

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Stefanie Ritz-Timme

**Razemisierung von Asparaginsäureresten und
Deiminierung von Argininresten humaner Histone in
Myokardgewebe**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Neufeind

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referentin: Univ.-Prof. Dr. med. Stefanie Ritz-Timme

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Stahl

Meinen Eltern
Angela Klinkhammer-Neufeind
&
Dr. med. Heinz-Peter Neufeind

Danksagung

Diese Arbeit entstand zwischen April 2007 und Dezember 2011 am Institut für Rechtsmedizin in Düsseldorf und ich möchte diese Seite nutzen um denjenigen Menschen zu danken, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Meiner Doktormutter Prof. Dr. Stefanie Ritz-Timme danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas, für die Unterstützung und fortwährende Motivation während meiner gesamten Promotionszeit, für konstruktive Diskussionen und Anregungen und für die stets blitzschnellen Korrekturen meiner Manuskripte mit anschließender Besprechung trotz eines bis zum Bersten gefüllten Terminkalenders.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Stahl danke ich für die Übernahme de Koreferats.

Ebenso bedanke mich bei meinem Betreuer Dr. Reimer Dobberstein für die Unterstützung und fachliche Hilfe bei der Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Bärbel Seeling und Dipl.-Biologin Alexandra Reckert: Ich danke euch für die hervorragende Einarbeitung zu Beginn meiner Arbeit, für eure stets vorbildliche Betreuung, Beratung und Unterstützung in praktischen und fachlichen Angelegenheiten, für eure Motivation in frustrierenden Zeiten, für eure Geduld und für die vielen schönen und lustigen Stunden, die wir gemeinsam erlebt haben. Ihr habt in allerhöchstem Maße dazu beigetragen, dass diese Arbeit fertig geworden ist.

Ferner bedanke ich mich bei den Rechtsmedizinern Dr. Britta Gahr, Dr. Benno Hartung und Dr. Felix Mayer sowie dem gesamten Sektionsteam des Instituts für die Asservation der Proben. Dr. Benno Hartung und Blazenka Bosilj danke ich herzlich für die Hilfe bei der Aufarbeitung und Beurteilung der histologischen Präparate.

Danksagung

Meinem Freund danke ich für seine Geduld und die unersetzliche Hilfe bei zahlreichen Formatierungs- und Layoutfragen. Zuletzt danke ich meinen Eltern für die Unterstützung, die unermüdliche Geduld und das bedingungslose Vertrauen in mich während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit. Ohne euch würde es diese Arbeit nicht geben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Posttranslationale Histonmodifikationen in der Epigenetik und in Alterungsprozessen	1
1.1.1. Histone als Verpackungseinheit der DNA	1
1.1.2. Posttranslationale Histonmodifikationen in der Epigenetik: „Histoncode“	2
1.1.3. Posttranslationale Histonmodifikationen in Alterungsprozessen	3
1.2. Intravitale Razemisierung von Asparaginsäure (AAR)	3
1.3. Deiminierung von Argininresten	8
1.4. Myokard als Untersuchungsmaterial	10
1.5. Zielsetzung	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Untersuchungsmaterial	12
2.2. Histologie	14
2.3. Aufreinigung des Myokards	15
2.3.1. Präparation und Verarbeitung der Proben	15
2.3.2. Isolation der Histone	16
2.3.3. Trennung der Histone mittels RP-HPLC	17
2.3.4. Überprüfung der Histonreinheit mittels Gelelektrophorese	18
2.3.5. Massenspektrometrische Kontrolle der Reinheit der Histone	18
2.4. Bestimmung des Verhältnisses D/L-Asx (Razemisierung) in Histon H1 und H2B	20
2.4.1. Hydrolyse der Histone	20
2.4.2. Analytik	20
2.5. Bestimmung des Verhältnisses D/L-Asx (Razemisierung) im Gesamtkernprotein	22
2.5.1. Hydrolyse des Gesamtkernproteins	22
2.5.2. Analytik	22
2.6. Quantifizierung des Citrullingehaltes der Histone	23
2.6.1. Hydrolyse der Histone	23
2.6.2. Analytik	23
2.7. Western-Blot zum Nachweis der Deiminierung in Histonen	25
2.8. Eingesetzte Lösungen	27
2.8.1. Histonisolation	27
2.8.2. FPLC	27
2.8.3. Gelelektrophorese	28
2.8.4. Vorbereitung für die Massenspektrometrie	29
2.8.5. HPLC	30
2.8.6. Western Blot	31
3. Ergebnisse	33
3.1. Histologische Untersuchung	33

3.2. Ergebnis der Aufreinigung der Histone	34
3.2.1. Auftrennung der Histonsubtypen mittels RP-HPLC	34
3.2.2. Überprüfung der Reinheit mittels Massenspektrometrie	36
3.3. Razemisierung von Asx-Resten myokardialer Histone	40
3.4. Razemisierung von Asx-Resten im Gesamtkernprotein des Myokards	43
3.5. Deiminierung von Argininresten myokardialer Histone	44
3.6. Western-Blot zum Nachweis der Deiminierung in Histonen	49
4. Diskussion	50
4.1. Methodenkritik	50
4.1.1. Aufreinigung von Histonen aus humanem Myokard	50
4.1.2. Subtypen von Histon H1 und H2B und deren Elutionsverhalten in der RP-HPLC	51
4.2. D-Asx-Reste in myokardialen Histonen	53
4.2.1. Einfluss von Umgebungsbedingungen auf die Razemisierungskinetik und die Untersuchungsergebnisse	53
4.2.2. D-Asx-Reste in Histonen H1 und H2B aus Myokardgewebe	53
4.3. D-Asx-Reste im Gesamtkernprotein des Myokards	57
4.4. Deiminierung von Argininresten myokardialer Histone	59
4.4.1. Einfluss der Aminosäuresequenz auf die Deiminierung	59
4.4.2. Deiminierung von Argininresten in H2B aus Myokardgewebe	60
4.4.3. Deiminierung von Argininresten in H1 aus Myokardgewebe	60
4.4.4. Funktionelle Konsequenzen der Deiminierung	62
5. Zusammenfassung	64
6. Abkürzungsverzeichnis	66
7. Literaturliste	67
8. Lebenslauf	81

1. Einleitung

Proteine sind komplexe organische Moleküle, die nach ihrer Synthese vielfältigen posttranslationalen Modifikationen unterliegen. Posttranslationale Modifikationen können 1.) enzymatisch vermittelt werden und 2.) spontan (nicht-enzymatisch) entstehen [Cloos und Christgau 2004, Cloos und Christgau 2002]. Viele dieser Modifikationen sind für Protein- und Zellfunktion unerlässlich, jedoch akkumulieren sie zum Teil auch mit dem Alter oder unter pathologischen Bedingungen und können dadurch einen schädigenden Einfluss haben und zu einer Kompromittierung der Zellfunktion führen

Die vorliegende Arbeit untersucht posttranslationale Modifikationen von Histonen. Die nachfolgenden Abschnitte der Einleitung geben einen Überblick über das Protein „Histon“ und die Modifikationen Razemisierung und Deiminierung, die Gegenstand der Untersuchung waren. Ferner wird beleuchtet warum humanes Myokard als Untersuchungsmaterial von besonderem Interesse ist.

1.1. Posttranslationale Histonmodifikationen in der Epigenetik und in Alterungsprozessen

1.1.1. Histone als Verpackungseinheit der DNA

Histone sind kleine, hochkonservierte basische Proteine, deren Funktion darin besteht, die DNA zu komprimieren und somit in eine höhere strukturelle Ordnung zu überführen [Bannister und Kouzarides 2005, Hagiwara et al. 2005, Strahl und Allis 2000].

Insgesamt gibt es fünf verschiedene Histonsubtypen, die sich strukturell/funktionell in Core-Histone und Linker-Histone unterteilen lassen; eine biochemische Einteilung erfolgt grob in lysinreiche, weniger lysinreiche und argininreiche Klassen [DeLange und Smith 1971]. Zu den Core-Histonen gehören die Subtypen H2A, H2B, H3 und H4, zu den Linker-Histonen das H1 [Hagiwara et al. 2005, Biel et al. 2005, Jenuwein

2001, Lindner und Helliger 1990]. Der Komplex aus DNA und zugehörigen Histonen wird als Nukleosom bezeichnet.

Die Core-Histone bilden ein Oktamer, bestehend aus zwei H2A-H2B-Dimeren und einem H3-H4-Tetramer, welches von der DNA-Doppelhelix umschlungen wird. Die an der Außenseite der Nukleosomen ansetzenden Linker-Histone stabilisieren den Komplex und führen somit zur Bildung des Chromatinkörpers [Lindner 2008, Ausió 2006, Turner 2000].

1.1.2. Posttranslationale Histonmodifikationen in der Epigenetik: „Histoncode“

Die in ihrer Struktur hochflexiblen Amino-(N)-Termini der Core-Histone ragen aus dem Nukleosom heraus und sind Gegenstand zahlreicher kovalenter, enzymatisch vermittelter posttranslationaler Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Deiminierung [Garcia et al. 2007, Margueron et al. 2005, Biel et al. 2005, Hagiwara et al. 2005, Cloos und Christgau 2004, Turner 2002]. Durch die Modifikationen der Histone kommt es zu Struktur- und Ladungsveränderungen, welche entweder eine stärkere Bindung an die DNA induzieren und dadurch zu einer Gen-Inaktivierung führen können, oder es kommt zu einer Lockerung der Bindung zwischen Histonen und DNA mit der Folge einer Gen-Aktivierung. Reversibilität dieser Modifikationen wird durch entsprechende Deacetylasen, Demethylasen und Dephosphatasen erreicht, welche entstandene Modifikationen aufheben und die damit entstandenen Ladungsveränderungen wieder rückgängig machen können [Biel et al. 2005].

Die verschiedenen kovalenten Histonmodifikationen beeinflussen sich zum Teil gegenseitig, so dass es zum Auftreten spezifischer Muster kommt. Diese Beobachtungen führten zur Hypothese des „Histoncodes“: Die auf den N-Termini lokalisierten Modifikationen führen in einer kombinatorischen, sequenzabhängigen Weise zu spezifischen „Downstream“-Ereignissen und tragen so maßgeblich zur Steuerung transkriptionsabhängiger Vorgänge bei [Biel et al. 2005]. Damit tragen

Histone nicht nur zur Strukturierung des Chromatins bei, sondern dienen auch als Matrix für die Schaffung eines Zugangs zur DNA und sind wesentliche Größen in der Modulation eukaryotischer Genexpression [Strahl und Allis 2000, Cosgrove et al. 2004].

1.1.3. Posttranslationale Histonmodifikationen in Alterungsprozessen

Neben den enzymatisch vermittelten posttranslationalen Modifikationen sind für Histone auch eine Reihe von spontanen, nicht-enzymatischen posttranslationalen Modifikationen beschrieben worden, insbesondere Oxidation, Glykosylierung, Deamidierung, Isomerisierung und Razemisierung (vgl. 1.2.) [Cloos und Christgau 2004]. Diese können im Alterungsprozess zur Akkumulation veränderter Proteine führen.

Histone sind langlebige Proteine [Reissner und Aswad 2003]; daraus ergibt sich die Frage ob die o.g. Modifikationen über die Lebensspanne der Histone akkumulieren können

1.2. Intravitale Razemisierung von Asparaginsäure (AAR)

Die Biosynthese humaner Aminosäuren und ihre weitere Synthese zu Proteinen erfolgt bei Mensch und Tier in Form von L-Aminosäuren. Demzufolge enthalten neu gebildete Proteine nur L-Aminosäuren. Wie bereits oben angesprochen, kann es anschließend zu einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen kommen. Dazu gehören die spontane, d.h. nicht-enzymatische Razemisierung und Isomerisierung von Asparaginsäureresten sowie die Deamidierung von Asparaginresten [Ritz-Timme und Collins 2002, Clarke 1987]. Der Prozess der Razemisierung beschreibt die Umwandlung eines L-Enantiomers in das entsprechende D-Enantiomer. In der Primärstruktur der Proteine stellen die Aminosäuren Asparaginsäure (= Asp) und Asparagin (= Asn) sogenannte „hot spots“ [Zhang et al. 2011, Schöneich 2008, Kosky et al. 1999, Minli et al. 1996, Geiger und

Clarke 1987] dar, dies sind instabile Aminosäure-Reste, die für Razemisierung, Isomerisierung und Deamidierung besonders anfällig sind.

Abbildung 1 beschreibt die Entstehung von D-Asparagin(säure): Zunächst erfolgt die Deamidierung – d.h. die Abspaltung von Ammoniak – von L-Asn. Dies führt zu einem metastabilen L-Succinimid, welches durch ein Intermediat (hier nicht dargestellt) zum D-Succinimid umgelagert werden kann. Von hier aus können sich vier Reaktionsprodukte bilden: Ausgehend vom L-Succinimid können L-Asp und L-Iso-Asp (= Isomerisierung) entstehen, ausgehend vom D-Succinimid können D-Asp (= Razemisierung) bzw. D-Iso-Asp (= Isomerisierung/Razemisierung) entstehen [Fujii et al. 2011, Ingrosso und Perna 1998].

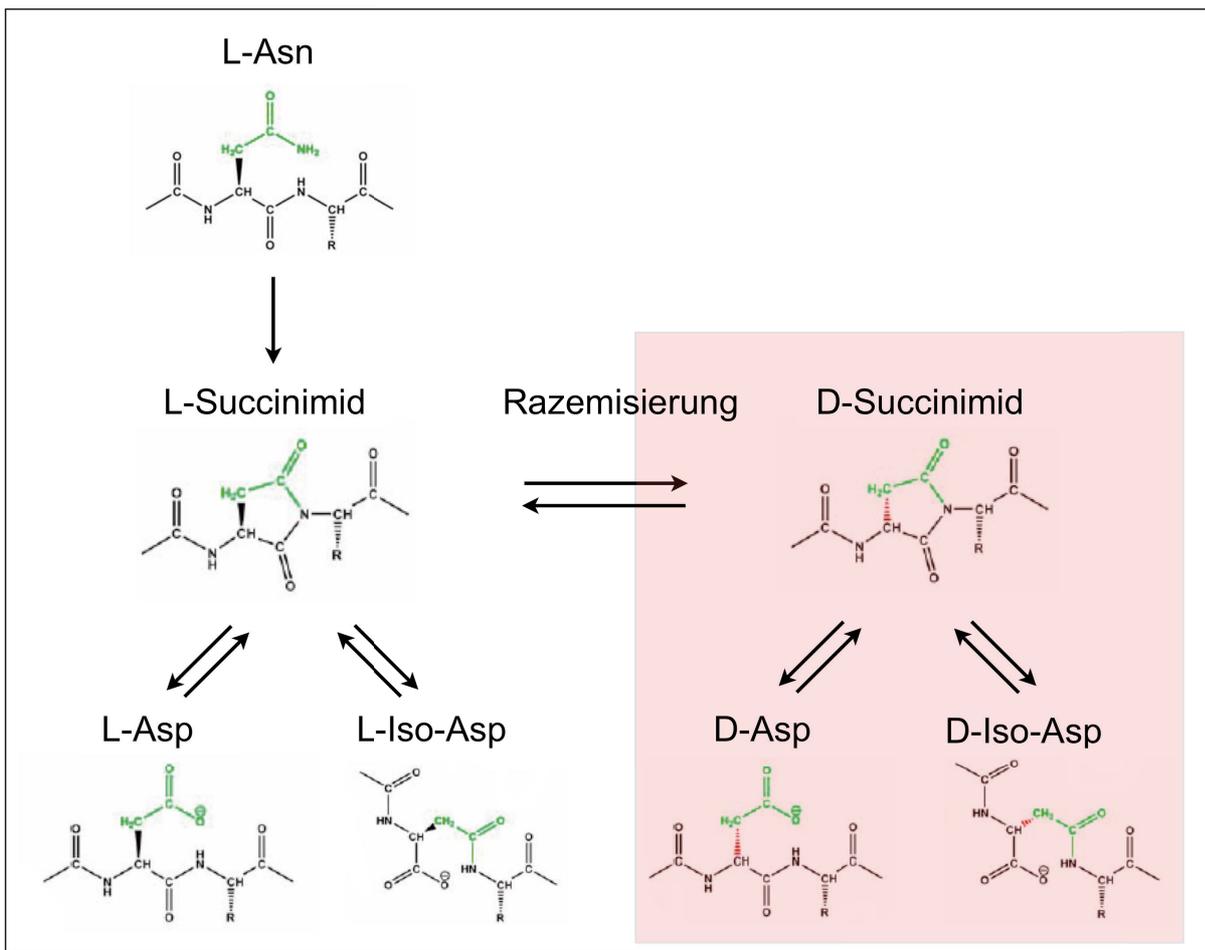


Abb. 1) Entstehung von D-Asparaginsäureresten durch spontane Modifikationen von Asn- und Asp-Resten. [Abbildung verändert nach Clarke (1987)]. Asn = Asparagin, Asp = Asparaginsäure.

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Die Akkumulation von D-Asparaginsäureresten wird weiter verstärkt durch die Wirkung des intrazellulären Enzyms Protein-L-Isoaspartyl-Methyltransferase (PIMT). Dies ist ein Reparaturenzym, welches selektiv atypische L-Iso-Asp-Reste methyliert; der daraus entstehende Methylester zerfällt spontan zu L-Succinimid, welches zu L-Asp und L-Iso-Asp hydrolysiert wird (vgl. Abb. 1 + 2) [Carter und Aswad 2008, Young et al. 2005, Reissner und Aswad 2003, Young et al. 2001]. Die Akkumulation von L-Iso-Asp gehört mit zu den Hauptursachen der spontanen Proteinschädigung in vivo und in vitro [Carter und Aswad 2008, Wakankar et al. 2007, Zhu et al. 2006, Vigneswara et al. 2006, Clarke 2003]. Normalerweise wird durch die Aktivität der PIMT die Anzahl an Iso-Asp-Resten möglichst gering gehalten, um schädigende Einflüsse auf die Zelle zu vermeiden [Kim et al. 1997, Johnson et al. 1993]. Bei jedem Methylierungs-/Demethylierungszyklus der PIMT entstehen aus dem L-Succinimid etwa 30 % L-Asp und 70 % L-Iso-Asp, d.h. es müssen mehrere dieser Zyklen durchlaufen werden bis die entsprechende Seitenkette sozusagen vollständig repariert und damit ihren „Normalzustand“ erreicht hat.

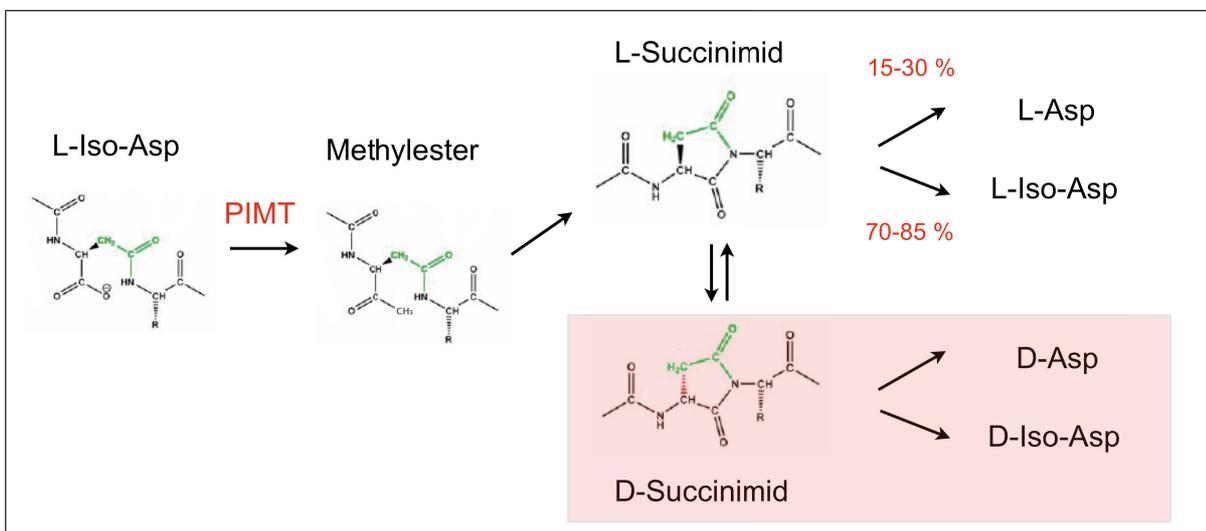


Abb. 2) Methylierung von L-Iso-Asp durch die PIMT mit anschließendem spontanem Zerfall zu L-Succinimid, welches wiederum zu L-Asp (15-30%) und L-Iso-Asp (70-85%) hydrolysiert wird. [Abbildung verändert nach Reissner und Aswad (2003)]. Asn = Asparagin, Asp = Asparaginsäure.

Wie bereits zu Abbildung 1 besprochen, ist das bei jedem dieser Zyklen entstehende L-Succinimid metastabil und besonders anfällig für Razemisierung (vgl. Abb. 1 + 2, hellrot unterlegt). Die bei der Razemisierung entstehenden D-Iso-Asp- und D-Asp-Reste können von der PIMT nicht effizient methyliert werden [Young et al. 2005, Galletti et al. 1988, McFadden und Clarke 1987], so dass durch Razemisierung also einerseits die Effizienz des Reparaturenzyms eingeschränkt wird und andererseits der von der PIMT durchgeführte reparative Prozess „ironischerweise“ die Akkumulation von D-Asx-Resten begünstigt [Carter und Aswad 2008].

Zur Quantifizierung razemisierter Asx-Reste wird üblicherweise eine saure Hydrolyse zur Freisetzung der einzelnen Aminosäuren eingesetzt. Diese Hydrolyse induziert eine Deamidierung von Asparaginresten zu Asparaginsäureresten, so dass in der Analytik nicht mehr zwischen Asparagin- und Asparaginsäureresten unterschieden werden kann, sie werden summarisch als „Asx“ bestimmt. In der Literatur wird dabei in aller Regel –etwas vereinfachend – von „Razemisierung von Asparaginsäure“ = „AAR“ gesprochen [Ritz-Timme 1999]. Im Folgenden wird deshalb entsprechend von Razemisierung (AAR) die Rede sein, wenn der in Abbildung 1 dargestellte Prozess gemeint ist.

Ob D-Aminosäurenreste akkumulieren, hängt einerseits von der Lebensdauer des „Mutterproteins“ ab, andererseits von der Geschwindigkeit der Razemisierung. Ferner spielen die Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins eine wichtige Rolle sowie das Vorhandensein adäquater Reparaturmechanismen [Ritz-Timme 1999].

