung gevortext und für einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der DNA basierte auf Säulchen.

Die Gewinnung der genomischen DNA aus den durch das Zellsortier-System vereinzelt Zellen erfolgte mit dem EZ DNA Methylation-Direct Kit. Dieses Kit ermöglicht neben der Isolierung gleichzeitig auch die Natriumbisulfit-Konvertierung der genomischen DNA.

2.2.2 Quantifizierung genomischer DNA

Für die Quantifizierung genomischer DNA wurde das Qubit dsDNA BR Assay Kit verwendet. Die DNA-Konzentration wurde entsprechend des vom Hersteller vorgegebenen Protokolls am Qubit-Fluorometer gemessen.

2.2.3 Natriumbisulfit-Konvertierung genomischer DNA

Die Standard-Methode zur Untersuchung der DNA-Methylierung ist die Sequenzierung bisulfit-konvertierter DNA. Die Behandlung denaturierter genomischer DNA mit Natriumbisulfit führt unter sauren Bedingungen zur Desaminierung (Abspaltung der Aminogruppe $-NH_2$) nicht methylierter Cytosine. Methylierte Cytosine sind durch die Methylgruppe vor der Desaminierung geschützt und bleiben unverändert [192]. Bei einer anschließenden PCR werden Uracile durch Thymin ersetzt, Cytosine bleiben erhalten (Abbildung 7).

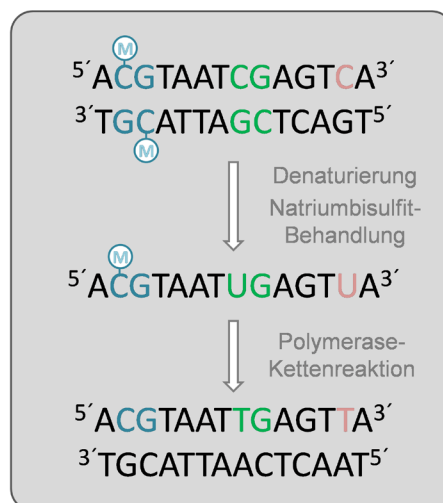


Abbildung 7: Konvertierung genomischer DNA durch Natriumbisulfit-Behandlung. Ursprünglich methylierte CpG-Dinukleotide sind blau, unmethylierte CpG-Dinukleotide grün und Nicht-CpG-Cytosine rot markiert. Durch Hitzedenaturierung wird die DNA einzelsträngig und die chemische Veränderung durch Natriumbisulfit wird möglich. Unmethylierte Cytosine werden durch hydrolytische Desaminierung zu Uracil, das dann in der PCR durch Thymin ersetzt wird. Methylierte Cytosine werden nicht konvertiert. Die ursprünglich komplementären DNA-Stränge sind infolge der Konvertierung der Basensequenz nicht mehr komplementär zueinander, weshalb die Konvertierung nur am Beispiel des oberen Stranges dargestellt ist. Abbildung erstellt nach [193].

Durch die Natriumbisulfit-Konvertierung genomischer DNA wird abhängig vom Methylierungs-Zustand der einzelnen Cytosine die DNA-Sequenz spezifisch verändert. Dies

erlaubt bei der folgenden Sequenzierung die Unterscheidung zwischen zuvor methylierten und nicht methylierten Cytosinen.

Die Bisulfit-Konvertierung der aus den Fibroblasten gewonnenen DNA-Proben sowie der DNA aus den Gesamtblutproben der WS-Patienten und der gesunden Kontrollen wurde mit dem EZ DNA Methylation Kit entsprechend des vom Hersteller angegebenen Protokolls durchgeführt. Nach der Denaturierung der DNA durch Inkubation in Verdünnungs-Puffer wurde das „CT Conversion Reagent“ hinzugegeben und die Reaktion über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Desulfonierung und die Aufreinigung der bisulfit-konvertierten DNA über Säulchen.

2.2.4 Locus-spezifische DNA-Methylierungs-Analyse durch Pyrosequenzierung

Pyrosequenzierung erlaubt die Quantifizierung des DNA-Methylierungs-Levels einzelner Amplikons. Pyrosequenzierung wurde verwendet, um die DNA-Methylierung verschiedener repetitiver Elemente zu untersuchen. Die verwendeten Primer werden in Tabelle 7 aufgelistet.

2.2.4.1 Prinzip der Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist eine Technik zur DNA-Sequenzierung, die auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Synthese beruht. Zunächst wird die durch eine PCR amplifizierte und biotinylierte DNA-Matrize an Streptavidin-Sepharose-Beads gebunden. Nach dem Waschen und Denaturieren an einer Vakuumstation wird in der Pyrosequenzierungs-Platte der Sequenzierungs-Primer an das einzelsträngige PCR-Amplikon hybridisiert. Die Enzyme DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase sowie die Substrate Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) und Luciferin werden hinzugegeben. Die vier Nukleotide (Desoxyribonukleosidtriphosphate, dNTPs) werden nacheinander, entsprechend der Dispensierungs-Reihenfolge, die von der zu analysierenden Sequenz abhängt, dispensiert. Ist das hinzugefügte Nukleotid komplementär zu der Base im Matrizen-Strang, wird es in den DNA-Strang eingebaut. Der Einbau des Nukleotids wird durch die DNA-Polymerase katalysiert und ist von der Abgabe eines Pyrophosphats (PP_i) begleitet. PP_i wird in der Anwesenheit von APS durch die ATP-Sulfurylase zu ATP konvertiert, das wiederum Energie für die von der Luciferase katalysierte Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin bereitstellt. Oxyluciferin generiert sichtbares Licht, das durch eine Kamera detektiert wird. Die Lichtsignale werden als Peaks im Pyrogramm dargestellt (Abbildung 8).

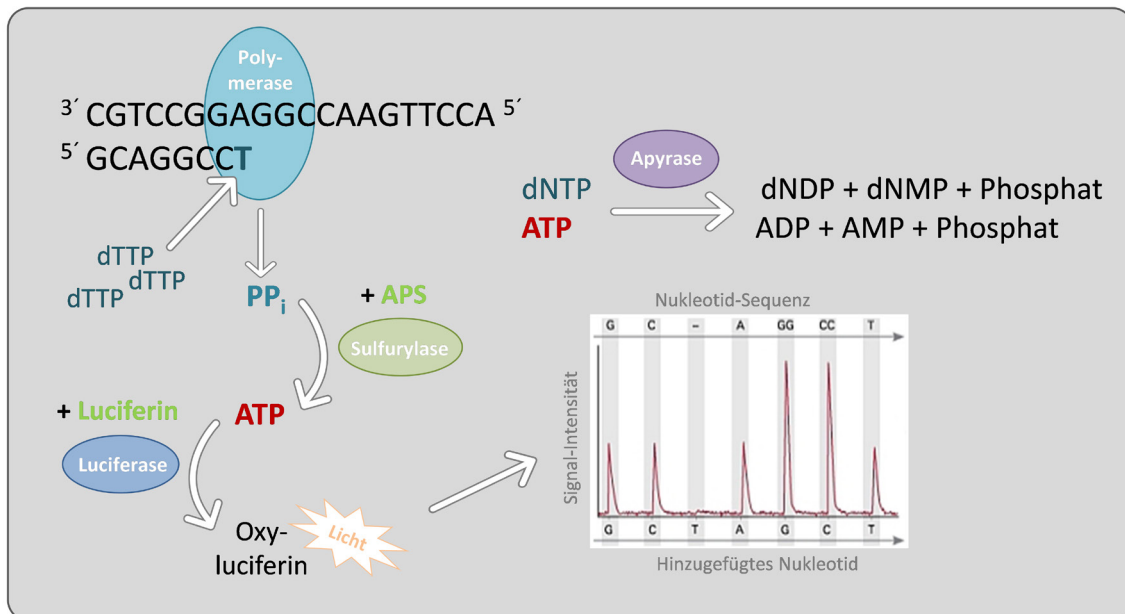


Abbildung 8: Prinzip der Pyrosequenzierung. Die Pyrosequenzierung basiert auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Synthese. Zu jedem Zeitpunkt ist nur eines der vier Nucleotide in der Reaktion vorhanden (z.B. dTTP). Da dTTP komplementär zum Matrizen-Strang ist, wird es von der DNA-Polymerase (in türkis dargestellt) eingebaut und PP_i wird abgegeben. PP_i wird von der Sulfurylase (grün) verwendet, um APS in ATP umzuwandeln, woraufhin die Luciferase (blau) Luciferin zu Oxy-luciferin konvertieren kann. Oxy-luciferin erzeugt sichtbares Licht, das durch eine Kamera detektiert wird und im Pyrogramm als Peak dargestellt wird. Nucleotide, die nicht eingebaut wurden, sowie überschüssiges ATP werden durch die Apyrase (lila) abgebaut. Abbildung erstellt nach [Internet-Referenz 7].

Da Desoxyadenosintriphosphat (dATP) die Konvertierung von Luciferin zu Oxy-luciferin begünstigen würde, wird stattdessen Desoxyadenosin- α -thiotriphosphat (dATP α S) verwendet. Dieses modifizierte Nucleotid wird nicht von der Luciferase erkannt, kann aber von der DNA-Polymerase in den DNA-Strang eingebaut werden. Die Menge an abgegebenen PP_i sowie die Menge an ATP ist äquimolar zur Anzahl der eingebauten Nucleotide. Daher ist jedes Lichtsignal proportional zur Menge eingebauter dNTPs. Das Enzym Apyrase entfernt konstant die übrigen dNTPs sowie überschüssiges ATP [194]. Das Prinzip der Pyrosequenzierung ist in dargestellt.

2.2.4.2 Protokoll

Für die Amplifikation der Zielregionen wurden PCRs durchgeführt. Die dafür verwendeten locus-spezifischen Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet. Für jeden Assay ist ein Primer (Forward oder Reverse) am 5'-Ende mit einem Biotin-Marker versehen. Um Amplikons für die α -Satelliten-DNA, ALU und LINE-1 zu generieren wurde zunächst eine Multiplex-PCR durchgeführt, in der alle drei Fragmente angereichert wurden. Das Pipettier-Schema der Multiplex-PCR ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Pipettier-Schema für die Multiplex-PCR.

Reagenz	Volumen für eine Reaktion (µl)
10xPCR Puffer mit MgCl ₂	2,5
dNTPs	0,5
10 µM Outer Forward ALU	0,3
10 µM Reverse ALU	0,3
10 µM Forward α-Satelliten-DNA	0,3
10 µM Outer Reverse α-Satelliten-DNA	0,3
10 µM Forward LINE-1	0,3
10 µM Outer Reverse LINE-1	0,3
FastStart Taq DNA Polymerase	0,2
Template	0,5
dH ₂ O	19,3
Σ	25

In anschließenden Nested-PCRs wurde jedes Amplikon separat erneut amplifiziert. In Tabelle 11 werden die Pipettier-Schemata für die Nested-PCRs für die α-Satelliten-DNA, ALU und LINE-1 sowie für die PCRs für die zwei rDNA-Regionen gezeigt.

Tabelle 11: Pipettier-Schemata der Nested-PCRs und der PCRs zur Amplifizierung der zwei rDNA-Regionen.

Reagenz	Volumen für eine Reaktion (µl)			
	rDNA-Region 1	rDNA-Region 2	α-Satelliten-DNA, LINE-1	ALU
10xPCR Puffer mit MgCl ₂	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTPs	0,5	0,5	0,5	0,5
10 µM Forward Primer	1	1	1,25	1
10 µM Reverse Primer	1	1	1,25	1
10 µM Universal Primer	-	-	-	1
FastStart Taq DNA Polymerase	0,2	0,2	0,2	0,2
Template	0,5	1	1*	1*
dH ₂ O	19,3	18,8	18,3	17,8
Σ	25	25	25	25

*Das Multiplex-PCR-Produkt wurde als Template benutzt.

Die PCR-Programme für die einzelnen Assays sind in Tabelle 12 dargestellt. Jedes Programm startet mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für fünf Minuten. Anschließend folgt eine Serie von 35 oder 40 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Temperaturschritten besteht. Im ersten Schritt werden die Reaktionen für 30 Sekunden auf 95 °C erhitzt. Dadurch werden die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Strängen der DNA-Doppelhelix unterbrochen. Im folgenden Schritt wird die Reaktion für 30 Sekunden auf die jeweilige assayspezifische Annealing-Temperatur herabgesetzt, so dass die Primer an die nun einzelsträngig vorliegende DNA binden können. Anschließend folgt ein 45 Sekunden langer

Schritt bei 72 °C, der der DNA-Polymerase die Synthese des zum Template komplementären DNA-Strangs erlaubt. Abschließend ermöglicht ein finaler Schritt bei 72 °C für sieben Minuten die Abschluss-Elongation der PCR-Reaktionen.

Tabelle 12: PCR-Programme der PCRs, die zur Amplifikation der repetitiven Elemente verwendet wurden.

Amplifikationsschritt	Dauer	Multiplex-PCR	Nested PCRs			rDNA		
			α -Satelliten-DNA	ALU	LINE-1	Region 1	Region 2	
1	Anfangs-Denaturierung	5 min						95 °C
2	Denaturierung	30 s						95 °C
3	Annealing	30 s	57 °C	57 °C	52 °C	60 °C	58 °C	57 °C
4	Elongation	45 s						72 °C
5	Abschluss-Elongation	7 min						72 °C
Anzahl der Zyklen			35	40	40	35	35	40

Anzahl der Zyklen bedeutet Anzahl der Wiederholungen der Schritte 2 bis 4.

Um den Erfolg der Amplifikation und die Größe der amplifizierten Fragmente zu kontrollieren, wurden die PCR-Produkte durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Um ein 1,5-prozentiges Agarosegel herzustellen, wurden 1,5 g peqGold Universal Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht. Für die Detektion der DNA im Agarosegel wurden 5 μ l des Fluoreszenzfarbstoffs HDGreen Plus hinzugefügt. HD Green Plus interkaliert in die DNA und kann durch Anregung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Vier μ l des PCR-Produktes wurden mit 6 μ l 1x DNA Loading Dye gemischt und in die Taschen des bei Raumtemperatur fest gewordenen Agarosegels pipettiert. Die Laufzeit betrug zwischen zehn und 20 Minuten bei einer Spannung von 150 bis 170 Volt. Der 100 bp GeneRuler DNA Ladder Mix wurde als Größenstandard verwendet.

Die Pyrosequenzierung wurde mit dem PyroMark Gold Q96 CDT-Kit an einem PyroMark Q96 MD Pyrosequenzierungs-System durchgeführt. Zunächst wurde die Pyrosequenzierungs-Platte vorbereitet. Pro Probe wurden 11,5 μ l Annealing-Puffer und 0,5 μ l Sequenzierungs-Primer gemischt und in die Pyrosequenzierungs-Platte pipettiert. Um die DNA-Matrize an Streptavidin-Sepharose-Beads zu binden, wurde eine Mischung aus Bindungs-Puffer, Wasser und Beads vorbereitet. Pro Probe wurden 40 μ l Bindungs-Puffer, 28 μ l Wasser und 2 μ l der Beads gerechnet. In einer 96-Well-Platte wurden zu 10 μ l jeder PCR-Reaktion je 70 μ l der Mischung gegeben. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und für fünf Minuten bei 1.400 rpm gevortext, um das biotinylierte PCR-Produkt an die Beads zu binden. Anschließend

wurde der Kopf der angeschalteten Vakuumstation in die PCR-Platte gesenkt, um die Beads anzusaugen. In weiteren Schritten wurde der Kopf nacheinander jeweils für zehn bis 15 Sekunden in 70 % Ethanol, in Denaturierungs-Puffer und in Wasch-Puffer getaucht. Der Denaturierungsschritt dient dem Entfernen der nicht-biotinylierten PCR-Produkte. Um die Beads, an die das PCR-Produkt gebunden ist, in die Platte mit der Mischung, die den Sequenzierungs-Primer enthält, zu geben, wurde der Kopf der Vakuumstation über die Pyrosequenzierungs-Platte gehalten und das Vakuum ausgeschaltet. Die Pyrosequenzierungs-Platte wurde für zwei Minuten bei 80 °C erhitzt und konnte anschließend mehrere Minuten bei Raumtemperatur abkühlen. Dieser Schritt erlaubt dem Sequenzierungs-Primer an die durch die Beads gefangenen biotinylierten DNA-Stränge zu binden. Die vier Nukleotide, die Enzym-Mischung und die Substrat-Mischung wurden entsprechend der von der Pyrosequenzierungs-Software angegebenen Volumina in die Dispensierungs-Spitzen pipettiert. Nachdem auf eine fehlerfreie Dispensation getestet worden war, wurde die Pyrosequenzierungs-Platte in den PyroMark 96 MD Pyrosequenzierer gelegt und der Lauf wurde gestartet.

2.2.4.3 Datenauswertung

Für die Auswertung der Pyrosequenzierungs-Daten wurde die PyroMark Q-CpG-Software verwendet. Weitere statistische Analysen wurden mit der IBM SPSS-Software Version 23 und 24 durchgeführt. Um zu testen, ob sich der Mittelwert des Ausgangskultur-Duplikats von der DNA-Methylierung der gealterten Klone unterscheidet, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für eine Stichprobe angewendet. Mit diesem nicht-parametrischen Einstichprobentest kann überprüft werden, ob eine Stichprobe von einem erwarteten Wert abweicht. Der Mann-Whitney-U-Test ist ebenfalls ein nicht-parametrischer Test und wurde angewendet, um auf signifikante Unterschiede zwischen den gealterten Klonen und den bestrahlten Klonen oder zwischen WS-Patienten und Kontrollen zu testen. Wurden die Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen verglichen, wurde der Analysis of variance (ANOVA)-Test angewendet. Die Spearman-Korrelation wurde verwendet, um die Stärke einer Assoziation zwischen zwei Variablen zu messen.

2.2.5 Genomweite DNA-Methylierungs-Analyse durch Infinium Methylierungs-Arrays

Im Gegensatz zu Ansätzen, in welchen einzelne spezifische Loci in einer geringen Anzahl von Genen untersucht werden, ermöglicht eine microarray-basierte Technologie eine Analyse auf genomweiter Ebene. Die Illumina Infinium HumanMethylation BeadChips (im Folgenden als Infinium Methylierungs-Arrays bezeichnet) erlauben DNA-Methylierungs-Analysen mit genomweiter Abdeckung und mit einer Auflösung auf Einzelnukleotid-Ebene.

2.2.5.1 Prinzip der Illumina Infinium Methylierungs-Array-Technologie

Die Infinium High Density (HD) Technologie der Infinium Methylierungs-Arrays basiert auf Beads mit langen Sonden, die spezifisch für den Zielbereich sind und so konzipiert wurden, dass die DNA-Methylierungs-Level von individuellen CpG-Stellen untersucht werden können [195]. Beads binden Oligonukleotide, die sich aus einer 23 bp langen Adresssequenz und einer 50 bp langen Sondensequenz zusammensetzen. Die Adresssequenzen ermöglichen die physikalische Lokalisierung der Sonden auf dem BeadChip. Die Sondensequenzen sind so konstruiert, dass sie komplementär zu spezifischen 50 bp langen Regionen der bisulfit-konvertierten DNA sind und mit dem 3'-Ende an einer CpG-Stelle enden [196]. Nach der Hybridisierung der Sonden an die bisulfit-konvertierte DNA kommt es je nach Sonden-Typ und Methylierungs-Zustand des jeweiligen CpGs zum Einbau eines Nukleotids, das durch ein Fluoreszenzsignal markiert ist, oder nicht. Durch die Messung des Fluoreszenzsignals kann die C/T-Konvertierung so genotypisiert werden.

Für die Infinium HD-Plattform wurden zwei Arten von Sonden-Design angewendet. Die Infinium I und II Assays wurden kombiniert, um die Analyse einer höheren Anzahl an CpG-Stellen zu ermöglichen. Der Vorteil der Typ I-Sonden ist, dass ihr Design die Messung von DNA-Methylierungs-Leveln in CpG-reichen Regionen ermöglicht. Typ II-Sonden können dagegen für Regionen mit geringer CpG-Dichte konstruiert werden und wurden entwickelt, um eine bessere Abdeckung des Genoms zu erreichen. Im Vergleich zu den Sonden des Infinium I Assays weisen sie eine höhere Variabilität der Methylierungs-Werte und eine schlechtere Reproduzierbarkeit in Replikaten auf. Das Prinzip der Sonden der beiden Infinium Assays wird in den nächsten Absätzen genauer erklärt.

Bei dem Infinium I Assay wird jede CpG-Stelle von zwei Sonden-Typen repräsentiert. Diese unterscheiden sich am 3'-Ende in ihrer Sequenz. Die Sequenz der einen Sonde endet mit einem Adenin (A), das eine Basenpaarung mit Thymin (T) eingehen kann, und ist somit

komplementär zur unmethylierten CpG-Stelle (U-Sonde). Die Sequenz der anderen Sonde hat am 3'-Ende dagegen ein Guanin (G), das Wasserstoffbrücken mit Cytosin (C) ausbilden kann, und ist dadurch komplementär zum methylierten Zustand der CpG-Stelle (M-Sonde) (Abbildung 9).

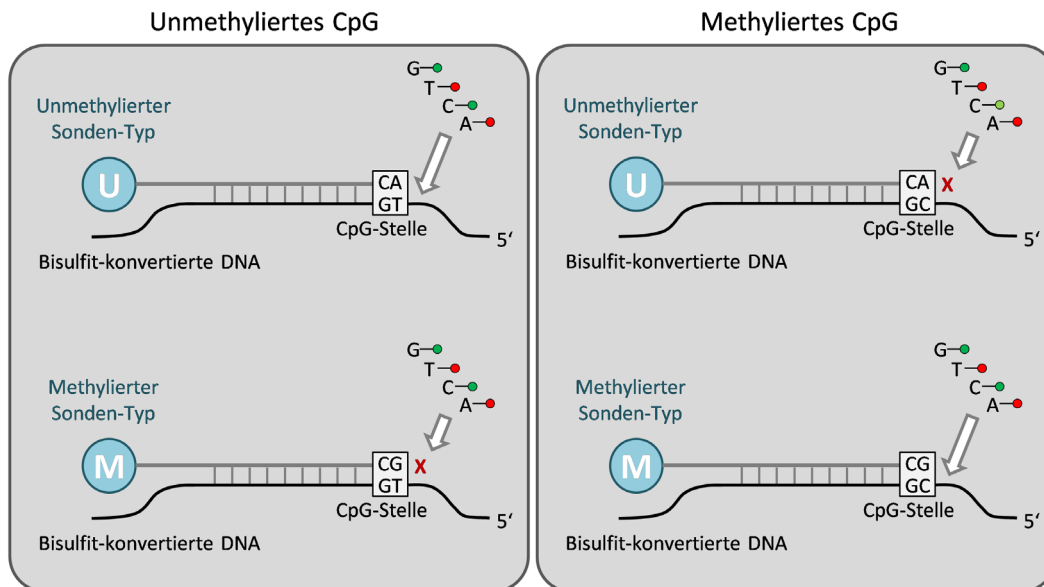


Abbildung 9: Prinzip des Infinium I Assays. Jede CpG-Stelle wird von einem unmethylierten und einem methylierten Sonden-Typ repräsentiert. Abbildung erstellt nach [195].

Ist die CpG-Stelle unmethyliert, kann die U-Sonde komplementär binden, woraufhin die Verlängerung um ein fluoreszenz-markiertes Nucleotid möglich ist und ein Signal detektiert werden kann. Mit der M-Sonde hat die unmethylierte CpG-Stelle dagegen eine Nichtübereinstimmung eines Nucleotids wodurch die Verlängerung um ein fluoreszenz-markiertes Nucleotid gehemmt ist und ein geringes Signal auf dem Array entsteht. Ist die zu analysierende CpG-Stelle methyliert, passiert das Gegenteil. Die M-Sonde ermöglicht die Verlängerung um ein fluoreszenz-markiertes Nucleotid, die U-Sonde zeigt dagegen ein schwaches Signal. Die Unterscheidung der einzelnen Base (ob an der CpG-Stelle nach der Bisulfit-Konvertierung ein C oder ein T vorliegt) basiert somit darauf, dass die DNA-Polymerase eine Sequenz nicht um ein Nucleotid verlängern kann, wenn am 3'-Ende eine Fehlpaarung vorliegt. Der Einbau des Nucleotids am 3'-Ende der Sonde richtet sich nach der ersten Base, die der CpG-Stelle im Matrizen-Strang folgt. Kommt es zur Verlängerung um ein Nucleotid, wird unabhängig vom Sonden-Typ an einem CpG-Locus das gleiche Nucleotid eingebaut. Dadurch werden die Signale für den methylierten und den unmethylierten Zustand im gleichen Farbkanal (rot oder grün) erzeugt.

Bei dem Infinium II Assay gibt es nur eine Sondensequenz pro CpG-Stelle. Das 3'-Ende der Sonde endet mit einem Cytosin, das komplementär an das Guanin der CpG-Stelle im Matrizenstrang bindet. Bei der Verlängerung um ein Nukleotid wird das 3'-Ende der Sonde vervollständigt und es kommt zum Einbau eines fluoreszenz-markierten Nukleotids (Abbildung 10).

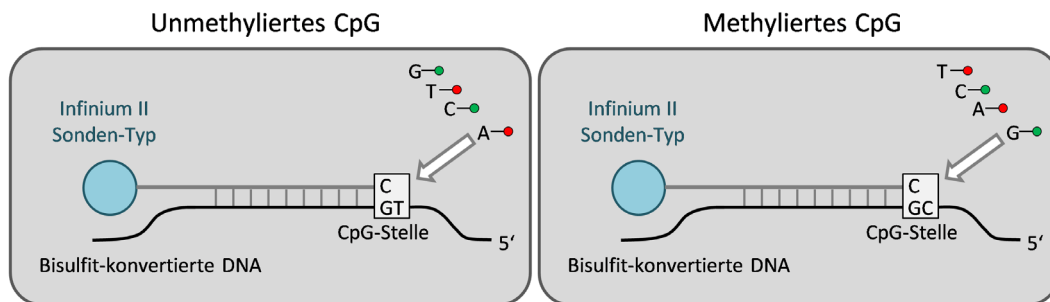


Abbildung 10: Prinzip des Infinium II Assays. Für jede CpG-Stelle gibt es nur einen Sonden-Typ. Abbildung erstellt nach [195].

Ist die CpG-Stelle unmethyliert, wird ein mit rotem Fluoreszenzfarbstoff markiertes ddATP eingebaut. Bei einer methylierten CpG-Stelle wird ein mit grünem Fluoreszenzfarbstoff gelabeltes ddGTP eingebaut. Die Signale für den methylierten und den unmethylierten Zustand werden beim Infinium II Assay folglich in beiden Farbkanälen erzeugt.

Das Level der DNA-Methylierung an einer bestimmten CpG-Stelle wird auch als Beta-Wert (β -Wert) bezeichnet und wird mit folgender Formel ermittelt:

$$\beta = \frac{\text{Intensität des methylierten Signals}}{(\text{Intensität des unmethylierten Signals} + \text{Intensität des methylierten Signals} + 100)}$$

Der β -Wert stellt somit das Verhältnis des methylierten Signals zum Signal des gesamten Locus dar. Während ein β -Wert von 0 eine vollständig unmethylierte CpG-Stelle repräsentiert, liegt bei einem β -Wert von 1 eine voll methylierte CpG-Stelle vor.

2.2.5.2 Generationen der Infinium Methylierungs-Arrays

Die Infinium Technologie zur DNA-Methylierungs-Analyse wurde 2008 mit der ersten Generation der Infinium Methylierungs-Arrays, dem Illumina Infinium Human Methylation 27K BeadChip, eingeführt. Der Infinium 27K-Methylierungs-Array verwendet nur den Infinium I Assay und deckt 27.578 Loci ab. Es wurden vor allem CpG-Stellen innerhalb von Promotorregionen von 14.475 Genen erfasst. Wegen der etablierten Assoziation zwischen der DNA-Methylierung in Promotorregionen und der Genexpression wurden bevorzugt CpG-Inseln abgedeckt [196].

Der Infinium 27K-Methylierungs-Array wurde 2011 von einer neueren Version abgelöst. Der Illumina Infinium Human Methylation 450K BeadChip deckt insgesamt 485.577 Loci des menschlichen Genoms ab (482.421 CpG-Stellen, 3.091 nicht-CpG-Stellen und 65 zufällige Einzelnukleotid-Polymorphismen) ab und verwendet neben dem Infinium I Assay auch den Infinium II Assay. Der neue Inhalt des Infinium 450K-Methylierungs-Arrays wurde nach Konsultation eines Konsortiums aus 22 Epigenetik-Forschern, die 19 Institutionen weltweit vertraten, ausgewählt und umfasste ein vielfältigeres Set an genomischen Kategorien. Es wurden 21.231 von 21.474 UCSC RefSeq-Genen [Internet-Referenz 8] mit durchschnittlich 17 CpGs pro Gen abgedeckt. Um eine umfassende Untersuchung der DNA-Methylierung der verschiedenen Gen-Regionen zu ermöglichen, wurden die Sonden, die innerhalb von Genregionen liegen, in mehrere Unterkategorien aufgeteilt. Promotorregionen wurden in zwei, sich gegenseitig ausschließende Kategorien eingeteilt: 200 bp und 1.500 bp Blocks upstream der Transkriptions-Startstelle (TSS200, TSS1500). Die 5'- und 3'- untranslatierten Regionen, das erste Exon und der Genkörper wurden ebenfalls getrennt erfasst. Außerdem werden CpG-Inseln, -Shores und -Shelves, FANTOM4-Promotoren, die Haupthistonekomplex-Region und einige Enhancer-Regionen abgedeckt [195].

Um eine noch höhere Abdeckung und vor allem die Abdeckung von distalen regulatorischen Elementen zu erreichen, wurde 2017 der Infinium 450K-Methylierungs-Array durch den Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip ersetzt. Dieser enthält 90 % des Inhalts seines Vorgängers plus 413.743 CpGs. Insgesamt sind auf dem Infinium EPIC-Methylierungs-Array 866.836 Cytosine des menschlichen Genoms abgedeckt (863.904 CpG-Stellen, 2.932 nicht-CpG-Stellen, 59 Einzelnukleotid-Polymorphismen und 636 Sonden für proben-abhängige und proben-unabhängige Qualitätskontrollen). Die zusätzlichen CpGs liegen vor allem in Regionen, die durch das FANTOM5- und das ENCODE-Projekt als potentielle Enhancer identifiziert wurden [197, 198].

2.2.5.3 Protokoll

Die genomweite DNA-Methylierungs-Analyse mit den Infinium Methylierungs-Arrays (450K und EPIC) wurde nach dem Protokoll, das detailliert im „Illumina Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide“ [Document # 15019519 v01; Internet-Referenz 9] beschrieben ist, durchgeführt. Die wichtigsten Schritte sind in Abbildung 11 dargestellt.

Als Vorbereitung auf einen Amplifikationsschritt wurde die bisulfit-konvertierte DNA denaturiert und neutralisiert. Vier μl der bisulfit-konvertierten DNA (150 ng) wurden in die

Reaktion zur Amplifikation des gesamten Genoms eingesetzt. Die denaturierte DNA wurde isothermisch über Nacht amplifiziert. Dabei erhöhte sich einheitlich die DNA-Menge der DNA-Proben um mehrere tausendfach, ohne einen signifikanten Amplifikations-Bias einzuführen. Die amplifizierten Produkte wurden enzymatisch fragmentiert. Nach einer Isopropanol-Präzipitation wurde die fragmentierte DNA durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert und anschließend in Hybridisierungs-Puffer resuspendiert. Die DNA-Proben wurden auf die BeadChips aufgetragen. Zwölf (Infinium 450K-Methylierungs-Array) beziehungsweise acht (Infinium EPIC-Methylierungs-Array) Proben konnten pro BeadChip prozessiert werden (Abbildung 11 oben).

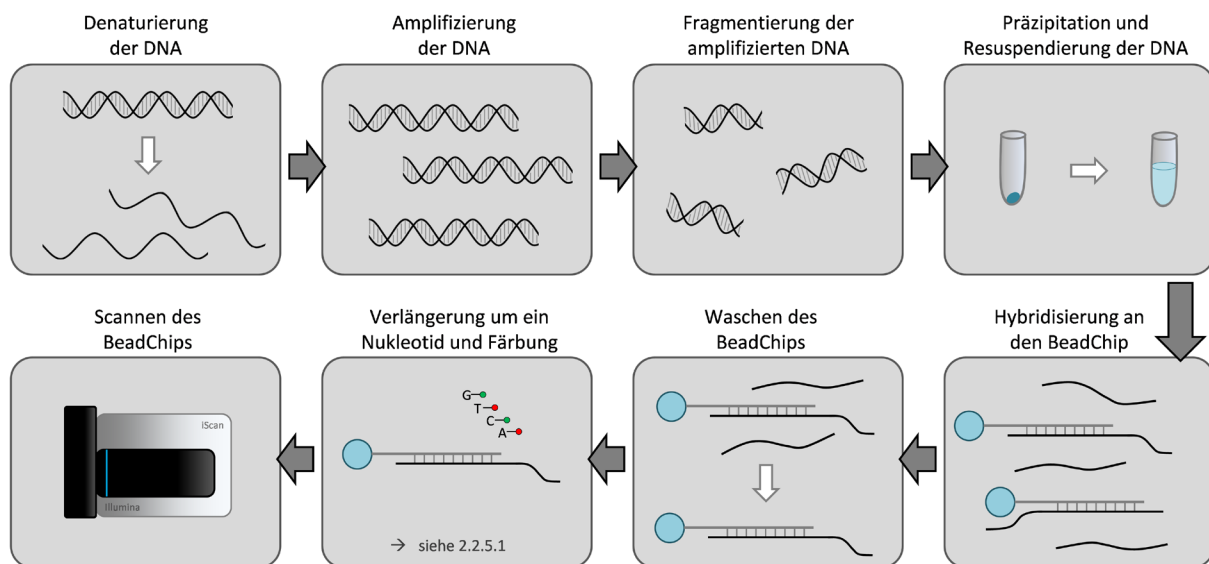


Abbildung 11: Arbeitsschritte des Infinium Methylierungs-Array-Protokolls. Nach der Amplifizierung des gesamten Genoms wurde die DNA enzymatisch fragmentiert, präzipitiert und in Hybridisierungs-Puffer resuspendiert. Es folgt die Hybridisierung der DNA auf die BeadChips. Abbildung erstellt basierend auf dem Illumina Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide [Internet-Referenz 9].

Durch Inkubation im Hybridisierungs-Ofen über Nacht wurden die Proben auf die BeadChips hybridisiert. Während der Hybridisierung binden die DNA-Fragmente die locus-spezifischen 50 bp langen Oligomere (Sondensequenzen der Infinium I und II Assays). Durch einen Waschschrift wurde nicht und unspezifisch hybridisierte DNA entfernt. In Kapillaren-Durchfluss-Kammern wurde der BeadChip der Verlängerung um ein Nukleotid und der Färbung unterzogen. Zum Schluss wurden die BeadChips ummantelt und am Illumina iScan unter Verwendung eines Lasers, der die Fluorophore der markierten eingebauten Nukleotide anregt, gescannt (Abbildung 11 unten). Der Scanner nimmt hochaufgelöste Bilder des Lichts, das von den Fluorophoren emittiert wird, auf und es wurde für jede Probe je eine Datei für den roten und den grünen Farbkanal erstellt.

2.2.5.4 Datenauswertung

2.2.5.4.1 Infinium 450K-Methylierungs-Array

Die Infinium 450K-Methylierungs-Array-Daten wurden mit der Chip Analysis Methylation Pipeline (ChAMP), die auf R basiert und für die Analyse von Illumina Infinium Methylation BeadChip-Daten entwickelt wurde, ausgewertet [199]. Die Schritte zur Auswertung der Daten sind in Abbildung 12 dargestellt.

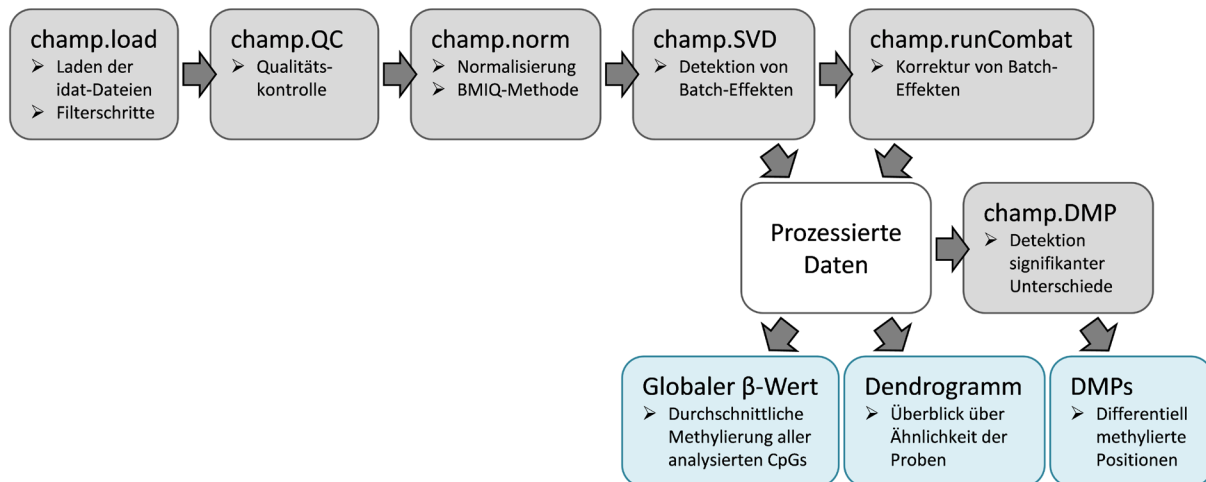


Abbildung 12: Pipeline zur Auswertung der Infinium 450K-Methylierungs-Array-Daten. Die von der Chip Analysis Methylation Pipeline (ChAMP) verwendeten Schritte sind grau markiert und die im Ergebnis-Teil präsentierten Ergebnisse sind blau hinterlegt.

Die Daten wurden als idat-Dateien geladen. Die `champ.load`-Funktion verwendet `minfi` [200] und führt mehrere Filterschritte durch. Sonden mit Detektions-p-Werten $> 0,01$, Sonden mit weniger als drei Beads pro Sonde in mindestens 5 % der Proben, alle Nicht-CpG-Sonden sowie Sonden, die mit einem Einzelnukleotid-Polymorphismus in Verbindung stehen (basierend auf den Empfehlungen aus [201]), Multi-Hit-Sonden und Sonden, die auf den X- und Y-Chromosomen liegen, wurden herausgefiltert.

Die anschließende Qualitätskontrolle (quality control, QC) ist ein wichtiger Prozess, um zu überprüfen, ob die Datensets für die nachfolgenden Analysen geeignet sind. Mit der `champ.QC`-Funktion werden drei Plots generiert, die eine explorative Analyse ermöglichen. Durch den Multidimensional Scaling Plot (`mdsPlot`) wird die Ähnlichkeit der Proben basierend auf den Top 1.000 variabelsten Sonden visualisiert. Der `densityPlot` zeigt die Verteilungen der β -Werte für jede Probe. Das Dendrogramm ist eine graphische Darstellung der Cluster-Bildung aller Proben. Bei der Qualitätskontrolle können Proben erkannt werden, die stark von den anderen Proben abweichen und keine gute Qualität aufweisen.

Eine Schwierigkeit der Infinium Methylierungs-Arrays ist, dass Sonden aus zwei verschiedenen Designs verwendet werden. Nach den Qualitätskontrollschritten wurde daher die voreingestellte Methode zur Typ-2 Sonden Korrektur, die β -mixture quantile (BMIQ)-Methode, für die Normalisierung verwendet [202].

Batch-Effekte wurden mit der singular value decomposition (SVD)-Methode detektiert. Die SVD wird verwendet, um die Hauptkomponenten mit biologischen und technischen Faktoren zu korrelieren. Dies ermöglicht die Entscheidung, ob es Batch-Effekte oder Störfaktoren gibt, die beachtet werden müssen. Für die Korrektur detektierter Batch-Effekte wurde die ComBat-Methode (implementiert in dem Surrogate Variable Analysis (SVA)-Paket) angewendet [203]. Der ComBat-Algorithmus verwendet eine empirische Bayes-Methode, die dafür entwickelt wurde technische Variation in Daten zu berichtigen.

Um die globale DNA-Methylierung anhand der Infinium 450K-Methylierungs-Array-Daten zu schätzen, wurde ein globaler β -Wert über alle in die Analyse mit eingeschlossenen CpG-Stellen ermittelt. Um einen ersten Überblick über die Ähnlichkeit der DNA-Methylierungs-Profile der untersuchten Proben zu bekommen, wurde für jeden Vergleich ein Dendrogramm erstellt. Ein Dendrogramm ist die graphische Darstellung der Aufteilung von Elementen einer hierarchischen Cluster-Analyse in Form einer Baumstruktur. Daher wird es auch als Baumdiagramm bezeichnet. Die Proben werden auf der horizontalen Achse dargestellt, die vertikale Achse dient als Skala des Distanzindex. Weisen Elemente eine hohe Ähnlichkeit beziehungsweise eine geringe Distanz zueinander auf, werden sie bei einem niedrigen Distanzindex fusioniert. Je höher der Distanzindex bei der Fusionierung, desto weniger ähnlich sind sich die Proben [204].

Um differentiell methylierte Positionen (DMPs) zu identifizieren, wurde die `champ.DMP`-Funktion verwendet, die das `limma`-Paket implementiert, um die p-Werte für die differentielle DNA-Methylierung zu berechnen, indem es ein lineares Modell anwendet [205, 206]. Alle p-Werte wurden nach der Benjamini-Hochberg-Methode für multiples Testen korrigiert [207].

Die DNA-Methylierungs-Analysen wurden für Fibroblastenlinie 1 und 2 jeweils in zwei Setups durchgeführt: der Vergleich der Ausgangskultur mit den gealterten Klonen zielte auf DNA-Methylierungs-Veränderungen ab, die mit der *in vitro* Alterung assoziiert werden können. Der Vergleich der gealterten Klone gegen die bestrahlten Klone sollte die mit der Bestrahlung in Verbindung stehenden Veränderungen der DNA-Methylierung aufdecken.

Eine Genset-Anreicherungs-Analyse wurde mit Hilfe des öffentlich zugänglichen Tools Enrichr durchgeführt [208, 209]. Listen von Genen, die von den DMPs abgedeckt sind, dienten als Input. Das Genset der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-Signalwege wurde verwendet, um angereicherte Signalwege zu detektieren. Termini wurden als angereichert betrachtet, wenn sie einen nach der Benjamini-Hochberg-Methode für die Korrektur für multiples Testen adjustierten p -Wert $< 0,01$ aufwiesen. Angereicherte Termini wurden nach dem Combined Score (CS) geordnet. Dieser wird durch folgende Formel berechnet: $CS = \log(p) * z$, wobei p der p -Wert ist und z der z -Wert, der berechnet wird, um die Abweichung vom Erwartungswert zu beurteilen.

