

***Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus  
humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin  
und Razemisierung von Asparaginsäure***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
vorgelegt der naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

von

Alexandra Stefanie Reckert  
aus Mülheim an der Ruhr

Düsseldorf, November 2013

Aus dem Institut für Rechtsmedizin  
Der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. Stefanie Ritz-Timme

Korreferent: Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.2014

Meiner Mutter  
Waltraud Reckert

## **Danksagung**

Diese Arbeit entstand zwischen 2006 und 2013 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, die stetige Motivation, die Anregungen, die konstruktiven Diskussionen, ihr allzeit offenes Ohr und auch für die Förderung durch ihre Bereitschaft mir zahllose Fortbildungsveranstaltungen zu genehmigen.

Bedanken möchte ich mich natürlich bei Professor William Martin, der trotz seines straffen Zeitplans bereit war, meine Doktorarbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu vertreten.

Dr. Sabine Metzger aus dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Betreuung während der massenspektrometrischen Untersuchungen. Ich danke dir für das unglaubliche Fachwissen von dem ich profitieren durfte, die stets konstruktive Kritik, die Verbesserungsvorschläge, die Motivation und die Integration in deine Arbeitsgruppe.

Besonderer Dank gilt der Jürgen Manchot Stiftung, die sie sich finanziell an meinem Projekt beteiligte.

Dank gebührt auch meiner Arbeitsgruppe im Proteinlabor der Rechtsmedizin: Anna, Bärbel, Christian, Inga, Julia, Nazan, Pitty und Reimer. Euch danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die Diskussionen und das produktive Miteinander im Labor.

Natürlich danke ich auch allen anderen Kollegen in der Rechtsmedizin, den „nicht Proteinis“. Danke der Sektionsabteilung fürs Gewebesammeln, den Ärzten für die Hilfe bei den histologischen Untersuchungen und allen Anderen fürs diskutieren, Trösten, Schoki-teilen und die Aufnahme in eure Gemeinschaft.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für ihr Verständnis, dass ich gerade in der letzten Phase der Doktorarbeit viel zu wenig Zeit für sie hatte. Danke dass ihr mich bei Laune gehalten habt, für die Spieleabende, die Unternehmungen und das ihr einfach immer für mich da seid.

Aber mein größter Dank gebührt meiner Mutter. Sie hat mich Zeit meines Lebens in wirklich allem unterstützt, mir den Rücken gestärkt und immer an mich geglaubt.

Ohne Euch wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen – Danke!

Eure Alex

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Posttranslationale Modifikationen von Histonen in Epigenetik &amp; Alterungsprozessen</b>	<b>1</b>
1.1.1 Histone	1
1.1.2 Posttranslationale Modifikationen der Histone (Epigenetik & Histoncode)	2
1.1.3 Posttranslationale Histonmodifikationen in Alterungsprozessen	3
<b>1.2 Intravitale Razemisierung von Asparaginsäure (AAR)</b>	<b>4</b>
1.2.1 Intravitale Razemisierung/Isomerisierung & Deamidierung in Proteinen	4
1.2.2 Der Mechanismus I: Razemisierung & Isomerisierung	6
1.2.3 Reparaturenzym Protein-L-Isoaspartyl-Methyltransferase (PIMT)	7
1.2.4 Quantifizierung razemisierter Asx-Reste	8
1.2.5 Der Mechanismus II: Deamidierung	8
<b>1.3 Deiminierung von Argininresten</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Zielsetzung</b>	<b>11</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Gewebeauswahl</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Histologie</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Präparation</b>	<b>16</b>
2.3.1 Gewebeaufschluss	16
2.3.2 Histonisolation & Fällung	17
2.3.3 Histontrennung – RP-HPLC (FPLC)	17
2.3.4 Gelelektrophorese – Überprüfung der Histontrennung	18
2.3.5 Proteinbestimmung nach Lowry	18
<b>2.4 Razemisierungsanalytik</b>	<b>19</b>
<b>2.5 Aminosäureanalytik – Quantifizierung des Citrullingehalts</b>	<b>20</b>

<b>2.6 Präparation für die Massenspektrometrie</b>	<b>21</b>
2.6.1 Tryptischer Verdau	22
2.6.2 Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid	23
2.6.3 Deiminierung von Peptidylarginin mittels PAD4	24
2.6.4 Chromatographische Trennung tryptischer Peptide	24
2.6.5 Entsalzung tryptischer Peptide	25
<b>2.7 Citrullinnachweis – Western-Blot</b>	<b>26</b>
<b>2.8 Citrullinnachweis – ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)</b>	<b>27</b>
<b>2.9 Massenspektrometrische Analytik</b>	<b>29</b>
2.9.1 Massenspektrometrie Grundlagen	29
2.9.2 Massenspektrometrische Analysen	30
2.9.3 Datengewinnung und –auswertung	31
2.9.4 Strategie zur massenspektrometrischen Detektion deamidierter bzw. deiminierter Peptide	32
<b>2.10 Eingesetzte Lösungen</b>	<b>34</b>
2.10.1 Gewebeaufschluss & Histonisolierung	34
2.10.2 Gelelektrophorese	34
2.10.3 Razemisierungsanalytik	36
2.10.4 Aminosäureanalytik – Citrullinbestimmung	37
2.10.5 Präparation für die Massenspektrometrie	37
2.10.6 Citrullinnachweis – Western-Blot	38
2.10.7 Citrullinnachweis – ELISA	39
<b><u>3. Ergebnisse</u></b>	<b><u>40</u></b>
<b>3.1 Qualität der Aufreinigung der Histone aus humanem Lebergewebe</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Razemisierungsgrad von Asx in Histonen aus humanem Lebergewebe</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Citrullin in Histonen aus humanem Lebergewebe</b>	<b>44</b>
3.3.1 Aminosäureanalytik	44

3.3.2 Citrullinbestimmung – Western-Blot	49
<b>3.4 Massenspektrometrische Analytik</b>	<b>50</b>
3.4.1 Detektion von Deamidierungsstellen in Histonen	50
3.5.2 Detektion von posttranslationalen Histoncode-Modifikationen in Histonen aus humanem Lebergewebe	52
3.4.3 Detektion von Deiminierungsstellen	57
<b>3.5 Versuche zur Identifikation &amp; Isolation deamidierten bzw. deiminierten Materials (Proteine/Peptide)</b>	<b>59</b>
3.5.1 Chromatographische Auftrennung tryptischer Peptide und Identifikation von Fraktionen mit razemisiertem (deamidierten) und deiminierten Peptiden zum konzentrierten Einsatz in der Massenspektrometrie	59
3.5.2 ELISA zur Identifikation von Fraktionen mit deiminiderten Peptiden zum konzentrierten Einsatz in der Massenspektrometrie	60
<b>3.6 Anreicherung von Peptidylcitrullin in Histonen H2B &amp; H3 mittels <i>in vitro</i> Deiminierung durch PAD4</b>	<b>61</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Qualität der Aufreinigung der Histone aus humanem Lebergewebe</b>	<b>62</b>
<b>4.2 Razemisierung von Asx in Histonen aus intraviral gealtertem Lebergewebe</b>	<b>63</b>
4.2.1 Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Razemisierungskinetik & die Untersuchungsergebnisse	64
4.2.2 Razemisierungsgrad von Asx in den aufgereinigten Leberhistonen	64
4.2.3 Korrelation der Akkumulation von Asx-Modifikationen mit dem Lebensalter	66
4.2.4 Biologische Folgen der <i>intra vitalen</i> Deamidierung & Razemisierung sowie Isomerisierung von Asx- Resten in Histonen	66
4.2.5 Lokalisation von Deamidierungsstellen in Histonen	67
<b>4.3 Citrullin in Histonen aus <i>intra vital</i> gealtertem Lebergewebe</b>	<b>68</b>
4.3.1 Akkumulation von Citrullin in Histonen aus Lebergewebe mit zunehmendem Alter	69
4.3.2 Biologische Folgen, Funktion und Determinanten der Deiminierung von Arg in Histonen	70

4.3.3 Lokalisation von Deiminierungsstellen	73
<b>4.4 Detektion von posttranslationalen Histoncode-Modifikationen in Histonen</b>	<b>74</b>
<b>5. Zusammenfassung/ Abstract</b>	<b>78</b>
<b>6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>9. Anhang Histonsequenzen</b>	<b>97</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Posttranslationale Modifikationen von Histonen in Epigenetik und Alterungsprozessen**

#### **1.1.1 Histone**

Histone sind kleine, basische, hoch konservierte Proteine, die im eukaryotischen Zellkern vorkommen (Zhang *et al.* 2004) und dort als Bestandteil des Chromatins zum Einen für die strukturelle Organisation der DNA verantwortlich sind und zum Anderen bei der Transkriptionskontrolle eine essentielle Rolle spielen. Die freien N-terminalen Bereiche (Tails) dienen zur Interaktion mit der DNA und anderen regulatorischen Molekülen (Zhang *et al.* 2002). Es sind 5 Gruppen von Histonen beschrieben: H2A, H2B, H3, H4 und H1. H2A, H2B, H3 und H4 gehören zu den so genannten „Core“-Histonen, wobei je 2 von jeder Gruppe zusammen ein Oktamer, den „Core“-Partikel, bilden. Um diesen legt sich mit etwa 147 Basenpaaren die DNA in 2 großen Linkswindungen, die außen von den „Linker“-Histonen der Gruppe H1 fixiert wird (Zhang *et al.* 2002). Diese strukturellen Einheiten werden als Nukleosomen bezeichnet. Die Nukleosomen bilden, als eine der am höchsten konservierten Strukturen (Turner 2005) die funktionalen Einheiten der Grundbausteine des makromolekularen Komplexes Chromatin (Dawson & Kuoazarides 2012), der für die „Verpackung“ der DNA im Zellkern mit einer 30-40 fachen Komprimierung der DNA sorgt (Luger *et al.* 1997; Basset *et al.* 2009).

Die Histone selbst bestehen aus einem N-terminalen, unstrukturierten Bereich (Tail) und einem globulären Bereich. Vornehmlich am N-Terminus stattfindende posttranslationale Modifikationen sind maßgeblich an der epigenetischen Kontrolle der Genregulation beteiligt und für die Zellfunktion notwendig (Tan *et al.* 2011, Munshi *et al.* 2009, Wang *et al.* 2009, Robinson & Robinson 2004, Jenuwein & Allis 2001, Strahl & Allis 2000).

### 1.1.2 Enzymatisch vermittelte posttranslationale Modifikationen der Histone (Epigenetik & Histoncode)

Histone sind aber nicht nur als Baustein für die Struktur des Chromatins wichtig, sondern dienen auch als Matrix zur Erstellung eines DNA-Zugangscodes, des so genannten **Histon-Codes**.

Als Histon-Code wird das komplexe, hochvariable Muster der posttranslationalen Histonmodifikationen bezeichnet (am Tail, wie auch an der globulären Region), das als Plattform hochselektiver Bindungsstellen für spezifische regulatorische Proteine den Zugang zur DNA und damit nukleäre Prozesse wie z. B. die Aktivierung und Repression der Transkriptionsvorgänge oder die Inaktivierung von Genen (Silencing) beeinflussen/beeinflusst (Mellor 2006, Biel *et al.* 2005).

Die **Epigenetik** befasst sich mit den Faktoren, die ohne die Veränderung des Genotyps eine Veränderung im Phänotyp verursachen können. Zum epigenetischen „Silencing“ zum Beispiel können 3 Faktoren beitragen: die DNA-Methylierung, das RNA-assoziierte Silencing und die Histon-Code-Modifikationen (Biel *et al.* 2005, Egger *et al.* 2004). Daher zählen die Histon-Code-Modifikationen zu den epigenetischen Regulationsmechanismen.

Posttranslationale Modifikationen an Histonen lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die (1.) enzymatisch vermittelten Modifikationen und die (2.) nicht-enzymatisch und spontanen Modifikationen. Zu den enzymatisch vermittelten posttranslationalen Modifikationen von Histonen gehören die Methylierung (Me) von Arginin (Arg) und Lysin (Lys), ebenso wie die Acetylierung (Ac) von Lysin und Serin (Ser). Bei den Methylierungen und Acetylierungen handelt es sich um die beiden häufigsten Modifikationen an Lysin-Resten (Zhang *et al.* 2004). Sie regulieren die Gentranskription (Yang *et al.* 2009). Die Acetylierung von Lysin neutralisiert die positive Ladung des Lysins und schwächt so die Interaktion zwischen Histon und DNA (Dekondensation) reversibel (Yoshida *et al.* 1990, Dawson & Kuoazarides 2012). Die Methylierung verändert zwar nicht die Gesamtladung des Histons, aber mit steigendem Methylierungsgrad wird die Basizität, Hydrophobie und Affinität

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

gegenüber anionischen Molekülen wie der DNA beeinflusst (Biel *et al.* 2005). Eine wichtige Rolle bei den enzymatisch vermittelten Modifikationen spielt auch die Deimierung, bei der ein Arginin mit Hilfe der Peptidylarginindeimnase (PAD) zu einem Citrullin umgewandelt wird, dessen Bildung antagonistisch zu Methylierungen am Arginin wirken kann (Bicker & Thompson 2012). Eine weitere enzymatische posttranslationale Modifikation von Histonen ist die Phosphorylierung von Serin (Ser), Threonin (Thr) oder Tyrosin (Tyr). Sie wirkt sich z. B. an H 3 aktivierend auf die Transkription aus (Novak & Corces 2000). Weiterhin häufig beschrieben werden unter Anderem die Ubiquitinierung, Sumoylierung sowie Glykosylierung (Zhang 2003, Sun & Allis 2002, Shiiro & Eisenman 2003, Cloos & Christgau 2004). Durch die Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten verschiedener Modifikationen allein am N-terminalen Bereich ergibt sich eine große Komplexität von Modifikationen (in ihrer Gesamtheit auch als des Histon-Code bezeichnet). So können zum Beispiel Argininreste 1-2 Methylreste (Mono- oder Dimethylierung) und Lysinreste bis zu drei Methylreste (Mono-, Di- oder Trimethylierungen) tragen (Anunziato & Hansen 2000, Munshi *et al.* 2009,).

### **1.1.3 Nicht-enzymatisch vermittelte posttranslationale Histonmodifikationen in Alterungsprozessen**

Zu den nicht-enzymatisch vermittelten posttranslationalen Modifikationen an Histonen gehören unter Anderem die Razemisierung, Isomerisierung und Deamidierung und Glykierung (Cloos & Christgau 2004, Cloos & Christgau 2001), Clarke 1987)

Histone sind langlebige Proteine, die partiell in modifiziertem Zustand nach der DNA-Replikation an die neu entstehenden Tochterzellen weitergegeben werden (Probst *et al.* 2009; Lindner *et al.* 1999). Jedoch wird ihr Umsatz durch den Umsatz der Zellen des jeweiligen Gewebes bestimmt. Dennoch zeigen Histone im Verlauf der Proteinalterung eine Akkumulation spontaner Aminosäuremodifikationen.

Eine Akkumulation von D-Asparagin (D-Asn) und D-Asparaginsäure (D-Asp) sowie von Iso-Asparaginsäure (Iso-Asp) in Histonen sowie die Glykierung von Lysinresten

konnten bereits nachgewiesen werden (Young *et al.* 2002 / 2005, Talasz *et al.* 2002, Cervantes-Laurean *et al.* 2005).

Das genaue Ausmaß sowie die biologischen Folgen dieser Modifikationen für die strukturelle und funktionelle Integrität des Chromatins sind bislang unbekannt. Es ist anzunehmen, dass solche Modifikationen die Struktur sowie die physikochemischen Eigenschaften der Histone beeinflussen und so die enzymatische Vermittlung des Histon-Codes und damit die Transkriptionskontrolle stören können. Für die Deamidierung wird wegen der resultierenden Ladungsänderung am N-Terminus eine Beeinflussung der Chromatinstruktur vermutet und die Akkumulation von L-Iso-Asp als eine der Hauptursachen der Proteinschädigung *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Neufeind 2011, Ogè *et al.* 2008, Carter und Aswad 2008, Zhu *et al.* 2006, Vigneswara *et al.* 2006, Capasso 1999).

## **1.2 Intravitale Razemisierung von Asparaginsäure (AAR)**

### **1.2.1 Intravitale Razemisierung/Isomerisierung & Deamidierung in Proteinen**

Die Proteinbiosynthese von Aminosäuren und ihre weitere Synthese zu Proteinen erfolgt bei höheren Lebewesen über L-Aminosäuren. Daher enthalten neu synthetisierte Proteine nur L-Aminosäuren. Nach der Synthese kann es zu einer großen Zahl verschiedener Modifikationen kommen, auch zu spontanen Modifikationen, wie der Razemisierung, Isomerisierung und Deamidierung von Asparaginsäure- oder Glutaminsäureresten (Clarke 1987).

Im Verlauf des Razemisierungsprozesses erfolgt die Umwandlung des L-Enantiomers einer Aminosäure in das entsprechende D-Enantiomer. Asparagin (Asn) und Asparaginsäure (Asp) bilden innerhalb der Aminosäuresequenz von Proteinen so genannte „Hot-Spots“ die für Razemisierungs-, Deamidierungs- und Isomerisierungsereignisse besonders anfällig sind (Robinson & Robinson 2004, Fujii *et al.* 1999, Geiger & Clarke 1987). Diese Modifikationen treten vornehmlich während der „physiologischen“ Proteinalterung, aber auch unter ungünstigen Umgebungsbedingungen wie oxidativem Stress oder der Einwirkung von UV-

Strahlung, auf und werden häufig im Zusammenhang mit Phänomenen des physiologischen und pathologischen Alterns gebracht (Robinson & Robinson 2004, Ritz-Timme & Collins 2002, Fujii *et al.* 2002, Ingrosso *et al.* 2000). Eine Akkumulation veränderter Asn- und Asp-Reste wurde auch für intrazelluläre Proteine beschrieben, da, sie abhängig von der Lebensdauer des Proteins, der Geschwindigkeit der Razemisierungsreaktion, der Struktur des Proteins (Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur) und vom Vorhandensein adäquater Reparaturmechanismen sind (Robinson & Robinson 2004, Ritz-Timme 1999).

Proteine mit kurzer „Lebensdauer“, also hohem „Turnover“ werden abgebaut, bevor es zu einer Akkumulation von D-Asx kommen kann (vgl. Abb. 1, rot-gepunktete Linie).

Bei Proteinen mit geringem „Turnover“ ist zwar eine Akkumulation von D-Asx zu beobachten, jedoch ist eine Korrelation mit dem Lebensalter nicht signifikant (vgl. Abb. 1 grün-gestrichelte Linie), weil durch neu synthetisierte Proteine immerzu L-Asx-Reste einfließen. In permanenten Proteinen (ohne / mit vernachlässigbarem „Turnover“) ist es möglich, dass eine Akkumulation von D-Asx mit dem Lebensalter korreliert (vgl. Abb. 1, blaue Linie) (Ritz-Timme & Collins 2002, Ritz-Timme 1999). Eine solche Korrelation zwischen akkumulierten Asx-Resten und dem Lebensalter ist in der Literatur mehrfach an diversen Proteinen beschrieben worden, wie zum Beispiel bei Elastin, Dentinproteinen und Osteocalcin (Ritz-Timme *et al.* 2003, Waite *et al.* 1999, Ritz-Timme 1999, Carolan *et al.* 1997, Ohtani 1995, Ritz *et al.* 1990, Helfman & Bada 1975).

Die Aufreinigung der Proteine und die Bestimmung der D-Asparaginsäurewerte waren in der Rechtsmedizin Grundlage für die Einführung präziser Verfahren zur Lebensaltersschätzung durch Nutzung dieser „molekularen Uhr“ (Neufeind 2011, Ritz-Timme *et al.* 2003, Ritz-Timme 1999).