Proteine mit hohem Zellumsatz, d.h. kurzer Lebensdauer, werden so schnell ausgetauscht, dass eine relevante Akkumulation des D-Asx gar nicht erst auftreten kann (vgl. Abb. 3, rote, gepunktete Linie). In Proteinen mit geringem Turnover kann es zwar zu einer Akkumulation razemisierter Aminosäurenreste kommen; wegen des bestehenden Umsatzes ist die Korrelation zwischen Razemisierung und Alter jedoch nicht signifikant (vgl. Abb. 3, grüne, gestrichelte Linie) [Alkass et al. 2009, Ritz-Timme und Collins 2002, Ritz-Timme 1999].

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

In permanenten Proteinen ohne nennenswerten Umsatz kann der Razemisierungsgrad der Aminosäuren in engem Zusammenhang mit dem Lebensalter des Organismus stehen (vgl. Abb. 3, blaue, durchgezogene Linie).

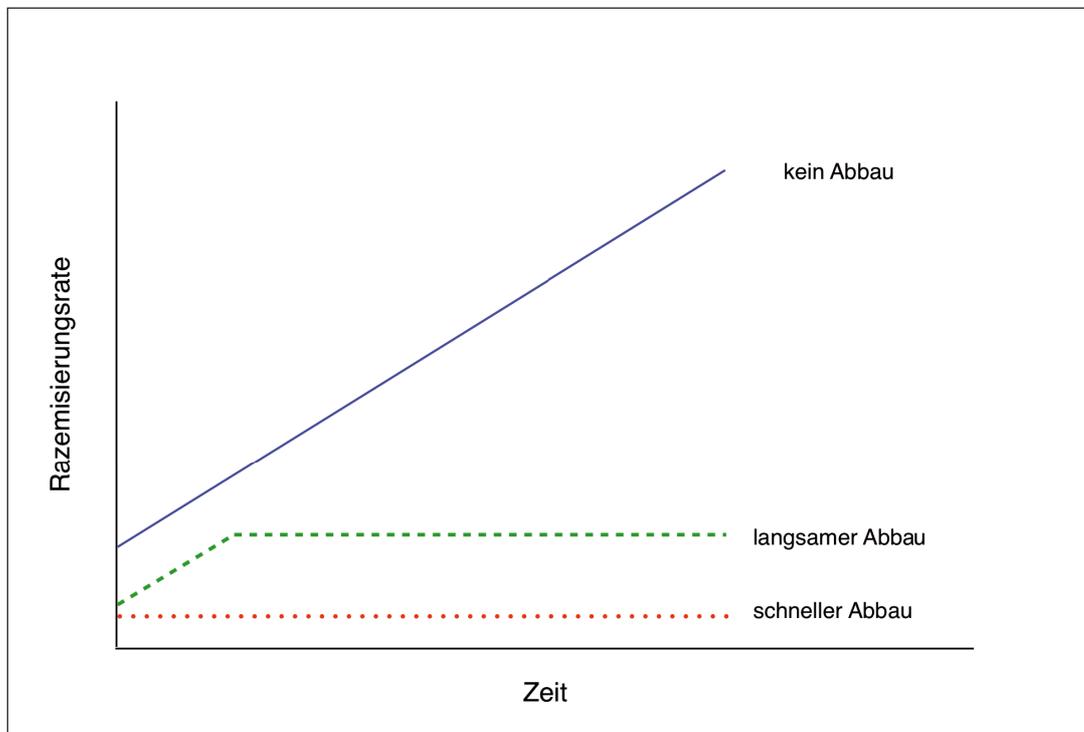


Abb. 3) Theoretische Beziehung zwischen dem Razemisierungsgrad von Asx und dem Proteinalter. [Abbildung verändert nach Ritz-Timme und Collins (2002)].

Ein derart enger Zusammenhang zwischen AAR und dem Lebensalter wurde bereits in verschiedenen langlebigen Proteinen gefunden, so in Dentinproteinen, Elastin und Osteocalcin [Ritz-Timme et al. 2003, Waite et al. 1999, Carolan et al. 1997, Ohtani 1995, Helfman und Bada 1975]. Die Aufreinigung dieser Proteine und die Bestimmung deren D-Asparagingehaltes war Grundlage für die Einführung präziser Verfahren zur Lebensaltersschätzung durch Nutzung dieser „molekularen Uhr“ [Ritz-Timme et al. 2003, Ritz-Timme 1999].

Aber auch in Geweben mit kürzerer Lebensdauer wurde eine in-vivo-Razemisierung nachgewiesen, so z.B. in Erythrozytenmembranproteinen [Ingrosso et al. 2000, Ingrosso und Perna 1998, McFadden und Clarke 1982].

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Bezüglich der Razemisierung von Histonen konnte die Arbeitsgruppe um Young [2002, 2005] eine vom Alter unabhängige Akkumulation von D-Asparaginsäureresten in Histon H2B aus Gehirngewebe von Hunden nachweisen (vgl. 4.2.2.).

Die funktionellen Konsequenzen dieser Aminosäurenmodifikationen in Histonen wurden bisher noch nicht experimentell belegt. Für die Deamidierung wird wegen der resultierenden Ladungsänderung am N-Terminus vermutet, dass diese Ladungsänderung über Beeinflussungen der Chromatinstruktur zu entsprechenden Änderungen im Chromatin führen können und diese Veränderungen im Zusammenhang mit Zellalterung stehen [Reissner und Aswad 2003, Lindner und Helliger 2001].

1.3. Deiminierung von Argininresten

Bei der Deiminierung (Synonym: Citrullinierung) erfolgt die Umwandlung von positiv geladenem Peptidylarginin zu neutral geladenem Peptidylcitrullin, wie in Abbildung 4 dargestellt [György et al. 2006, Hagiwara et al. 2005]. Citrullin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, d.h. diese Aminosäure wird primär nicht in Proteine eingebaut. Daraus lässt sich schließen, dass die Anwesenheit von Citrullin in Proteinen auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sein muss [Vossenaar et al. 2003].

Das Enzym, welches diesen Prozess katalysiert, ist die Peptidylarginin-Deiminase (PADI); sie ist spezifisch für proteingebundenes Arginin, jedoch nicht für freies Arginin [Vossenaar et al. 2003].

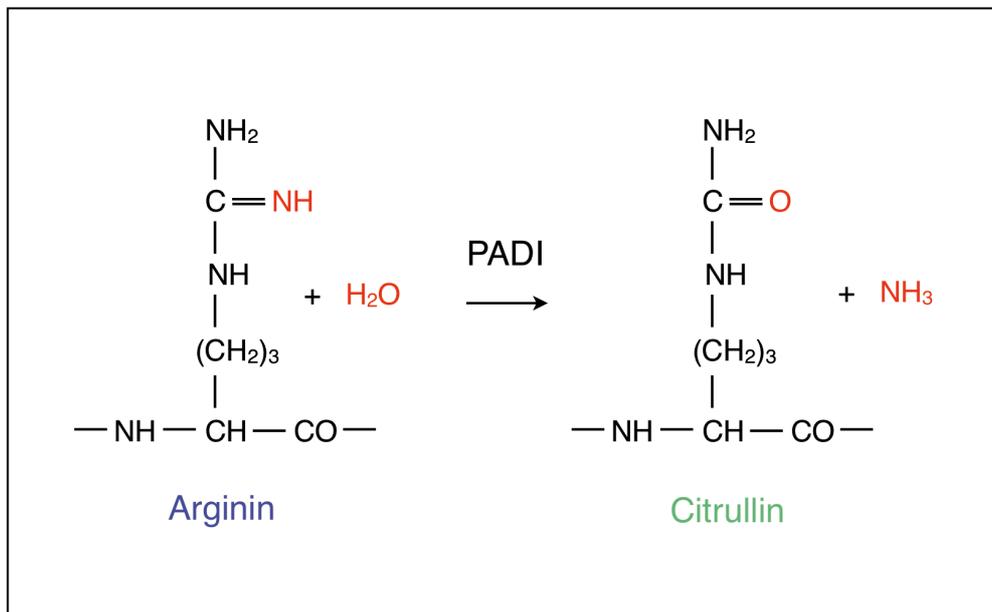


Abb. 4) Enzymatische Deiminierung von Arginin (Arg) zu Citrullin (Cit) durch die Peptidylarginin-Deiminase (PADI). [Abbildung verändert nach György et al. (2006)].

Die Erstbeschreibung der PADI erfolgte durch Rogers et al. (1977). Mittlerweile sind vier humane PADI-Isoenzyme identifiziert, die durch die Gene PADI1-4 kodiert werden [Chavanas et al. 2004]. Die PADI1 wird hauptsächlich in Epidermis, Uterus, Prostata, Thymus und Milz exprimiert, die PADI2 ist in Muskel- und Gehirnzellen lokalisiert, die PADI3 in Epidermis und Haarfollikeln und die PADI4 findet sich in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten [Chavanas et al. 2004, Vossenaar et al. 2003]. Die PADI1-3 sind ausschließlich im Zytosol lokalisiert, die PADI4 hingegen befindet sich im Zellkern [Vossenaar 2003, Nakashima et al. 2002].

An Histonen ist Deiminierung bislang nur für Zellen aus Zellkulturen beschrieben worden [Hagiwara et al. 2005]. Die in diesen Arbeiten provozierte in-vitro Deiminierung wurde nur unter hohen Kalzium-Konzentrationen beobachtet, zur Induktion der Deiminierung in Zellkulturen kamen Kalzium-Ionophore zur Anwendung [György et al. 2006, Méchin et al. 2005, Arita et al. 2004, Vossenaar et al., 2003]. Der Nachweis einer Deiminierung gelang für die Histonsubtypen H2A, H3 und H4, jedoch nicht für H2B und H1 [Neeli et al. 2008, Hagiwara et al. 2005, Cuthbert et al. 2004, Hagiwara et al. 2002].

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Die funktionellen Konsequenzen der Deiminierung von Argininresten in Histonen sind noch nicht hinreichend geklärt. Die durch die Deiminierung induzierte Ladungsneutralisierung – positiv geladenes Arginin wird zu neutral geladenem Citrullin – in Histonen kann weitreichende Folgen für die Interaktionen der Nukleosomen mit der negativ geladenen DNA haben. Weiter könnten deiminierte Arginireste nicht mehr methyliert werden, so dass darüber die epigenetische Steuerung der Transkriptionskontrolle beeinflusst werden kann; in soweit wurde auch diskutiert, ob die Deiminierung von Argininresten möglicherweise auch als Teil des „Histoncodes“ (vgl. 1.1.2.) zu sehen ist [Cuthbert et al. 2004, Vossenaar et al. 2003].

1.4. Myokard als Untersuchungsmaterial

Kardiomyozten gehören neben Skelettmuskelzellen und Neuronen zu den langlebigen post-mitotischen Zellen. Die Zellteilungsaktivität der Kardiomyozyten kommt schon kurz nach der Geburt zum Stillstand, so dass jegliche Größenzunahme des Myokards nur durch Hypertrophie der Kardiomyozyten erfolgen kann [Terman und Brunk 2004, Liew et al. 1983].

Ihre lange Lebensspanne unterscheidet Kardiomyozyten von anderen, kurzlebigen post-mitotischen Zellen wie z.B. differenzierten Epithelzellen. Auch diese Zellen teilen sich nicht mehr, werden aber konstant erneuert, so dass geschädigte Zellstrukturen nicht akkumulieren können [Terman und Brunk 2004].

Zwar ist mittlerweile belegt, dass auch Kardiomyozyten bis zu einem gewissen Grad durch Stammzellendifferenzierung ersetzt werden können, die Rate an ersetzten Zellen ist aber so niedrig, dass der Prozess der Zellalterung nicht verhindert werden kann [Terman und Brunk 2004, Anversa und Kajstura 1998].

Aufgrund ihrer langen Lebensspanne können in Kardiomyozyten also altersabhängige Veränderungen auftreten. Gut belegt sind in der Literatur z.B. altersbedingte Änderungen der Mitochondrien und eine altersbedingte Zunahme der Anzahl und Größe von Lysosomen, welche nach und nach mit nicht abbaubarem

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Material „aufgefüllt“ werden, dem sogenannten Lipofuszin oder Alterspigment [Terman et al. 2010, Terman und Brunk 2004, Brunk und Terman 2002].

Somit stellt sich das Myokard als ein einzigartiges „Modell“ dar, um altersabhängige Veränderungen zu untersuchen und wurde in der vorliegenden Arbeit als Untersuchungsmaterial ausgewählt. Erstmals wurden intravital gealterte, humane myokardiale Histone aus postmortal asservierten Proben isoliert: Bisher untersuchte Histone aus Myokard stammten aus Ratten, Kaninchen und Hühnern [Liew et al. 1983, Liew und Sole 1978, Beeson und Triplett 1967].

1.5. Zielsetzung

Vor diesem Hintergrund sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

Ist Razemisierung von Asparaginsäure (AAR) in myokardialen Histonen nachweisbar und ergibt sich möglicherweise eine positive Korrelation mit dem Alter?

Ist eine Deiminierung von Argininresten in myokardialen Histonen nachweisbar? Findet sich eine altersabhängige Zunahme der Deiminierung?

Zeigen pathologisch veränderte Herzgewebeproben ein auffälliges Muster der untersuchten Histonmodifikationen?

Zur Klärung dieser Fragen wurden Histone aus postmortal entnommenen Myokardproben aufgereinigt und das Ausmaß der Razemisierung ihrer Asparaginsäurereste sowie der Deiminierung ihrer Argininreste analysiert. Die Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung des Lebensalters der Individuen sowie dem jeweilig zugehörigen (histo)morphologischen Befund interpretiert.

2. Material und Methoden

Aus humanem Myokardgewebe wurden zunächst die Zellkerne isoliert und anschließend die Histone H1 und H2B aufgereinigt.

Mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*) wurden die posttranslationalen Modifikationen Razemisierung von Asx (AAR) und Deiminierung (Umwandlung von Arginin zu Citrullin) detektiert. Das Ausmaß der AAR wurde sowohl für die aufgereinigten Histone als auch nebenbefundlich im Gesamtkernprotein des Myokards bestimmt.

2.1. Untersuchungsmaterial

Bei der Autopsie von 25 humanen Individuen im Alter zwischen 10 und 85 Jahren wurden circa 10 x 2 cm (Gewicht ungefähr 10 Gramm) große Myokard-Proben aus Septum und / oder Hinterwand entnommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Für die Durchführung der Untersuchung lag eine Zustimmung der Ethikkommission vor (Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Studiennummer 2671).

Makroskopisch zeigte sich bei den verwendeten Proben kein Anhalt für pathologische Veränderungen (Hypertrophie, infarzierte Bereiche, Fibrose). Zur Verifizierung dieser Befunde erfolgte eine histologische Aufarbeitung aller Proben (vgl. 2.2.).

Leichen mit Fäulnisveränderungen sowie Brandleichen und bekanntermaßen infektiöse Leichen wurden nicht untersucht.

Abbildung 5 stellt die Arbeitsschritte schematisch dar:

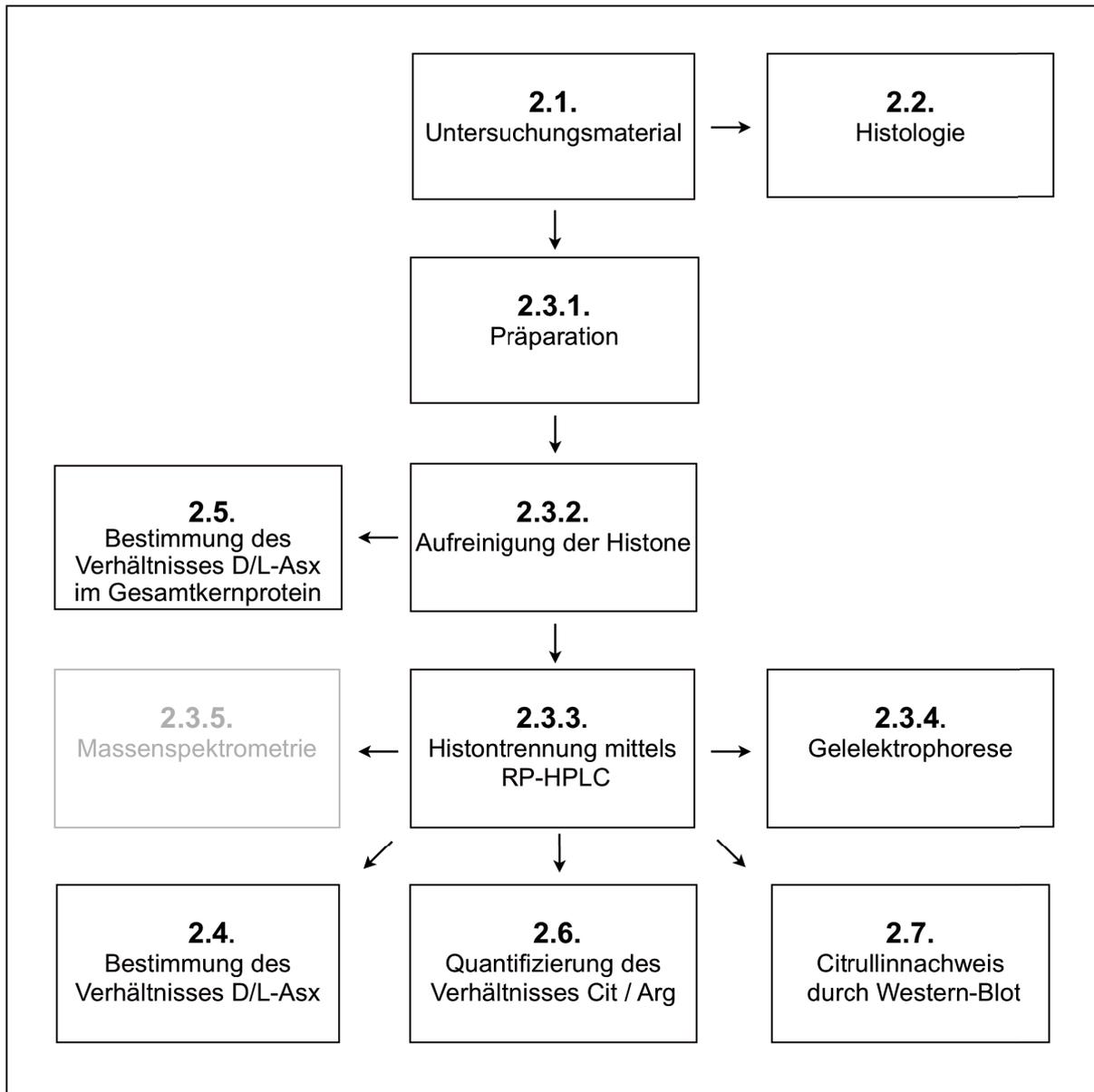


Abb. 5) Darstellung der Arbeitsschritte

2.2. Histologie

Aus myokardialem Septum und Hinterwand wurden für die histologische Untersuchung Gewebeproben mit einer Dicke von ca. 1 mm und einer Fläche von ca. 1 x 1 cm entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Im Anschluss daran wurden mit einem Schlittenmikrotom histologische Schnitte (ca. 10 – 20 μm) angefertigt.

Zur morphologischen Beurteilbarkeit der Myozyten und des Gesamtbefundes wurden die mikroskopischen Präparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Eine 5-Chromfärbung diente der Darstellung der bindegewebigen und elastischen Anteile; diese war eine modifizierte Kombination aus der Elastika-Färbung nach van Gieson (EvG) und der Resorcin-Fuchsin-Färbung nach Weigert.

Die Untersuchungen und die Dokumentation der histologischen Präparate wurden an einem Lichtmikroskop des Typs DM 2000 von Leica mit angeschlossenem Computer und Bildbearbeitungsprogramm (Leica IM500) durchgeführt.

2.3. Aufreinigung des Myokards

2.3.1. Präparation und Verarbeitung der Proben

Alle Lösungen, die im folgenden Protokoll für die Aufreinigung der Histone benötigt wurden, waren auf 4 °C gekühlt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge.

Die Herzgewebeproben wurden im noch tiefgefrorenem Zustand mit einem Skalpell in hauchdünne Scheiben geschnitten. Zur Entfernung des Hämoglobins (= Hämolyse) erfolgte die Zugabe von 5 Volumina einer 2%igen NaCl-Lösung (**a**) unter Zusatz von 0,1 mM Proteaseinhibitor (**d**) mit anschließender 20-minütiger Inkubation auf einem Schüttler im Kühlschrank. Es folgte ein weiterer 15-minütiger Hämolyse schritt (s.o.). Bereits makroskopisch zeigte sich der Erfolg der Hämolyse durch die beige-bräunliche Farbe der Myokardstücke nach der Hämolyse im Gegensatz zur tiefroten Färbung dieser vor der Behandlung. Versuche mit höherprozentigen NaCl-Lösungen (15%ig, 10%ig und 5%ig) führten zwar ebenfalls zu einer zufriedenstellenden Hämolyse, hatten jedoch einen Proteinverlust der einzelnen Fraktionen zur Folge. Mit einer 1%igen NaCl-Lösung wurde keine vollständige Hämolyse erreicht. Die 2%ige NaCl-Lösung erwies sich als ideal, um die Proben von Hämoglobin zu befreien und dennoch eine ausreichende Proteinintensität bei der Auftrennung auf der FPLC zu erreichen.

Die nachfolgende Aufarbeitung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Jackowski und Liew [1980]. Das Herzgewebe wurde unter Zusatz von 10 Volumina MA-Puffer (**b**) und 0,1 mM Proteaseinhibitor (**d**) mit einem Ultra-Turrax (Typ TP 18/10 Janke & Kunkel GmbH und Co. KG) für 5 - 6 Minuten homogenisiert. Zur Entfernung des restlichen Bindegewebes wurde das Homogenisat durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 300 μ m filtriert.

Die Proben wurden bei 1100 g in einer Zentrifuge von Hettich (Typ Rotina 420R) 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 Volumina MA-Puffer (**b**) plus 0,1 mM Proteaseinhibitor (**d**) resuspendiert. Mittels eines Dounce-Homogenisators wurden die Proben mit jeweils 6 - 7 Stößen eines Teflonpistills weiter homogenisiert. Anschließend wurde erneut bei 1100 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nach Zugabe von 10 Volumina MB-Puffer (**c**) plus 0,1 mM Proteaseinhibitor (**d**) auf das entstandene Pellet wurde wieder zentrifugiert (s.o.). Ein letzter Zentrifugationsschritt (s.o.) erfolgte nach der Zugabe von 10 Volumina eiskaltem Aqua bidest plus 0,1 mM Proteaseinhibitor (**d**).