Um unabhängig vom Enrichr-Tool zu ermitteln, ob ein Überlapp zwischen einem einzelnen Genset (z. B. in einer bestimmten Datenbank aufgelistete Gene) mit einem Genset aus dieser Studie signifikant ist, wurde der Fisher's-Exact-Test mit R durchgeführt.

Im Rahmen einer Kollaboration mit Dr. Steve Horvath wurde die neu entwickelte epigenetische Uhr, die als „skin & blood clock“ bezeichnet wird, verwendet. Diese basiert auf 391 CpGs und kann auf verschiedene Zellen, einschließlich Fibroblasten, Keratinozyten, Mundschleimhaut und Blutzellen, angewendet werden [101]. Das geschätzte Alter wird in Jahren angegeben und wurde mit 365 multipliziert, um Tage als Zeiteinheit zu erhalten. Um zu testen, ob sich der Mittelwert des Ausgangskultur-Duplikats von dem epigenetischen Alter der gealterten Klone unterscheidet, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für eine Stichprobe angewendet. Unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Test wurde auf signifikante Unterschiede zwischen den gealterten Klonen und den bestrahlten Klonen getestet. Um auf die Gleichheit der Varianzen zweier Gruppen zu prüfen, wurde der Levene-Test herangezogen.

2.2.5.4.2 Infinium EPIC-Methylierungs-Array

Um die Infinium EPIC-Methylierungs-Array-Daten für den Online-Kalkulator („DNA methylation age calculator“), eine frei zugängliche Software der epigenetischen Uhr, vorzubereiten, wurde die Software Genome Studio für das Subtrahieren des Hintergrundsignals und die Normalisierung an die internen Kontrollen herangezogen.

Die epigenetische Uhr („Horvath's clock“), die das epigenetische Alter basierend auf 353 CpG-Stellen berechnet, wurde verwendet, um das DNA-Methylierungs-Alter der Gesamtblutproben der WS-Patienten und der Kontrollen zu bestimmen.

Der verwendete Online-Kalkulator erlaubt eine erweiterte Analyse für Daten, die basierend auf Blutproben gewonnen wurden. Im Output dieser Analyse sind verschiedene Werte für das

epigenetische Alter (in Jahren) und für die Beschleunigung des epigenetischen Alterns sowie Schätzungen der Blutzell-Werte enthalten. Mathematische Hintergründe und Informationen zur Software werden in Horvath *et al.*, 2013 [99] detailliert beschrieben, die wichtigsten Werte werden im Folgenden erklärt.

Der Anteil der verschiedenen Blutzellen wurde basierend auf den Infinium Methylierungs-Array-Daten unter der Verwendung von zwei verschiedenen Methoden geschätzt. Die Methode nach Houseman basiert auf DNA-Methylierungs-Signaturen von aufgereinigten Leukozytenproben und dient zur Bestimmung der Anteile an CD8+ T- und CD4+ T-Zellen sowie an natürlichen Killerzellen, B-Zellen und Granulozyten [210]. Der Anteil der erschöpften CD8+ T-Zellen und der naiven CD8+ T-Zellen wurde durch die Option der erweiterten Analyse der Software der epigenetischen Uhr ermittelt [99].

Die erste Messung, die allgemein als Beschleunigung des Alterns (Age acceleration, AgeAccel) bezeichnet wird, wird als universelle Messung des epigenetischen Alters betrachtet, da sie auf fast alle Gewebe- und Zelltypen angewendet werden kann. AgeAccel wird folgendermaßen berechnet: Für die Kontrollproben wurde das epigenetische Alter (DNAmAge) auf das chronologische Alter regressiert. Das daraus resultierende Modell wurde verwendet, um das epigenetische Alter jeder Probe vorherzusagen. Die Messung AgeAccel wird als Differenz zwischen dem beobachteten Wert und dem vom Modell vorhergesagten Wert für das epigenetische Alter definiert. Ein hoher positiver Wert für AgeAccel bedeutet, dass das beobachtete epigenetische Alter höher ist als das, das basierend auf den Kontrollen vorhergesagt wurde. AgeAccel korreliert relativ schwach mit den Blutzell-Zahlen, hängt aber noch mit ihnen zusammen.

Die zwei weiteren Messungen zur Beschleunigung des epigenetischen Alterns können nur berechnet werden, wenn Daten, die auf peripherem Blut basieren, vorhanden sind.

Die Messung zur Beschleunigung des intrinsischen epigenetischen Alterns (intrinsic epigenetic age acceleration, IEAA) wurde definiert, um den Effekt der Blutzell-Zusammensetzung zu eliminieren. IEAA misst die reinen epigenetischen Effekte des Alterns, die nicht durch Unterschiede in den Blutzell-Zahlen beeinflusst werden. Dieser Wert ist definiert als Residuum, das aus einem multivariaten Regressionsmodell resultiert, das das epigenetische Alter an das chronologische Alter und an verschiedene Blutzell-Werte (naïve CD8+ T-Zellen, erschöpfte CD8+ T-Zellen, Plasmablast-Zellen, CD4+ T-Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten und Granulozyten) regressiert.

Die Messung zur Beschleunigung des extrinsischen epigenetischen Alterns (extrinsic epigenetic age acceleration, EEAA) zielt darauf ab das epigenetische Altern in Komponenten zu messen, die mit dem Immunsystem zusammenhängen. EEAA wird durch die folgenden drei Schritte definiert: zunächst wurde das epigenetische Alter nach Hannum *et al.* basierend auf 71 CpGs berechnet [92]. Anschließend wurde die Beteiligung der Blutzelltypen an der Schätzung des Alters erhöht, indem ein gewichteter Durchschnitt der Berechnung von Hannum mit drei Zelltypen, von denen bekannt ist, dass sie sich mit dem Alter ändern (naïve CD8+ T-Zellen, erschöpfte CD8+ T-Zellen und Plasma-Blast-Zellen), gebildet wurde. Dafür wurde der Ansatz von Klemera *et al.* angewendet [211]. Der Wert der EEAA wurde dann definiert als das Residuum, das aus einem univariaten Modell, das das nach Hannum *et al.* berechnete epigenetische Alter an das chronologische Alter regressiert, resultiert. Per Definition zeigt der Wert der EEAA eine positive Korrelation mit der Menge an erschöpften CD8+ T-Zellen und an Plasmablast-Zellen sowie eine negative Korrelation mit der Menge an naiven CD8+ T-Zellen. Bei der Berechnung des Wertes EEAA werden sowohl altersabhängige Veränderungen in der Blutzell-Komposition, als auch intrinsische epigenetische Veränderungen berücksichtigt.

Um den tatsächlichen Wert der Beschleunigung des epigenetischen Alterns zu berechnen, wurde ein multivariates Regressionsmodell verwendet. Ein Regressions-Koeffizient misst den Einfluss der verschiedenen Variablen in einer Regressions-Gleichung. Mit Hilfe einer Regressions-Analyse lässt sich der Beitrag einer unabhängigen Variable (dem Regressor) für die Vorhersage der abhängigen Variable herleiten. Durch die Division des Regressions-Koeffizienten des Krankheits-Status durch den Regression-Koeffizienten des chronologischen Alters erhält man die Beschleunigung des Alterns in Jahren.

2.2.6 Locus-spezifische DNA-Methylierungs-Analyse durch Deep Bisulfite Sequencing mit dem Illumina MiSeq

DBS mit dem Illumina MiSeq erlaubt die Erstellung der DNA-Methylierungs-Profile mehrerer tausend individueller Allele für mehrere spezifische Loci und verschiedene Proben gleichzeitig.

2.2.6.1 Prinzip des Deep Bisulfite Sequencings

Der DBS-Workflow setzt sich grob aus der Vorbereitung der Library und deren Sequenzierung am Illumina MiSeq zusammen.

Die Arbeitsschritte zur Library-Präparation beinhalten zwei PCRs, die das Anfügen von Adaptersequenzen, die für die Sequenzierung benötigt werden, möglich machen. Das Ziel der ersten PCR ist die Amplifizierung der Zielregion. Die verschiedenen Amplikons der ersten PCRs jeder biologischen Probe werden anschließend gepoolt, um sie in der zweiten PCR gleichzeitig mit denselben Multiplex-Indices zu markieren. Die PCR-Produkte der zweiten PCR werden wiederum gepoolt um am Illumina MiSeq sequenziert zu werden (Abbildung 13).

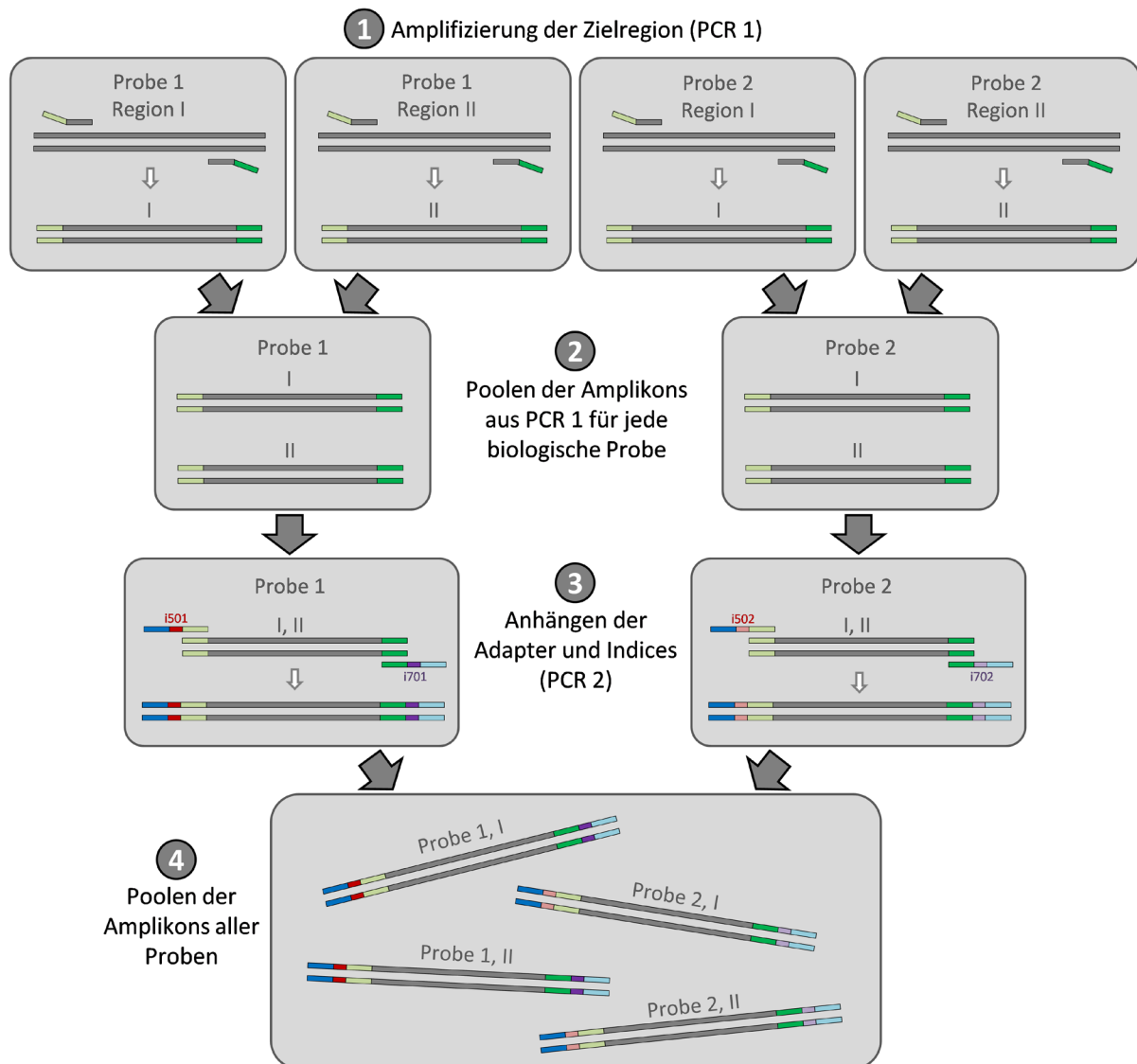


Abbildung 13: Prinzip der Library-Präparation, vereinfacht dargestellt mit zwei Zielregionen und zwei Proben. Die verschiedenen Amplikons der ersten PCR werden für jede biologische Probe gepoolt, um dann in der zweiten PCR mit denselben Indices markiert zu werden. Durch das Poolen aller Amplikons entsteht die finale Library, die dann am Illumina MiSeq sequenziert wird. Abbildung erstellt nach [212].

Am Illumina MiSeq folgen die Cluster-Generierung und die Sequenzierung. Die Cluster-Generierung ist der Prozess, in dem jedes Fragment-Molekül amplifiziert wird. Das Prinzip dieses Prozesses ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

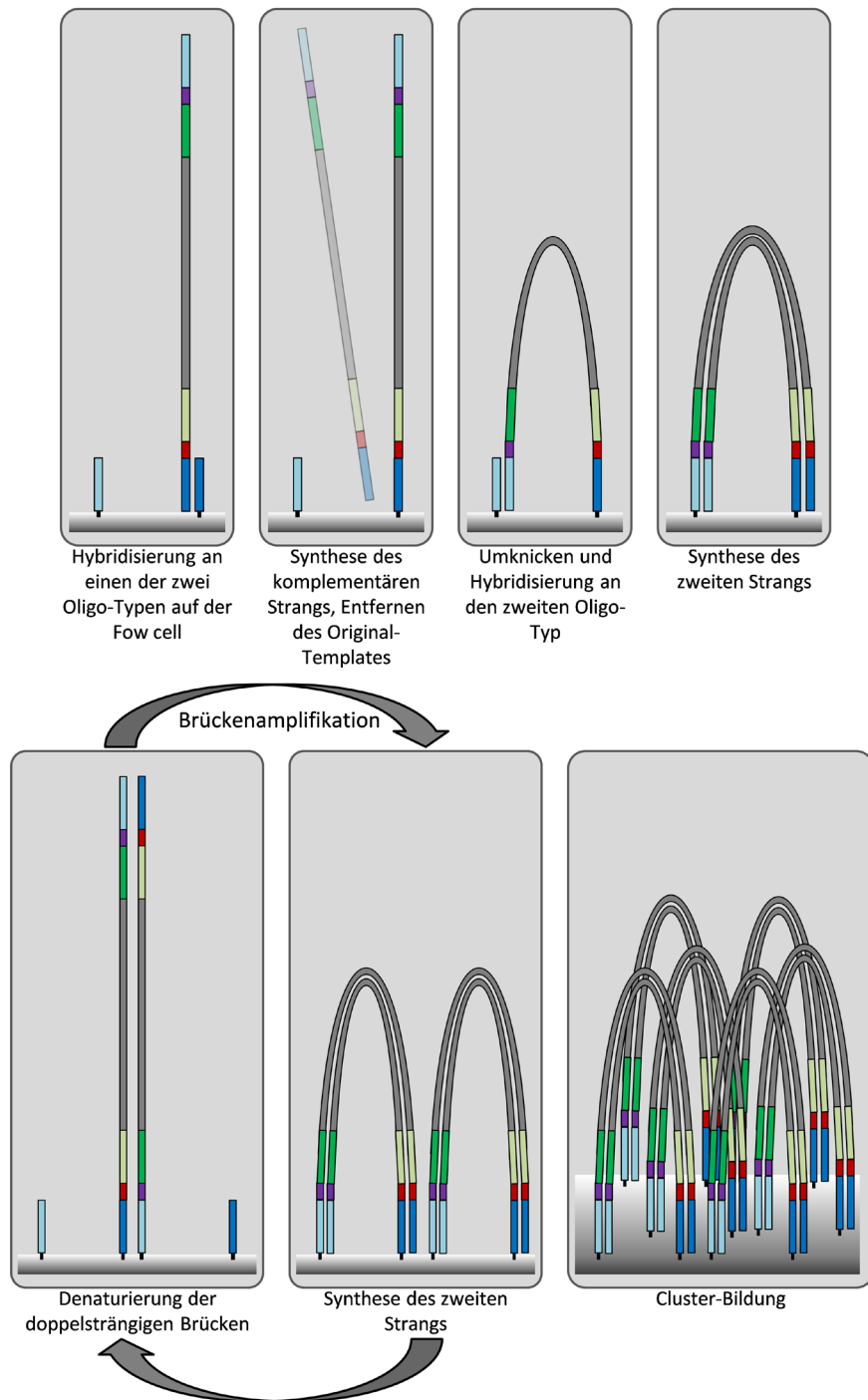


Abbildung 14: Prinzip der Cluster-Generierung am Illumina MiSeq. Die an den beiden Enden mit unterschiedlichen Adaptoren ligierten Amplikons werden per Brückenamplifikation vervielfältigt. Die DNA-Moleküle innerhalb eines Clusters weisen die gleiche Sequenz auf. Abbildung erstellt nach [Internet-Referenz 10].

Auf der Oberfläche der Flow cell gibt es zwei verschiedene Oligo-Typen. Die Fragmente, die an beiden Enden mit zu den Oligos auf der Flow cell komplementären Adapterregionen versehen wurden, binden zunächst an einen der beiden Oligo-Typen. Ein zu dem hybridisierten Fragment komplementärer Strang wird gebildet. Anschließend wird das doppelsträngige Molekül denaturiert und das Original-Template gewaschen. Das nicht gebundene Ende des Strangs fällt nach unten und bindet an den anderen der zwei Oligo-Typen

auf der Oberfläche der Flow cell. Polymerasen bilden den komplementären Strang, wodurch eine doppelsträngige Brücke entsteht (Abbildung 14 oben). Die Brücke wird denaturiert, woraufhin zwei einzelsträngige Kopien desselben Moleküls vorliegen, die an der Flow cell befestigt sind. Dieser Prozess der Brückenamplifikation wird viele Male wiederholt und passiert gleichzeitig an Millionen von Clustern, so dass alle Fragmente klonal amplifiziert werden (Abbildung 14 unten) [Internet-Referenzen 10 und 11]. Nach der Cluster-Generierung folgt die Sequenzierung, die auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Synthese beruht. Die Schritte dieses Prozesses sind schematisch in Abbildung 15 dargestellt.

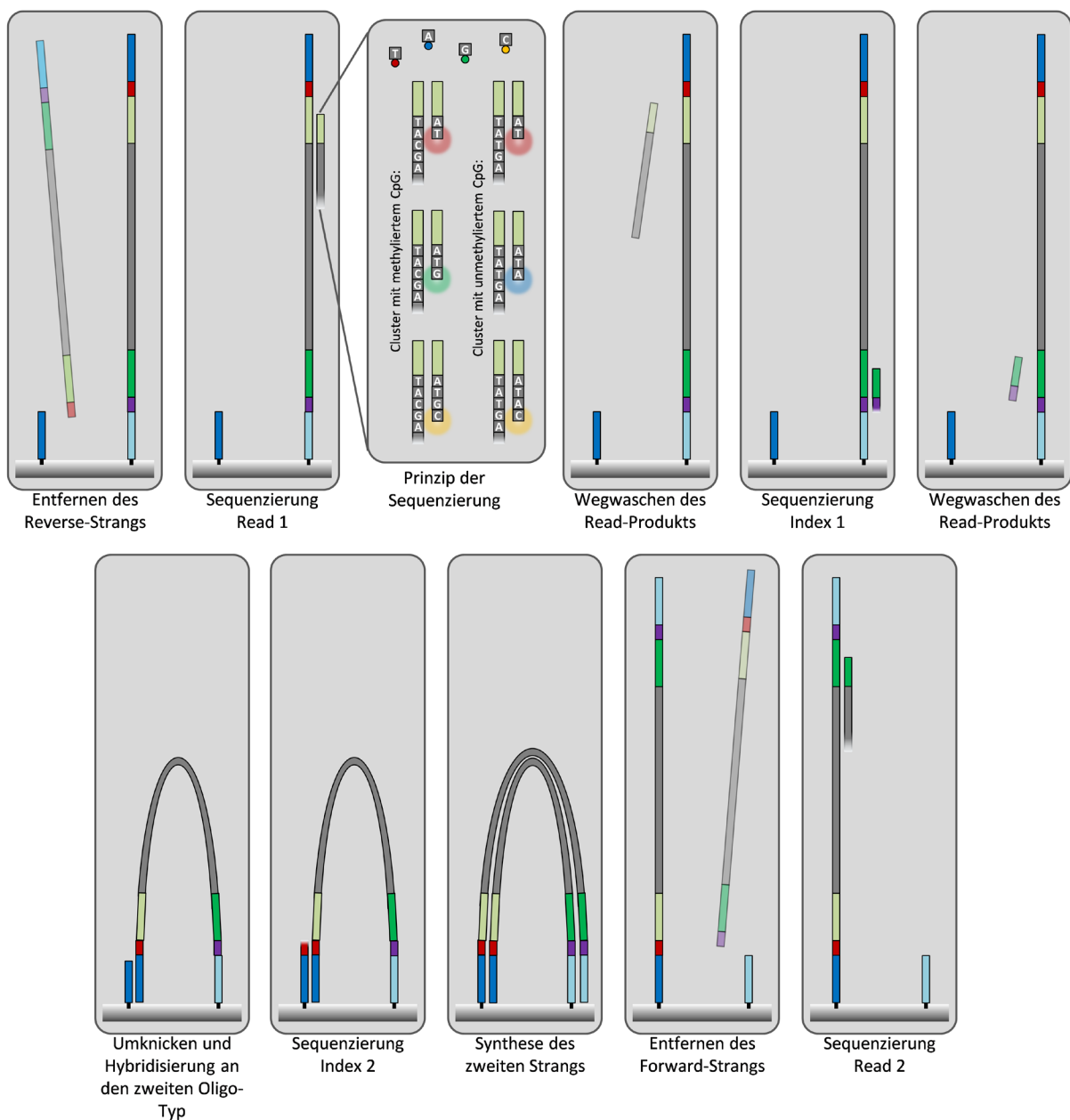


Abbildung 15: Schritte der Sequenzierung am Illumina MiSeq. Read 1, Index 1, Index 2 und Read 2 werden nacheinander sequenziert. Die Sequenzierung beruht auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Synthese. Der Einbau der vier verschiedenfarbig fluoreszierenden Nukleotide wird in Echtzeit bestimmt. Dabei kann ermittelt werden, ob vor der Bisulfit-Konvertierung ein methyliertes oder unmethyliertes Cytosin vorlag. Abbildung erstellt nach [Internet-Referenz 10].

Der Reverse-Strang wird geschnitten und abgewaschen, woraufhin nur noch die Forward-Stränge auf der Flow cell vorhanden sind. Die 3'-Enden werden blockiert, um ungewolltes Binden von Primern zu verhindern. Die Sequenzierung beginnt mit der Verlängerung des ersten Sequenzierungs-Primers und Read 1 wird produziert. Hierbei konkurrieren bei jedem Zyklus die fluoreszenz-markierten Nukleotide um den Einbau in die wachsende Kette. Basierend auf der Sequenz des Template-Strangs wird nur das passende Nukleotid eingebaut. Nach dem Einbau jedes Nukleotids werden die Cluster durch eine Lichtquelle angeregt und ein charakteristisches Fluoreszenzsignal wird abgegeben. Die emittierte Wellenlänge und die Signalintensität bestimmen den Base call. Die identischen Stränge jedes Clusters werden simultan gelesen. Hunderte von Millionen von Clustern werden in einem parallelen Prozess sequenziert. Nach der Fertigstellung des ersten Reads wird das Read-Produkt gewaschen und der Primer für den Index 1-Read hinzugefügt, der an das Template hybridisiert. Der Index-Read wird generiert und anschließend abgewaschen (Abbildung 15 oben). Die Blockade der 3'-Enden wird entfernt, woraufhin das Template umknicken und an den anderen der zwei Oligo-Typen binden kann. Index 2 wird sequenziert. Anschließend wird der zweite Oligo-Typ auf der Flow cell verlängert und eine doppelsträngige Brücke entsteht, die dann linearisiert wird. Die 3'-Enden werden blockiert, der Original-Forward-Strang wird geschnitten und durch einen Waschschriff entfernt, so dass nur noch der Reverse-Strang vorhanden ist. Der Sequenzierungs-Primer für Read 2 bindet, durch die Wiederholung der Sequenzierungsschritte wird Read 2 generiert (Abbildung 15 unten). Dieser gesamte Prozess produziert Millionen von Reads, die alle Fragmente präsentieren. Da das Fragment von beiden Seiten sequenziert wird (Read 1 und 2, Paired-End Sequencing), werden Sequenzierungs-Daten von hoher Qualität generiert, die gut an die Referenzsequenz aligniert werden können [Internet-Referenzen 10 und 11].

2.2.6.2 Protokoll

Das Protokoll zur Vorbereitung der Proben basiert auf der BisPCR²-Methode, die von Bernstein *et al.* [212] entwickelt wurde und eine robuste, effiziente sowie kosteneffektive Technik für die Bisulfit-Sequenzierung von spezifischen Loci darstellt.

Unter der Verwendung locus-spezifischer Primer für *ATM*, *BRCA1*, *RAD51C* und *TP53* wurden in den ersten PCRs die Zielregionen amplifiziert. Für jeden Assay wurden in einem 25 µl-Ansatz 1 µl bisulfit-konvertierte DNA als Template eingesetzt. Das Pipettier-Schema und die

PCR-Programme für die ersten PCRs der Library-Präparation sind in Tabelle 13 und Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 13: Pipettier-Schema für die ersten PCRs der DBS-Library-Präparation.

Reagenz	Volumen für eine Reaktion (µl)
10xPCR Puffer mit MgCl ₂	2,5
dNTPs	0,5
10 µM Forward Primer	1
10 µM Reverse Primer	1
Fast Start Taq DNA Polymerase	0,2
Template	1
dH ₂ O	18,8
Σ	25

Tabelle 14: PCR-Programme für die ersten PCRs der DBS-Library-Präparation.

Amplifikationsschritt	Dauer	PCR 1			
		ATM	BRCA1	RAD51C	TP53
1 Anfangs-Denaturierung	10 min		95 °C		
2 Denaturierung	30 s		95 °C		
3 Annealing	30 s	56 °C	58 °C	56 °C	58 °C
4 Elongation	1 min		72 °C		
5 Abschluss-Elongation	10 min		72 °C		
Anzahl der Zyklen		40	40	40	40

Anzahl der Zyklen bedeutet Anzahl der Wiederholungen der Schritte 2-4.

Durch Gelelektrophorese wurde die Fragmentlänge der PCR-Produkte kontrolliert. Um überschüssige Primer und Nukleotide zu entfernen, wurden die PCR-Produkte mit AMPure XP-Beads aufgereinigt. Für jede Probe wurden PCR-Produkt und Beads im Verhältnis 1:0,9 gemischt, zwei Waschschrirte mit 75 % Ethanol wurden durchgeführt und anschließend die DNA in 20 µl Elutions-Puffer eluiert. Nach der Quantifizierung der DNA-Konzentration mit Hilfe des Qubit-Fluorometers wurden die PCR-Produkte verdünnt, um anschließend die vier Amplikons jeder biologischen Probe zu gleichen Teilen (0,2 ng/µl) miteinander kombinieren zu können. In einer zweiten PCR wurden in einem 50 µl-Ansatz jeweils 5 µl des jeweiligen Pools einer biologischen Probe eingesetzt und durch die Verwendung von Index-Primern individuell markiert. Das Pipettier-Schema und das PCR-Programm für die zweite PCR der Library-Präparation werden in Tabelle 15 und Tabelle 16 präsentiert.

Tabelle 15: Pipettier-Schema der zweiten PCR der DBS-Library-Präparation.

Reagenz	Volumen für eine Reaktion (µl)
10xPCR Puffer mit MgCl ₂	5
dNTPs	1
10 µM Forward Primer	1
10 µM Reverse Primer	1
Fast Start Taq DNA Polymerase	0,4
Template	5
dH ₂ O	36,6
Σ	50

Tabelle 16: PCR-Programm der zweiten PCR der DBS-Library-Präparation.

Amplifikationsschritt	Dauer	PCR2
1 Anfangs-Denaturierung	15 min	95 °C
2 Denaturierung	30 s	95 °C
3 Annealing	30 s	68-56 °C
4 Elongation	2 min	72 °C
5 Abschluss-Elongation	10 min	72 °C
Anzahl der Zyklen		10

Die Pools wurden unter Verwendung der AMPure XP-Beads aufgereinigt. Für jede Probe wurden Pool und Beads im Verhältnis 1:0,9 gemischt, zwei Waschschrte mit 75 % Ethanol wurden durchgeführt und die DNA in 30 µl Elutions-Puffer eluiert. Die Fragmentlängen sowie die DNA-Konzentrationen der Pools wurde mit dem High Sensitivity DNA Kit entsprechend der Anweisungen des Herstellers auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer bestimmt. Nachdem jeder Pool auf 4 nM verdünnt worden war, wurden je 3 µl zu einem finalen Pool zusammen pipettiert, der erneut auf dem Bioanalyzer vermessen wurde. Die aus allen Pools bestehende Library wurde entsprechend der Angaben des „Denature and Dilute Libraries Guide“ [Document # 15039740 v06; Internet-Referenz 12] denaturiert, auf 8 pM verdünnt und mit einer 8 pM PhiX Control v3 im Verhältnis 5:1 gemischt. Bei der Sequenzierung spezifischer Amplikons, die ausgehend von bisulfit-konvertierter DNA generiert wurden, weisen die Libraries eine geringe Diversität auf. Daher wurde eine PhiX Library als Sequenzierungs-Kontrolle hinzugefügt. Die finale Library wurde mit dem MiSeq Reagent Kit v2 (500 Zyklen) sequenziert. Um den Lauf zu starten, wurde der „MiSeq System User Guide“ [Document # 15027617 v04; Internet-Referenz 13] herangezogen.

2.2.6.3 Datenauswertung

Für die Auswertung der mit dem Illumina MiSeq generierten Daten wurde die Software Amplifyer2 herangezogen, die zur Analyse und Visualisierung von Sequenzierungs-Daten verwendet werden kann. Amplifyer2 ist eine weiter entwickelte Version des Amplifyer, dessen Name sich aus Amplicon analyzer zusammensetzt [213]. Da bei der Bisulfit-Konvertierung der Großteil der Cytosine in Thymin umgewandelt wird, ist eine Schwierigkeit bei der Analyse bisulfit-konvertierter DNA, dass sie im Vergleich zu genomischer DNA weniger komplex ist und lange T-Homopolymere enthält. Der Amplifyer wurde unter Berücksichtigung dieser Herausforderungen entwickelt und stellt ein Software-Paket dar, das komplexe Assay-Designs mit mehreren Amplicons von vielen Proben analysieren kann.

Mit der `analyzefastq`-Funktion wurde unter Verwendung der voreingestellten Optionen aus den `fastq`-Dateien eine Amplifyer-Analyse-Datei (`akzr`-Datei) erstellt. Diese wurde verwendet, um mit der `methylation`-Funktion die DNA-Methylierungs-Analyse für die vier einzelnen Assays durchzuführen. Hierbei wurde die maximal erlaubte Anzahl an ungewissen CpGs (`badmeth`) für jeden Assay auf null gesetzt. Die Sequenzen werden basierend auf den jede biologische Probe als einzigartig ausweisenden Indices getrennt. Für jede Probe werden die Reads mit im Base call übereinstimmenden Bereichen geclustert. Forward- und Reverse-Reads werden gepaart, wodurch zusammenhängende Sequenzen entstehen. Durch das Alignment dieser Sequenzen an die Referenzsequenz der Zielregionen wird der Methylierungs-Status der CpGs bestimmt. Je nachdem, ob an einer Position, an der in der genomischen Sequenz ein C vorliegt, ein T oder ein C aligniert wird, wird dieses als unmethyliertes oder methyliertes Cytosin identifiziert.

Für jede Probe wurde die durchschnittliche DNA-Methylierung über alle CpGs und alle Reads sowie auf Einzelallel-Ebene die Anzahl an Reads, die Einzel-CpG-Fehler aufweisen, ermittelt.

Um zu testen, ob sich der Mittelwert des Ausgangskultur-Duplikats von der DNA-Methylierung der gealterten Klone unterscheidet, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für eine Stichprobe angewendet. Der Mann-Whitney-U-Test wurde angewendet, um auf signifikante Unterschiede zwischen den gealterten Klonen und den bestrahlten Klonen zu testen.

3 Ergebnisse

3.1 Fibroblasten als *in vitro* Modell zur Untersuchung altersassoziierter und strahleninduzierter Veränderungen der DNA-Methylierung

3.1.1 Direkte Effekte ionisierender Strahlung auf das genomweite DNA-Methylierungs-Profil

Um die Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung direkt nach Strahlenexposition zu untersuchen, wurden die DNA-Methylierungs-Profile von Fibroblasten eine bis 72 Stunden nach Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy analysiert (Abbildung 16).

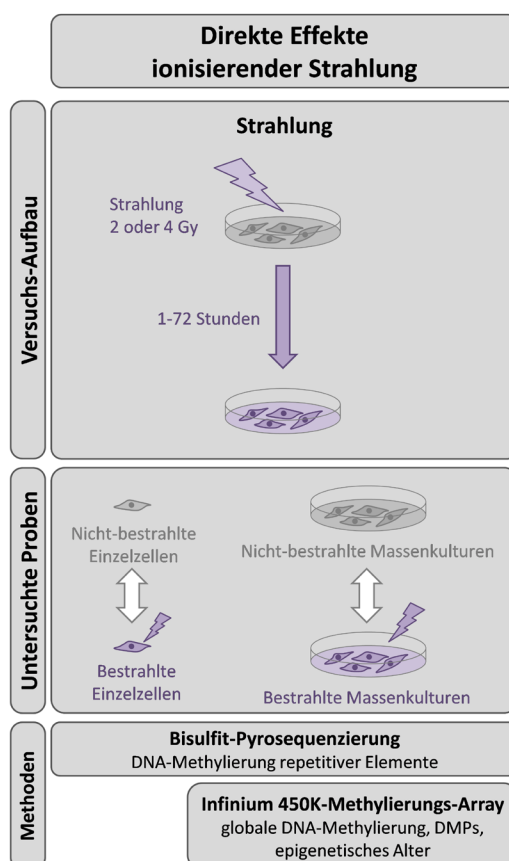


Abbildung 16: Darstellung der in Fibroblasten durchgeführten Versuche zur Untersuchung der direkten Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung. Die DNA-Methylierung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten eine bis 72 Stunden nach Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy analysiert. Mittels Pyrosequenzierung wurde die DNA-Methylierung repetitiver Elemente in Einzelzellen ermittelt. In den Massenkulturen wurden unter Verwendung von Infinium 450K-Methylierungs-Arrays genomweite DNA-Methylierungs-Profile auf Einzelnukleotid-Ebene erstellt.

Die direkten Effekte ionisierender Strahlung auf das genomweite DNA-Methylierungs-Profil wurden in der Publikation „Analysis of global DNA methylation changes in primary human fibroblasts in the early phase following X-ray irradiation“, die 2017 in PLoS One erschienen ist, veröffentlicht [216].

3.1.1.1 Pyrosequenzierungs-Ergebnisse: DNA-Methylierung repetitiver Elemente

Mittels Pyrosequenzierung wurden die durchschnittlichen DNA-Methylierungs-Level der repetitiven Elemente α -Satelliten-DNA, ALU und LINE-1 in nicht-bestrahlten Massenkulturen und in Massenkulturen jeweils sechs und 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy untersucht. Jede Kondition (Dosis/Zeitpunkt) wurde in drei verschiedenen Fibroblastenlinien und jeweils in Triplikaten analysiert. Für die Kondition 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy wurde die Anzahl der untersuchten Fibroblastenlinien auf neun erhöht. Die durchschnittlichen DNA-Methylierungs-Werte der repetitiven Elemente sind in Abbildung 17 dargestellt.

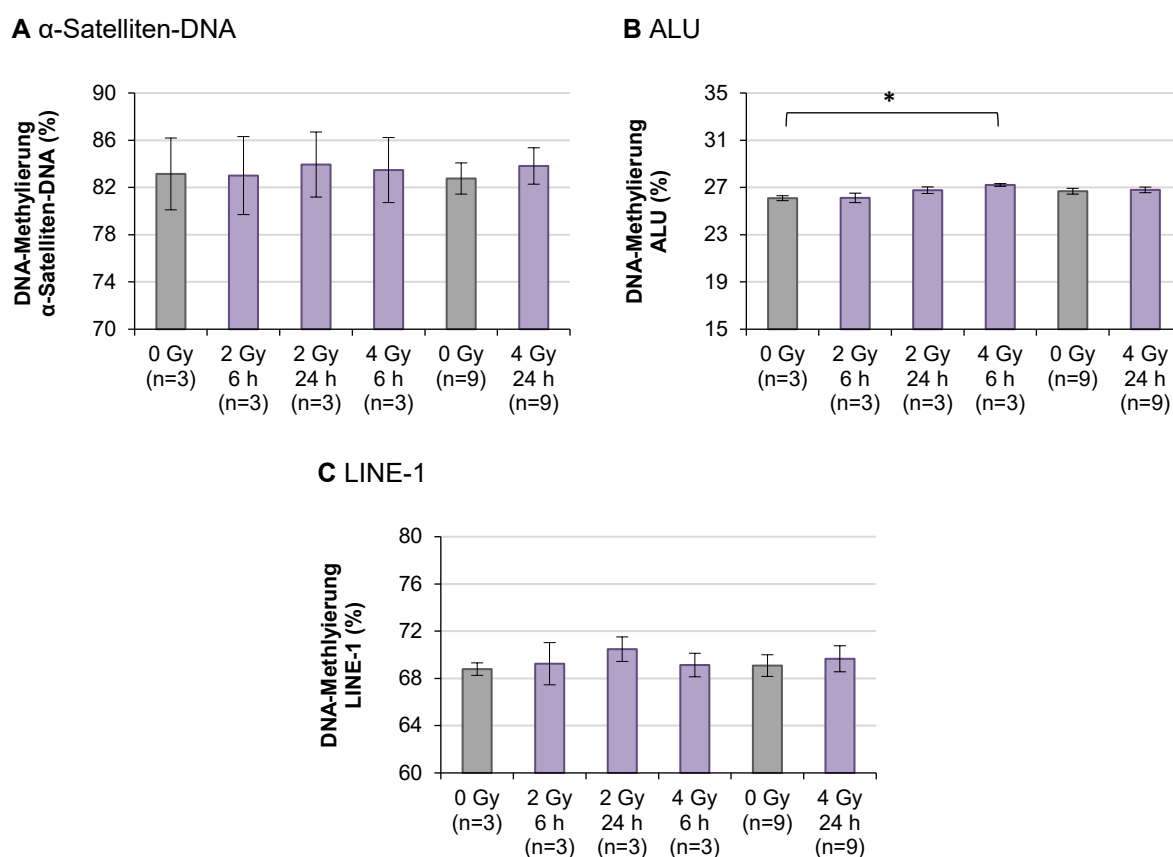


Abbildung 17: DNA-Methylierung der repetitiven Elemente direkt nach Bestrahlung. Abgebildet sind die DNA-Methylierungs-Level der repetitiven Elemente α -Satelliten-DNA (A), ALU (B) und LINE-1 (C) in nicht-bestrahlten und bestrahlten Massenkulturen sechs und 24 Stunden (h) nach Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy. Die Anzahl der untersuchten Fibroblastenlinien ist in Klammern angegeben (n). Die Ergebnisse werden als Mittelwert (der verschiedenen Kulturen) der Mittelwerte (über Triplikat-Messungen) \pm Standardfehler dargestellt. Das Sternchen kennzeichnet einen signifikanten Gruppen-Unterschied (* $p < 0,05$; ANOVA).

Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die bestrahlten Kulturen tendenziell erhöhte durchschnittliche DNA-Methylierungs-Werte. Insgesamt waren die Unterschiede zwischen nicht-bestrahlten und bestrahlten Kulturen allerdings sehr gering. Für die α -Satelliten-DNA konnte mit + 1,0 % die maximale Differenz zur Kontrolle 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy

beobachtet werden. Für ALU wurde eine signifikante Zunahme um 1,1 % sechs Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy detektiert ($p=0,01$; ANOVA). Für LINE-1 lag mit + 1,7 % die größte Differenz zur Kontrolle 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy vor (Abbildung 17).

Abbildung 18 zeigt die DNA-Methylierungs-Level der repetitiven Elemente der neun verschiedenen nicht-bestrahlten und bestrahlten Kulturen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy.

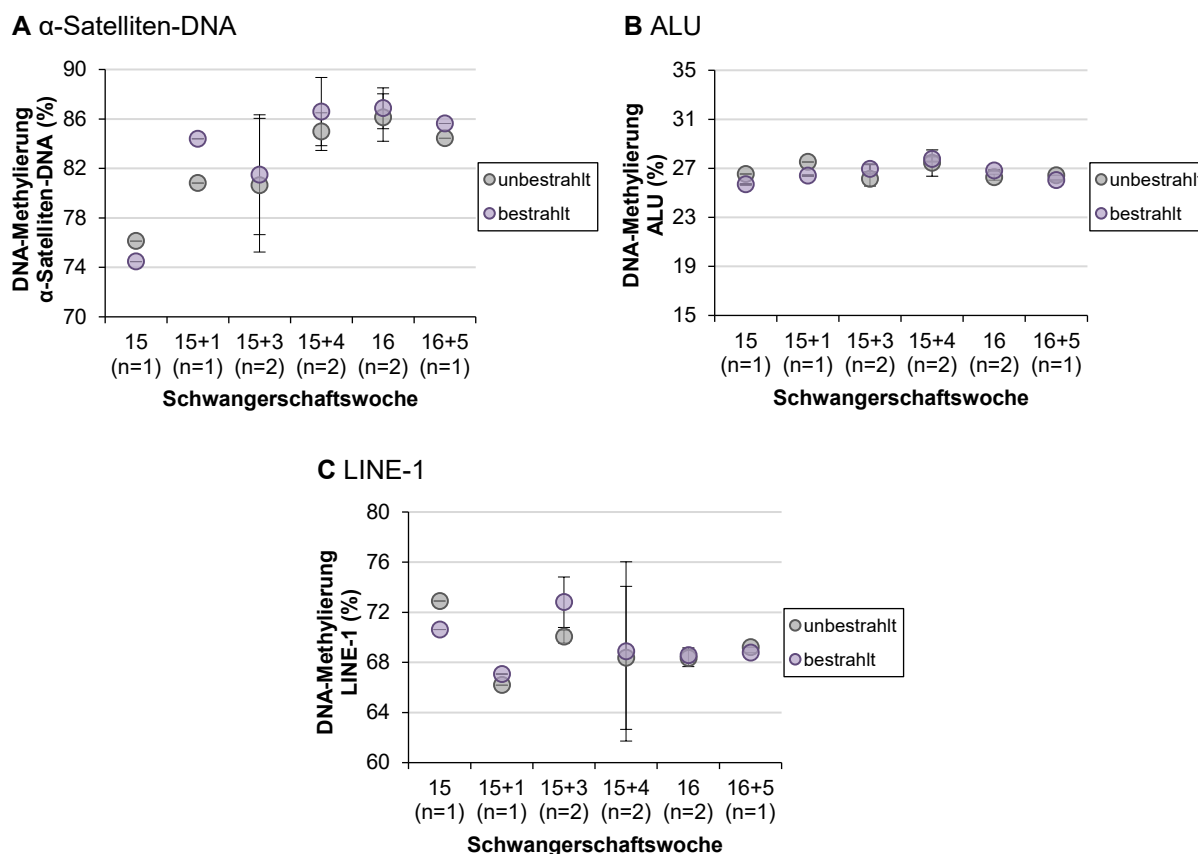


Abbildung 18: Variation der DNA-Methylierung der repetitiven Elemente zwischen den untersuchten Fibroblastenlinien. Dargestellt sind die DNA-Methylierungs-Level der repetitiven Elemente α -Satelliten-DNA (A), ALU (B) und LINE1 (C) 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy. Die Variation der DNA-Methylierung zwischen nicht-bestrahlten und bestrahlten Kulturen wurde mit den Differenzen zwischen den verschiedenen Fibroblastenlinien, die von verschiedenen Fetten stammen, verglichen. Die Kulturen sind nach zunehmender Schwangerschaftsdauer angeordnet. Die Anzahl der untersuchten Fibroblastenlinien pro Schwangerschaftswoche ist in Klammern angegeben (n).

