

Abschlussbericht

Anschubprojekt: „Dietary effects on DNA methylation in porcine parathyroid glands“

Zuwendungsempfänger:	Klaus Wimmers, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Petra Wolf, Universität Rostock (AUF) Brigitte Vollmar, Universität Rostock (MED)
Kooperationspartner:	FBN, Uni-HRO (AUF, MED)
Vorhabensbezeichnung:	EpiPTG
Laufzeit des Vorhabens:	01.06.2019 – 31.03.2020
Autoren:	Michael Oster, Klaus Wimmers

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
1 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	1
2 Einleitung und Ziele des Projektes	1
3 Material und Methoden	3
4 Ergebnisse und Diskussion	5
5 weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt	9
6 Literaturverzeichnis	9
Danksagung	10

1. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In Schweinen übersteigt die Phosphor (P)-Versorgung mit der Nahrung häufig den altersabhängigen Bedarf, sodass Schweinegülle in der Regel eine hohe P-Belastung aufweist. Neue Fütterungsstrategien zielen auf eine verbesserte P-Effizienz durch eine sogenannte P-Konditionierung. Hier geht man der Frage nach, in wie weit eine langfristige Supplementierung bzw. Reduzierung von P in entwicklungsbiologisch sensitiven Zeitfenstern wie der fetalen oder früh-postnatalen Entwicklung zu epigenetischen und transkriptionellen Modifikationen führt. Die Entwicklung und Analyse von epigenetischen Markern in DNA-Sequenzen von Genen, die für die Aufrechterhaltung der P-Homöostase relevant sind, wird zum Verständnis der intrinsischen Reaktionen auf Umweltfaktoren bei höheren Säugetieren beitragen. In dieser Studie wurden die Nachkommen von Schweinen während der Trächtigkeit, der Laktation und der postnatalen Entwicklung in einem 3x3-Design einer mütterlichen und postnatalen Diät mit variablen P-Gehalten ausgesetzt. Bei Nebenschilddrüsen wurden im Vorfeld Transkriptionsprofile nach 120 Lebenstagen untersucht, um die Wirksamkeit der Fütterungsstrategien zur Aufrechterhaltung der P-Homöostase zu veranschaulichen. Die Forschungsarbeiten zeigen eine Anpassung v.a. auf Ebene der Signaltransduktion für die Regulation von PTH (Parathormon), was sich in molekularen epigenetischen Profilen einerseits und phänotypischen Effekten in den Knochen andererseits widerspiegelt. Insbesondere konnten epigenetische Marker in den Promotorsequenzen der Gene *PTH*, *PTH1R*, *FGFR1* und *SPP1* erfolgreich analysiert werden. Die prozentualen Methylierungsgrade der untersuchten CpG-Dinukleotide innerhalb der PCR-amplifizierten Fragmente zeigten für die Gene *PTH* und *SPP1* (Osteopontin) Ergebnisse, die für die Modulation der P-Homöostase genutzt werden könnten. Die Quantifizierung von PTH, das als Vermittler zwischen Nebenschilddrüsen und Knochen fungiert, konnte im Serum in kommerziellen Analysekits aufgrund mangelnder Kreuzreaktivität mit der Zieltierart Schwein nicht bestimmt werden. Weiterhin zeigten sich diätetische Effekte auf die Rohaschegehalte von Metakarpalknochen, jedoch waren die Gehalte an P und Calcium im speziellen nicht betroffen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass eine ausreichende Versorgung der Knochen mit P und Calcium bei Schweinen auch mit einer reduzierten P-Diät möglich ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die P-Homöostase aufgrund intrinsischer Mechanismen sichergestellt werden konnte. Die erzielten Ergebnisse im Anschubprojekt tragen dazu bei, die endogenen Reaktionen auf physiologischer Ebene nachzuvollziehen und Rückschlüsse auf die systemische Regulation von P und Calcium abzuschätzen. Es wird angestrebt, auf Grundlage der Etablierung epigenetischer Marker im Rahmen eines interdisziplinären Projektes zum systemischen Zusammenspiel von Nebenschilddrüse, Niere, Darm und Knochen in Huhn und Schwein weitere Drittmittelförderung einzuwerben.

2. Einleitung und Ziele des Projektes

Um die P-Effizienz bei Schweinen zu erhöhen, muss die genetische und physiologische Grundlage des P-Stoffwechsels auf molekularer, zellulärer, organismischer und mikrobiologischer Ebene besser verstanden werden. Durch Wachstum, Stoffwechsel und physiologischen turn-over scheidet der Organismus P endogenen Ursprungs aus, welcher kontinuierlich durch eine bedarfsdeckende Ernährung ersetzt werden muss. Aus diesen Gründen muss P in ausreichender Menge mit der Nahrung zugeführt werden (Abbildung 2).