2.3.2. Isolation der Histone

Dem Pellet wurde 10 ml einer 0,8 M Schwefelsäure (**e**) hinzugefügt [Panyim et al. 1971]. Die Proben wurden für 5 Stunden im Kühlschrank auf einem Schüttler inkubiert, um die Kerne zu lysieren.

Anschließend erfolgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 3000 g. Der Überstand, der nun die Histone enthielt, wurde in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zur Fällung der Histone mit 30 - 35 ml eiskaltem Aceton aufgefüllt. Etwa 1 mg des Kernpellets wurde bei -20 °C tiefgefroren und für die HPLC-Analytik des Gesamtkernproteins des Myokards verwendet. Die Fällung der Histone erfolgte über Nacht im Kühlschrank (4 °C).

Am nächsten Morgen wurde erneut 15 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Das entstandene Histonpellet wurde mit 5 ml eines Aceton-Ethanol-Gemischs (im Verhältnis 1:1) gewaschen und anschließend abzentrifugiert (s.o.). Mitunter konnten bei diesem Schritt mehrere Histonpellets einer Probe durch das Hinzugeben des Aceton-Ethanol-Gemisches gepoolt werden.

Das Histonpellet wurde in ein LoBind-Eppendorfgefäß überführt und anschließend über die RP-HPLC aufgetrennt.

2.3.3. Trennung der Histone mittels RP-HPLC

Das Histonpellet wurde in 600 μ l Eluent A (f) aufgenommen und anschließend für 10 Minuten auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert, um die darin enthaltenen Histone in Lösung zu bringen.

Anschließend wurde die Probe in einer Tischzentrifuge (Hettich, Mikro 200) bei 13.000 g (Raumtemperatur) abzentrifugiert. Dieser Schritt musste wiederholt werden, wenn das Pellet nach dem ersten Zentrifugationsschritt nicht ausreichend fest war. Der Überstand wurde vorsichtig - zur Vermeidung der Bildung von Luftbläschen - in eine Probenspritze aufgezogen und in die Probenschlaufe des Gerätes injiziert.

Die Auftrennung der Histone erfolgte nach Young [Young et al. 2001] mittels RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*) auf einer FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA Explorer 900 von Amersham Biosciences. Bei der Säule handelte es sich um folgendes Fabrikat: Jupiter 5 μ , C 18, 300 Å, 250 x 10,00 mm der Firma Phenomenex®.

Zu Beginn der Methode wurden die Eluenten A (f) und B (g) in einem Mischverhältnis von 42 % Eluent B gestartet. In den nachfolgenden 128 Minuten stieg die Konzentration linear bis 84 % Eluent B an. Bei jeweils bestimmten Konzentrationen des Laufmittels eluierten die Histonsubtypen H1 und H2B von der Säule.

Die Detektion erfolgte mittels einer UV-Lampe (UV-900, Amersham Biosciences 900 Series) bei einer Wellenlänge von 214 nm, die Signalstärke wurde in mAU angegeben.

Mithilfe eines Fraktionierers (Frac-920, Amersham Biosciences 900 Series) wurde das Eluat in Fraktionen zu je 500 μ l in 15 ml Greiner-Röhrchen aufgefangen, anschließend in LoBind-Eppendorfgefäße aliquotiert und über Nacht vakuumgetrocknet. Sofern eine Trocknung der Proben nicht unmittelbar möglich war, konnten diese bei -80 °C zwischengelagert werden.

Die getrockneten Aliquots (Lagerung bei -20 °C) standen für die nachfolgenden Untersuchungen (Gelelektrophorese, HPLC-Analytik) zur Verfügung. Aufgrund einer

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

zu geringen Proteinkonzentration der Histone einzelner Individuen konnten nicht immer beide HPLC-Quantifizierungen (Deiminierung und Razemisierung) durchgeführt werden. Die Auswahl deckte für beide posttranslationalen Modifikationen ein möglichst breites Altersspektrum ab.

2.3.4. Überprüfung der Histonreinheit mittels Gelelektrophorese

Die getrockneten Aliquots wurden in 50 μ l Aqua bidest gelöst und entsprechend ihrer Proteinintensität mit Probenpuffer (für den Gebrauch, **n**) vermischt, kurz gevortext und für 3 Minuten bei 13.000 g (Raumtemperatur) zentrifugiert. Die nachfolgende Denaturierung fand bei 95 °C für 3 Minuten statt. Im Anschluss daran wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis gelagert um die Denaturierung zu stoppen.

Das Auftragen der Proben erfolgte auf ein SDS-Page-Gel (*SDS = Sodium Dodecyl Sulfate*) mit 16%igem Trenngel und 5%igem Sammelgel (Pipetierschema **h-I**) in einer Elektrophoresekammer von BIO-RAD (Model No. Mini-PROTEAN® 3 Cell), gefüllt mit 1fach konzentriertem Laufpuffer (**p**). Mit jedem Lauf wurde ein Molekulargewichtsmarker (SigmaMarker™ Low range, M.W. 6,500 - 66,000) sowie ein Histonmix – bestehend aus allen fünf Subtypen – aus Kalbsthymus (Roche, 10 223 565 001) mitgeführt, um die Zuordnung der Proteinbanden zu den einzelnen Histonsubtypen zu erleichtern.

Die Elektrophorese startete bei 220 V, 60 mA und 9 Watt und lief circa 50 Minuten. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel für 25 Minuten in Coomassie-Lösung (**q**) gefärbt, anschließend mit einer Lösung nach Schägger und von Jagow [1987] (**r**) entfärbt und zur Dokumentation fotografiert.

2.3.5. Massenspektrometrische Kontrolle der Reinheit der Histone

Zur Vorbereitung der FPLC-Histon-Aliquots für die Massenspektrometrie wurde ein tryptischer Lösungsverdau durchgeführt.

Das im LoBind-Eppendorfgefäß getrocknete Proteinaliquot wurde in 237,5 μ l Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (**s**) aufgenommen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend wurde 12,5 μ l einer Trypsinlösung (**t**) hinzu pipettiert und die Protein-Trypsin-Probe für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Verhältnis von Trypsin zu Protein sollte im Verhältnis 1:20 stehen. Zum Schluss wurde der Lösungsverdau für 10 Minuten bei 95 °C inaktiviert und die Probe unter Vakuum eingetrocknet. Die massenspektrometrischen Messungen wurden exemplarisch im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

2.4. Bestimmung des Verhältnisses D/L-Asx (Razemisierung) in Histon H1 und H2B

2.4.1. Hydrolyse der Histone

Für die Ermittlung des Razemisierungsgrades von Asx (als D/L-Asx) in den Histonen H1 und H2B wurden die FPLC-Aliquots der Histone in 1 ml einer 6 N Salzsäure (**u**) gelöst, in säuresaubere Pyrexröhrchen überführt und anschließend für 6 Stunden im Heizblock bei 100 °C hydrolysiert. Im Anschluss wurde die überschüssige Flüssigkeit unter Vakuum abgezogen. Die Hydrolysate wurden bei -20 °C gelagert.

2.4.2. Analytik

Die Bestimmung des Razemisierungsgrades von Asx als D/L-Asx erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*) nach der Methode von Kaufmann und Manley [1998], modifiziert nach Dobberstein et al. [2009], auf einem HPLC-Gerät (Agilent 1100 Series) bestehend aus einem Vakuumentgaser, einer quaternären Pumpe, einem programmierbarem Probengeber, einem Säulen-Thermostat sowie einem programmierbaren Fluoreszenzdetektor (FLD).

Die Histon-Hydrolysate wurden entsprechend ihrer Intensität (in mAU) in Probenpuffer plus L-Homo-Arginin (**v**) aufgenommen und 40 µl des Gemisches in für die HPLC-Analytik vorgesehenen Probengefäße überführt.

Die Kernpellet-Hydrolysate wurden in 1 ml Probenpuffer (plus L-Homo-Arginin, **v**) aufgenommen und anschließend um den Faktor 40 – 50 mit Probenpuffer verdünnt. Die Probengefäße wurden auf zuvor festgelegten Positionen des Probentabletts positioniert.

Als stationäre Phase wurde eine C18-Säule (Typ BDS HYPERSIL C18, 250 x 3 mm, Partikelgröße 5 µm, Thermo Scientific) verwendet. Über die Dauer von 115 Minuten fand bei einer konstanten Flussrate von 0,56 ml / min und 25 °C unter der

Verwendung eines binären Gradienten aus Eluent A (**w**) und Eluent B (**x**) die Detektion der Aminosäurenderivate bei $\lambda = 445$ nm statt. Die Anregungswellenlänge des Fluoreszenz-detektors lag bei $\lambda = 230$ nm. Identifiziert wurden die Signale anhand der Retentions-zeiten der Standardreinsubstanzen in externen Standards.

Die Quantifizierung der Razemisierung erfolgte nach Integration der Flächen unter den D- und L-Signalen mit Hilfe der Analysesoftware „HPChemStation“. Die Fläche des L-Enantiomers wurde als interner Standard (= 100 %) definiert und zur Fläche der D-Asx ins Verhältnis gesetzt. Jede Probe wurde doppelt analysiert und anschließend das arithmetische Mittel der Messwerte bestimmt.

2.5. Bestimmung des Verhältnisses D/L-Asx (Razemisierung) im Gesamtkernprotein

2.5.1. Hydrolyse des Gesamtkernproteins

Für die Ermittlung des Razemisierungsgrades von Asx (als D/L-Asx) im Gesamtkernprotein des Myokards wurden die Aliquots des Gesamtkernproteins unter Zugabe von 1 ml 6 N Salzsäure (**u**) in säuresaubere Pyrexröhrchen überführt, für 6 Stunden bei 100 °C im Heizblock hydrolysiert und im Anschluss daran unter Vakuum eingetrocknet und bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.2. Analytik

Die Proben wurden in 1 ml Probenpuffer (plus L-Homo-Arginin, **v**) aufgenommen und anschließend um den Faktor 40 – 50 mit Probenpuffer verdünnt.

Die Analyse des Razemisierungsgrades erfolgte wie oben dargestellt (vgl. 2.4.2.) nach der Methode von Kaufmann und Manley [1998], modifiziert nach Dobberstein et al. [2009].

2.6. Quantifizierung des Citrullingehaltes der Histone

2.6.1. Hydrolyse der Histone

Zur Bestimmung des Citrullingehaltes der Histone wurden die FPLC-Aliquots der Histone in 1 ml einer 6 N Salzsäure (**u**) gelöst, in säuresaubere Pyrexröhrchen überführt und anschließend für 24 Stunden im Heizblock bei 110 °C hydrolysiert. Im Anschluss daran wurden die Proben vakuumgetrocknet und bei -20 °C gelagert.

2.6.2. Analytik

Die Hydrolysate wurden entsprechend ihrer Intensität (in mAU) in Probenpuffer ohne L-Homo-Arginin (**v**) aufgenommen und 40 μ l des Gemisches in für die HPLC-Analytik vorgesehenen Probengefäße überführt. Die Probengefäße wurden auf zuvor festgelegten Positionen des Probenplateaus positioniert.

Die Bestimmung der einzelnen Aminosäuren erfolgte auf dem HPLC-Gerät der Firma Agilent (1100 Series) nach einer Methode modifiziert nach Heems et al. [1998].

Die Vorsäulenderivatisierung erfolgte für die primären Aminosäuren mit OPA-Reagenz (ortho-Phthaldialdehyd und 3-Mercaptopropionsäure in Borat-Puffer, Agilent Technologies) und für die sekundären Aminosäuren mit 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC, Agilent Technologies).

Die stationäre Phase war eine C18-Säule der Firma Thermo Scientific (Typ BDS HYPERSIL C18, 150 x 4,6 mm, Partikelgröße 3 μ m). Als mobile Phase diente ein binärer Gradient aus Eluent A (**y**) und Eluent B (**z**), welcher bei einer konstanten Flussrate von 1 ml / min bei 40 °C über die Dauer von 70 Minuten zur Elution der Aminosäuren führte.

Für die OPA-Derivate wurde der Fluoreszenzdetektor auf eine Anregungswellenlänge von $\lambda = 335$ nm und die Detektionswellenlänge von $\lambda = 440$ nm eingestellt. Nach 35 bis 38 Minuten schaltete der Detektor für die Analyse der FMOC-Derivate auf die

Anregungswellenlänge von $\lambda = 266$ nm und die Detektionswellenlänge von $\lambda = 305$ nm um. Identifiziert wurden die Signale anhand der Retentionszeiten der Standardreinsubstanzen in externen Standards. Die Derivatisierung der Probe erfolgte in der Probenkapillare des automatischen Probengebers unmittelbar vor der Analyse.

Die Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte nach Integration der Fläche unter dem zu analysierenden Signal mittels der Analysesoftware "HPChemStation". Zur Ermittlung des Gehalts an Citrullin wurde die Fläche unter dem Citrullinsignal sowie die Fläche unter dem Argininsignal bestimmt. Die dem Arginin zugeordnete Fläche wurde als interner Standard (= 100%) definiert und zur Fläche des Citrullins ins Verhältnis gesetzt. Für jede Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und anschließend das arithmetische Mittel bestimmt.

2.7. Western-Blot zum Nachweis der Deiminierung in Histonen

Die für den Citrullinnachweis unter Vakuum eingetrockneten FPLC-Aliquots wurden wie unter Punkt 2.3.4. beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Auf dem Gel wurden ein Molekulargewichtsmarker (SigmaMarker™ Low range, M.W. 6,500 - 66,000 kDa), ein vorgefärbter Marker (Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, M.W. 1,7 – 40 kDa von Fermentas), ein Histonstandard – bestehend aus allen fünf Subtypen – aus Kalbsthymus (Roche, 10 223 565 001) sowie eine Positivkontrolle (Carboanhydrase aus bovinen Erythrozyten, Sigma) mitgeführt.

Vor dem Blotten wurde das Gel in Transferpuffer (**a**₁) überführt und unter Schwenken für 10 Minuten äquilibriert. Die PVDF-Membran (Porengröße 0,2 µm) wurde vor Blotbeginn für eine Minute in Methanol geschwenkt und anschließend für 2 Minuten in Transferpuffer (**a**₁) äquilibriert. Die Membran, das Gel sowie die in Transferpuffer getränkten Filter und Schwammtücher wurden unter Vermeidung von Luftbläschen in eine Transferkassette eingespannt.

Der Tank des BIO-RAD-Systems (Model No. Mini-PROTEAN 3 Cell) wurde mit 4 °C kaltem Transferpuffer (**a**₁) befüllt und die Transferkassette in der dafür vorgesehenen Einhängenvorrichtung angebracht. Geblottet wurde sowohl für H2B als auch für H1 insgesamt 4 Stunden bei 250 mA und 200 V. Alle nachfolgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einem Schüttler.

Nach Beendigung des Blottens wurde die Membran 3 x 5 Minuten in 1 x PBS (**b**₁) gewaschen, das Gel zur Kontrolle des Proteintransfers mit Coomassie-Lösung (**q**) gefärbt und mit einer Lösung nach Schägger und von Jagow [1987] (**r**) entfärbt. Das Blockieren der Membran erfolgte für eine Stunde im Wärmeschrank bei 37 °C mit 5 % BSA (**c**₁). Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran 3 x 5 Minuten mit 1 x PBST (**d**₁) bei 37 °C gewaschen. Für die Primär-Antikörperbindung wurden ein polyklonaler Anti-Citrullin-

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Antikörper (AB5612 aus Kaninchen, Millipore) und 0,5 %iges BSA (**e**₁) im Verhältnis 1:1500 gemischt und mit der Membran für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Danach wurde die Membran für 3 x 5 Minuten mit 1 x PBS (**b**₁) bei 37 °C gewaschen. Für die Sekundär-Antikörperbindung wurden ein polyklonaler Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (AP 132P aus Ziege, Millipore) und 0,5%iges BSA (**e**₁) im Verhältnis 1:2000 gemischt und unter den obigen Bedingungen für weitere 2 Stunden inkubiert. Daraufgehend wurde die Membran für 3 x 5 Minuten in 1 x PBST (**d**₁) bei 37 °C gewaschen. Die Detektion der Immunreaktion erfolgte mit ECI (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate von Thermo Scientific) für eine Minute. Das Ergebnis der Immunreaktion wurde mittels eines Imagers (FujiFilm LAS-3000) fotografisch dokumentiert.

Zur exakten Bandenidentifizierung und Kontrolle der Blotting-Bedingungen wurde die Membran 3 x 5 Minuten mit PBST (**d**₁) bei 37 °C gewaschen, anschließend für 20 Minuten in Amidoschwarz (**f**₁) proteingefärbt, danach entfärbt (**g**₁) und fotografiert (s.o.).

2.8. Eingesetzte Lösungen

2.8.1. Histonisolation

- (a) 2%ige Natriumchloridlösung (1 L):
Natriumchlorid (NaCl): 10 g ad 1000 ml Aqua bidest
- (b) MA-Puffer n. Jackowski & Liew [1980] (1 L):
Saccharose (C₁₂H₂₂O₁₁): 85,575 g (0,25 M), Tris-HCl (C₄H₁₁NO₃): 1,576 g (10 mM), Magnesiumchlorid (MgCl₂): 0,321 g (3 mM), ad 1000 ml Aqua bidest
- (c) MB-Puffer n. Jackowski & Liew [1980] (1 L):
Triton X-100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n): 1 ml (0,1 %) ad 1000 ml MA-Buffer (s.o.)
- (d) Proteaseinhibitor (Stocklösung 100 mM) (50 ml):
Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF, C₇H₇FO₂S): 0,871 g ad 50 ml Ethanol abs. (C₂H₆O)
- (e) Schwefelsäure 0,8 M (575 ml):
Aqua bidest: 550 ml, Schwefelsäure (H₂SO₄): 25 ml

2.8.2. FPLC

- (f) Eluent A (1 L):
Wasser HPLC-grade: 1000 ml, Trifluoressigsäure (TFA, C₂HF₃O₂): 4 ml
15 Minuten Entgasung im Ultraschallbad
- (g) Eluent B (1 L):
Acetonitril (C₂H₃N): 840 ml, Wasser HPLC-grade: 160 ml, Trifluoressigsäure (TFA, C₂HF₃O₂): 4 ml
15 Minuten Entgasung im Ultraschallbad

2.8.3. Gelelektrophorese

(h) Acrylamid A (100 ml):

Acrylamid (C_3H_5NO): 29,2 g, N'N'-bis-methylenacrylamid ($C_7H_{10}N_2O_2$): 0,8 g, ad 100 ml Aqua bidest

(i) Trenngelpuffer (Tris-HCl 1,5 M), pH 8,8 (450 ml):

Tris-Base ($C_4H_{11}NO_3$): 27,23 g in 240 ml Aqua bidest lösen, mit 6 N HCl auf pH 8,8 einstellen, ad 450 ml Aqua bidest

(j) Sammelgelpuffer (Tris-HCl 0,5 M), pH 6,8 (200 ml):

Tris-Base ($C_4H_{11}NO_3$): 12 g in 100 ml Aqua bidest lösen, mit 6 N HCl auf pH 6,8 einstellen, ad 200 ml Aqua bidest

(k) SDS 10 % (100 ml):

Natriumdodecylsulfat (SDS, $C_{12}H_{25}NaO_4S$): 10 g ad 100 ml Aqua bidest

(l) APS (10%) (1 ml):

Ammoniumperoxidsulfat (APS, $H_8N_2O_8S_2$): 0,1 g ad 1 ml Aqua bidest

(h - l) Pipettierschema für SDS-Page-Gel:

	16 % Trenngel	5 % Sammelgel
Acrylamid A	2,65 ml	425 μ l
Trenngelpuffer	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer	-	625 μ l
10 % SDS	50 μ l	25 μ l
Aqua bidest	1,05 ml	1,425 ml

Nach Zugabe der folgenden Substanzen beginnt die Polymerisation:

10 % APS	25 μ l	12,5 μ l
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	2,5 μ l	2,5 μ l

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

- (m) Probenpuffer-Ansatz (9,5 ml):
Aqua bidest: 3,55 ml, Tris-HCl ($C_4H_{11}NO_3$): 0,5 M: 1,25 ml (pH 6,8), Glycerol ($C_3H_8O_3$): 2,5 ml, SDS 10 % (s.o.): 2,0 ml, Bromphenolblau ($C_{19}H_9Br_4NaO_5S$) 0,5 %: 0,2 ml
- (n) Probenpuffer (für den Gebrauch) (1 ml):
Probenpuffer-Ansatz (s.o.): 950 μ l, β -Mercaptoethanol (C_2H_6OS): 50 μ l
- (o) Laufpuffer-Konzentrat (10 x), pH 8,3 (1 L):
Tris-Base ($C_4H_{11}NO_3$): 30,3 g, Glycin ($C_2H_5NO_2$): 144 g, Natriumdodecylsulfat (SDS, $C_{12}H_{25}NaO_4S$): 10 g, ad 1000 ml Aqua bidest
mit pH-Streifen kontrollieren, nicht mit Säure oder Lauge einstellen!
- (p) Laufpuffer zum Gebrauch (1 x) (1 L):
Laufpuffer-Konzentrat (s.o.): 100 ml ad 1000 ml Aqua bidest
- (q) Coomassie-Färbelösung (1 L):
Coomassie ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$): 2,5 g, Methanol (CH_4O): 500 ml, Essigsäure ($C_2H_4O_2$): 150 ml, ad 1000 ml Aqua bidest
im Anschluss Filtration
- (r) Entfärber nach Schägger und von Jagow [1987] (2 L):
Isopropanol (C_3H_8O): 500 ml, Essigsäure ($C_2H_4O_2$): 140 ml, ad 2000 ml Aqua bidest

2.8.4. Vorbereitung für die Massenspektrometrie

- (s) Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (50 ml)
Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3): 0,098825 g (25 mM) ad 50 ml Aqua bidest

(t) Trypsinlösung (zum Verdau) (200 µl):

Trypsin (Proteomics Grade, Sigma-Aldrich): 20 µg in 200 µl Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (s.o.) lösen; Konzentration = 0,1 µg / µl

2.8.5. HPLC

Alle nachfolgenden Substanzen haben die höchstmögliche Reinheitsstufe (HPLC-grade).