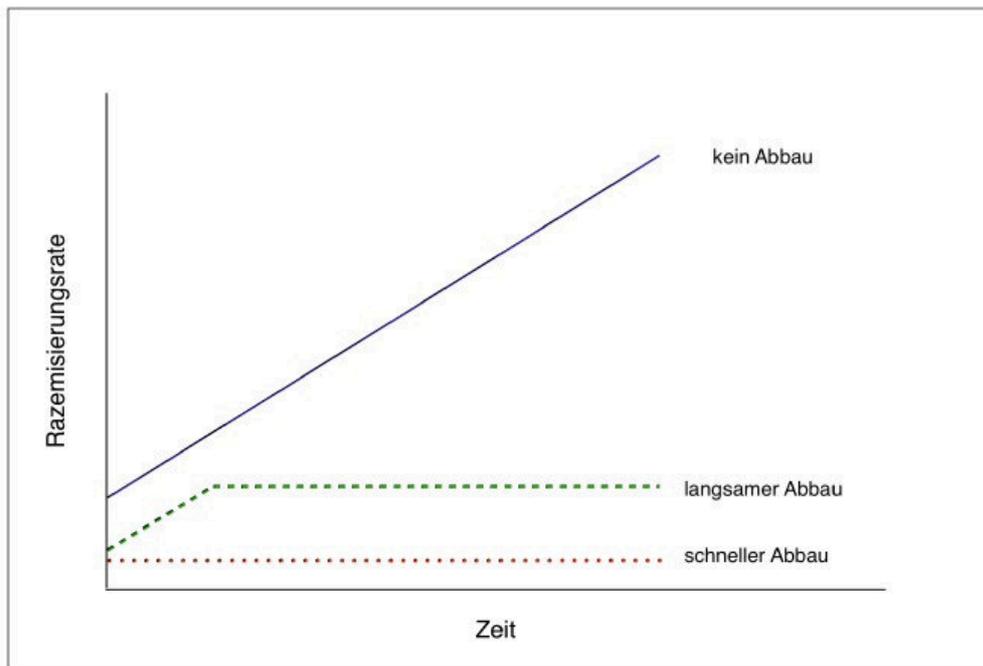


Abb. 1. Theoretische Beziehung zwischen dem Razemisierungsgrad von Asx und dem Proteinalter. Rot gepunktete Linie: Proteine mit schnellem Turnover, grün gestrichelte Linie: Proteine mit langsamem Turnover, blaue Linie: permanente Proteine (kein Turnover) (nach Neufeind 2011)

### 1.2.2 Reaktionsschema I: Razemisierung & Isomerisierung

Abbildung 2 zeigt den Reaktionsmechanismus einer Razemisierung, Isomerisierung (und Deamidierung) am Beispiel von Asparagin.

Zuerst erfolgt eine Deamidierung an L-Asn (Abspaltung von  $\text{NH}_3$ ). Es bildet sich ein metastabiles L-D-Succinimid-Intermediat. Aus diesem können 4 Produkte entstehen. Ausgehend vom L-Succinimid können L-Asp (Deamidierung) oder L-Iso-Asp entstehen (Isomerisierung). Aus dem D-Succinimid ist die Bildung von D-Asp (Razemisierung/Deamidierung) oder D-Iso-Asp (Razemisierung/Isomerisierung) möglich (Cournoyer & O'Connor 2009, Robinson & Robinson 2004, Aswad 1995, Bischoff & Kolbe 1994). Die Aminosäuren D-Iso-Asp und D-Asp entstehen allerdings in kleineren Mengen als L-Asp und L-Iso-Asp (Kim *et al.* 1997).

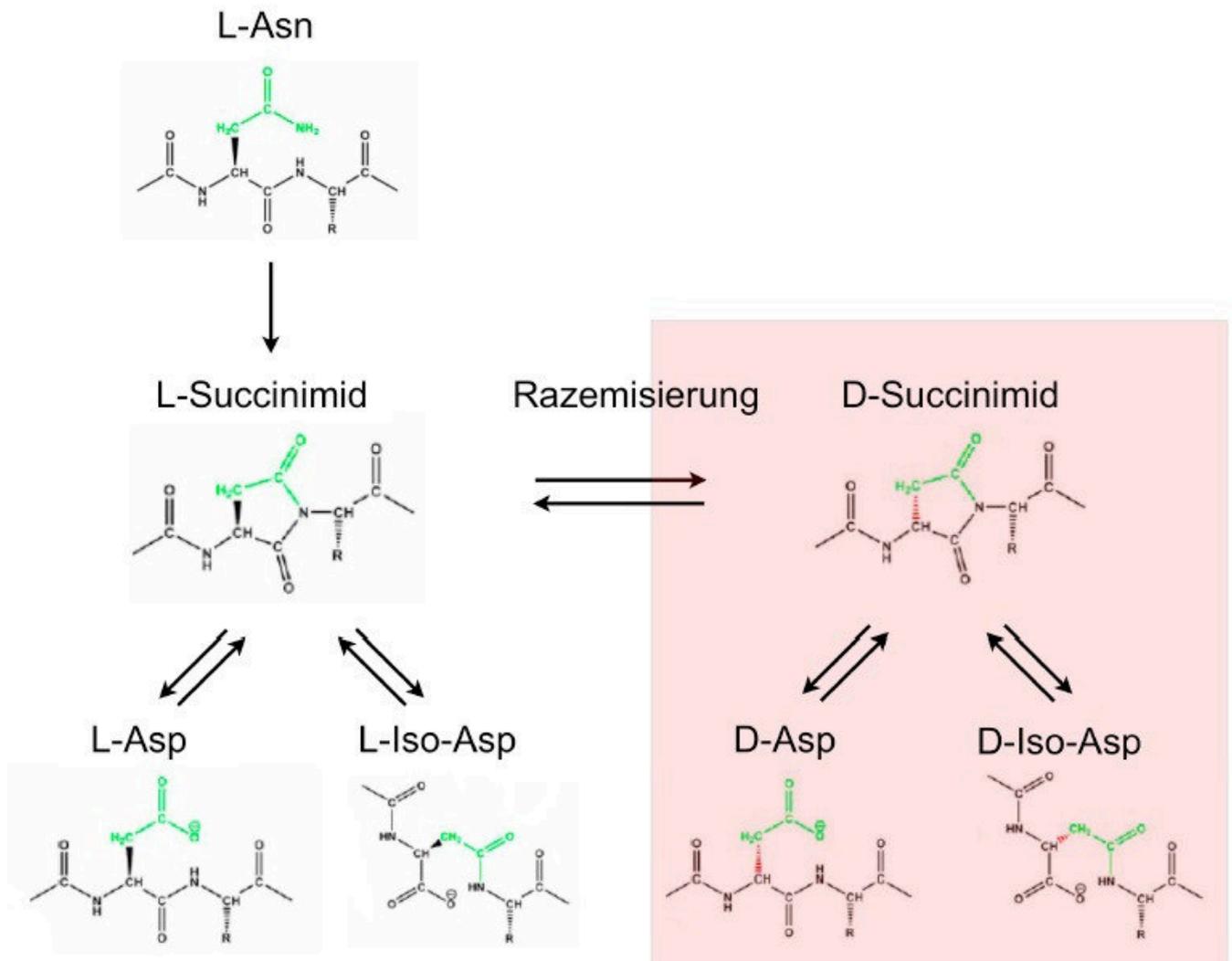


Abb. 2 Entstehung von D-Asparaginsäure- und D-Iso-Asparaginsäureresten durch spontane Modifikationen von Asn- und Asp-Resten (verändert nach Clarke 1987). Asn = Asparagin, Asp = Asparaginsäure.

### 1.2.3 Reparaturenzym Protein-L-Iso-Aspartyl-Methyltransferase (PIMT)

Die Aktivität des Reparaturenzyms PIMT reduziert normalerweise die Menge der entstandenen Iso-Asp-Reste, indem es selektiv L-Iso-Asp-Reste zu einem methyliert? (Abb. 3), welcher wiederum in das metastabile Succinimid-Intermediat zerfällt und dann zu L-Asp bzw. L-Iso-Asp hydrolysiert werden kann (Young *et al.* 2005, Robinson & Robinson 2004, Reissner und Aswad 2003, Young *et al.* 2001, Kim *et al.* 1997). Allerdings kann die Aktivität der PIMT auch zu einer verstärkten Akkumulation von D-Asparaginsäureresten führen. Der Methylierungs-/Demethylierungszyklus produziert etwa 30 % L-Asp und ca. 70 % L-Iso-Asp und

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

kann auch zu jeder Zeit in der das metastabile Succinimid-Intermediat entsteht eine Razemisierung zu D-Asp und D-Iso-Asp fördern (Abb. 2 & 3), die für die PIMT kein Substrat darstellen (Young et al. 2005/2001, McFadden und Clarke 1987).

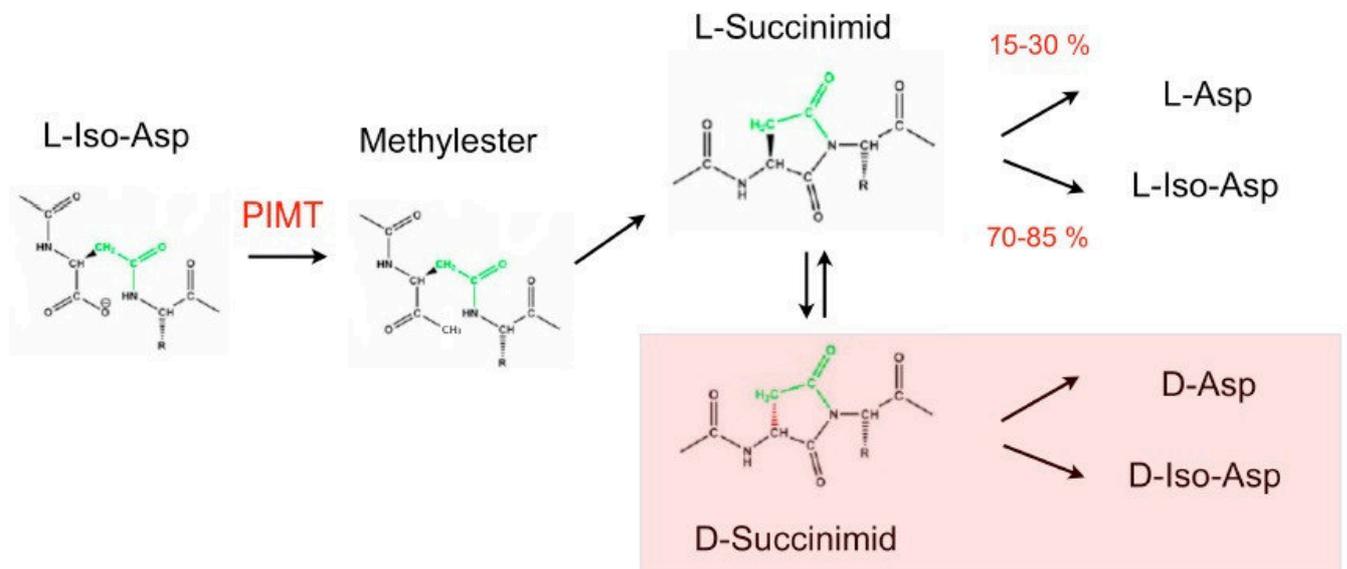


Abb.3. Methylierung von L-Iso-Asp durch die PIMT mit anschließendem spontanem Zerfall zu L-Succinimid, das wiederum zu L-Asp (15-30%) und L-Iso-Asp (70-85%) hydrolysiert wird (verändert nach Reissner und Aswad 2003). Asn = Asparagin, Asp =Asparaginsäure.

### 1.2.4 Quantifizierung razemisierter Asx-Reste

Üblicherweise erfolgt Quantifizierung razemisierter Asx-Reste nach hydrolytischer Freisetzung der Aminosäuren über eine Gaschromatographie oder eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Heems *et al.* 1998). Durch die Bedingungen bei der sauren Hydrolyse wird Asparagin zu 100% deamidiert und liegt damit auch als Asparaginsäure vor, so dass keine Unterscheidung zwischen Asn und Asp (und Iso-Asp) mehr möglich ist und summarisch als „Asx“ bezeichnet werden.

### 1.2.5 Reaktionsschema II: Deamidierung

Die Deamidierung von Asparagin (Asn) und Glutamin (Gln) erfolgt irreversibel, wie in Abb. 4 & 5 dargestellt, unter Verlust einer Amid-Gruppe (als neutrales  $\text{NH}_3$ ) bei gleichzeitiger Addition einer Hydroxylgruppe (aus  $\text{H}_2\text{O}$ ). Sie ist die häufigste

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

posttranslationale Modifikation und verursacht eine Massenverschiebung („Massenshift“) von +0,984 Da (Cournoyer & O'Connor 2009). Eine Deamidierung erfolgt bei Asn schneller als bei Gln und die Deamidierungsraten werden durch sterische Effekte der Seitenketten der Nachbar-Aminosäuren beeinflusst (Robinson & Robinson 2004, Collins *et al.* 1999). Daher verläuft eine Deamidierung bei Asn-Gly, Asn-Ser, Asn-His, Ser-Asn-Gly, Glu-Asn-Asn, Leu-Asn-Gly, Leu-Asn-Asn besonders schnell, bei Asn-Leu jedoch verlangsamt (Cournoyer & O'Connor 2009, Cournoyer & O'Connor 2009, Chelinus *et al.* 2005, Robinson & Robinson 2004). Bei den Konstellationen Asn-Pro (Cournoyer & O'Connor 2009), Gly-Asn-Thr, Thr-Asn-Tyr, Tyr-Asn-Pro, Trp-Asn-Ser, Ser-Asn-Phe, Cys-Asn-Val, Ser-Asn-Thr, Trp-Asn-Ser, Phe-Asn-Trp, His-Asn-Ala, Phe-Asn-Ser, Ser-Asn-Lys, Gly-Asn-Val, His-Asn-His, Ser-Asn-Tyr, Leu-Asn-Tyr, Leu-Asn-Trp, Ser-Asn-Leu, Asn-Asn-Phe, Asp-Asn-Ala, Gly-Asn-Ser und Phe-Asn-Arg findet kein Deamidierungsprozess statt (Chelinus *et al.* 2005).

Eine Deamidierung kann einerseits durch die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine verlangsamt, andererseits können Veränderungen der Sekundärstruktur eine Deamidierung auch beschleunigen sowie bei Hitze einwirkung (Robinson & Robinson 2004).

In Histonen wurden bisher Deamidierungen von Asn bereits für H4 beschrieben und für die anderen Histongruppen angenommen/vermutet worden (Robinson & Robinson 2004). Robinson & Robinson (2004) postulieren, dass die Deamidierung von Asn in Histonen als „molekulare Uhr“ für die Entwicklung, Funktion, „Turnover“ und Alterung von Zellen und Organismen dienen. Als „Hotspot“ für eine Deamidierung wird Asp-Asn(25)-Ile in Histon H4 beschrieben (in humanem Milzgewebe wurden Deamidierungen bei zwischen 5-10 % der Asn-Reste beschrieben). Auch eine altersbedingte Akkumulation deamidierter Asn-Reste in Histon 1 aus Leber, Niere und Hirn von Ratte und Maus ist bereits beschrieben worden (Robinson & Robinson 2004, Lindner *et al.* 1999).

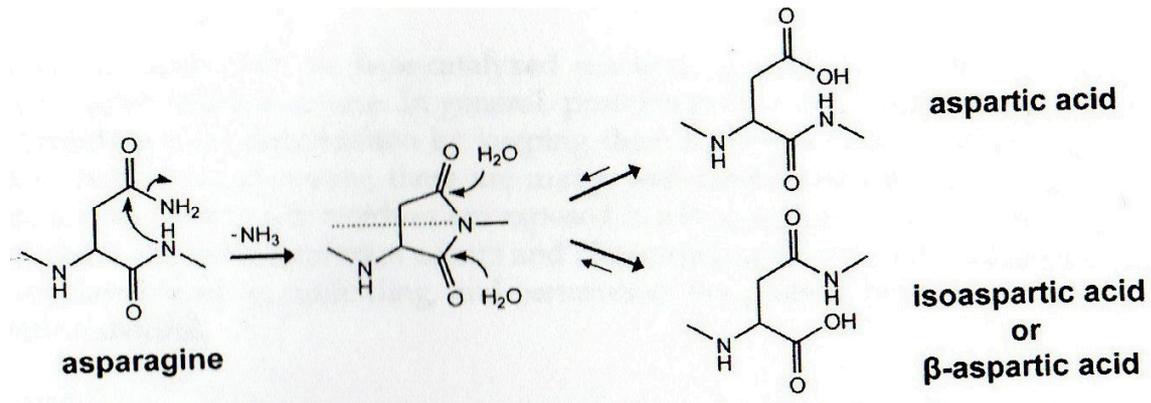


Abb. 4. Deamidierung von Asparagin resultiert in der Bildung von Asparaginsäure (aspartic acid) und Iso-Asparaginsäure (iso-aspartic acid) (Cournoyer & O'Connor 2009).

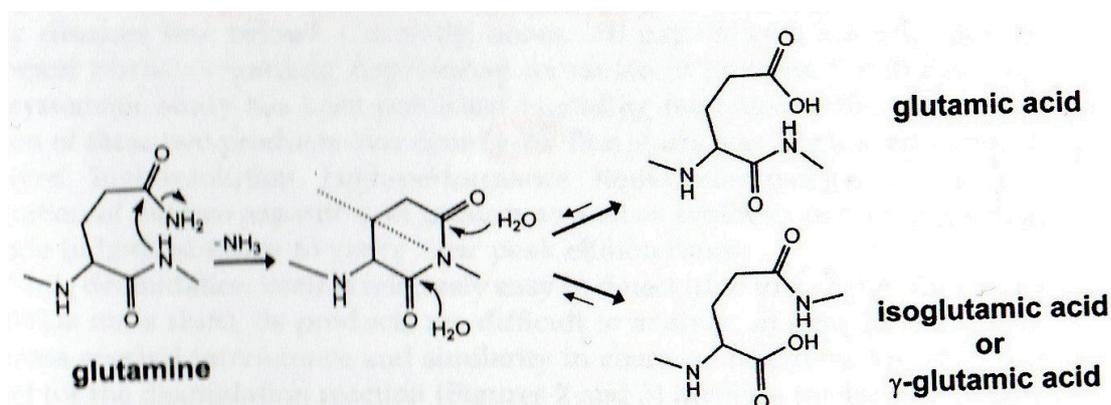


Abb. 5. Deamidierung von Glutamin resultiert in der Bildung von Glutaminsäure (glutamic acid) und Iso-Glutaminsäure (iso-gutamic acid) (Cournoyer & O'Connor 2009)

### 1.3 Deiminierung von Arginin-Resten

Bislang werden mehr als 300 Aminosäuren beschrieben, von denen jedoch nur 20 an der Proteinbiosynthese beteiligt sind (Akram *et al.* 2001). Citrullin gehört nicht zu diesen 20 Aminosäuren. In Proteinen wird enzymatisch die Umwandlung von Arginin zu Citrullin katalysiert, durch die Familie der Peptidylarginin-Deiminasen (PAD) (EC. 3.5.3.15) (Chanvanas *et al.* 2004, Arita *et al.* 2004, Vossenar *et al.* 2003, Asaga & Ishigami 2001). Die entscheidene/auffälligste Konsequenz der Deiminierung ist der Verlust der positiven Ladung des Arginins (vgl. Abb. 7) zu einem neutral geladenen Citrullin (Azuma *et al.* 1998). Die Deiminierung von Arginin-Resten in Histonen wird zur Zeit noch rege beforscht.

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

Sie wird bisher sowohl mit vielen physiologischen, als auch pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Bei physiologischen Prozessen spielt sie nach Györgi *et al.* (2006) eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Epidermis sowie der Regulation der Genexpression und Apoptose. Durch die Deiminierung können sowohl Methylierungsstellen in Histonen blockiert werden, als auch Mono-Methylierungen an Arginin-Resten aufgehoben werden (Cuthbert *et al.* 2004). Insoweit hat die Deiminierung von Arginin in Histonen einen unmittelbaren Einfluss auf den Histon-Code und wird diesem auch schon zugerechnet (Pratesi *et al.* 2013). Citrullinierte Histone sollen auch eine Rolle in der Pathophysiologie von Psoriasis, Rheumatoide Arthritis (RA) und Multipler Sklerose (MS) spielen (Arita *et al.* 2004).