Für alle drei repetitiven Elemente war die Variation der DNA-Methylierung zwischen den unabhängigen Fibroblastenlinien, die verschiedene Feten und Schwangerschaftsdauern vertreten, größer als die Differenz zwischen nicht-bestrahlten und bestrahlten Kulturen von ein und derselben Fibroblastenlinie. Die DNA-Methylierung der α -Satelliten-DNA korrelierte positiv (Spearman-Rho=0,785; $p=0,012$) mit der Schwangerschaftsdauer (Abbildung 18 A).

Da das durchschnittliche DNA-Methylierungs-Level einer Zellpopulation extreme DNA-Methylierungs-Werte in einzelnen Zellen maskieren könnte, wurden Einzelzell-Analysen

durchgeführt. Die DNA-Methylierung der repetitiven Elemente α -Satelliten-DNA, ALU und LINE-1 wurden in einzelnen Zellen, die aus zwei Fibroblastenlinien 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy und aus den jeweiligen Kontrollen isoliert wurden, analysiert (Abbildung 19).

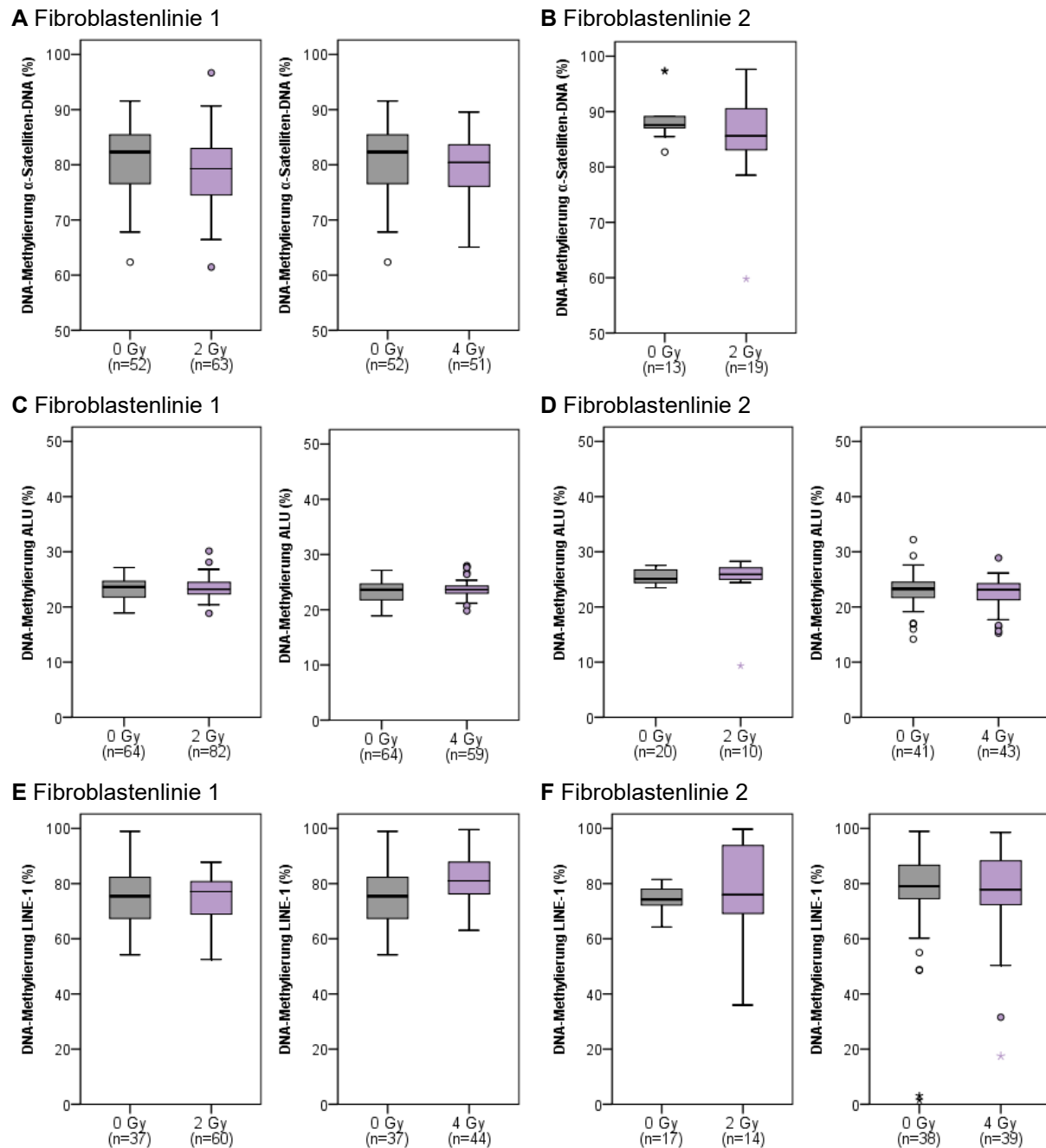


Abbildung 19: Box-Plots zur Verteilung der DNA-Methylierung der repetitiven Elemente in Einzelzellen. Die DNA-Methylierung der repetitiven Elemente α -Satelliten-DNA (A, B), ALU (C, D) und LINE-1 (E, F) wurde in einzelnen Zellen von zwei Fibroblastenlinien jeweils 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy analysiert. Die Anzahl der analysierten Einzelzellen ist in Klammern angegeben (n). Der Median wird durch eine horizontale Linie repräsentiert. Die Unterseite der Box gibt die 25. Perzentile an, die Oberseite die 75. Perzentile. Ausreißer werden als Kreise und extreme Ausreißer als Sterne dargestellt.

Für beide Strahlendosen und beide Fibroblastenlinien war die Variation der DNA-Methylierung vergleichbar zwischen nicht-bestrahlten und bestrahlten Zellen (Levene-Test). Der Anteil an Ausreißern war nach Bestrahlung nicht wesentlich erhöht.

3.1.1.2 Ergebnisse der Infinium 450K-Methylierungs-Arrays

Um mögliche direkte Bestrahlungseffekte auf die genomweite DNA-Methylierung auf Einzelnukeotid-Ebene zu analysieren, wurden Infinium 450K-Methylierungs-Arrays eine, sechs und 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy (Array-Datensatz 1) und sechs, 24 und 72 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy (Array-Datensatz 2) durchgeführt. Für beide Strahlendosen wurde jeder analysierte Zeitpunkt durch eine nicht-bestrahlte und drei bestrahlte Massenkulturen repräsentiert. Beide Datensätze umfassten je 12 Proben (hybridisiert auf je einem Chip). Nach den verschiedenen Filterschritten, die in Material und Methoden detailliert erklärt werden, blieben im ersten Array-Datensatz 411.092 CpGs und im zweiten Array-Datensatz 409.810 CpGs für die weiteren Analysen.

Für jede Probe wurde der globale β -Wert über alle CpGs bestimmt. Für beide Strahlendosen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der nicht-bestrahlten und der bestrahlten Kulturen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Strahlenexposition festgestellt werden (Abbildung 20).

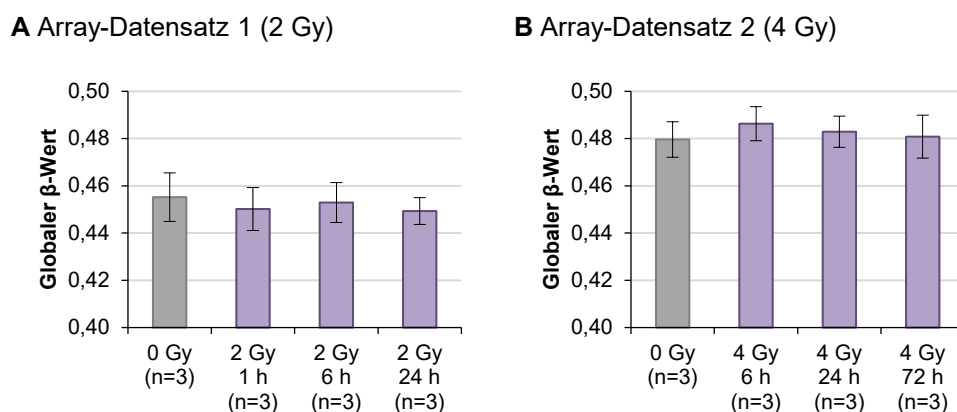


Abbildung 20: Globaler β -Wert direkt nach Bestrahlung. Abgebildet ist der globale β -Wert über alle analysierten CpGs in nicht-bestrahlten und bestrahlten Massenkulturen eine bis 72 Stunden (h) nach Bestrahlung mit 2 Gy (A) oder 4 Gy (B). Die Anzahl der analysierten Replikate ist in Klammern angegeben (n). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

In einer Cluster-Analyse über alle CpG-Stellen werden die nicht-bestrahlten Kulturen nicht deutlich in einem Cluster von den bestrahlten Proben getrennt und weisen untereinander keine höhere Ähnlichkeit auf als zu den bestrahlten Proben (Abbildung 21).

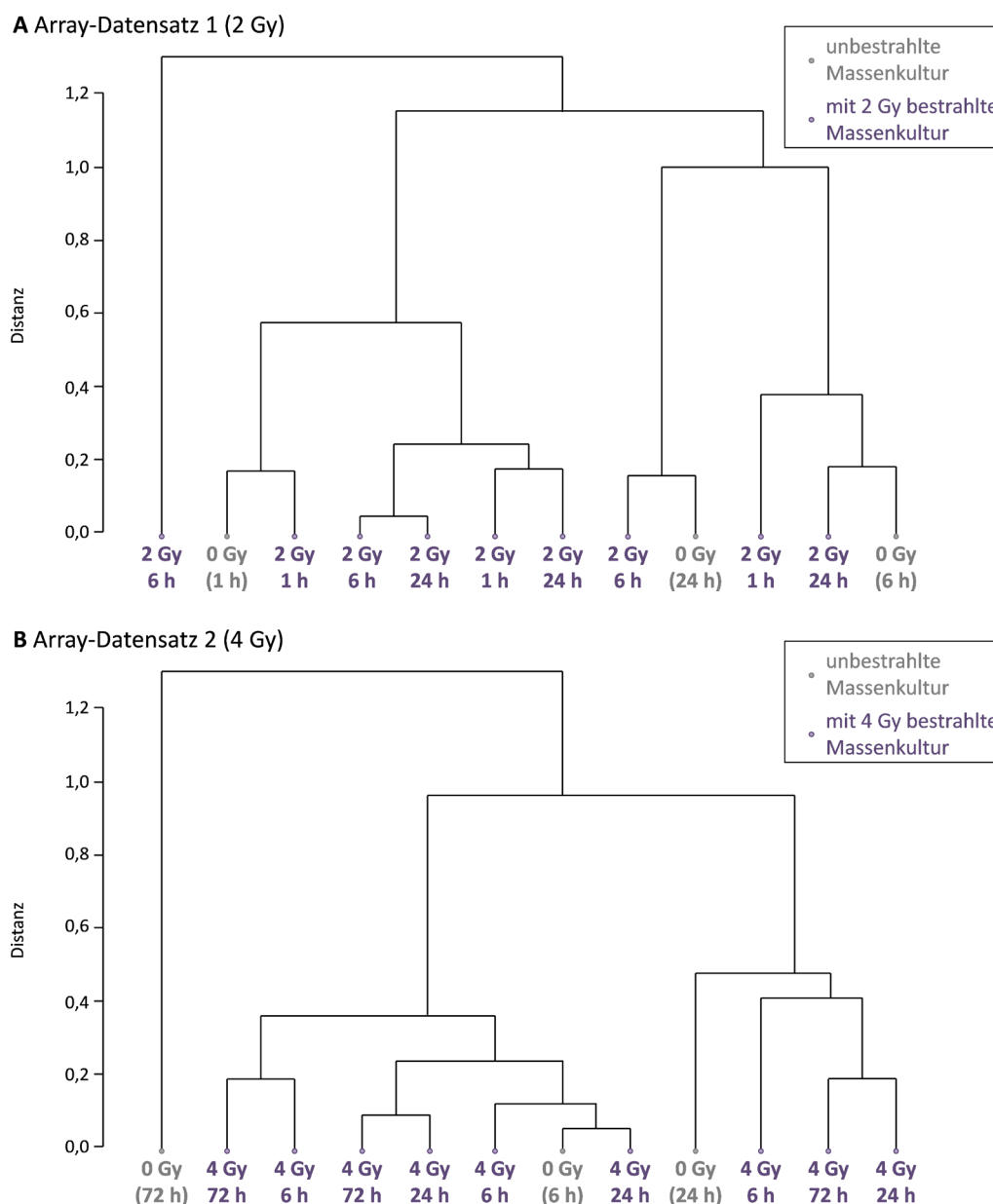


Abbildung 21: Dendrogramme zur Visualisierung der Ähnlichkeit nicht-bestrahlter und bestrahlter Massenkulturen. Abgebildet sind die nicht-bestrahlten und die mit 2 Gy (A) oder mit 4 Gy (B) bestrahlten Massenkulturen. Cluster bestehen aus Proben, die zueinander eine geringere Distanz aufweisen als zu den Proben anderer Cluster.

In beiden Array-Datensätzen konnten im Vergleich der nicht-bestrahlten gegen die bestrahlten Proben keine signifikant differentiell methylierten CpG-Stellen detektiert werden.

3.1.1.3 Ergebnisse der epigenetischen Uhr

Um den direkten Effekt ionisierender Strahlung auf das epigenetische Alter zu untersuchen, wurde dieses mit Hilfe der epigenetischen Uhr, die für Fibroblasten geeignet ist und als „skin and blood clock“ bezeichnet wird, berechnet (Tabelle 17).

Tabelle 17: Epigenetisches Alter bestrahlter und nicht-bestrahlter Massenkulturen.

	Dosis	Zeitpunkt	n	Epigenetisches Alter	
				MW	SF
Array-Datensatz 1	0 Gy		3	-14	21
	2 Gy	1 h	3	-16	5
	2 Gy	6 h	3	2	12
	2 Gy	24 h	3	-12	14
Array-Datensatz 2	0 Gy		3	-218	23
	4 Gy	6 h	3	-242	5
	4 Gy	24 h	3	-244	7
	4 Gy	72 h	3	-236	4

Diese Tabelle präsentiert die Anzahl der Replikate (n) sowie den Mittelwert (MW) und Standardfehler (SF) des epigenetischen Alters (in Tagen). Zeitpunkt bezieht sich auf die Anzahl der Stunden (h) nach Strahlenexposition.

Für keinen der untersuchten Zeitpunkte nach Bestrahlung konnte ein signifikanter Unterschied zwischen nicht-bestrahlten und bestrahlten Proben detektiert werden.

3.1.2 Effekte der Langzeit-Kultivierung und Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung auf das genomweite DNA-Methylierungs-Profil

Das Altern ist ein komplexer multifaktorieller Vorgang. Die molekularen Mechanismen, die am Prozess des Alterns beteiligt sind, sind noch nicht gut verstanden. Um altersassoziierte epigenetische Veränderungen aufzudecken, wurde ein *in vitro* Modell für das Altern etabliert. Ausgehend von einzelnen Zellen einer Massenkultur primärer humaner Fibroblasten wurden Klone für 20 PVs expandiert. Normale diploide Fibroblasten, die fortlaufend kultiviert werden, können als Modellsystem für altersassoziierte zelluläre und molekulare Veränderungen betrachtet werden [214, 215]. Um durch die *in vitro* Alterung induzierte epigenetische Veränderungen zu detektieren, wurden die DNA-Methylierungs-Profile der Ausgangskultur, aus der die Klone generiert worden waren (0 PVs), und der gealterten Klonen (20 PVs) gegenüber gestellt (Abbildung 22 A).

Durch die Verwendung des *in vitro* Modells für das Altern in Verbindung mit Bestrahlung konnten die Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung analysiert werden. Um DNA-Methylierungs-Veränderungen im Zusammenhang mit den Langzeit-Effekten ionisierender Strahlung zu detektieren, wurden die DNA-Methylierungs-Profile zwischen den nach Strahlenexposition gealterten Klonen, die im Folgenden als bestrahlte Klone bezeichnet werden, und den gealterten Klonen verglichen (Abbildung 22 B).

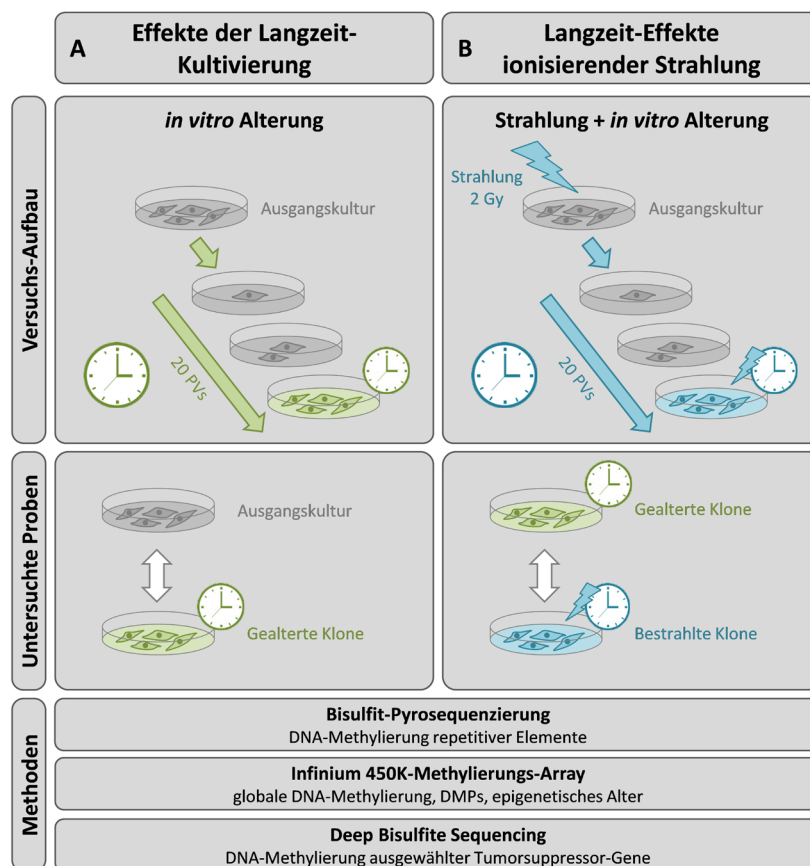


Abbildung 22: Darstellung der in Fibroblasten durchgeführten Versuche zur Untersuchung der Effekte der Langzeit-Kultivierung und der Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung. **(A)** Um altersassoziierte DNA-Methylierungs-Veränderungen zu identifizieren, wurde durch die Generierung von Einzelzell-Klonen ein *in vitro* Modell für das Altern etabliert. Der Vergleich der gealterten Klone mit der Ausgangskultur zeigte die Effekte der Langzeit-Kultivierung über 20 Populations-Verdoppelungen (PVs). **(B)** Um die Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung zu analysieren, wurde das *in vitro* Modell für das Altern in Verbindung mit Bestrahlung verwendet. Die Unterschiede zwischen den gealterten Klone und den bestrahlten Klone wurden als Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung betrachtet. Mittels Pyrosequenzierung wurde die DNA-Methylierung repetitiver Elemente untersucht. Unter Verwendung von Infinium 450K-Methylierungs-Arrays wurden genomweite DNA-Methylierungs-Profile auf Einzelnukleotid-Ebene erstellt und mittels Deep Bisulfite Sequencings die DNA-Methylierung in Promotorbereichen ausgewählter Tumorsuppressor-Gene auf Einzelallel-Ebene analysiert.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Ergebnisse reproduzierbar sind, wurden die Experimente in zwei verschiedenen embryonalen Fibroblastenlinien (Fibroblastenlinie 1 und 2) durchgeführt. Für die Fibroblastenlinie 1 konnten 12 gealterte Klone und 34 bestrahlte Klone etabliert werden. Von der zweiten Fibroblastenlinie wurden 20 gealterte und 26 bestrahlte Klone erstellt. Die jeweilige Ausgangskultur der beiden Fibroblastenlinien wurde als Duplikat analysiert.

Die Effekte der Langzeit-Kultivierung und die Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung wurden in der Publikation „Genetic and epigenetic changes in clonal descendants of irradiated human fibroblasts“, die 2018 in *Experimental Cell Research* erschienen ist, veröffentlicht [217].

3.1.2.1 Pyrosequenzierungs-Ergebnisse: DNA-Methylierung repetitiver Elemente

Um die Effekte der *in vitro* Alterung auf die DNA-Methylierung repetitiver Elemente zu untersuchen, wurde die DNA-Methylierungs-Level der α -Satelliten-DNA, der ALU- und LINE-1-Elemente und der rDNA zwischen den gealterten Klonen und der entsprechenden Ausgangskultur, die für die Etablierung der Klone verwendet worden war, verglichen.

Für beide Fibroblastenlinien waren die durchschnittlichen DNA-Methylierungs-Level der α -Satelliten-DNA sowie der ALU- und LINE-1-Elemente in den gealterten Klonen signifikant reduziert. Mit einer Reduktion des DNA-Methylierungs-Levels in den gealterten Klonen um 4,9 % in Fibroblastenlinie 1 ($p=0,004$; Wilcoxon-Test) und um 6,9 % in Fibroblastenlinie 2 ($p<0,000$) war dieser Effekt am stärksten für die α -Satelliten-DNA. Das DNA-Methylierungs-Level von ALU und LINE-1 war in den gealterten Klonen der Fibroblastenlinie 1 um 0,8 % und um 2,4 % ($p=0,012$; $p=0,010$) und der Fibroblastenlinie 2 um 0,7 % und um 1,9 % ($p=0,005$; $p=0,002$) reduziert (Tabelle 18).

Tabelle 18: DNA-Methylierung repetitiver Elemente in Ausgangskultur, gealterten und bestrahlten Klonen.

		α -Satelliten-DNA			ALU			LINE-1		
		n	MW	SF	n	MW	SF	n	MW	SF
Fibroblastenlinie 1	Ausgangskultur	1	78,4	0,9	1	25,3	0,1	1	78,9	0,6
	gealterte Klone	12	73,5	1,0	12	24,5	0,3	12	76,5	0,7
	bestrahlte Klone	34	68,1	0,6	33	23,6	0,2	34	76,1	0,3
Fibroblastenlinie 2	Ausgangskultur	1	84,6	0,3	1	26,5	1,0	1	74,5	1,3
	gealterte Klone	20	77,7	0,4	20	25,8	0,2	20	72,6	0,6
	bestrahlte Klone	26	77,1	0,6	26	25,6	0,2	26	72,6	0,5

Diese Tabelle präsentiert die Anzahl der untersuchten Proben (n) sowie den Mittelwert (MW) und Standardfehler (SF) der DNA-Methylierungs-Level (in %) der repetitiven Elemente. Die Ausgangskultur wurde jeweils als Duplikat gemessen.

Im Gegensatz dazu nahm die DNA-Methylierung des rDNA-Promotors mit der *in vitro* Alterung zu. Das DNA-Methylierungs-Level in rDNA-Region 1 war in den gealterten Klonen der Fibroblastenlinie 1 um 3,6 % ($p=0,005$) und der Fibroblastenlinie 2 um 1,8 % ($p=0,001$) erhöht. Für rDNA-Region 2 konnte eine Zunahme um 5,0 % in der ersten Fibroblastenlinie ($p=0,003$) und um 3,0 % in der zweiten Fibroblastenlinie ($p<0,001$) beobachtet werden (Tabelle 19).

Tabelle 19: DNA-Methylierung der ribosomalen DNA in Ausgangskultur, gealterten und bestrahlten Klonen.

		rDNA-Region 1			rDNA-Region 2		
		n	MW	SF	n	MW	SF
Fibroblastenlinie 1	Ausgangskultur	1	13,0	0,5	1	16,4	0,6
	gealterte Klone	12	16,6	0,8	12	21,4	0,8
	bestrahlte Klone	32	17,8	0,3	34	22,7	0,3
Fibroblastenlinie 2	Ausgangskultur	1	19,1	0,1	1	24,5	0,4
	gealterte Klone	15	20,9	0,4	20	27,5	0,5
	bestrahlte Klone	19	20,8	0,3	26	27,9	0,4

Diese Tabelle präsentiert die Anzahl der untersuchten Proben (n) sowie den Mittelwert (MW) und Standardfehler (SF) der DNA-Methylierungs-Level (in %) zweier Regionen des rDNA-Promotors. Die Ausgangskultur wurde jeweils als Duplikat gemessen.

Um den Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung repetitiver Elemente zu analysieren, wurden die DNA-Methylierungs-Level zwischen gealterten Klonen und bestrahlten Klonen verglichen.

In den bestrahlten Klonen der Fibroblastenlinie 1 war das DNA-Methylierungs-Level der α -Satelliten-DNA um 5,4 % ($p < 0,000$; Mann-Whitney-U-Test), das der ALU-Elemente um 0,9 % ($p = 0,015$) und das der LINE-1-Elemente um 0,4 % reduziert. Im zweiten Experiment wiesen die bestrahlten Klone ebenfalls tendenziell reduzierte DNA-Methylierungs-Level auf, allerdings lagen die Differenzen hier nur bei - 0,6 % für die α -Satelliten-DNA, - 0,2 % für ALU und 0 % für LINE-1 (Tabelle 18).

Der Vergleich der DNA-Methylierungs-Level der rDNA-Regionen zwischen gealterten Klonen und bestrahlten Klonen ergab keine signifikanten Unterschiede, es zeigte sich aber eine Tendenz zu einer erhöhten DNA-Methylierung nach Bestrahlung. In den bestrahlten Klonen der Fibroblastenlinie 1 war das DNA-Methylierungs-Level um 1,2 % in rDNA-Region 1 und um 1,3 % in rDNA-Region 2 erhöht. Bestrahlte Klone der zweiten Fibroblastenlinie zeigten ein um 0,1 % verringertes DNA-Methylierungs-Level in rDNA-Region 1 und ein um 0,4 % erhöhtes DNA-Methylierungs-Level in rDNA-Region 2 (Tabelle 19).

3.1.2.2 Ergebnisse der Infinium 450K-Methylierungs-Arrays

Um mögliche Effekte der Langzeit-Kultivierung und Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung auf die genomweite DNA-Methylierung auf Einzelnukleotid-Ebene zu analysieren, wurden Infinium 450K-Methylierungs-Arrays für die Ausgangskulturen, die gealterten Klone und die bestrahlten Klone der Fibroblastenlinie 1 (Array-Datensatz 1) und der Fibroblastenlinie 2

(Array-Datensatz 2) durchgeführt. Die jeweils 48 Proben wurden auf je vier BeadChips hybridisiert.

Um den Effekt der Langzeit-Kultivierung auf die DNA-Methylierung zu erfassen, wurden für beide Fibroblastenlinien jeweils die genomweiten DNA-Methylierungs-Profile zwischen der Ausgangskultur und den gealterten Klonen verglichen. Nach den Filterschritten flossen für den ersten Array-Datensatz 410.285 CpGs und für den zweiten Array-Datensatz 413.558 CpGs in die weiteren Analysen mit ein.

Für jede Probe wurde der globale β -Wert über alle CpGs bestimmt. Für beide Fibroblastenlinien war der Mittelwert der globalen β -Werte der gealterten Klone signifikant geringer als der Mittelwert des Ausgangskultur-Duplikats. Im Vergleich zur Ausgangskultur wiesen die gealterten Klone eine in der ersten Fibroblastenlinie um 2,28 % ($p=0,002$; Wilcoxon-Test) und in der zweiten Fibroblastenlinie um 1,65 % ($p<0,001$) reduzierte durchschnittliche globale DNA-Methylierung auf (Abbildung 23).

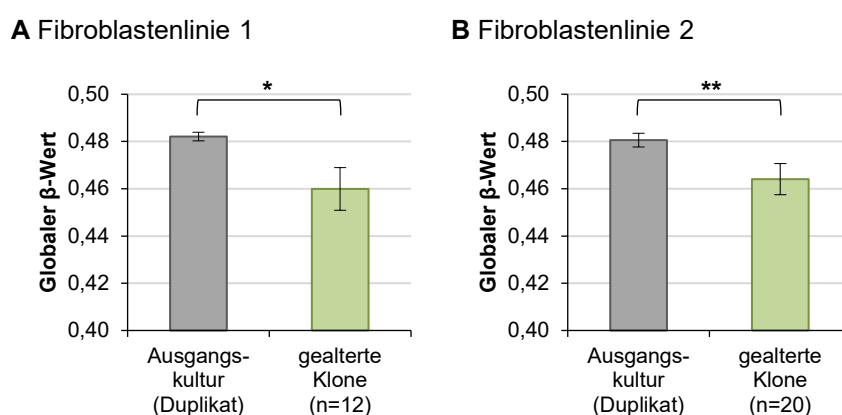


Abbildung 23: Globaler β -Wert für die Ausgangskultur und die gealterten Klone. Abgebildet ist der globale β -Wert über alle analysierten CpGs für die Ausgangskultur-Duplikate und die gealterten Klone der Fibroblastenlinien 1 (A) und 2 (B). Die Anzahl der analysierten Proben ist in Klammern angegeben (n). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Sternchen kennzeichnen einen signifikanten Unterschied (* $p<0,05$; ** $p<0,001$; Wilcoxon-Test).

Die Cluster-Analyse über alle CpGs zeigt deutlich, dass die Duplikate der Ausgangskultur in beiden Array-Datensätzen jeweils eine äußerst starke Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Außerdem besteht zum Großteil der gealterten Klone eine hohe Distanz, es liegt demzufolge eine geringe Ähnlichkeit vor (Abbildung 24).

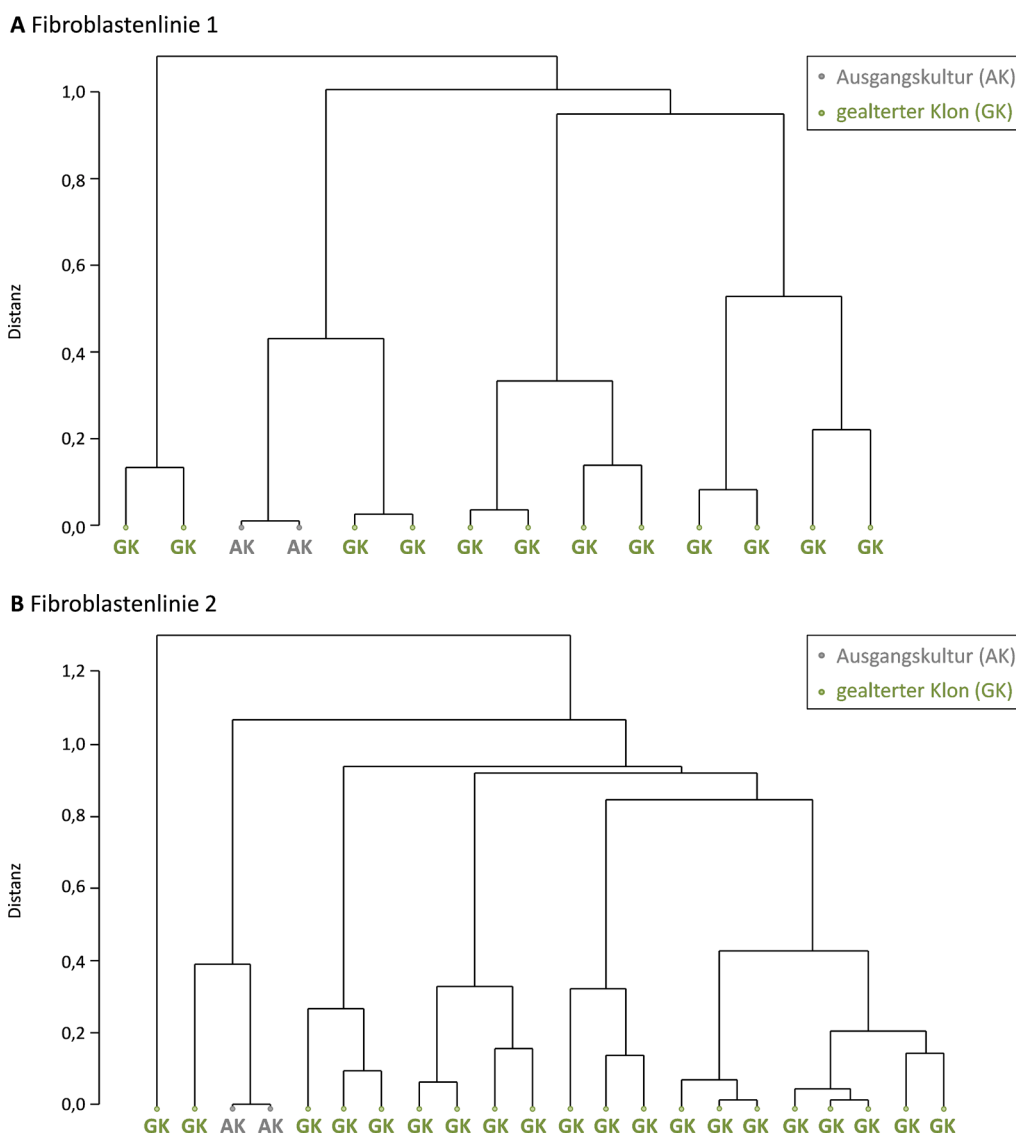


Abbildung 24: Dendrogramme zur Visualisierung der Ähnlichkeit zwischen Ausgangskultur und gealterten Klonen. Abgebildet sind die Ausgangskultur-Duplikate und die gealterten Klone der Fibroblastenlinien 1 (A) und 2 (B). Cluster bestehen aus Proben, die zueinander eine geringere Distanz aufweisen als zu den Proben anderer Cluster.

Auf der Einzelnukleotid-Ebene ergab der Vergleich der genomweiten DNA-Methylierungsprofile zwischen der Ausgangskultur und den gealterten Klonen im ersten Array-Datensatz 6.277 differentiell methylierte Positionen (DMPs) (adjustierter p-Wert<0,05), wovon 4.566 an Genregionen von 3.396 verschiedenen Genen annotiert sind. Im Array-Datensatz 2 wurden 19.281 DMPs (adjustierter p-Wert<0,05) identifiziert, wovon 13.452 Positionen 7.138 verschiedenen Genen zugeordnet wurden. Für beide Fibroblastenlinien war der größere Teil der DMPs hypomethyliert (58 % in Array-Datensatz 1 und 52 % in Array-Datensatz 2). Ein Überlapp von 1.131 CpGs wurde in beiden Datensätzen als differentiell methyliert zwischen Ausgangskultur und gealterten Klonen identifiziert.

Die β -Differenzen zwischen Ausgangskultur und gealterten Klonen dieser überlappenden CpGs des ersten Array-Datensatzes korrelieren positiv mit den entsprechenden β -Differenzen des zweiten Datensatzes (Spearman-Rho=0,689, $p < 0,001$).

An die 1.131 DMPs wurden 667 verschiedene Gene annotiert. Eine Genset-Anreicherungs-Analyse unter Verwendung des Enrichr-Tools und mit diesen Genen als Input resultierte in zehn angereicherten Termini (adjustierter p-Wert $< 0,1$), unter welchen der Terminus Fokale Adhäsion und der Ras-Signalweg die höchsten kombinierten Scores aufwiesen (Tabelle 20).

Tabelle 20: Ergebnisse der Genset-Anreicherungs-Analyse im Zusammenhang mit der *in vitro* Alterung.

Terminus	Überschneidung	p-Wert	Adjustierter p-Wert	CS	Gene
Fokale Adhäsion	hsa04510 17/202	4,5E-04	0,079	14,8	TNXB;ACTN2;LAMC3;SRC;THBS2;VAV2;IGF1R;COMP;CCND3;COL4A2;COL4A1;PDGFD;COL6A2;RAC2;AKT1;DOCK1;BCAR1
Ras-Signalweg	hsa04014 17/227	0,002	0,079	12,5	BRAP;ANGPT4;RAB5C;RASGRF2;CALML3;GRIN1;IGF1R;PLD2;RASA3;GNG7;PDGFD;KIT;RAC2;AKT1;GNB3;FGFR2;FGFR1
Amphetamin-Abhängigkeit	hsa05031 8/67	0,002	0,079	12,2	GRIA1;DDC;CREB3L1;CALML3;PDYN;SLC18A2;GRIN1;CREB5
PI3K-Akt-Signalweg	hsa04151 22/341	0,003	0,079	11,4	ANGPT4;TNXB;IRS1;LAMC3;BRCA1;THBS2;IGF1R;RPTOR;COMP;CCND3;COL4A2;COL4A1;CREB3L1;GNG7;PDGFD;COL6A2;KIT;AKT1;GNB3;FGFR2;FGFR1;CREB5
Synaptischer Vesikel-Zyklus	hsa04721 8/63	0,001	0,079	11,3	RAB3A;AP2A1;SLC17A7;SLC17A8;CPLX1;AP2A2;SLC18A2;AP2M1
Zentraler Kohlenstoff-Metabolismus in Krebs	hsa05230 8/67	0,002	0,079	11,2	PFKL;HKDC1;KIT;AKT1;FGFR2;PFKP;HK1;FGFR1
Nikotin-Abhängigkeit	hsa05033 6/40	0,002	0,079	10,1	GRIA1;GABRA6;GABRA5;SLC17A7;SLC17A8;GRIN1
AMPK-Signalweg	hsa04152 11/124	0,003	0,079	9,3	RPTOR;PFKL;IRS1;CREB3L1;AKT1;CPT1C;PPARGC1A;ADRA1A;PFKP;CREB5;IGF1R
Galaktose-Metabolismus	hsa00052 5/30	0,003	0,079	7,4	PFKL;HKDC1;LALBA;PFKP;HK1
Fruktose- und Mannose-Metabolismus	hsa00051 5/32	0,004	0,094	6,1	PFKL;HKDC1;ALDOA;PFKP;HK1

Die Termini mit adjustiertem p-Wert $< 0,01$ sind nach aufsteigendem Combined Score (CS) angeordnet.

Die GenAge-Datenbank für altersassoziierte Gene enthält 307 Gene, die entweder direkt mit dem Altern in Verbindung stehen oder die besten Kandidaten-Gene aus Modellorganismen sind. An 16 dieser 307 Gene (*A2M*, *AKT1*, *ATM*, *BRCA1*, *FGFR1*, *HIC1*, *HOXC4*, *HSF1*, *IGF1R*, *IRS1*, *KCNA3*, *NCOR2*, *NUDT1*, *PPARGC1A*, *RB1*, *RECQL4*) wurden DMPs annotiert, die mit der Langzeit-Kultivierung assoziiert wurden, was einen signifikanten Überlapp ergab ($p = 0,047$, Fisher's Exakt-Test).

Um den Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung zu analysieren, wurden für beide Fibroblastenlinien jeweils die genomweiten DNA-Methylierungs-Profile der gealterten Klone gegen die der bestrahlten Klone verglichen. Im ersten Array-Datensatz genügten 412.489 Sonden und im zweiten Array-Datensatz 413.476 Sonden den Qualitäts-Ansprüchen und überstanden das Filtern.

Der Vergleich der Mittelwerte der globalen β -Werte über alle CpGs zwischen den gealterten Klonen und den bestrahlten Klonen ergab in beiden Array-Datensätzen einen signifikanten Unterschied. Im Vergleich zu den nicht-bestrahlten Klonen wiesen die bestrahlten Klone eine in der ersten Fibroblastenlinie um 1,23 % ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test) und in der zweiten Fibroblastenlinie um 0,37 % ($p = 0,002$) reduzierte durchschnittliche globale DNA-Methylierung auf (Abbildung 25).

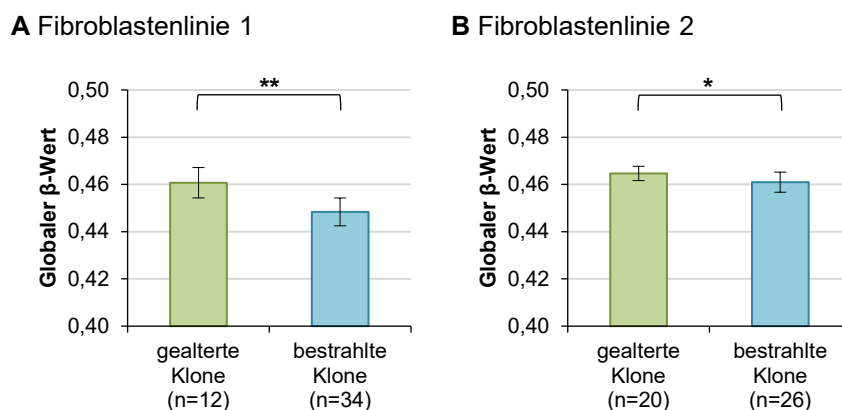
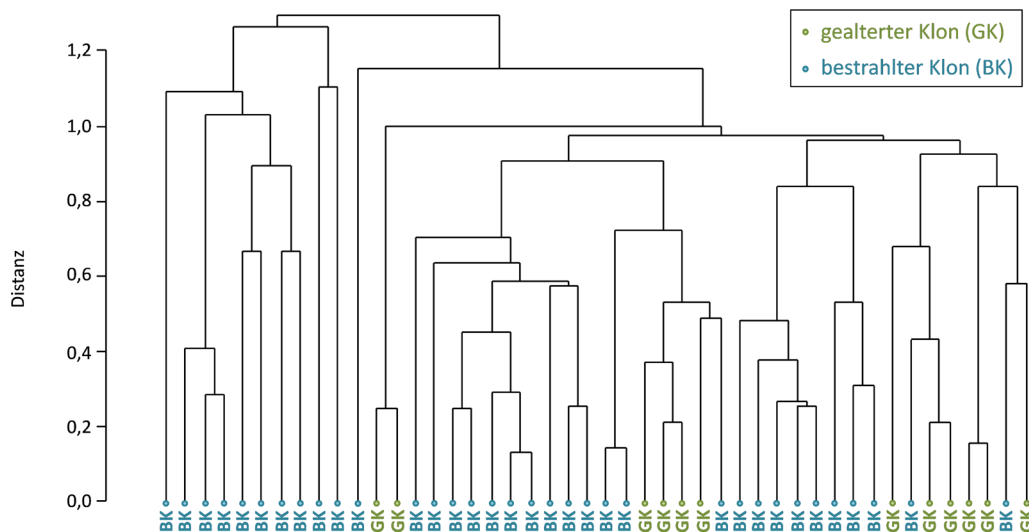


Abbildung 25: Globaler β -Wert für die gealterten Klone und die bestrahlten Klone. Dargestellt ist der globale β -Wert über alle analysierten CpGs der gealterten Klone und der bestrahlten Klone der Fibroblastenlinien 1 (A) und 2 (B). Die Anzahl der analysierten Klone ist in Klammern angegeben (n). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Sternchen kennzeichnen einen signifikanten Gruppen-Unterschied (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test).