(u) 6 N Salzsäure (HCl) (1 L):

Aqua bidest: 500 ml, Salzsäure (HCl): 500 ml

(v) Probenpuffer (200 ml):

0,1 M Salzsäure (HCl): 100 ml, Natriumazid (NaN₃): 9,75 mg

für Razemisierung L-Homo-Arginin: 0,03 mM

für Deiminierung ohne L-Homo-Arginin

ad 100 ml Aqua bidest

(w) Eluent A für Razemisierung nach Kaufmann & Manley [1998] (pH 6,0) (2 L):

Natriumacetat (C₂H₃NaO₂): 3,773 g, Natriumazid (NaN₃): 0,195 g, Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA, C₁₀H₁₆N₂O₈): 0,750 g, ad 2000 ml Aqua bidest mit 10%iger Essigsäure (C₂H₄O₂) auf pH 6,0 - 6,01 einstellen

(x) Eluent B für Razemisierung nach Kaufmann & Manley [1998] (1,08 L):

Methanol (CH₄O): 1000 ml, Acetonitril (C₂H₃N): 83,4 ml

Cave: Volumenkontraktion

(y) Eluent A für Deiminierung nach Heems et al. [1998], pH 6,0 (2 L):

Natriumacetat (C₂H₃NaO₂): 3,773 g, Natriumazid (NaN₃): 0,195 g, Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA, C₁₀H₁₆N₂O₈): 0,750 g, ad 2000 ml Aqua bidest mit 10%iger Essigsäure (C₂H₄O₂) auf pH 6,0 - 6,01 einstellen

(z) Eluent B für Deiminierung nach Heems et al. [1998] (1,08 L):

Methanol (CH₄O): 1000 ml, Acetonitril (C₂H₃N): 83,4 ml

Cave: Volumenkontraktion

2.8.6. Western Blot

(a₁) Transferpuffer, pH 8,2 – 8,3 (2L):

Tris-Base (C₄H₁₁NO₃): 11,64 g (48 mM), Glycin (C₂H₅NO₂): 58 g (386 mM),

Natrimdodecylsulfat (SDS, C₁₂H₂₅NaO₄S) = 0,1 %: 20 ml 10 % SDS (s.o.),

Methanol (CH₄O): 400 ml (20 %), ad 2000 ml Aqua bidest

mit pH-Streifen kontrollieren, nicht mit Säure oder Lauge einstellen!

(b₁) PBS (10 x), pH 7,2 – 7,4 (1L):

Natriumchlorid (NaCl): 80 g (1,37 M), Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄):

11,5 g (81 mM), Kaliumchlorid (KCl): 2 g (27 mM), Kaliumdihydrogenphosphat

(KH₂PO₄): 2 g (14,7 mM), ad 1000 ml Aqua bidest

vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 verdünnen = 1 x PBS

(c₁) Blockierlösung 5 % BSA (für einen Blot):

BSA (Bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich): 1,25 g in 25 ml 1 x PBS (s.o.)

(d₁) PBST = PBS-Tween (1L):

PBS-Tween: 1 ml (0,1%) in 1000 ml 1 x PBS (s.o.) lösen

(e₁) BSA für Antikörperreaktionen (für einen Blot):

BSA (Bovines Serumalbumin, Sigma Aldrich): 0,125 g in 25 ml 1 x PBS (s.o.)

(f₁) Amidoschwarz Färbelösung (200 ml):

Amidoschwarz 10 B (C₂₂H₁₄N₆Na₂O₉S₂): 0,2 g (0,1 %), Methanol (CH₄O): 90

ml (45 %), Essigsäure (C₂H₄O₂): 14 ml (7 %), Aqua bidest: 96 ml

(g₁) Amidoschwarz-Entfärber (1L):

Methanol (CH₄O): 700 ml (70 %), Essigsäure (C₂H₄O₂): 21 ml (7 %), Aqua
bidest: 279 ml

3. Ergebnisse

3.1. Histologische Untersuchung

Bei der Untersuchung der histologischen Präparate zeigten die Koronargefäße von 13 Individuen eine leichte bis ausgeprägte Koronararteriosklerose. Ferner fanden sich bei sieben Individuen Zeichen einer Hypertrophie der Kardiomyozyten und bei neun Individuen perinukleäre Lipofuszinablagerungen.

Insgesamt wiesen drei der untersuchten Individuen infarzierte Myokardbereiche auf (37, 40 und 62 Jahre). In allen drei Fällen handelte es sich um alte Infarkte.

Koronararteriosklerose, Hypertrophie und Lipofuszinablagerungen hatten keinen Einfluss auf die erhobenen Daten. Befunde, die an Proben mit Infarkt Narben erhoben wurden, zeigten erhöhte Citrullinierungswerte (vgl. 4.4.).

3.2. Ergebnis der Aufreinigung der Histone

3.2.1. Auftrennung der Histonsubtypen mittels RP-HPLC

Abbildung 6 zeigt das typische Elutionsprofil der myokardialen Histone in der RP-HPLC in Relation zum Elutionsprofil eines Standards.

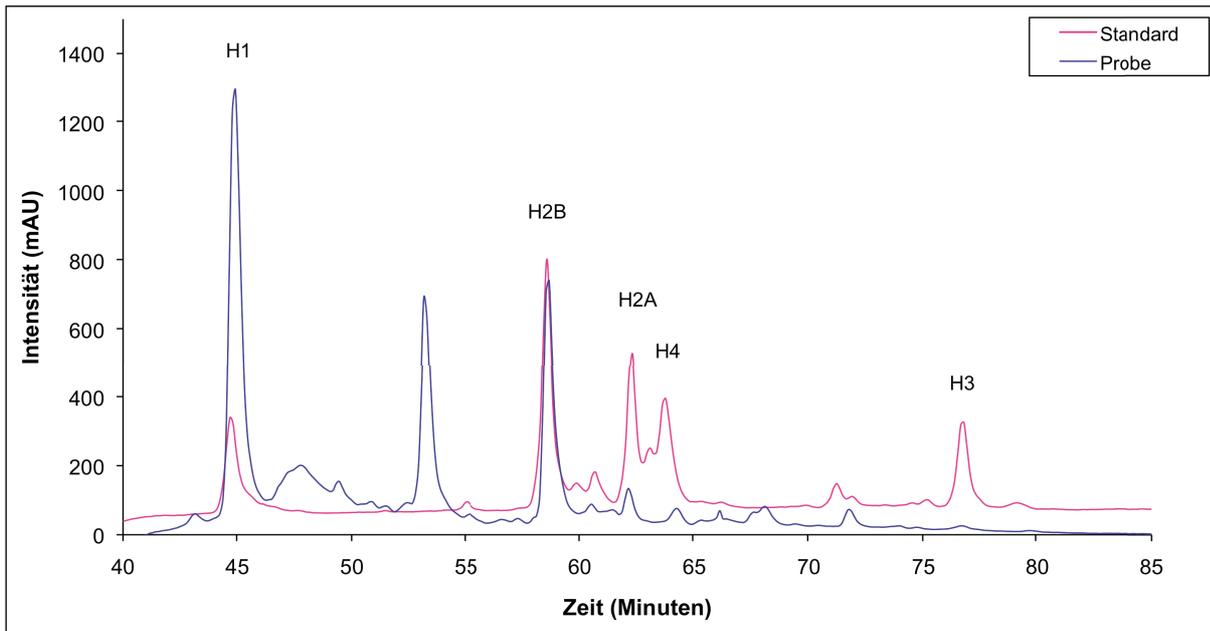


Abb. 6) Typisches Elutionsprofil myokardialer Histone (blau) im Vergleich zum Elutionsprofil eines bovinen Histonstandards (rosa).

Die gelelektrophoretische Untersuchung der eluierten Fraktionen ermöglichte eine Zuordnung der Histonsubtypen zu den Peaks (vgl. Abb. 7).

Das Signal bei 45 Minuten konnte immer als reine H1-Fraktion identifiziert werden. Das bei 53 Minuten eluierende Protein konnte keinem der fünf verschiedenen Histonsubtypen zugeordnet werden und wurde daher als „Fremdprotein“ bezeichnet. Das Signal bei 58 Minuten konnte in der Gelelektrophorese als reine H2B-Fraktion beschrieben werden.

Das Elutionsmuster der myokardialen Histonen war altersunabhängig. Lediglich die Intensität der Signale variierte, wobei die Intensität des H2B-Signals einer deutlich größeren Variationsbreite unterlag als die Intensität des H1-Signals. Bei zu geringer

Intensität des H2B-Signals konnte das Protein nicht für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Mit der verwendeten Aufreinigungsmethode konnten nur die Subtypen H1 und H2B in ausreichendem Maße gewonnen werden.

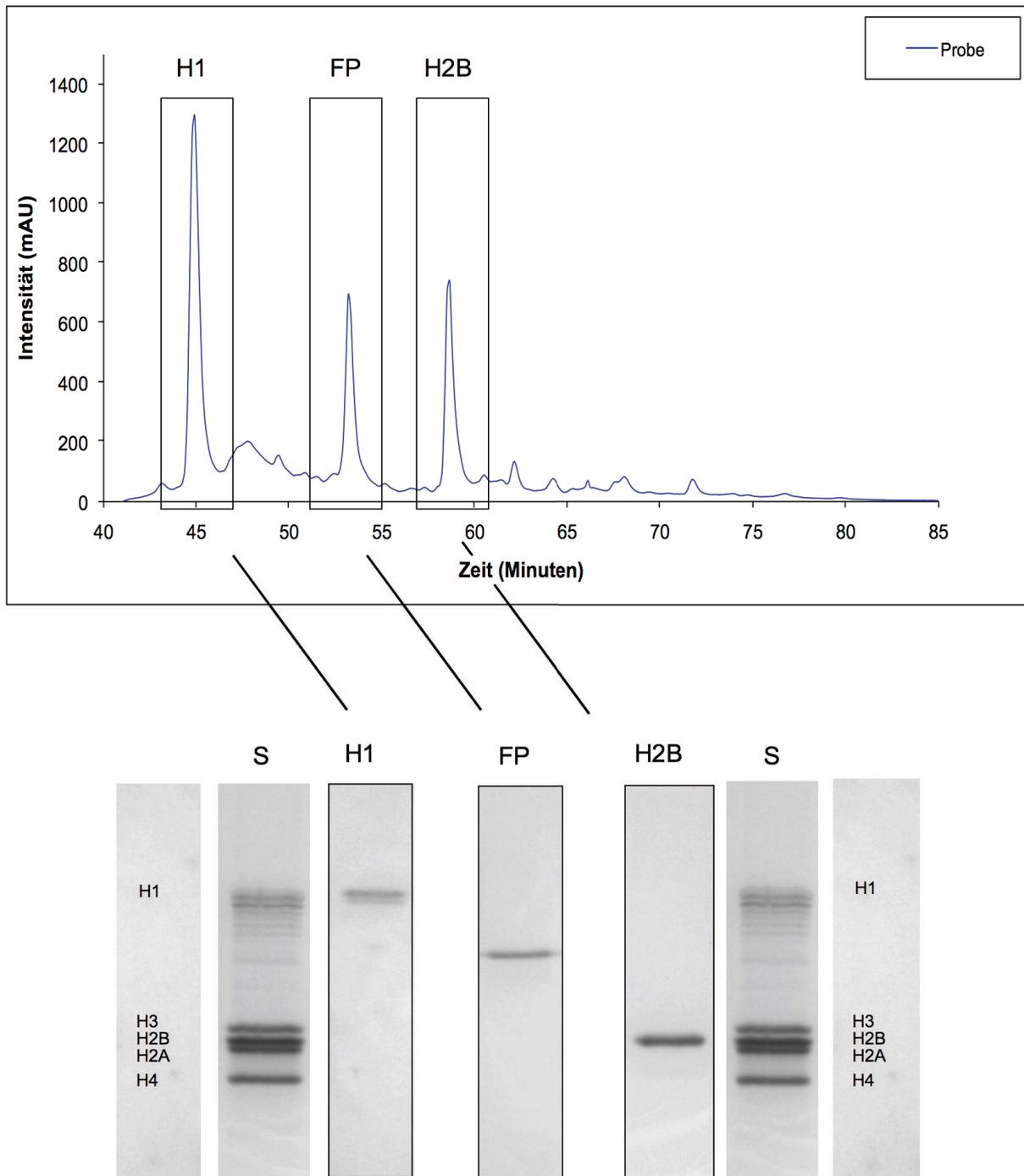


Abb. 7) Lokalisation der Elution von Histonsubtypen in der RP-HPLC durch elektrophoretische Auftrennung der eluierenden Proteine. S = Standard, FP = Fremdprotein.

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

3.2.2. Überprüfung der Reinheit mittels Massenspektrometrie

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung der H1-Histone nach dem tryptischen Verdau (vgl. 2.3.5.). Die Signale konnten eindeutig H1 zugeordnet werden, es lagen keine Verunreinigungen vor.

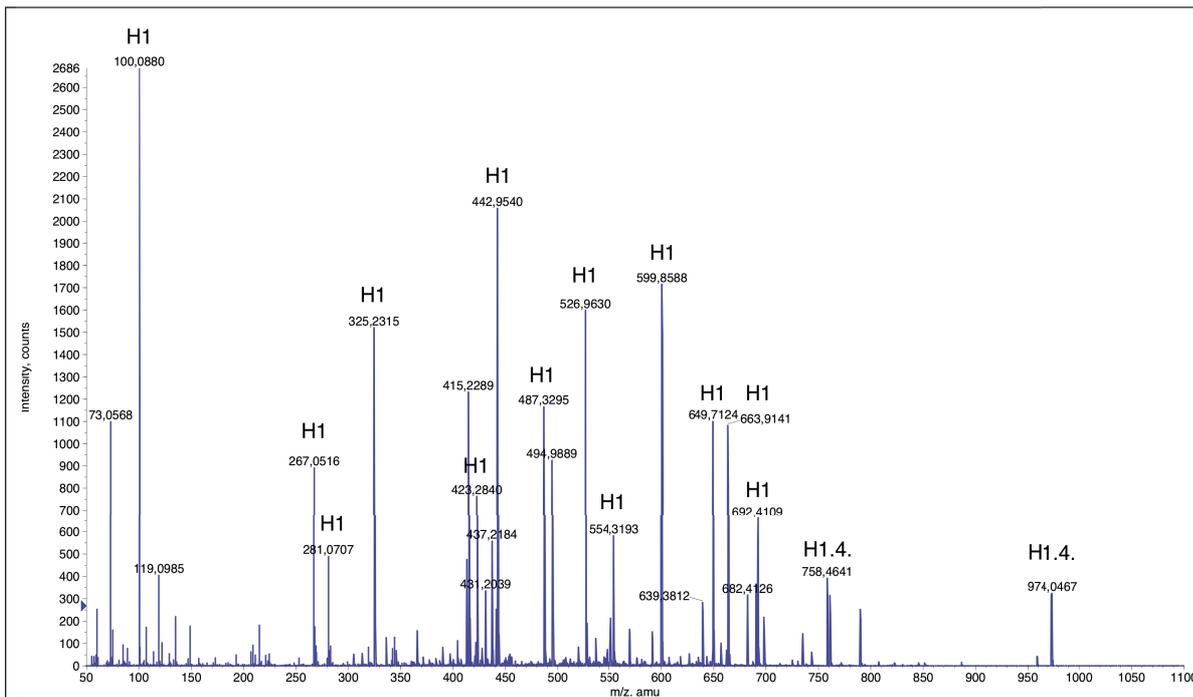


Abb. 8) Übersichtsspektrum einer sauberen H1-Fraktion in der Massenspektrometrie.

Hingegen zeigte sich bei den H2B-Fractionen zunächst eine massive Verunreinigung aller Proben durch Hämoglobin (vgl. Abb. 9).

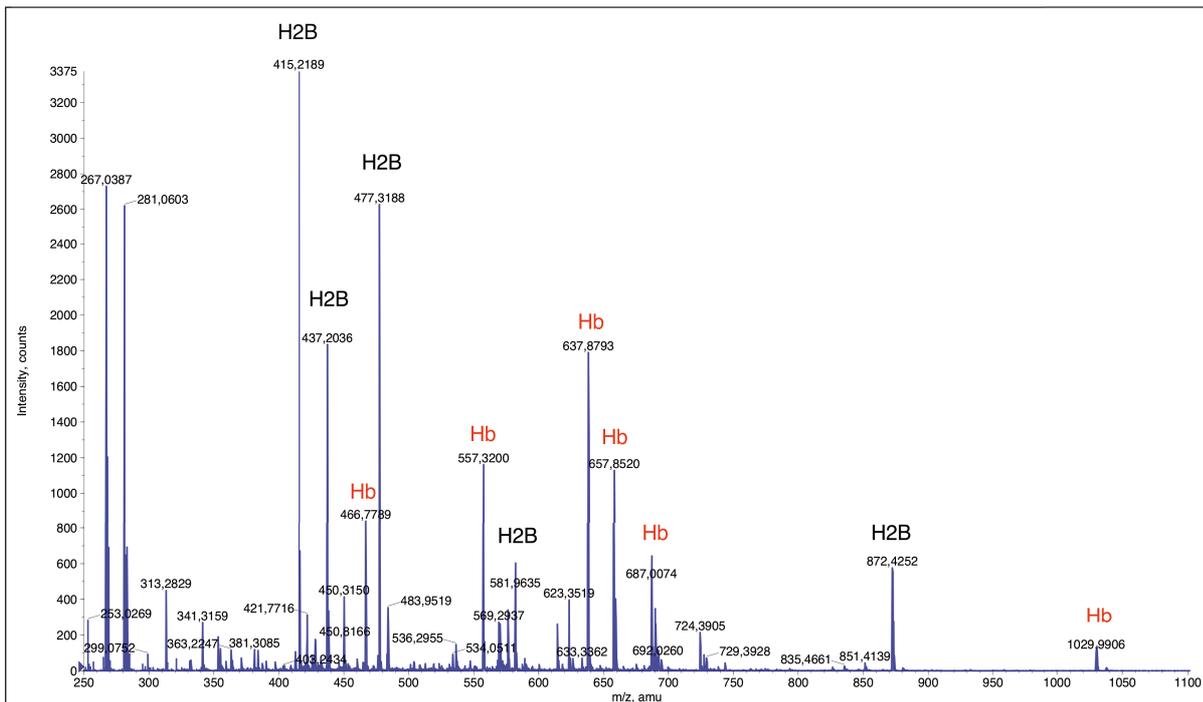


Abb. 9) Übersichtsspektrum einer mit Hämoglobin (= Hb) verunreinigten H2B-Fraktion in der Massenspektrometrie.

Korrelierend dazu befanden sich in der Gelelektrophorese neben der spezifischen Bande für H2B bei ~17 kDa noch weitere Banden bei ~15 kDa und ~29 kDa. Im Vergleich mit einem bovinen Hämoglobin-Standard zeigte sich, dass diese Banden auf die Verunreinigung mit Hämoglobin zurückzuführen waren (vgl. Abb. 11).

Zur Bestätigung der Effektivität der vor der Homogenisation durchgeführten Hämolyse (vgl. 2.3.1.) wurde Histon H2B erneut massenspektrometrisch untersucht. Hierbei war keine Verunreinigung durch Hämoglobin mehr zu finden (vgl. Abb. 10).

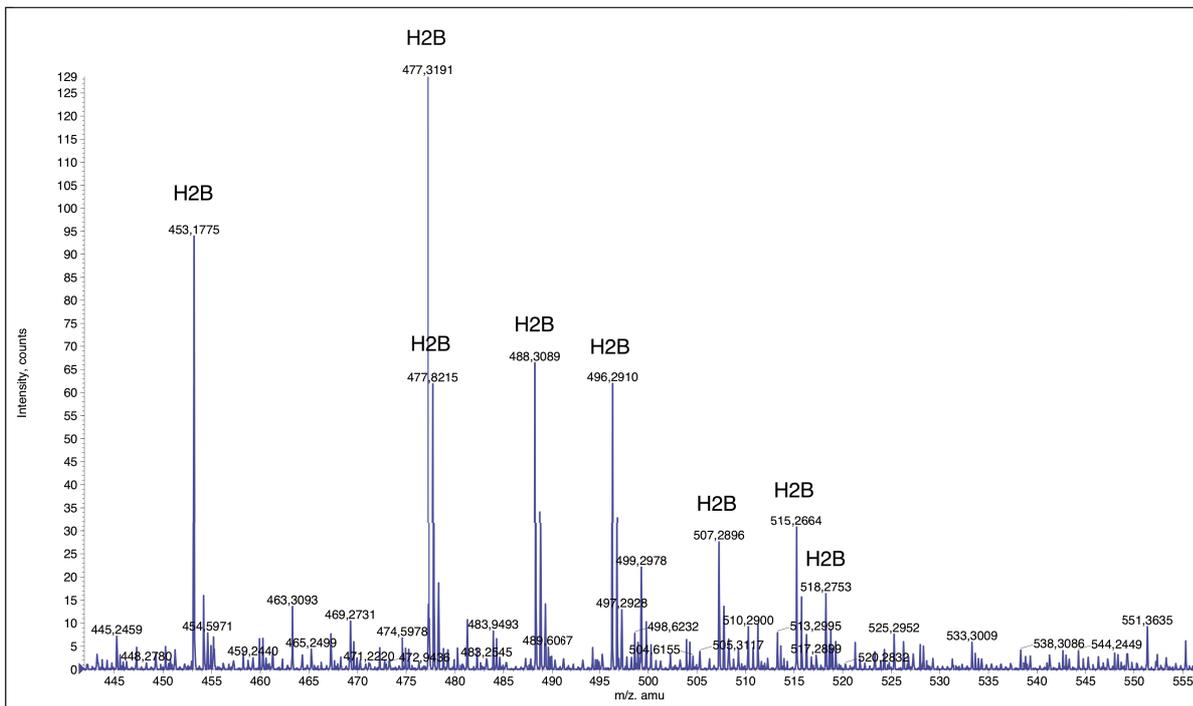


Abb. 10) Übersichtsspektrum einer sauberen H2B-Fraktion in der Massenspektrometrie.

Entsprechend dazu zeigte sich jetzt in der Gelelektrophorese eine singuläre Bande bei ~17 kDa, welche spezifisch für Histon H2B ist (vgl. Abb. 11).