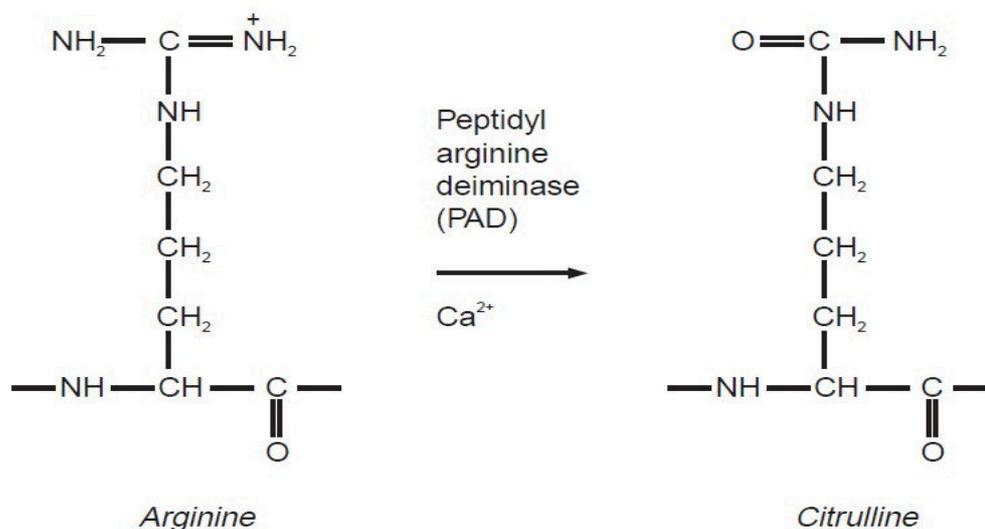


Abb. 7. Deiminierung von Peptidylarginin resultiert in der Bildung von Peptidylcitrullin (van Venrooij & Pruijn 2000).

## 1.4 Zielsetzung

Histone sind funktionell sehr wichtige Proteine; ihre posttranslationalen Modifikationen wiederum vermitteln bzw. bestimmen entscheidend die Proteinfunktion. Die bislang zu posttranslationalen Histonmodifikationen vorliegenden Daten stützen sich fast ausschließlich auf die Ergebnisse von in-vitro-Untersuchungen an Zellen aus Zellkulturen, die z.B. keiner natürlichen Alterung wie im Gesamtorganismus unterworfen waren.

Ziele der Arbeit waren:

- die Überprüfung der vorliegenden in-vitro-Daten an Zellen, die unter natürlichen Bedingungen im Gewebsverband gealtert sind. Dazu wurden Lebergewebeproben aus autoptisch entnommenem Material analysiert. Von besonderem Interesse waren dabei die spontanen Modifikationen, die in Zusammenhang mit (altersbedingten?) Funktionsveränderungen in der Literatur bereits angesprochen worden waren, nämlich insbesondere die Deamidierung von Asn-Resten, die Razemisierung von Asp-Resten und die Deiminierung von Arg-Resten,
- die Beschreibung der an in-vivo-gealterten Histonen detektierbaren posttranslationalen Modifikationen (inklusive der dem Histon-Code zugerechneten Modifikationen) im Molekül als erster Schritt zu einem besseren Verständnis der biologischen Folgen der posttranslationalen Histonmodifikationen.

Dabei wurde von folgenden Arbeitshypothesen ausgegangen:

- (1) Humane Histone zeigen auch intra vitam eine alters- und/oder umweltbedingte Akkumulation (spontaner) posttranslationaler Aminosäuremodifikationen, hierbei besonders an Asparagin-, Asparaginsäureresten sowie Argininresten (Bildung von Citrullinresten).
- (2) Diese verändern die Struktur sowie die physikochemischen Eigenschaften der Moleküle und können so die enzymatische Vermittlung des Histon-Codes und damit die Transkriptionskontrolle stören.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen und entlang der o.g. Zielsetzung wurde zusammenfassend folgendes Prozedere gewählt:

- Aufreinigung der Histone aus in vivo gealterten Zellen (autoptisch entnommenes Lebergewebe)
- Bestimmung des Razemisierungsgrades der Asx-Reste in den aufgereinigten Histonen; Prüfung des Zusammenhangs zwischen Lebensalter und dem D-Asp-Reste-Gehalt der Proben
- Bestimmung des Deiminierungsgrades der Arg-Reste in den aufgereinigten Histonen; Prüfung des Zusammenhangs zwischen Lebensalter und dem Citrullingehalt der Proben

- Massenspektrometrische Lokalisation deamidiertes Asn-Reste, deiminierter Arg-Reste und der dem Histoncode zugerechneten Modifikationen
- Auswertung und Interpretation der resultierenden „Modifikationskarte“.

## 2 Material und Methoden

Aus Hepatozyten von humanem Lebergewebe wurden zunächst die Zellkerne isoliert und daraus die Histone mittels Extraktion gewonnen. Über die Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC-Methodik) und Massenspektrometrie wurden posttranslationale Modifikationen detektiert und Modifikationsstellen bestimmt.

Abbildung 8 stellt die Arbeitsschritte schematisch dar:

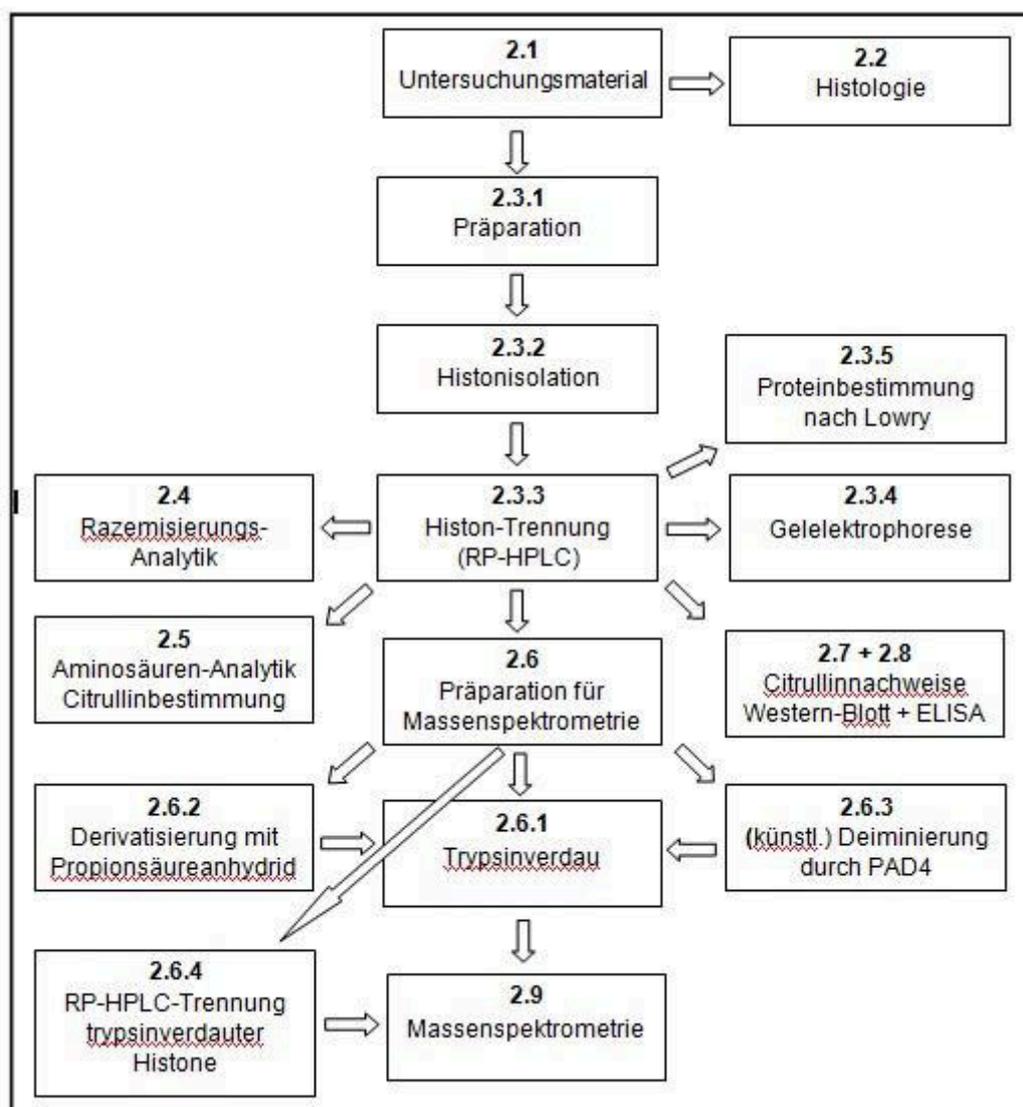


Abb. 8. Schematische Übersicht über das methodische Vorgehen

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

## 2.1 Gewebeauswahl

Ausgewählt wurden Lebergewebeproben, die vom Obduzenten während der Obduktion (postmortal) entnommen und als makroskopisch unauffällig beurteilt wurden. Die Leberproben wurden nach der Entnahme in Schraubdeckelgefäße überführt, mit den Daten des Verstorbenen und der Sektionsnummer versehen und in Formalin fixiert oder/und bei  $-25\text{ °C}$  tiefgefroren. Für die Durchführung der Untersuchung/Verarbeitung des Probematerials lag eine Zustimmung der Ethikkommission vor (Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Studiennummer 2671).

## 2.2 Histologie

Um sicherzustellen, dass das Gewebe nicht nur makroskopisch unauffällig war wurden die Formalin-fixierte Gewebeproben histologisch weiter untersucht. Die Anfertigung der mikroskopischen Präparate erfolgte im hiesigen histologischen Labor (durch Frau Bosilij (MTA)). Die Auswertung und Befundung der Präparate erfolgte durch einen Facharzt für Rechtsmedizin (Dr. med. Felix Mayer) im hiesigen Institut. Es wurden nur solche Gewebeproben für die weitere Analytik ausgewählt, die nach histologischer Beurteilung ohne pathologische Befunde waren. Zur morphologischen Beurteilung der zur Verfügung stehenden Gewebeproben wurden mikroskopische Präparate aus dem formalifixiertem Material hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Eine zusätzliche 5- Chromfärbung diente der Darstellung von bindegewebigen und elastischen Anteilen. Hierbei wurde eine Kombination aus der Elastika-Färbung nach van Gieson (EvG) und der Resorcin-Fuchsin-Färbung nach Weigert angefertigt (Lit der Färbungen).

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

## 2.3 Präparation

### 2.3.1 Gewebeaufschluss

Alle, für die folgende Präparation der Histone benötigten, Lösungen und Geräte wurden auf 4 °C vorgekühlt.

Im noch gefrorenen Zustand erfolgte die Portionierung und Einwaage des Gewebematerials, wobei die Mindestmenge 10 g betrug. Nach dem Abwiegen wurden die Gewebestücke mittels Skalpell und Pinzette in ca. 1-2 mm<sup>2</sup> Würfel geschnitten und in Schraubdeckelgefäße überführt.

Zur Hämolyse der Zellen wurden die Gewebewürfel mehrmals mit 50 ml 2 %-iger NaCl-Lösung (**a**) unter Zugabe eines Proteaseinhibitors (**b**) bedeckt und im Kühlschrank für je 20 min unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde die lysierte Lösung über ein Sieb abgossen. Der Waschvorgang wurde 2-3-mal wiederholt, bis die Organeigenfarbe hervortrat (die rote Färbung verschwunden war). Die weitere Aufarbeitung des Gewebes erfolgte mit wenigen Abwandlungen nach Young *et al.* (2001).

Nach der Hämolyse wurde das Lysat in ein vorgekühltes 100 ml Becherglas mit 40 ml des H<sub>2</sub>-Homogenisationspuffers (**c**) und 1 ml des Proteaseinhibitors (**b**) überführt und mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator homogenisiert, bis makroskopisch keine Gewebestücke mehr zu sehen waren. Danach wurde das Homogenisat durch ein mit Homogenisationspuffer (**c**) benetztes 300 µm Sieb gegeben um Bindegewebereste zu entfernen. Im Anschluss wurde die Lösung bei 1440 x g für 15 min zentrifugiert (Zentrifuge von Hettich; Typ Rotina 420R), der Überstand verworfen und das Pellet zur Entfernung von eventuell noch verbliebenen Blutresten mit 10 Vol. kaltem destillierten Wasser + 1 ml Proteaseinhibitor (**b**) gelöst. Mittels eines Schüttlers (Vortexer VWR VV3) wurde die Lösung vermischt und anschließend zentrifugiert, bei 1440 x g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und mit dem Pellet erfolgte anschließend die Histonisolierung.

### 2.3.2 Histonisolation und Fällung

Die Histonisolation erfolgte abgewandelt nach Young *et al.* (2001) durch saure Extraktion (Hydrolyse?) aus dem groben Kernpellet. Nach Zugabe von einem Volumen was??? Schwefelsäure? (**d**) wurde das Pellet gelöst und im Kühlschrank für 1 h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugation bei 3880 x g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß mit 40 ml kaltem (4 °C) Aceton überführt und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gefällt. Am nächsten Tag erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 3880 x g für 10 min bei 4 °C. Danach wurde der Überstand verworfen und es erfolgte ein finaler Waschschriff, indem das entstandene Pellet mit 5 Vol. einer Mischung aus Ethanol : Wasser (1:1v/v?) auf dem Vortexer geschüttelt wurde. Im Anschluss erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 3880 x g für 10 min bei 4 °C. Abschließend wurden die Pellets im Exsikkator getrocknet, bis sie sich durch leichtes Schütteln vom Gefäßboden lösen ließen und dann für weitere Analysen bei -25 °C gelagert.

### 2.3.3 Histontrennung – RP-HPLC (FPLC)

Aus dem gewonnenen Pellet wurden etwa 8 mg entnommen und in 600 µl Eluent A (**e**) gelöst, für 10 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert und dann bei 11.000 x g für 3 min (RT) zentrifugiert (Hettich, Mikro 200).

Die Probenlösung wurde in einer Spritze luftblasenfrei aufgezogen und in die Probenschlaufe des Gerätes injiziert. Die Auftrennung erfolgte nach Young *et al.* (2001) über eine RP-HPLC, ausgeführt mit einem FPLC-Gerät (*Fast Protein Liquid Chromatographie*) (Äkta-Explorer 900 Series, Amersham/Biosciences) über eine C18-Säule (Spezifikation: Jupiter 5u C18 300 A, 250\*10,00 mm 5 micron, Phenomenex).

Die Eluenten A (**e**) und B (**f**) wurden dabei mit einem Mischverhältnis von 35 % B gestartet und über einen linearen Gradienten über 70 min zu einer Konzentration von 70 % B gesteigert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 214 nm und die Signalstärke wurde in mAU dargestellt. Zusätzlich erfolgte eine automatische

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

Fraktionierung des Eluates in Fraktionen zu je 500 µl, welche nach Aliquotierung für Elektrophorese, HPLC- und MS-Analytik nach darauffolgender Trocknung (SA-Speed-Concentrator BAUC-300H, Saur) für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung standen.

### 2.3.4 Gelelektrophorese – Überprüfung der Histontrennung

Um die Histone voneinander zu trennen wurde das Verfahren der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) genutzt. Das Detergenz SDS hat dabei die Proteine gebunden und denaturiert und sorgte dafür, dass die Proteinmobilität im Gel von der Proteingröße bestimmt werden konnte. Die Histonfraktionen wurden in Aqua dest. gelöst und mit Probenpuffer (**g**) versetzt. Danach wurden die Proben bei 95 °C für 5 min denaturiert und im Anschluss bis zum Auftragen auf das Elektrophoresegel bei -25 °C gelagert. Die Gele wurden mittels eines Gießstandes der Elektrophoreseeinheit (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell, BioRad) hergestellt (Pipettierschema **h-I**). Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x Laufpuffer befüllt (**m**). Die Histonproben wurden auf ein Sammelgel (5 %) aufgetragen, das auf ein Trenngel (16 %) geschichtet war, in dem die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgte. Bei jedem Lauf wurde ein Molekulargewichtsmarker (Low range, M.W. 6,500 - 66,000, SigmaMarker™) sowie ein Histonmix – bestehend aus allen fünf Histon-Subtypen (Kalbsthymus, Roche 10 223 565 001) als Standard mitgeführt. Nach einer Laufzeit von 45-55 min bei 220 V, 60 mA und 9 W erfolgte die Proteinfärbung mittels einer Coomassie-Färbelösung (**n**) für 25 min. Im Anschluss folgte die Entfärbung nach Schagger & von Jagow (1987) (**o**) und die Fotodokumentation mittels eines Intas Gel-Imager

### 2.3.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry erfolgte mittels des Modified Lowry Protein Assay Kit (Produkt-Nr. 23240, Thermo Scientific) für die Nutzung auf Mikrotiterplatten. Bei jeder Messung wurde eine BSA-Standardreihe (über die

Konzentrationsstufen 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0 µg/ml = Blank) mitgeführt. Zudem wurde das Folin Ciocalteu Reagenz in einer Mischung von 1:1 mit HPLC-Wasser vor jeder Messung frisch angesetzt. Auf der Mikrotiterplatte wurden jeweils 40 µl Standard oder Probe des unbekanntem Proteingehalts je Well aufgetragen und je 200 µl des Lowry Reagenz zugesetzt. Dann folgte eine 30 sek Inkubation unter Schütteln und eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Weiter erfolgte die Zugabe von 20 µl Folin Ciocalteu Reagenz für 30 sek unter Schütteln, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Das Auslesen der Absorption erfolgte bei 750 nm über einen ELISA-Platten-Leser (DIALAB EL800). Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte über die mitgeführte Standardreihe.

## 2.4 Razemisierungsanalytik

Für die Ermittlung des Razemisierungsgrades von Asx (als D/L-Asx) in den Histonen wurden die in der RP-HPLC Aufreinigung gewonnenen Fraktionen der Histone in 1 ml einer 6 N Salzsäure (**p**) gelöst, in säuresaubere Reagenzgläser mit Schraubverschluß (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 bis zur Messung bei -25 °C gelagert.

Die Bestimmung des Razemisierungsgrades von Asx als D/L-Asx erfolgte mittels einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*) nach Kaufman & Manley (1998) und modifiziert nach Dobberstein *et al.* (2009), auf einem HPLC-Gerät (Agilent 1100 Series) einem Vakuumentgaser, einer quaternären Pumpe, einem programmierbarem Probengeber, einem Säulen-Thermostat sowie einem programmierbaren Fluoreszenzdetektor (FLD). Die Histon-Hydrolysate wurden entsprechend ihrer Proteinkonzentration eingestellt und in 40 µl Probenpuffer mit L-Homo-Arginin (**q**) aufgenommen und in Probengefäße für die HPLC überführt.

Für die Analyse des Razemisierungsgrades von D / L-Asx nach Kaufman und Manley (1998) wurden nur die primären Aminosäuren mit einem Derivatisierungsreagenz OPA/IBLC (N-Isobutyryl-L Cystein) (**r**) detektiert.

Die stationäre Phase stellte eine C18-Säule (Thermo-Electron-Corporation, Typ BDS Hypersil C18, Größe 250 x 3 mm, Partikelgröße 5 µm) dar.

Die Detektion der Aminosäurenderivate fand bei einer konstanten Flussrate von 0,56 ml / min, 25 C und über die Dauer von 115 min unter Verwendung eines binären Gradienten aus Eluent A (**s**) und Eluent B (**t**) als mobile Phase statt. Die Anregungswellenlänge des Fluoreszenzdetektors für die OPA-Derivate lag bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 230$  nm und die Detektionswellenlänge lag bei  $\lambda = 445$  nm. Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgte anhand eines Retentionszeiten-Abgleichs mit einer Reinsubstanzmischung in einem externen Standard.

Die Beurteilung der Aminosäuren erfolgte über die Integration der Fläche der Signale mit der Analysesoftware „HPChemStation“. Dabei wurden die Flächen der D- und L-Asx Signale bestimmt, indem die Fläche des L- Entantiomers als interner Standard (=100%) gesetzt und die Fläche des D-Asx dazu ins Verhältnis gesetzt wurde. Hieraus wurde der Razemisierungsgrad der Probe als D / L Verhältnis ermittelt. Es erfolgten Doppelbestimmungen und die Bildung der arithmetischen Mittelwerte aus den Einzelmessungen.

## 2.5 Aminosäureanalytik – Quantifizierung des Citrullingehaltes

Zur Quantifizierung des Citrullingehaltes wurden die Histon-Aliquots in 1 ml einer 6 N Salzsäure (**p**) gelöst, in säuresaubere Reagenzgläser mit Schraubverschluss (Pyrexröhrchen) überführt und anschließend für 24 h im Heizblock bei 110 °C hydrolysiert. Im Anschluss wurden die Proben im Vakuum getrocknet und bei -25 °C gelagert.