Als P-Homöostase wird die Aufrechterhaltung eines P-Gleichgewichtszustandes durch endogene Regulationsprozesse bezeichnet. In Säugetieren wie dem Schwein wird die P-Homöostase vor allem durch die enterale Absorption, die Knochengeweberemodellierung (engl. *bone remodeling*) und die renale Ausscheidung gesteuert. Im Wesentlichen werden diese Prozesse durch Parathormon (PTH), Calcitriol (1,25(OH)₂D₃; Vitamin D), Calcitonin (CT) und ihre jeweiligen Rezeptoren, die sich im Dünndarm, im Knochen und in den Nieren befinden, vermittelt. Zusätzlich zu den endokrinen Mechanismen gibt es eine weitere auto- und parakrine Ebene von Mechanismen, die die P-Homöostase regulieren, darunter Phosphatonine wie den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23), dessen Konzentration im Blut von den Nebenschilddrüsen über Rezeptoren wie den Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor 1 (FGFR1) erfasst werden. Das PTH wird in den Nebenschilddrüsen gebildet und in den Blutkreislauf sezerniert. Diese übergeordnete endokrine Kontrolle ermöglicht die Stimulation osteoklastischer Aktivität und damit die Mobilisierung von Kalziumreserven wie Hydroxylapatit aus dem Knochen. Da sich Kalzium und P im stöchiometrischen Gleichgewicht befinden, mobilisiert die durch PTH ausgelöste Knochenresorption auch P. Infolgedessen verhindert PTH durch eine erhöhte renale P-Ausscheidung einen systemischen P-Überschuss im Serum. PTH kommt demnach eine Schlüsselrolle in der P-Homöostase zu und ist wichtiges Effektormolekül nach intrinsischen und extrinsischen Reizen.

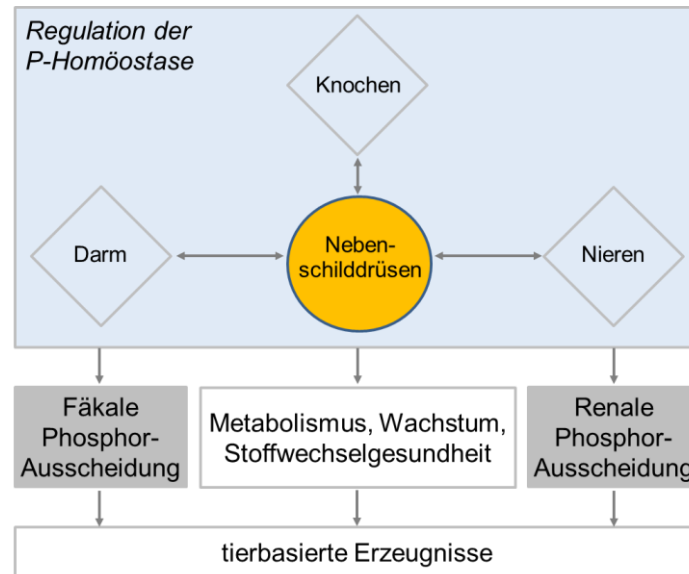


Abbildung 1: Die Aufrechterhaltung der P-Homöostase dient der Gewährleistung von Wachstum und Stoffwechselgesundheit. Assoziierte Stoffwechselprozesse umfassen die Integration von Nebenschilddrüsen, Darm, Nieren und Knochen. Eine optimale P-Effizienz erfordert eine hohe P-Absorption im Darm, eine ausreichende P-Speicherung im Skelett und eine geringe P-Ausscheidung. Die beteiligten Mechanismen sind eng mit dem Calciumspiegel verknüpft. Die Minimierung der Supplementierung mit mineralischen P und die Verbesserung der P-Effizienz der Tiere hängen von verschiedenen Faktoren wie (Epi)Genetik, Haltungsbedingungen, P-Verdaulichkeit, Hormonstatus und Transkriptionsraten ab.