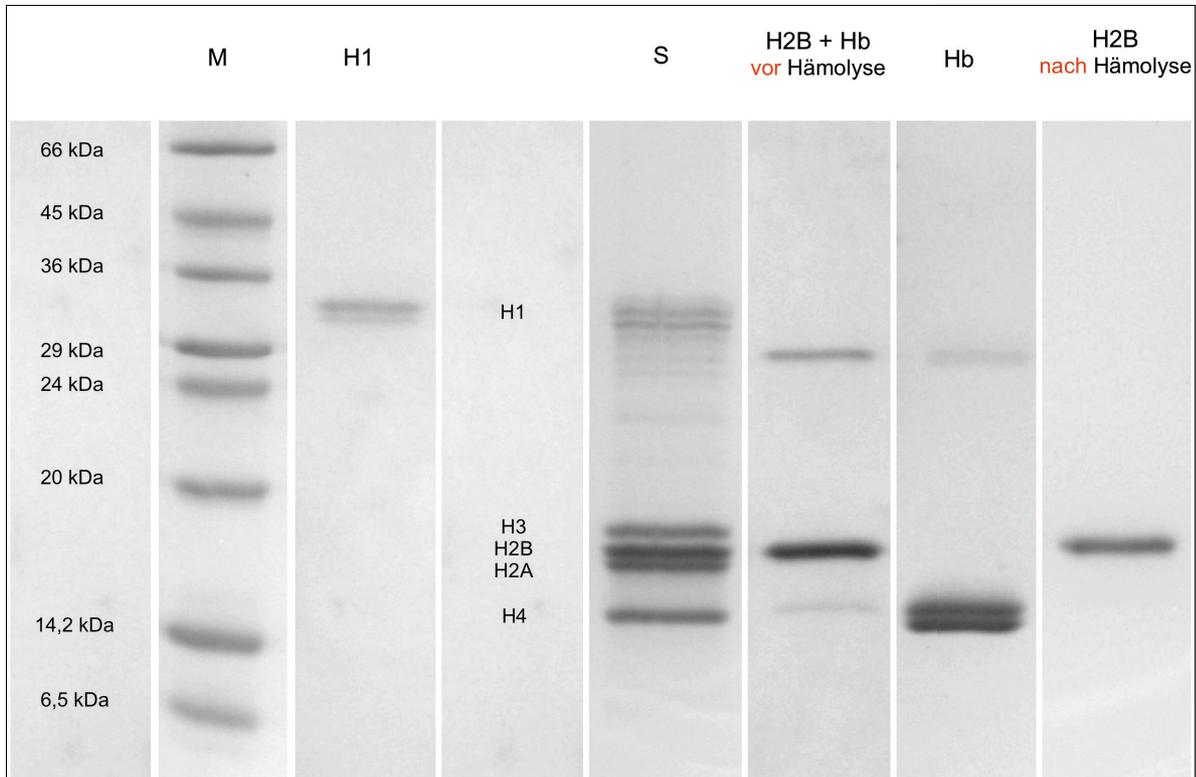


Abb. 11) Gelelektrophorese vor und nach Hämolyse. M = Marker, S = Standard, Hb = Hämoglobin.

3.3. Razemisierung von Asx-Resten myokardialer Histone

Die Histone H1 und H2B wurden mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf ihren Razemisierungsgrad von Asx untersucht. Abbildung 12 zeigt beispielhaft die chromatographische Auftrennung der primären Aminosäuren eines Histons H2B nach einer 6h-Hydrolyse mit HCl.

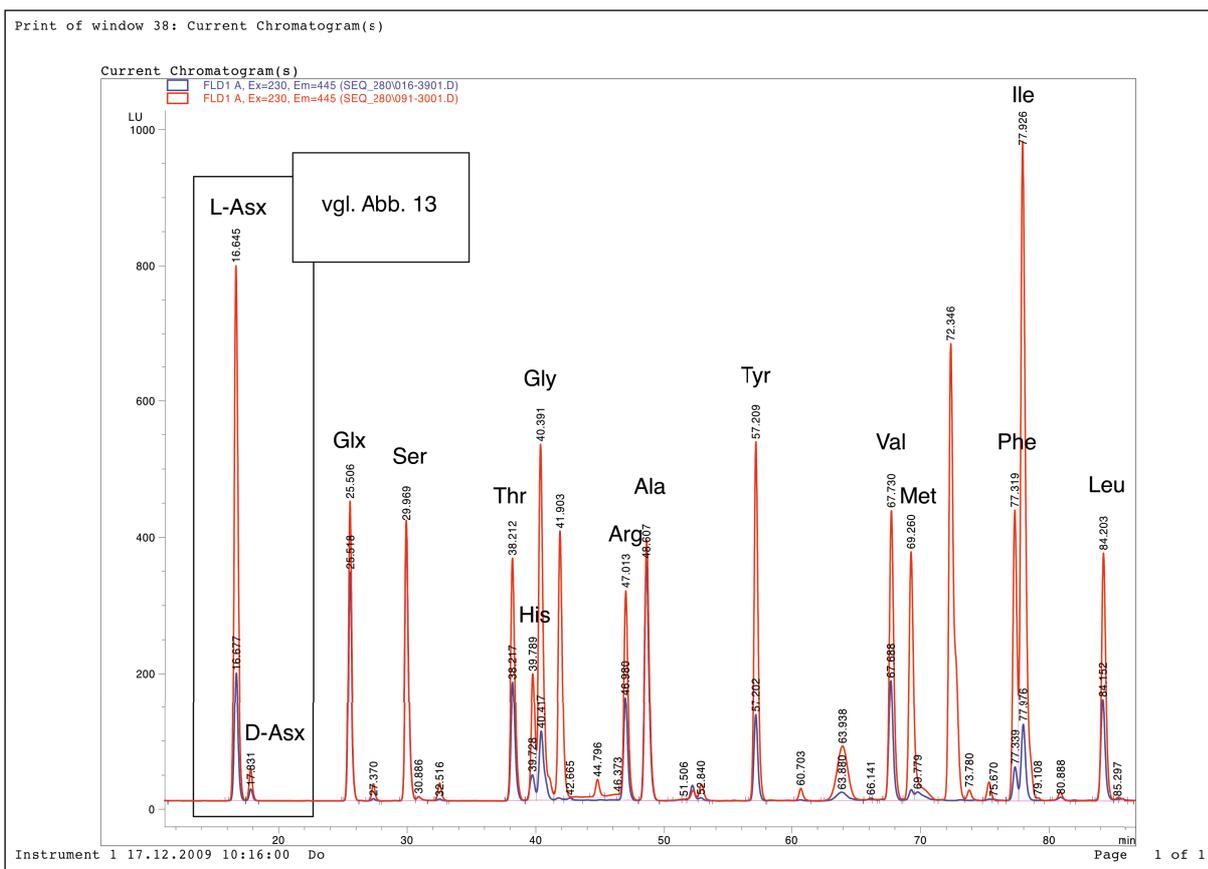


Abb. 12) Flüssigkeitschromatographische Auftrennung primärer Aminosäuren nach 6h-Hydrolyse von Histon H2B. Die blauen Signale stellen die Aminosäuren des myokardialen Histons dar, die roten Signale zeigen im Vergleich dazu die Aminosäuren der externen Standardreinsubstanz.

Abbildung 13 zeigt beispielhaft das Verhältnis eines L-Asx zu einem D-Asx-Signal von Histon H2B eines 10-jährigen männlichen Individuums mit einem Razemisierungsgrad von 8 %.

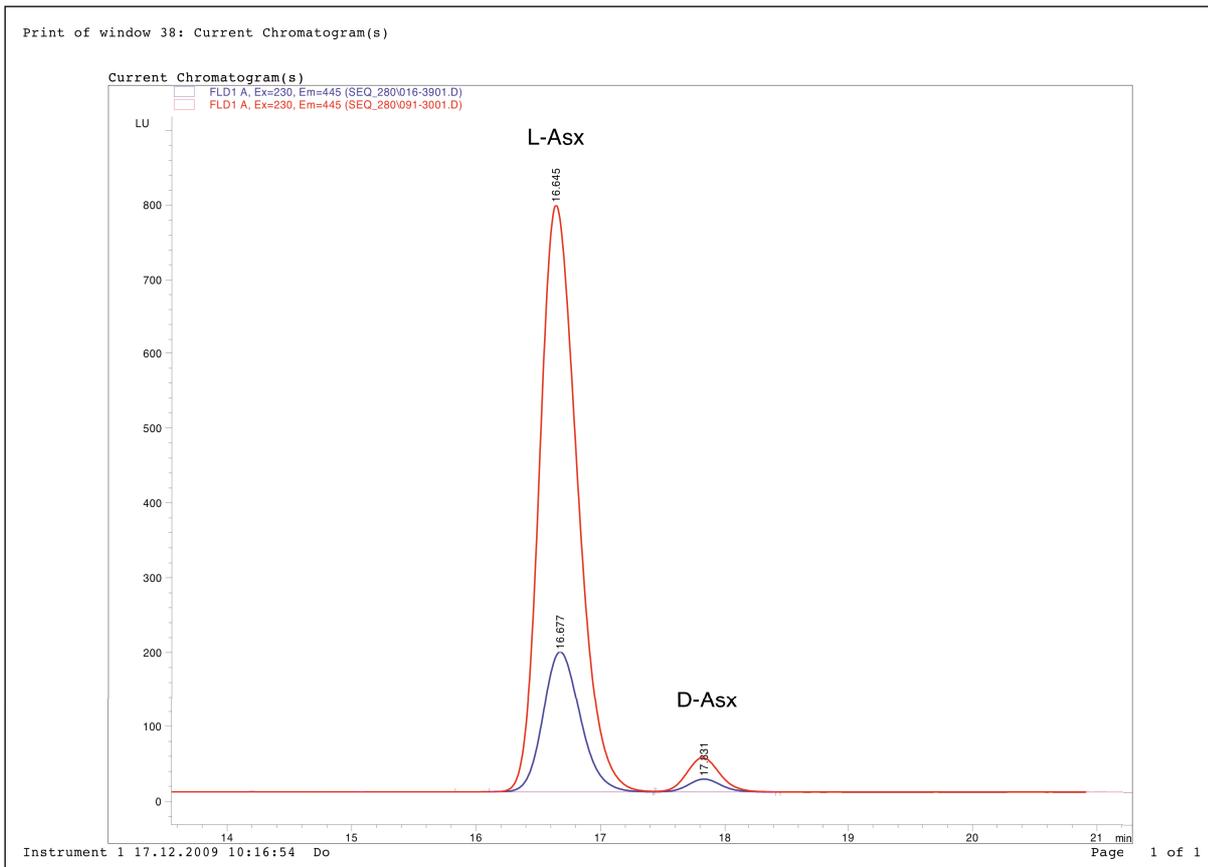


Abb. 13) Ausschnitt aus einem FPLC-Chromatogramm. Das blaue Signal stellt das Chromatogramm einer aufgereinigten H2B-Probe dar, das rote Signal das einer externen Standardreinsubstanz.

Die Razemisierungsgrade des Histons H1 (vgl. Abb. 14) variierten zwischen 1,45 % und 1,7 %. Bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,136 (Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,018496$) ergab sich kein Hinweis auf eine altersabhängige Zunahme des D-Enantiomers im Verhältnis zum L-Enantiomer.

Histon H2B (vgl. Abb. 15) zeigte Razemisierungswerte zwischen 5,35 % bei einem 57-jährigen männlichen Individuum und 8,45 % bei einem 25-jährigen weiblichen Individuum. Wie bei H1 fand sich auch hier kein Anhalt für eine altersabhängige Zunahme des Razemisierungsgrades (Korrelationskoeffizient $r = 0,234$, Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,054756$).

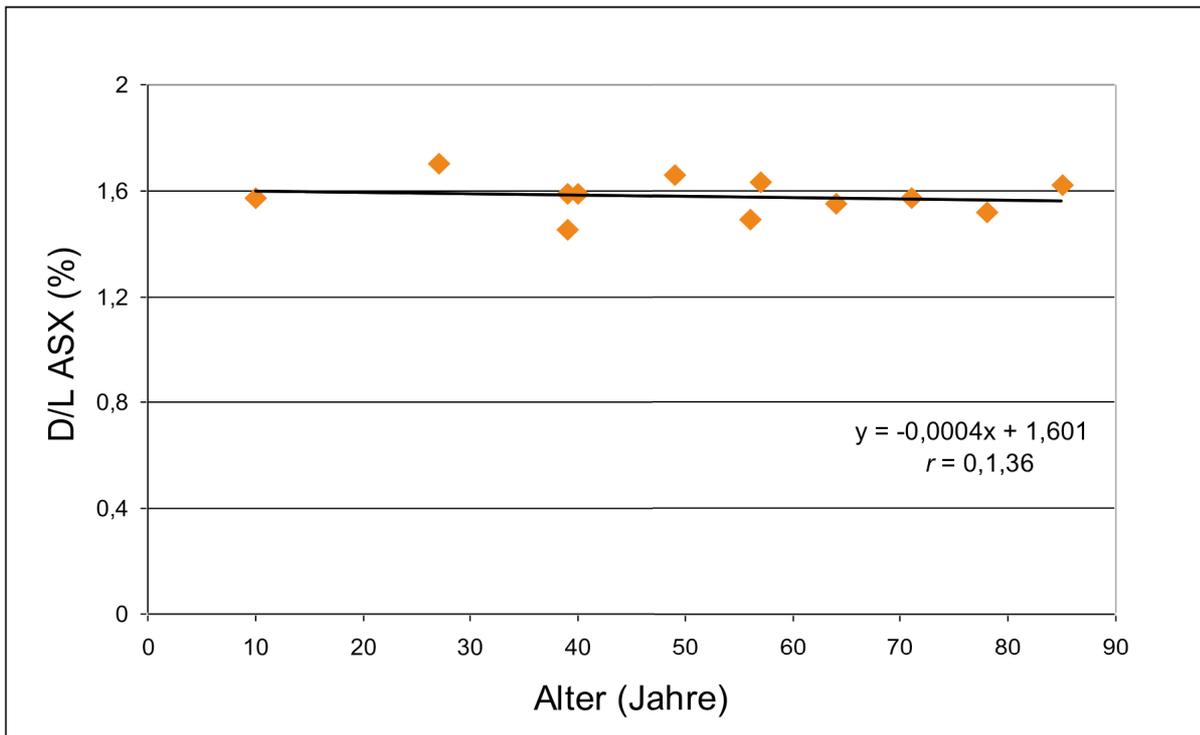


Abb. 14) D/L-Asx (%) in Histon H1 in Abhängigkeit vom Alter.

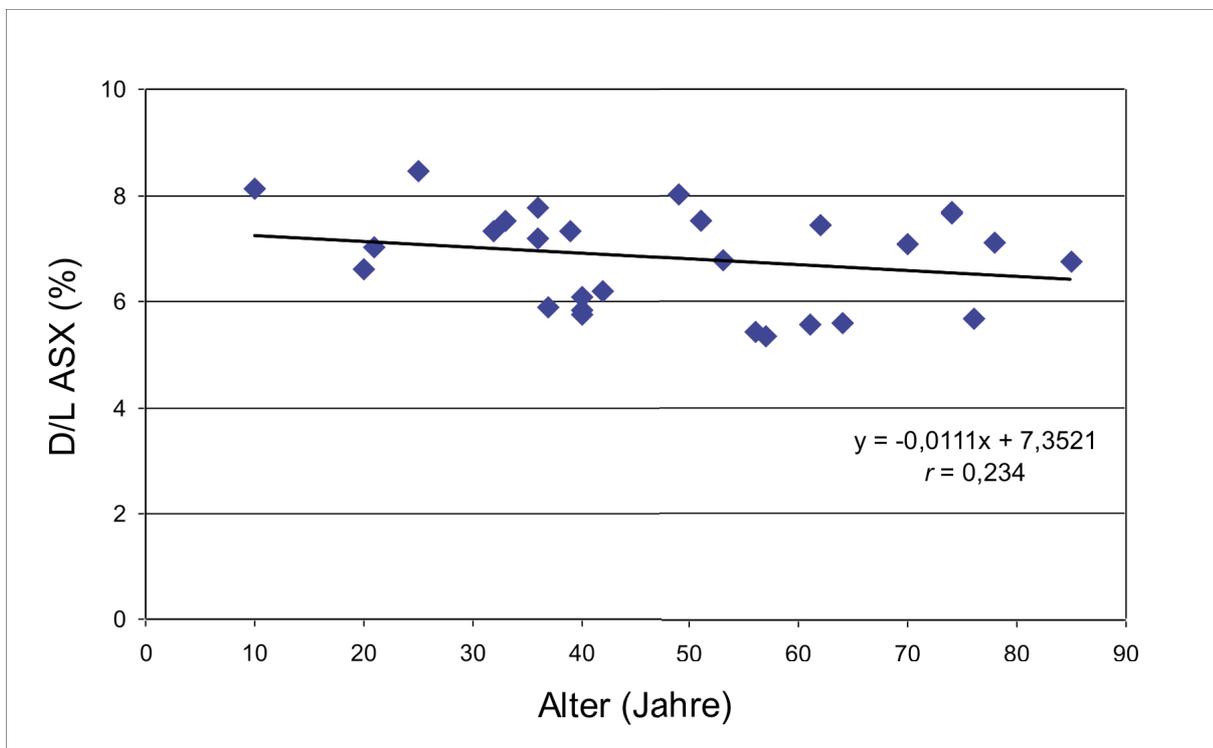


Abb. 15) D/L-Asx (%) in Histon H2B in Abhängigkeit vom Alter.

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

3.4. Razemisierung von Asx-Resten im Gesamtkernprotein des Myokards

Von Myokardproben verschiedenen Alters wurde das Gesamtkernprotein auf Razemisierung von Asx-Resten untersucht (vgl. Abb. 16). Die Werte lagen zwischen 1,59 % und 1,82 %, der Mittelwert betrug 1,70 % D/L-Asx. Dabei zeigte sich ein minimaler Anstieg der Razemisierungswerte mit zunehmendem Alter der Individuen mit geringfügigen Streuungen in allen Alterklassen. Bei einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,854$ (Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,7294$) ist von einer positiven Korrelation auszugehen.

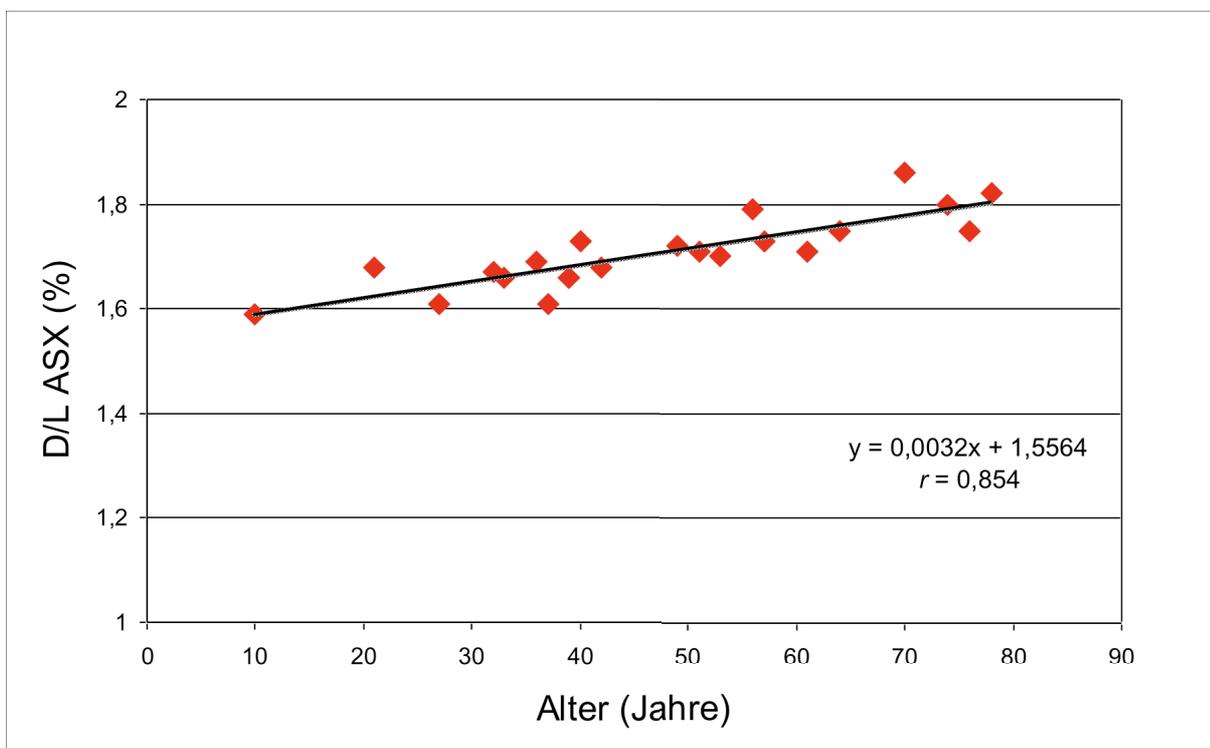


Abb. 16) D/L-Asx (%) im Gesamtkernprotein des Myokards in Abhängigkeit vom Alter.

3.5. Deiminierung von Argininresten myokardialer Histone

In den aufgereinigten Histonsubtypen H1 und H2B wurde Citrullin als Folge einer enzymatischen Deiminierung von Argininresten detektiert. Abbildung 17 zeigt beispielhaft die chromatographische Auftrennung primärer und sekundärer Aminosäuren eines Histons H2B nach einer 24-stündigen sauren Hydrolyse.