Die Cluster-Analyse über alle CpGs resultierte in der ersten Fibroblastenlinie in einer Bildung von Clustern durch die gealterten Klone und die bestrahlten Klone. Viele bestrahlte Klone zeigten zu dem Cluster, in dem sich der Großteil der gealterten Klone befindet, eine hohe Distanz beziehungsweise eine geringe Ähnlichkeit. Für die zweite Fibroblastenlinie ist dagegen keine deutliche Cluster-Bildung erkennbar (Abbildung 26). Dies weist bereits darauf hin, dass in der ersten Fibroblastenlinie ein großer Bestrahlungs-Effekt zu erwarten ist, in der zweiten Fibroblastenlinie jedoch nicht.

A Fibroblastenlinie 1



B Fibroblastenlinie 2

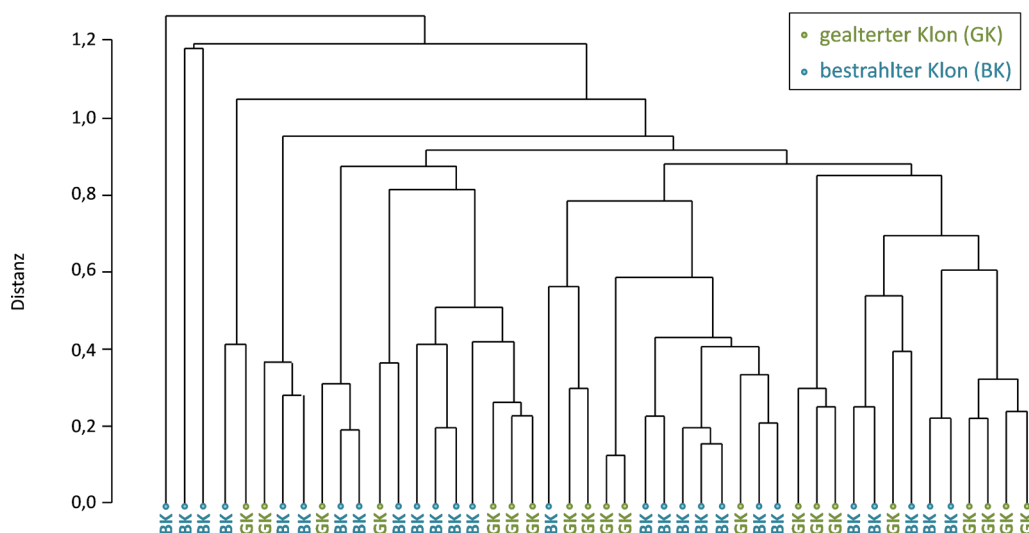


Abbildung 26: Dendrogramme zur Visualisierung der Ähnlichkeit zwischen gealterten und bestrahlten Klonen. Abgebildet sind die gealterten Klone und die bestrahlten Klone der Fibroblastenlinien 1 **(A)** und 2 **(B)**. Cluster bestehen aus Proben, die zueinander eine geringere Distanz aufweisen als zu den Proben anderer Cluster.

Für den Vergleich der genomweiten DNA-Methylierungs-Profile auf Einzelnukleotid-Ebene zwischen gealterten Klonen und bestrahlten Klonen wurden für die zwei Array-Datensätze verschiedene Filter-Kriterien verwendet.

Um nach den signifikantesten DMPs zu filtern, wurde im ersten Array-Datensatz ein adjustierter p-Wert von 0,001 angesetzt, woraufhin 34.515 CpG-Stellen als differentiell methyliert zwischen gealterten Klonen und bestrahlten Klonen identifiziert wurden. 24.152 dieser CpGs wurden an Genregionen von 10.872 verschiedenen Genen annotiert. Im zweiten Array-Datensatz wurden 4.452 DMPs detektiert (adjustierter p-Wert<0,05), wovon 3.324 CpGs 2.761 verschiedenen Genen zugeordnet wurden. 61 % der DMPs in Array-Datensatz 1 und 68 % der DMPs in Array-Datensatz 2 waren in bestrahlten Klonen hypomethyliert.

Die Anzahl der DMPs, die zwischen den zwei Array-Datensätzen überlappten, war eher gering. Nur 396 CpGs wurden in beiden Experimenten als differentiell methyliert zwischen gealterten Klonen und bestrahlten Klonen identifiziert. Die β -Differenzen zwischen gealterten Klonen und bestrahlten Klonen dieser überlappenden CpGs des ersten Array-Datensatzes korrelierten positiv mit den β -Differenzen des zweiten Datensatzes (Spearman-Rho=0,199; $p < 0,001$). Eine Genset-Anreicherungs-Analyse mit den 259 Genen, die den 396 CpGs zugeordnet wurden, ergab einen angereicherten Terminus (adjustierter p-Wert $< 0,1$), den MAPK-Signalweg (Tabelle 21).

Es ist bekannt, dass sich die Reaktion auf Bestrahlung zwischen verschiedenen Individuen sehr stark unterscheiden kann. Dies könnte durch unterschiedliche genetische Faktoren bedingt sein, die zu verschiedenen intrinsischen zellulären Reaktion auf Schäden, die durch Bestrahlung ausgelöst werden, führen [218]. Da sich die Anzahl der CpGs, die als differentiell methyliert identifiziert wurde, zwischen den zwei Array-Datensätzen sehr stark unterscheidet, könnte man annehmen, dass die Fibroblastenlinie 1, die für das erste Experiment verwendet wurde, stärker auf Strahlenexposition reagiert als Fibroblastenlinie 2, die als Ausgangsmaterial für das zweite Experiment diente. Unter dieser Annahme wurden die DNA-Methylierungs-Veränderungen der Fibroblastenlinie 1 noch einmal genauer betrachtet. Es wurde nach Genen gefiltert, die mindestens zwei DMPs enthielten, woraufhin 2.757 Gene übrigblieben. Eine Anreicherungs-Analyse mit diesen Genen resultierte in 63 angereicherten Termini. Die vollständige Liste der angereicherten Begriffe kann dem Anhang entnommen werden (Tabelle 26). Die ersten zehn angereicherten Termini werden in Tabelle 21 präsentiert, angeführt von dem Terminus Signalwege in Krebs. Der MAPK-Signalweg, der bereits angereichert war als beide Experimente beachtet wurden, tauchte auch unter den ersten zehn Termini wieder auf.

Tabelle 21: Ergebnisse der Genset-Anreicherungs-Analysen im Zusammenhang mit den Langzeit-Effekten ionisierender Strahlung.

Terminus	Überlapp	p-Wert	Adjustierter p-Wert	CS	Gene	
Fibroblastenlinie 1 und 2						
MAPK-Signalweg	hsa04010	12/255	1,3E-04	0,021	17,9	MAP2K3;CACNG6;IL1A;CACNA2D1;CACNA1B;CACNA1A; CACNA1D;FOS;FLNC; MAP3K6;MAPK8IP3;MAP3K5
Fibroblastenlinie 1						
Signalwege in Krebs	hsa05200	101/397	3,3E-10	7,4E-08	46,0	RB1;SPI1;CSF3R;HHIP;ITGA2B;FGF1;FGF2;ETS1;IGF1R;RASSF1;EDNRB;CCND1;AKT2;PRKACA;PDGFRB;WNT5B;PRKCB;DAPK1;WNT5A;PRKCA;MITF;BCR; ADCY9;COL4A2;COL4A1;AGTR1;CSF1R;CTBP2;CTBP1;EPAS1;PDGFB;PLD1;WNT6;FGF20;FADD;WNT4;STAT5A;CREBBP;WNT10A;SMAD3;WNT3A; ZBTB16;FZD6;BRAF;IGF1;GNG12;NFKB1;CDK6;FGF14;GNB1;BCL2;GNAS;GRB2;FGF12;FGFR3;FGFR2;CDKN1A;HSP90AB1;PIK3CD;GLI3;GLI2;MECOM; BDKRB2;BDKRB1;JAK1;APC2;PLEKHG5;NCOA4;TGFB2;CCNA1;PAX8;TRAF3;RARA;ITGA6;BIRC7;MET;PPARD;LAMA2;HDAC1;PTGER3;LAMA3;ADCY4; ADCY2;ADCY8;ADCY6;EGFR;RXRB;RXRA;GNG7;GNA12;CTNNA3;CTNNA2;RUNX1T1;NTRK1;TCF7L2; TCF7L1;LAMB3;PML;VEGFA;MAPK10; KRAS
Calcium-Signalweg	hsa04020	57/180	5,2E-10	7,4E-08	41,3	CHRM2;RYR1;RYR2;OXTR;HTR2A;RYR3;SLC8A1;SLC8A2;EDNRB;BDKRB2;PLCE1;BDKRB1;NOS1;PRKACA;PDGFRB;PRKCB;SPHK2;PRKCA;TACR1;ITPKB; ADCY9;STIM1;LTB4R2;CCKBR;ORAI2;AGTR1;CAMK2B;PDE1A;PTGER3;ADCY4;CACNA1B;ITPR1;CACNA1A;ADCY2;CACNA1D;CACNA1C;ADCY8; CACNA1E;EGFR;CACNA1H;CACNA1G;CACNA1I;GRIN2A;GNA15;PHKG1;PTK2B;NOS3;ATP2B2;GRIN2C;HTR5A;GRIN2D;GRIN1;P2RX5;P2RX3;P2RX1; GNAS;PLCD1
Morphin-Abhängigkeit	hsa05032	36/91	1,0E-09	9,4E-08	37,4	GABRB3;GABRB2;PDE1A;ADCY4;CACNA1B;CACNA1A;ADCY2;ADCY8;ADCY6;GABRR2;PDE11A;GRK5;GNG7;GRK6;ADORA1;PDE8B;PRKACA;GABRD; KCNJ6;GABBR1;KCNJ9;GABRA5;PRKCB;PDE4D;PDE4C;PDE2A;PRKCA;OPRM1;GNG12;GABRG3;GNAO1;ADCY9;PDE10A;GNB1;GNAS; PDE7B
Rap1-Signalweg	hsa04015	62/211	2,6E-09	1,9E-07	37,3	DOCK4;FLT4;ITGA2B;ITGB2;PIK3CD;SIPA1L2;FGF1;ITGAL;FGF2;IGF1R;AKT2;PLCE1;PDGFRB;MAGI1;PRKCB;MAGI2;PRKCA;VAV2;APBB1P;ADCY9; PARD3;PRKD2;RAPGEF5;MET;SKAP1;RAPGEF4;CSF1R;SRC;ADCY4;PDGFB;ADCY2;ADCY8;PRKCZ;ADCY6;EGFR;RAP1GAP;GRIN2A;CNR1;PDGFD;PDGFC; FGF20;MAP2K6;FARP2;NGFR;ANGPT2;ANGPT1;BRAF;IGF1;MAPK12;VEGFA;GRIN1;GNAO1;EFNA3;FGF14;GNAS;KRAS;FGFR4;FGF12;FGFR3;SIPA1; FGF2;BCAR1
Fokale Adhäsion	hsa04510	59/202	8,1E-09	4,6E-07	33,9	ITGB4;FLT4;ITGA2B;PIK3CD;IGF1R;CCND1;AKT2;CAPN2;ITGB7;PDGFRB;ACTN2;PRKCB;ACTN1;PRKCA;VAV2;MYL7;COL4A2;COL4A1;MYL2;COL6A3; ITGA7;ITGA6;DOCK1;MET;SHC4;SHC2;TNXB;SHC3;LAMA2;SRC;LAMA3;PDGFB;EGFR;THBS4;PDGFD;PDGFC;MYL10;PAK6;FLNB;FYN;PIP5K1C;FLNC; LAMB3;CAV1;BRAF;PARVA;IGF1;PARVB;VEGFA;COL1A1;MAPK10;MYLPP;COL1A2;COL9A1;BCL2;COL9A3;GRB2;COL9A2;BCAR1
PI3K-Akt-Signalweg	hsa04151	82/341	2,1E-07	8,5E-06	29,4	CHRM2;CDKN1A;CSF3R;HSP90AB1;ITGB4;FLT4;ITGA2B;PIK3CD;BRCA1;FGF1;FGF2;IGF1R;RPTOR;TCL1A;CCND1;CREB3L1;AKT2;CREB3L2;ITGB7;JAK3; IL6R;JAK1;PDGFRB;G6PC;TSC2;PRKCA;OSMR;COL4A2;COL4A1;DDIT4;COL6A3;ITGA7;ITGA6;SGK1;MET;CREB5;CSF1R;PHLPP1;TNXB;ATF6B;LAMA2; LAMA3;PDGFB;EGFR;THBS4;BCL2L11;RXRA;GNG7;PDGFD;PDGFC;FGF20;NGFR;ANGPT2;LAMB3;ANGPT1;NOS3;IGF1;GNG12;NFKB1;VEGFA;COL1A1; GH2;EFNA3;COL1A2;FGF14;CDK6;PPP2R2C;PPP2R2B;GNB1;PPP2R2D;COL9A1;BCL2;COL9A3;GRB2;KRAS;COL9A2;PKN1;FGFR4;PIK3AP1;FGF12;FGFR3; FGF2
Circadiane Rhythmik	hsa04713	33/95	2,0E-07	8,5E-06	27,8	RYR1;CAMK2B;RYR2;ADCY4;ITPR1;ADCY2;CACNA1D;CACNA1C;ADCY8;ADCY6;RYR3;CACNA1H;CACNA1G;CACNA1I;GRIN2A;GNG7;NOS1;PRKACA; PRKG1;KCNJ6;KCNJ9;PRKCB;PRKCA;GNG12;GRIN2C;GRIN2D;GRIN1;GNAO1;ADCY9;PER3;GNB1; NOS1AP;GNAS
MAPK-Signalweg	hsa04010	65/255	4,2E-07	1,5E-05	26,7	ZAK;RASGRF2;FGF1;FGF2;RPS6KA4;MECOM;AKT2;RPS6KA2;STMN1;PRKACA;MAP3K6;MAP3K5;PDGFRB;MAP4K2;DAXX;PRKCB;IL1R2;CACNA2D1; CACNA2D3;CACNA2D2;RRAS2;PRKCA;CACNA2D4;MAPK8IP3;CDC25B;TGFB2;IL1B;MAPKAPK2;MAPT;PDGFB;CACNA1B;CACNA1A;CACNA1D; CACNA1C;NLK;CACNA1E;EGFR;CACNA1H;CACNA1G;CACNG6;CACNA1I;NTF3;GNA12;FGF20;FLNB;FLNC;CACNG2;MAP4K4;MAP2K6;NTRK1;BDNF; BRAF;NFATC1;GNG12;MAPK12;NFKB1;MAPK10;FGF14;TAOK2;GRB2;KRAS;FGFR4;FGF12;FGFR3;FGFR2
Aldosteron-synthese und -sekretion	hsa04925	29/81	5,2E-07	1,6E-05	25,6	CAMK2B;SCARB1;ATF6B;ADCY4;ITPR1;ADCY2;CACNA1D;CACNA1C;ADCY8;ADCY6;CACNA1H;CACNA1G;CACNA1I;CREB3L1;CREB3L2;PRKACA;CAMK1D; PRKCB;PRKCE;PDE2A;PRKCA;NR4A2;ADCY9;AGTR1;GNAS;PRKD2;DAGLB;KCNK3;CREB5
Cholinerge Synapse	hsa04725	35/111	1,2E-06	3,1E-05	24,2	CHRM2;CAMK2B;CHRNA4;CHRNA6;CHAT;ADCY4;CACNA1B;ITPR1;CACNA1A;PIK3CD;ADCY2;CACNA1D;CACNA1C;ADCY8;ADCY6;CREB3L1;GNG7;AKT2; CREB3L2;FYN;PRKACA;KCNJ6;PRKCB;KCNJ14;PRKCA;GNG12;GNAO1;ADCY9;KCNQ1;GNB1;KCNQ2;BCL2;KCNQ4;KRAS;CREB5

Die Termini der Fibroblastenlinie 1 sind nach aufsteigendem Combined Score (CS) angeordnet. Eine vollständige Liste aller 63 angereicherten Termini kann dem Anhang (Tabelle 26) entnommen werden.

3.1.2.3 Ergebnisse der epigenetischen Uhr

Die „skin & blood clock“ wurde verwendet, um das epigenetische Alter basierend auf den 450K-Methylierungs-Array-Daten zu bestimmen. Die Mittelwerte des epigenetischen Alters der Ausgangskultur-Duplikate betragen - 228 (\pm 17) Tage für die erste und - 210 (\pm 0) Tage für die zweite Fibroblastenlinie. Mit einem durchschnittlichen Alter von - 206 (\pm 11) Tagen und - 160 (\pm 25) Tagen zeigten die gealterten Klone ein um 22 und 49 Tage höheres durchschnittliches epigenetisches Alter als die jeweiligen Ausgangskulturen der ersten und der zweiten Fibroblastenlinie (Tabelle 22). Aufgrund einer zu niedrigen Probenzahl und einer hohen Variation konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden, jedoch eine Tendenz mit $p=0,084$ (Wilcoxon-Test) für Fibroblastenlinie 1 und $p=0,057$ für Fibroblastenlinie 2. Bestrahlte Klone der Fibroblastenlinie 1 hatten ein durchschnittliches Alter von - 198 (\pm 15) Tagen und der Fibroblastenlinie 2 von - 138 (\pm 24) Tagen (Tabelle 22). Die bestrahlten Klone waren somit um 8 Tage beziehungsweise 22 Tage älter als die gealterten Klone.

Tabelle 22: Epigenetisches Alter in Ausgangskultur, gealterten und bestrahlten Klonen.

	Epigenetisches Alter				
	n	MW	SF	Min	Max
Fibroblastenlinie 1					
Ausgangskultur	1	-228	17	-245	-211
gealterte Klone	12	-206	11	-271	-161
bestrahlte Klone	34	-198	15	-324	-31
Fibroblastenlinie 2					
Ausgangskultur	1	-210	0	-210	-209
gealterte Klone	20	-160	25	-251	258
bestrahlte Klone	26	-138	24	-306	200

Diese Tabelle präsentiert die Anzahl der untersuchten Proben (n) sowie den Mittelwert (MW), den Standardfehler (SF), Minimum (Min) und Maximum (Max) des epigenetischen Alters (in Tagen). Die Ausgangskultur wurde jeweils als Duplikat gemessen.

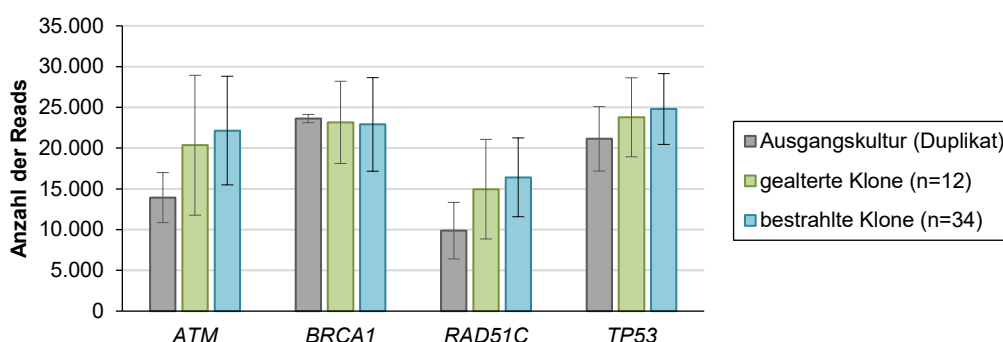
Es lag eine große Variation im epigenetischen Alter vor, sowohl in den gealterten Klonen als auch in den bestrahlten Klonen (Tabelle 22). In Fibroblastenlinie 1 waren die Varianzen der gealterten Klone und der bestrahlten Klone nicht gleich ($p=0,003$; Levene-Test). Nach Bestrahlung war die Varianz des epigenetischen Alters höher. In diesem Zusammenhang ist es auch interessant zu erwähnen, dass für beide Fibroblastenlinien manche Klone nach 20 PVs epigenetisch jünger waren als die jeweilige Ausgangskultur.

3.1.2.4 Ergebnisse des Deep Bisulfite Sequencings: DNA-Methylierung von Tumorsuppressor-Genen

Mittels DBS wurde das DNA-Methylierungs-Profil der Promotorbereiche ausgewählter Tumorsuppressor-Gene analysiert. In einem MiSeq-Lauf wurden vier verschiedene Assays (*ATM*, *BRCA1*, *RAD51C* und *TP53*) in 96 Proben untersucht. Die Proben setzten sich aus den 12 gealterten und 34 bestrahlten Klonen der ersten Fibroblastenlinie, den 20 gealterten und 26 bestrahlten Klonen der zweiten Fibroblastenlinie sowie den jeweiligen Ausgangskultur-Duplikaten zusammen.

In Abbildung 27 ist die durchschnittliche Anzahl der Reads pro Assay, aufgetrennt nach den beiden Fibroblastenlinien, dargestellt. Für *RAD51C* wurde die geringste Abdeckung erreicht, allerdings entspricht dieser Assay auch dem längsten Amplikon (Tabelle 8). Alle Assays weisen mit einer durchschnittlichen Anzahl von über 10.000 Reads eine hohe Abdeckung auf.

A Fibroblastenlinie 1



B Fibroblastenlinie 2

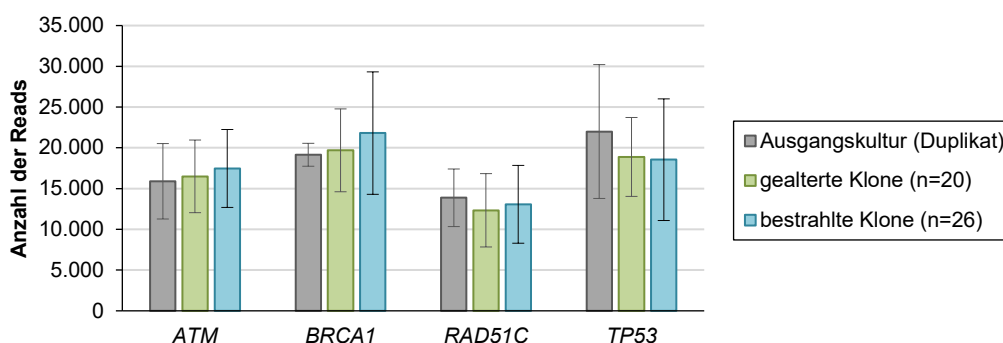


Abbildung 27: Durchschnittliche Anzahl an Reads pro Assay. Abgebildet ist die Anzahl der Reads für die Ausgangskultur, die gealterten Klone und die bestrahlten Klone der Fibroblastenlinie 1 (**A**) und 2 (**B**) der vier untersuchten Assays. Die Anzahl der analysierten Proben ist in Klammern angegeben (n). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Zunächst wurde für jedes Gen die durchschnittliche DNA-Methylierung über alle CpGs und alle Reads betrachtet. *TP53* wies mit einer DNA-Methylierung von 0,20 % in beiden

Ausgangskulturen die geringste DNA-Methylierung auf, gefolgt von *ATM* (0,25 %) und *BRCA1* (0,30 % und 0,25 %). Die DNA-Methylierung von *RAD51C* lag in den Ausgangskulturen bei 0,90 % bzw. 0,55 % (Tabelle 23).

Um den Effekt der *in vitro* Alterung auf die durchschnittliche DNA-Methylierung zu untersuchen, wurde diese zwischen der Ausgangskultur und den gealterten Klonen verglichen. Für *RAD51C* wurde sowohl in Fibroblastenlinie 1 ($p=0,014$; Wilcoxon-Test) als auch in Fibroblastenlinie 2 ($p=0,048$) eine signifikante Erhöhung der DNA-Methylierung in den gealterten Klonen beobachtet. Auch für *ATM* konnte in der ersten Fibroblastenlinie ein Trend in Richtung erhöhter DNA-Methylierung in den gealterten Klonen detektiert werden ($p=0,071$). Für *BRCA1* wiesen die gealterten Klone der Fibroblastenlinie 1 dagegen eine reduzierte DNA-Methylierung auf ($p=0,041$) (Tabelle 23).

Tabelle 23: Durchschnittliche DNA-Methylierung über alle CpGs und alle Reads.

	<i>ATM</i>			<i>BRCA1</i>			<i>RAD51C</i>			<i>TP53</i>		
	n	MW	SF	n	MW	SF	n	MW	SF	n	MW	SF
Fibroblastenlinie 1												
Ausgangskultur	1	0,250	0,050	1	0,300	0,000	1	0,900	0,100	1	0,200	0,000
gealterte Klone	12	0,317	0,046	12	0,283	0,017	12	1,192	0,112	12	0,208	0,008
bestrahlte Klone	34	0,294	0,026	34	0,277	0,008	34	2,156	0,284	34	0,209	0,005
Fibroblastenlinie 2												
Ausgangskultur	1	0,250	0,050	1	0,250	0,050	1	0,550	0,050	1	0,200	0,000
gealterte Klone	20	0,250	0,011	20	0,260	0,112	20	0,755	0,105	20	0,205	0,005
bestrahlte Klone	26	0,262	0,011	26	0,277	0,008	26	0,689	0,056	25	0,204	0,004

Diese Tabelle präsentiert die Anzahl der untersuchten Proben (n) sowie den Mittelwert (MW) und Standardfehler (SF) der durchschnittlichen DNA-Methylierungs-Level (in %) der vier untersuchten Tumorsuppressorgene. Die Ausgangskultur wurde jeweils als Duplikat gemessen.

Um den Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung der vier Tumorsuppressor-Gene zu analysieren, wurden die Mittelwerte der durchschnittlichen DNA-Methylierung zwischen den gealterten und den bestrahlten Klonen verglichen. Die größte Differenz konnte für *RAD51C* mit einer Zunahme um 0,96 % in den bestrahlten Klonen der ersten Fibroblastenlinie detektiert werden ($p=0,069$; Mann-Whitney-U-Test).

Um neben der durchschnittlichen DNA-Methylierung über alle CpGs die DNA-Methylierung auch auf Einzelallel-Ebene zu analysieren, wurden die einzelnen Reads betrachtet und der Anteil der Reads mit Einzel-CpG-Fehlern (ECF-Reads) ermittelt. Einzel-CpG-Fehler liegen vor, wenn einzelne CpGs methyliert sind, während der Großteil der nebeneinanderliegenden CpGs eines Reads unmethyliert ist. Da bei der Datenanalyse ein strikter Filter gewählt wurde, der keine ungewissen CpGs zulässt, wurden bereits Reads mit nur einem methylierten CpG als

ECF-Read gezählt. Die durchschnittlichen Anteile an ECF-Reads für die Ausgangskulturen, die gealterten Klone und die bestrahlten Klone werden in Tabelle 24 präsentiert.

Tabelle 24: Anteil an Reads mit Einzel-CpG-Fehlern.

	<i>ATM</i>			<i>BRCA1</i>			<i>RAD51C</i>			<i>TP53</i>		
	n	MW	SF	n	MW	SF	n	MW	SF	n	MW	SF
Fibroblastenlinie 1												
Ausgangskultur	1	7,8	0,2	1	3,6	0,2	1	26,2	1,4	1	3,3	0,2
gealterte Klone	12	9,2	1,2	12	3,4	0,1	12	33,3	2,8	12	3,3	0,1
bestrahlte Klone	34	8,7	0,7	34	3,5	0,1	34	44,3	2,7	34	3,4	0,0
Fibroblastenlinie 2												
Ausgangskultur	1	7,7	0,2	1	3,2	0,2	1	17,1	0,8	1	3,3	0,1
gealterte Klone	20	7,7	0,1	20	3,3	0,1	20	22,5	1,9	20	3,4	0,0
bestrahlte Klone	26	7,8	0,2	26	3,3	0,0	26	21,7	1,5	25	3,4	0,0

Diese Tabelle präsentiert die Anzahl der untersuchten Proben (n) sowie den Mittelwert (MW) und Standardfehler (SF) des Anteils der Reads mit mindestens einem CpG-Fehler (in %) der vier untersuchten Tumorsuppressorgene. Die Ausgangskultur wurde jeweils als Duplikat gemessen.

Da in den Ausgangskulturen beider Fibroblastenlinien für alle vier Gene keine Reads mit mehr als 20 % DNA-Methylierung detektiert wurden, wurde dieser Schwellenwert festgelegt, um gealterte und bestrahlte Klone zu identifizieren, die Reads mit einer höheren DNA-Methylierung aufweisen. Diese Klone sind in Abbildung 28 und Abbildung 29, die die Anteile der ECF-Reads für jede einzelne Probe präsentieren, durch rote Pfeile markiert.

Für *ATM* lag der durchschnittliche Anteil an ECF-Reads in den Ausgangskulturen bei 7,7 % in Fibroblastenlinie 1 und bei 7,8 % in Fibroblastenlinie 2. Während der Anteil an ECF-Reads in Fibroblastenlinie 2 weder in den gealterten noch in den bestrahlten Klonen zunahm, war er in den gealterten Klonen der Fibroblastenlinie 1 um 1,4 % erhöht. Im Vergleich zu den gealterten Klonen wiesen die bestrahlten Klone dieser Fibroblastenlinie einen um 0,5 % reduzierten Anteil an ECF-Reads auf (Tabelle 24). In einem von 12 gealterten Klonen (8,3 %) und einem von 34 bestrahlten Klonen (2,9 %) wurden Reads mit einer DNA-Methylierung über 20 % detektiert (Abbildung 28 A). Auch in Fibroblastenlinie 2 zeigte einer der 26 bestrahlten Klone (3,8 %) Reads mit mehr als 20 % DNA-Methylierung (Abbildung 28 B). Das *ATM*-Amplikon deckt 32 CpGs ab und es wurden Reads mit maximal neun methylierten CpGs detektiert (28 % DNA-Methylierung).

Für das Tumorsuppressor-Gen *BRCA1* lag der Anteil an ECF-Reads in den Ausgangskulturen bei 3,6 % beziehungsweise 3,2 % (Tabelle 24). In Fibroblastenlinie 1 war der Anteil an ECF-Reads in den gealterten Klonen niedriger als in der Ausgangskultur (p=0,041, Wilcoxon-Test). Für

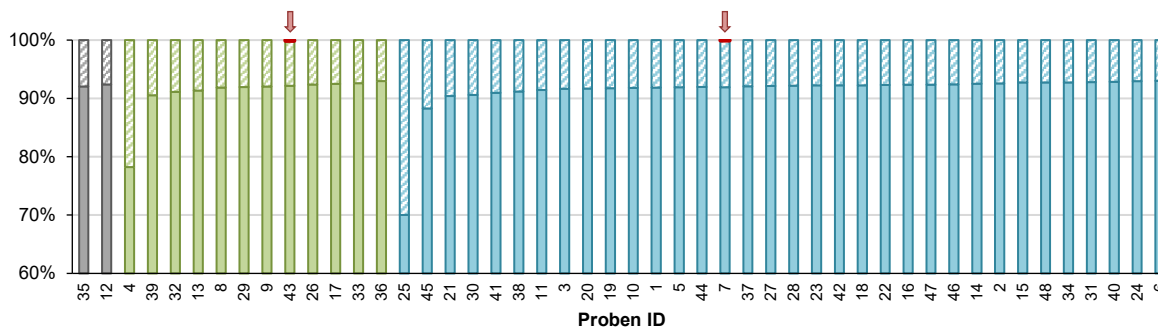
BRCA1 konnte in einem der 12 gealterten Klone (8,3 %) der ersten Fibroblastenlinie sowie in fünf der 34 bestrahlten Klone (14,7 %) der ersten Fibroblastenlinie und in vier der 26 bestrahlten Klone (15,4 %) der zweiten Fibroblastenlinie Reads mit einer DNA-Methylierung über 20 % detektiert werden (Abbildung 28 C und D). Durch den *BRCA1*-Assay wurden 13 CpGs analysiert, Reads wiesen eine maximale DNA-Methylierung von 38 % auf (5 CpGs).

Das Tumorsuppressor-Gen *RAD51C* wies mit 26,2 % in Fibroblastenlinie 1 und 17,1 % in Fibroblastenlinie 2 bereits in den Ausgangskulturen einen relativ hohen Anteil an ECF-Reads auf (Tabelle 24). In gealterten und in bestrahlten Klonen war dieser Anteil teilweise stark erhöht. Das war vor allem in den bestrahlten Klonen der Fibroblastenlinie 1 (Abbildung 29 A) zu beobachten. Bei dem Vergleich der Ausgangskultur mit den gealterten Klonen konnte in beiden Fibroblastenlinien ein signifikanter Unterschied für *RAD51C* gefunden werden. Gealterte Klone wiesen einen in Fibroblastenlinie 1 um 7,1 % ($p=0,019$; Wilcoxon-Test) und in Fibroblastenlinie 2 um 5,4 % ($p=0,002$) erhöhten Anteil an ECF-Reads auf. In Fibroblastenlinie 1 zeigten die bestrahlten Klone im Vergleich zu den gealterten Klonen einen um 11 % erhöhten Anteil an ECF-Reads ($p=0,068$; Mann-Whitney-U-Test) (Tabelle 24). Für *RAD51C* konnten in 8,3 % (1/12) und 5 % (1/20) der gealterten Klone der ersten und der zweiten Fibroblastenlinie Reads mit mehr als 20 % DNA-Methylierung detektiert werden. In 13 der 34 bestrahlten Klone (38,2 %) der Fibroblastenlinie 1 lagen Reads mit mehr als 20 % DNA-Methylierung vor (Abbildung 29 A und B). Im *RAD51C*-Assay wurden 39 CpGs abgedeckt, wovon in manchen Reads maximal 14 methyliert vorlagen (36 % DNA-Methylierung).

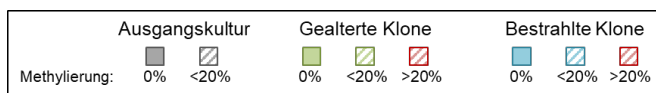
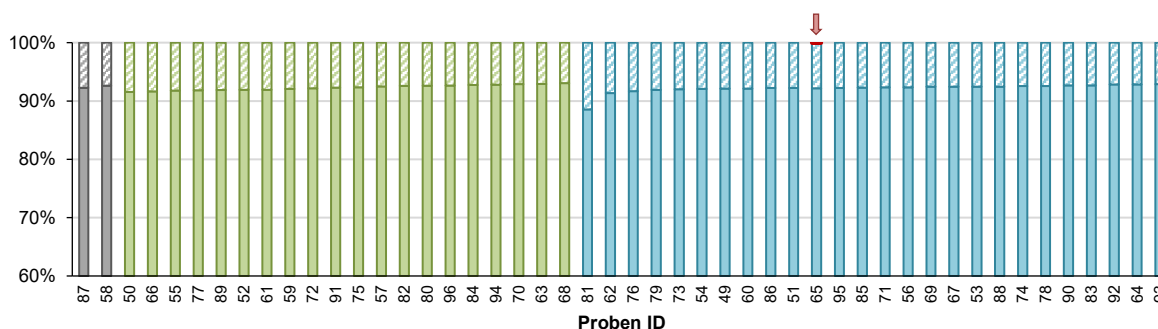
Für das *TP53*-Gen lag der Anteil an ECF-Reads in den Ausgangskulturen jeweils bei 3,3 % und nahm weder in den gealterten Klonen noch in den bestrahlten Klonen zu (Tabelle 24). Für *TP53* konnten in keiner einzigen der 96 untersuchten Proben Reads mit mehr als 20 % DNA-Methylierung detektiert werden (Abbildung 29 C und D). Von den 15 CpGs des *TP53*-Amplikons waren maximal drei methyliert (20%).

Manche Klone der ersten Fibroblastenlinie wiesen Reads mit einer DNA-Methylierung über 20 % in mehr als einem Gen auf. Ein gealterter Klon und drei bestrahlte Klone zeigten sowohl in *BRCA1* als auch in *RAD51C* Reads mit mehr als 20 % DNA-Methylierung (gealterter Klon 8; bestrahlte Klone 2, 24, 37). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung das Auftreten aberranter Allele in multiplen Genen sein könnte.

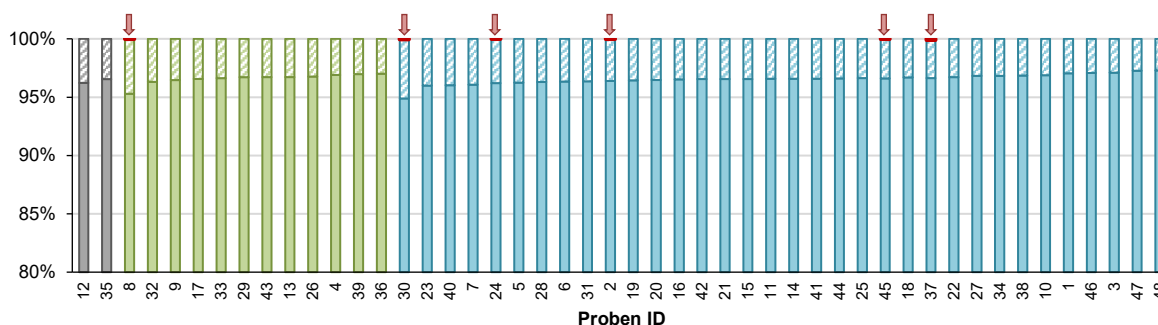
A ATM Fibroblastenlinie 1



B ATM Fibroblastenlinie 2



C BRCA1 Fibroblastenlinie 1



D BRCA1 Fibroblastenlinie 2

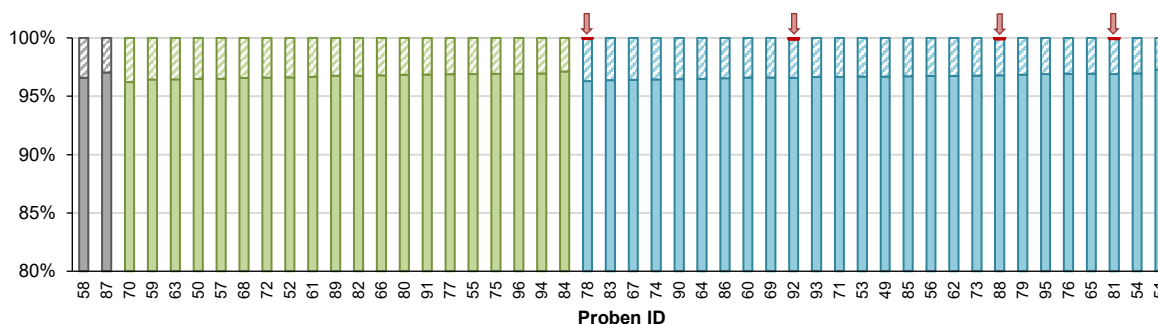
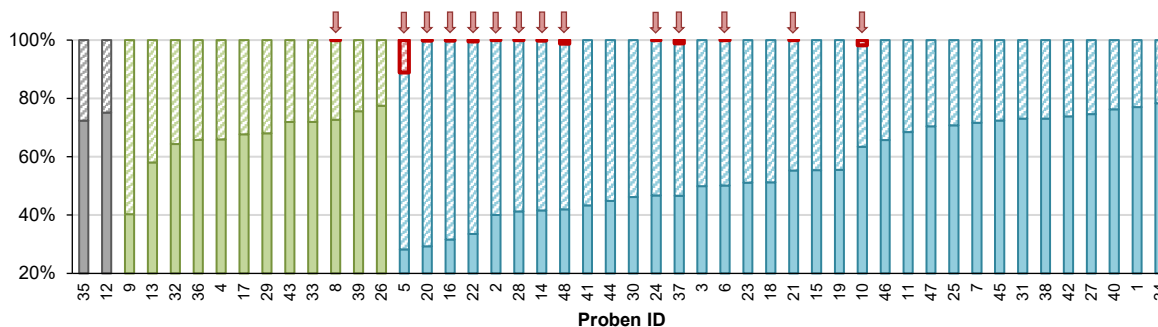
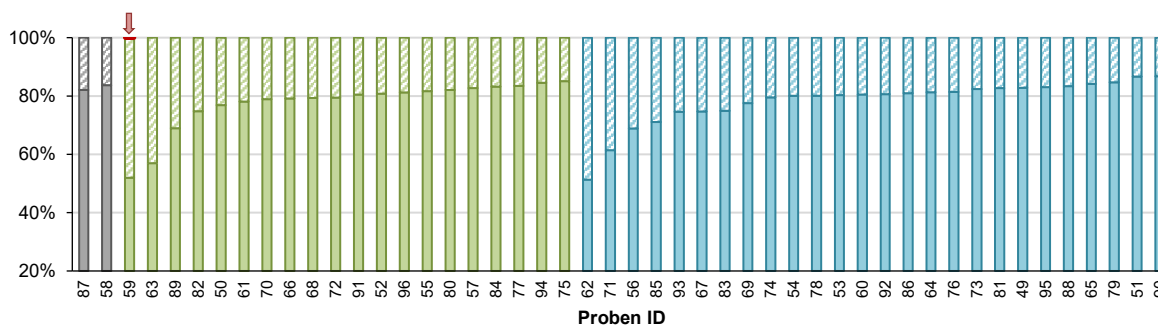


Abbildung 28: Prozentuale Verteilung der Reads für ATM und BRCA1 für die einzelnen Proben. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an unmethylierten Reads und an Reads mit Einzel-CpG-Fehlern (ECF-Reads) für ATM (A, B) und BRCA1 (C, D). Ausgefüllte Balken repräsentieren unmethylierte Reads, mit Musterfüllung gefüllte Balken den Anteil an ECF-Reads. Die Ausgangskultur-Duplikate sind in grau dargestellt, gealterte Klone in grün und bestrahlte Klone in blau. Die Proben sind innerhalb jeder Gruppe nach abnehmendem Anteil an ECF-Reads geordnet. Der Anteil an Reads mit einer DNA-Methylierung über 20 % ist rot markiert. Klone, für die Reads mit über 20 % DNA-Methylierung detektiert wurden, sind zusätzlich mit einem roten Pfeil markiert.