Die Bestimmung des Citrullingehaltes erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (1100 Series, Agilent Technologies), bestehend aus Vakuumentgaser, quaternärer Pumpe, programmierbarem Probengeber, Säulen-Thermostat sowie einem programmierbaren Fluoreszenzdetektor (FLD) nach von Heems *et al.* (1998) als leicht abgewandelte Methode. Die Hydrolysate wurden

entsprechend ihrem ursprünglichen Proteingehalt in Probenpuffer (**u**) aufgenommen und 40 µl der Lösung in HPLC-Probengefäße überführt. 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-Fluorenylmethyl-chloroformat (FMOC, Agilent Technologies) in der Probenkapillare des Probengebers unmittelbar vor der Analyse. Als Anregungswellenlänge wurde für OPA/3-MPA  $\lambda = 335$  nm gewählt, als Detektionswellenlänge  $\lambda = 440$  nm; als Anregungswellenlänge für die Detektion der sekundären Aminosäuren mit FMOC wurde  $\lambda = 260$  nm, und als Detektionswellenlänge  $\lambda = 315$  nm gewählt. Der Umschaltzeitpunkt lag bei 35 bzw. 38 Minuten. Als stationäre Phase diente eine C18-Säule (Thermo-Electron-Corporation, Typ BDS Hypersil C18, Größe 250 x 3 mm, Partikelgröße 5 µm, Thermo Scientific). Die mobile Phase bildete ein binärer Gradient aus Eluent A (**v**) und Eluent B (**w**), bei konstanter Flussrate von 1 ml / min bei einer Temperatur von 40 °C, über die Dauer von 75 min zur Elution der Aminosäurederivate. Identifiziert wurden die Signale über den Abgleich der Retentionszeiten mit denen von Reinsubstanzen in mitgeführten, externen Standards.

Die Quantifizierung wurde mithilfe der Analysensoftware „HPChemStation“ vorgenommen. Die Flächen der Signale wurden integriert. Zur Ermittlung des Gehalts an Citrullin wurde die Fläche unter dem Citrullinsignal sowie die Fläche unter dem Argininsignal berechnet. Die dem Arginin zugeordnete Fläche wurde als interner Standard (= 100%) gesetzt und die Fläche des Citrullinsignals dazu ins Verhältnis gesetzt. Für jede Probe wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt und anschließend das arithmetische Mittel berechnet.

## 2.6 Präparation für die Massenspektrometrie

Zur massenspektrometrischen Detektion von Deamidierungsstellen wurden von Herrn Dr. Reimer Dobberstein Histonproben zur Verfügung gestellt, bei denen durch Hitzeeinwirkung Deamidierungen induziert wurden. Die Histone wurden dabei in di-Natriumhydrogenphosphatpuffer (0,2 M; pH 9) gelöst und erhitzt. Zu definierten

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

Zeitpunkten erfolgte die Probenname für die Analytik. Das für diese Arbeit zur Verfügung gestellte Material wurde nach einer Inkubation von 60 min bei 80 °C entnommen.

### 2.6.1 Tryptischer Verdau

#### a) „in Lösungsverdau“

Um sequenzierbare Peptide für die massenspektrometrische Analyse zu erhalten wurden die denaturierten Proteine mit Trypsin (Sigma Proteomics Grade T6567) gespalten. Die Endoprotease Trypsin spaltete die Proteine an der carboxyterminalen Seite von Lysin- und Arginin. Arginin-Prolin- bzw. Lysin- Prolin-Bindungen waren hingegen resistent. Vor dem Verdau wurden die Histone und Trypsin (Sigma Proteomics Grade T6567) separat in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (**x**) gelöst. Um eine optimale Umsetzung zu erzielen wurde ein Verhältnis von Trypsin zu Protein von 1:20 gewählt. Bei 5 µg Protein entspricht dieses Mischungsverhältnis 0,25 µg Trypsin. Die Inkubation erfolgte über 2,5 h bei 37°C, . Anschließend wurde der Verdau 10 min bei 95°C inaktiviert und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingeengt.

Eine Übersicht über die Schnittstellen des tryptischen Verdaus findet sich im Anhang (vgl. Seite 98-102) Die Schnittstellen sind innerhalb der Histonsequenzen gelb unterlegt.

#### b) „in Gel Verdau“

Aus photodokumentierten Elektrophoresegelen wurden mittels Einwegskalpell die Histonbanden ausgeschnitten. Diese wurden danach in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten, in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Coomassie gefärbt mit Entfärber (**o**) ausgewaschen. Anschließend wurden 100 µl Ammoniumhydrogencarbonat-ACN-Puffer (**y**) zugegeben und unter Schütteln für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit einer Pipette abgenommen und in einem separaten Reaktionsgefäß für weitere Analysen aufgehoben. Des Weiteren wurde erneut 100 µl des Ammoniumhydrogencarbonat-ACN-Puffer (**y**) auf die Gelwürfel gegeben, für 30 min unter Schütteln inkubiert und die Lösung mit der Pipette

abgenommen und im Reaktionsgefäß gesammelt. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurden die Gelstückchen für 30 min mit reinem Acetonitril (ACN) gewaschen um Wasser aus den Gelstücken zu entfernen. Auch diese Lösung wurde mittels einer Pipette entfernt und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Nun wurden die Gelstücke in der Vakuumzentrifuge für 30 min getrocknet und im Anschluss in einem Vol. Trypsinlösung (**z**) für 30 min rehydriert und für die anschließende Inkubation (12-16 h bei 37 °C) großzügig mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (**x**) überschichtet. Die Lösung wurde mit einer Pipette abgenommen und in einem Reaktionsgefäß gesammelt (ab jetzt enthielten die Überstände Peptide). Die Gelstücke wurden mit 2 Vol. Wasser (HPLC-Grad) versetzt und 5 min unter Schütteln, dann 5 min im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex) inkubiert. Der Überstand wurde wieder ins Reaktionsgefäß überführt. Nun folgten drei identische Elutionsschritte. Die Gelstücke wurden mit 1 Vol. Elutionslösung (**a1**) versetzt, für 30 min unter Schütteln inkubiert und die Überstände im Reaktionsgefäß gesammelt. Die eluierten Peptide wurden dann in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingeengt und bis zur Analyse bei – 25 °C gelagert.

### 2.6.2 Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid (nach Garcia *et al.* 2007)

Zur Detektion der N-Termini der Histone wurde die folgende Derivatisierung der Peptidyllysine etabliert: Aufgereinigte Histonproben von 5 µg wurden in 5 µl Ammoniumbicarbonatpuffer (**b1**) 100 mM, pH 8 gelöst und weiter mit 2 µl Ammoniumhydroxidlösung (35 %) versetzt. Unmittelbar vor der Nutzung wurden 75 µl Propionsäureanhydrid (Sigma #240311) und 25 µl Methanol (HPLC-Grad) zusammengeführt, gemischt und kurz abzentrifugiert.

Zwanzig µl dieser Lösung wurden zu der Probe gegeben, gemischt und abzentrifugiert, dann wurde die Lösung durch Zugabe von Ammoniumhydroxidlösung (35 %) auf pH 8 eingestellt, die Probe bei 51°C für 20 min. inkubiert und anschließend in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingeengt. Die trockene Probe wurde erneut in 5 µl Ammoniumbicarbonatpuffer (**b1**) gelöst und die Derivatisierung wiederholt. Danach sollte die Reaktion zu 95 % erfolgt sein. Vor der

massenspektrometrischen Analyse erfolgte ein tryptischer „in Lösungsverdau“. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -25 °C gelagert.

### 2.6.3 Deiminierung von Peptidylarginin mittels PAD4

Da sich das Peptidylcitrullin im Probenmaterial in den massenspektrometrischen Analysen bisher nicht nachweisen ließ, wurden aufgereinigte Histone durch Inkubation mit humaner PAD4 (ModiQuest MQ16.203-10) *in vitro* deiminiert. Hierdurch sollte zum Einen gezeigt werden, ob der Nachweis von Peptidylcitrullin durch die massenspektrometrische Analytik möglich ist, zum Anderen Erkenntnisse zu Möglichkeiten der Isolation/Anreicherung deiminiertes Histone zu liefern.

Die Anwendung der Peptidylarginindeiminase erfolgte nach Anweisung des Lieferanten ModiQuest mit einer Modifikation im Deiminierungspuffer. Dieser wurde entgegen der Anweisung ohne DTT angesetzt, da dies den im Anschluss durchgeführten Trypsinverdau inhibierte.

Die Proteine wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in dem Deiminierungspuffer (**c1**) verdünnt. Die PAD4 (MQ-16.203-10 human, ModiQuest) wurde in einer Konzentration von 50 mU auf 100 µg Protein zugegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert.

### 2.6.4 Chromatographische Trennung tryptischer Peptide

Um den Ort der Deiminierung im Protein besser detektieren zu können wurden die Histone tryptisch verdaut und dieser Verdau dann chromatographisch über einen linearen Gradienten (mobile Phase) von 5 % B (Eluent A) (**d1**) bis 100 % B (**e1**) (Eluent B) in 60 min aufgetrennt (Äkta-Explorer 900 Series, Amersham/Biosciences). Als stationäre Phase diente eine Proteo-Säule von Phenomenex (C12 4 µm, A90, 475 sq.m/g, 15% carbon load).

Die Signalbereiche wurden über einen Fraktionierer automatisch gesammelt und im Anschluss an den Lauf eingetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-25^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.6.5 Entsalzung der tryptischen Peptide

Tryptisch-verdaute Peptidlösungen wurden über Festphasenextraktion von den Komponenten befreit, die bei massenspektrometrischen Verfahren die Analyse stören konnten.

#### a.) *PerfectPure C-18 Tip* (Eppendorf, Hamburg)

In 10  $\mu\text{l}$  Waschlösung (**f1**) wurden die zur Trocknung eingengten Peptide für mindestens 5 min gelöst. Währenddessen wurde ein *PerfectPure C-18 Tip* mit Elutionslösung (**g1**) initialisiert. Hierzu wurden 10  $\mu\text{l}$  der Lösung aufgezogen und in den „Waste“ entlassen; dieser Vorgang wurde 2 x wiederholt. Danach wurde der Tip mit der Waschlösung (**f1**) equilibriert, wobei 3 x 10  $\mu\text{l}$  der Waschlösung aufgezogen und in den „Waste“ abgelassen wurden. Nun wurden die gelösten Peptide auf das C-18 Material geladen, indem die Lösung aus dem Probengefäß 10 x in den Tip aufgezogen und wieder abgelassen wurde. Ungebundene Komponenten wurden mit der Waschlösung (**f1**) aus dem Tip gewaschen. Dazu wurden 3 x jeweils 10  $\mu\text{l}$  Waschlösung in den Tip aufgezogen und in ein separates Gefäß abgelassen. Diese Gefäße wurden für weitere Analysen zurückgestellt. Nun wurden die gebundenen Peptide aus dem Tip eluiert. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  Elutionslösung (**g1**) in den Tip aufgezogen und in ein „LowBind“ – Reaktionsgefäß abgelassen, erneut aufgezogen und wieder abgelassen und dies noch 5 x wiederholt. Der Tip wurde in ein Reaktionsgefäß abgeworfen und für weitere Analysen zurückgehalten. Entsalzte Peptide konnten nun in die *NanoES Capillaries* (Proxen Biosystems, Odense, Dänemark) geladen und in die Elektrospray-Quelle transferiert werden.

#### b.) „*StageTip*“ (Proxeon, Thermo Scientific) C-18 Tip

Das Peptidpellet wurde in 10 µl Waschlösung (**h1**) aufgenommen und mindestens 5 min gelöst. Derweil wurde der „*Stage-Tip*“ initialisiert, indem 10 µl der Initialisierungslösung (**i1**) luftblasenfrei in den „*Stage-Tip*“ pipettiert wurden. Die Lösung sammelte sich oberhalb der Matrix. Mit Hilfe eines auf den Tip gesetzten „*DispenserTip*“ wurde die Lösung durch die Matrix in den „Waste“ gedrückt. Der Vorgang wurde 1 x wiederholt.

Zum Equilibrieren wurden 10 µl Waschlösung (**h1**) auf die Matrix geben und mit dem „*DispenserTip*“ in den „Waste“ gedrückt; der Vorgang wurde 1 x wiederholt. Nun wurde die Peptidlösung auf die Matrix gegeben und mittels des „*DispenserTips*“ durchgedrückt, wobei die Lösung im Ursprungsgefäß aufgefangen und der Vorgang noch 2 x wiederholt wurde. Die ungebundene Lösung wurde durch Auftragen von 10 µl Waschlösung auf die Matrix ausgespült; beim Durchdrücken wurde die Lösung in Reaktionsgefäßen aufgefangen und für weitere Analysen zurückgestellt; der Zyklus wurde 2 x wiederholt. Die Elution erfolgte durch Auftragen von 10 µl Elutionslösung (**j1**) auf die Matrix, gefolgt vom Durchdrücken in ein Reaktionsgefäß für die Analyse, erneutem Schichten der so erhaltenen Probenflüssigkeit auf die Matrix mit anschließendem Durchdrücken; der Vorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Der „*Stage-Tip*“ wurde für weitere Analysen in einem Reaktionsgefäß zurückbehalten. Die eluierten Peptide konnten nun in die „*NanoES Capillaries*“ (Proxen Biosystems, Odense, Dänemark) geladen und in die Elektrospray-Quelle transferiert werden.

## 2.7 Citrullinnachweis – Western-Blot

Die Histon-Aliquots wurden wie unter Punkt 2.3.4 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. In jedem Gel wurde 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, Fermentas), ein Histonstandardmix (Kalbsthymus, Roche, 10 223 565 001) sowie eine Positivkontrolle Carboanhydrase (aus bovinen Erythrozyten, Sigma) mitgeführt.

Im ersten Schritt wurde das Gel in Transferpuffer (**k1**) überführt und für 10 min „equilibriert“. Eine PVDF-Membran (Porengröße 0,2 µm) wurde für 60 sek in Methanol

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

(HPLC-Grad) geschwenkt und dann für 2 min ebenfalls in Transferpuffer (**k1**) „equilibriert“. Membran, Gel, Filter und Schwammtücher wurden in die Transfer-Kassette eingelegt und in den mit Transferpuffer (4°C) gefüllten Tank des BIO-RAD-Systems (Model No. Mini-PROTEAN 3 Cell) eingepasst.

Gebloftet wurde insgesamt 4 Stunden bei 250 mA und 200 V. Alle nachfolgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten unter Nutzung eines Laborschüttlers.

Nach dem Blotten wurde die Membran 3 x 5 Minuten in 1 x PBS (**I1**) gewaschen.

Das Gel wurde zur Kontrolle des Transfers (analog der Schritte unter Punkt 2.3.4) gefärbt und entfärbt. Die Membran wurde derweil für eine Stunde im Wärmeschrank bei 37 °C mit 5 % BSA (**m1**) blockiert. Anschließend wurde diese über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5 Minuten mit 1 x PBST (**n1**) bei 37 °C gewaschen.

Als Primär-Antikörperbindung wurde ein polyklonaler Anti-Citrullin Antikörper (AB5612 aus Kaninchen, Millipore) mit 0,5 %-igem BSA (**m1**) im Verhältnis 1:1500 gemischt und mit der Membran für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Nächstes erfolgten 3 Waschschrte mit PBS (**I1**) (je 5 min. bei 37 °C). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonaler Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (AP 132P aus Ziege, Millipore) und 0,5%iges BSA (**m2**) im Verhältnis 1:2000 gemischt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es folgten wieder 3 Waschschrte mit PBST (**n1**) bei 37 °C. Im Anschluss wurde die Immunreaktion mit ECI (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate von Thermo Scientific) für eine Minute detektiert. Das Ergebnis der Immunreaktion wurde mittels eines Imagers (FujiFilm LAS-3000) fotografisch dokumentiert. Zur Identifikation aller Banden wurde die Membran danach nochmals gewaschen (3 x 5 min. mit PBST (**n1**) bei 37 °C) und dann für 20 min mit Amidoschwarz (**o1**) gefärbt (Proteinfärbung), mit Amidoschwarz-Entfärber (**p1**) entfärbt und ebenfalls photodokumentiert.

## 2.8 Citrullinnachweis – ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Als alternativer Weg zum Nachweis deiminerter Argininreste in Histonen wurde ein ELISA etabliert. Als zweite Anwendungsmöglichkeit dieser Methode wurde getestet

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

ob sich Peptidylcitrullin in Peptiden - wie sie nach einem tryptischen Verdau vorliegen - detektieren ließ und so eine Vorauswahl für die massenspektrometrische Analytik getroffen werden konnte. Von der Firma Millipore stand der Antikörper AB5412 zur Verfügung, als Sekundärantikörper wurde ein „Peroxidase-labelled“ Ziege anti-Kaninchen (Millipore) gewählt.

Bei jedem Ansatz wurde eine Verdünnungsreihe der Positivkontrolle mitgeführt; dabei handelte es sich um die Substanz die als Antigen bei der Herstellung des Antikörpers genutzt wurde (D/L Citrulline conjugate D/L Citrulline-G-BSA (Gemacbio AG064), als Negativkontrolle diente PBS/BSA (**q1**))

Im ersten Schritt wurden die Proben in je 200 µl Natriumcarbonatpuffer (**r1**) gelöst und auf die Microtiterplatte (maxisorp well plates, Nunc) aufgetragen und für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert („coating“). Die Sättigung der Platte erfolgte mit (je Well) 200 µl PBS/BSA (**s1**) für 1 Stunde bei 37 °C. Nun folgten 3 Waschschrte mit (je Well) 200 µl PBS (3 x 5 min unter Schütteln). In der Zwischenzeit wurde der Antikörper (AB5612 aus Kaninchen, Millipore) in der Konzentration 1:5000 in PBS/BSA (**m1**) gelöst und schließlich (je Well) 200 µl aufgetragen und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dann folgten 3 Waschschrte mit (je Well) 200 µl PBS (3 x 5 min unter Schütteln). Der Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG, Peroxidase Conjugated AP132P, Millipore) wurde in der Konzentration 1:10000 in PBS/BSA (**s1**) gelöst, dann je Well 200 µl aufgetragen und für 1 Stunde inkubiert. Hiernach erfolgten 3 Waschschrte mit PBS-Tween (**n1**) (3 x 5 min unter Schütteln). Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von (je Well) 100 µl TMB (Thermo Scientific TMB Substrate Kit #34021) ausgelöst, es folgte eine Inkubation von 30 min. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von (je Well) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Optische Dichte wurde bei 450 nm in einem ELISA-Reader (DIALAB EL800) ausgelesen. Die Bestimmung der Citrullinkonzentrationen erfolgte über die mitgeführte Standardreihe.

## 2.9 Massenspektrometrie

### 2.9.1 Massenspektrometrie – Grundlagen

Die Massenspektrometrie ist eine zentrale analytische Technik für das Studium von Biomolekülen (Domon & Aebersold 2006). Dabei werden die Molekülmassen freier Ionen im Hochvakuum bestimmt. Die Massenspektrometrie hat zunehmend an Bedeutung für die Proteinanalytik gewonnen, was auf die Entwicklung sanfter Ionisierungsmethoden wie ESI (**e**lectro**s**pray ionosation) oder MALDI (**m**atrix **a**ssisted **l**aser **d**esorption/ionisation) zurückzuführen ist (Kühlberg 2008).

Die massenspektrometrische Identifikation posttranslationaler Modifikationen der Histone wurde an einem Elektrospray-Hybrid-Massenspektrometer (ESI Qq-TOF) vorgenommen, das mit einer Nano-Spray-Quelle ausgerüstet ist (Q-Star XL, Applied Biosystems, Darmstadt).

Generell besteht ein Massenspektrometer aus den 3 Hauptkomponenten: Ionenquelle, (Massen)-Analysator und Detektor.

In der Ionenquelle werden aus der Analyt-Lösung (hier: bipolar & flüchtig = Methanol mit leichter Säure = Ameisensäure), welche tryptisch verdaute Histonpeptide enthält, positiv geladene Ionen freigesetzt, die dann zum Analysator geleitet werden.

Bei der Elektrospray (ESI)-Massenspektrometrie wird die flüssige Peptidmischung in eine metallbedampfte Glaskapillare mit einem sehr kleinem Durchmesser an der Spitze überführt (Nano-Elektrospray-Quelle). Hier wird ein elektrisches Feld zwischen der Kapillare (Anode) und einer Kathode angelegt. In der Flüssigkeit am Ende der Kapillare wird eine Spannungs-Akkumulation erzeugt, es bilden sich hoch geladene Tröpfchen, die aus dem Ende der Kapillare sprühen. Auf dem Weg durch das elektrische Feld hin zum Übergang (Interface) in den Analysator verdampft die Flüssigkeit in den Tropfen, was zur deren Explosion („*coulomb explosion*“) führt und einfach und/oder mehrfach geladene Ionen erzeugt, die das Interface passieren und durch einen Stickstoffstrom in die Hochvakuumzone des Analysatorbereichs gelangen.