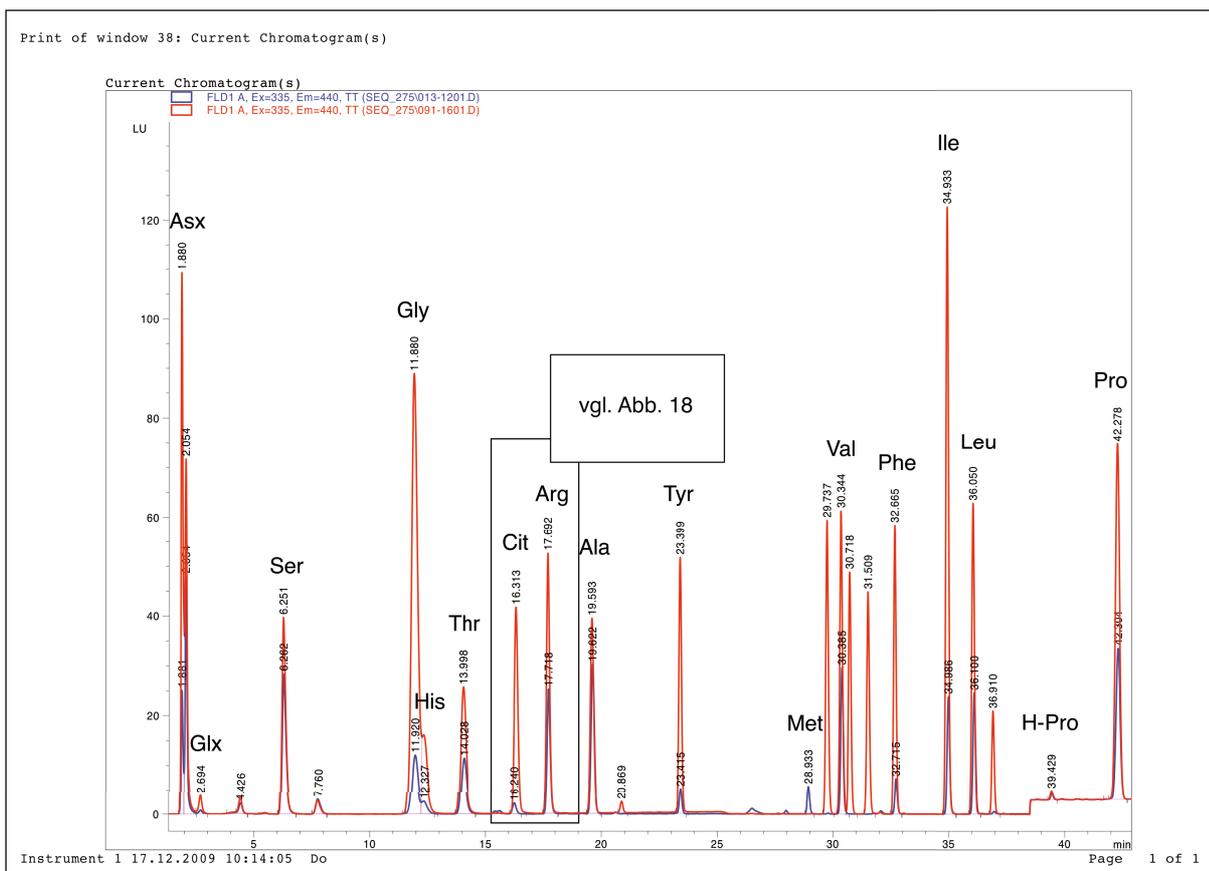


Abb. 17) Flüssigkeitschromatographische Auftrennung primärer und sekundärer Aminosäuren nach 24h-Hydrolyse eines Histons H2B. Die blauen Signale stellen die Aminosäuren des myokardialen Histons dar, die roten Signale zeigen im Vergleich dazu die Aminosäurekomponenten der externen Standardreinsubstanz.

Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch das Ausmaß der Citrullinierung als Citrullin/Arginin (%) von 9,96 % von Histon H2B eines 70-jährigen männlichen Individuums.

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

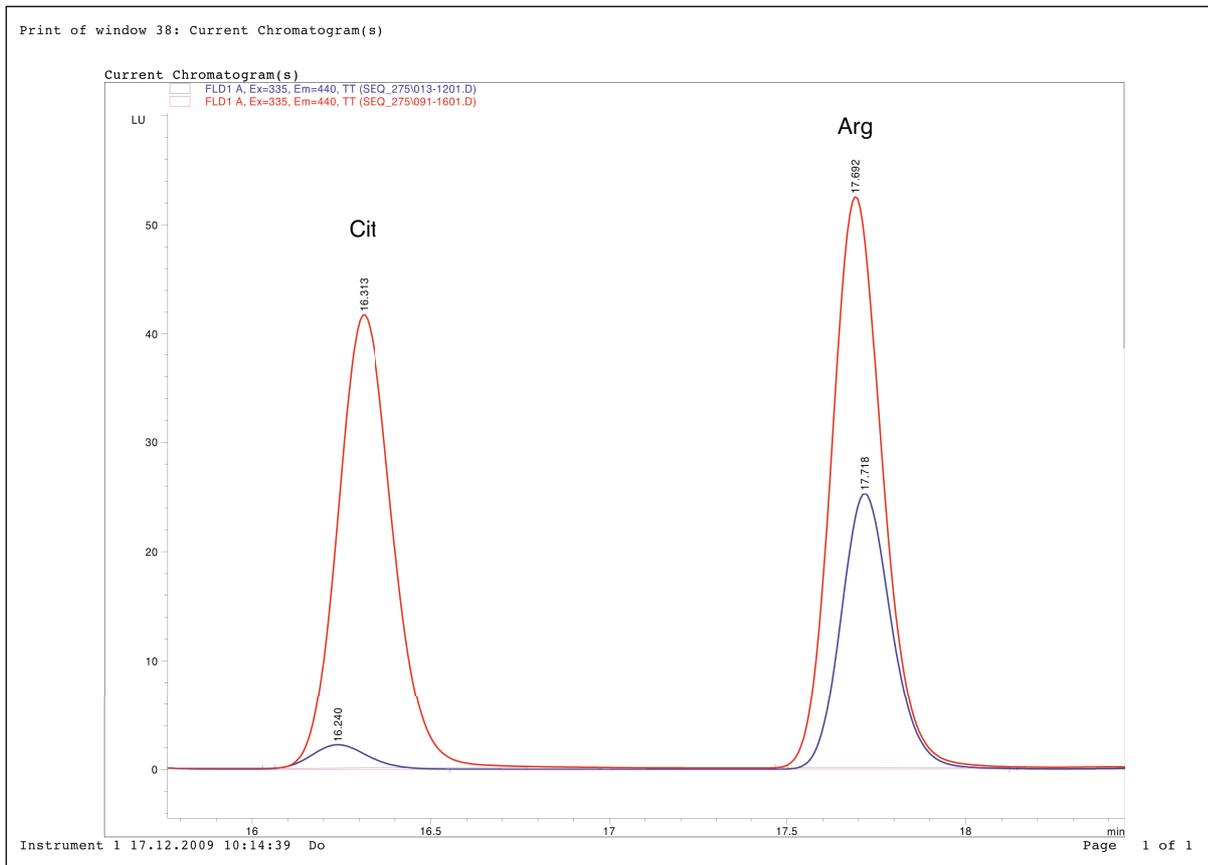


Abb. 18) Ausschnitt aus einem FPLC-Chromatogramm. Die blaue Kurve stellt das Chromatogramm eines aufgereinigten Histons H2B dar, die rote Kurve das der externen Standardreinsubstanz.

Das Ausmaß der Deiminierung als Quotient Citrullin/Arginin (%) in Histon H1 schwankte zwischen 0,8 % bei einem 10 Jahre alten männlichen Individuum und 5,48 % bei einem 40-jährigen männlichen Individuum (vgl. Abb. 18). Ausgehend vom Korrelationskoeffizienten $r = 0,358$ (Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,128164$) zeigte sich kein Anhalt für eine Abhängigkeit der Deiminierung vom Lebensalter.

Die roten Kreise in Abbildung 19 markieren Fälle, in denen sich in der histologischen Untersuchung infarzierte Bereiche fanden. Entfernt man diese markierten Werte unter der Annahme, dass die Pathologie im Hintergrund das Ergebnis beeinflusst, aus dem Datensatz, so ergibt sich das in Abbildung 20 dargestellte Diagramm. Bei erneuter Berechnung des Korrelationskoeffizienten ergäbe sich für diesen Fall ein r

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

= 0,740 (Bestimmtheitsmaß = $r^2 = 0,5476$), so dass hier vorsichtig eine positive Korrelation zum Alter abgeleitet werden könnte (vgl. 4.4.).

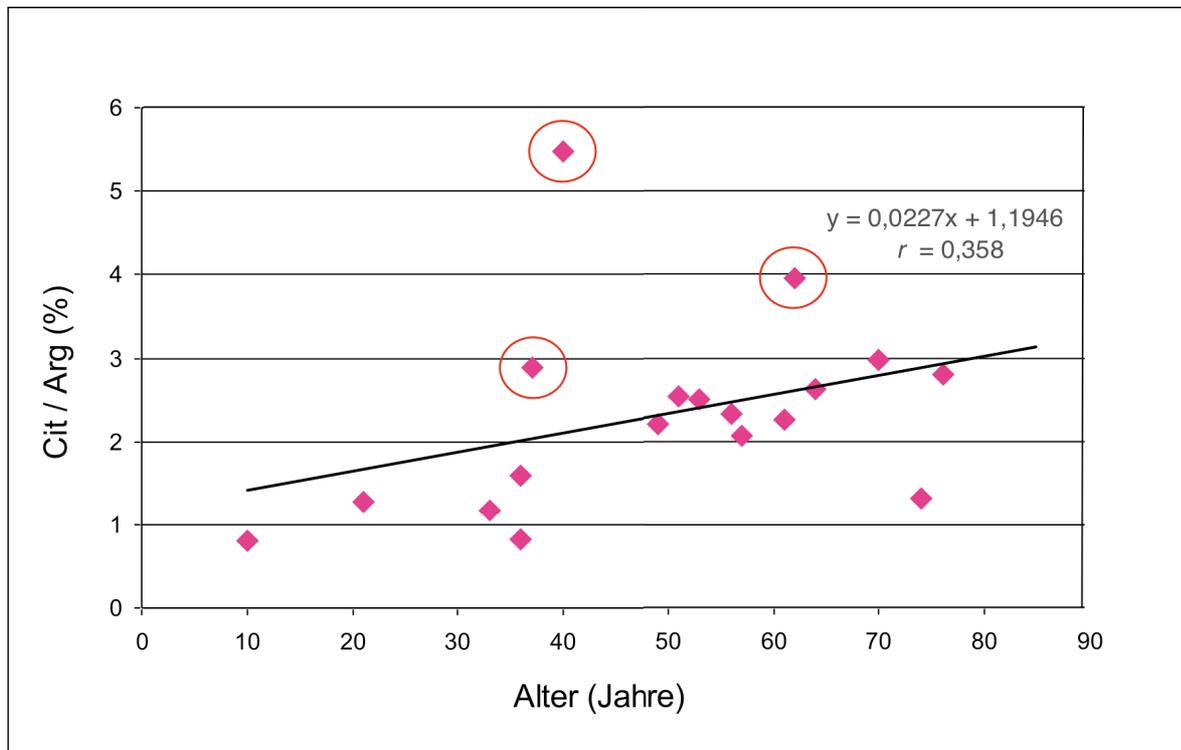


Abb. 19) Citrullingehalt myokardialer Histone des Typs H1 als Citrullin/Arginin (%) in Abhängigkeit vom Alter. Die markierten Werte (rote Kreise) kennzeichnen Fälle mit Myokardnarben.

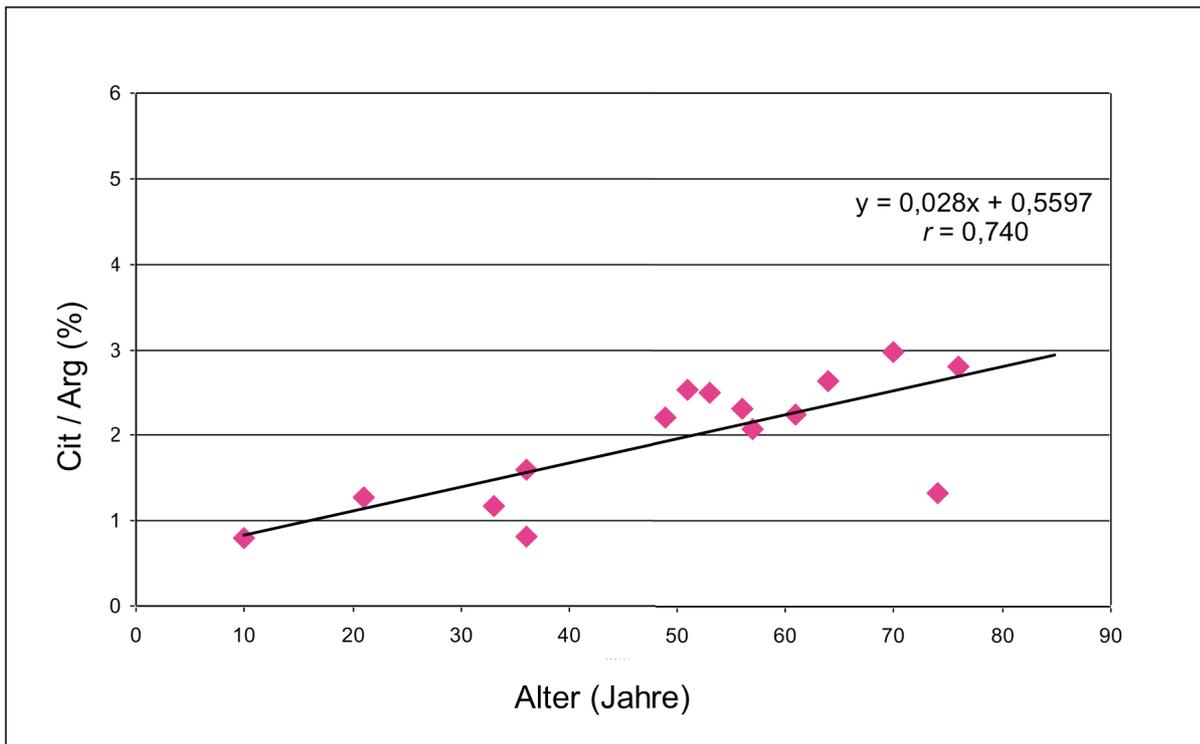


Abb. 20) Citrullingehalt myokardialer Histone des Typs H1 als Citrullin/Arginin (%) in Abhängigkeit vom Alter. Diagramm ohne die in Abbildung 19 markierten Fälle mit Myokardnarben.

Histon H2B wies Deiminierungsraten zwischen 5,38 % und 11,03 % auf (vgl. Abb. 21). Der Korrelationskoeffizient $r = 0,02$ (Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,0004$) zeigt, dass es keinen Hinweis auf eine altersabhängige Zunahme des Citrullingehaltes gab.

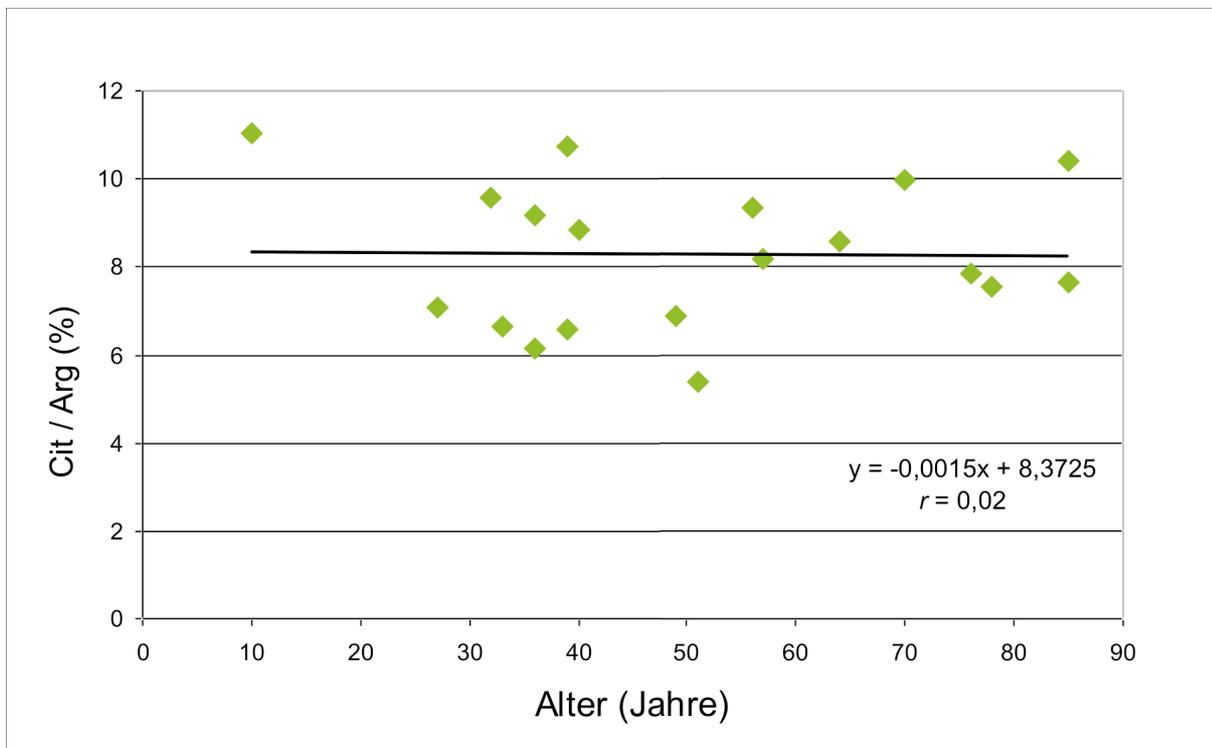
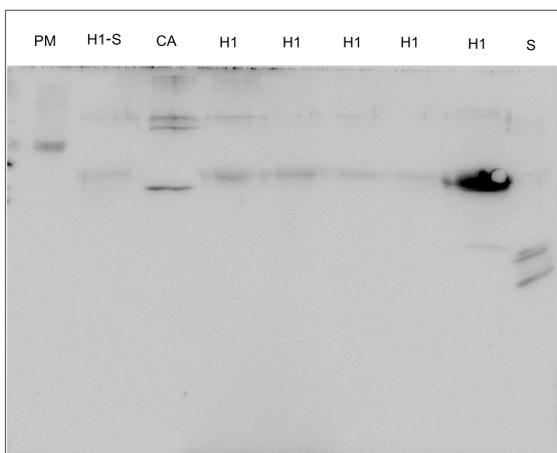


Abb. 21) Citrullingehalt myokardialer Histone des Typs H2B als Citrullin/Arginin (%) in Abhängigkeit vom Alter.

3.6. Western-Blot zum Nachweis der Deiminierung in Histonen

Exemplarisch wurden sowohl für H1 als auch für H2B Western-Blots zum Nachweis des Citrullins angefertigt (vgl. Abb. 22 und 23). Der positive Citrullin-Nachweis konnte sowohl für Histone des Typs H1 als auch für Histone des Typs H2B erbracht werden. Die angefertigten Western-Blots lassen keine Aussage über die Quantität des Proteins zu.

(1)



(2)

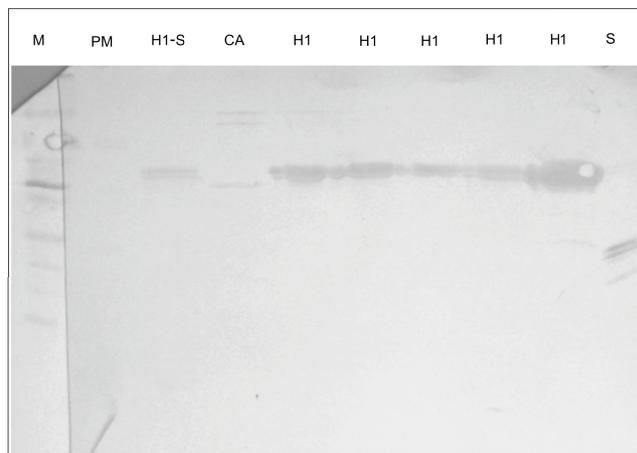
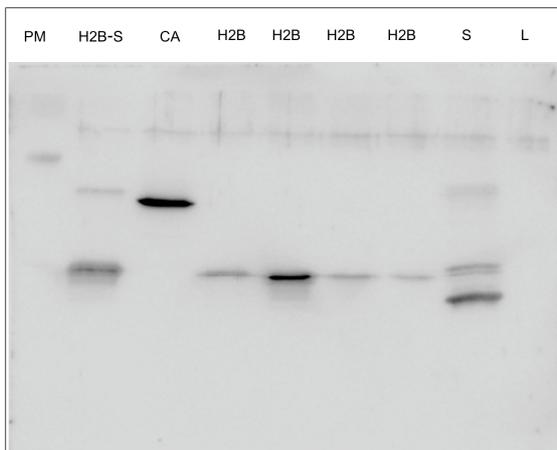


Abb. 22) Histone H1: Blot nach Immunreaktion (Anti-Citrullin-AK) (1), Blot nach Proteinfärbung mit Amidoschwarz (2).

(1)



(2)

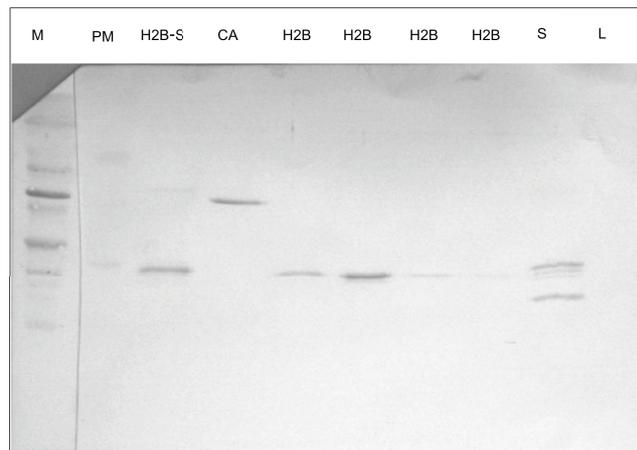


Abb. 23) Histone H2B: Blot nach Immunreaktion (Anti-Citrullin-AK) (1), Blot nach Proteinfärbung mit Amidoschwarz (2).

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

4. Diskussion

4.1. Methodenkritik

4.1.1. Aufreinigung von Histonen aus humanem Myokard

Die Aufreinigung der myokardialen Zellkerne mittels der Methode nach Jackowski und Liew [1980] und der anschließenden Isolation der Histone mittels Schwefelsäure [Panyim et al. 1971] führte in allen untersuchten Herzgewebeproben zu einer ausreichenden Ausbeute der Histonsubtypen H1 und H2B, nicht jedoch der Histone H2A, H3 und H4. Die in der Methode nach Jackowski und Liew [1980] bzw. Liew et al. [1983] angewandte Dichtegradientenzentrifugation zur besseren Trennung von Zellkernen und Zytoplasma war nicht erfolgreich: Mehrmalige Versuche dieser Dichtegradientenzentrifugation zeigten einen massiven Verlust von Zellkernen in einer mit diversen Zellbestandteilen verunreinigten Schicht. Die Ausbeute der reinen Kerne war so gering, dass mehrmalige Dichtegradientenzentrifugationsschritte notwendig gewesen wären; dafür war die Quantität des Sektionsmaterials jedoch nicht ausreichend.

Der Verunreinigung der Zellkernmasse durch Erythrozyten wurde durch die Einführung eines Hämolyse-schrittes vor Beginn der Homogenisation des Myokards entgegengewirkt und damit eine potentielle Verfälschung der Daten durch kontaminierendes Fremdprotein verhindert [Ingrosso und Perna 1998].

Die Histonauftrennung über die RP-HPLC ergab für die Subtypen H1 und H2B ein reproduzierbares, typisches Elutionsprofil [vgl. Abb. 6; Bonenfant et al. 2006, Garcia et al. 2007].