In der Tierhaltung werden verschiedene Ernährungsformen diskutiert und hinsichtlich des P-Bedarfs bzw. der Futter- und P-Effizienz bewertet. Dabei stellte sich heraus, dass die mütterliche Ernährung eine physiologische adaptive Reaktion ("Metabolische Programmierung") provoziert. Dies kann die Möglichkeit bieten bestimmte Phänotypen zu induzieren. Es gibt Hinweise, dass auch bezüglich der P-Effizienz Mechanismen der Programmierung relevant sind. Die molekulare Beschaffenheit eines solchen Gedächtnisses ist weitgehend unverstanden. Experimente bei Nagern belegen, dass Modifikationen der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit experimentellen Trächtigkeitsdiäten eine wichtige Rolle bei der Modulierung der Genexpression spielen [Lillicrop et al., 2005; Junien, 2006]. Die Kenntnis dieser epigenetischen Mechanismen, die der metabolischen Programmierung zugrunde liegen, bietet die Möglichkeit, spezifische Phänotypen und Anpassungen an bestimmte Umweltbedingungen zu induzieren. Um die P-Effizienz in der Schweinehaltung zu verbessern, wurde ein Fütterungsversuch durchgeführt, bei dem trächtige Sauen und ihre Nachkommen mit variablen Mengen an diätetischem P versorgt wurden. Für die Sicherstellung der Mineralienhomöostase sind die Nebenschilddrüsen von großer Bedeutung. Entsprechend zeigen die Ergebnisse auf Transkriptomebene (RNAseq), die aus den Nebenschilddrüsen der betroffenen Nachkommen erhoben wurden, Expressionsunterschiede von Genen mit Bezug zur mineralischen Homöostase (z.B. *PTH*, *FGFR1*).

Im Anschubprojekt sollen die langfristigen Auswirkungen für eine verbesserte Phosphoreffizienz evaluiert werden. Dazu werden molekulare epigenetische Analysen an Nebenschilddrüsen und Muskeln von Schweinen durchgeführt. Die DNA-Methylierungsprofile ausgewählter Promotorabschnitte von Genen mit Bezug zur P-Homöostase werden mittels Bisulfit-Sequenzierung analysiert, um auf transkriptionelle Regulationseffekte schließen zu können. Der multidisziplinäre Ansatz des Anschubprojektes umfasst außerdem die Bestimmung der PTH-Serumspiegel und mögliche direkte Auswirkungen auf die Mineralienresorption aus dem Knochengewebe. Diese erweiterte molekulare Charakterisierung soll das Verständnis zur möglichen Implementierung einer diätetischen P-Konditionierung mit erhöhter P-Effizienz bei Schweinen vertiefen.

3. Material und Methoden

Diäten, Tiere und Probensammlung

Der Fütterungsversuch fand in den Jahren 2017-2018 statt und war Teil der ersten Förderphase des Leibniz Wissenschaftscampus Phosphorforschung Rostock. Es wurden drei Diäten mit unterschiedlichem P-Gehalt an trächtige Sauen während der Trächtigkeit (115 Tage) und Laktation (28 Tage) verfüttert. Vom Absetzen (Tag 28) bis zur Schlachtung (120 Lebenstage) wurden je sechs Ferkel pro Wurf zu drei Diätengruppen mit unterschiedlichem P-Gehalt zugeordnet. Die Nachkommen wurden sowohl während der Trächtigkeits- und Laktationsperiode als auch während der Wachstums- und Mastperiode Schwankungen im P-Gehalt der Nahrung ausgesetzt (n=83), woraus neun Versuchsgruppen entstanden. Zur Schlachtung wurde Serum gewonnen sowie die Nebenschilddrüsen, Muskel und Metakarpalknochen entnommen.

DNA-Isolierung und DNA-Bisulfit-Sequenzierung

Die Nebenschilddrüsen wurden in flüssigem Stickstoff zu Pulver gemahlen und für die DNA-Isolierung mittels TRI-Reagenz nach den Anweisungen des Herstellers (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Die Quantifizierung der DNA wurde mit einem NanoDrop ND-2000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Alle DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert, bis die Downstream-Analysen durchgeführt wurden. Die Bisulfit-Konvertierung jeder DNA-Probe wurde gemäß den Protokollen des Herstellers mit einem EZ-DNA-Methylation-Kit durchgeführt (Zymo Research, Irvine, Kalifornien, USA). Methylierungs-PCR-Primer wurden unter Verwendung von MethPrimer abgeleitet [Li & Dahiya 2002]. Für jedes Kandidatengen wurde ein DNA-Fragment der Promotorregion mit einem spezifischen Temperaturprogramm amplifiziert (Tabelle 1). Die Methylierungs-PCR-Amplifikation enthielt 100 ng Bisulfit-konvertiertes DNA-Template, 1 x PCR-Puffer, 250 µM dNTPs, 5 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer und 0,2 Einheiten Hot-Start Taq-DNA-Polymerase (Qiagen). Die

Bestimmung der DNA-Basenabfolge bzw. des Auftretens nicht konvertierter Cytosinbasen, sogenannter CpGs, erfolgte in den gereinigten PCR-Produkten mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequenzierkit V3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Es wurde der Sequenzierautomat ABI 3130 verwendet (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA). Die Sanger-Sequenzierungschromatogramme wurden mit Hilfe der ESME (Epigenetic Sequencing METHylation)-Analysesoftware ausgewertet, die den prozentualen Methylierungsgrad an jedem CpG innerhalb des PCR-amplifizierten Fragments der Bisulfit-konvertierten DNA schätzt [Lewin et al., 2004]. Sowohl einzelne CpGs als auch die gesamte sogenannte CpG-Insel wurden mittels Varianzanalyse analysiert, wobei die fixen Effekte der Diät und Wurf berücksichtigt wurden (R, v4.0, *R Foundation for Statistical Computing*).