Im (Massen)-Analysator werden die Ionen gemäß ihres Masse-/Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) getrennt und gegen ihre Intensität gelistet. Es gibt verschiedene Arten von Analysatoren, die auch unterschiedlich miteinander kombiniert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Identifikation der posttranslationalen Modifikationen eine Kombination aus Quadrupol (Q) und Time-of-Flight (TOF), ein Qq-TOF-Gerät genutzt. Ein Quadrupol-Massenanalysator besteht aus 4 Stabelektroden, die ein kombiniertes Wechsel-Gleichspannungsfeld erzeugen. Hier bewegen sich die Ionen eines definierten  $m/z$ -Verhältnisses auf stabilen, oszillierenden Bahnen und durchlaufen den Quadrupol. Die Ionen anderer  $m/z$ -Verhältnisse bewegen sich auf instabilen Bahnen und kollidieren mit den Stabelektroden. Im TOF-Massenspektrometer wird die Zeit gemessen, die ein Ion braucht um eine definierte Flugbahn von der Ionenquelle zum Detektor zu durchqueren. Ihre Geschwindigkeit erhalten die Ionen durch Beschleunigung im elektrischen Feld, sie hängt vom  $m/z$ -Verhältnis ab, das heißt Ionen mit verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen erreichen zu verschiedenen Zeiten den Detektor.

Für die Analyse posttranslationaler Modifikationen wurde die Produkt-Ionen-Analyse genutzt, dabei wurde der erste Quadrupol (G1) als Filter für Ionen einer bestimmten Masse genutzt. Diese vorsortieren Ionen wurden in Q2 fragmentiert und im TOF analysiert. Die Signale des Detektors wurden an einen Computer weitergeleitet, der sie aufzeichnete und die Summe aller detektierten Signale in einem charakteristischen Massenspektrum des untersuchten Peptides wiedergab, was die Sequenzierung und damit die Detektion von PTMs möglich machte.

### **2.9.2 Massenspektrometrische Analysen**

Die Identifikation posttranslationaler Modifikationen erfolgte durch Sequenzierung von Peptiden anhand der in der Massenspektrometrie gewonnenen Spektren. Im ersten Schritt wurde ein so genannter PMF („peptide mass fingerprint“) des verdauten Proteins gewonnen, indem ein Spektrum der  $m/z$ -Verhältnisse der in der Probe befindlichen Peptide erzeugt wurde (Übersichtsspektrum). Solche PMFs ließen sich mit softwarebasierten Listen theoretischer Peptide vergleichen, die

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

gewonnen werden könnten indem z.B. das Programm *GPMAW* (Lighthouse data, Odense Dänemark) das gleiche Experiment theoretisch durchgeführt. Dazu wurde/wurden die bekannte(n) Aminosäuresequenz(en) des/der Zielproteins/ Zielproteine in die Software eingelesen, virtuell verdaut und im Anschluss eine Liste der entstehenden m/z-Verhältnisse der virtuellen Peptide erzeugt, welche mit den im tatsächlichen Experiment detektierten m/z-Verhältnissen der Peptide des realen Verdau abgeglichen werden konnten. Modifizierte Peptide bzw. nicht modifizierte Peptide wichen in ihren m/z-Verhältnissen voneinander ab. So waren all jene Signale im Spektrum besonders interessant, die nicht mit denen in der softwarebasiert entstandenen Liste übereinstimmten. Diese wurden für weitere Analysen ausgewählt der so genannten Tandem-Massenspektrometrie, bei der 2 Stufen massenspektrometrischer Analytik in einem Experiment nutzen ließ (MS/MS).

Hier wurde im ersten Schritt ein einzelnes Produkt-Ion ausgewählt, welches im 2. Schritt einer Fragmentierung unterzogen wurde (in dieser Arbeit der Kollisionsgas-induzierten Fragmentierung CID; wobei die Ionen durch Kollision mit Stickstoffmolekülen fragmentierten). Aus den entstandenen Fragmenten konnten Rückschlüsse auf die Sequenz des Peptides gezogen werden.

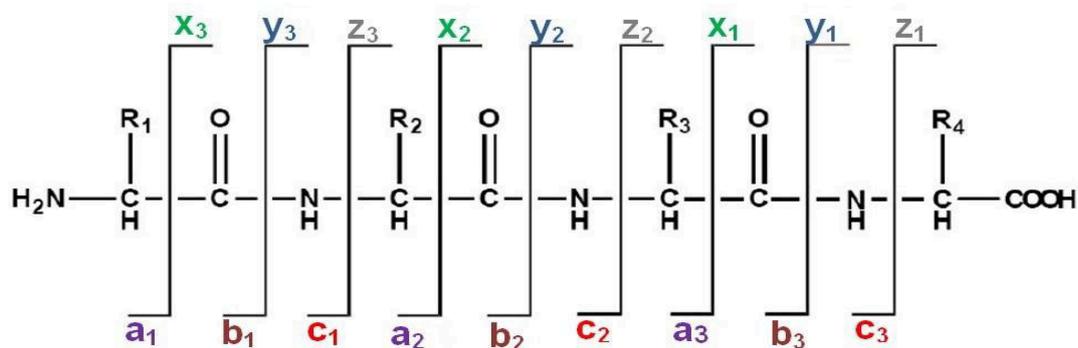


Abb. 9. Nomenklatur der Peptid-Fragmentierung (verändert nach Roepstorff & Fohlmann 1984).

Die Fragmentierung durch Kollisionsgas induzierte Spaltung führt zum Brechen des Peptid-Rückgrades. Dabei entstehen entweder Fragmente die eine positive Ladung am C-Terminus tragen (dargestellt durch x, y, z) oder es entstehen Fragmente die eine positive Ladung am N-Terminus tragen (dargestellt durch a, b, c).

Mittels der erzeugten MS/MS-Spektren waren 2 Wege der Auswertung möglich. Erstens, das so genannte „library searching“, wobei MS/MS-Spektren mit einer bestehenden Bibliothek (Datenbank) abgeglichen wurden. Dies konnte aber nur dann zum Erfolg führen, wenn das entsprechende Peptid schon in der Datenbank vorhanden war. War das Peptid unbekannt, oder trug es eine unbekannte

Modifikation, erfolgte keine korrekte Identifikation. Zweitens, beim „de novo sequencing“ wurde mittels des erzeugten MS/MS-Spektrums manuell die b- und y-Ionenserie abgeleitet und so viele Signale wie möglich identifiziert bis das Peptid als identifiziert gelten konnte.

### 2.9.3 Datengewinnung und –auswertung

Von jedem tryptischen Verdau wurde im Scanmodus *TOF-MS* ein Übersichtsspektrum erzeugt aus dem die Zielpeptide für die MS/MS-Analytik bestimmt wurden. Im Scanmodus „*Product Ion*“ wurde dann für jedes gewählte Zielpeptid mindestens 1 MS/MS-Spektrum aufgezeichnet. Die Massenspektren wurden jeweils mit der *Analyst QS Software* (Applied Biosystems) ausgewertet. Über Mascot (<http://www.matrixscience.com>) erfolgte der Abgleich mit der NCBI Nr Datenbank zur Bestätigung der Protein- bzw. Peptididentität (Suchparameter: taxonomy unspecified, 1 missed cleavage site, peptide tolerance 1.2 Da, MS/MS tolerance +/- 0.6 Da, partial chemical modification: oxidation of methionine). Der von Mascot ermittelte Wahrscheinlichkeitswert wurde als Indikator der Protein- bzw. Peptididentität gewertet und durch „de novo“ Sequenzierung überprüft. Die Proteinidentität galt ab einer (positiv) bestätigten Sequenzabdeckung von >10 % als gesichert, die Peptididentität mit der Bestätigung durch „de novo“ Sequenzierung.

### 2.9.4 Strategie zur massenspektrometrischen Detektion deamidierter bzw. deiminierter Peptide

Wie oben erwähnt (1.2.5) resultiert aus der Deamidierung von Asn oder Gln, sowie der Deiminierung ein Massenshift von +1 Da (ganz exakt; 0,984 Da). Dies stellt sich im Isotopenmuster deamidierter/deiminierter Aminosäuren (oder Peptide) im Massenspektrum wie folgt dar (Abb. 6 am Beispiel des Deamidierung durch Asparagin). Für die Deiminierung (Peptidylarginin deiminiert zu Peptidylcitrullin) ist auf Grund der gleichen Massenveränderung das gleiche Bild des Massenshifts zu

erwarten. Bei der Massenspektrometrischen Analytik wird also gezielt nach diesem Massenshift gesucht.

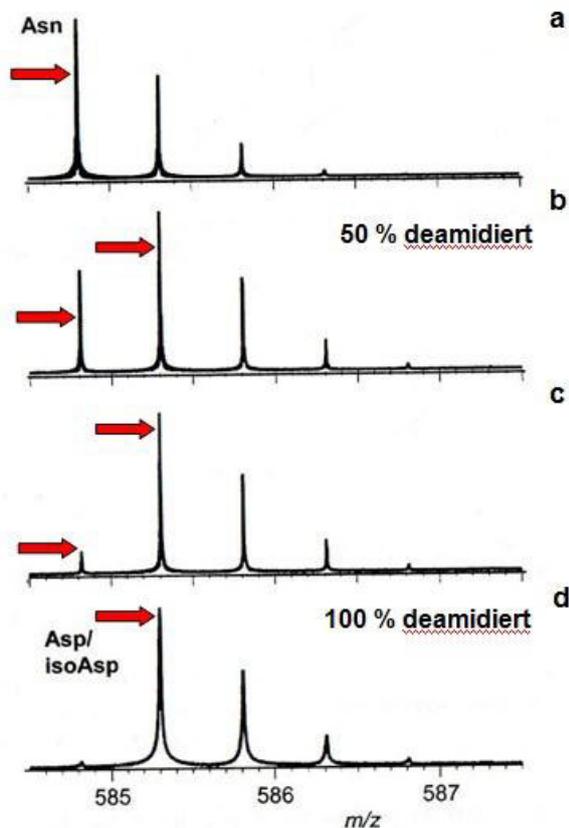


Abb. 6: Massenshift durch zunehmende Deamidierung eines tryptischen Peptides von Asn zu Asp/Iso-Asp (verändert nach Cournoyer et al. (2009)).

a) Peptid liegt nativ vor (100 % Asn), typisches Isotopenmuster, erstes Signal mit rotem Pfeil gekennzeichnet, b+c) Peptid zu 50 % und mehr deamidiert, erstes Signal wird kleiner, zweites Signal wird größer (rote Pfeile), d) Peptid zu 100 % deamidiert, statt Asn liegt jetzt Asp bzw Iso-Asp vor (erstes Signal um die Masse 1 größer geworden (roter Pfeil)).

## 2.10 Eingesetzte Lösungen

### 2.10.1 Gewebeaufschluss + Histonisolation

- a.) 2 %-ige Natriumchloridlösung (1 L): Natriumchlorid (NaCl): 10 g ad 1000 ml  
Aqua bidest
- b.) Proteaseinhibitor lösen ad 1 L Aqua bidest (Stammlösung), (Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua bidest verdünnen): 66 g 6-Aminohexansäure; 3,9 g Benzamidin (2,5 mM); 625 mg N-Ethylmaleinimid = NEM; 522 mg Phenylmethansulfonylfluorid = PMSF (3 mM)
- c.) H2 Homogenisationspuffer (1 L) in Aqua bidest lösen: 1,302 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Natriumsalz = Na-Hepes (5 mM); 0,1461 g Ethylendiamin-tetraessigsäure = EDTA (0,5 mM); 0,0154 g Dithiotreitol = DTT (0,1 mM); 34,23 g Sucrose (10 % w/v)
- d.) HCl: 0,375 M
- e.) Eluent A (1 L): Wasser HPLC-grade: 1000 ml; Trifluoressigsäure (TFA, C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, Merck): 3 ml; 15 Minuten Entgasung im Ultraschallbad
- f.) Eluent B (1 L): Acetonitril (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N) HPLC-grade; Trifluoressigsäure (TFA, C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, Merck) 3 ml; 15 Minuten Entgasung im Ultraschallbad

### 2.10.2 Gelelektrophorese

- g.) Probenpuffer-Ansatz-Stammlösung (9,5 ml): Aqua bidest: 3,55 ml; Tris-HCL (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>): 0,5 M: 1,25 ml (pH 6,8), Glycerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>): 2,5 ml; SDS 10 % (s.u.): 2,0 ml Bromphenolblau (C<sub>19</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>4</sub>NaO<sub>5</sub>S): 0,5 %: 0,2 ml  
Probenpuffer für den Gebrauch: 950 µl aus der Stammlösung; β-Mercaptoethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS): 50 µl

- 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-Gele:

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Acrylamid	2,65 ml	425 $\mu$ l
Trenngelpuffer	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer	-	625 $\mu$ l
10 % SDS	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Aqua bidest	1,05 ml	1,425 $\mu$ l

Nach Zugabe von APS und TEMED setzt die Polymerisation ein:

APS	25 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l

- m.)** Laufpufferkonzentrat (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,  $C_{12}H_{25}O_4S$ ): 10 g, ad 1000 ml Aqua bidest mit pH-Streifen kontrollieren, nicht mit Säure oder Laufe einstellen!
- Laufpuffer zum Gebrauch (1 x) (1 L): Laufpuffer-Konzentrat: 100 ml ad Aqua bidest

- n.) 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
- o.) 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

### 2.10.3 Razemisierungsanalytik

- p.) 6 N Salzsäure (HCl) (1 L): Aqua bidest: 500 ml, Salzsäure (HCl): 500 ml
- q.) Probenpuffer mit L-Homoarginin (200 ml): 0,1 M Salzsäure (HCl): 100 ml; Natriumazid ( $NaN_3$ ): 9,75 mg; L-Homo-Arginin: 0,03 mM ad 100 ml Aqua bidest
- r.) OPA/IBLC (N-ISObutyl-L Cystein): 22,8 mg OPA; 49,7 mg IBLC in 1 ml Kaliumboratpuffer (s.u.) lösen  
Kaliumboratpuffer: 6,18 g Borsäure ( $H_3BO_3$ ) in 100 ml Aqua bidest lösen; 4,65 g KOH-Linsen zufügen, mit KOH-Lösung auf pH 10,4 einstellen
- s.) Eluent A nach Kaufmann & Manley (1998) (pH 6,0) (2 L): Natriumacetat ( $C_2H_3NaO_2$ ): 3,773 g; Natriumazid ( $NaN_3$ ): 0,195 g; Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA,  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ): 0,750 g; ad 2000 ml Aqua bidest mit 10 %-iger Essigsäure ( $C_2H_4O_2$ ) auf pH 6,0 einstellen
- t.) Eluent B nach Kaufmann & Manley (1998) (1,08 L): Methanol ( $CH_4O$ ): 1000 ml, Acetonitril ( $C_2H_3N$ ): 83,4 ml

### 2.10.4 Aminosäurenanalytik – Citrullinbestimmung

- u.) Probenpuffer (200 ml): 0,1 M Salzsäure (HCl): 100 ml; Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ): 9,75 mg
- v.) Eluent A Kaufmann & Manley (1998), pH 6,0 (2 L): Natriumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ): 3,773 g, Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ): 0,195 g, Ethylendiamintriaessigsäure (EDTA,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ): 0,750 g, ad 2000 ml Aqua bidest mit 10 %-iger Essigsäure ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) auf pH 6,0 einstellen
- w.) Eluent B Kaufmann & Manley (1998), (1,08 L) : Methanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ): 1000 ml, ACN ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ): 83,4 ml

### 2.10.5 Präparation für die Massenspektrometrie

- x.) Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (50 ml): Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{NCO}_3$ ): 0,098825 (25 mM) ad 50 ml Wasser (HPLC-grade) pH 8
- y.) Ammoniumhydrogencarbonat-ACN-Lösung: Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{NCO}_3$ ): 0,098825 (25 mM) ad 25 ml Wasser (HPLC-grade) lösen; 50 % (25 ml) Acetonitril ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ) zufügen
- z.) Trypsinlösung für Verdau (200  $\mu\text{l}$ ): Trypsin (Proteomics Grade, Sigma-Aldrich): 20  $\mu\text{g}$  in 200  $\mu\text{l}$  Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (s.o.) lösen
- a1.) Elutionslösung: 50 % Acetonitril ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ), 5 % Ameisensäure ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 45 % Wasser (HPLC-grade)
- b1.) Ammoniumbicarbonatpuffer (100 mM): Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{NCO}_3$ ): 0,3953 g ad 50 ml Wasser (HPLC-grade) lösen, pH 8
- c1.) Deiminierungspuffer: Tris-HCl: 1,2114 g (0,1 M) in 100 ml Wasser HPLC-grade lösen (pH 7,5);  $\text{CaCl}_2$ : 0,1109 g (10 mM); DTT ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ): 0,0772 g (5 mM) zugeben, lösen.

**d1.)** Eluent A: Wasser (HPLC-grade) + 5 % Acetonitril + 0,1 % TFA

**e1.)** Eluent B: Acetonitril + 0,1 % TFA

**f1.)** Waschlösung: 950 µl Wasser (HPLC-grade) + 40 µl Methanol (HPLC-grade) + 10 µl Ameisensäure (reinst)

**g1.)** Elutionslösung: 490 µl Wasser (HPLC-grade) + 600 µl Methanol (HPLC-grade) + 10 µl Ameisensäure (reinst)

**h1.)** Waschlösung: 910 µl Wasser (HPLC-grade) + 40 µl Methanol (HPLC-grade) + 50 µl Ameisensäure (reinst)

**i1.)** Initialisierungslösung: 150 µl Wasser (HPLC-grade) + 800 µl Acetonitril (HPLC-grade) + 50 µl Ameisensäure (reinst)

**j1.)** Elutionslösung: 350 µl Wasser (HPLC-grade) + 600 µl Methanol (HPLC-grade) + 50 µl Ameisensäure (HPLC-Grade)

### 2.10.6 Citrullinnachweis – Western-Blot

**k1.)** Transferpuffer, pH 8,2 - 8,3 (2 L):

Tris-Base ( $C_4H_{11}NO_3$ ): 11,64 g (48 mM), Glycin ( $C_2H_5NO_2$ ): 58 g (386 mM), Natriumdodecylsulfat (SDS,  $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ) = 0,1 %: 20 ml 10 % SDS (s.o.), Methanol ( $CH_4O$ ): 400 ml (20 %), ad 2000 ml Aqua bidest mit pH-Streifen kontrollieren

**l1.)** PBS (10 x), pH 7,2 - 7,4 (1 L): Natriumchlorid (NaCl): 80 g (1,37 M); Dinatriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ ): 11,5 g (81 mM); Kaliumchlorid (KCl): 2 g (27 mM); Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ ): 2 g (14,7 mM); ad 1000 ml Aqua bidest vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 verdünnen = 1 x PBS

**m1.)** Blockierlösung 5 % BSA: BSA (Bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich): 1,25 g in 25 ml 1 x PBS (s.o.)

**m2.)** BSA für Antikörperreaktion: BSA (Bovines Serumalbumin, Sigma Aldrich): 0,125 g in 25 ml 1 x PBS (s.o.)

**n1.)** PBS-Tween (1 L): 1 ml (0,1 %) in 1000 ml 1 x PBS (s.o.) lösen

**o1.)** Amidoschwarz 10 B ( $C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$ ): 0,2 g (0,1 %); Methanol ( $CH_4O$ ): 90 ml (45 %), Essigsäure ( $C_2H_4O_2$ ): 14 ml (7 %); Aqua bidest: 96 ml

**p1.)** Amidoschwarzfärber (1 L): Methanol ( $CH_4O$ ): 700 ml (70 %), Essigsäure ( $C_2H_4O_2$ ): 21 ml (7 %), Aqua bidest: 279 ml

### 2.10.7 Citrullinnachweis – ELISA

**q1.)** PBS-Puffer (1 L): Natriumchlorid (NaCl): 8,0 g, Kaliumchlorid (KCl): 0,2 g, Dinatriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ ): 1,42 g

**r1.)** Natriumcarbonat-Lösung (1 L): Natriumcarbonat ( $Na_2CO_3$ ): 5,2995 g (50 mM) pH 9,6

**s1.)** PBS/BSA-Lösung: PBS siehe l1 + 2,5 g/L BSA

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Qualität der Aufreinigung der Histone aus humanem Lebergewebe**

Abbildung 10 zeigt im oberen Teil (a) ein typisches Elutionsprofil einer RP-HPLC-Trennung der Histon-Gruppen nach Gewebekomogenisation und Histonextraktion nach Young *et al.* (2001) (siehe 2.3), im unteren Teil (b) die elektrophoretische Zuordnung der Signale zu den eluierten Histongruppen.