Histon H1 zeigte in den meisten Fällen eine um 30 – 50 % höhere Ausbeute als Histon H2B. Die offenbar bessere Elution von H1 ist möglicherweise durch den Aufbau des Nukleosoms bedingt. Die sogenannten Core-Histone bilden ein Oktamer, bestehend aus zwei H2A-H2B-Dimeren und einem H3-H4-Tetramer, welches von der

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Doppelhelix umschlungen wird. Die an der Außenseite der Nukleosomen ansetzenden H1 Linker- Histone stabilisieren den Komplex und führen somit zur Bildung des Chromatinkörpers [Lindner 2008, Ausió 2006, Turner 2000]. Da die Linker-Histone nicht im Core-Komplex verankert sind (s.o.), ist es möglich, dass sie sich während der Histon-Isolation leichter aus dem Chromatinverbund herauslösen lassen.

Weshalb H2B aus dem Myokardgewebe als einziges der Core-Histon zu extrahieren war, lässt sich anhand von Literaturdaten nicht klären. Die Daten der bisher aus Myokard isolierten Histone zeigten eine Isolation aller Core-Histone mithilfe der bereits angesprochenen Dichtegradientenzentrifugation [Liew et al. 1983, Liew und Sole 1978, Beeson und Triplett 1967].

Zur Identifikation der Histone wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt [Lindner 2008], die entsprechenden Banden konnten durch einen mitgeführten Histonstandard eindeutig zugeordnet werden (vgl. Abb. 7). Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden einzelne Proben exemplarisch massenspektrometrisch untersucht (vgl. Abb. 8 + 9). Die Reinheit der H2B-Fraktion nach Durchführung des eingeführten Hämolyse-schrittes konnte massenspektrometrisch bestätigt werden (vgl. Abb. 10).

4.1.2. Subtypen von Histon H1 und H2B und deren Elutionsverhalten in der RP-HPLC

Nach Angaben in der Literatur sind bisher sieben Unterformen des Histons H1 im Menschen identifiziert worden: H1.1 – H1.5 als Haupttypen sowie H1° in differenzierten Zellen und H1t bzw. H1oo in männlichen bzw. weiblichen Keimzellen [Bianchi 2004, Doenecke et al. 1997]. Das Linker-Histon gilt als das in seiner Struktur am stärksten variierende Histon und die verschiedenen Subtypen unterscheiden sich in ihrem elektrophoretischen und chromatographischen Verhalten [Ausió 2006, Doenecke et al. 1997, Cole 1987, Eick et al. 1989]. Die Sequenzübereinstimmung

innerhalb der fünf H1-Haupttypen beträgt zwischen 60 und 85 % [Drabent et al. 1995].

Die H1-Haupttypen H1.1 – H1.5 finden sich in allen somatischen Zellen [Bianchi 2004], jedoch sind keine spezifischen Daten für menschliches oder tierisches Myokard bekannt.

Die myokardialen Linker-Histone eluierten in der Chromatographie reproduzierbar bei 45 Minuten und stellten sich in der nachfolgenden Gelelektrophorese als zwei Banden dar. Dies lässt darauf schließen, dass im humanen Myokard mindestens zwei H1-Subtypen vorhanden sind. Zur genaueren Analyse wären massenspektrometrische Analysen notwendig.

Für Histon H2B sind drei verschiedene Unterformen beschrieben: H2B.1, H2B.2, H2B.3 [Ausió 2006, Doenecke et al. 1997]. Es finden sich ebenfalls keine myokardspezifischen Daten in der Literatur. Abbildung 7 lässt vermuten, dass die myokardialen Histonsubtypen eine ähnliche Struktur aufweisen und deshalb reproduzierbar als ein Peak bei 58 Minuten von der Säule eluierten. Um genauere Aussagen treffen zu können, müssten auch hier massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt werden.

4.2. D-Asx-Reste in myokardialen Histonen

4.2.1. Einfluss von Umgebungsbedingungen auf die Razemisierungskinetik und die Untersuchungsergebnisse

Die Geschwindigkeit der AAR ist von verschiedenen Faktoren abhängig wie Temperatur, pH-Wert und Zeit [Zhang et al. 2011, Meissner und Ritz-Timme 2010, Alkass et al. 2009, McCudden und Kraus 2006, Capasso et al. 1991].

Unter „normalen“ postmortalen Umständen ist die Umgebungstemperatur im Regelfall niedriger als in vivo, so dass eine postmortale Nachrazemisierung vernachlässigbar gering ist [Ritz-Timme und Collins 2002]. Eine mittlere Umgebungstemperatur von 15 °C innerhalb von 10 Jahren würde bei einer auf Dentin beruhenden Altersschätzung lediglich zu einem Fehler von 0,2 Jahren führen [Meissner und Ritz-Timme 2010, Ohtani 1995]. Proben von Brandleichen wurden nicht für die vorliegende Untersuchung eingesetzt, da hohe Umgebungstemperaturen einen Einfluss auf die Razemisierungskinetik haben können [Ritz-Timme 1999]. Des Weiteren wurden keine Proben von Leichen mit bereits eingetretenen Fäulniserscheinungen asserviert, da der Einfluss der damit verbundenen Proteindegradation auf die Razemisierungskinetik nicht vorhersagbar ist.

Alle Proben wurden vor der HPLC-Messung einer sauren Hydrolyse (6 Stunden bei 100 °C) unterzogen, die Razemisierung induzieren kann [McCudden und Kraus 2006, Waite et al. 1999]; diese in vitro-Razemisierung ist bei der Interpretation der erhobenen Daten zu berücksichtigen.

4.2.2. D-Asx-Reste in Histonen H1 und H2B aus Myokardgewebe

Systematische Untersuchungen zum Ausmaß der AAR in Histonen humaner Zellen existieren bisher nicht. Verschiedene Daten haben dennoch bereits darauf

hingewiesen, dass sowohl Linker- als auch Core-Histone in unterschiedlichem Ausmaß von dem Razemisierungsprozess betroffen sind.

So zeigten Young et al. [2005, 2001], dass Asp²⁵ in Histon H2B aus Gehirngewebe von Hunden signifikant, jedoch unabhängig vom Alter, razemisiert. Ebenso fand sich eine Akkumulation von D-Asp an Position Asp⁵¹ in Histon H2B, jedoch war das Ausmaß der Razemisierung deutlich geringer als an Asp²⁵ (s.u.). Des Weiteren wurden an Asp²⁵ in Histon H4 aus menschlicher Milz Razemisierungswerte zwischen 5 und 10 % nachgewiesen [Hayashi et al. 1982]. Die Arbeitsgruppe um Lindner et al. [1999] wies darüber hinaus eine für Histon H1 altersabhängige Zunahme der D-Asx-Konzentrationen in Leber-, Nieren- und Gehirngewebe von Ratten und Mäuse nach.

Die vorliegende Arbeit bestätigt das Auftreten von D-Asx-Resten in den Histonen H1 und H2B.

Die erhobenen D/L-Asx-Werte für myokardiales Histon H1 lagen zwischen 1,45 % und 1,7 %, die D/L-Asx-Werte für myokardiales Histon H2B zwischen 5,35 % und 8,45 %. Beide erhobenen Datenreihen zeigten keinerlei Korrelation zum Alter der Individuen.

Die niedrigen Razemisierungswerte der Linker-Histone sind möglicherweise nicht auf eine intravitale Akkumulation razemisierter Asx-Reste zurückzuführen, sondern eher als eine durch die saure Hydrolyse (s.o.) induzierte in-vitro-Razemisierung zu interpretieren [Ritz-Timme 1999], die wegen des standardisierten Prozederes alle Proben betraf.

Dagegen sind die für H2B erhobenen D/L-Asx-Werte mit einer relativ großen Streuung als Indiz für eine intravitale Akkumulation razemisierter Asparaginsäurereste in myokardialen Histonen zu werten. Die erhobenen Werten korrelieren gut mit den für in Histon H2B erhobenen Daten aus Gehirngewebe von Hunden [Young et al. 2005] – dort lagen die Razemisierungswerte von H2B zwischen 4,9 % und 7 %.

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Young et al. [2001, 2005] zeigten, dass in Histon H2B die Aminosäuresequenz Asp–Gly an Position 25 und 26 die von den in H2B insgesamt in Frage kommenden sechs Asx-Resten am anfälligsten für die Bildung von Iso-Asp ist.

Keines der anderen drei Core-Histone (H2A, H3 und H4) weist Asx-Reste auf, die so schnell isomerisieren [Young et al. 2001.] Ursächlich für dieses Phänomen könnte die Lage der Aminosäuresequenz Asp²⁵–Gly²⁶ in Histon H2B sein – diese befindet sich in den hochflexiblen N-Termini, die durch die exponierte Lage für die PIMT (vgl. 1.2.) einfacher zugänglich sein könnte [Carter und Aswad 2008, Young et al. 2005].

Die Bildung von Iso-Asp an Asp²⁵–Gly²⁶ wurde für Histon H2B auf etwa annähernd 1 % pro Tag geschätzt. Dies wiederum führt zu einem regelmäßigen „Substratnachschiebung“ für die PIMT, die Iso-Asp in das für Razemisierung höchst empfindliche Succinimid überführt (s.o.). Somit leistet das Reparaturenzym PIMT einen erheblichen Beitrag – von Young et al. [2005] wird dieser auf 76 bis 90 % geschätzt – zur in-vivo-Razemisierung von Asp²⁵ in H2B. Etwa 12 % des Asp²⁵ in Histon H2B liegen als D-Enantiomer vor [Carter und Aswad 2008, Young et al. 2005].

Durch die Isomerisierung an Asp²⁵–Gly²⁶ kann es zu einer veränderten Interaktion von H2B mit der umgebenden DNA kommen sowie zu einer für posttranslationale Modifikationen veränderten Empfindlichkeit benachbarter Aminosäurereste wie z.B. von Lys²³, das zur Vermittlung des Histoncodes acetyliert bzw. methyliert wird [Carter und Aswad 2008, Kim et al. 2006, Zhang et al. 2003].

Die durch die PIMT begünstigte Razemisierung von Asp²⁵ könnte ebenfalls zu signifikanten Veränderungen der H2B-Funktion führen. Welche Folgen diese chemischen Modifikationen z.B. auf die Transkriptionskontrolle der Zelle haben, bleibt noch zu klären [Carter und Aswad 2008].

Die Tatsache, dass es nicht zu einer Akkumulation von D-Asx-Resten mit dem Alter kommt (vgl. Abb. 14 + 15), spricht gegen die Hypothese, dass Histone in langlebigen

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Herzzellen permanente Proteine sind und mit dem Individuum altern. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit lassen also darauf schließen, dass Histone im Myokard einem Metabolismus unterliegen, der möglicherweise von immenser Bedeutung für das „Überleben“ und die adäquate Funktion des Organs „Herz“ ist.

In den Fällen mit pathologischen Veränderungen (Koronararteriosklerose, Hypertrophie, Lipofuszinablagerung, Infarkt) fanden sich keine auffälligen Werte. Dies ist aber auch nicht notwendigerweise zu erwarten, wenn es zutrifft, dass Histone offenbar ausgetauscht werden können.

4.3. D-Asx-Reste im Gesamtkernprotein des Myokards

Obwohl sich in den Histonen H1 und H2B keine altersabhängige Zunahme der D-Asx-Reste zeigte, fand sich im Gesamtkernprotein ein leichter Anstieg der Werte mit zunehmendem Alter (vgl. Abb. 16).

Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass es im Gesamtkernprotein permanente Proteine gibt, in denen es zu einer Akkumulation von D-Asx-Resten kommt. Daraus ergibt sich die Frage, um welche Proteine es sich handeln könnte.

In eukaryotischen Zellen sind Zellkern und Zytoplasma durch die Kernhülle voneinander getrennt. Die Kernhülle besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran sowie Kernporen, die für den bidirektionalen Transport von Makromolekülen zwischen Kern und Zytoplasma zuständig sind. Die äußere Kernhülle geht fließend in das den Kern umgebende Endoplasmatische Retikulum (ER) über, welches mit Ribosomen besetzt ist. Äußere Kernhülle und ER können morphologisch als ein Kontinuum betrachtet werden [Gruenbaum et al. 2005]. Das ER ist eine Organelle mit einer wichtigen Rolle in vielen zellulären Prozessen, die für das Überleben und die normale Funktion der Zelle von großer Bedeutung sind. So ist das ER für die Sekretion und die nachfolgende Faltung von im Zellkern synthetisierten Proteinen verantwortlich. Weitere Aufgaben liegen in der Aufrechterhaltung der intrazellulären Kalzium-Homöostase und der Lipid-Biosynthese [Kim et al. 2008].

Auch unter optimalen Bedingungen können bis zu 30 % der im ER neusynthetisierten Proteine von vornherein fehlgefaltet sein. Normalerweise werden solche Proteine in einer vom ER durchgeführten „Qualitätskontrolle“ identifiziert und in einem dem ER-assoziierten Degradationssystem (ERAD) abgebaut [Glembotski 2007, Kincaid und Cooper 2007].

Fehlgefaltete Proteine können aber auch akkumulieren und es gibt Evidenz dafür, dass eine Akkumulation dieser Proteine mit neurodegenerativen, immunologischen, endokrinologischen und anderen altersabhängigen Krankheiten in Verbindung steht [Glembotski 2007, Stefani 2004].

Eine mögliche Hypothese der im Gesamtkernprotein des Myokards erhobenen Daten könnte sein, dass im Alter mehr und mehr fehlgefaltete Proteine im ER akkumulieren. Ob diese Proteine einer Razemisierung anheim fallen können, lässt sich anhand von Literaturdaten nicht klären. Jedoch finden sich in der Literatur Untersuchungen zum Polypeptidhormon Amylin (Synonym: Insel-Amyloid-Polypeptid) der β -Zellen des Pankreas, welches spontan deamidieren kann und bereits durch Razemisierungswerte von unter 5 % zu Amyloid aggregiert, welches beim Diabetes mellitus Typ 2 von pathophysiologischer Bedeutung ist [Nilsson et al. 2002].

Ein weiteres Beispiel dafür, dass fehlgefaltete bzw. fehlaggregierte Proteine Razemisierung aufweisen können, ist das β -Amyloid, welches als Hauptcharakteristikum des M. Alzheimer angesehen wird. Shapira et al. [1988] ermittelten Werte von 5 % D-Asp, die Arbeitsgruppe um Roher [Roher et al. 1993] erhoben Razemisierungswerte von D-Asp von bis zu 11 %.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die altersabhängige Razemisierung im Gesamtkernprotein des Myokards durch diejenigen Histonsubtypen, die bei der Aufreinigung nicht in ausreichendem Maße gewonnen werden konnten, verursacht wurde.

4.4. Deiminierung von Argininresten myokardialer Histone

Die Deiminierung von Arginin als enzymatisch vermittelte posttranslationale Modifikation ist bisher nur für die Core-Histone H2A, H3 und H4 aus Zellkulturen beschrieben worden, jedoch noch nicht für das Core-Histon H2B und für die Linker-Histone [Hagiwara et al. 2005, Cuthbert et al. 2004, Hagiwara et al. 2002]. Die Citrullinierung humaner myokardialer Histone und insbesondere Citrullinreste in H2B und H1 wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal untersucht.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass myokardiale Histone auch unter natürlichen Gegebenheiten *in vivo* eine Deiminierung unterschiedlichen Ausmaßes aufweisen und dass dieser Prozess auch das Core-Histon H2B sowie die Linker-Histone betrifft.

4.4.1. Einfluss der Aminosäuresequenz auf die Deiminierung

Rein theoretisch kann jeder Argininrest von einer Deiminierung betroffen sein [Györgi et al. 2006]. Es gibt allerdings verschiedene Faktoren, die die Deiminierungskinetik beeinflussen. So ist bekannt, dass ein Argininrest mit einem sich C-terminal anschließenden Glutaminsäure-Rest nur in etwa 10 % von einer Citrullinierung betroffen ist; die Sequenz N-Arg-Glu-C findet sich an Position 92 - 93 in H2B. Dahingegen ist ein Argininrest mit einem sich C-terminal anschließenden Asparaginsäure-Rest in bis zu 100 % für eine Deiminierung anfällig ist [Tarcza et al. 1996]. Die Sequenz N-Arg-Asp-C findet sich in Histon H3 und H4, jedoch nicht in H1 und H2B.

Das Ausmaß der Deiminierung von Argininresten wurde summarisch erhoben, d.h. alle Argininreste wurden in die Datenerfassung mit einbezogen. Da es unwahrscheinlich ist, dass alle Argininreste gleichermaßen von dem Deiminierungsprozess betroffen sind [Györgi et al. 2006], ist davon auszugehen,

dass einzelne Argininreste noch höhere Deiminierungswerte aufweisen als es der Gesamtwert angibt.

4.4.2. Deiminierung von Argininresten in H2B aus Myokardgewebe

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten beschreiben erstmals eine Deiminierung von Histon H2B. Der niedrigste Deiminierungswert lag bei 5,38 %, der höchste Wert bei 11,03 %. (vgl. Abb. 21). Eine Korrelation zum Alter konnte nicht festgestellt werden. Die im Vergleich zu Histon H1 höheren Deiminierungswerte lassen sich auf die unterschiedliche Primär- und Sekundärstruktur der Histone zurückführen .

Für H2B betrug z.B. der höchste gemessene Wert 11,03 %. Wären von den in Histon H2B insgesamt vorkommenden acht Argininresten statt aller acht Reste z.B. nur zwei modifiziert (vgl. 4.4.1.), so würden diese beiden Argininreste Citrullinwerte von jeweils 44 % aufweisen. Einzelne Argininreste mit hohen Citrullinierungswerten können zu weitaus größeren funktionellen Konsequenzen führen, als eine gleichmäßige Verteilung der Citrullinierungswerte über alle möglichen Argininreste (vgl. 4.4.4.).

4.4.3. Deiminierung von Argininresten in H1 aus Myokardgewebe

Bei den Linker-Histonen lag der niedrigste Deiminierungswert bei 0,8 %, der höchste Deiminierungswert bei 5,48 % (vgl. Abb. 19 + 20). Die verschiedenen H1-Subtypen weisen drei bis sechs Argininreste auf, da die meisten Subtypen allerdings drei Argininreste aufweisen, soll dieses Beispiel für drei Argininreste berechnet werden: Wäre z.B. nur ein Argininrest modifiziert, so könnte dieser einen Citrullinierungswert von bis ca. 16 % aufweisen. Zu den dadurch entstehenden funktionellen Konsequenzen vgl. 4.4.4.

Es ergaben sich Hinweise auf erhöhte Werte in infarzierten Myokardbereichen. Daraus ergibt sich die Frage, ob Deiminierung in Zusammenhang mit bestimmten pathophysiologischen Zusammenhängen steht.

Wie bereits in der Einleitung (vgl. 1.3.) angesprochen ist die Aktivität der PADI kalziumabhängig. Takahara et al. [1986] zeigten am Beispiel der PADI2, dass dieses Enzym bei einer physiologischen Kalzium-Konzentration von 10^{-8} bis 10^{-6} M inaktiv ist. Dies führte zu der Annahme, dass Citrullinierung nur unter „extremen“ Bedingungen, z.B. als Trigger für den programmierten Zelltod, auftritt [György et al. 2006]. Hierbei kommt es zu einer Dysregulation der Kalzium-Homöostase, die über einen massiven Einstrom von Kalzium in die Zelle Apoptose induziert [Orrenius et al. 2003].

Außerdem wird eine Anreicherung von Kalzium im Zytosol mit tödlich verlaufenden Myokardkrankungen in Zusammenhang gebracht [Faulk et al. 1995, Lakatta 1993, Steenbergen et al. 1990]. Durch die Kalzium-Akkumulation kommt es zur Aktivierung endogener Enzyme, die durch Kompromittierung der Zellintegrität zu Zeldysfunktionen bis hin zu Nekrose führen [Faulk et al. 1995, Mazzanti 1990].

Brini et al. [1993] postulierten, dass die zytosolische Kalzium-Konzentration eng mit der Kalzium-Konzentration im Zellkern korreliert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Kernmembran kein großes Hindernis für die Diffusion von Kalziumionen darstellt [Faulk et al. 1995, Brini et al. 1993]. Ein Kalzium-Einstrom in das Zytosol während der bei einem Myokardinfarkt stattfindenden Nekrose kann also möglicherweise ungehindert auch die Kernmembran passieren und bietet dort für die PADI optimale Arbeitsbedingungen. Dies könnte die erhöhten Citrullinwerte in infarziertem Gewebe erklären. Wie für die Razemisierung (vgl. 4.2.) gilt aber, dass eine standardisierte Untersuchung mit höheren Fallzahlen notwendig wäre.

Die Deiminierungswerte von H1 lassen einen Anstieg dieser posttranslationalen Modifikation mit dem Alter vermuten, sofern man die in infarziertem Myokard erhobenen Daten vernachlässigt (vgl. Abb. 20).

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Altern bedingt eine Änderung der Genexpression und führt zu genomischer Instabilität [Oberdoerffer und Sinclair 2007]. Änderungen in der Epigenetik scheinen eine wichtige Rolle für altersspezifische Veränderungen zu spielen, so kommt es z.B. zu einer generellen Abnahme der DNA-Methylierung mit zunehmendem Alter mit nachfolgender Unterdrückung der Genexpression [Kawakami et al. 2009, Richardson 2003, Liu et al. 2003]. In der Literatur finden sich nur wenige Daten zu altersspezifischen Histonmodifikationen. Sarg et al. [2002] zeigten, dass eine trimethylierte Form von Histon H4 in Rattenleber und Rattenniere mit dem Alter zunimmt. Die Arbeitsgruppe um Kawakami [2009] wies nach, dass die Carbonylierung von Histon H1, H2A, H2B und H3 mit dem Alter zunimmt.

4.4.4. Funktionelle Konsequenzen der Deiminierung

Deiminierung wird sowohl mit vielen physiologischen, als auch mit vielen pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Im Rahmen physiologischer Prozesse spielt die Citrullinierung von Proteinen eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Epidermis, Regulation der Genexpression und Apoptose [György et al. 2006].

Nach Cuthbert et al. [2004] beeinflusst Deiminierung die Methylierung von Argininresten der Histone, da durch den Umbau von Arginin zu Citrullin Methylierungsstellen blockiert werden. Methylierte Histone spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Genexpression, so dass es durch den Deiminierungsprozess mit nachfolgender Blockierung der Methylierung zu einer Deaktivierung der Genexpression kommt [György et al. 2006].