Tabelle 1. Sequenzinformationen der genutzten PCR-Primer

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur (°C)	Amplikonlänge (bp)
bisPTHf	TATGGAGGTTTTAGGTTAGGGG	59.0	149
bisPTHr	CCCTACCCTTACTCAATAAATTAAC	56.0	
bisPTH1Rf	GGTTTTAAGTAGTTAGGGGTGGAGT	59.0	291
bisPTH1Rr	AACCAAAATCCCTAAAAAACCTACT	59.0	
bisFGFR1f	GGTTTGATTAGAATTGGTTTTGA	58.0	263
bisFGFR1r	AAAACACACAAAAACACACAAAAAA	59.0	
bisSPP1f	TTGTTAAAGATAATAGAGTAGAAAAGAA	54.0	478
bisSPP1r	TTTCCCTTTAAACACATTACTCA	56.0	

Quantifizierung von PTH in Serum

Darüber hinaus wurden diejenigen Analysekits für die Quantifizierung von PTH getestet, die derzeit auf dem Markt für die Spezies Schwein erhältlich sind (Immutopics, cat no. 60-3100; San Clemente, Kalifornien, USA; TECOmedical, cat no. 60-3000; Bünde, Deutschland; LSbio, cat no. LS-F23295; Seattle, Washington, USA).

Bestimmung von Knochenparametern

Die Auswirkungen der variablen P-Versorgung auf den Mineralisierungsgrad (Osteoblastenaktivität vs. Mineralresorption) wurde in Metakarpalknochen bewertet. Für die Analysen wurden die rechtsseitigen III. und IV. Metakarpalknochen verwendet. Die Trockenmasse (g/kg) wurde durch Gefriertrocknung bestimmt (Delta 1-24 LSCplus, Fa. Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH). Anschließend wurden die Proben entfettet und mit einer Zentrifugalmühle (ZM1, Retsch GmbH, Maschenweite: 0,5 mm) gemahlen. Die Bestimmung von Rohasche, P und Calcium erfolgte nach den Empfehlungen des VDLUFA [Miesorski et al., 2018; VDLUFA, 1976]. Die erhobenen Parameter wurden mittels Varianzanalyse analysiert, wobei fixen Effekte (Diät, Wurf) als auch das Lebendgewicht als Co-Variable berücksichtigt wurden (R, v4.0). Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Promotormethylierung in Kandidatengenen der P-Homöostase

Die Genpromotor-Methylierungsraten einzelner CpG-Stellen (%) von SPP1 (Osteopontin) sind in Abbildung 1 dargestellt. Die untersuchte Promotorregion erscheint in Nebenschilddrüsen konsistent hypomethyliert, was auf eine erhöhte Genaktivität hindeutet.