H1 eluierte immer nach 34 Minuten und konnte als Reifraktion gewonnen werden (vgl. Abb. 10), stellte sich aber in der Elektrophorese als Doppelbande dar. Auch H2B eluierte reproduzierbar nach 47 Minuten und ließ sich ebenso als Reifraktion gewinnen, wie H3, das nach 65 Minuten eluierte (vgl. Abb. 10). Auffällig ist, dass die Histone H4 und H2A sich chromatographisch nicht trennen ließen und beide in zwei Signalen gemeinsam eluierten (nach ca. 52 und 54 Minuten). In einigen Fällen konnten sehr kleine Mengen reiner H2A und reiner H4 Histone aus den Randbereichen der Signale gewonnen werden.

Das Elutionsmuster war gut reproduzierbar und es zeigten sich hierin keine altersbedingten Auffälligkeiten.

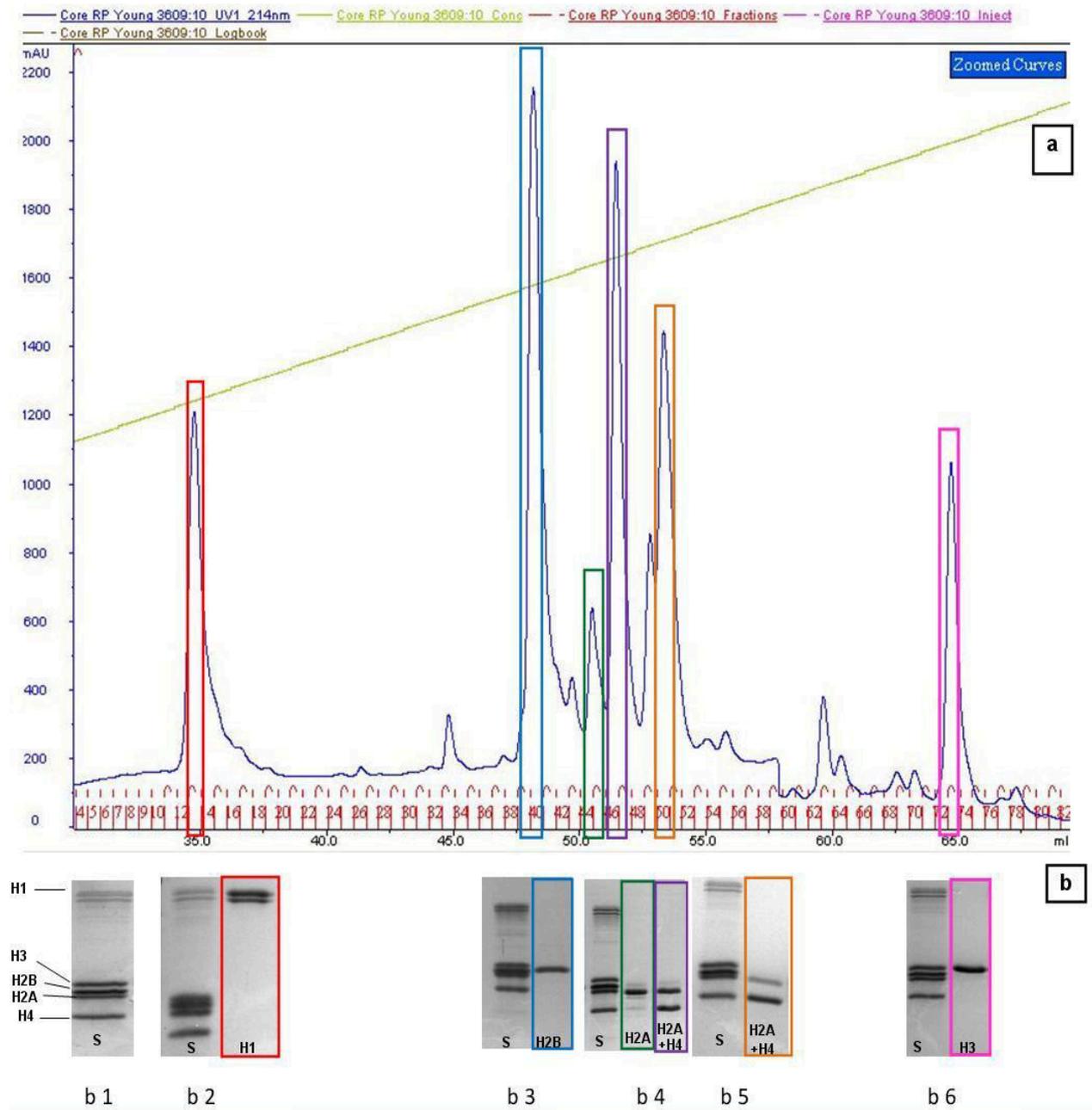


Abbildung 10. Auftrennung der Histon-Subtypen.

a) typisches RP-HPLC-Elutionsprofil von Histonen. Aufgetragen ist die Signalintensität in mAU (y-Achse) gegen die Laufzeit in ml (1 ml entspricht dabei 1 min.) Die durch farbige Umrandung kenntlich gemachten Signale decken sich farblich mit den in b) dargestellten Elektrophoreseergebnissen der erzeugten Fraktionen.

b) SDS/PAGE-Elektrophoreseprofile der Fraktionen der in a) dargestellten Signale: b1 Histonstandardmix mit Zuordnung der Banden; b2-b6 Elektrophoreseergebnisse der gekennzeichneten Fraktionen, jede Fraktion wird von einem mit „S“ gekennzeichneten, im Gel mitgeführten Histonstandardmix zur Identifikation der einzelnen Subtypen begleitet.

### 3.2 Razemisierungsgrad von Asx in Histonen aus humanem Lebergewebe

Als Screeningverfahren für eine altersbedingte Akkumulation von Asp/Asn-Resten wurde die in der Arbeitsgruppe etablierte Methode zur Bestimmung des Razemisierungsgrades von Asparaginsäure in Proteinen eingesetzt (siehe 2.4).

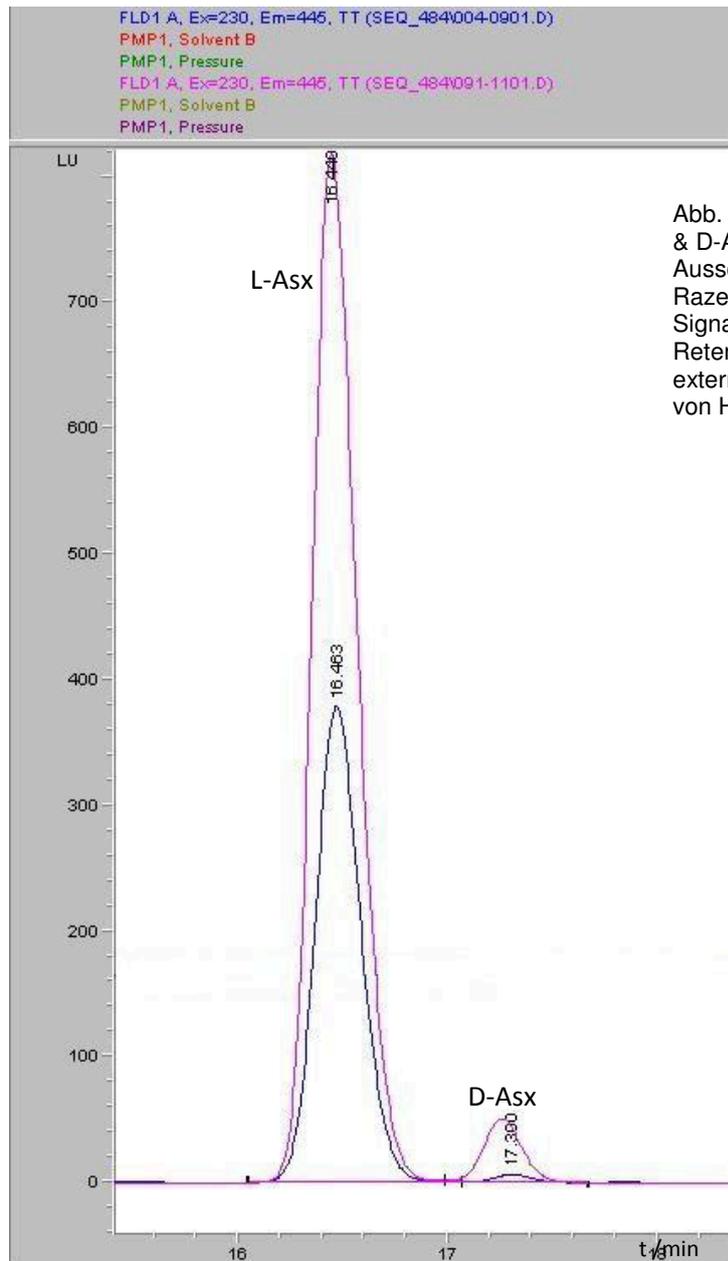


Abb. 11 Chromatographische Trennung von L-Asx & D-Asx. Ausschnitt eines HPLC-Chromatogramms der Razemisierungsanalytik. Aufgetragen (Y-Achse) die Signalstärke (LU) gegen (X-Achse) die Retentionszeit (min); in rosa die Signale eines externen Standards, in blau die Signale einer Probe von Histon H3.

In Abb. 11 ist ein Ausschnitt eines Chromatogramms der Trennung der primären Aminosäuren im Rahmen der Razemisierungsanalytik dargestellt. Die beiden Signale für L-Asx eluierten bei 16,44 min (Standard) und 16,46 min (H3), die

Signale des D-Asx eluierten bei 17,300 min, eine klare Nulllinientrennung lag vor, die Signale wiesen weder „fronting“ noch „tailing“ auf (vgl. Abb. 11). Der Razemisierungsgrad (als D/L in %, siehe 2.4) lag im dargestellten Fall (H3) bei 1,48 % D-Asx.

In Abb. 12 ist der Razemisierungsgrad der verschiedenen Histon-Subtypen-Gruppen gegen das Alter der Probanden dargestellt. Die Histone H1 und H2B zeigten mit Abstand die höchsten Razemisierungsgrade von bis maximal 7 % D/L-Asx über alle Asp- und Asn-Reste für H2B (bei durchschnittlich 6,4 Asx-Resten pro Molekül (vgl. Tab 1)) und bis zu 8,7 % bei H1 (bei durchschnittlich 5,7 Asx-Resten pro Molekül (vgl. Tab 2)); bei gleichzeitiger großer Streubreite der Werte, während die Werte der Histontypen H3, H2A und H4 sich über alle Altersgruppen hinweg weitgehend stabil bei ca. 2 % zeigten. Die Darstellung der Bestimmtheitsmaße für die Stichproben (Tab.1) zeigt, dass für H1 und H2B eine Korrelation mit dem Alter nicht vorlag. Für H4, H3 und H2A konnten nur wenige Proben untersucht werden; auch hier ergab sich kein Anhalt für einen Zusammenhang zwischen Razemisierungsgrad (Asx) und Lebensalter. Wegen der geringen Stichprobengröße und der dadurch bedingten geringen Aussagefähigkeit wurde in Tab. 1 auf die Angaben für H2A, H2B und H3 verzichtet.

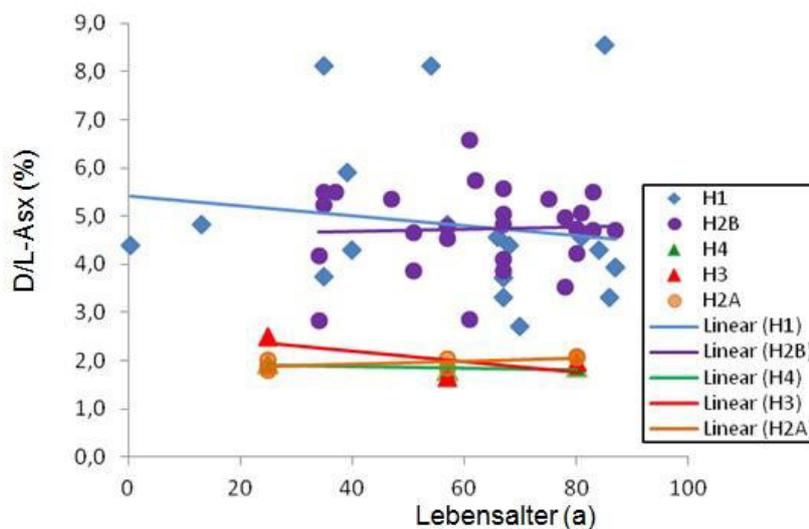


Abb.12 Razemisierungsgrad von Asx in humanen Leberhistonen. Die Abbildung zeigt die Razemisierungsgrade der einzelnen Histongruppen. Aufgetragen sind das Verhältnis von D- zu L-Asx in % gegen das Lebensalter der Probanden (in Jahren). Die Werte der Linker-Histone H1 werden durch blaue Rauten, H2B durch lila Punkte, H4 und H3 durch grüne bzw. rote Dreiecke und H2A durch gelbe Punkte dargestellt. Die zugehörigen Regressionsgeraden sind ebenfalls farblich kodiert dargestellt.

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

Histon	Formel der Regressionsgraden	n	Bestimmtheitsmaß
H1	$Y = -0,0101x + 1,7956$	18	$R^2 = 0,0238$
H2B	$Y = 0,0026x + 4,5661$	27	$R^2 = 0,0027$

Tab. 1 Daten zur Regressionsanalyse der Datensätze aus Abb. 12.

Die Werte zeigen keinen Zusammenhang zwischen Razemisierungsgrad (Asx) und Lebensalter.

In Spalte 1 sind die Histongruppen genannt, die zugehörigen Formeln der Regressionsgraden aus Abb. 12 sind in Spalte 2 wiedergegeben, die Bestimmtheitsgrade in Spalte 3. Der Farbcode wurde analog zu Abb. 12 gewählt

Histon	Ø Anz. Asx-Reste
H1	5,7
H2B	6,4
H3	5,0
H4	5,0
H2A	7,5

Tab. 2 Durchschnittliche Anzahl der Asx-Reste pro Histonmolekül.

Spalte 1 listet die Histongruppen auf, Spalte 2 gibt die durchschnittliche Anzahl der Asx-Reste pro Histonmolekül wieder, Farbcode analog zu Abb. 12 und Tab. 2.

### 3.3 Citrullin in Histonen aus humanem Lebergewebe

#### 3.3.1. Aminosäureanalytik

Abb. 13 zeigt beispielhaft die chromatographische Auftrennung primärer und sekundärer Aminosäuren einer Probe des Histons H2B nach einer 24-stündigen sauren Hydrolyse (vgl. 2.5). Citrullin eluierte nach 16,55 Minuten (Probe) bzw. 16,62 Minuten (Standard) (vgl. Abb. 14), es lag eine saubere Nulllinientrennung vor und die Signale waren „schulterfrei“.

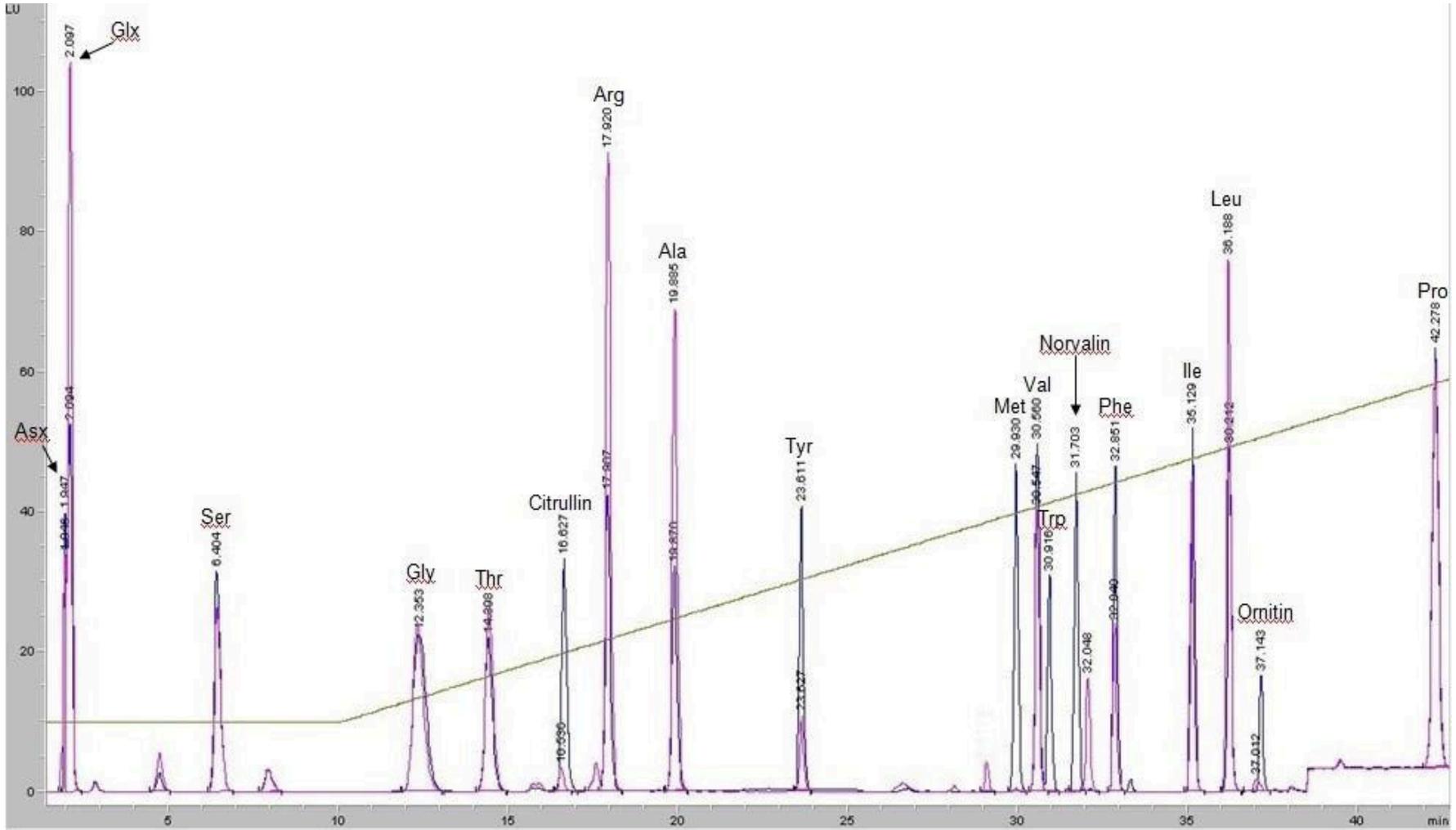


Abb. 13 Flüssigkeitschromatogramm der Trennung primärer und sekundärer Aminosäuren nach 24 h Hydrolyse eines Histons H2B.

Aufgetragen ist die Signalintensität in LU (y-Achse) gegen die Retentionszeit in min (x-Achse). Die blauen Signale stellen einen externen Standard aus Reinsubstanzen dar, die rosafarbenen Signale zeigen die Aminosäurekomponenten einer H2B Probe. Die Signale sind mit dem Substanznamen oder dem 3-Buchstabencode der Aminosäuren benannt.