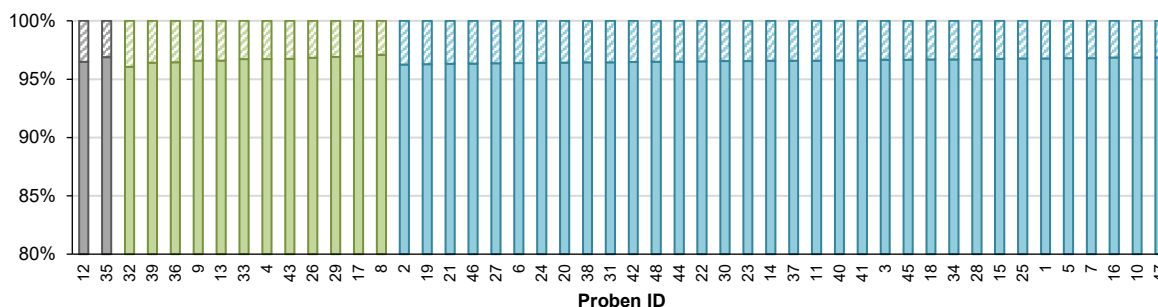
A *RAD51C* Fibroblastenlinie 1



B *RAD51C* Fibroblastenlinie 2



C *TP53* Fibroblastenlinie 1



D *TP53* Fibroblastenlinie 2

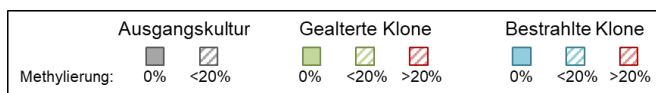
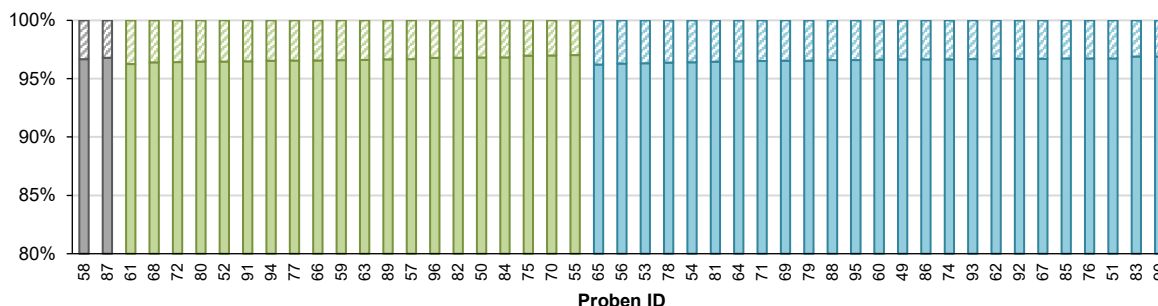


Abbildung 29: Prozentuale Verteilung der Reads für *RAD51C* und *TP53* für die einzelnen Proben. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an unmethylierten Reads und an Reads mit Einzel-CpG-Fehlern (ECF-Reads) für *RAD51C* (**A**, **B**) und *TP53* (**C**, **D**). Ausgefüllte Balken repräsentieren unmethylierte Reads, mit Musterfüllung gefüllte Balken den Anteil an ECF-Reads. Die Ausgangskultur-Duplikate sind in grau dargestellt, gealterte Klone in grün und bestrahlte Klone in blau. Die Proben sind innerhalb jeder Gruppe nach abnehmendem Anteil an ECF-Reads geordnet. Der Anteil an Reads mit einer DNA-Methylierung über 20 % ist rot markiert. Klone, für die Reads mit über 20 % DNA-Methylierung detektiert wurden, sind zusätzlich mit einem roten Pfeil markiert.

Für *RAD51C* konnte in beiden Fibroblastenlinien ein Effekt der *in vitro* Alterung und in der ersten Fibroblastenlinie ein tendenzieller Effekt der Bestrahlung beobachtet werden.

Um einen Überblick darüber zu bekommen, ob sich die Einzel-CpG-Fehler auf wenige bestimmte CpGs beschränken oder über verschiedene CpGs verteilt sind, wurde die durchschnittliche DNA-Methylierung pro CpG und pro Probe ermittelt und in Abbildung 30 dargestellt. In der Ausgangskultur der ersten Fibroblastenlinie lagen CpGs mit einer maximalen DNA-Methylierung von 4 % vor, in der zweiten Fibroblastenlinie mit maximal 1 %. In manchen Klonen konnten dagegen CpGs detektiert werden, die DNA-Methylierungs-Werte über 10 % zeigten.

3.2 Veränderungen der DNA-Methylierung in Gesamtblut von WS-Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Veränderungen der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit vorzeitigem Altern untersucht. Dafür standen DNA-Proben aus Gesamtblut von 18 WS-Patienten und 18 sorgfältig nach Alter und Geschlecht zugeordneten gesunden Kontrollen zur Verfügung (Abbildung 31).

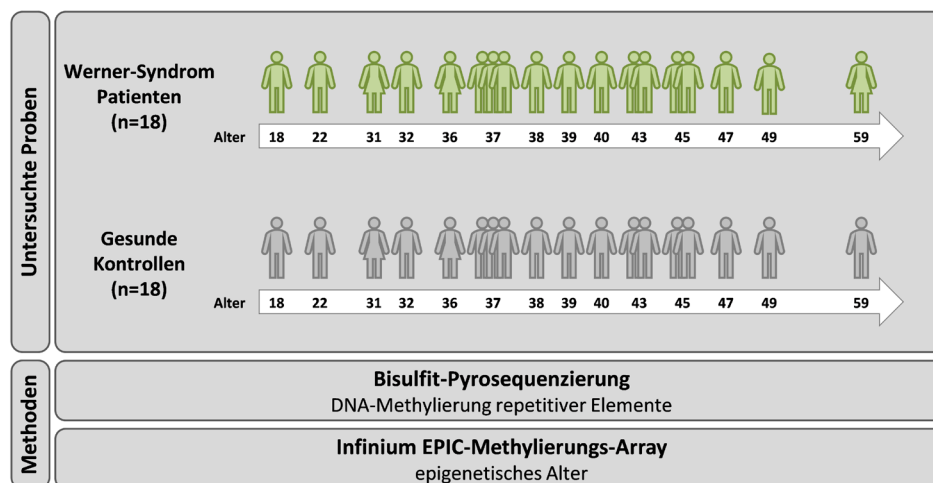


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Verteilung des Alters und des Geschlechts über die WS-Patienten und die Kontrollen. Mittels Pyrosequenzierung wurde die DNA-Methylierung repetitiver Elemente analysiert. Basierend auf Infinium EPIC-Methylierungs-Array-Daten wurde das epigenetische Alter ermittelt.

Die Ergebnisse zur epigenetischen Uhr wurden in der Publikation „Accelerated epigenetic aging in Werner syndrome“, die 2017 in *Aging* erschienen ist, veröffentlicht [219].

3.2.1 Pyrosequenzierungs-Ergebnisse - DNA-Methylierung repetitiver Elemente

Das Altern ist im Allgemeinen mit einem Verlust der globalen DNA-Methylierung assoziiert, die vor allem an repetitiven DNA-Sequenzen auftritt [89]. Um die Hypothese zu testen, dass Patienten, die durch Kennzeichen des vorzeitigen Alterns charakterisiert sind, einen weiter fortgeschrittenen Verlust der globalen DNA-Methylierung aufweisen als Kontrollen des gleichen Alters, wurden die repetitiven Elemente α -Satelliten-DNA, ALU und LINE-1 mittels Pyrosequenzierung untersucht.

Für die α -Satelliten-DNA gab es keinen Unterschied in der durchschnittlichen DNA-Methylierung zwischen WS-Patienten und Kontrollen, für ALU und LINE-1 betrug die Differenz je + 0,3 %. Die Unterschiede in der durchschnittlichen DNA-Methylierung der repetitiven Elemente zwischen Kontrollen und WS-Patienten waren somit nur sehr gering (Abbildung 32).

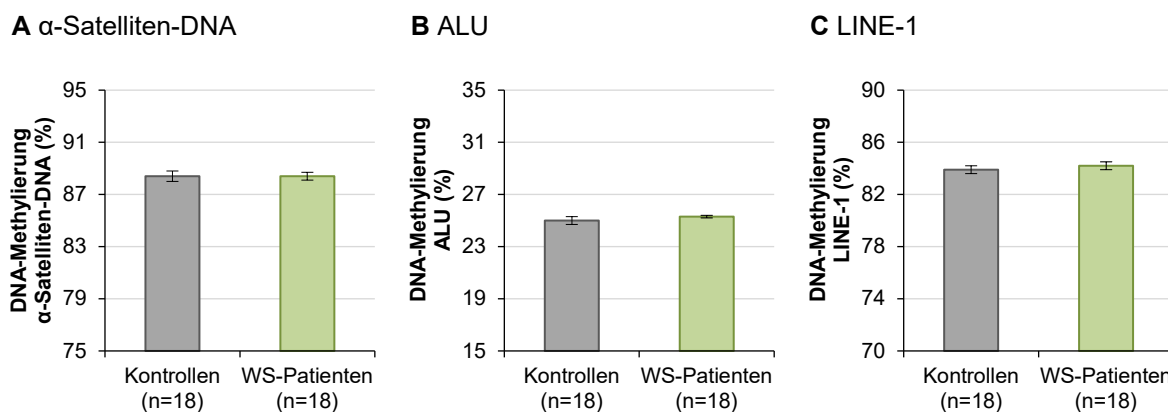


Abbildung 32: DNA-Methylierung der repetitiven Elemente in WS-Patienten und Kontrollen. Dargestellt sind die DNA-Methylierungs-Level der repetitiven Elemente α -satelliten DNA (A), ALU (B) und LINE-1 (C). Die Anzahl der untersuchten Proben ist in Klammern angegeben (n). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler präsentiert.

Da die DNA-Methylierung der rDNA bereits mit dem Alter und mit Krebs assoziiert wurde, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die DNA-Methylierung des rDNA-Promotors in WS-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen verändert sein könnte. WS-Patienten wiesen eine um 2,2 % erhöhte DNA-Methylierung der untersuchten Region 1 sowie eine um 2,5 % erhöhte DNA-Methylierung der untersuchten Region 2 auf (Abbildung 33).

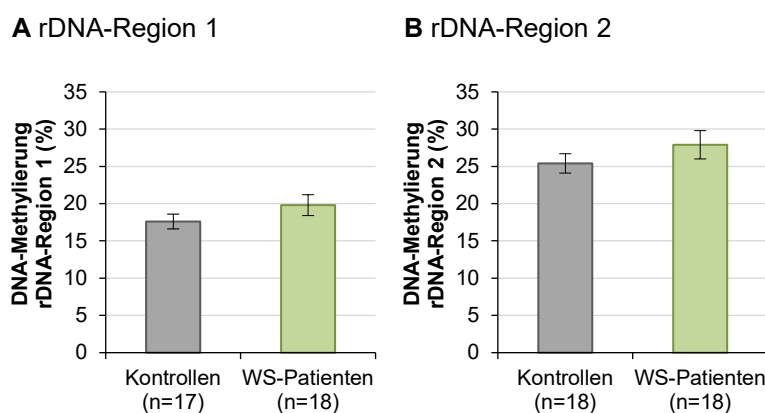


Abbildung 33: DNA-Methylierung der rDNA in WS-Patienten und Kontrollen. Dargestellt sind die DNA-Methylierungs-Level der rDNA-Region 1 (A) und 2 (B). Die Anzahl der untersuchten Proben ist in Klammern angegeben (n). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler präsentiert.

3.2.2 Ergebnisse der epigenetischen Uhr

Basierend auf den Infinium EPIC-Methylierungs-Array-Daten wurde für die WS-Patienten und die Kontrollen mit Hilfe der epigenetischen Uhr („Horvath’s clock“) das epigenetische Alter bestimmt. Wie erwartet, lag eine starke lineare Beziehung zwischen dem epigenetischen Alter und dem chronologischen Alter vor (Pearson’s $r=0,83$; $p<0,001$) (Abbildung 34).

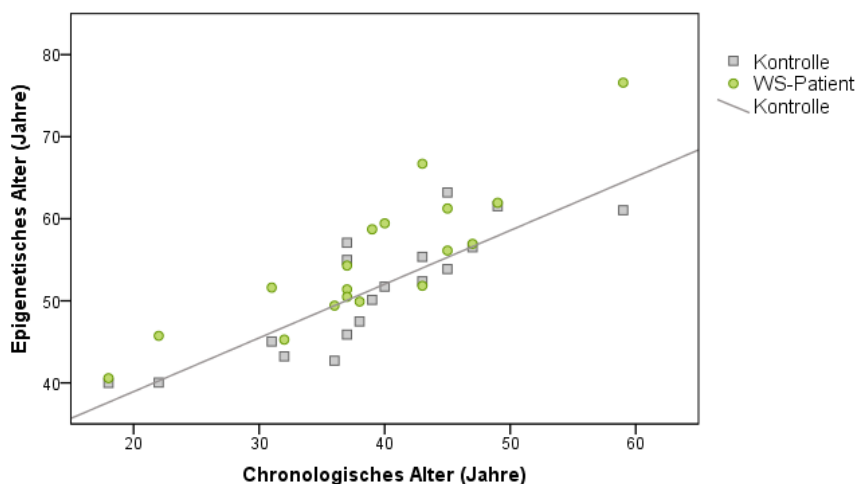


Abbildung 34: Epigenetisches Alter in WS-Patienten und Kontrollen. Das epigenetische Alter (y-Achse) ist gegen das chronologische Alter (x-Achse) aufgetragen. Gesunde Kontrollen sind als graue Vierecke, WS-Patienten als grüne Kreise dargestellt. Die graue Linie repräsentiert die Regressionslinie durch die Kontrollen.

WS konnte mit allen drei Messungen zur Beschleunigung des epigenetischen Alterns signifikant assoziiert werden, wobei die Assoziation für EEAA ($p=0,006$, Mann-Whitney-U-Test) stärker war als für AgeAccel ($p=0,011$) und für IEAA ($p=0,034$) (Abbildung 35).

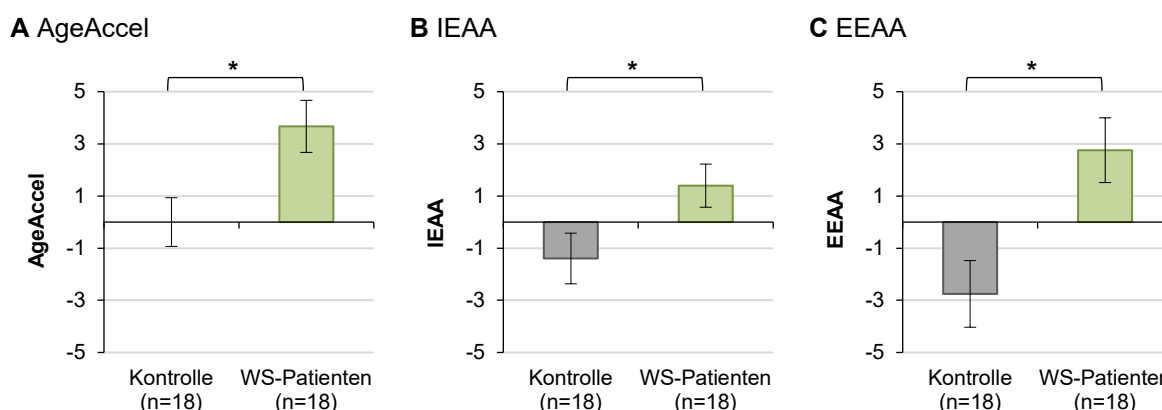


Abbildung 35: Messungen zur Beschleunigung des epigenetischen Alterns in WS-Patienten und Kontrollen. Dargestellt sind die Werte der drei Messungen zur Beschleunigung des Alterns: AgeAccel (A), Beschleunigung des intrinsischen epigenetischen Alterns (IEAA) (B) und des extrinsischen epigenetischen Alterns (EEAA) (C). Die Anzahl der untersuchten Proben ist in Klammern angegeben (n). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler präsentiert. Das Sternchen kennzeichnet einen signifikanten Gruppen-Unterschied ($*p < 0,05$; Mann-Whitney U-Test).

Da die Patienten und Kontrollen nach Geschlecht und Alter in passende Paare gruppiert wurden, wurden ein univariates konditionales logistisches Regressions-Model erstellt, in dem das paarweise Design beachtet wurde und in dem automatisch für das chronologische Alter und Geschlecht adjustiert wurde. Nach diesen Regressionsmodellen ist WS (abhängige Variable) signifikant mit AgeAccel ($p=0,047$, Regressions-Koeffizient=0,26, Standardfehler=0,13), mit IEAA ($p=0,045$, Regressions-Koeffizient=0,27, Standardfehler=0,14) und in

geringerem Maße mit EAAA ($p=0,071$, Regressions-Koeffizient= $0,16$, Standardfehler= $0,09$) assoziiert.

Um den tatsächlichen Wert der Beschleunigung des Alterns zu bestimmen, wurde ein multivariates Regressionsmodell erstellt, das die Parameter Krankheits-Status, Alter, Geschlecht sowie Werte zur Blutzell-Zusammensetzung enthält (Tabelle 25). WS ist mit einem um 6,44 Jahre erhöhtem Alter assoziiert.

Tabelle 25: Multivariates Regressionsmodell.

Kovariate	Koeffizient	Standardfehler	T-Statistik	p-Wert
Chronologisches Alter	0,663	0,10	6,40	$6,2 \times 10^{-7}$
Krankheits-Status (WS)	4,250	1,56	2,72	0,01
Geschlecht (weiblich)	-1,980	2,14	-0,92	0,36
CD4+ T-Zellen	35,429	27,09	1,31	0,20
Granulozyten	34,037	19,65	1,73	0,09
Natürliche Killerzellen	17,977	24,02	0,75	0,46
Naïve CD8+ T-Zellen	-0,004	0,02	-0,17	0,86

Das epigenetische Alter (Resultat) wird auf das chronologische Alter, Krankheits-Status, Geschlecht und Blutzell-Werte regressiert. WS ist mit einem um $(4,25:0,66=)$ 6,44 Jahre erhöhtem Alter assoziiert.

In einer weiteren Analyse wurde untersucht, ob WS mit den Blutzell-Werten, die anhand der Methylierungs-Array-Daten geschätzt wurden, in Verbindung gebracht werden kann. Durch den Vergleich der Blutzell-Werte zwischen WS-Patienten und gesunden Kontrollen konnte eine signifikante Abnahme an naïven CD8+ T-Zellen in WS-Patienten ($p=0,025$) beobachtet werden. Dieser p-Wert übersteht allerdings die Adjustierung für multiple Vergleiche nicht. Außerdem ist WS in einem konditionalen logistischen Regressionsmodell, das für das paarweise Proben-Design adjustiert, nicht mit naïven CD8+ T-Zellen assoziiert ($p=0,16$). Auch kein weiterer Blutzell-Wert konnte mit dem Krankheits-Status in Verbindung gebracht werden.

4 Diskussion

4.1 Veränderungen der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit *in vitro* Alterung und ionisierender Strahlung

4.1.1 Effekte der *in vitro* Alterung auf die DNA-Methylierung

Der größte Risikofaktor für viele Krankheiten, einschließlich Diabetes, neurodegenerativer Krankheiten, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs, ist ein hohes Alter [189]. Die Identifizierung der molekularen Mechanismen, die dem Prozess des Alterns zugrunde liegen, und der Wege zur Manipulation dieser Mechanismen sind wichtige Ziele für die Verbesserung der menschlichen Gesundheit. Absicht dieser Arbeit war es DNA-Methylierungs-Veränderungen im Zusammenhang mit dem Altern zu untersuchen, um zur Aufklärung der altersassoziierten epigenetischen Veränderungen beizutragen.

Es wird angenommen, dass die Alterung in Zellkultur altersassoziierte Veränderungen reflektiert, die auch in menschlichen Zellen *in vivo* auftreten. Daher können Zellen, die fortlaufend in Kultur wachsen, als Modellsystem für mit dem Altern in Verbindung stehende molekulare und zelluläre Veränderungen betrachtet werden [214]. Die zelluläre Alterung *in vitro* wurde bereits oft verwendet, um Krebs und andere altersassoziierte Krankheiten zu untersuchen [214, 215]. In dieser Arbeit wurden Einzelzell-Klone primärer humaner Fibroblasten als *in vitro* Modell für das Altern etabliert und verwendet, um altersassoziierte Veränderungen der DNA-Methylierung zu analysieren. Gealterte Klone wurden generiert, indem einzelne Zellen aus einer fetalen Fibroblastenlinie für 20 PVs expandiert wurden. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Ergebnisse reproduzierbar sind, wurden gealterte Klone ausgehend von zwei verschiedenen Fibroblastenlinien erstellt. Um Veränderungen in der DNA-Methylierung detektieren zu können, die mit der Langzeit-Kultivierung und damit auch potentiell mit dem Altern assoziiert sind, wurde die DNA-Methylierung zwischen den gealterten Klonen (20 PVs) und der jeweiligen primären Ausgangskultur (0 PVs), aus der die einzelnen Zellen für die Klonierung entnommen worden waren, verglichen. Die DNA-Methylierungswerte der Ausgangskultur dienten als Referenz oder Startpunkt und Unterschiede im DNA-Methylierungs-Profil zwischen Ausgangskultur und gealterten Klonen wurden als Resultat der *in vitro* Alterung betrachtet.

4.1.1.1 Globale Hypomethylierung durch *in vitro* Alterung

Die DNA-Methylierung der repetitiven Elemente kann stellvertretend für Veränderungen der genomweiten DNA-Methylierung analysiert werden [54]. Auch die Array-Daten erlauben eine Abschätzung der globalen DNA-Methylierung, indem ein durchschnittlicher DNA-Methylierungs-Wert über alle analysierten CpGs ermittelt wird. In beiden Fibroblastenlinien konnte die *in vitro* Alterung mit einer globalen Hypomethylierung assoziiert werden. Zum einen waren die DNA-Methylierungs-Level der repetitiven Elemente ALU, LINE1 und insbesondere der α -Satelliten-DNA im Vergleich zur Ausgangskultur in den gealterten Klonen signifikant reduziert. Zum anderen konnte auch anhand des globalen β -Wertes über alle mit dem 450K-Methylierungs-Array analysierten CpGs eine signifikante Abnahme der DNA-Methylierung in den gealterten Klonen festgestellt werden.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnisse wurde auf zellulärem Level bereits gezeigt, dass der 5mC-Gehalt der DNA in normalen diploiden Fibroblasten von Mäusen und Hamstern sowie in humanen Fibroblasten mit Kultivierung deutlich abnimmt [220]. Außerdem führte die Behandlung humaner diploider Fibroblasten mit 5-Azacytidin, einem synthetischem Nukleosid, das die DNA-Methylierung inhibiert, zu einer signifikanten Reduktion des Potenzials zur Populations-Verdoppelung der Zellen in Kultur [221]. In kultivierten embryonalen Lungenfibroblasten konnten Zhang und seine Kollegen eine globale Hypomethylierung sowohl mit replikativer Seneszenz, als auch mit stressinduzierter Seneszenz assoziieren [222].

Dass auch das Altern eines Organismus *in vivo* mit einer globalen Hypomethylierung assoziiert ist, konnten bereits viele Studien zeigen [63, 220, 223]. Der Vergleich des 5mC-Gehalts der DNA zwischen nicht kultivierten peripheren Blutlymphozyten von jungen (durchschnittliches Alter 25) und alten (durchschnittliches Alter 75) Individuen zeigte ein reduziertes DNA-Methylierungs-Level in der alten Gruppe [224]. In einer Studie von Heyn *et al.* wurde gezeigt, dass Hundertjährige und Neunzigjährige ein geringeres DNA-Methylierungs-Level aufweisen als Neugeborene. Die CpGs, die eine Hypomethylierung aufwiesen, waren über alle genomischen Regionen, wie Promotoren sowie exonische, intronische und intergenische Regionen verteilt. Unter den am häufigsten von der Hypomethylierung betroffenen intergenischen Regionen waren LINE-1 und ALU [85]. Auch in Blutproben von zwischen 55 und 92 Jahre alten Individuen konnte eine negative Korrelation zwischen dem Alter und der DNA-Methylierung von ALU und LINE-1 gezeigt werden [225]. Man geht davon aus, dass die mit

dem Alter abnehmende DNA-Methylierung von Transposons stark zu der altersassoziierten Genom-Instabilität und damit zum Prozess des Alterns beiträgt [226].

Die Aktivität der DNMT1, die für den Erhalt der DNA-Methylierung während der Replikation wichtig ist, scheint mit dem Alter abzunehmen [227, 228]. Die altersassoziierte globale Hypomethylierung ist somit wahrscheinlich durch passive Demethylierung bedingt [64]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression von *DNMT1* durch das Wachstumshormon (growth hormone, GH) beeinflusst wird, wodurch eine Verbindung zwischen der DNA-Methylierung und dem IGF1-/FOXO-Signalweg, der eine grundlegende Rolle im Prozess des Alterns spielt, besteht [229]. In Modellen, die versuchen die globale Hypomethylierung mit dem Alter zu erklären, sollten auch Veränderungen des Metabolismus beachtet werden [64]. Prozesse, die in die Methylierung und Demethylierung der DNA und potentiell in die altersassoziierte globale Hypomethylierung involviert sind, hängen mit dem 1-Kohlenstoff-Metabolismus zusammen. Dieser stellt ein Netzwerk aus miteinander verknüpften biochemischen Reaktionen, die den Transfer von 1-Kohlenstoffgruppen von einer Komponente auf eine andere beinhalten, dar. Für einige dieser Reaktionen werden Coenzyme, wie Folsäure, Vitamin B12, Vitamin B6 und Riboflavin benötigt und wichtige intermediäre Komponenten sind Methionin und Cholin [230]. Der 1-Kohlenstoff-Metabolismus wird durch genetische und durch externe Faktoren, wie durch die Nahrungsaufnahme, beeinflusst. Daher wird angenommen, dass die regelmäßige Einnahme von Stoffen, die in den 1-Kohlenstoff-Metabolismus involviert sind, wie Folsäure oder Vitamin B12, die graduelle Hypomethylierung während des Alterns verlangsamen könnte [231, 232].

4.1.1.2 Erhöhte DNA-Methylierung der rDNA durch *in vitro* Alterung

Die DNA-Methylierung des rDNA-Promotors war im Vergleich zur Ausgangskultur in den gealterten Klonen signifikant erhöht. Dieser Effekt konnte deutlich in beiden Fibroblastenlinien und für beide untersuchten rDNA-Regionen beobachtet werden. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis konnten Machwe *et al.* zeigen, dass die *in vitro* Seneszenz von Fibroblasten zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Methylierung der rDNA-Gene führt [233]. In Ratten, die 3 bis 96 Wochen alt waren, wurde für die zur humanen rDNA homologen Region eine erhöhte DNA-Methylierung in alten Ratten beobachtet [234]. Auch in Spermien und der Leber männlicher Ratten wurde das Altern mit einer Hypermethylierung der rDNA in Verbindung gebracht [235]. In Blutproben von 20 bis 105 Jahre alten Menschen konnte jedoch für die CpG-Insel, die im rDNA-Promotor liegt, keine konsistente, signifikante

Korrelation zwischen der DNA-Methylierung und dem chronologischen Alter gefunden werden [234]. Der Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung und der Expression der rDNA wurde bereits mehrmals gezeigt, wobei eine höhere DNA-Methylierung mit geringerer Expression assoziiert ist [191, 234].

Veränderungen in der Proteinsynthese spielen eine wichtige Rolle im Prozess des Alterns [236-238]. Die Verlangsamung der gesamten Proteinsynthese gehört zu den allgemeinen biochemischen Veränderungen, die bereits häufiger mit dem Alter in Zusammenhang gebracht wurden [236]. Die Produktion neu synthetisierter Proteine ist abhängig von den Ribosomen und einer der essentiellen Prozesse der Proteostase [239]. Eine verringerte rRNA-Transkription resultiert in reduzierter Ribosomen-Biogenese, verändertem Zellwachstum und erhöhtem Zelltod [240, 241]. Die Zunahme der DNA-Methylierung des rDNA-Promotors könnte zu einer reduzierten rRNA-Synthese führen und so zum altersassoziierten Verlust der Proteostase beitragen.

4.1.1.3 Locus-spezifische DNA-Methylierungs-Veränderungen altersassoziiierter Gene und Signalwege durch *in vitro* Alterung

Neben den DNA-Methylierungs-Veränderungen der repetitiven Elemente treten mit dem Alter auch Hypo- und Hypermethylierungs-Ereignisse an spezifischen Loci auf. Der Vergleich der durch die 450K-Methylierungs-Array erstellten DNA-Methylierungs-Profile zwischen der Ausgangskultur und den gealterten Klonen zeigte die Effekte der Langzeit-Kultivierung auf die genomweite DNA-Methylierung auf Einzelnukleotid-Ebene und in mit Genen assoziierten Loci. Jedes Individuum altert unterschiedlich. Dies kann durch genetische Faktoren und Umwelteinflüsse bedingt sein, aber auch zufällige Ereignisse spielen eine wichtige Rolle. Auch auf epigenetischer Ebene kommt es mit dem Alter zu individuell unterschiedlichen Abweichungen (epigenetische Drift). Für die Veränderungen, die in beiden Fibroblastenlinien auftraten, ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass sie nicht zufällig passiert sind, sondern zu den gerichteten epigenetischen Veränderungen gehören, die mit dem Altern assoziiert werden können. Daher konzentrierten wir uns auf die Veränderungen der DNA-Methylierung, die in beiden Fibroblastenlinien detektiert werden konnten.

Genomweit wurden 1.131 CpGs identifiziert, die in beiden Fibroblastenlinien eine signifikante differentielle DNA-Methylierung zwischen der Ausgangskultur und den gealterten Klonen aufwiesen. Die starke positive Korrelation (Spearman-Rho=0.689) zwischen den entsprechenden β -Differenzen dieser überlappenden CpGs zeigt, dass die detektierten

DNA-Methylierungs-Veränderungen eine starke Übereinstimmung zwischen der ersten und der zweiten Fibroblastenlinie aufweisen und somit reproduzierbar sind. Den 1.131 DMPs wurden 667 verschiedene Gene zugeordnet. Es wurde also ein Set an Genen identifiziert, deren DNA-Methylierung mit der *in vitro* Alterung durch Langzeit-Kultivierung assoziiert ist. Eine Genset-Anreicherungs-Analyse mit den 667 Genen als Input ergab angereicherte Termini, die bereits bekannt dafür sind, dass sie eine Rolle im Prozess des Alterns spielen, angeführt von dem Terminus Fokale Adhäsion. In fokalen Adhäsionen formen Transmembran-Rezeptoren der Integrinfamilie und verschiedene Adapterproteine die physikalische Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Aktin-Zytoskelett [242]. Die Aktivität von Fibroblasten und die fokale Adhäsion im Bindegewebe nimmt mit dem Alter ab. Im Vergleich zu Fibroblasten von jungen Mäusen weisen Fibroblasten von alten Mäusen ein reduziertes Funktionslevel, geringe Motilität und Proliferation, ein schlecht organisiertes Zytoskelett und Unterschiede in der Lokalisierung der wesentlichen fokalen Adhäsionsproteine auf [243]. Neben weiteren Veränderungen des Zytoskeletts konnten Änderungen der fokalen Adhäsionen mit Seneszenz assoziiert werden. Während junge Fibroblasten große fokale Adhäsionen ausbilden, entwickeln seneszente Zellen zahlreiche kleine fokale Kontaktstellen [244].

Unter den angereicherten Termini waren drei signifikante Signalwege, der Ras-, der PI3K-Akt- und der AMPK-Signalweg. Diese drei Signalwege wurden bereits oft als metabolische Signalwege im Zusammenhang mit Altern und mit Langlebigkeit diskutiert [70, 73, 74]. Der Insulin/IGF-1-Signalweg wurde als erster metabolischer Signalweg identifiziert, der den Prozess des Alterns modifizieren kann [245, 246]. Sowohl der Ras-Signalweg, als auch der PI3K-Akt- und der AMPK-Signalweg gehören zu den Komponenten, die dem Insulin/IGF-1-Signalweg nachgeschaltet sind (Abbildung 36).

Die Ras-Proteine sind Mitglieder einer Superfamilie kleiner GTPasen, die eine grundlegende Rolle in der Signaltransduktion als Reaktion auf verschiedene extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Zytokinen spielen [247]. Durch die Aktivierung mehrerer downstream Signalwege spielt der Ras-Signalweg eine Rolle in der Koordination der Proliferation und der Differenzierung sowie zahlreicher weiterer zellulärer Prozesse [70, 248, 249]. Die Komponenten des Ras-Signalwegs sind dadurch in das Altern und in die Regulation der Langlebigkeit involviert [70, 250]. Der Ras-Signalweg ist wichtig für die Erhaltung der Gesundheit und ist daher ein interessanter und potentieller Ansatzpunkt für die Entwicklung

von Interventionen, die nicht nur die Lebensspanne erhöhen, sondern auch den Beginn und das Fortschreiten des altersassoziierten funktionellen Abbaus verzögern [70, 251].

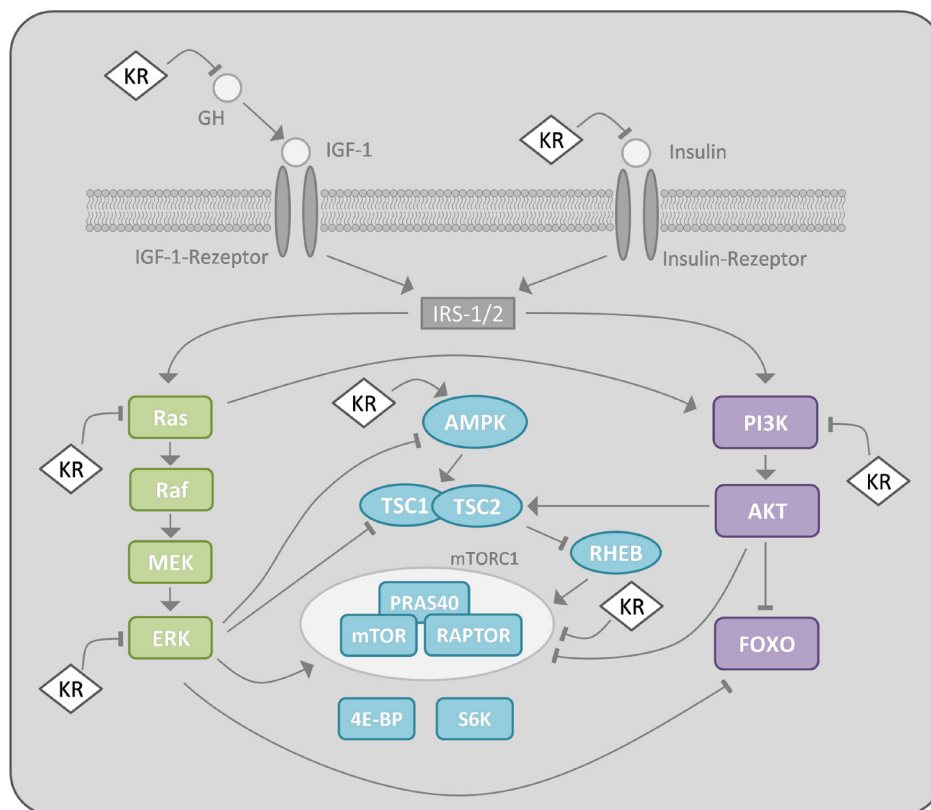


Abbildung 36: Signalwege, die mit Altern und Langlebigkeit assoziiert sind. Kalorienrestriktion (KR) ist eine robuste Intervention, die die Lebensspanne in zahlreichen Spezies erhöht. Der Ras-Signalweg (in grün dargestellt) sowie der AMPK-mTOR-Signalweg (blau) und der PI3K-Akt-Signalweg (lila) sind downstream-Komponenten des Insulin/insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-Signalwegs. Positiv regulierte Interaktionen sind durch Pfeile dargestellt, negativ regulierte durch stumpf auslaufende Linien. Abbildung erstellt nach [70] und [72].

Die Adenosinmonophosphat (AMP)-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist eine zentrale Komponente in vielen Signalwegen und als Hauptregulator des zellulären Energiehaushaltes ein wesentlicher Nährstoff-Sensor. Ist das Energielevel der Zelle durch die Leerung des zellulären ATP-Speichers als Reaktion auf Stressfaktoren niedrig, wird der AMPK-Signalweg aktiviert. Dies führt dazu, dass Signalwege, die den ATP-Speicher der Zellen wieder auffüllen (Fettsäureoxidation, Glykolyse, etc.), positiv reguliert werden und Biosynthesewege, die ATP verbrauchen (Glukoneogenese, Proteinsynthese, etc.), inhibiert werden [252]. Mehrere Studien haben beschrieben, dass das AMPK-Signal mit dem Alter abnimmt, wodurch das Gleichgewicht des Energiemetabolismus gestört und das Auftreten metabolischer Krankheiten während des Alterns unterstützt wird [253]. Über verschiedene Spezies hinweg konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von AMPK für die Verlängerung der Lebensspanne ausreicht [253-258]. Als zentraler Regulator des Energiestoffwechsels, der

Stressresistenz und der Proteostase ist die AMPK ein attraktives therapeutisches Ziel zur Behandlung von Krebs, Adipositas oder Diabetes mellitus Typ 2 [259].

Die AKT/Proteinkinase B (PKB) ist ein zentrales Signalmolekül, das verschiedene zelluläre Funktionen im Zusammenhang mit Metabolismus, Langlebigkeit und zellulärer Seneszenz downstream der Phosphoinositid-3-kinase (PI3K) reguliert [260]. Die aberrante Regulierung der PI3K-Akt-Achse spielt eine wesentliche Rolle in mit dem Alter assoziierten Krankheiten wie Krebs, Diabetes mellitus Typ 2, Herz-Erkrankungen und neurodegenerativen Krankheiten. Es wurde beschrieben, dass eine reduzierte Aktivität des PI3K-Akt-Signalwegs die Lebensdauer verlängern kann [261].

Auch zahlreiche Gene, die in den Zuckerstoffwechsel involviert sind, enthielten mit der *in vitro* Alterung assoziierte differentiell methylierte CpGs. Dies resultierte in den angereicherten Termini Galaktose-/Fruktose- und Mannose-Metabolismus. D-Galaktose ist eine der Substanzen, die verwendet werden, um die Alterung in verschiedenen Modellen zu beschleunigen [262, 263]. Zahlreiche Studien haben in verschiedenen Spezies gezeigt, dass eine kontrollierte Kalorienrestriktion den Prozess des Alterns verlangsamen kann [264]. Da die DNA-Methylierung von Genen, die in metabolische Signalwege und in den Zuckerstoffwechsel involviert sind, mit der *in vitro* Alterung assoziiert werden konnte, weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass epigenetische Modifikationen in der Regulation der Langlebigkeit im Zusammenhang mit der Kalorienrestriktion eine Rolle spielen könnten.

Die GenAge-Datenbank für altersassoziierte Gene enthält neben wenigen Genen, die direkt mit dem humanen Altern assoziiert sind, vor allem Kandidaten-Gene, die möglicherweise im Prozess des Alterns von Bedeutung sind. Es konnte ein signifikanter Überlapp zwischen den Genen, die mit der *in vitro* Alterung assoziierte DMPs enthalten, und den 307 Genen aus der GenAge-Datenbank festgestellt werden. Dies zeigt, dass 16 der mit der *in vitro* Alterung assoziierten Gene bereits in einem anderen Zusammenhang mit dem Altern in Verbindung gebracht worden waren und bekräftigt, dass sie eine Rolle im Prozess des Alterns spielen könnten. Hierbei scheinen epigenetische Mechanismen der DNA-Methylierung involviert zu sein.

In einer konzeptionell ähnlichen Studie von Bork *et al.* wurde der Effekt der Langzeit-Kultivierung auf die DNA-Methylierung in mesenchymalen Stromazellen (mesenchymal stromal cells, MSCs) analysiert [265]. Mit Hilfe des Illumina HumanMethylation27 BeadChips wurde der DNA-Methylierungs-Status an mehr als 27.000 CpG-Stellen in MSCs in frühen

Passagen (P2) und späten Passagen (P8-P15) analysiert. Es konnten 84 CpGs (annotiert an 78 verschiedene Gene) detektiert werden, die zwischen frühen und späten Passagen differentiell methyliert sind. Obwohl die Gruppe um Bork eine frühere Version der Infinium Methylierungs-Arrays verwendete, einen anderen Zelltyp untersuchte und eine andere Auswertungs-Strategie verfolgte, wurden vier der 78 Gene auch in unserer Studie von mit der *in vitro* Alterung assoziierten DMPs abgedeckt. Die Gene *FGFR1* und *SELPLG* wiesen in beiden Studien hypermethylierte CpGs und die Gene *HK1* und *CASQ2* hypomethylierte CpGs auf. Vergleichbar mit unseren Beobachtungen, dass 58 % der DMPs in Fibroblastenlinie 1 und 52 % der DMPs in Fibroblastenlinie 2 eine reduzierte DNA-Methylierung aufwiesen, war auch in der Studie von Bork *et al.* mit 65 % der größere Teil der DMPs hypomethyliert. Dies passt zu der Tatsache, dass die globale Hypomethylierung das Hauptereignis während des Alterns ist. Allerdings konnten auch locus-spezifische Hypermethylierungs-Ereignisse detektiert werden. Entgegen früheren Beobachtungen, dass *de novo* Methylierung hauptsächlich an Promotoren von Tumorsuppressor-Genen auftritt, gibt es nun Hinweise darauf, dass es sich dabei eher um einen weitreichenden programmierten Prozess handelt, der auf relativ allgemeine, durch den Polycomb-Komplex vermittelte Mechanismen, zurückgeführt werden kann [266, 267]. Die essentielle Polycomb Group (PcG)-Maschinerie besteht aus zwei Multi-Protein-Komplexen, den Polycomb Repressive Complex 1 und 2 (PRC1 und PRC2). Der Polycomb-Komplex fungiert als Repressor, indem er die Bildung von lokalem Heterochromatin herbeiführt [268].

Eine Theorie zum abnormalen Gewinn an DNA-Methylierung während des Alterns schlägt die Rekrutierung der *de novo* DNA-Methyltransferasen durch den Polycomb-Komplex vor [269]. Eine alternative Theorie legt ein kompetitives Modell nahe, in dem unmethylierte DNA-Regionen durch PRC1 und PRC2 vor den *de novo* DNA-Methyltransferasen geschützt werden. Die Theorie besagt, dass die PRC1- und PRC2-Level mit dem Alter geringer werden, wodurch der graduelle Zugang von DNMT3A und DNMT3B an unmethylierte DNA-Regionen und somit die *de novo* Methylierung in älteren Individuen zugelassen wird [64].