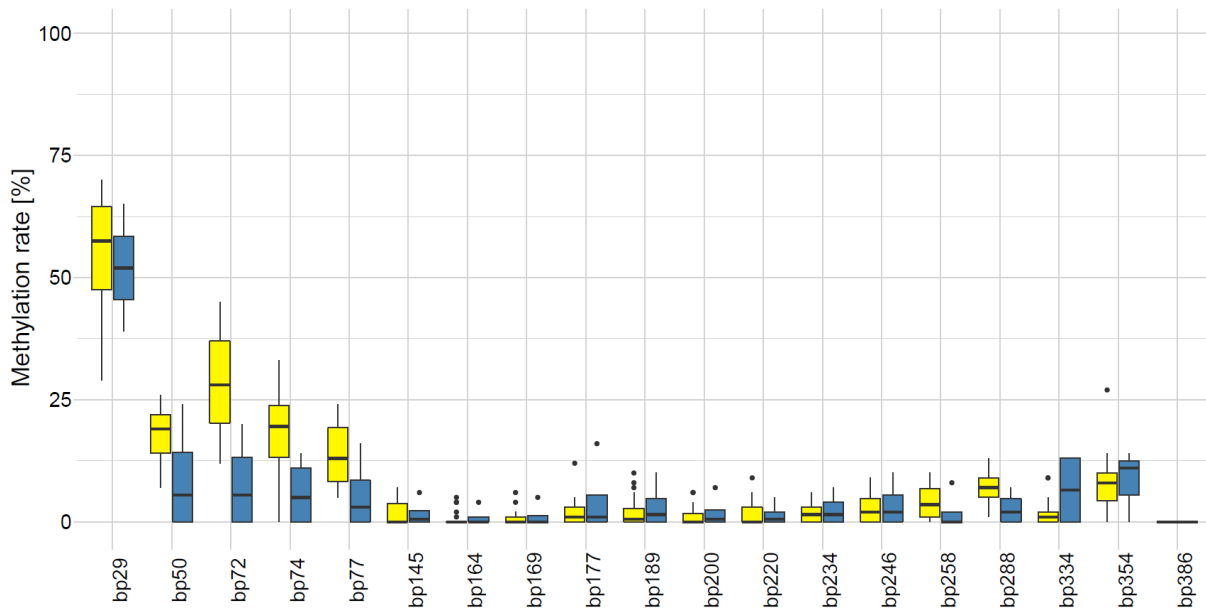


Abbildung 1: DNA-Methylierungsrate (%) einzelner CpG-Stellen aus der porcinen Promotorregion von SPP1 (Osteopontin) in Muskel (gelb) und Nebenschilddrüse (blau).

Auch die Promotorregion von PTH zeigt in den Nebenschilddrüsen eine geringere Methylierungsrate als im Muskel (Abbildung 2), was der Gewebe-spezifischen Expression von PTH in den Nebenschilddrüsen entspricht. Es ist demnach davon auszugehen, dass das PTH-Gen zusätzlich zu den gut beschriebenen Regulationen über VDRE (engl. *Vitamin-D Response Element*) und post-transkriptionale Mechanismen auch durch die Methylierungsrate einzelner Promotorabschnitte gesteuert werden kann. Dies eröffnet eine neue Ebene der Modulation innerhalb der P-Homöostase im Schwein und wird in Folgestudien auf weitere Projekte angewandt.

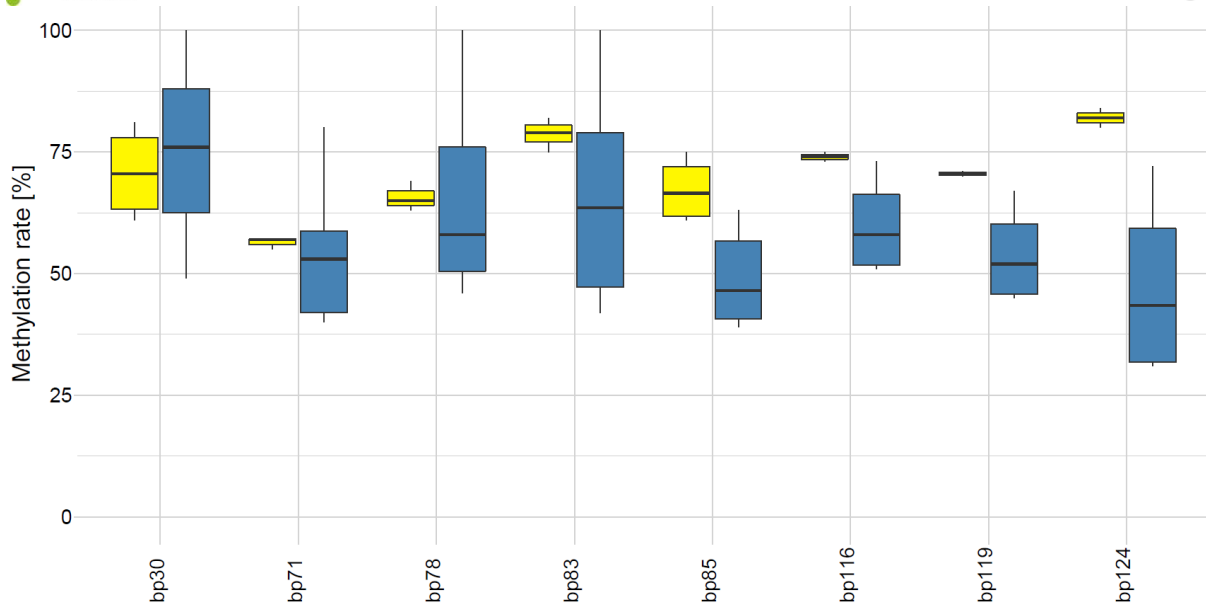


Abbildung 2: DNA-Methylierungsrate (%) einzelner CpG-Stellen aus der porcinen Promotorregion von PTH (Parathormon) in Muskel (gelb) und Nebenschilddrüse (blau).