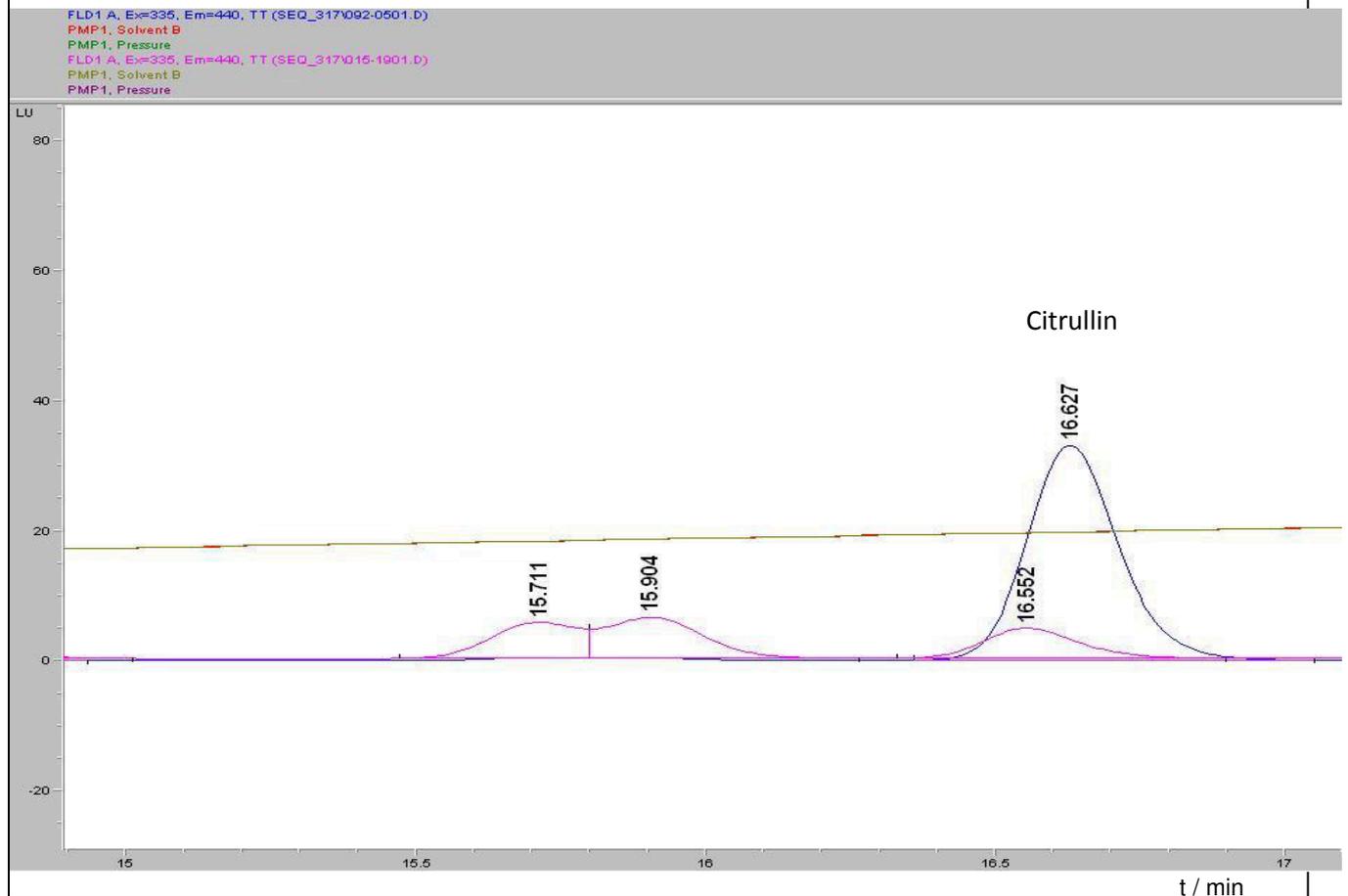


Abb. 14. Ausschnittsvergrößerung des Citrullinsignals aus Abb. 13

Aufgetragen sind die Signalintensität in LU (y-Achse) gegen die Retentionszeit in min (x-Achse). Die Signale des externen Standards sind in blau, die Signale der H2B Probe in rosa dargestellt.

Im Sinne eines „Screenings“ wurden alle Histontypen auf das Vorhandensein von Citrullin untersucht. In allen aufgereinigten Histonsubtypen wurde Citrullin detektiert.

In Abb. 15, 16 & 17 werden die Verhältnisse von Citrullin zu Arginin (%) der verschiedenen Histontypen dargestellt. Abb. 15 zeigt die Werte für die Subtypengruppe der Linker-Histone H1 (erstmalig in H1 aus humanem Lebergewebe). Die Werte zeigen eine breite Streuung von etwa 1,5 % bis 10,4 % bei durchschnittlich 5,3 Argininresten pro Histonmolekül (vgl. Tab. 3). Es sind weder eine Altersabhängigkeit ( $R^2=0,0943$ ) wie etwa ein Anstieg der Werte mit steigendem Lebensalter noch ein anderer Trend erkennbar.

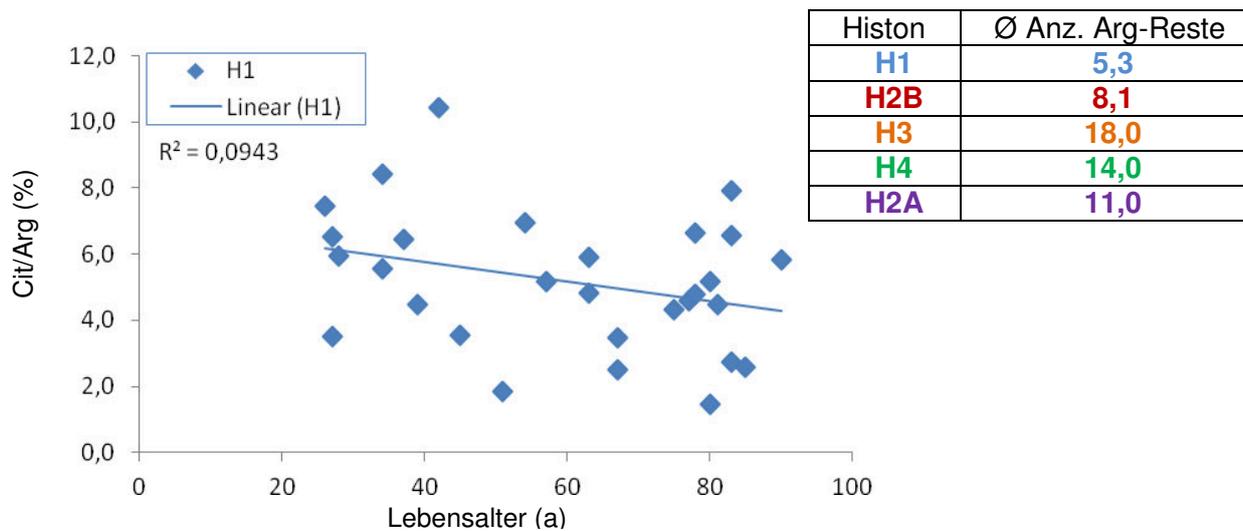


Abb. 15 Citrullingehalt in Linkerhiston H1 aus humanem Lebergewebe  
Der Citrullingehalt (als Cit/Arg in % auf der y-Achse) aufgetragen gegen das Lebensalter (a) auf der x-Achse inkl. Regressionsgerade und Bestimmtheitsmaß  $R^2$ .

Tab. 3 (rechts) Übersicht über die durchschnittliche Anzahl der Arg-Reste pro Histon der einzelnen Subtyp-Gruppen. Spalte 1 listet die Histontypen, Spalte 2 die ermittelte durchschnittliche Anzahl der Argininreste pro Molekül (Farbcode analog zu dem in den Abbildungen 15, 16 & 17)

Abb. 16 belegt erstmals Peptidylcitrullin in Histonen der Subtyp-Gruppe H2B aus humanem, intravital gealtertem Lebergewebe. Auch diese Stichprobe zeigt eine breite Streuung zwischen 0,0 % und 14,6 % (bei durchschnittlich 8,1 Arg-Resten pro Molekül (vgl. Tab 3)). Dennoch ergab die Regressionsanalyse (Bestimmtheitswert  $R^2=0,1324$ ) keinen Anhaltspunkt für einen engen Zusammenhang mit dem Alter.

Abb. 17 stellt die Werte der übrigen Core-Histon-Fractionen dar. Die Werte der Gruppe H2A streuen zwischen 1,1 % und 11,5 % (bei durchschnittlich 11 Arg-Resten pro Molekül (vgl. Tab 3)). Zwei der 22 Werte (9,1 % der Werte) sind besonders hoch mit 10,88 % bzw. 11,5 %, das Alter der Probanden liegt hier bei 27 bzw. 40 Jahren. Die übrigen Werte liegen zwischen 1,1 % und 7,8 %. Eine Korrelation mit dem Alter ergab sich nicht ( $R^2=0,019$ ). Die Histone der Subtypen-Gruppe H3 zeigten Werte zwischen 0,3 % und 5,0 % (bei durchschnittlich 18 Arg-Resten pro Molekül (vgl. Tab. 3)). Es finden sich keine Auffälligkeiten, die Datenpunkte sind homogen verteilt, eine Korrelation mit dem Alter ergab sich ebenfalls nicht ( $R^2=0,1269$ ). Die wenigsten Datenpunkte ließen sich für die Histon-Subtyp-Gruppe H4 ermitteln, da

diese nur in geringen Mengen ohne die beschriebene Kontamination des gleichzeitig in der RP-HPLC-Methode eluierenden H2A gewonnen werden konnten (Ausbeute). Die Werte streuen zwischen 2,6 % und 7,5 % und zeigen keinen engen Zusammenhang mit dem Alter ( $R^2=0,0131$ ).

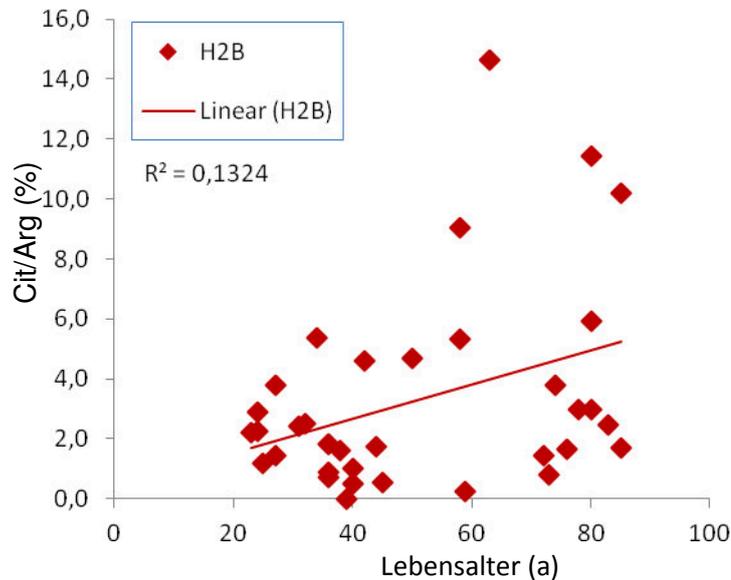


Abb. 16 Citrullingehalt in H2B aus humanem Lebergewebe  
Der Citrullingehalt (als Cit/Arg in % auf der y-Achse) aufgetragen gegen das Lebensalter (a) auf der x-Achse. Rote Rauten bilden die Meßpunkte für H2B ab zusätzlich wizden die zugehörige Regressionsgerade (rote Linie) und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  angegeben.

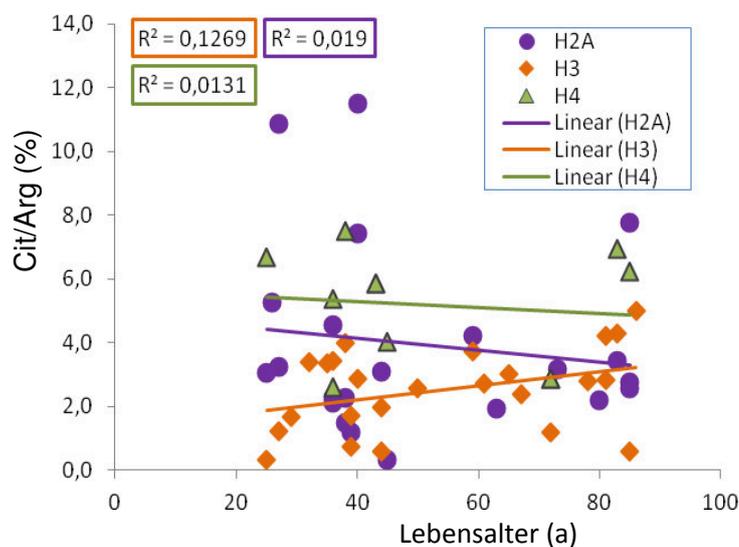


Abb. 17 Citrullingehalt in H2A, H3 & H4 aus humanem Lebergewebe.  
Der Citrullingehalt (als Cit/Arg in % auf der y-Achse) aufgetragen gegen das Lebensalter (a) auf der x-Achse. Werte für H2A = lila Punkte; H3 = orange Rauten; H4 = grüne Dreiecke, Die Regressionsgeraden und Bestimmtheitsmaße tragen analoge Farbgebung

### 3.3.2 Citrullinnachweis im Western-Blot

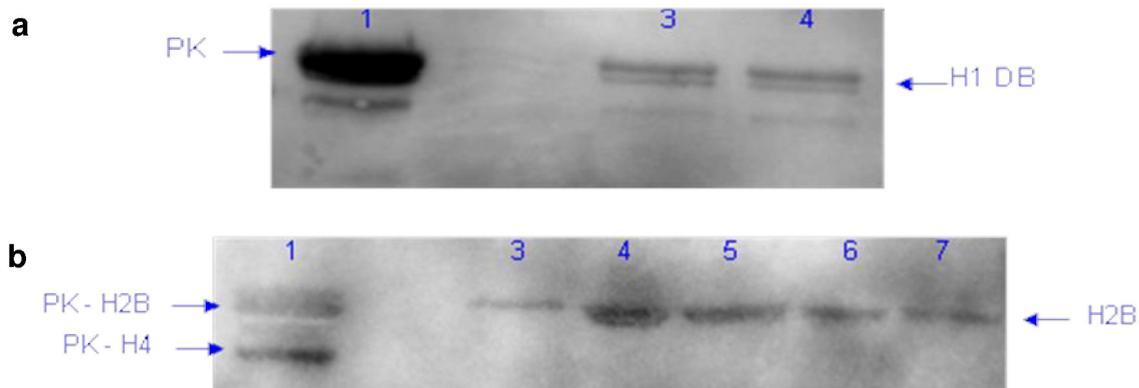


Abb.18. Citrullinnachweis in H1 und H2B mittels Western-Blot

a) Spur 1 – Positivkontrolle (PK), Spur 3+4 Peptidylcitrullin-positives H1 als Doppelbande (H1DB)  
 b) Spur 1 – Positivkontrolle (PK) beinhaltet H2B (PK-H2B) und H4 (PK-H4), Spur 3-7 Peptidylcitrullin-positives H2B.

Zur Verifizierung der Identität des Peptidylcitrullins aus den Ergebnissen der Aminosäureanalytik wurden Western-Blots mit zurückgestellten, nicht hydrolysierten Aliquots der Proben angefertigt. Abb.18 zeigt exemplarisch Ergebnisse der Histone H1 (a) und H2B (b). In beiden Abbildungsteilen zeigt Spur 1 die entsprechende Positivkontrolle (PK) und die Spuren 3+4 (Abb. 18a) den Peptidylcitrullin-positiven Befund für H1, die Spuren 3-7 (Abb. 18b) den Peptidylcitrullin-positiven Befund für H2B.

Damit konnte der angestrebte Citrullin-Nachweis sowohl für Histone des Typs H1 als auch für Histone des Typs H2B erbracht werden.

### 3.4 Massenspektrometrische Analytik

#### 3.4.1 Detektion von Deamidierungsstellen in Histonen

Die Detektion deamidierter Asparaginreste ist eine methodische Herausforderung. Bisher wurde die Deamidierung im Zuge der Razemisierungsanalytik indirekt mitbestimmt. Massenspektrometrisch jedoch ist der Nachweis von Deamidierungen zunächst nicht gelungen. Erst nachdem im Rahmen eines anderen Projektes der Arbeitsgruppe Histonproben zur Verfügung gestellt werden konnten, in denen durch Hitzeeinwirkung Deamidierungen induziert worden waren (Dr. Reimer Dobberstein, Daten unveröffentlicht) konnte gezeigt werden, dass die Detektion von deamidierten Histonen mit der gewählten massenspektrometrischen Analyseverfahren tatsächlich möglich war. Die folgenden Abbildungen zeigen Ergebnisse die an den von Dr. Dobberstein zur Verfügung gestellten Proben erhoben wurden. Ein Nachweis von Deamidierungsstellen in den aus humaner Leber gewonnen Histonproben gelang jedoch nicht.

Abb. 19 zeigt die *de novo* sequenzierten MS-MS-Spektren des H2A-Peptides (Pos. 21-29) nicht deamidiert und deamidiert im Vergleich. Die Aminosäure, die von der Deamidierung „betroffen“ ist ist Glutamin (Q) an. 24, sie wird zu Glutaminsäure (E) deamidiert (jeweils gelb eingekreist). Im nicht deamidierten Peptid beträgt die Masse des zugehörigen Fragmentes 703,46, im deamidierten Peptid tritt hingegen an dieser Stelle die Masse 704,44 auf. Dies entspricht dem gesuchten Massenschift von +1 Da. Damit kann die Deamidierung von H2A-Q24 zu H2A-E24 belegt werden.

Die nachfolgende Abb. 20 zeigt die Deamidierung von H2A-Q24 zu H2A-E24 noch einmal als „Overlay“. Die roten Signale zeigen das Isotopenmuster des nicht deamidierten Precursor-Ions mit der Masse 703,44, die blauen Signale zeigen das Isotopenmuster des deamidierten Ions mit der Masse 704,44. Dargestellt ist der „Shift“, d.h. die Verschiebung des Isotopenmusters an der Deamidierungsstelle von der Masse 703,44 hin zur „deamidierten“ Masse von 704,44 (vgl. Abb. 6).

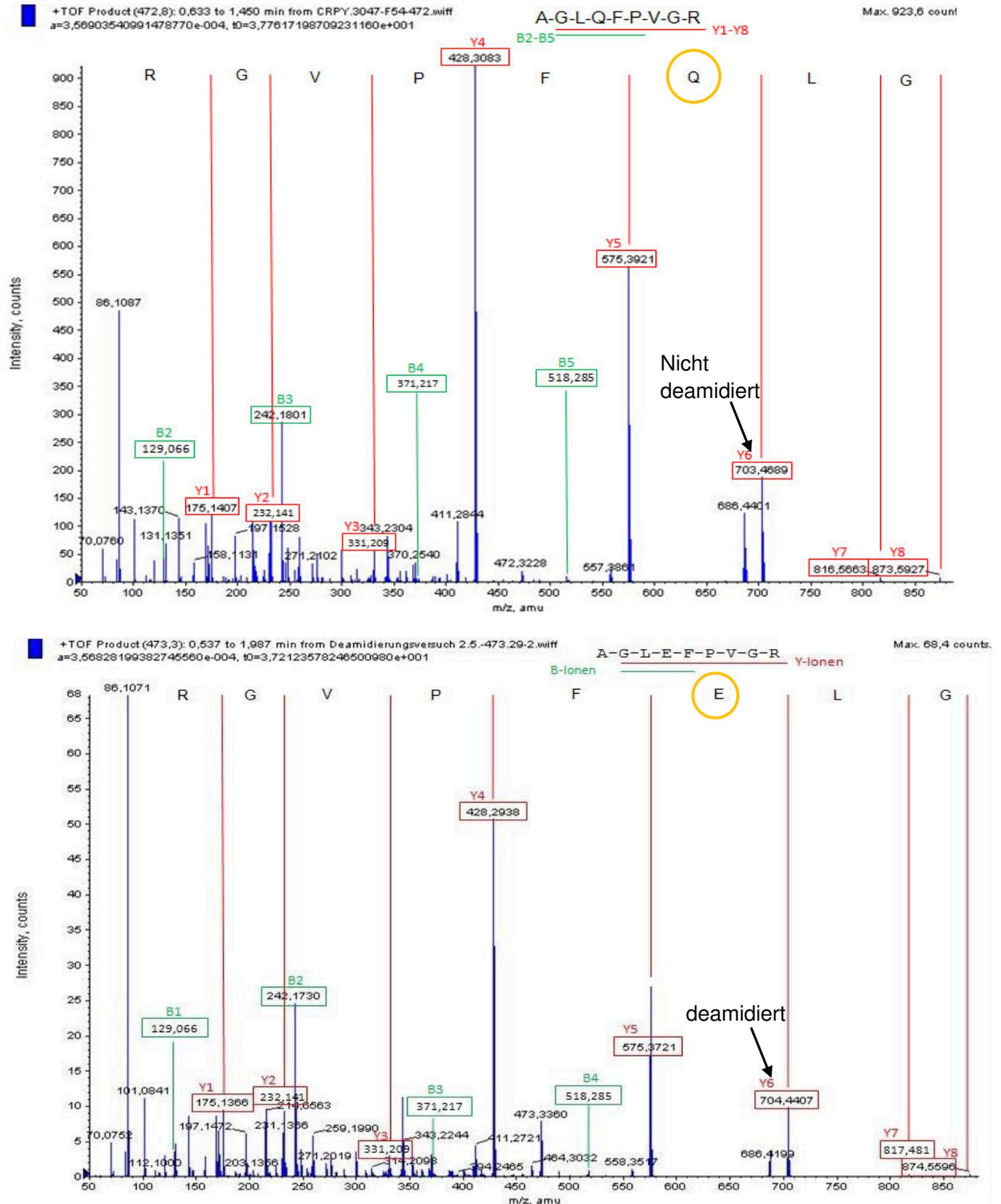


Abb. 19 *De novo* sequenzierte MS-MS-Spektren eines nicht deamidierten Peptides (H2A: 21-29: AGLQFPVGR oben) und eines deamidierten Peptides (H2A: 21-29: AGLEFPVGR unten) im Vergleich. In rot dargestellt die y-Ionen-Serie mit zugehörigen Massen und der Sequenz abgeleitet aus der y-Ionen-Serie. In grün dargestellt korrespondierende b-Ionen. Gelbe Kreise kennzeichnen die Deamidierungsstelle innerhalb der Sequenz, die Pfeile deuten auf die entsprechenden Fragment-Massen.