4.1.1.4 Erhöhtes epigenetisches Alter durch *in vitro* Alterung

Für die Bestimmung des epigenetischen Alters der Fibroblastenproben wurde die epigenetische Uhr verwendet, die als „skin & blood clock“ bezeichnet wird und dafür entwickelt wurde das epigenetische Alter in verschiedenen Zelltypen, einschließlich Fibroblasten, sensitiv und robust zu schätzen [101]. Das epigenetische Alter ist ein zumindest

passiver Biomarker des biologischen Alters und ist ein Prädiktor für die Sterblichkeit, kognitive und körperliche Dysfunktionen sowie für altersassoziierte Krankheiten [270-274].

Die Berechnung des epigenetischen Alters der Ausgangskultur und eines Großteils der Klone resultierte in negativen Werten. Dies kann dadurch erklärt werden, dass mit fetalen Fibroblasten gearbeitet wurde, die vor der Geburt im Rahmen einer Fruchtwasseruntersuchung entnommen worden waren. In beiden Fibroblastenlinien war das durchschnittliche epigenetische Alter der gealterten Klone höher als das der jeweiligen Ausgangskultur. Die Langzeit-Kultivierung über 20 PVs führte demzufolge zu Änderungen der DNA-Methylierung der 391 CpGs, auf welchen die Berechnung des epigenetischen Alters durch die „skin & blood clock“ basiert. Übereinstimmend mit unseren Beobachtungen wurde bereits in Fibroblasten von Neugeborenen, in Keratinozyten und in humanen Endothelzellen gezeigt, dass die Proliferation von Zellen durch einen Anstieg des epigenetischen Alters begleitet wird. Die „skin & blood clock“ kann demnach die dynamische Alterung von kultivierten Zellen *ex vivo* erfassen [101].

Das epigenetische Altern entspricht nicht der abgestimmten, gemeinsamen Veränderung aller Zellen eines Gewebes zur gleichen Zeit von einem epigenetischen Zustand in einen anderen. Sie reflektiert hingegen DNA-Methylierungs-Veränderungen, die in einer kleinen Anzahl an Zellen zu irgendeiner Zeit geschehen. Zellen einer bestimmten Population oder eines Gewebes sind folglich epigenetisch heterogen. Diese Heterogenität erzeugt DNA-Methylierungs-Werte zwischen 0 (unmethyliert) und 1 (methyliert), wie zum Beispiel dass 66 % der tausenden Kopien eines bestimmten CpGs, die von tausenden von Zellen stammen, methyliert sind. Diese DNA-Methylierungs-Werte werden von der epigenetischen Uhr verwendet, um das epigenetische Alter zu schätzen [97]. Es konnte eine bemerkenswert große Variation im epigenetischen Alter zwischen den individuellen Klonen, die von der gleichen primären Ausgangskultur stammen, beobachtet werden. Dies weist auf epigenetische Drift zwischen den klonalen Nachkommen verschiedener Zellen in einer Kultur oder einem Gewebe hin. Da das epigenetische Alter der Einzelzell-Klone das epigenetische Alter der jeweiligen Ausgangszelle reflektieren könnte, unterstützen diese Ergebnisse die Ansicht, dass einzelne Zellen innerhalb einer Massenkultur sich stark unterscheidende epigenetische Alter aufweisen und dass das epigenetische Alter eines Gewebes einen Durchschnitt von tausenden individuellen Zellen reflektiert. Da die epigenetische Uhr auf Daten der Infinium Methylierungs-Arrays basiert und die empfohlene minimale Einsatzmenge an DNA für diese

Methode bei 250 ng liegt, ist es momentan nicht möglich das epigenetische Alter einzelner Zellen zu bestimmen. Daher stellen die Einzelzell-Klone ein gutes Modell dar, um Fragestellungen wie diese zu untersuchen.

4.1.1.5 Zunahme der DNA-Methylierung des Tumorsuppressor-Gens *RAD51C* durch *in vitro* Alterung

Die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen durch DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung [275]. Die Hypermethylierung dieser Gene beschränkt sich jedoch nicht nur auf neoplastische Zellen, sondern tritt auch während des Alterns in normalen Zellen auf. Erhöhte DNA-Methylierungs-Level in älteren Individuen sind dabei mit einer höheren Suszeptibilität für Krebs assoziiert [276-278]. Mittels DBS sollte untersucht werden, ob die *in vitro* Alterung mit einer aberranten DNA-Methylierung der Promotorbereiche ausgewählter Tumorsuppressor-Gene einhergeht.

Die Standard-Methode um DNA-Methylierungs-Analysen gezielter Amplikons durchzuführen ist die Bisulfit-Pyrosequenzierung. Hier wird ein durchschnittlicher DNA-Methylierungs-Wert für jede CpG-Stelle über alle Allele einer Probe gemessen und die Region, die untersucht werden kann, ist auf eine Länge von 115 bp beschränkt [279]. DBS ermöglicht dagegen eine hochauflösende Sequenzierung ausgewählter Amplikons auf Einzelallel-Ebene. Die Länge der Amplikons ist hierbei beschränkt durch die Zyklenanzahl und somit durch die Art der Sequenzierungs-Kassette. In dieser Arbeit war das längste Amplikon 494 bp lang. Die durch diese Methode erreichte hohe Abdeckung ermöglichte die Detektion geringer DNA-Methylierungs-Unterschiede sowie seltener DNA-Methylierungs-Ereignisse einzelner CpGs in einzelnen Allelen.

Die ausgewählten Assays erlaubten die DNA-Methylierungs-Analyse der Promotorbereiche der Tumorsuppressor-Gene *ATM* (32 CpGs), *BRCA1* (13 CpGs), *RAD51C* (39 CpGs) und *TP53* (15 CpGs). Im nicht pathologischen Zustand ist der Promotorbereich von Tumorsuppressor-Genen unmethyliert [27, 143, 147, 280]. Dies konnte in beiden Fibroblastenlinien für alle vier untersuchten Tumorsuppressor-Gene beobachtet werden. Die durchschnittlichen DNA-Methylierungs-Werte über alle CpGs und alle Reads lagen für die vier untersuchten Gene in den Ausgangskulturen unter 1 %. Diese Werte stimmen mit anderen Studien, die Promotorbereiche von Tumorsuppressor-Genen untersucht haben, überein [147, 281].

Für *ATM* und *RAD51C* konnte eine Zunahme der durchschnittlichen DNA-Methylierung in den gealterten Klonen beobachtet werden, die für *RAD51C* in beiden Fibroblastenlinien Signifikanz

erreichte. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch bei der Betrachtung der DNA-Methylierung auf Einzelallel-Ebene wieder. In beiden Fibroblastenlinien konnte für *RAD51C* in den gealterten Klonen ein signifikant erhöhter Anteil an Reads mit Einzel-CpG-Fehlern detektiert werden. Für *BRCA1* wiesen die gealterten Klone der Fibroblastenlinie 1 dagegen eine signifikant reduzierte durchschnittliche DNA-Methylierung und einen signifikant reduzierten Anteil an Reads mit Einzel-CpG-Fehlern auf. Die DNA-Methylierungs-Differenz zwischen der Ausgangskultur und den gealterten Klonen war nur sehr gering und auch die Signifikanz wurde nur knapp erreicht ($p=0,041$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die *in vitro* Alterung in der aberranten *de novo* Methylierung des Promotorbereichs von *RAD51C* resultiert. Im Promotorbereich von *BRCA1* wird dagegen keine *de novo* Methylierung zugelassen. Für *TP53* konnte in beiden Fibroblastenlinien keine Veränderung der DNA-Methylierung mit der *in vitro* Alterung beobachtet werden.

Im Zusammenhang mit der durchschnittlichen Methylierung sollte auf einen Schwachpunkt der Technik hingewiesen werden. Der durch die Bisulfit-Konvertierung bedingte Sequenzunterschied zwischen den methylierten und den unmethylierten Allelen könnte während der PCR zu einem Amplifikations-Bias hin zum unmethylierten, T-reichen Allel führen. Da methylierte Allele dann unterrepräsentiert wären, könnte der Bias in einer unzutreffenden Schätzung des DNA-Methylierungs-Levels resultieren [282]. In nachfolgenden Projekten sollte daher eine Methode verwendet werden, die es erlaubt, die PCR-Duplikate bioinformatisch zu detektieren und in der Auswertung zu beachten. Eine Möglichkeit wäre durch Single Molecule Tagging einzelne Allele vor der Amplifikation durch Random-Tags zu markieren, wodurch die Sequenzen die nach der Amplifikation denselben Barcode tragen, auf ein Ausgangsmolekül zurückgeführt werden können.

Man geht davon aus, dass eher die Dichte der CpG-Methylierung einer regulatorischen Region als die DNA-Methylierung individueller CpGs die Genaktivität beeinflussen kann [283]. Je höher die Anzahl an methylierten CpGs in einem Read, desto eher könnte sich die DNA-Methylierung funktionell auf die Expression auswirken. Die DNA-Methylierung wird mit jeder Zellteilung weitergegeben. Ein kumulativer Effekt durch fortschreitende PVs könnte in einer Zunahme der DNA-Methylierung resultieren, die zur Stilllegung des Gens führen könnte. Die Ausgangskulturen wurde als Referenz verwendet, um einen Schwellenwert für den Anteil methylierter CpGs eines Reads zu definieren. Grundsätzlich war der Hauptanteil der Reads unmethyliert. Unter den Reads mit Einzel-CpG-Fehlern lagen für alle vier Gene in den

Ausgangskulturen beider Fibroblastenlinien keine Reads mit mehr als 20 % DNA-Methylierung vor. Daher wurde dieser Schwellenwert verwendet, um gealterte Klone zu identifizieren, die auf Einzelallel-Ebene eine Zunahme der DNA-Methylierung im Vergleich zur Ausgangskultur aufwiesen.

Dieser Wert sollte auch als Schwellenwert für technische Artefakte diskutiert werden. Der Amplifyer2, der für die Auswertung der DBS-Daten verwendet wurde, bietet durch die badmeth-Filtereinstellung eine Möglichkeit die Qualität der Reads zu erhöhen. Hier kann ausgewählt werden, für wie viele CpGs eines Amplikons ein unsicherer DNA-Methylierungs-Status zugelassen wird. Um weitgehend ausschließen zu können, dass es sich bei den detektierten DNA-Methylierungs-Ereignissen um technische oder durch die Daten-Analyse hervorgerufene Artefakte handelt, wurden bei der Auswertung der Daten ein striktes Filterkriterium gewählt und der badmeth-Filter auf 0 gesetzt. Es wurden somit nur Reads in die Auswertung mitaufgenommen, für die für alle CpGs ein klar methylierter oder unmethylierter Zustand bestimmt werden konnte. Ein weiterer Punkt, der angemerkt werden sollte, ist, dass Allele mit inkompletter Bisulfit-Konvertierung methylierte CpGs vortäuschen könnten. Da für die Bisulfit-Konvertierung der für das DBS verwendeten Proben ein erweitertes Protokoll verwendet wurde, das eine Inkubation über Nacht beinhaltet und für die Illumina Methylierungs-Arrays empfohlen wird, kann eine unvollständige Bisulfit-Konvertierung als Störfaktor jedoch nahezu komplett ausgeschlossen werden.

Unter der Verwendung des Schwellenwertes von 20 % konnte für *ATM* und *BRCA1* in Fibroblastenlinie 1 jeweils ein gealterter Klon gefunden werden, der auf Einzelallel-Ebene eine Zunahme der DNA-Methylierung im Vergleich zur Ausgangskultur aufwies. Für *RAD51C* konnte in beiden Fibroblastenlinien jeweils ein gealterter Klon mit Reads mit einer DNA-Methylierung über 20 % detektiert werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass in manchen Klonen durch die *in vitro* Alterung Allele auftreten, die eine höhere Anzahl an methylierten CpGs aufweisen als die Ausgangskultur. In den Nachkommen der bestrahlten Zellen liegen also nach 20 PVs Zellen vor, die Allele mit einer DNA-Methylierung in sich tragen, die höher ist als die maximale DNA-Methylierung aller Allele, die in der Ausgangskultur detektiert wurden.

Um feststellen zu können, ob die *de novo* Methylierung des *RAD51C*-Promotors auf einzelne CpGs zurückgeführt werden kann, wurde die DNA-Methylierung der 39 CpGs des *RAD51C*-Assays in jeder untersuchten Probe betrachtet. Vereinzelt CpGs zeigten in einzelnen Klonen eine hohes DNA-Methylierungs-Level. Dies könnte daran liegen, dass hier die *de novo*

Methylierung schon in einer der ersten PVs stattfand und über die nachfolgenden PVs an die Nachkommen weitergegeben wurde. Dadurch lagen nach 20 PVs viele Zellen vor, in welchen das entsprechende CpG methyliert war. Dass in den verschiedenen Klonen unterschiedliche CpGs betroffen sind, deutet darauf hin, dass die Einzel-CpG-Fehler eher zufällig passierten.

4.1.2 Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung

Strahlentherapie wird angewendet, um Krebs zu behandeln, kann dabei aber auch nachteilige Auswirkungen für die Patienten haben und unter anderem das Risiko für die Entwicklung eines Zweittumors erhöhen. Das Zweittumor-Risiko ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel von der Strahlendosis, dem bestrahlten Gewebe, der genetischen Prädisposition oder dem Alter der Patienten während deren Behandlung. Eine große Herausforderung bei der Einschätzung des Risikos für einen Zweittumor besteht darin, dass diese meist erst 10 Jahre oder später nach einer Strahlentherapie auftreten [284-287]. Außerdem sind die komplexen biologischen Prozesse, die zu einem strahleninduzierten Zweittumor führen, noch nicht gut verstanden. Therapeutische Bestrahlung hat nicht nur Auswirkungen auf das anvisierte neoplastische Gewebe, sondern auch auf normale Körperzellen des umliegenden gesunden Gewebes. In dieser Studie wurden primäre humane Fibroblasten verwendet, die normalen Zellen, die während der Krebstherapie Strahlung ausgesetzt werden, ähnlich sind. Das Ziel dieser Arbeit war es DNA-Methylierungs-Veränderungen nach Strahlenexposition in normalen Zellen zu untersuchen, um die Hypothese zu testen, dass epigenetische Mechanismen in die strahleninduzierte Krebsentstehung involviert sein könnten.

Die Methylierung und die Demethylierung der DNA sind dynamische Prozesse und der DNA-Methylierungs-Zustand kann sich in einem Zeitraum von Stunden oder weniger verändern [288, 289]. Ionisierende Strahlung könnte also das DNA-Methylierungs-Muster bereits wenige Stunden nach Strahlenexposition beeinflussen. Um DNA-Methylierungs-Veränderungen, die im Zusammenhang mit der direkten DNA-Schadensantwort stehen, zu detektieren, wurde zunächst die DNA-Methylierung innerhalb des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung analysiert.

Da sich strahleninduzierte Zweittumore erst mehrere Jahre nach Strahlentherapie bilden, wurde die Hypothese untersucht, dass auch strahleninduzierte DNA-Methylierungs-Veränderungen erst längere Zeit nach Strahlenexposition auftreten könnten. Einzelzell-Klone wurden als *in vitro* Modell für das Altern verwendet. Bestrahlte Klone wurden erstellt, indem einzelne Zellen einer mit 2 Gy bestrahlten Massenkultur für mindestens 20 PVs expandiert

wurden. Die gealterten Klone, die aus Einzelzellen einer nicht-bestrahlten Massenkultur erstellt wurden, dienten als Kontrolle für DNA-Methylierungs-Veränderungen, die durch die Langzeit-Kultivierung hervorgerufen werden. Die Unterschiede zwischen den genomweiten DNA-Methylierungs-Profilen der gealterten Klone und der bestrahlten Klone wurden als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung betrachtet. Durch die *in vitro* Alterung nach Strahlenexposition wurde also die Latenzzeit nach Strahlentherapie imitiert.

4.1.2.1 Globale Hypomethylierung als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung

Durch Bisulfit-Pyrosequenzierung wurde, repräsentativ für die globale DNA-Methylierung, die DNA-Methylierung der repetitiven Elemente α -Satelliten-DNA, ALU und LINE-1 untersucht.

Um den direkten Effekt ionisierender Strahlung zu analysieren, wurden die DNA-Methylierungs-Level der repetitiven Elemente jeweils sechs und 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy ermittelt. Im Vergleich zu den nicht-bestrahlten Kulturen war die DNA-Methylierung der bestrahlten Kulturen tendenziell erhöht. Allerdings waren die Unterschiede sehr gering und nur für ALU konnte sechs Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy eine signifikante Hypermethylierung detektiert werden.

Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy waren die strahleninduzierten Veränderungen der DNA-Methylierung der repetitiven Elemente geringer als die Variation der DNA-Methylierung zwischen den Fibroblastenlinien, die von neun verschiedenen Feten stammen. Interessanterweise korrelierte die DNA-Methylierung der α -Satelliten-DNA positiv mit der Schwangerschaftsdauer. Neben ihrer Funktion in der Genregulation spielt die DNA-Methylierung auch eine Rolle in der Kondensation und Struktur der Chromosomen [19]. Die mit der Schwangerschaftsdauer zunehmende DNA-Methylierung der α -Satelliten-DNA könnte bei der Etablierung und bei dem Erhalt einer stark kondensierten Chromatin-Struktur des Zentromers helfen und dabei zu dessen Stabilität und zu einer korrekten Chromosomen-Segregation beitragen [290]. Die positive Korrelation zwischen dem DNA-Methylierungs-Level der α -Satelliten-DNA und der Schwangerschaftswoche deutet darauf hin, dass die Dauer der Schwangerschaft ein Faktor sein könnte, der die Unterschiede der DNA-Methylierungs-Muster zwischen den Fibroblastenlinien erklären könnte [291, 292]. Des Weiteren war die Anzahl der Passagen der nicht-bestrahlten und der bestrahlten Kulturen der jeweiligen Fibroblastenlinien zwar stets identisch, sie unterschied sich jedoch zwischen den verschiedenen Fibroblastenlinien. Die Variation der DNA-Methylierung zwischen den Fibroblastenlinien

könnte daher auch durch serienmäßiges Passagieren der Kulturen und durch Zellkultur-Bedingungen verursacht sein [293, 294].

Obwohl die DNA-Methylierungs-Level der repetitiven Elemente in den ersten 24 Stunden nach Bestrahlung eher stabil zu bleiben schienen, sollte die Hypothese untersucht werden, dass ausgeprägte DNA-Methylierungs-Veränderungen in einigen wenigen individuellen Zellen einer Kultur existieren. Diese Zellen könnten dann anfällig für neoplastische Transformation sein. Die Variation der DNA-Methylierung der repetitiven Elemente wurde in Einzelzellen 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy untersucht und mit der Variation in nicht-bestrahlten Einzelzellen verglichen. Es gab keine einheitlichen Anzeichen für eine erhöhte Variation oder für eine erhöhte Anzahl an Ausreißern nach Bestrahlung.

Übereinstimmend mit den Beobachtungen in den repetitiven Elementen konnte auch durch den Vergleich der globalen β -Werte über alle in die Analyse der 450K-Methylierungs-Array-Daten mit eingeschlossenen CpGs zwischen nicht-bestrahlten und bestrahlten Kulturen gezeigt werden, dass die globale DNA-Methylierung in den ersten 72 Stunden nach Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy konstant bleibt.

Um den Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung auf die globale DNA-Methylierung zu untersuchen, wurden die DNA-Methylierungs-Level der bestrahlten Klone gegen die gealterten Klone verglichen. Die repetitiven Elemente zeigten in den bestrahlten Klonen beider Fibroblastenlinien im Vergleich zu den gealterten Klonen ein geringeres DNA-Methylierungs-Level. Für die α -Satelliten-DNA und für ALU wurde in der Fibroblastenlinie 1 Signifikanz erreicht. Auch die Abschätzung der globalen DNA-Methylierung anhand der Array-Daten zeigte eine signifikante Abnahme in den bestrahlten Klonen beider Fibroblastenlinien. Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass ein Verlust der globalen DNA-Methylierung als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung auftritt. Übereinstimmend mit unseren Beobachtungen, zeigten mehrere Studien eine strahleninduzierte Abnahme der globalen DNA-Methylierung. Allerdings waren die Ergebnisse nach verschiedenen Strahlendosen und über verschiedene Zelllinien nicht konsistent und mehrere Studien, die vor allem an Mäusen durchgeführt wurden, zeigten immer deutlicher, dass durch ionisierende Strahlung hervorgerufene Veränderungen der DNA-Methylierung nicht nur von der Dosis und dem untersuchten Gewebe- oder Zelltyp, sondern auch von der Art der Strahlung und vom Geschlecht abhängig sind [169]. Außerdem spielt die Zeit nach der Bestrahlung eine Rolle, was auch in unserer Studie beobachtet wurde. Während die globale DNA-Methylierung direkt

nach Bestrahlung eher konstant blieb, konnte mehrere PVs nach Strahlenexposition eine globale Hypomethylierung festgestellt werden.

In weiblichen Ratten wurde gezeigt, dass eine Dosis von 5 Gy Röntgenstrahlung zu einem starken und signifikanten Verlust der genomischen DNA-Methylierung im bestrahlten Brustgewebe führt. Diese globale Hypomethylierung in dem ionisierender Strahlung ausgesetzten Gewebe ging einher mit reduzierten Leveln der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B sowie des methyl-bindenden Proteins MeCP2 [173]. Die durch ionisierende Strahlung induzierte globale Hypomethylierung könnte demnach durch eine reduzierte Expression der DNA-Methyltransferasen bedingt sein [163, 172, 295].

Ein Verlust der globalen DNA-Methylierung wurde auch in Tumorzellen beobachtet und mit maligner Transformation und Krebsentstehung in Verbindung gebracht [127, 154, 296-298]. Daher wird diskutiert, ob die durch Strahlentherapie hervorgerufene Hypomethylierung zur strahleninduzierten Krebsentstehung beitragen und als Marker für die onkogene Transformation verwendet werden könnte [171, 173].

4.1.2.2 Erhöhte DNA-Methylierung der rDNA als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung

Um den Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung der rDNA zu untersuchen, wurde das DNA-Methylierung-Level des rDNA-Promotors zwischen bestrahlten Klonen und gealterten Klonen verglichen. Die DNA-Methylierung des rDNA-Promotors war in bestrahlten Klonen tendenziell erhöht. Dies weist darauf hin, dass Bestrahlung in einer Hypermethylierung der rDNA resultiert und dadurch zu einer veränderten Regulation der Ribosomen-Biogenese führen könnte.

Eine Hypermethylierung der rDNA wurde bereits mit mehreren Krebsarten assoziiert und es wurde vorgeschlagen, dass die rDNA als Marker während der Tumorprogression oder als prognostischer Indikator für die Identifizierung der Krankheit in einem frühen Stadium verwendet werden könnte [299-304]. In CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen von Patienten mit myelodysplastischem Syndrom wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikant reduzierte rRNA-Expression und eine erhöhte DNA-Methylierung des rDNA-Promotors detektiert [191]. Im Gegensatz zu normalem Gewebe war die Promotor-DNA-Methylierung in Brustkrebsgewebe jedoch nicht unbedingt invers mit der rRNA-Expression korreliert, was auf eine komplexere Fehlregulation der rDNA-Transkription bei der Tumorentstehung hinweist [301].

Die Mechanismen, die zu einer Hypermethylierung der rDNA in Tumoren führen, sind noch nicht geklärt. Eine erhöhte Proteinsynthese, die durch die Ribosomen-Biogenese als limitierender Faktor aufrechterhalten wird, ist Voraussetzung für das Wachstum und die Proliferation einer Krebszelle [305]. Da die Rate der Ribosomen-Produktion in Krebszellen erhöht ist, würde man im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Gewebe theoretisch eine Hypomethylierung der rDNA erwarten. Ein hohes DNA-Methylierungs-Level der rDNA wurde außerdem mit einer besseren Prognose und längerem krankheitsfreiem Überleben sowie Gesamtüberleben assoziiert. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Hypermethylierung der rDNA eine Verteidigungsreaktion gegen die Tumorprogression sein könnte [304].

4.1.2.3 Locus-spezifische DNA-Methylierungs-Veränderungen durch ionisierende Strahlung

Unter der Verwendung von Illumina 450K-Methylierungs-Arrays wurden die Effekte ionisierender Strahlung auf die genomweite DNA-Methylierung auf Einzelnukleotid-Ebene und in mit Genen assoziierten Loci analysiert.

Direkt nach Bestrahlung (eine bis 72 Stunden nach Strahlenexposition) konnten keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen nicht-bestrahlten und mit 2 oder 4 Gy bestrahlten Massenkulturen detektiert werden. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung wurden in einer konzeptionell ähnlichen Studie mit normalen humanen Fibroblasten und bronchialen Epithelzellen sieben Tage nach Bestrahlung mit verschiedene Dosen γ -Strahlen ebenfalls keine Auswirkungen auf die DNA-Methylierung festgestellt [178]. In Brust- und Darmkrebszellen konnten dagegen globale und genspezifische DNA-Methylierungs-Veränderungen nach Bestrahlung detektiert werden [163, 164]. Das spricht dafür, dass normale Zellen und Krebszellen sich in ihrer epigenetischen Antwort auf Strahlenexposition unterscheiden.

Als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung konnten in unserer Studie allerdings auch in normalen Zellen DNA-Methylierungs-Veränderungen beobachtet werden. Bei dem Vergleich der genomweiten DNA-Methylierungs-Profile zwischen gealterten Klonen und bestrahlten Klonen wurden in beiden Fibroblastenlinien Veränderungen in der DNA-Methylierung auf Einzelnukleotid-Ebene mit Bestrahlung assoziiert.

Die Anzahl der CpGs, die als differentiell methyliert zwischen gealterten Klonen und bestrahlten Klonen identifiziert wurden, unterschied sich stark zwischen den beiden

Experimenten. Dies weist darauf hin, dass die zwei Fibroblastenlinien, die als Ausgangsmaterial für die Klonierung verwendet worden waren, unterschiedlich sensitiv auf die Bestrahlung reagierten. Dadurch kann auch die geringe Anzahl an zwischen den Experimenten überlappenden DMPs und die relativ schwache Korrelation (Spearman-Rho=0,199) zwischen den entsprechenden β -Differenzen beider Experimente erklärt werden. Es ist bekannt, dass Patienten, die sich einer Strahlentherapie unterziehen, unterschiedlich auf die Behandlung reagieren, da sie eine individuelle intrinsische zelluläre Antwort auf Schäden durch Bestrahlung haben. Es wird angenommen, dass diese Variation der Reaktion auf Bestrahlung durch verschiedene genetische Faktoren, die in die Regulation der DNA-Reparatur oder in die Kontrolle der Apoptose involviert sind, verursacht ist [218].

Trotz des bemerkenswerten Unterschieds in der Strahlensensitivität zwischen den Fibroblastenlinien konnten 396 differentiell methylierte CpGs, die mit 259 Genen assoziiert sind, in beiden Fibroblastenlinien detektiert werden. Die Gene waren im mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Signalweg angereichert.

Da die Fibroblastenlinie, die für das erste Experiment verwendet wurde, sensitiver gegenüber Bestrahlung reagierte als die Ausgangskultur des zweiten Experiments, wurden die DNA-Methylierungs-Veränderungen, die im ersten Experiment detektiert worden waren, näher betrachtet. Nachdem nach Genen gefiltert worden war, die mindestens zwei DMPs enthielten, konnten DNA-Methylierungs-Veränderungen von 2.757 Genen mit Bestrahlung assoziiert werden. Die Genset-Anreicherungs-Analyse resultierte in 63 signifikant angereicherten Termini, angeführt von Signalwege in Krebs. Nach Bestrahlung zeigten folglich vor allem Gene, die in die Krebsentstehung und -progression involviert sind, eine aberrante DNA-Methylierung. Der MAPK-Signalweg, der bereits angereichert war, als beide Experimente berücksichtigt wurden, tauchte auch unter den Top 10 der angereicherten Begriffe auf.

Der MAPK-Signalweg leitet als Reaktion auf verschiedene Stimuli Signale von der Zellmembran an den Nukleus weiter. Dabei interagiert er mit zahlreichen intrazellulären Signalwegen und ist dadurch an der Regulation der Proliferation, der Seneszenz, der Apoptose und zahlreicher weiterer zellulärer Prozesse beteiligt [306, 307]. Der MAPK-Signalweg wurde bereits mehrmals mit der Reaktion auf Strahlung in Verbindung gebracht [306-309]. Es wurde gezeigt, dass der MAPK-Signalweg durch ionisierende Strahlung oder andere toxische Stressfaktoren aktiviert wird und dass seine Signale eine kritische Rolle bei der Kontrolle des Zellüberlebens nach Strahlenexposition spielen [306, 310, 311]. Der MAPK-Signalweg ist in die

Krebsentstehung involviert und seine aberrante Aktivierung wurde mit zahlreichen Krebs-Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [312-315].

Auch der Calcium-Signalweg wurden bereits mit der Reaktion auf Bestrahlung sowie mit der Krebsentstehung assoziiert [309, 316, 317]. Calcium ist ein wichtiges Signalmolekül. Veränderungen des intrazellulären Calcium-Levels beeinflussen zelluläre Funktionen, wie die Sekretion, die Enzymaktivität und die Regulation des Zellzyklus und können zu Apoptose führen [318].

Der Rap1-Signalweg war ebenfalls unter den signifikanten Termini. Das Ras-associated protein-1 (Rap1) ist eine kleine GTPase und Mitglied einer Ras-verwandten Proteinfamilie. Rap1 ist ein wichtiger Regulator grundlegender Zellfunktionen, wie der Bildung und der Kontrolle von Zelladhäsionen, und spielt eine Rolle bei der Zellmigration und -polarisierung. Durch seine Interaktion mit anderen Proteinen ist Rap1 in verschiedenen Krebsarten in die Zellinvasion und die Metastasierung involviert [319, 320].

Fokale Adhäsion und der PI3K-Akt-Signalweg wurden bereits im Zusammenhang mit der Alterung diskutiert (siehe 4.1.1.3). Der PI3K-Akt-Signalweg ist aber auch einer der am häufigsten veränderten Signalwege in Krebs und spielt eine wesentliche Rolle bei der Initiierung eines Tumors und bei der Tumorprogression [321-323]. Tumorzellen zeichnen sich stark durch veränderte Dynamiken der fokalen Adhäsion aus [324, 325].

Insgesamt sind die Gene, deren DNA-Methylierung mit dem Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung assoziiert wurde, in Prozesse involviert, die mit der Entstehung und der Progression von Krebs in Verbindung gebracht werden können.

4.1.2.4 Erhöhtes epigenetisches Alter als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung

Unter Verwendung der „skin & blood clock“, einer epigenetischen Uhr, die für Fibroblasten und *ex vivo* Studien geeignet ist, wurde der Effekt ionisierender Strahlung auf das epigenetische Alter untersucht.

Eine bis 72 Stunden nach Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy blieb das epigenetische Alter im Vergleich zu den nicht-bestrahlten Kulturen relativ konstant. Für die Erstellung der zwei Array-Datensätze wurde die gleiche Fibroblastenlinie verwendet. Die Passagen der bestrahlten und nicht-bestrahlten Kulturen waren innerhalb der Array-Datensätze jeweils gematcht. Allerdings waren die Zellen, deren DNA für das erste Array-Experiment (2 Gy) verwendet wurde, in einer höheren Passage als die Zellen des zweiten Array-Experiments (4 Gy). Dies erklärt den

Unterschied im epigenetischen Alter zwischen den beiden Datensätzen und bestätigt erneut, dass das Passagieren von Zellen einen Effekt auf das epigenetische Alter hat, da für die Proben, die eine höhere Passage aufweisen ein höheres epigenetisches Alter bestimmt wurde.

Als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung konnte eine Zunahme des epigenetischen Alters beobachtet werden. Im Vergleich zu den gealterten Klonen wiesen die bestrahlten Klone in beiden Fibroblastenlinien ein leicht erhöhtes durchschnittliches epigenetisches Alter auf. Studien haben gezeigt, dass das epigenetische Alter von Tumorproben höher ist als das chronologische Alter ihrer Donoren [92, 99]. Es wurde vorgeschlagen, dass die Schätzung des epigenetischen Alters basierend auf Blut-DNA als potentieller Biomarker für die frühe Detektion von Krebs verwendet werden könnte [271]. Ein hohes epigenetisches Alter ist demzufolge ein starker Prädiktor für die Entwicklung von Krebs.

4.1.2.5 Zunahme der DNA-Methylierung des Tumorsuppressor-Gens *RAD51C* als Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung

Wesentliche Eigenschaften von Krebszellen sind eine aberrante Genfunktion und veränderte Genexpressions-Muster. Inzwischen steht fest, dass diese Dysregulation nicht nur durch genetische Veränderungen, sondern auch durch epigenetische Aberrationen verursacht wird. Der abnormale Gewinn an DNA-Methylierung in normalerweise unmethylierten Promotoren und die assoziierte Repression der Transkription und der Genfunktion sind epigenetische Veränderungen, die oft im Zusammenhang mit Krebs studiert werden [326-328]. In den meisten Krebsarten wurde die Hypermethylierung verschiedener Tumorsuppressor-Gene mit deren Stilllegung in Verbindung gebracht [327]. Die Hypermethylierung von Tumorsuppressor-Genen ist in Krebszellen häufiger als die Mutation dieser Gene [329]. Eine permanente Repression von Tumorsuppressor-Genen oder anderen krebsassoziierten Genen fördert die Transformation einer gesunden Zelle zu einer Krebszelle und somit das Fortschreiten der Krebsentwicklung [21, 330].

Mittels DBS wurde das DNA-Methylierungs-Profil der Tumorsuppressor-Gene *ATM*, *BRCA1*, *RAD51C* und *TP53* in den bestrahlten Klonen untersucht, um zu analysieren ob Hypermethylierungs-Ereignisse in den Promotorbereichen von Tumorsuppressor-Genen zu den Langzeit-Effekten ionisierender Strahlung zählen und zur strahleninduzierten Krebsentstehung beitragen könnten. Für alle vier Gene konnte in den bestrahlten Klonen im Vergleich zu den gealterten Klonen keine signifikante Zunahme der durchschnittlichen DNA-Methylierung über alle CpGs und alle Reads detektiert werden.

Für *RAD51C*, das bereits bei der *in vitro* Alterung auffällig war, wurde in der ersten Fibroblastenlinie eine Zunahme der durchschnittlichen DNA-Methylierung von 1,2 % in gealterten Klonen auf 2,2 % in bestrahlten Klonen beobachtet ($p=0,069$). Außerdem zeigten 38,2 % der bestrahlten Klone Reads mit einer DNA-Methylierung über 20 %. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Promotorregion von *RAD51C* in der ersten Fibroblastenlinie nach Bestrahlung anfällig ist für eine aberrante Zunahme an methylierten CpGs. Diese Beobachtung stimmt mit den Methylierungs-Array-Ergebnissen überein, die bereits zeigten, dass die erste Fibroblastenlinie strahlungssensitiv ist und DNA-Methylierungs-Veränderungen nach Strahlenexposition aufweist.

Die Tumorentstehung ist ein vielstufiger komplexer Prozess, an dem eine Anhäufung von genetischen und epigenetischen Veränderungen in mehreren Genen involviert ist [136, 331]. Drei bestrahlte Klone der ersten Fibroblastenlinie wiesen Reads mit einer DNA-Methylierung über 20 % in den Promotorbereichen von *BRCA1* und *RAD51C* auf. Ein Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung könnte demzufolge das Auftreten aberranter Allele in multiplen Genen sein.

4.1.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die in den Prozess des Alterns involviert sind, könnte zur Entwicklung von Therapeutika, die nicht nur die Lebenserwartung erhöhen, sondern auch den Beginn des altersassoziierten funktionellen Verfalls verzögern, beitragen. Da epigenetische Modifikationen reversibel sind, stellen sie vielversprechende Kandidaten für die Identifizierung und Validierung von Anti-Aging Interventionen dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden altersassoziierte DNA-Methylierungs-Veränderungen aufgedeckt, die zum Verständnis der epigenetischen Mechanismen, die in den Prozess des Alterns involviert sind, beitragen können.

Es wird diskutiert inwieweit altersassoziierte Veränderungen, die in menschlichen Zellen *in vivo* auftreten, *in vitro* beobachtet werden können [215]. In beiden Fibroblastenlinien konnten eine globale Hypomethylierung, DNA-Methylierungs-Veränderungen in altersrelevanten Signalwegen und Genen und ein erhöhtes epigenetisches Alter beobachtet werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Langzeit-Kultivierung beginnend bei einer einzelnen Zelle über 20 PVs zu reproduzierbaren, altersassoziierten Veränderungen der DNA-Methylierung führt. Die Ergebnisse weisen somit stark darauf hin, dass Fibroblasten unter diesen experimentellen Bedingungen als *in vitro* Modell für das Altern auf epigenetischer Ebene verwendet werden

können. Auch Bork und seine Kollegen stellten fest, dass die *in vitro* Alterung durch Langzeit-Kultivierung (frühe und späte Passagen) und das *in vivo* Altern (frühe Passagen von jungen und alten Donoren) zwei Prozesse mit ähnlichen epigenetischen Modifikationen sind [265].

Der Vorteil eines *in vitro* Modells ist, dass Störfaktoren, die die DNA-Methylierung im Laufe des Lebens über einen langen Zeitraum beeinflussen, ausgeschlossen und DNA-Methylierungs-Veränderungen auf die intrinsischen altersspezifischen Effekte alleine zurückgeführt werden können. In *in vivo* Altersstudien werden Störfaktoren oft nicht vollständig berücksichtigt, da Informationen über die Lebensweise, die Essgewohnheiten, den BMI, bestehende Krankheiten und andere Einflüsse oft nicht ausreichend vorhanden sind.

Ein weiterer Vorteil eines *ex vivo* Systems ist, dass das Altern über mehrere Jahre in diesem Modell auf wenige Wochen oder Monate beschränkt werden kann. Dies ermöglicht eine zeiteffektive Untersuchung potentieller Wirkstoffe, die, unter anderem durch die Beeinflussung der altersassoziierten DNA-Methylierungs-Veränderungen, den Prozess des Alterns verlangsamen könnten. Außerdem kann der Einfluss verschiedener Risikofaktoren auf das Altern abgeschätzt werden. Exogene Faktoren können Auswirkungen auf epigenetische Modifikationen haben und somit in Regulationsmechanismen eingreifen. Mit dem *in vitro* Modell kann getestet werden ob bestimmte Umwelteinflüsse über einen längeren Zeitraum positive oder negative Effekte auf die DNA-Methylierung haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es verwendet, um die Auswirkungen von Röntgenstrahlung im Zusammenhang mit der Alterung und somit den Langzeit-Effekt ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung zu untersuchen.

Eine globale Hypomethylierung und die Hypermethylierung spezifischer Gene wurde auch in Tumoren beobachtet. Die detektierten altersassoziierten DNA-Methylierungs-Veränderungen erinnern somit an Aberrationen des DNA-Methylierungs-Profiles, die mit Krebs assoziiert wurden. Es könnte demnach einen Zusammenhang zwischen den durch das Alter bedingten Veränderungen der DNA-Methylierung und dem erhöhten Krebsrisiko, das in der älteren Population beobachtet wird, geben [332, 333].

Ziel der in den Fibroblasten durchgeführten Versuche war es, neben altersassoziierten DNA-Methylierungs-Veränderungen strahleninduzierte Aberrationen des DNA-Methylierungs-Profiles normaler Zellen zu untersuchen, um die Hypothese zu testen, dass epigenetische Mechanismen an der Entstehung eines durch Strahlentherapie hervorgerufenen Zweittumors beteiligt sein könnten.

Zunächst wurden die DNA-Methylierungs-Veränderungen innerhalb des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung analysiert. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass in normalen Fibroblasten keine direkten DNA-Methylierungs-Veränderungen durch eine einmalige Dosis Röntgenstrahlen verursacht werden. Die frühe Phase der DNA-Schadensantwort bringt in normalen Zellen folglich keine wesentlichen Veränderungen des DNA-Methylierungs-Musters mit sich. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sehr geringe Veränderungen der DNA-Methylierung nicht erfasst werden konnten. Um marginale Effekte detektieren zu können, müsste man in zukünftigen Studien die Anzahl der analysierten Proben erhöhen. Es wäre auch denkbar, dass andere epigenetische Mechanismen, wie Histon-Modifikationen oder die Expression von miRNAs, im Zusammenhang mit der direkten Schadensantwort verändert sein könnten. In Krebszellen konnten direkt nach Bestrahlung Veränderungen der DNA-Methylierung detektiert werden. Strahlentherapie basiert auf den unterschiedlichen biologischen Eigenschaften von Tumoren und gesunden Geweben. Man geht davon aus, dass die genetisch instabilen Tumorzellen empfindlicher gegenüber Strahlenexposition sind und zugrunde gehen, wohingegen normale Zellen die durch die Strahlung induzierten Schäden reparieren können. Da Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen ein verändertes DNA-Methylierungs-Profil aufweisen, sind sie auch auf epigenetischer Ebene bereits instabil und daher vermutlich anfälliger für DNA-Methylierungs-Veränderungen durch ionisierende Strahlung. Dies könnte erklären, warum in Krebszellen direkt nach Bestrahlung mit nur einer einzelnen Dosis Auswirkungen auf die DNA-Methylierung beobachtet werden können. Normale Zellen können den Schaden dagegen ohne wesentliche Veränderungen der DNA-Methylierung verkraften.

Um neben den direkten Effekten auch die Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung untersuchen zu können, wurde das *in vitro* Modell für das Altern in Verbindung mit Strahlenexposition verwendet. Als Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung traten die DNA-Methylierungs-Veränderungen, die bereits im Zusammenhang mit der *in vitro* Alterung detektiert wurden, verstärkt auf. Im Vergleich zu den gealterten Klonen lagen in den bestrahlten Klonen eine globale Hypomethylierung und DNA-Methylierungs-Veränderungen von Genen und Signalwegen, die mit Krebs assoziiert wurden, vor. Außerdem war die DNA-Methylierung der rDNA und das epigenetische Alter nach Bestrahlung tendenziell erhöht. Das in den bestrahlten Klonen detektierte DNA-Methylierungs-Muster erinnert somit stark an das DNA-Methylierungs-Profil von Tumorzellen.

Aberrante DNA-Methylierungs-Muster können schon früh während des Prozesses der Krebsentstehung detektiert werden und können zahlreiche verschiedene biologische Prozesse beeinflussen [334]. Es wird daher immer deutlicher, dass Veränderungen der DNA-Methylierung nicht nur eine passive Begleiterscheinung im Prozess der Krebsentstehung oder eine Folge der neoplastischen Transformation sind. Man geht dagegen davon aus, dass sie aktiv an der Entstehung eines Tumors beteiligt sind. Die durch ionisierende Strahlung induzierten DNA-Methylierungs-Veränderungen könnten somit in die Krebsentstehung nach Strahlenexposition involviert sein und zu dem sekundären Krebsrisiko nach Strahlentherapie beitragen.