Tarcsa et al. [1996] zeigten, dass ein hohes Maß an Citrullinierung *in vitro* zur Denaturierung von Proteinen führt. Eine Modifikation von Argininresten über 10 % führte zu einem kompletten Verlust der Proteinstruktur. Ursächlich für den Strukturverlust könnte die Aufhebung des Ladungsverhaltens von Arginin (positiv) zu Citrullin (neutral) sein (vgl. 1.3.).

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Es wird vermutet, dass Deiminierung unter physiologischen Bedingungen zwar zu einer Veränderung der Proteinstruktur führt, es jedoch nicht gleich zu einer Denaturierung von Proteinen kommen muss [Tarcsa et al. 1996]. Wang et al. [2009] zeigten, dass es durch die Citrullinierung von Histonen in Granulozyten zu einer Einschränkung der Verbindung des Nukleosoms – also dem Komplex aus DNA und Histonen – mit den Linker-Histonen kommt und somit die Überführung der DNA in eine höhere Verpackungseinheit verhindert wird.

Eine hohe Rate an Deiminierung in Histonen könnte also zu nukleosomaler Instabilität führen, da die durch die Deiminierung weniger basischen Histone schwächer an die saure DNA binden können [Györgi et al. 2006]. Weisen einzelne Argininreste höhere Deiminierungswerte auf als die Gesamtsumme aller Argininreste, wie beispielhaft in 4.4.2. und 4.4.3. aufgeführt, so kann dieser hoch citrullinierte Einzelrest, je nach Lage in der Primärstruktur, vermutlich zu einer viel stärkeren Störung der epigenetischen Kontrolle führen als mehrere niedrig citrullinierte Einzelreste – damit erlangt die durch Deiminierung resultierende Chromatindekondensation im Rahmen des Histoncodes vermutlich funktionelle Bedeutung [Thompson und Fast 2006].

5. Zusammenfassung

In langlebigen Proteinen kann es zu einer altersabhängigen intravitalen Akkumulation von D-Asparaginsäure infolge von Deamidierung von Asparaginresten und Razemisierung von Asparaginsäureresten kommen. Dies wurde z.B. in Dentinproteinen, Elastin und Osteocalcin nachgewiesen [Ritz-Timme et al. 2003, Waite et al. 1999, Carolan et al. 1997, Ohtani 1995, Helfman und Bada 1975] und war Grundlage für die Einführung präziser Verfahren zur Lebensaltersschätzung durch Nutzung dieser „molekularen Uhr“ [Ritz-Timme et al. 2003, Ritz-Timme 1999].

Da Kardiomyozyten langlebige Zellen sind, wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, ob die Histone H1 und H2B aus humanem Myokard eine altersabhängige Akkumulation von D-Asparaginsäureresten zeigen, was eine Langlebigkeit dieser Proteine in Kardiomyozyten belegen würde.

Die erhobenen Daten ergaben keinen Hinweis auf eine Akkumulation von D-Asparaginsäure in H1 unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen. H2B zeigte relativ hohe D-Asparaginsäurewerte, die aber nicht altersabhängig waren. Eine funktionelle (epigenetische) Bedeutung dieser posttranslationalen Modifikation ist vorstellbar, aber nicht unmittelbar aus den erhobenen Daten ableitbar.

Im Gesamtkernprotein des Myokards fand sich überraschenderweise eine leichte altersabhängige Zunahme des D-Asparaginsäuregehaltes. Hier wäre es von großem Interesse, das bzw. die in diesem Proteingemisch tatsächlich betroffene(n) kernassoziierte(n) Protein(e) zu identifizieren, um potentielle Folgen dieser altersabhängigen Razemisierung klären zu können.

Weiterhin wurden die myokardialen Histone H1 und H2B auf die enzymatisch vermittelte posttranslationale Modifikation Deiminierung (Synonym: Citrullinierung; Umwandlung von Arginin zu Citrullin) untersucht, welche bisher nur für die

Histonsubtypen H2A, H3 und H4 beschrieben worden war [Hagiwara et al. 2005, Cuthbert et al. 2004, Hagiwara et al. 2002].

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass auch H1 und H2B von Deiminierung betroffen sind, bei H2B war der Deiminierungsprozess eindeutig vom Alter unabhängig, bei H1 weisen die Daten auf einen möglichen altersabhängigen Anstieg hin. Die histologisch festgestellten infarzierten Bereiche bei drei der untersuchten Individuen zeigten erhöhte Deiminierungswerte.

Zur Klärung der funktionellen Konsequenzen der detektierten posttranslationalen Modifikationen der Histone H1 und H2B wäre zunächst die beispielsweise massenspektrometrische Identifizierung der betroffenen Aminosäurenreste erforderlich.

6. Abkürzungsverzeichnis

AAR	Razemisierung von Asx-Resten
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Asx	Asparaginsäure und/oder Asparagin
Cit	Citrullin
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fmoc	9-Fluorenylmethylchloroformat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Hb	Hämoglobin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
N-Terminus	Amino-Terminus
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PADI	Peptidylarginin-Deiminase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline + Tween
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

7. Literaturliste

Ausió J. (2006): Histone variants – the structure behind the function. *Briefings in functional genomics and proteomics* 5, 228-243

Alkass K., Buchholz B.A., Ohtani S., Yamamoto T., Druid H., Spalding K.L. (2009): Age estimation in forensic sciences: Application of combined aspartic acid racemization and radiocarbon analysis. *Molecular and Cellular Proteomics* 9, 1022-1030

Anversa P., Kajstura J. (1998): Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circulation Research* 83, 1-13

Arita, K., Hashimoto H, Shimizu T., Nakashima K., Yamada M. Sato M. (2004): Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. *Nature Structural and Molecular Biology* 11, 777-783

Bannister A.J., Kouzarides T. (2005): Reversing histone methylation. *Nature* 436, 1103-1106

Beeson J.L., Triplett E.L. (1967): Localization and characterization of rat and chicken histones. *Cell Research* 48, 61-70

Bianchi M.E. (2004): Significant (re)location: how to use chromatin and/or abundant protein as messages of life and death. *TRENDS in Cell Biology* 14, 287-293

Biel M., Wascholowski V., Giannis A. (2005): Epigenetik – ein Epizentrum der Genregulation: Histone und histonmodifizierende Enzyme. *Angewandte Chemie* 117, 3248-3280

Bonenfant D., Coulot M., Towbin H., Schindler P., van Oostrum J. (2006): Characterization of histone H2A and H2B variants and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* 5, 541-525

Brini M., Murgia M., Pasti L., Picard D., Pozzen T., Rizzuto R. (1993): Nuclear Ca²⁺-concentration measured with specifically targeted recombination aequorin. *The EMBO Journal* 12, 4813-4819

Brunk U.T., Terman A. (2002); Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell functions. *Free Radical Biology & Medicine* 33, 611-619

Capasso S., Mazzarella L., Zagari A. (1991): Deamidation via cyclic imide of asparaginy peptides: dependence on salts, buffers and organic solvents. *Peptide research* 4, 234-238

Carolan V.A., Gardner M.L., Lucy D., Pollard A.M. (1997): Some considerations regarding the use of amino acid racemization in human dentine as an indicator of age at death. *Journal of Forensic Sciences* 42, 10-16

Carter W.G., Aswad D.W. (2008): Formation, localization, and repair of L-Isoaspartyl sites in histones H2A and H2B in nucleosomes from rat liver and chicken erythrocytes. *Biochemistry* 47, 10757-10764

Chavanas S., Méchin M.-C., Takahara H., Kawada A., Nachat R., Serre G., Simon M. (2004): Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segment and a new human gene, PADI6. *Gene* 330, 19-27

Clarke S. (2003): Aging as war between chemical and biochemical processes: protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. *Ageing Research* 2, 263-285

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Clarke S. (1987): Propensity for spontaneous succinimide formation from aspartyl and asparaginy residues in cellular proteins. *International Journal of Peptide and Protein Research* 30, 808-821

Cloos P.A.C., Christgau S. (2004): Post-translational modifications of proteins: implications for aging, antigen recognition, and autoimmunity. *Biogerontology* 5, 139-158

Cloos P.A.C., Christgau S. (2002): Non-enzymatic covalent modifications of proteins: mechanisms, physiological consequences and clinical applications. *Matrix Biology* 21, 39-52

Cole R.D. (1987): Microheterogeneity in H1 histones and its consequences. *International Journal of Peptide and Protein Research* 30, 433-449

Cosgrove M.S., Boeke J.D., Wolberger C. (2004): Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, 1037-1043

Cuthbert G.L., Daujat S., Snowden A.W., Erdjument-Bromage H., Hagiwara T., Yamada M., Schneider R., Gregory P.D., Tempst P., Bannister A.J., Kouzarides T. (2004): Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545-553

DeLange R.L., Smith E.L. (1971): Histones: Structure and Function. *Annual Reviews of Biochemistry* 40, 279-314

Dobberstein R.C., Collins M.J., Craig O.E., Taylor G., Penkman K.E.H., Ritz-Timme S. (2009): Archaeological collagen: Why worry about collagen diagenesis? *Archaeological and Anthropological Sciences* 1, 31-42

Doenecke D., Albig W., Bode C., Drabent K., Franke K., Gavenis K., Witt O. (1997): Histones genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochemistry and Cell Biology* 107, 1-10

Drabent B., Franke K., Bode C., Kosciessa U., Bouterfa H., Hameister H., Doenecke D. (1995): Isolation of two murine H1 histone genes and chromosomal mapping of the H1 gene complement. *Mammalian Genome* 6, 505-511

Eick S., Nicolai M., Mumberg D., Doenecke D. (1989): Human H1 histones: conserved and varied sequence elements in two H1 subtype genes. *European Journal of Cell Biology* 49, 110-115

Faulk E.A., McCully J.D., Tsukube T., Hadlow N.C., Krukenkamp I.B., Levitsky S. (1995): Myocardial mitochondrial calcium accumulation modulates nuclear calcium accumulation and DNA fragmentation. *The Annals of Thoracic Surgery* 60, 338-344

Fujii N., Kaji Y., Fujii N. (2011): D-amino acids in aged proteins: Analysis and biological relevance. *Journal of Chromatography B* 879, 3141-3147

Galletti P., Ingrosso D., Manna C., Sica F., Capasso S., Pucci P., Marino G. (1988): Enzymatic methyl esterification of synthetic tripeptides: structural requirements of the peptide substrate. Detection of the reaction products by fast-atom-bombardment mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry* 177, 233-239

Garcia B.A., Shabanowitz J., Hunt D.F. (2007): Characterization of histones and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* 11, 66-73

Geiger T., Clarke S. (1987): Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginy and aspartyl residues in peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 785-794

Glembotski C.C. (2007): Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart. *Circulation Research* 101, 975-984

Gruenbaum Y., Margalit A., Goldman R.D., Shumaker D.K., Wilson K.L. (2005): The nuclear lamina comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6., 21-31

György B., Tóth E., Tarcsa E., Falus A., Buzás E.I. (2006): Citrullination: A posttranslational modification in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38, 1662-1677

Hagiwara T., Hidaka Y., Yamada M. (2005): Deimination of Histone H2A and H4 at Arginine 3 in HL-60 Granulocytes. *Biochemistry* 44., 5827-5834

Hagiwara T., Nakashima K., Hirano H., Senshu T., Yamada M. (2002): Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 979-983

Hayashi T., Ohe Y., Hayashi H., Iwai K. (1982): Human spleen histone H4. Isolation and amino acid sequence. *The Journal of Biochemistry* 92, 1995-2000

Heems D., Luck G., Fraudeau C., Vérette E. (1998): Fully automated precolumn derivatization, on-line dialysis and high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in food, beverages and feedstuff. *Journal of Chromatography A* 798, 9-17

Helfman P.M., Bada J.L. (1975): Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 2891-2894

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

- Ingrosso D., D'Angelo S., di Carlo E., Perna A.F., Zappia V., Galetti P.** (2000): Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. *European Journal of Biochemistry* 267, 4397-4404
- Ingrosso D., Perna A.F.** (1998): D-amino acids in aging erythrocytes. *ESX* 85, 119-145
- Jackowski G., Liew C.-C.** (1980): Fractionation of Rat Ventricular Nuclei. *Biochem. J.* 188, 363-373
- Jenuwein T., Allis C.D.** (2001): Translating the Histone Code. *Science* 293, 1074-1080
- Johnson B.A., Najbauer J., Aswad D.W.** (1993): Accumulation of substrates for protein L-lysine methyltransferase in adenosine dialdehyde-treated PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 6174-6181
- Kaufmann D.S., Manley W.F.** (1998): A new procedure for determining DL amino acid ratios in fossils using reverse phase liquid chromatography. *Quaternary Geochronology* 17, 987-1000
- Kawakami K., Nakamura A., Ishigami A., Goto S., Takahashi R.** (2009): Age-related difference of site-specific histone modifications in rat liver. *Biogerontology* 10, 415-421
- Kim I. Xu W., Reed J.C.** (2008): Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 1013-1030

Kim S.C., Sprung R., Chen Y., Xu Y., Ball H., Pei J., Cheng T., Kho Y., Xiao H., Xiao L., Grishin N. V., White M., Yang X.J., Zhao Y. (2006): Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomic survey. *Molecular Cell* 23, 607-618

Kim E., Lowenson J.D., MacLaren D.C., Clarke S., Young S.G. (1997): Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6132-6137

Kincaid M.M., Cooper A.A. (2007): Misfolded proteins traffic from the endoplasmic reticulum (ER) due to ER export signals. *Molecular Biology of the Cell* 18, 455-463

Kosky A.A., Razzaq U.O., Treuheit M.J., Brems D.N. (1999): The effects of alpha-helix on the stability of Asn residues: Deamidation rates in peptides of varying helicity. *Protein Science* 8, 2519-2523

Lakatta E.G. (1993): Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiological Reviews* 73, 413-467

Liew C.-C., Jackowski G., Ma T., Sole M.J. (1983): Nonenzymatic separation of myocardial cell nuclei from whole heart tissue. *American Journal of Physiology* 244, C3-C10

Liew C.C., Sole M.J. (1978): Studies of nuclear proteins in the heart of the cardiomyopathic Syrian hamster-phosphorylation of histones. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 10, 847-855

Lindner H.H. (2008): Analysis of histones, histone variants, and their posttranslationally modified forms. *Electrophoresis* 29, 2516-2532

Lindner H., Helliger W. (2001): Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins. *Experimental Gerontology* 36, 1551-1563

Lindner H., Sarg B., Grunicke H., Helliger W. (1999): Age-dependent deamidation of H1° histones in chromatin of mammalian tissues. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 125, 182-186

Lindner H., Helliger W. (1990). Effects of eluent composition, ion-pair reagent and temperature on the separation of histones by high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 30, 518-522

Liu L., Wylie R.C., Andrews L.G., Tollefsbol T.O. (2003): Aging, cancer and nutrition: The DNA methylation connection. *Mechanisms of Ageing and Development* 124, 989-998

Margueron R., Trojer P., Reinberg D. (2005): The key to development: interpreting the histone code? *Current Opinion in Genetics and Development* 15, 163-176

Mazzanti M., DeFelice L.J. Cohen J., Malter H. (1990): Ion channels in the nuclear envelope. *Nature* 343, 764-767

McCudden C.R., Kraus V.B. (2006): Biochemistry of amino acid racemization and clinical application to musculoskeletal disease. *Clinical Biochemistry* 39, 1112-1130

McFadden P.N., Clarke S. (1987): Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: Implications for the cellular repair of damaged proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 2595-2599

McFadden P.N., Clarke S. (1982): Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: possible step in the repair of aged membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 2460-2464

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Méchin M.C., Enji M., Nachat R., Chavanas S., Charveron M., Ishida-Yamamoto A., Serre G., Takahara H., Simon M. (2005): The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ by their substrate specificities and subcellular locations. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 1984-1995

Meissner C., Ritz-Timme S. (2010): Molecular pathology and age estimation. *Forensic Science International* 203, 34-43

Minli X., Vander Velde D., Morton M., Borchardt R.T., Schowen R.L. (1996): pH-induced change in the rate-determining step for the hydrolysis of the Asp/Asn-derived cyclic-imide intermediate in protein degradation. *Journal of the American Chemical Society* 118, 8955-8956

Nakashima K., Hagiwara T., Yamada M. (2002): Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 49562-49568

Neeli I., Khan S.N., Radic M. (2008): Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *The Journal of Immunology* 180, 1895-1902

Nilsson M.R., Driscoll M., Raleigh D.P. (2002): Low levels of asparagine deamidation can have a dramatic effect in aggregation of amyloidogenic peptides: implications for the study of amyloid formation. *Protein Science* 11, 343-349

Oberdoerffer P., Sinclair D.A. (2007): The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 692-702

Ohtani S. (1995): Estimation of age from dentin by using the racemization reaction of aspartic acid. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 16, 158-161

Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. (2003): Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 552-565

Panyim S., Bilek D., Chalkley R. (1971): An Electrophoretic Comparison of Vertebrate Histones. *The Journal of Biological Chemistry* 246, 4206-4125

Reissner K.J., Aswad D.W. (2003): Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *Cellular and Molecular Life Sciences* 60, 1281-1295

Richardson B. (2003): Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Research Reviews* 2, 245-261

Ritz-Timme S., Laumeier I., Collins M. (2003): Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *International Journal of Legal Medicine* 117, 96-101

Ritz-Timme S., Collins M.J. (2002): Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing Research Reviews* 1, 43-59

Ritz-Timme S., Hrsg. Berg S. und Brinkmann B. (1999): Lebensaltersbestimmung aufgrund des Razemisierungsgrades von Asparaginsäure: Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche. *Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik* Band 23, Verlag Schmidt-Römhild, Lübeck

Rogers G.E., Harding H.W.J., Llewellyn-Smith I.J. (1977): The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohylin, an intracellular precursor. *Biochimica et Biophysica Acta* 495, 159-175

Roher A.E., Lowenson J.D., Clarke S., Wolkow C., Wang R., Cotter R.J., Reardon I.M., Zürcher-Neely H.A., Heinrikson R.L., Ball M.J., Greenberg B.D. (1993): Structural alterations in the peptide backbone of β -amyloid core protein may

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 3072-3083

Sarg B., Koutzamani E., Helliger W., Rundquist I., Lindner H.H. (2002): Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 39195-39201

Schägger H., von Jagow G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379

Schöneich C. (2008): Mechanisms of protein damage induced by cysteine thiyl radical formation. *Chemical Research in Toxicology* 21, 1175-1179

Shapira R., Austin G.E., Mirra S.S. (1988): Neuritic plaque amyloid in Alzheimer's disease is highly racemized. *Journal of Neurochemistry* 50, 69-74

Steenbergen C., Murphy E., Watts J., London R. (1990): Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circulation Research* 66, 135-146

Stefani M. (2004): Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochimica et Biophysica Acta* 1739, 5-25

Strahl B. D., Allis C. D. (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45

Takahara H., Okamoto H., Sugawara K. (1986): Calcium-dependent properties of peptidylarginine deiminase from rabbit skeletal muscle. *Agricultural and Biological Chemistry* 50, 2899-2904

Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe

Tarcsa E., Marekov L.N., Mei G., Melino G., Lee S.-C., Steinert P.M. (1996): Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 30709-30716

Terman A., Kurz T., Navratil M., Arriaga E.A., Brunk U.T. (2010): Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxidants & Redox Singaling* 12, 503-535

Terman A., Brunk U.T. (2004): Myocyte aging and mitochondrial turnover. *Experimental Gerontology* 39, 701-705

Thompson P.R., Fast W. (2006): Histone citrullination by protein arginine deiminase: Is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS Chemical Biology* 1, 433-441

Turner B.M. (2002): Cellular memory and the histone code. *Cell* 111, 285-291

Turner B.M. (2000): Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* 22, 836-845

Vigneswara V., Lowenson J.D., Powell C.D., Thakur M., Bailey K., Clarke S., Ray D.E., Carter W.G. (2006): Proteomic identification of novel substrates of a protein isoaspartyl methyltransferase repair enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 32619-32629

Vossenaar E.R., Zendman A.J.W., van Venrooij W.J., Pruijn G.J.M. (2003): PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays* 25, 1106-1118

Waite E.R., Collins M.J., Ritz-Timme S., Schutz H-W., Cattaneo C., Borrmann H.I.M. (1999): A review of the methodological aspects of aspartic acid racemization analysis for use in forensic science. *Forensic Science International* 103, 113-124

Wang Y., Li M., Stadler S., Correll S., Li P., Wang D., Hayama R., Leonelli L., Han H., Grigoryev S.A., Allis D., Coonrod S.A. (2009): Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of Cell Biology* 184, 205-213

Wakankar A.A., Borchardt R.T., Eigenbrot C., Shia S., Wang Y.J., Shire S.J., Liu J.L. (2007): Aspartate isomerization in the complementarity-determining regions of two closely related monoclonal antibodies. *Biochemistry* 46, 1534-1544

Young G.W., Hoofring S.A., Mamula M.J., Doyle H.A., Bunick G.J., Hu Y., Aswad D.W. (2005): Protein L-Isoaspartyl Methyltransferase catalyzes *in vivo* racemization of aspartate-25 in mammalian histone H2B. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 26094-26098

Young A.L., Carter W.G., Doyle H.A., Mamula M.J., Aswad D.W. (2001): Structural Integrity of Histone H2B *In Vivo* Requires the Activity of Protein L-Isoaspartate O-Methyltransferase, a Putative Protein Repair Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 37161-37165

Zhang J., Yip H., Katta V. (2011): Identification of isomerization and racemization of aspartate in the Asp-Asp motifs of a therapeutic protein. *Analytical Biochemistry* 410, 234-243

Zhang L., Eugeni E.E., Parthun M.R., Freitas M.A. (2003): Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* 112, 77-86

Zhu J.X., Doyle H.A., Mamula M.J., Aswad D.W. (2006): Protein repair in the brain, proteomic analysis of endogenous substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in mouse brain. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 33802-33813

8. Lebenslauf

PERSÖNLICHES

Name: Anna Neufeind
Geburtsdatum: 20. Juli 1984
Geburtsort: Hilden
Adresse: Kruppstraße 18
40227 Düsseldorf
Nationalität: Deutsch

AUSBILDUNG

seit Sept. 2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für
Anästhesiologie am Universitätsklinikum Düsseldorf

2004 – 2011 Studium der Humanmedizin
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2006

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2011

Approbation als Ärztin 2011

1996 – 2004 Gymnasium Hochdahl, Erkrath

1992 – 1996 Grundschule Sechseckschule, Erkrath