Ein weiteres Kandidatengenen stellt PTH1R (engl. *parathyroid hormone rezeptor 1*) dar. Dessen untersuchter Promotorbereich zeigt hohe Gewebe-spezifische Methylierungsrate (Abbildung 3). In wie weit diese Effekte auch Einfluß auf die Genexpression von PTH1R durch DNA-Methylierung haben, sollte in Folgeprojekten näher untersucht werden. Insbesondere in Nierengewebe könnten Regelkreise über die DNA-Methylierung von PTH1R Einfluß auf die P-Homöostase nehmen und renale P-Verluste steuern.

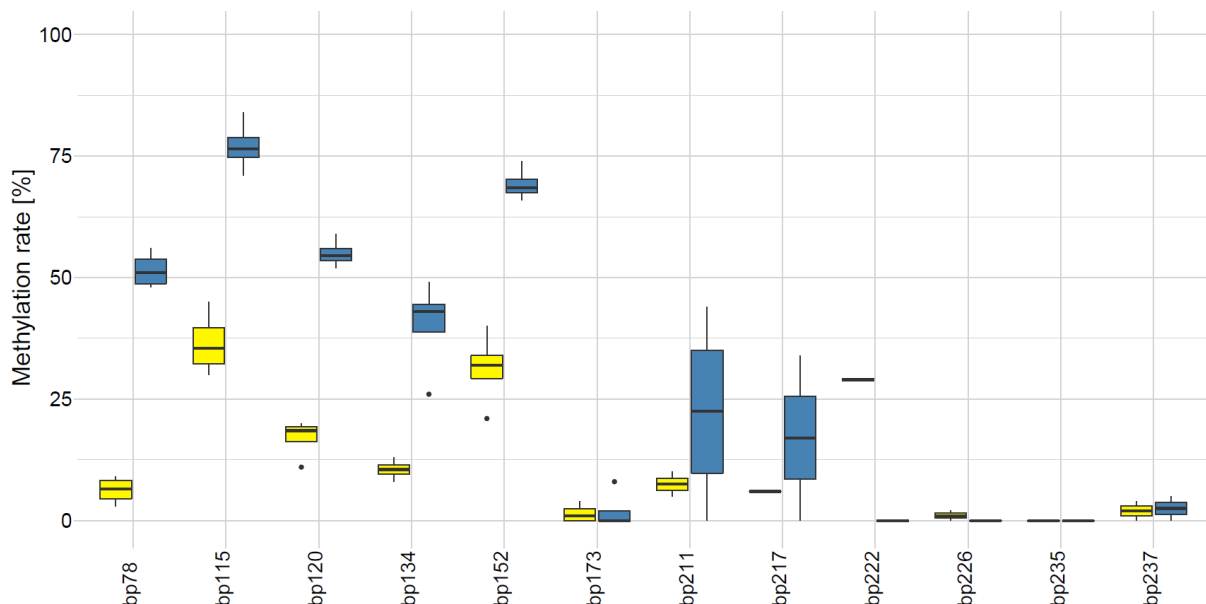


Abbildung 3: DNA-Methylierungsrate (%) einzelner CpG-Stellen aus der porcinen Promotorregion von PTH1R (engl. *parathyroid hormone rezeptor 1*) in Muskel (gelb) und Nebenschilddrüse (blau).

Die Analyse der Promotorregion von FGFR1 (engl. *fibroblast growth factor receptor 1*) ergab eine nahezu vollständige Hypomethylierung in sowohl Muskel als auch Nebenschilddrüsen. Somit erscheint FGFR1 nicht für eine weitere Analyse auf Diät- bzw. Gewebespezifische Regulationen geeignet.