Patienten reagieren unterschiedlich auf Strahlentherapie. Es wird angenommen, dass die Variation der Reaktion auf Bestrahlung durch verschiedene genetische Faktoren, die die individuelle intrinsische zelluläre Schadensantwort regulieren, bedingt ist [218]. Da die Versuche zu den Langzeit-Effekten ionisierender Strahlung in zwei Fibroblastenlinien durchgeführt wurden, konnte festgestellt werden, dass die individuelle Sensitivität gegenüber Strahlung auch auf epigenetischer Ebene widerspiegelt wird. Die Anzahl an untersuchten Individuen sollte in Folgestudien erhöht werden, um dieser Beobachtung weiter nachzugehen. DNA-Methylierungs-Signaturen in strahlenexponierten gesunden Zellen könnten als Marker etabliert werden, um die individuellen Auswirkungen ionisierender Strahlung auf das DNA-Methylierungs-Profil zu untersuchen. Außerdem könnten Zusammenhänge zwischen der genetischen Prädisposition und den Langzeit-Effekten ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung untersucht werden. Unter der Annahme, dass die beobachteten DNA-Methylierungs-Veränderungen die Entstehung eines Tumors begünstigen, könnten Marker identifiziert werden, die zur Einschätzung des Langzeit-Krebsrisikos von Patienten, die eine Strahlentherapie erhalten, beitragen.

Da viele Studien gezeigt haben, dass strahleninduzierte DNA-Methylierungs-Veränderungen gewebspezifisch sind, wäre es interessant die Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung in verschiedenen Zelltypen zu untersuchen. Fetale Fibroblasten wurden für das Projekt gewählt, da erwartet wurde, dass diese sich für mindestens 50 PVs expandieren lassen [221]. Dabei wurde jedoch nicht bedacht, dass fetale Fibroblasten, die im Fruchtwasser gefunden werden, bereits mehrere Zellteilungen durchlaufen haben und unter Zellkultur-Bedingungen nicht immer ihre maximale Proliferations-Kapazität erreichen können. Es war daher nicht möglich ausgehend von einzelnen Zellen der Klone Subklone zu erstellen und so

den Verlauf der DNA-Methylierungs-Veränderungen nachzuverfolgen. Um die Generierung von Subklonen in Folgestudien realisieren zu können, sollten für weitere Experimente Zellen gewählt werden, die eine längere Kultivierung erlauben.

Zusammenfassend kann dennoch gesagt werden, dass Einzelzell-Klone primärer humaner Fibroblasten als *in vitro* Modell für das Altern geeignet sind, um epigenetische Mechanismen des Prozesses des Alterns und die Auswirkungen exogener Faktoren, wie zum Beispiel ionisierender Strahlung, auf altersassoziierte DNA-Methylierungs-Veränderungen zu untersuchen. Ionisierende Strahlung hat in normalen Zellen keine wesentlichen Auswirkungen auf die DNA-Methylierung direkt nach Strahlenexposition, durch die *in vitro* Alterung nach Bestrahlung treten jedoch die durch die Alterung bedingten Veränderungen der DNA-Methylierung verstärkt auf und ein DNA-Methylierungs-Profil, das die Tumorentwicklung begünstigen könnte, entsteht.

4.2 Veränderungen der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit vorzeitigem Altern in WS-Patienten

Progeroide Syndrome sind charakterisiert durch das frühe Auftreten klinischer Eigenschaften, die mit dem normalen Altern assoziiert sind. Unter zahlreichen verschiedenen Mechanismen, die am Prozess des Alterns beteiligt sind, spielen epigenetische Modifikationen eine wichtige Rolle. Veränderungen im DNA-Methylierungs-Profil könnten an den klinischen Manifestationen des WS beteiligt sein. In dieser Arbeit wurde die DNA-Methylierung repetitiver Elemente und das epigenetische Alter in Gesamtblutproben von WS-Patienten analysiert.

4.2.1 Globale DNA-Methylierung in WS-Patienten

Patienten mit WS weisen Symptome des vorzeitigen Alterns und eine erhöhte Prädisposition für Krebs auf. Durch die Analyse der DNA-Methylierung repetitiver Elemente, als Marker für Veränderungen der globalen DNA-Methylierung, wurden das Altern und Krebs bereits häufig mit einer globalen Hypomethylierung assoziiert [54, 335-337]. Die reduzierte DNA-Methylierung von transposablen Elementen trägt zu deren Reaktivierung und damit zur genomischer Instabilität bei [338]. Fibroblasten von WS-Patienten sind charakterisiert durch eine erhöhte genomische Instabilität [339, 340]. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass WS-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen eine reduzierte DNA-Methylierung der repetitiven Elemente aufweisen. Die WS-Patienten zeigten jedoch im Vergleich zu den

Kontrollen sehr ähnliche DNA-Methylierungs-Level der repetitiven Elemente α -Satelliten-DNA, ALU und LINE-1. Dieses Ergebnis widerspricht zwar der oben genannten Hypothese, stimmt aber mit der Beobachtung aus einer Studie von Zhang *et al.* überein, dass WRN-defiziente mesenchymale Stammzellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen keine signifikante Veränderung im 5mC-Level aufweisen [341].

4.2.2 Erhöhte DNA-Methylierung der rDNA in WS-Patienten

Veränderungen in der Biologie des Nukleolus und der Ribosomen wurden bereits mit dem Prozess des Alterns in Verbindung gebracht [236-238]. Die DNA-Methylierung der sich tandemartig wiederholenden rDNA-Gene wurde mit Krebs und anderen Krankheiten assoziiert [191, 301].

In unserer Studie konnte in den WS-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen eine um mehr als 2 % erhöhte DNA-Methylierung der untersuchten rDNA-Regionen beobachtet werden. Da die DNA-Methylierung der rDNA sowohl in den Kontrollen als auch in den WS-Patienten eine hohe Variation zeigte, war dieser Unterschied nicht signifikant. Machwe und seine Kollegen untersuchten die Rolle der rDNA im Prozess des normalen und des vorzeitigen Alterns, indem sie Veränderungen der rDNA-Gene während der *in vitro* Seneszenz in normalen und WS-Fibroblasten analysierten. Sie konnten beobachten, dass die zelluläre Seneszenz von einer signifikanten Zunahme der DNA-Methylierung der rDNA-Gene begleitet wurde. Dieser Effekt war in WS-Fibroblasten deutlich ausgeprägter als in normalen Fibroblasten [233].

4.2.3 Beschleunigung des epigenetischen Alterns in WS-Patienten

Unter der Verwendung der epigenetischen Uhr („Horvath’s clock“) wurde das epigenetische Alter der WS-Patienten und der gesunden Kontrollen berechnet. Es lag eine starke, positive Korrelation zwischen dem chronologischen und dem epigenetischen Alter vor. Wie erwartet nahm das epigenetische Alter also mit steigendem chronologischen Alter zu.

Der Wert für die Beschleunigung des Alterns (AgeAccel) war positiv. Das beobachtete epigenetische Alter der WS-Patienten war somit höher als der Wert, der durch das lineare Regressionsmodell durch die Kontrollen vorhergesagt wurde. Auch die Messung zur Beschleunigung des intrinsischen epigenetischen Alterns (IEAA), die nicht von Unterschieden in der Zusammensetzung der Blutzellen beeinflusst wird, und zur Beschleunigung des extrinsischen epigenetischen Alterns (EEAA), bei der altersassoziierte Veränderungen der Blutzell-Komposition beachtet werden, konnten mit WS assoziiert werden.

Das DNA-Methylierungs-Profil ist zelltypspezifisch und unterscheidet sich somit zwischen den verschiedenen Blutzelltypen. Da die jeweilige Zusammensetzung der Blutzellen zwischen Individuen variieren kann und durch pathologische Zustände beeinflusst werden kann, sollte bei DNA-Methylierungs-Analysen von Gesamtblutproben stets die Blutzell-Komposition als Störfaktor beachtet werden. Da der Effekt des epigenetischen Alterns auch für die zellintrinsische Messung IEAA bestimmt werden konnte und da die Effekte in multivariaten Modellen, die für die Blutzell-Werte korrigiert wurden, signifikant blieben, konnten Variationen der Blutzell-Zusammensetzung als Störfaktor ausgeschlossen werden.

Der tatsächliche Wert der Beschleunigung des epigenetischen Alterns wurde mit einem multivariaten Regressionsmodell berechnet. WS ist mit einem um 6,44 Jahre erhöhtem Alter assoziiert. Das durchschnittliche Sterbealter von Patienten mit WS liegt bei 54 Jahren, das gesunder Individuen bei etwa 80 Jahren in Japan und bei ungefähr 74 Jahren in den Vereinigten Staaten von Amerika [109, 342]. Es liegt demnach eine quantitative Differenz zwischen dem Grad des beschleunigten epigenetischen Alterns und dem durchschnittlichen Sterbealter von WS-Patienten vor. Diese Diskrepanz könnte die Tatsache reflektieren, dass das in Blutproben ermittelte epigenetische Alter nur eine unvollständige Messung des Alters des gesamten Organismus ist. Das Alter eines Organismus kann besser geschätzt werden, wenn man die Berechnungen des epigenetischen Alters verschiedener Gewebe und Organe kombiniert.

Eine Beschleunigung des epigenetischen Alterns wurde auch mit einem anderen progeroiden Syndrom, dem Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom (HGPS), in Verbindung gebracht. Da Fibroblasten von HGPS-Patienten untersucht wurden, wurde die „skin & blood clock“, die für *ex vivo* Studien mit menschlichen Zellen geeignet ist, verwendet und im Vergleich zu den Kontrollen eine Beschleunigung des epigenetischen Alterns detektiert [101].

WS wird durch den Verlust der RecQ-Helikase WRN verursacht, der zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist aber noch unklar. Es gibt verschiedene Theorien, die die beobachtete Beschleunigung des epigenetischen Alterns erklären könnten [219].

Als DNA-Helikase ist WRN in zelluläre Prozesse involviert, in welchen doppelsträngige DNA getrennt werden muss, einschließlich der DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Transkription. RNA-Helikasen spielen dagegen eine Rolle in allen Abläufen, die RNA involvieren, wie Transkription, Splicing und Translation. Es wurde gezeigt, dass RNA-Helikasen die epigenetische Alterungsrate im Cerebellum beeinflussen [343, 344]. Auch wenn DNA-

Helikasen und RNA-Helikasen vielleicht nicht viel gemeinsam haben und der Zusammenhang zwischen der Helikase-Aktivität und der epigenetischen Alterungsrate nur im Cerebellum beobachtet wurde, besagt die Helikase-Theorie des beschleunigten epigenetischen Alterns, dass WRN in der Funktion als DNA-Helikase zum epigenetischen Altern im Blut beitragen könnte.

Zellen von WS-Patienten zeigen langsame Wachstumsraten, vorzeitige Seneszenz und genomische Instabilität [345]. Die Tatsache, dass der Funktionsverlust von *WRN* WS verursacht, bekräftigt, dass die genomische Instabilität ein fundamentaler Mechanismus des Alterns ist [346]. Die Theorie zur Epigenom-Instabilität als Ursache für das beschleunigte epigenetische Altern beruht darauf, dass *WRN* auch eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Chromatin-Stabilität spielt [121]. Unter der Annahme, dass die epigenetische Uhr mit den Funktionen eines epigenetische Aufrechterhaltungs-System in Verbindung gebracht werden kann, deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass der Funktionsverlust von *WRN* dieses System beeinflusst, wodurch ein erhöhtes epigenetisches Alter hervorgerufen wird [99].

Die Beschleunigung des epigenetischen Alterns im Zusammenhang mit WS könnte auch aus der Verkürzung der Telomere resultieren. Es wurde gezeigt, dass der Verlust von *WRN* die Telomerverkürzung fördert [345]. Die ektoische Expression der Telomerase in WS-Fibroblasten konnte diese teilweise vor der vorzeitigen Seneszenz bewahren und die genomische Integrität erhöhen [339, 347]. Der Hauptkritikpunkt an der Telomer-Theorie des beschleunigten epigenetischen Alterns ist, dass die Messung IEAA in peripheren Blutzellen und in Fettgewebe nicht mit der Telomerlänge korreliert [348, 349].

Die Immunoseneszenz-Theorie des beschleunigten epigenetischen Alterns besagt, dass das in Gesamtblutproben von WS-Patienten beobachtete beschleunigte epigenetische Altern auf Veränderungen der Blutzell-Zusammensetzung, die mit der Immunoseneszenz assoziiert sind, zurückgeführt werden könnte. Die altersassoziierten Veränderungen in der Zusammensetzung der T-Zellen beinhalten die Reduktion der naiven CD8+ T-Zellen, die in den Schutz gegen Infektions-Krankheiten involviert sind und eine wichtige Rolle bei der Immunüberwachung von Malignomen spielen [350]. Diese Theorie wird unterstützt durch das Ergebnis, dass naive CD8+ T-Zellen in WS reduziert zu sein scheinen. Allerdings ist diese Abnahme der CD8+ T-Zellen mit dem p-Wert=0,025 nach der Adjustierung für multiples Testen nicht mehr signifikant. Diesem Ergebnis könnte in einer größeren Studie, in der möglichst auch Durchflusszytometrie-Messungen durchgeführt werden sollten, nachgegangen werden.

Außerdem widerspricht der Immunoseneszenz-Theorie, dass keine Assoziation zwischen den erschöpften CD8⁺ T-Zellen und WS detektiert werden konnte und dass die beobachtete Beschleunigung des epigenetischen Alterns gemäß der Analyse durch ein multivariates Modell unabhängig von den Veränderungen der Blutzell-Komposition ist.

4.2.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Das DNA-Methylierungs-Profil von WS-Patienten wurde untersucht und gegen das von gesunden Kontrollen verglichen, um DNA-Methylierungs-Veränderungen im Zusammenhang mit dem vorzeitigen Altern zu identifizieren. Progeroide Syndrome ähneln bis zu einem gewissen Ausmaß dem physiologischen Prozess des Alterns und könnten als Modell dienen, um Einblicke in die Biologie des normalen menschlichen Alterns zu bekommen [351, 352]. Das Wissen, das wir durch die Analyse der molekularen Pathologie humaner progeroider Syndrome erhalten, könnte dazu beitragen den komplexen Prozess des Alterns zu verstehen. Die Beobachtung, dass das vorzeitige Altern der WS-Patienten nicht mit einer globalen Hypomethylierung in Verbindung gebracht werden kann, lässt die Vermutung zu, dass die globale Hypomethylierung, die mit dem normalen Altern assoziiert ist, keine wesentlichen Auswirkungen auf den Alters-Phänotyp hat, sondern eher eine passive Begleiterscheinung ist. Ein häufig diskutiertes Thema im Bereich der Altersforschung ist, ob progeroide Syndrome eine beschleunigte Form des normalen Alterns darstellen. Dieser Fragestellung könnte bei einer umfassenderen Analyse der EPIC-Methylierungs-Array-Daten, die die Detektion von zwischen den Kontrollen und den WS-Patienten differentiell methylierter Regionen miteinschließen sollte, weiter nachgegangen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass WS mit einem erhöhten epigenetischen Alter und mit einer tendenziell erhöhten DNA-Methylierung der rDNA assoziiert werden kann. Es gibt demzufolge spezifische epigenetische Veränderungen, die für eine Beschleunigung der mit dem normalen Altern assoziierten DNA-Methylierungs-Veränderungen sprechen. Da alle WS-Patienten dieser Studie bestätigte Mutation im *WRN*-Gen aufweisen, sollten diese beobachteten Effekte des beschleunigten epigenetischen Alterns Konsequenzen des Funktionsverlusts von *WRN* sein. Hier liegt somit ein Beispiel dafür vor, wie ein endogener Faktor die altersassoziierten DNA-Methylierungs-Veränderungen beeinflussen kann.

Bisher richtet sich die Behandlung von WS gegen die einzelnen Symptome des jeweiligen Individuums. Ein anderer Ansatz wäre einen molekularen Schalter zu finden, der das Auftreten aller oder zumindest mehrerer Symptome des vorzeitigen Alterns verhindern könnte. Die

Tatsache, dass bei WS-Patienten eine Beschleunigung des epigenetischen Alterns vorliegt und dass diese mit Hilfe der epigenetischen Uhr relativ leicht messbar ist, könnte genutzt werden, um potentielle Medikamente zu testen. Die epigenetische Uhr könnte als Biomarker für die Wirksamkeit verschiedener Therapeutika im Zusammenhang mit dem vorzeitigen Altern verwendet werden.

Für unsere Studie standen uns Gesamtblutproben von 18 WS-Patienten zur Verfügung. Im Feld der WS-Forschung ist das eine relativ große Probensammlung, in bisherigen Studien zur DNA-Methylierung wurden nur drei oder weniger Patienten mit *WRN*-Mutation untersucht [122, 123]. Dennoch sollte in zukünftigen Studien die Anzahl der Patienten möglichst erhöht und neben Gesamtblut auch weiteres Gewebe analysiert werden, um die beobachteten DNA-Methylierungs-Muster auch in anderen Gewebetypen zu bestätigen.

Neben der DNA-Methylierung, die nur ein Teilgebiet der Epigenetik darstellt, könnten in weiteren Studien auch andere epigenetische Mechanismen im Zusammenhang mit dem vorzeitigen Altern untersucht werden.

5 Referenzen

5.1 Literaturverzeichnis

1. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: a landscape takes shape*. Cell, 2007. **128**(4): p. 635-8.
2. Allis, C.D. and T. Jenuwein, *The molecular hallmarks of epigenetic control*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(8): p. 487-500.
3. Zheng, Y., et al., *Prediction of genome-wide DNA methylation in repetitive elements*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(15): p. 8697-8711.
4. Schubeler, D., *Function and information content of DNA methylation*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 321-6.
5. Li, B., M. Carey, and J.L. Workman, *The role of chromatin during transcription*. Cell, 2007. **128**(4): p. 707-19.
6. Rouhi, A., et al., *MiRNAs, epigenetics, and cancer*. Mamm Genome, 2008. **19**(7-8): p. 517-25.
7. D'Addario, C., et al., *Epigenetic mechanisms and endocannabinoid signalling*. FEBS J, 2013. **280**(9): p. 1905-17.
8. Tollefsbol, T.O., *Epigenetics: The new science of genetics*, in *Handbook of Epigenetics*. 2010, The New Molecular and Medical Genetics, hg. Academic Press. p. 1-6.
9. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 381-95.
10. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33** Suppl: p. 245-54.
11. Moosavi, A. and A. Motevalizadeh Ardekani, *Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases*. Iran Biomed J, 2016. **20**(5): p. 246-58.
12. Tycko, B. and J. Ashkenas, *Epigenetics and its role in disease*. J Clin Invest, 2000. **105**(3): p. 245-6.
13. Chiang, P.K., et al., *S-Adenosylmethionine and methylation*. FASEB J, 1996. **10**(4): p. 471-80.
14. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2395-402.
15. Jin, B., Y. Li, and K.D. Robertson, *DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?* Genes Cancer, 2011. **2**(6): p. 607-17.
16. Wu, X. and Y. Zhang, *TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(9): p. 517-534.
17. Jones, P.A. and G. Liang, *Rethinking how DNA methylation patterns are maintained*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(11): p. 805-11.
18. De Carvalho, D.D., J.S. You, and P.A. Jones, *DNA methylation and cellular reprogramming*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(10): p. 609-17.
19. Haaf, T., *The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosome structure and function: implications for methylation-associated cellular processes*. Pharmacol Ther, 1995. **65**(1): p. 19-46.
20. D'Urso, A. and J.H. Brickner, *Mechanisms of epigenetic memory*. Trends Genet, 2014. **30**(6): p. 230-6.
21. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
22. Takai, D. and P.A. Jones, *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3740-5.
23. Jones, P.A., *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(7): p. 484-92.
24. Clouaire, T. and I. Stancheva, *Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin?* Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(10): p. 1509-22.
25. Zhu, H., G. Wang, and J. Qian, *Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(9): p. 551-65.
26. Deaton, A.M. and A. Bird, *CpG islands and the regulation of transcription*. Genes Dev, 2011. **25**(10): p. 1010-22.
27. Jain, P.K., *Epigenetics: the role of methylation in the mechanism of action of tumor suppressor genes*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **983**: p. 71-83.
28. Holliday, R., *DNA methylation and epigenotypes*. Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(5): p. 500-4.
29. Portela, A. and M. Esteller, *Epigenetic modifications and human disease*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1057-68.
30. Ehrlich, M. and K.C. Ehrlich, *DNA cytosine methylation and hydroxymethylation at the borders*. Epigenomics, 2014. **6**(6): p. 563-6.

31. Fleischer, T., et al., *DNA methylation at enhancers identifies distinct breast cancer lineages*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1379.
32. Aran, D., S. Sabato, and A. Hellman, *DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes*. Genome Biol, 2013. **14**(3): p. R21.
33. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
34. de Koning, A.P., et al., *Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome*. PLoS Genet, 2011. **7**(12): p. e1002384.
35. Koga, A., et al., *Evolutionary origin of higher-order repeat structure in alpha-satellite DNA of primate centromeres*. DNA Res, 2014. **21**(4): p. 407-15.
36. Rudd, M.K., G.A. Wray, and H.F. Willard, *The evolutionary dynamics of alpha-satellite*. Genome Res, 2006. **16**(1): p. 88-96.
37. Smith, Z.D. and A. Meissner, *DNA methylation: roles in mammalian development*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(3): p. 204-20.
38. Gonzalez, I.L. and J.E. Sylvester, *Complete sequence of the 43-kb human ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer*. Genomics, 1995. **27**(2): p. 320-8.
39. Birch, J.L. and J.C. Zomerdijk, *Structure and function of ribosomal RNA gene chromatin*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 4): p. 619-24.
40. Leary, D.J. and S. Huang, *Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus*. FEBS Lett, 2001. **509**(2): p. 145-50.
41. Moss, T., et al., *A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(1): p. 29-49.
42. Wang, W., et al., *Ribosomal proteins and human diseases: pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic implications*. Med Res Rev, 2015. **35**(2): p. 225-85.
43. Agrawal, S. and A.R. Ganley, *Complete Sequence Construction of the Highly Repetitive Ribosomal RNA Gene Repeats in Eukaryotes Using Whole Genome Sequence Data*. Methods Mol Biol, 2016. **1455**: p. 161-81.
44. Batzer, M.A. and P.L. Deininger, *Alu repeats and human genomic diversity*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(5): p. 370-9.
45. Pray, L., *Transposons: The jumping genes*. Nature Education, 2008. **1**(1): p. 204.
46. Ostertag, E.M. and H.H. Kazazian, Jr., *Biology of mammalian L1 retrotransposons*. Annu Rev Genet, 2001. **35**: p. 501-38.
47. Gu, Z., et al., *Enrichment analysis of Alu elements with different spatial chromatin proximity in the human genome*. Protein Cell, 2016. **7**(4): p. 250-266.
48. Girard, L. and M. Freeling, *Regulatory changes as a consequence of transposon insertion*. Dev Genet, 1999. **25**(4): p. 291-6.
49. Kochanek, S., D. Renz, and W. Doerfler, *DNA methylation in the Alu sequences of diploid and haploid primary human cells*. EMBO J, 1993. **12**(3): p. 1141-51.
50. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 335-40.
51. Miousse, I.R., et al., *Response of transposable elements to environmental stressors*. Mutat Res Rev Mutat Res, 2015. **765**: p. 19-39.
52. Miousse, I.R. and I. Koturbash, *The Fine LINE: Methylation Drawing the Cancer Landscape*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 131547.
53. Choi, S.H., et al., *Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer*. Int J Cancer, 2009. **125**(3): p. 723-9.
54. Yang, A.S., et al., *A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. e38.
55. Sellis, D., A. Provata, and Y. Almirantis, *Alu and LINE1 distributions in the human chromosomes: evidence of global genomic organization expressed in the form of power laws*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(11): p. 2385-99.
56. Lopez-Otin, C., et al., *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-217.
57. Aunan, J.R., et al., *Molecular and biological hallmarks of ageing*. Br J Surg, 2016. **103**(2): p. e29-46.
58. Hoeijmakers, J.H., *DNA damage, aging, and cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(15): p. 1475-85.
59. Lord, C.J. and A. Ashworth, *The DNA damage response and cancer therapy*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 287-94.
60. Moskalev, A.A., et al., *The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria*. Ageing Res Rev, 2013. **12**(2): p. 661-84.

61. Blasco, M.A., *Telomere length, stem cells and aging*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(10): p. 640-9.
62. Jiang, H., Z. Ju, and K.L. Rudolph, *Telomere shortening and ageing*. Z Gerontol Geriatr, 2007. **40**(5): p. 314-24.
63. Johnson, A.A., et al., *The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease*. Rejuvenation Res, 2012. **15**(5): p. 483-94.
64. Jung, M. and G.P. Pfeifer, *Aging and DNA methylation*. BMC Biol, 2015. **13**: p. 7.
65. Smith-Vikos, T. and F.J. Slack, *MicroRNAs and their roles in aging*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 1): p. 7-17.
66. Wang, Y., Q. Yuan, and L. Xie, *Histone Modifications in Aging: The Underlying Mechanisms and Implications*. Curr Stem Cell Res Ther, 2018. **13**(2): p. 125-135.
67. Balch, W.E., et al., *Adapting proteostasis for disease intervention*. Science, 2008. **319**(5865): p. 916-9.
68. van Deursen, J.M., *The role of senescent cells in ageing*. Nature, 2014. **509**(7501): p. 439-46.
69. Sikora, E., A. Bielak-Zmijewska, and G. Mosieniak, *Cellular senescence in ageing, age-related disease and longevity*. Curr Vasc Pharmacol, 2014. **12**(5): p. 698-706.
70. Slack, C., *Ras signaling in aging and metabolic regulation*. Nutr Healthy Aging, 2017. **4**(3): p. 195-205.
71. Fontana, L., L. Partridge, and V.D. Longo, *Extending healthy life span--from yeast to humans*. Science, 2010. **328**(5976): p. 321-6.
72. Barzilai, N., et al., *The critical role of metabolic pathways in aging*. Diabetes, 2012. **61**(6): p. 1315-22.
73. Riera, C.E., et al., *Signaling Networks Determining Life Span*. Annu Rev Biochem, 2016. **85**: p. 35-64.
74. Costa, M.C., A.L. Leitao, and F.J. Enguita, *Noncoding Transcriptional Landscape in Human Aging*. Curr Top Microbiol Immunol, 2016. **394**: p. 177-202.
75. Green, D.R., L. Galluzzi, and G. Kroemer, *Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging*. Science, 2011. **333**(6046): p. 1109-12.
76. Harman, D., *The Free Radical Theory of Aging: Effect of Age on Serum Copper Levels*. J Gerontol, 1965. **20**: p. 151-3.
77. Hekimi, S., J. Lapointe, and Y. Wen, *Taking a "good" look at free radicals in the aging process*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(10): p. 569-76.
78. Payne, B.A. and P.F. Chinnery, *Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1847**(11): p. 1347-53.
79. Cheung, T.H. and T.A. Rando, *Molecular regulation of stem cell quiescence*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(6): p. 329-40.
80. Ren, R., et al., *Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics*. Cell Metab, 2017. **26**(3): p. 460-474.
81. Kiernan, J., J.E. Davies, and W.L. Stanford, *Concise Review: Musculoskeletal Stem Cells to Treat Age-Related Osteoporosis*. Stem Cells Transl Med, 2017. **6**(10): p. 1930-1939.
82. McCabe, A., et al., *Hematopoietic stem cell loss and hematopoietic failure in severe aplastic anemia is driven by macrophages and aberrant podoplanin expression*. Haematologica, 2018.
83. Giunta, S., *Exploring the complex relations between inflammation and aging (inflamm-aging): anti-inflamm-aging remodelling of inflamm-aging, from robustness to frailty*. Inflamm Res, 2008. **57**(12): p. 558-63.
84. Szarc vel Szic, K., et al., *From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? Clin Epigenetics*, 2015. **7**: p. 33.
85. Heyn, H., et al., *Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. 10522-7.
86. Fraga, M.F., et al., *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10604-9.
87. Feil, R. and M.F. Fraga, *Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(2): p. 97-109.
88. Poulsen, P., et al., *The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases*. Pediatr Res, 2007. **61**(5 Pt 2): p. 38R-42R.
89. Pal, S. and J.K. Tyler, *Epigenetics and aging*. Sci Adv, 2016. **2**(7): p. e1600584.
90. McClay, J.L., et al., *A methylome-wide study of aging using massively parallel sequencing of the methyl-CpG-enriched genomic fraction from blood in over 700 subjects*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(5): p. 1175-85.
91. Bell, J.T., et al., *Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population*. PLoS Genet, 2012. **8**(4): p. e1002629.
92. Hannum, G., et al., *Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates*. Mol Cell, 2013. **49**(2): p. 359-367.
93. Xu, Z. and J.A. Taylor, *Genome-wide age-related DNA methylation changes in blood and other tissues relate to histone modification, expression and cancer*. Carcinogenesis, 2014. **35**(2): p. 356-64.

94. Munoz-Najar, U. and J.M. Sedivy, *Epigenetic control of aging*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(2): p. 241-59.
95. Austad, S.N., *Why women live longer than men: sex differences in longevity*. Gend Med, 2006. **3**(2): p. 79-92.
96. Blair, S.N., et al., *Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women*. JAMA, 1989. **262**(17): p. 2395-401.
97. Horvath, S. and K. Raj, *DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing*. Nat Rev Genet, 2018. **19**(6): p. 371-384.
98. Lee, H.Y., S.D. Lee, and K.J. Shin, *Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads*. BMB Rep, 2016. **49**(7): p. 359-69.
99. Horvath, S., *DNA methylation age of human tissues and cell types*. Genome Biol, 2013. **14**(10): p. R115.
100. Nwanaji-Enwerem, J.C., M.G. Weisskopf, and A.A. Baccarelli, *Multi-tissue DNA methylation age: Molecular relationships and perspectives for advancing biomarker utility*. Ageing Res Rev, 2018. **45**: p. 15-23.
101. Horvath, S., et al., *Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies*. Aging (Albany NY), 2018. **10**(7): p. 1758-1775.
102. Navarro, C.L., P. Cau, and N. Levy, *Molecular bases of progeroid syndromes*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 2**: p. R151-61.
103. Lessel, D., J. Oshima, and C. Kubisch, *[Werner syndrome. A prototypical form of segmental progeria.]*. Med Genet, 2012. **24**(4): p. 262-267.
104. Yamaga, M., et al., *Recent Trends in WRN Gene Mutation Patterns in Individuals with Werner Syndrome*. J Am Geriatr Soc, 2017. **65**(8): p. 1853-1856.
105. Yu, C.E., et al., *Positional cloning of the Werner's syndrome gene*. Science, 1996. **272**(5259): p. 258-62.
106. Yokote, K., et al., *WRN Mutation Update: Mutation Spectrum, Patient Registries, and Translational Prospects*. Hum Mutat, 2017. **38**(1): p. 7-15.
107. Friedrich, K., et al., *WRN mutations in Werner syndrome patients: genomic rearrangements, unusual intronic mutations and ethnic-specific alterations*. Hum Genet, 2010. **128**(1): p. 103-11.
108. Suzuki, T., et al., *Diverged nuclear localization of Werner helicase in human and mouse cells*. Oncogene, 2001. **20**(20): p. 2551-8.
109. Huang, S., et al., *The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients*. Hum Mutat, 2006. **27**(6): p. 558-67.
110. Bohr, V.A., *Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(12): p. 609-20.
111. Brosh, R.M., Jr. and V.A. Bohr, *Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(22): p. 7527-44.
112. Chu, W.K. and I.D. Hickson, *RecQ helicases: multifunctional genome caretakers*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(9): p. 644-54.
113. Hanada, K. and I.D. Hickson, *Molecular genetics of RecQ helicase disorders*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(17): p. 2306-22.
114. Singh, D.K., B. Ahn, and V.A. Bohr, *Roles of RECQ helicases in recombination based DNA repair, genomic stability and aging*. Biogerontology, 2009. **10**(3): p. 235-52.
115. Bachrati, C.Z. and I.D. Hickson, *RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork*. Chromosoma, 2008. **117**(3): p. 219-33.
116. Opresko, P.L., *Telomere ResQue and preservation--roles for the Werner syndrome protein and other RecQ helicases*. Mech Ageing Dev, 2008. **129**(1-2): p. 79-90.
117. Takemoto, M., et al., *Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey*. Geriatr Gerontol Int, 2013. **13**(2): p. 475-81.
118. Salk, D., et al., *Cytogenetic aspects of Werner syndrome*. Adv Exp Med Biol, 1985. **190**: p. 541-6.
119. Melaragno, M.I., D. Pagni, and M.A. Smith, *Cytogenetic aspects of Werner's syndrome lymphocyte cultures*. Mech Ageing Dev, 1995. **78**(2): p. 117-22.
120. Fukuchi, K., G.M. Martin, and R.J. Monnat, Jr., *Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5893-7.
121. Shamanna, R.A., et al., *Recent Advances in Understanding Werner Syndrome*. F1000Res, 2017. **6**: p. 1779.
122. Heyn, H., S. Moran, and M. Esteller, *Aberrant DNA methylation profiles in the premature aging disorders Hutchinson-Gilford Progeria and Werner syndrome*. Epigenetics, 2013. **8**(1): p. 28-33.
123. Guastafierro, T., et al., *Genome-wide DNA methylation analysis in blood cells from patients with Werner syndrome*. Clin Epigenetics, 2017. **9**: p. 92.
124. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.

125. Altieri, F., et al., *DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(5): p. 891-937.
126. van Hoesel, A.Q., et al., *Assessment of DNA methylation status in early stages of breast cancer development*. Br J Cancer, 2013. **108**(10): p. 2033-8.
127. Kulis, M. and M. Esteller, *DNA methylation and cancer*. Adv Genet, 2010. **70**: p. 27-56.
128. Jueliger, S., et al., *Senescence Induced by DNA Demethylating Drugs to Treat Solid Tumors*. 2018. 1-30.
129. Timp, W. and A.P. Feinberg, *Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(7): p. 497-510.
130. Laird, P.W. and R. Jaenisch, *DNA methylation and cancer*. Hum Mol Genet, 1994. **3 Spec No**: p. 1487-95.
131. Hanada, M., et al., *bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1993. **82**(6): p. 1820-8.
132. Nishigaki, M., et al., *Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays*. Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2115-24.
133. Watt, P.M., R. Kumar, and U.R. Kees, *Promoter demethylation accompanies reactivation of the HOX11 proto-oncogene in leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **29**(4): p. 371-7.
134. Hino, O. and T. Kobayashi, *Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex*. Cancer Sci, 2017. **108**(1): p. 5-11.
135. Di Ruscio, A., et al., *The second hit of DNA methylation*. Mol Cell Oncol, 2016. **3**(3): p. e1093690.
136. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
137. Greger, V., et al., *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma*. Hum Genet, 1989. **83**(2): p. 155-8.
138. Merlo, A., et al., *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. Nat Med, 1995. **1**(7): p. 686-92.
139. Majidinia, M. and B. Yousefi, *DNA repair and damage pathways in breast cancer development and therapy*. DNA Repair (Amst), 2017. **54**: p. 22-29.
140. Narod, S.A. and L. Salmena, *BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer*. Discov Med, 2011. **12**(66): p. 445-53.
141. Wu, J., L.Y. Lu, and X. Yu, *The role of BRCA1 in DNA damage response*. Protein Cell, 2010. **1**(2): p. 117-23.
142. Olivier, M., M. Hollstein, and P. Hainaut, *TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(1): p. a001008.
143. Begam, N., K. Jamil, and S.G. Raju, *Promoter Hypermethylation of the ATM Gene as a Novel Biomarker for Breast Cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2017. **18**(11): p. 3003-3009.
144. Bai, A.H., et al., *Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia*. Int J Cancer, 2004. **112**(5): p. 846-53.
145. Esteller, M., et al., *Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(7): p. 564-9.
146. Bai, X., et al., *BRCA1 promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian carcinoma: Association with low expression of BRCA1, improved survival and co-expression of DNA methyltransferases*. Oncol Lett, 2014. **7**(4): p. 1088-1096.
147. Hansmann, T., et al., *Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast cancer*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(21): p. 4669-79.
148. Kang, J.H., et al., *Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma*. Lab Invest, 2001. **81**(4): p. 573-9.
149. Bednarski, J.J. and B.P. Sleckman, *Integrated signaling in developing lymphocytes: the role of DNA damage responses*. Cell Cycle, 2012. **11**(22): p. 4129-34.
150. Borrego-Soto, G., R. Ortiz-Lopez, and A. Rojas-Martinez, *Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer*. Genet Mol Biol, 2015. **38**(4): p. 420-32.
151. Frankenberg-Schwager, M., *Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells*. Radiat Environ Biophys, 1990. **29**(4): p. 273-92.
152. Ward, J.F., *DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1988. **35**: p. 95-125.
153. Moding, E.J., M.B. Kastan, and D.G. Kirsch, *Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(7): p. 526-42.
154. Chi, H.C., et al., *Impact of DNA and RNA Methylation on Radiobiology and Cancer Progression*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(2).

155. Delaney, G., et al., *The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines*. Cancer, 2005. **104**(6): p. 1129-37.
156. Berkey, F.J., *Managing the adverse effects of radiation therapy*. Am Fam Physician, 2010. **82**(4): p. 381-8, 394.
157. Braunstein, S. and J.L. Nakamura, *Radiotherapy-induced malignancies: review of clinical features, pathobiology, and evolving approaches for mitigating risk*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 73.
158. Ng, J. and I. Shuryak, *Minimizing second cancer risk following radiotherapy: current perspectives*. Cancer Manag Res, 2015. **7**: p. 1-11.
159. Little, J.B., *Radiation carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 397-404.
160. Andreassen, C.N. and J. Alsner, *Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: a systematic review*. Radiother Oncol, 2009. **92**(3): p. 299-309.
161. De Ruyscher, D., et al., *First report on the patient database for the identification of the genetic pathways involved in patients over-reacting to radiotherapy: GENEPI-II*. Radiother Oncol, 2010. **97**(1): p. 36-9.
162. Hendry, J.H., *Genomic instability: potential contributions to tumour and normal tissue response, and second tumours, after radiotherapy*. Radiother Oncol, 2001. **59**(2): p. 117-26.
163. Antwi, D.A., et al., *Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways*. Epigenetics, 2013. **8**(8): p. 839-48.
164. Bae, J.H., et al., *Identification of radiation-induced aberrant hypomethylation in colon cancer*. BMC Genomics, 2015. **16**: p. 56.
165. Chaudhry, M.A. and R.A. Omaruddin, *Differential DNA methylation alterations in radiation-sensitive and -resistant cells*. DNA Cell Biol, 2012. **31**(6): p. 908-16.
166. Kalinich, J.F., G.N. Catravas, and S.L. Snyder, *The effect of gamma radiation on DNA methylation*. Radiat Res, 1989. **117**(2): p. 185-97.
167. Aypar, U., W.F. Morgan, and J.E. Baulch, *Radiation-induced epigenetic alterations after low and high LET irradiations*. Mutat Res, 2011. **707**(1-2): p. 24-33.
168. Goetz, W., M.N. Morgan, and J.E. Baulch, *The effect of radiation quality on genomic DNA methylation profiles in irradiated human cell lines*. Radiat Res, 2011. **175**(5): p. 575-87.
169. Miousse, I.R., K.R. Kutanzi, and I. Koturbash, *Effects of ionizing radiation on DNA methylation: from experimental biology to clinical applications*. Int J Radiat Biol, 2017. **93**(5): p. 457-469.
170. Giotopoulos, G., et al., *DNA methylation during mouse hemopoietic differentiation and radiation-induced leukemia*. Exp Hematol, 2006. **34**(11): p. 1462-70.
171. Koturbash, I., I. Pogribny, and O. Kovalchuk, *Stable loss of global DNA methylation in the radiation-target tissue--a possible mechanism contributing to radiation carcinogenesis?* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(2): p. 526-33.
172. Pogribny, I., et al., *Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(10): p. 553-61.
173. Loree, J., et al., *Radiation-induced molecular changes in rat mammary tissue: possible implications for radiation-induced carcinogenesis*. Int J Radiat Biol, 2006. **82**(11): p. 805-15.
174. Kovalchuk, O., et al., *Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation*. Mutat Res, 2004. **548**(1-2): p. 75-84.
175. Koturbash, I., et al., *Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen in vivo*. Carcinogenesis, 2007. **28**(8): p. 1831-8.
176. Kuhmann, C., et al., *DNA methylation changes in cells regrowing after fractionated ionizing radiation*. Radiother Oncol, 2011. **101**(1): p. 116-21.
177. Bennett, K.L., et al., *HPV status-independent association of alcohol and tobacco exposure or prior radiation therapy with promoter methylation of FUSSEL18, EBF3, IRX1, and SEPT9, but not SLC5A8, in head and neck squamous cell carcinomas*. Genes Chromosomes Cancer, 2010. **49**(4): p. 319-26.
178. Lahtz, C., et al., *Gamma irradiation does not induce detectable changes in DNA methylation directly following exposure of human cells*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44858.
179. Huang, L., A.R. Snyder, and W.F. Morgan, *Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5848-54.
180. Little, J.B., *Genomic instability and bystander effects: a historical perspective*. Oncogene, 2003. **22**(45): p. 6978-87.
181. Morgan, W.F., *Radiation-induced genomic instability*. Health Phys, 2011. **100**(3): p. 280-1.
182. Sigurdson, A.J. and I.M. Jones, *Second cancers after radiotherapy: any evidence for radiation-induced genomic instability?* Oncogene, 2003. **22**(45): p. 7018-27.

183. Kaup, S., et al., *Radiation-induced genomic instability is associated with DNA methylation changes in cultured human keratinocytes*. *Mutat Res*, 2006. **597**(1-2): p. 87-97.
184. McAnulty, R.J., *Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(4): p. 666-71.
185. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. *Exp Cell Res*, 1961. **25**: p. 585-621.
186. Tigges, J., et al., *The hallmarks of fibroblast ageing*. *Mech Ageing Dev*, 2014. **138**: p. 26-44.
187. Koch, C.M., et al., *Monitoring of cellular senescence by DNA-methylation at specific CpG sites*. *Aging Cell*, 2012. **11**(2): p. 366-9.
188. Kumar, D., et al., *Development and Characterization of an In Vitro Model for Radiation-Induced Fibrosis*. *Radiat Res*, 2018. **189**(3): p. 326-336.
189. Niccoli, T. and L. Partridge, *Ageing as a risk factor for disease*. *Curr Biol*, 2012. **22**(17): p. R741-52.
190. Teschler, S., et al., *Aberrant DNA Methylation of rDNA and PRIMA1 in Borderline Personality Disorder*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(1).
191. Raval, A., et al., *Reduced rRNA expression and increased rDNA promoter methylation in CD34+ cells of patients with myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2012. **120**(24): p. 4812-8.
192. Hayatsu, H., *Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis--a personal account*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2008. **84**(8): p. 321-30.
193. Krueger, F., et al., *DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data*. *Nat Methods*, 2012. **9**(2): p. 145-51.
194. Tost, J. and I.G. Gut, *DNA methylation analysis by pyrosequencing*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(9): p. 2265-75.
195. Bibikova, M., et al., *High density DNA methylation array with single CpG site resolution*. *Genomics*, 2011. **98**(4): p. 288-95.
196. Bibikova, M., et al., *Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium(R) assay*. *Epigenomics*, 2009. **1**(1): p. 177-200.
197. Lizio, M., et al., *Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas*. *Genome Biol*, 2015. **16**: p. 22.
198. Siggins, L. and K. Ekwall, *Epigenetics, chromatin and genome organization: recent advances from the ENCODE project*. *J Intern Med*, 2014. **276**(3): p. 201-14.
199. Morris, T.J., et al., *ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(3): p. 428-30.
200. Aryee, M.J., et al., *Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(10): p. 1363-9.
201. Zhou, W., P.W. Laird, and H. Shen, *Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(4): p. e22.
202. Teschendorff, A.E., et al., *A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data*. *Bioinformatics*, 2013. **29**(2): p. 189-96.
203. Johnson, W.E., C. Li, and A. Rabinovic, *Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods*. *Biostatistics*, 2007. **8**(1): p. 118-27.
204. Chen, J., A.M. MacEachren, and D.J. Pequet, *Constructing overview+detail dendrogram-matrix views*. *IEEE Trans Vis Comput Graph*, 2009. **15**(6): p. 889-96.
205. Smyth, G.K., *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004. **3**: p. Article3.
206. Wettenhall, J.M. and G.K. Smyth, *limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data*. *Bioinformatics*, 2004. **20**(18): p. 3705-6.
207. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing*. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 1995. **57**(1): p. 289-300.
208. Chen, E.Y., et al., *Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool*. *BMC Bioinformatics*, 2013. **14**: p. 128.
209. Kuleshov, M.V., et al., *Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(W1): p. W90-7.
210. Houseman, E.A., et al., *DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution*. *BMC Bioinformatics*, 2012. **13**: p. 86.
211. Klemra, P. and S. Doubal, *A new approach to the concept and computation of biological age*. *Mech Ageing Dev*, 2006. **127**(3): p. 240-8.
212. Bernstein, D.L., et al., *The BisPCR(2) method for targeted bisulfite sequencing*. *Epigenetics Chromatin*, 2015. **8**: p. 27.

213. Rahmann S, B.J., Kanber D, Martin M, Horsthemke B, Buiting K., *Amplifyer: Automated methylation analysis of amplicons from bisulfite flowgram sequencing*. PeerJ PrePrints, 2013(1): p. e122v2.
214. Phipps, S.M., et al., *Aging cell culture: methods and observations*. Methods Mol Biol, 2007. **371**: p. 9-19.
215. de Magalhaes, J.P., *From cells to ageing: a review of models and mechanisms of cellular senescence and their impact on human ageing*. Exp Cell Res, 2004. **300**(1): p. 1-10.
216. Maierhofer, A., et al., *Analysis of global DNA methylation changes in primary human fibroblasts in the early phase following X-ray irradiation*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0177442.
217. Flunkert, J., et al., *Genetic and epigenetic changes in clonal descendants of irradiated human fibroblasts*. Exp Cell Res, 2018. **370**(2): p. 322-332.
218. Schnarr, K., et al., *Individual radiosensitivity and its relevance to health physics*. Dose Response, 2007. **5**(4): p. 333-48.
219. Maierhofer, A., et al., *Accelerated epigenetic aging in Werner syndrome*. Aging (Albany NY), 2017. **9**(4): p. 1143-1152.
220. Wilson, V.L. and P.A. Jones, *DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells*. Science, 1983. **220**(4601): p. 1055-7.
221. Holliday, R., *Strong effects of 5-azacytidine on the in vitro lifespan of human diploid fibroblasts*. Exp Cell Res, 1986. **166**(2): p. 543-52.
222. Zhang, W., et al., *Comparison of global DNA methylation profiles in replicative versus premature senescence*. Life Sci, 2008. **83**(13-14): p. 475-80.
223. Zampieri, M., et al., *Reconfiguration of DNA methylation in aging*. Mech Ageing Dev, 2015. **151**: p. 60-70.
224. Drinkwater, R.D., et al., *Human lymphocytes aged in vivo have reduced levels of methylation in transcriptionally active and inactive DNA*. Mutat Res, 1989. **219**(1): p. 29-37.
225. Bollati, V., et al., *Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects*. Mech Ageing Dev, 2009. **130**(4): p. 234-9.
226. Nikitin, A.G. and R.J. Shmookler Reis, *Role of transposable elements in age-related genomic instability*. Genet Res, 1997. **69**(3): p. 183-95.
227. Casillas, M.A., Jr., et al., *Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts*. Mol Cell Biochem, 2003. **252**(1-2): p. 33-43.
228. Lopatina, N., et al., *Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts*. J Cell Biochem, 2002. **84**(2): p. 324-34.
229. Armstrong, V.L., et al., *Expression of DNA methyltransferases is influenced by growth hormone in the long-living Ames dwarf mouse in vivo and in vitro*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014. **69**(8): p. 923-33.
230. Mason, J.B., *Biomarkers of nutrient exposure and status in one-carbon (methyl) metabolism*. J Nutr, 2003. **133** Suppl 3(3): p. 941S-947S.
231. Choi, S.W., et al., *Nutritional epigenomics: a portal to disease prevention*. Adv Nutr, 2013. **4**(5): p. 530-2.
232. Kuo, H.K., et al., *The role of homocysteine in multisystem age-related problems: a systematic review*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2005. **60**(9): p. 1190-201.
233. Machwe, A., D.K. Orren, and V.A. Bohr, *Accelerated methylation of ribosomal RNA genes during the cellular senescence of Werner syndrome fibroblasts*. FASEB J, 2000. **14**(12): p. 1715-24.
234. D'Aquila, P., et al., *Methylation of the ribosomal RNA gene promoter is associated with aging and age-related decline*. Aging Cell, 2017. **16**(5): p. 966-975.
235. Oakes, C.C., et al., *Aging results in hypermethylation of ribosomal DNA in sperm and liver of male rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1775-80.
236. Rattan, S.I., *Synthesis, modifications, and turnover of proteins during aging*. Exp Gerontol, 1996. **31**(1-2): p. 33-47.
237. Comai, L., *The nucleolus: a paradigm for cell proliferation and aging*. Braz J Med Biol Res, 1999. **32**(12): p. 1473-8.
238. Steffen, K.K. and A. Dillin, *A Ribosomal Perspective on Proteostasis and Aging*. Cell Metab, 2016. **23**(6): p. 1004-1012.
239. Arnsburg, K. and J. Kirstein-Miles, *Interrelation between protein synthesis, proteostasis and life span*. Curr Genomics, 2014. **15**(1): p. 66-75.
240. Opferman, J.T. and G.P. Zambetti, *Translational research? Ribosome integrity and a new p53 tumor suppressor checkpoint*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 898-901.
241. Zentner, G.E., et al., *Integrative genomic analysis of human ribosomal DNA*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(12): p. 4949-60.
242. Wehrle-Haller, B. and B. Imhof, *The inner lives of focal adhesions*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(8): p. 382-9.
243. Arnesen, S.M. and M.A. Lawson, *Age-related changes in focal adhesions lead to altered cell behavior in tendon fibroblasts*. Mech Ageing Dev, 2006. **127**(9): p. 726-32.

244. Nishio, K. and A. Inoue, *Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts*. *Histochem Cell Biol*, 2005. **123**(3): p. 263-73.
245. Friedman, D.B. and T.E. Johnson, *Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, define the age-1 gene*. *J Gerontol*, 1988. **43**(4): p. B102-9.
246. Kenyon, C., et al., *A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type*. *Nature*, 1993. **366**(6454): p. 461-4.
247. McKay, M.M. and D.K. Morrison, *Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK*. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3113-21.
248. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 211-25.
249. Goitre, L., et al., *The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1120**: p. 1-18.
250. Borrás, C., et al., *RasGrf1 deficiency delays aging in mice*. *Aging (Albany NY)*, 2011. **3**(3): p. 262-76.
251. Slack, C., et al., *The Ras-Erk-ETS-Signaling Pathway Is a Drug Target for Longevity*. *Cell*, 2015. **162**(1): p. 72-83.
252. Viollet, B., et al., *AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009. **14**: p. 19-44.
253. Salminen, A. and K. Kaarniranta, *AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network*. *Ageing Res Rev*, 2012. **11**(2): p. 230-41.
254. Apfeld, J., et al., *The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans**. *Genes Dev*, 2004. **18**(24): p. 3004-9.
255. Curtis, R., G. O'Connor, and P.S. DiStefano, *Aging networks in *Caenorhabditis elegans*: AMP-activated protein kinase (aak-2) links multiple aging and metabolism pathways*. *Aging Cell*, 2006. **5**(2): p. 119-26.
256. Funakoshi, M., et al., *A gain-of-function screen identifies *wdb* and *lkb1* as lifespan-extending genes in *Drosophila**. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **405**(4): p. 667-72.
257. Weir, H.J., et al., *Dietary Restriction and AMPK Increase Lifespan via Mitochondrial Network and Peroxisome Remodeling*. *Cell Metab*, 2017. **26**(6): p. 884-896 e5.
258. Hwang, A.B., et al., *Feedback regulation via AMPK and HIF-1 mediates ROS-dependent longevity in *Caenorhabditis elegans**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(42): p. E4458-67.
259. Day, E.A., R.J. Ford, and G.R. Steinberg, *AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases*. *Trends Endocrinol Metab*, 2017. **28**(8): p. 545-560.
260. Tzivion, G. and N. Hay, *PI3K-AKT-FoxO axis in cancer and aging*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(11): p. 1925.
261. C, O.N., *PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease*. *Exp Gerontol*, 2013. **48**(7): p. 647-53.
262. Bo-Htay, C., et al., *Effects of d-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions*. *J Cell Mol Med*, 2018. **22**(3): p. 1392-1410.
263. Shwe, T., et al., *Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions*. *Exp Gerontol*, 2018. **101**: p. 13-36.
264. Heilbronn, L.K. and E. Ravussin, *Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans*. *Am J Clin Nutr*, 2003. **78**(3): p. 361-9.
265. Bork, S., et al., *DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells*. *Aging Cell*, 2010. **9**(1): p. 54-63.
266. Ohm, J.E., et al., *A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing*. *Nat Genet*, 2007. **39**(2): p. 237-42.
267. Schlesinger, Y., et al., *Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer*. *Nat Genet*, 2007. **39**(2): p. 232-6.
268. Chittock, E.C., et al., *Molecular architecture of polycomb repressive complexes*. *Biochem Soc Trans*, 2017. **45**(1): p. 193-205.
269. Cedar, H. and Y. Bergman, *Programming of DNA methylation patterns*. *Annu Rev Biochem*, 2012. **81**: p. 97-117.
270. Marioni, R.E., et al., *DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life*. *Genome Biol*, 2015. **16**: p. 25.
271. Zheng, Y., et al., *Blood Epigenetic Age may Predict Cancer Incidence and Mortality*. *EBioMedicine*, 2016. **5**: p. 68-73.
272. Marioni, R.E., et al., *The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936*. *Int J Epidemiol*, 2015. **44**(4): p. 1388-96.

273. Levine, M.E., et al., *Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning*. Aging (Albany NY), 2015. **7**(12): p. 1198-211.
274. Perna, L., et al., *Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort*. Clin Epigenetics, 2016. **8**: p. 64.
275. Toyota, M. and J.P. Issa, *The role of DNA hypermethylation in human neoplasia*. Electrophoresis, 2000. **21**(2): p. 329-33.
276. Issa, J.P., *CpG-island methylation in aging and cancer*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **249**: p. 101-18.
277. Waki, T., et al., *Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples*. Oncogene, 2003. **22**(26): p. 4128-33.
278. Ahuja, N., et al., *Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5489-94.
279. Bassil, C.F., Z. Huang, and S.K. Murphy, *Bisulfite pyrosequencing*. Methods Mol Biol, 2013. **1049**: p. 95-107.
280. Zemliakova, V.V., et al., *[Abnormal methylation of several tumor suppressor genes in sporadic breast cancer]*. Mol Biol (Mosk), 2003. **37**(4): p. 696-703.
281. Bock, J., et al., *Single CpG hypermethylation, allele methylation errors, and decreased expression of multiple tumor suppressor genes in normal body cells of mutation-negative early-onset and high-risk breast cancer patients*. Int J Cancer, 2018.
282. Warnecke, P.M., et al., *Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(21): p. 4422-6.
283. Weber, M., et al., *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome*. Nat Genet, 2007. **39**(4): p. 457-66.
284. Preston, D.L., et al., *Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998*. Radiat Res, 2007. **168**(1): p. 1-64.
285. Metayer, C., et al., *Second cancers among long-term survivors of Hodgkin's disease diagnosed in childhood and adolescence*. J Clin Oncol, 2000. **18**(12): p. 2435-43.
286. Travis, L.B., et al., *Cumulative absolute breast cancer risk for young women treated for Hodgkin lymphoma*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(19): p. 1428-37.
287. Lorigan, P., et al., *Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: a systematic review*. Lancet Oncol, 2005. **6**(10): p. 773-9.
288. Kangaspeska, S., et al., *Transient cyclical methylation of promoter DNA*. Nature, 2008. **452**(7183): p. 112-5.
289. Metivier, R., et al., *Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter*. Nature, 2008. **452**(7183): p. 45-50.
290. Hayden, K.E., et al., *Sequences associated with centromere competency in the human genome*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(4): p. 763-72.
291. Spiers, H., et al., *Methylomic trajectories across human fetal brain development*. Genome Res, 2015. **25**(3): p. 338-52.
292. Schneider, E., et al., *CpG sites with continuously increasing or decreasing methylation from early to late human fetal brain development*. Gene, 2016. **592**(1): p. 110-118.
293. Shmookler Reis, R.J. and S. Goldstein, *Variability of DNA methylation patterns during serial passage of human diploid fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(13): p. 3949-53.
294. Wagner, J.R., et al., *The relationship between DNA methylation, genetic and expression inter-individual variation in untransformed human fibroblasts*. Genome Biol, 2014. **15**(2): p. R37.
295. Raiche, J., et al., *Sex- and tissue-specific expression of maintenance and de novo DNA methyltransferases upon low dose X-irradiation in mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(1): p. 39-47.
296. Jiang, L., et al., *Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts*. Cancer Res, 2008. **68**(23): p. 9900-8.
297. Ehrlich, M., *DNA hypomethylation in cancer cells*. Epigenomics, 2009. **1**(2): p. 239-59.
298. Ehrlich, M., *Cancer-linked DNA hypomethylation and its relationship to hypermethylation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **310**: p. 251-74.
299. Bacalini, M.G., et al., *The nucleolar size is associated to the methylation status of ribosomal DNA in breast carcinomas*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 361.
300. Yan, P.S., et al., *Hypermethylation of ribosomal DNA in human breast carcinoma*. Br J Cancer, 2000. **82**(3): p. 514-7.
301. Karahan, G., et al., *Relative expression of rRNA transcripts and 45S rDNA promoter methylation status are dysregulated in tumors in comparison with matched-normal tissues in breast cancer*. Oncol Rep, 2015. **33**(6): p. 3131-45.

302. Chan, M.W., et al., *Hypermethylation of 18S and 28S ribosomal DNAs predicts progression-free survival in patients with ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(20): p. 7376-83.
303. Teschler S, R.A., Linder B, Dammann RH, *Aberrant DNA Methylation of Ribosomal RNA Genes in Human Cancer*. Mol Biol, 2015. **4**: p. 128.
304. Powell, M.A., et al., *Ribosomal DNA methylation in patients with endometrial carcinoma: an independent prognostic marker*. Cancer, 2002. **94**(11): p. 2941-52.
305. Thomas, G., *An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(5): p. E71-2.
306. Dent, P., et al., *MAPK pathways in radiation responses*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5885-96.
307. Munshi, A. and R. Ramesh, *Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response*. Genes Cancer, 2013. **4**(9-10): p. 401-8.
308. Hagan, M., et al., *Ionizing radiation-induced mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in DU145 prostate carcinoma cells: MAP kinase inhibition enhances radiation-induced cell killing and G2/M-phase arrest*. Radiat Res, 2000. **153**(4): p. 371-83.
309. Lyng, F.M., et al., *The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects*. Radiat Res, 2006. **165**(4): p. 400-9.
310. Dent, P., et al., *Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways*. Radiat Res, 2003. **159**(3): p. 283-300.
311. Obata, T., G.E. Brown, and M.B. Yaffe, *MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway*. Crit Care Med, 2000. **28**(4 Suppl): p. N67-77.
312. Burotto, M., et al., *The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective*. Cancer, 2014. **120**(22): p. 3446-56.
313. Boutros, T., E. Chevet, and P. Metrakos, *Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer*. Pharmacol Rev, 2008. **60**(3): p. 261-310.
314. Fang, J.Y. and B.C. Richardson, *The MAPK signalling pathways and colorectal cancer*. Lancet Oncol, 2005. **6**(5): p. 322-7.
315. Germann, U.A., et al., *Targeting the MAPK Signaling Pathway in Cancer: Promising Preclinical Activity with the Novel Selective ERK1/2 Inhibitor BVD-523 (Ulixertinib)*. Mol Cancer Ther, 2017. **16**(11): p. 2351-2363.
316. Wang, X.X., et al., *Large-scale DNA methylation expression analysis across 12 solid cancers reveals hypermethylation in the calcium-signaling pathway*. Oncotarget, 2017. **8**(7): p. 11868-11876.
317. Rooke, R., *Can calcium signaling be harnessed for cancer immunotherapy?* Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(10): p. 2334-40.
318. Clapham, D.E., *Intracellular calcium. Replenishing the stores*. Nature, 1995. **375**(6533): p. 634-5.
319. Zhang, Y.L., et al., *Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion*. Cancer Biol Med, 2017. **14**(1): p. 90-99.
320. Gutmann, D.H., et al., *Alterations in the rap1 signaling pathway are common in human gliomas*. Oncogene, 1997. **15**(13): p. 1611-6.
321. Fresno Vara, J.A., et al., *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(2): p. 193-204.
322. Osaki, M., M. Oshimura, and H. Ito, *PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer*. Apoptosis, 2004. **9**(6): p. 667-76.
323. Lien, E.C., C.C. Dibble, and A. Toker, *PI3K signaling in cancer: beyond AKT*. Curr Opin Cell Biol, 2017. **45**: p. 62-71.
324. Maziveyi, M. and S.K. Alahari, *Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue*. Oncotarget, 2017. **8**(29): p. 48471-48487.
325. Okegawa, T., et al., *The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy*. Acta Biochim Pol, 2004. **51**(2): p. 445-57.
326. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
327. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
328. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1148-59.
329. Choi, J.D. and J.S. Lee, *Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer*. Genomics Inform, 2013. **11**(4): p. 164-73.
330. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(10): p. 726-34.
331. Karakosta, A., et al., *Genetic models of human cancer as a multistep process. Paradigm models of colorectal cancer, breast cancer, and chronic myelogenous and acute lymphoblastic leukaemia*. J Exp Clin Cancer Res, 2005. **24**(4): p. 505-14.

332. Finkel, T., M. Serrano, and M.A. Blasco, *The common biology of cancer and ageing*. Nature, 2007. **448**(7155): p. 767-74.
333. Gautrey, H.E., et al., *DNA methylation abnormalities at gene promoters are extensive and variable in the elderly and phenocopy cancer cells*. FASEB J, 2014. **28**(7): p. 3261-72.
334. Klutstein, M., et al., *DNA Methylation in Cancer and Aging*. Cancer Res, 2016. **76**(12): p. 3446-50.
335. Neven, K.Y., et al., *Repetitive element hypermethylation in multiple sclerosis patients*. BMC Genet, 2016. **17**(1): p. 84.
336. Bollati, V., et al., *DNA methylation in repetitive elements and Alzheimer disease*. Brain Behav Immun, 2011. **25**(6): p. 1078-83.
337. Pogribny, I.P. and F.A. Beland, *DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(14): p. 2249-61.
338. Slotkin, R.K. and R. Martienssen, *Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(4): p. 272-85.
339. Crabbe, L., et al., *Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(7): p. 2205-10.
340. Melcher, R., et al., *Spectral karyotyping of Werner syndrome fibroblast cultures*. Cytogenet Cell Genet, 2000. **91**(1-4): p. 180-5.
341. Zhang, W., et al., *Ageing stem cells. A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging*. Science, 2015. **348**(6239): p. 1160-3.
342. Goto, M., et al., *Werner syndrome: a changing pattern of clinical manifestations in Japan (1917~2008)*. Biosci Trends, 2013. **7**(1): p. 13-22.
343. Lu, A.T., et al., *Genetic variants near MLST8 and DHX57 affect the epigenetic age of the cerebellum*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10561.
344. Horvath, S., et al., *The cerebellum ages slowly according to the epigenetic clock*. Aging (Albany NY), 2015. **7**(5): p. 294-306.
345. Crabbe, L., et al., *Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity*. Science, 2004. **306**(5703): p. 1951-3.
346. Hisama, F.M., J. Oshima, and G.M. Martin, *How Research on Human Progeroid and Antigeroid Syndromes Can Contribute to the Longevity Dividend Initiative*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(4): p. a025882.
347. Wyllie, F.S., et al., *Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 16-7.
348. Breitling, L.P., et al., *Frailty is associated with the epigenetic clock but not with telomere length in a German cohort*. Clin Epigenetics, 2016. **8**: p. 21.
349. Horvath, S., et al., *Obesity accelerates epigenetic aging of human liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(43): p. 15538-43.
350. Fagnoni, F.F., et al., *Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging*. Blood, 2000. **95**(9): p. 2860-8.
351. Chang, H.H.Y., et al., *Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(8): p. 495-506.
352. Li, K., et al., *Regulation of WRN protein cellular localization and enzymatic activities by SIRT1-mediated deacetylation*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7590-8.

5.2 Elektronische Quellen

- Internet-Referenz 1:** Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer.
Verfügbar Online im Internet unter:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/> [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 2:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/472> [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 3:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5889> [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 4:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157> [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 5:** National Research Council (US) Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation (BEIR V). Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: Beir V. Washington (DC): National Academies Press (US); 1990. 1, Background Information and Scientific Principles.
Verfügbar Online im Internet unter:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218702/> [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 6:** <http://www.wenersyndrome.org/>; Seattle, WA [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 7:** <http://genoseq.ucla.edu/action/view/Pyrosequencing> [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 8:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/> [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 9:** https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/infinium_assays/infinium_hd_methylation/infinium-hd-methylation-guide-15019519-01.pdf [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 10:** <http://www.biofidal-lab.com/details-miseq+illumina+sequencing+system+at+lyon-50.html> [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 11:** <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html?langsel=/de/> [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 12:** https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-06.pdf [aufgerufen am 27.08.2018]
- Internet-Referenz 13:** https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-system-guide-for-local-run-manager-15027617-04.pdf [aufgerufen am 27.08.2018]

6 Verzeichnisse

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Epigenetische Mechanismen.....	5
Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der Methylierung und der Demethylierung der DNA.....	7
Abbildung 3: Die Kennzeichen des Alterns.....	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der altersassoziierten DNA-Methylierungs-Veränderungen.	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Unterschiede im DNA-Methylierungs-Profil zwischen normalen Zellen und Krebszellen.....	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Primer, die für Deep Bisulfite Sequencing verwendet wurden.....	35
Abbildung 7: Konvertierung genomischer DNA durch Natriumbisulfit-Behandlung.....	39
Abbildung 8: Prinzip der Pyrosequenzierung.....	41
Abbildung 9: Prinzip des Infinium I Assays.....	46
Abbildung 10: Prinzip des Infinium II Assays.....	47
Abbildung 11: Arbeitsschritte des Infinium Methylierungs-Array-Protokolls.....	49
Abbildung 12: Pipeline zur Auswertung der Infinium 450K-Methylierungs-Array-Daten.....	50
Abbildung 13: Prinzip der Library-Präparation, vereinfacht dargestellt mit zwei Zielregionen und zwei Proben.....	55
Abbildung 14: Prinzip der Cluster-Generierung am Illumina MiSeq.....	56
Abbildung 15: Schritte der Sequenzierung am Illumina MiSeq.....	57
Abbildung 16: Darstellung der in Fibroblasten durchgeführten Versuche zur Untersuchung der direkten Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung.....	62
Abbildung 17: DNA-Methylierung der repetitiven Elemente direkt nach Bestrahlung.....	63
Abbildung 18: Variation der DNA-Methylierung der repetitiven Elemente zwischen den untersuchten Fibroblastenlinien.....	64
Abbildung 19: Box-Plots zur Verteilung der DNA-Methylierung der repetitiven Elemente in Einzelzellen.....	65
Abbildung 20: Globaler β -Wert direkt nach Bestrahlung.....	66
Abbildung 21: Dendrogramme zur Visualisierung der Ähnlichkeit nicht-bestrahlter und bestrahlter Massenkulturen.....	67
Abbildung 22: Darstellung der in Fibroblasten durchgeführten Versuche zur Untersuchung der Effekte der Langzeit-Kultivierung und der Langzeit-Effekte ionisierender Strahlung auf die DNA-Methylierung.....	69
Abbildung 23: Globaler β -Wert für die Ausgangskultur und die gealterten Klone.....	72
Abbildung 24: Dendrogramme zur Visualisierung der Ähnlichkeit zwischen Ausgangskultur und gealterten Klonen.....	73
Abbildung 25: Globaler β -Wert für die gealterten Klone und die bestrahlten Klone.....	75

Abbildung 26: Dendrogramme zur Visualisierung der Ähnlichkeit zwischen gealterten und bestrahlten Klonen..... 76

Abbildung 27: Durchschnittliche Anzahl an Reads pro Assay. 80

Abbildung 28: Prozentuale Verteilung der Reads für *ATM* und *BRCA1* für die einzelnen Proben. 84

Abbildung 29: Prozentuale Verteilung der Reads für *RAD51C* und *TP53* für die einzelnen Proben.... 85

Abbildung 30: Durchschnittliche DNA-Methylierung der einzelnen CpGs des *RAD51C*-Assays. 87

Abbildung 31: Schematische Darstellung der Verteilung des Alters und des Geschlechts über die WS-Patienten und die Kontrollen. 88

Abbildung 32: DNA-Methylierung der repetitiven Elemente in WS-Patienten und Kontrollen. 89

Abbildung 33: DNA-Methylierung der rDNA in WS-Patienten und Kontrollen..... 89

Abbildung 34: Epigenetisches Alter in WS-Patienten und Kontrollen. 90

Abbildung 35: Messungen zur Beschleunigung des epigenetischen Alterns in WS-Patienten und Kontrollen. 90

Abbildung 36: Signalwege, die mit Altern und Langlebigkeit assoziiert sind..... 97

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Chemikalien.....	31
Tabelle 2:	Verwendete kommerzielle Kits, Puffer und Medien.	31
Tabelle 3:	Verwendete Apparaturen.....	32
Tabelle 4:	Selbst hergestellte Puffer und Medien.	33
Tabelle 5:	Für Zellkultur verwendete Verbrauchsmaterialien.	33
Tabelle 6:	Verwendete Programme und Datenbanken.....	33
Tabelle 7:	Primer, die zur DNA-Methylierungs-Analyse durch Pyrosequenzierung verwendet wurden.....	34
Tabelle 8:	Primer, die für die erste PCR der DBS-Library-Präparation verwendet wurden.	36
Tabelle 9:	NEBNext Multiplex Primer, die für die zweite PCR der DBS-Library-Präparation verwendet wurden.....	36
Tabelle 10:	Pipettier-Schema für die Multiplex-PCR.	42
Tabelle 11:	Pipettier-Schemata der Nested-PCRs und der PCRs zur Amplifizierung der zwei rDNA-Regionen.	42
Tabelle 12:	PCR-Programme der PCRs, die zur Amplifikation der repetitiven Elemente verwendet wurden.....	43
Tabelle 13:	Pipettier-Schema für die ersten PCRs der DBS-Library-Präparation.	59
Tabelle 14:	PCR-Programme für die ersten PCRs der DBS-Library-Präparation.....	59
Tabelle 15:	Pipettier-Schema der zweiten PCR der DBS-Library-Präparation.....	60
Tabelle 16:	PCR-Programm der zweiten PCR der DBS-Library-Präparation.....	60
Tabelle 17:	Epigenetisches Alter bestrahlter und nicht-bestrahlter Massenkulturen.	68
Tabelle 18:	DNA-Methylierung repetitiver Elemente in Ausgangskultur, gealterten und bestrahlten Klonen.	70
Tabelle 19:	DNA-Methylierung der ribosomalen DNA in Ausgangskultur, gealterten und bestrahlten Klonen.	71
Tabelle 20:	Ergebnisse der Genset-Anreicherungs-Analyse im Zusammenhang mit der <i>in vitro</i> Alterung.	74
Tabelle 21:	Ergebnisse der Genset-Anreicherungs-Analysen im Zusammenhang mit den Langzeit-Effekten ionisierender Strahlung.	78
Tabelle 22:	Epigenetisches Alter in Ausgangskultur, gealterten und bestrahlten Klonen.	79
Tabelle 23:	Durchschnittliche DNA-Methylierung über alle CpGs und alle Reads.....	81
Tabelle 24:	Anteil an Reads mit Einzel-CpG-Fehlern.	82
Tabelle 25:	Multivariates Regressionsmodell.....	91
Tabelle 26:	Vollständige Liste zu den Ergebnissen der Anreicherungs-Analyse mit dem Genset der Fibroblastenlinie 1.	145

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Σ	Summe
%	Prozent
°C	Grad Celsius
5caC	5-Carboxylcytosin
5fC	5-Formylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
A A	Adenin (DNA-Base)
AgeAccel	Age acceleration (Beschleunigung des Alterns)
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
B BER	Basen-Exzisions-Reparatur
BMI	Body Mass Index
BMIQ	Beta Mixture Quantile dilation
bp	Base pairs (Basenpaare)
BR	Broad Range
BRCA1	breast cancer 1
C C	Cytosin (DNA-Base)
CD	Cluster of Differentiation
ChAMP	Chip Analysis Methylation Pipeline
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CS	Combined Score
C-terminal	Carboxy-terminal
D dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dATP α S	Desoxyadenosin-alpha-Thiotriphosphat
DBS	Deep Bisulfite Sequencing
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMP	differentiell methylierte Position
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E ECF-Read	Read mit Einzel-CpG-Fehler(n)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEAA	extrinsic epigenetic age acceleration (Beschleunigung des extrinsischen epigenetischen Alterns)
<i>et al.</i>	lat.: <i>et alii</i> (und andere)
<i>etc.</i>	lat.: <i>et cetera</i> (und die übrigen)

F	FACS	fluorescence-activated cell sorting
	FBS	Fetal Bovine Serum
	FOXO	Forkhead-Box-Protein O
G	g	Gramm
	G	Guanin (DNA-Base)
	gDNA	genomische DNA
	GH	growth hormone
	GTP	Guanosintriphosphat
	Gy	Gray
H	HD	High Density
	HGPS	Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom
I	ID	Identification number
	IEAA	intrinsic epigenetic age acceleration (Beschleunigung des intrinsischen epigenetischen Alterns)
	IGF-1	insulin-like growth factor 1
K	kb	Kilobasen
L	L	Liter
	LINE	Long interspersed elements
M	M	Molare Masse
	MAP	Mitogen activated protein
	MAPK	MAP-Kinase
	mds	Multidimensional Scaling Plot
	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
	MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
	MIRA	methylated-CpG island recovery assay
	miRNA	Micro RNA
	ml	Milliliter
	mRNA	messenger RNA
	MSCs	mesenchymal stromal cells (mesenchymale Stroma-Zellen)
N	NaOH	Natriumhydroxid
	ng	Nanogramm
	NH ₂	Aminogruppe
	nM	Nanomolar
	N-terminal	Amino-terminal
P	PcG	Polycomb Group
	PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
	pH	lat.: <i>potentia hydrogenii</i> („Stärke des Wasserstoffs“)
	pM	Picomolar
	pmol	picomol
	PP _i	Pyrophosphat
	PRC	Polycomb repressive Complex
	PV	Populations-Verdoppelung
	p-Wert	probability value (Signifikanzwert)
Q	QC	Quality control (Qualitätskontrolle)
R	RAD51C	RAD51 paralog C
	Rap1	Ras-associated protein-1
	rDNA	ribosomale DNA
	RIGI	radiation-induced genomic instability (strahleninduzierte Genom-Instabilität)
	RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
	rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
	rRNA	ribosomale RNA
S	S	Sedimentationskoeffizienten
	SIRT-1	Sirtuin-1

	SVA	Surrogate Variable Analysis
	SVD	Singular Value Decomposition
T	T	Thymin (DNA-Base)
	TAE	Tris-Acetat-EDTA
	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
	TDG	Thymin-DNA-Glykosylase
	TET	ten-eleven translocation
	TP53	Tumor Protein p53
	TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
	TSS	Transkriptions-Startstelle
	T-Zelle	Thymus-Lymphozyte
U	U	Uracil
	UV	Ultraviolett
W	WGBS	Whole genome bisulfite sequencing (Komplett-Genom-Bisulfitsequenzierung)
	WRN	Werner syndrome RecQ like helicase
	WS	Werner-Syndrom
X	X-ray	Röntgen

7 Publikationen und Kongressbeiträge

7.1 Publikationen

Accelerated epigenetic aging in Werner syndrome.

Maierhofer A, Flunkert J, Oshima J, Martin GM, Haaf T, Horvath S.

Aging (Albany NY). 2017 Apr; 9(4):1143-1152. doi: 10.18632/aging.101217.

Analysis of global DNA methylation changes in primary human fibroblasts in the early phase following X-ray irradiation.

Maierhofer A[#], Flunkert J[#], Dittrich M, Müller T, Schindler D, Indrajit Nanda I, Haaf T.

[#]geteilte Erstautorschaft

PLoS One. 2017 May 10; 12(5): e0177442. doi: 10.1371/journal.pone.0177442

Genetic and epigenetic changes in clonal descendants of irradiated human fibroblasts.

Flunkert J, Maierhofer A, Dittrich M, Müller T, Horvath S, Nanda I, Haaf T.

Exp Cell Res. 2018 Jun 28. pii: S0014-4827(18)30377-X. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.06.034.

Hypermethylation of the non-imprinted maternal *MEG3* and paternal *MEST* alleles is highly variable among normal individuals.

Haertle L, Maierhofer A, Böck J, Lehnen H, Böttcher Y, Blüher M, Schorsch M, Potabattula R, El Hajj N, Appenzeller S, Haaf T.

PLoS One. 2017 Aug 30; 12(8):e0184030. doi: 10.1371/journal.pone.0184030.

Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and *ex vivo* studies.

Horvath S, Oshima J, Martin GM, Lu AT, Quach A, Cohen H, Felton S, Matsuyama M, Lowe D, Kabacik S, Wilson JG, Reiner AP, Maierhofer A, Flunkert J, Aviv A, Hou L, Baccarelli AA, Li Y, Stewart JD, Whitsel EA, Ferrucci L, Matsuyama S, Raj K.

Aging (Albany NY). 2018 Jul 26; 10(7):1758-1775. doi: 10.18632/aging.101508.

Generation of a human induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 51-year-old female with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) carrying a duplication of *SLC2A3*.

Jansch C, Günther K, Waider J, Ziegler GC, Forero A, Kollert S, Svirin E, Pühringer D, Kwok CK, Ullmann R, Maierhofer A, Flunkert J, Haaf T, Edenhofer F, Lesch KP.

Stem Cell Res. 2018 Apr; 28:136-140. doi: 10.1016/j.scr.2018.02.005.

***Hypoxia-inducible factor 3A* gene expression and methylation in adipose tissue is related to adipose tissue dysfunction.**

Pfeiffer S, Krüger J, Maierhofer A, Böttcher Y, Klötting N, El Hajj N, Schleinitz D, Schön MR, Dietrich A, Fasshauer M, Lohmann T, Dreßler M, Stumvoll M, Haaf T, Blüher M, Kovacs P.

Sci Rep. 2016 Jun 27; 6:27969. doi: 10.1038/srep27969.

7.2 Kongressbeiträge

Genome-wide DNA methylation profiling reveals epigenetic signatures associated with Werner Syndrome.

Maierhofer A, Flunkert J, Oshima J, Martin G, Horvath S, Dittrich M, Müller T, Haaf T.

Orale Präsentation auf der 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Münster (2018)

Methylation analysis in primary human fibroblasts following X-ray irradiation.

Maierhofer A, Flunkert J, Nanda I, Dittrich M, Müller T, Haaf T.

Poster auf der 27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Lübeck (2016)

Danksagung

Anhang

Tabelle 26: Vollständige Liste zu den Ergebnissen der Anreicherungs-Analyse mit dem Genset der Fibroblastenlinie 1.

Terminus		Überlapp	p-Wert	Adjustierter p-Wert	Combined Score
Signalwege in Krebs	hsa05200	101/397	3,3E-10	7,4E-08	46,0
Calcium-Signalweg	hsa04020	57/180	5,2E-10	7,4E-08	41,3
Morphin-Abhängigkeit	hsa05032	36/91	1,0E-09	9,4E-08	37,4
Rap1-Signalweg	hsa04015	62/211	2,6E-09	1,9E-07	37,3
Fokale Adhäsion	hsa04510	59/202	8,1E-09	4,6E-07	33,9
PI3K-Akt-Signalweg	hsa04151	82/341	2,1E-07	8,5E-06	29,4
Circadiane Rhythmik	hsa04713	33/95	2,0E-07	8,5E-06	27,8
MAPK-Signalweg	hsa04010	65/255	4,2E-07	1,5E-05	26,7
Aldosteronsynthese und -sekretion	hsa04925	29/81	5,2E-07	1,6E-05	25,6
Cholinerge Synapse	hsa04725	35/111	1,2E-06	3,1E-05	24,2
Regulation des Aktin-Cytoskeletts	hsa04810	56/214	1,1E-06	3,0E-05	23,4
Ras-Signalweg	hsa04014	58/227	1,6E-06	3,8E-05	23,0
Oxytocin-Signalweg	hsa04921	44/158	2,5E-06	5,5E-05	21,4
Phospholipase D-Signalweg	hsa04072	41/144	3,0E-06	6,1E-05	19,9
GABAerge Synapse	hsa04727	29/88	3,6E-06	6,8E-05	18,0
Retrograde Endocannabinoid-Signalweiterleitung	hsa04723	31/101	8,9E-06	1,6E-04	17,5
Endocytose	hsa04144	61/259	1,4E-05	2,4E-04	17,5
Glutamaterge Synapse	hsa04724	33/114	1,8E-05	2,7E-04	15,8
cAMP-Signalweg	hsa04024	49/199	2,9E-05	3,9E-04	14,9
Tight junction	hsa04530	38/139	1,9E-05	2,7E-04	13,5
Proteinverdau und -absorption	hsa04974	28/90	1,8E-05	2,7E-04	13,2
Östrogen-Signalweg	hsa04915	29/99	4,5E-05	5,6E-04	13,1
Adherens junction	hsa04520	24/74	3,3E-05	4,2E-04	12,0
Dilatative Kardiomyopathie	hsa05414	26/90	1,4E-04	1,5E-03	10,1
Adrenerge Signalweiterleitung in Kardiomyozyten	hsa04261	37/148	1,9E-04	1,8E-03	10,0
Melanom	hsa05218	22/71	1,5E-04	1,5E-03	9,5
Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	hsa05412	23/74	9,9E-05	1,1E-03	9,1
Proteoglykane in Krebs	hsa05205	46/203	3,9E-04	3,2E-03	8,9
Langlebigkeit regulierender Signalweg - Säuger	hsa04211	26/94	3,0E-04	2,7E-03	8,5
Prostata-Krebs	hsa05215	25/89	3,0E-04	2,7E-03	8,4
Chronische myeloide Leukämie	hsa05220	22/73	2,3E-04	2,2E-03	8,3
Kokain-Abhängigkeit	hsa05030	18/49	4,9E-05	5,8E-04	8,2
AGE-RAGE-Signalwege in diabetischen Komplikationen	hsa04933	27/101	4,3E-04	3,3E-03	8,0
Melanogenese	hsa04916	27/100	3,6E-04	3,0E-03	8,0
HTLV-I-Infektion	hsa05166	55/258	5,7E-04	4,1E-03	7,4
Gliom	hsa05214	20/65	3,2E-04	2,8E-03	7,2
Dopaminerge Synapse	hsa04728	32/129	5,6E-04	4,1E-03	6,8
Entzündungsmediator-Regulation von TRP-Kanälen	hsa04750	26/98	6,1E-04	4,2E-03	6,2
AMPK-Signalweg	hsa04152	31/124	5,9E-04	4,2E-03	5,9
Transkriptionelle Fehlregulation in Krebs	hsa05202	41/180	7,0E-04	4,7E-03	5,7
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	hsa04550	34/142	7,7E-04	4,9E-03	5,4
Thyroidhormonsynthese	hsa04918	21/71	4,2E-04	3,3E-03	5,1
Hippo-Signalweg	hsa04390	36/153	7,7E-04	4,9E-03	4,9
Axonale Lenkung	hsa04360	31/127	9,1E-04	5,5E-03	4,3
Thyroidhormon-Signalweg	hsa04919	29/118	1,2E-03	6,9E-03	4,1
Nikotin-Abhängigkeit	hsa05033	15/40	1,6E-04	1,6E-03	3,6
Insulinsekretion	hsa04911	23/85	9,2E-04	5,5E-03	3,3
Langlebigkeit regulierender Signalweg - mehrere Spezies	hsa04213	19/64	7,4E-04	4,9E-03	3,1
Wnt-Signalweg	hsa04310	32/142	3,0E-03	1,6E-02	2,9
GnRH-Signalweg	hsa04912	23/91	2,4E-03	1,3E-02	2,3
cGMP-PKG-Signalweg	hsa04022	36/167	3,9E-03	1,8E-02	2,3
Chemokin-Signalweg	hsa04062	39/187	4,9E-03	2,2E-02	1,7
Hypertrophe Kardiomyopathie	hsa05410	22/83	1,6E-03	8,7E-03	1,4
Bakterielle Invasion epithelialer Zellen	hsa05100	21/78	1,6E-03	8,8E-03	1,2
Cholin-Metabolismus in Krebs	hsa05231	24/101	4,7E-03	2,2E-02	1,1
Hepatitis B	hsa05161	31/146	8,7E-03	3,6E-02	1,1
Zelladhäsions-Moleküle	hsa04514	31/142	5,7E-03	2,5E-02	1,1
Sphingolipid-Signalweg	hsa04071	27/120	6,3E-03	2,7E-02	0,5
Gap junction	hsa04540	22/88	3,5E-03	1,7E-02	0,4
Akute myeloide Leukämie	hsa05221	17/57	1,3E-03	7,5E-03	0,4
ECM-Rezeptor-Interaktion	hsa04512	21/82	3,1E-03	1,6E-02	0,2
Neuroaktiver Ligand-Rezeptor-Interaktion	hsa04080	51/277	1,8E-02	6,6E-02	0,1
Serotonerge Synapse	hsa04726	25/112	9,2E-03	3,8E-02	0,0