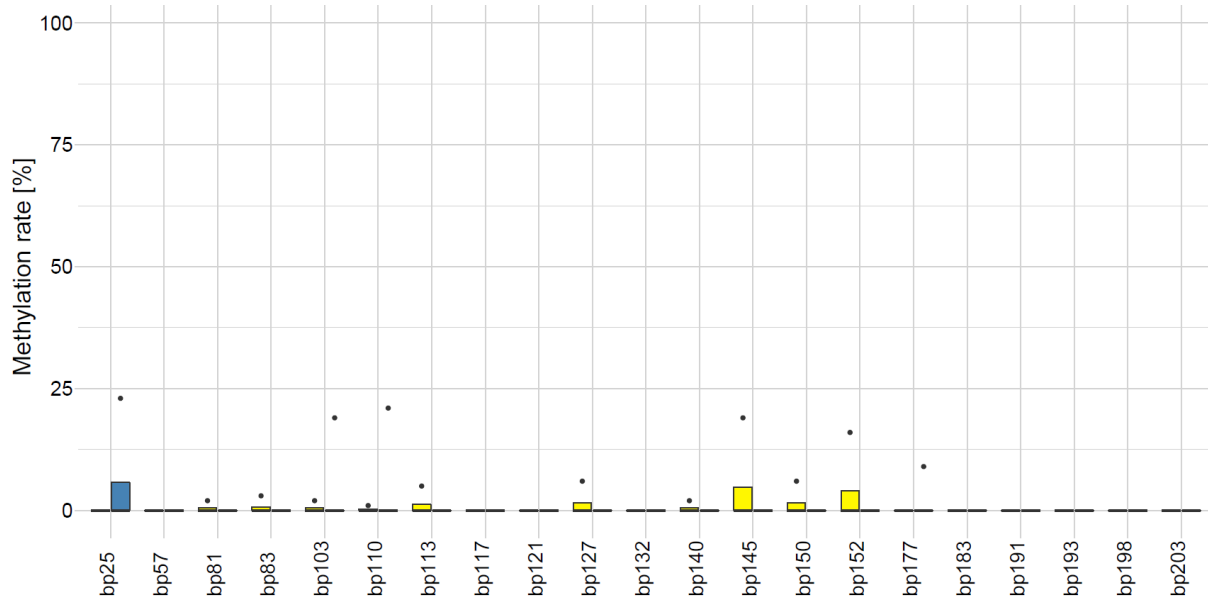


Abbildung 4: DNA-Methylierungsrate (%) einzelner CpG-Stellen aus der porcinen Promotorregion von FGFR1 (engl. *fibroblast growth factor receptor 1*) in Muskel (gelb) und Nebenschilddrüse (blau).

Für die Quantifizierung von PTH wurden Verdünnungsreihen mit Serum von ausgewachsenen Schweinen getestet. Bei keinem der drei kommerziellen Tests konnte eine spezifische Bindung bzw. Kreuzreaktivität zum Schwein gezeigt werden. Somit konnte die Serumkonzentration von PTH im Schwein nicht bestimmt werden. Auf der Grundlage von Untersuchungen an Ferkeln kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Serumkonzentration von PTH bei Schweinen, die mit niedrigem P-Gehalt gefüttert werden, abnimmt [Oster et al., 2016].

Die Analyse der Metakarpalknochen zeigte signifikante Effekte für den Trockenmassegehalt und die Rohaschekonzentrationen aufgrund der Absetzdiät ($p < 0.05$). Jedoch waren die Konzentrationen von P und Calcium weder von der mütterlichen Diät noch von der Absetzdiät beeinflusst ($p > 0.05$).

Tabelle 2. Parameter porciner Metakarpalknochen. Die Proben stammen von Schweinen, die während der maternalen und postnatalen Entwicklung einer Diät mit empfohlenen (M), reduzierten (L) oder höheren (H) P-Gehalten ausgesetzt waren.

Diät (Mat)	Diät (AS)	TM [g/kg FM]	RA [g/kg TM]	RA [g/kg FM]	P [g/kg TM]	P [g/kg FM]	Ca [g/kg TM]	Ca [g/kg FM]
L	L	642.3	511.0	328.4	332.8	213.7	425.8	273.5
L	M	668.8	536.4	358.7	329.8	220.7	418.4	281.5

L	H	630.5	541.0	341.2	320.5	202.2	433.8	273.5
M	L	600.0	511.8	307.7	353.0	211.4	408.2	245.2
M	M	663.3	525.3	349.2	347.2	230.1	402.3	266.9
M	H	646.6	545.2	352.3	339.0	219.2	407.1	264.1
H	L	639.2	530.2	338.8	332.8	212.6	402.0	257.2
H	M	646.1	550.8	356.4	319.8	206.0	403.2	260.7
H	H	649.1	536.8	348.3	332.3	215.8	408.6	265.9
SEM		32.2	19.3	24.4	17.8	16.6	14.2	16.2
P Wert	Diät (Mat)	0.499	0.206	0.323	0.243	0.213	0.705	0.163
	Diät (NK)	0.030	0.016	0.010	0.526	0.501	0.182	0.475
	Diät (Mat) x Diät (NK)	0.825	0.195	0.904	0.483	0.388	0.611	0.946

Mat – maternal; AS – Absetzer; RA – Rohasche; TM – Trockenmasse; FM – Frischmasse; Ca – Calcium;

Die aus den Expressionsprofilen von porcinen Nebenschilddrüsen gewonnenen Daten liefern Informationen über physiologische Reaktionen auf ernährungsbedingte Hypophosphatämien und weisen auf eine synergistische Regulierung von Rückkopplungsschleifen zur systemischen Kontrolle der PTH-Expression und -Stabilität hin (Daten nicht gezeigt; Teil des Drittmittelprojektes PEGaSus). Mit Hilfe der erhobenen Daten zur Mineralisierung der Metakarpalknochen wird deutlich, wie eng der porcine Organismus den Mineralienhaushalt reguliert und über feedback-Mechanismen die Versorgung der Knochenmatrix sicherstellt.

Es gibt immer mehr Belege dafür, dass Expression, Stabilität und Sekretion von PTH umfassend über ein breites Spektrum von Molekülen einschließlich der aktiven Form von Vitamin D (Calcitriol), Transkriptionsfaktoren wie MAFB und post-transkriptionelle Modifikationen einschließlich des CaSR-Signalwegs gesteuert werden [Morito2018, Brown2013]. Darüber hinaus wurde der Serum-P-Spiegel als post-transkriptionelles Signal identifiziert, das die Stabilität der *PTH*-mRNA moduliert [Hernandez1996, Silver2018]. Die Ergebnisse der bisher ermittelten Expressionsprofile zeigen die Resilienz gegenüber diätetischen P-Reduktionen durch übergeordnete endogene Mechanismen. Die ermittelten Methylierungsprofile der Nebenschilddrüsen komplementieren die genannten Regulationsmechanismen für eine endogene Balance der *PTH*-mRNA-Kopienzahl und sind Grundlage für weitere molekulare Untersuchungen in Nebenschilddrüsen an der Spezies Schwein.

5. weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt

Es ist beabsichtigt, die generierten Ergebnisse des Anschubprojektes mit allen Partnern der beteiligten Institutionen in einem gemeinsamen Manuskript zu veröffentlichen. Weiterhin ist geplant, die Ergebnisse zum Symposium des P-Campus (November 2020) sowie auf der Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde & der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften (DGFZ/GfT) vorzustellen (Februar 2021).

Der etablierte Methodenansatz zur Darstellung von Methylierungsprofilen ausgewählter Kandidatengene der P-Homöostase soll auf Nieren- und Knochenproben ausgeweitet werden. Es wird angestrebt, auf Grundlage der Etablierung epigenetischer Marker im Rahmen eines interdisziplinären Projektes zum systemischen Zusammenspiel von Nebenschilddrüse, Niere, Darm und Knochen in Huhn und Schwein weitere Drittmittelförderung einzuwerben.

6. Literaturverzeichnis

- Brown EM (2013). Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27(3):333-343.
- Lewin J, Schmitt AO, Adorján P, Hildmann T, Piepenbrock C (2004). Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. *Bioinformatics* 20(17):3005-3012.
- Hernández A, Concepción MT, Rodríguez M, Salido E, Torres A (1996). High phosphorus diet increases preproPTH mRNA independent of calcium and calcitriol in normal rats. *Kidney Internat* 50(6):1872-1878.
- Junien C (2006). Impact of diets and nutrients/drugs on early epigenetic programming. *J Inherit Metabol Dis* 29(2-3):359-365.
- Li LC, Dahiya R (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18(11):1427-1431.
- Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC (2005). Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 135(6):1382-1386.
- Miesorski M, Gerlinger C, Borgelt L, Lieboldt M, Oster M, Wimmers K, Wolf P (2018). Bone mineralization as diagnostic parameter for the assessment of dietary phosphorous supply in pigs – are there differences between bones? 22nd Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, 183.
- Morito N, Yoh K, Usui T, Oishi H, Ojima M, Fujita A, Koshida R, Shawki H, Hamada M, Muratani M, Yamagat K, Takahashi S (2018). Transcription factor MafB may play an important role in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 93(1):54-68.
- Oster M, Just F, Büsing K, Wolf P, Polley C, Vollmar B, Murani E, Ponsuksili S, Wimmers K (2016). Toward improved phosphorus efficiency in monogastrics—Interplay of serum, minerals, bone, and immune system after divergent dietary phosphorus supply in swine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 310(10):R917-R925.
- Silver J, Naveh-Many T (2018). Vitamin D and the parathyroids. In *Vitamin D* edn 4, (pp. 461-475). Eds D Feldman, JW Pike, R Bouillon, E Giovannucci, D Goltzman, M Hewison. San Diego, Academic Press.
- VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten) (1976). *Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch) Band III Die chemische Untersuchung von Futtermitteln mit 1. – 8. Ergänzungslieferung (1983 – 2012) (AufL.3 Ges)*, VDLUFA-Verlag, Darmstadt. Retrieved from <http://www.vdlufa.de/Methodenbuch/index.php?lang=de>

Danksagung

Die Autoren danken für die finanzielle Zuwendung des Leibniz-Wissenschaftscampus Phosphorforschung Rostock im Rahmen der Anschubprojekte der 2. Förderphase. Weiterhin danken die Autoren Frau Angela Garve (FBN) und Herrn Aisanjiang Wubuli (FBN) für die ausgezeichnete Laborarbeit.