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

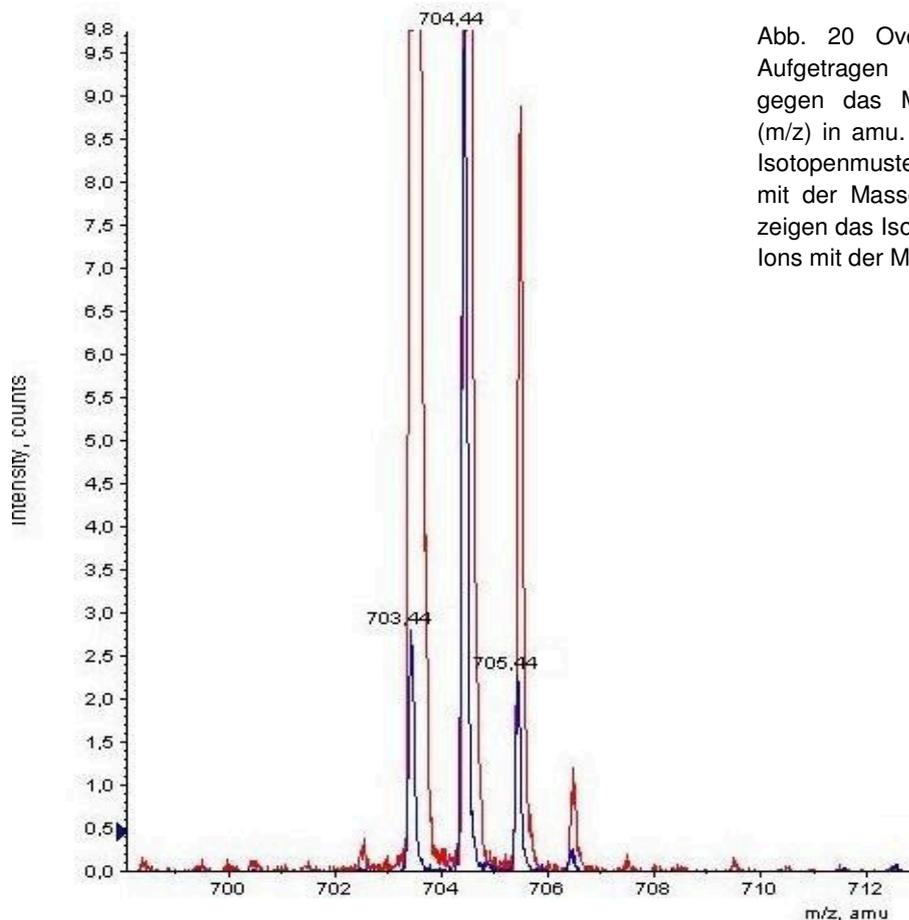


Abb. 20 Overlay – Deamidierungsstelle. Aufgetragen ist die Intensität (y-Achse) gegen das Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) in amu. Die roten Signale zeigen das Isotopenmuster des nicht deamidierten Ions mit der Masse 703,44, die blauen Signale zeigen das Isotopenmuster des deamidierten Ions mit der Masse 704,44.

### 3.4.2 Detektion von Posttranslationalen Histon-Code-Modifikationen in Histonen aus humaner Leber

Bei der massenspektrometrischen Analyse bestand zunächst das Problem, dass ein klassischer Trypsinverdau infolge des Reichtums der Histone an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin insbesondere im Bereich der N-Termini zu sehr kleinen, nicht mehr detektierbaren Fragmenten führte; dadurch waren zunächst Peptide im Bereich der N-Termini nicht nachweisbar. Deshalb wurde eine spezielle Derivatisierungsmethode erfolgreich etabliert. Sie basiert auf einer Blockierung der Lysinreste und damit eines Teils der Schnittstellen für den Verdau mit Trypsin (die Blockierung erfolgt über eine Derivatisierung der Probe mit Propionsäureanhydrid).

Hierbei bindet eine Propionylamidgruppe N-Terminal an freie Aminogruppen und  $\epsilon$ -Aminogruppen von unmodifizierten, oder endogen monomethylierten Lysinen (Garcia

et al. 2007)). Dies ermöglicht zum einen die Detektion der lysinreichen Bereiche am N-Terminus der Proteine, zum andern aber auch die zuverlässige Detektierbarkeit der kovalenten Aminosäuremodifikationen des Histoncodes. Die induzierte Modifikation kann von den Modifikationen des Histoncodes klar unterschieden werden.

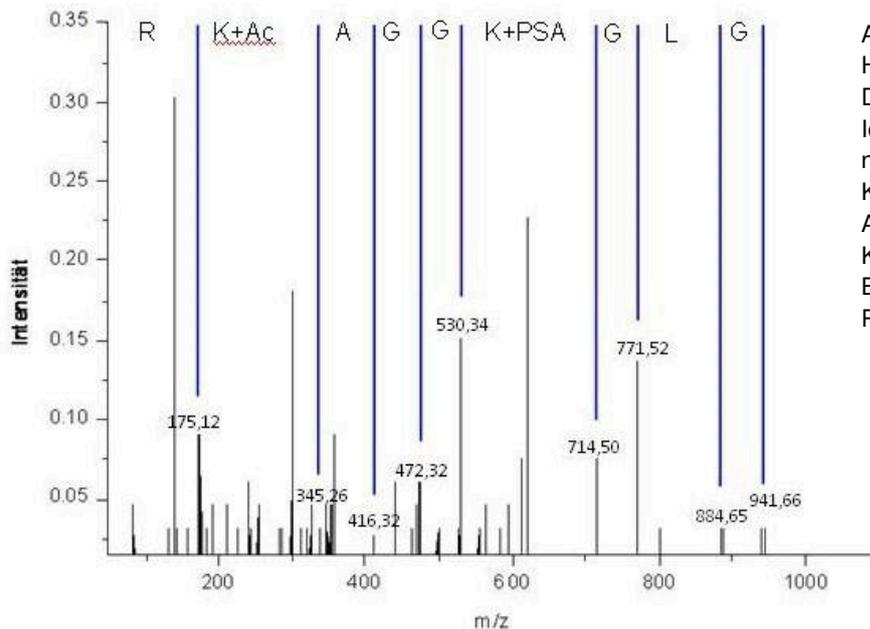


Abb. 21 MS/MS-Spektrum von H4:9-17. Dargestellt ist die Serie der y-Ionen (Sequenz von rechts nach links GLGKGGAKR). K+Ac bezeichnet die Acetylierungsstelle an Lys 16, K+PSA bezeichnet die Blockierung von Lys 12 durch Propionsäureanhydrid

In Abb. 21 wurde exemplarisch ein *de novo* sequenziertes Massenspektrum von Histon H4 dargestellt. Das Peptid zeigt die Aminosäuresequenz von Position 9 bis 17: GLGKGGAKR. In der dargestellten y-Ionenserie ist ersichtlich, dass das ursprünglich unmodifizierte Lysin an Position 12 durch Propionsäureanhydrid propionyliert wurde und damit von Trypsin nicht mehr als Schnittstelle erkannt wurde. Außerdem ist ersichtlich, dass das „blockierte“ Lysin klar von der *in vivo* entstandenen Acetylierung an Position 16 unterschieden werden kann. Alle Core-Histongruppen wurden mit Propionsäureanhydrid derivatisiert.

Im Folgenden werden die massenspektrometrisch detektierten posttranslationalen Modifikationsstellen der Core-Histone aus humanem Lebergewebe der Übersichtlichkeit halber statt durch MS-MS-Spektren an Aminosäuresequenzen der jeweiligen Histonsubtypen dargestellt. Die Sequenzen werden im Einbuchstabencode der Aminosäuren wiedergegeben, die Modifikationsstellen farblich markiert und beschrieben. Da bei den Linker-Histonen die Sequenzen stärker

variieren, die Modifikationsstellen sich jedoch in mehreren Subtypen mit leicht verschobenen Positionen finden ließen, wurde auf die Darstellung der Sequenzen verzichtet und die Modifikationsstellen in den einzelnen Subtypen nur benannt.

An Histonen der Subtypen-Gruppe H3 (Abb. 22) konnten eine Acetylierungsstelle und drei Monomethylierungsstellen identifiziert werden, bei der Acetylierungsstelle handelt es sich um Lysin 23 (H3K23Ac), bei den Monomethylierungsstellen um Lysin 9 (H3K9Me) und Lysin 27 (H3K27Me) und Lysin 79 (H3K79Me).

### **Histonsequenz H3:** (Sequenzbeispiel H3.3)

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPHRY  
RPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDL  
RFQSAAILGALQEASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKD  
IQLARRIRGERA

Abb. 22 Posttranslationale Modifikationen des Histon-Codes an Histon H3.

Aminosäuresequenz des Histons H3.3. im Einbuchstabencode, Acetylierungsstellen sind gelb markiert, Monomethylierungsstellen sind pink markiert.

### **Histonsequenz Subtyp H4:**

SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RDNIQGITKPAIRRLARRG  
GVKRISGLIYEETRGVLKVFL ENVIRDAV TYTEHAKRKTVT  
AMDVVYALKROGRTLYGFGG

Abb. 23 Posttranslationale Modifikationen des Histon-Codes an Histon H4.

Aminosäuresequenz des Histons H4. im Einbuchstabencode, Acetylierungsstellen sind gelb markiert, Monomethylierungsstellen sind pink markiert.

An Histonen des Subtyps H4 (Abb. 23) aus intravital gealtertem, humanem Lebergewebe konnten 3 Acetylierungsstellen und eine Monomethylierungsstelle nachgewiesen werden. Die erste Acetylierungsstelle ist die N-terminale Acetylierung

von Serin an Position 1 der Aminosäuresequenz (H4S1Ac). Des Weiteren konnten Acetylierungen an den Lysinen 16 (H4K16Ac) und 12 (H4K12Ac) nachgewiesen werden. Außerdem handelt es sich bei der an K16 beschriebenen Acetylierung um

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

die am häufigsten detektierte Modifikation die im Rahmen dieser Analysen aufgetreten ist. Zusätzlich zu den Acetylierungen fand sich am Histon H4 auch eine Monomethylierungsstelle an Lysin 20 (H4K20Me).

#### Histonsequenz H2A (Sequenzbeispiel H2A.1)

SGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGN<sup>E</sup>  
 RVGAGAPVYLA<sup>E</sup>AVLEYLTAEILELAGNAARDNKKTRII<sup>E</sup>PRH  
 LQLAIRNDE<sup>E</sup>LNKLLGKVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTESH  
 HKAKGK

Abb. 24 Posttranslationale Modifikationen des Histon-Codes an Histon H2A.

Aminosäuresequenz des Histons H2A.1. im Einbuchstabencode, Histoncode-unabhängige Methylierungsstellen (dunkelgrün)

Für Histone der Untergruppe H2A konnten (Abb. 24) Histoncode-unabhängige Methylierungsstellen an Glutaminsäure 41 (H2AE41Me) und Glutaminsäure 92 (H2AE92Me) gezeigt werden.

#### Histone H2B: (Sequenzbeispiel H2B.1K)

MPEPSKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSIY  
 VYKVLKQVHPDTGISSKAMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLA  
 HYNKRSTITSR<sup>E</sup>IQTAVRLLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKY  
 TSSK

Abb. 25 Posttranslationale Modifikationen des Histon-Codes an Histon H2B.

Aminosäuresequenz des Histons H2B.1K. im Einbuchstabencode, Acetylierungsstellen sind gelb, eine Sequenzabweichung hellgrün markiert, gleiche Sequenzbereiche wurden unterstrichen.

Innerhalb der Histon-Untergruppe H2B (Abb. 25) konnten 1 bis 2 Acetylierungsstellen, und eine so genannte Sequenzabweichung identifiziert werden.

Bei der/den Acetylierungsstellen handelt es sich um eine Acetylierung innerhalb eines Peptids mit der Aminosäurefolge: KAVTK. Diese Sequenz kommt innerhalb der Primärsequenz der Histone der H2B-Gruppe 2 mal vor. Zum einen an Position

16-21 (H2BK16Ac), zum anderen an Position 116-121 (H2BK116Ac). Außerdem fand sich eine Abweichung in der Primärsequenz von H2B an Position 94 (H2BE94).

Bei den Linker-Histonen H1 ließ sich durchweg nur eine Art von Modifikationen belegen, und zwar handelt es sich hierbei um Propionylierungen (Prop), die an Lysin erfolgen und einen Massenshift von +56 Da ausmachen. Es handelt sich um die chemisch gleiche Modifikation wie sie auch beim Einsatz der Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid zustande kommt. Die Linkerhistone wurden jedoch nicht mit PSA derivatisiert. Die Modifikation fand sich jeweils in Peptiden deren Sequenzen in mehreren der H1 Subtypen vorkommen und bei denen die Position in der Proteinsequenz von Subtyp zu Subtyp variiert. Bei H1.2 & H1.4 betroffen K81Prop, K46Prop, bei H1.2 K63Prop. Bei H1.3 betroffen K82Prop, K47Prop, K64Prop, Bei H1.5 betroffen K84Prop und K49Prop.

### 3.4.3 Detektion von Deiminierungsstellen

Die massenspektrometrische Detektion deiminierter Argininreste ist, ebenso wie die Detektion von Deamidierungsstellen eine methodische Herausforderung. Bisher wurde die Deiminierung summarisch im Zuge der Aminosäureanalytik mitbestimmt. Massenspektrometrisch jedoch ist der Nachweis von Deiminierung zunächst nicht gelungen. Erst nachdem durch „in vitro“ Deiminierung die Umsetzung von Arginin zu Citrullin (mittels PAD4) in aufgereinigten Histonproben induziert worden war, konnte gezeigt werden, dass die Detektion von deiminerten Histonen mit der gewählten massenspektrometrischen Analysemethode tatsächlich möglich war. Abb. 26 zeigt die Deiminierung von H3R72. Das Peptid zeigt die Pos. 70-83 des Histons H3 mit der Sequenz: L-V-**Cit**-E-I-A-Q-D-F-Q-T-D-L-R.

Ein massenspektrometrischer Nachweis von „in vivo“ entstandenen Deiminierungsstellen in den aus humaner Leber gewonnen Histonproben gelang jedoch nicht.

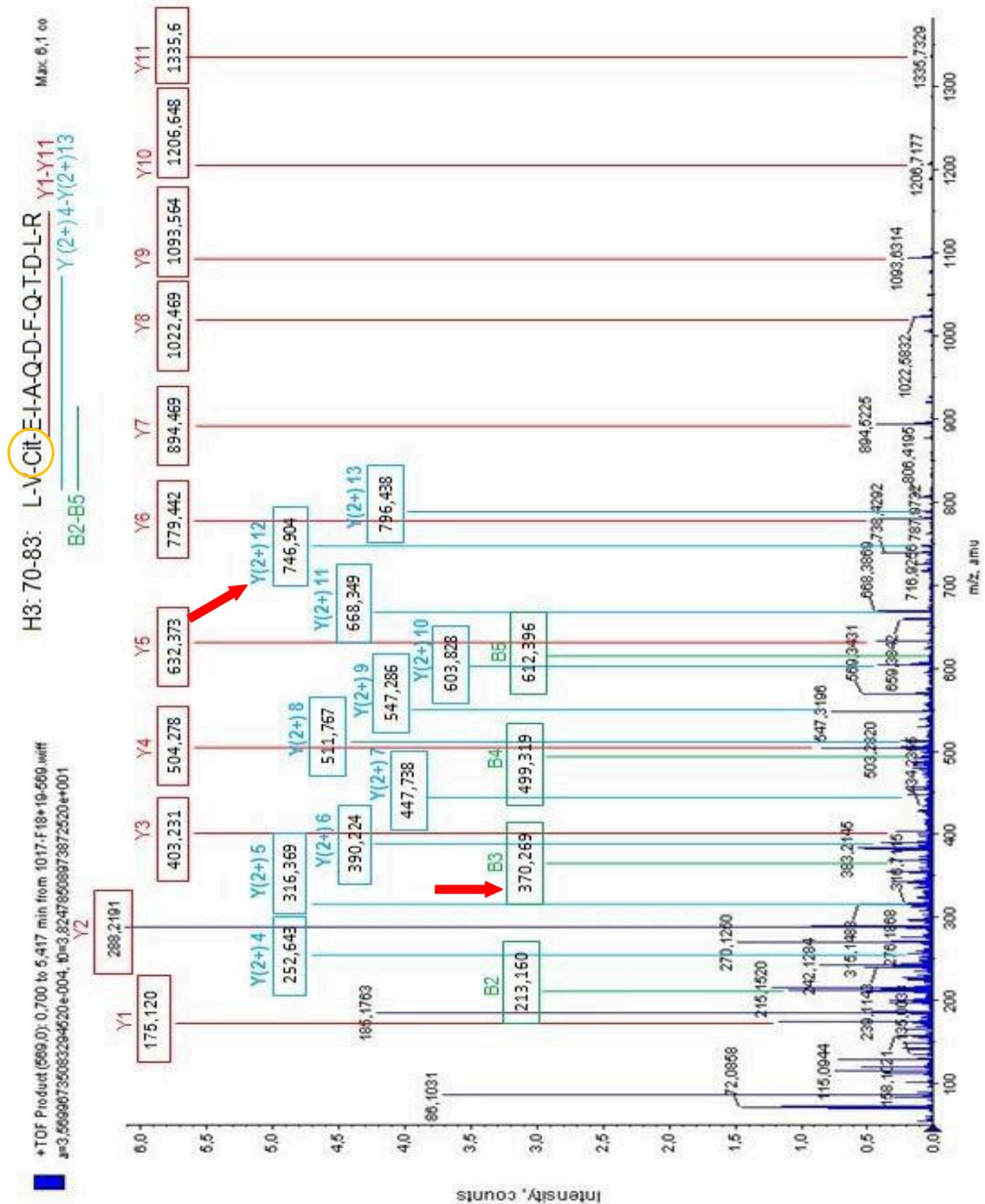


Abb. 26 *De novo* sequenziertes Spektrum des deiminierten Peptides H3: 70-83

Farbcodierung: y-Ionen-Serie (rot), 2-fach geladenen y-Ionen-Serie (hellblau), b-Ionen-Serie (grün), Deiminierungsstelle in der b-Serie und der 2-fach geladenen y-Serie mit roten Pfeilen markiert. Leserichtung der y-Serien von rechts nach links, für die b-Ionenserie von links nach rechts

### **3.5. Versuche zur Identifikation und Isolation deamidierten bzw. deiminierten Materials (Proteine/Peptide)**

Da der massenspektrometrische Nachweis der Deamidierung bzw. Deiminierung in den chromatographisch aufgereinigten Histonproben nicht gelang, sollte die Komplexität der tryptisch verdauten Proben verringert werden. Der Ansatz bestand darin möglichst deamidiertes bzw. deiminiertes Material aus tryptisch verdauten Proben von nicht deamidiertem, bzw. nicht deiminiertem Material chromatographisch zu trennen und die gewonnenen Fraktionen einzeln der Razemisierungs- bzw. der Aminosäureanalytik zuzuführen (vgl. 3.6.1).

Parallel sollte die Identifikation deiminierten Materials über den Einsatz eines Anti-Peptidylcitrullin-Antikörpers (AB5612 von Millipore) ebenfalls in den durch die chromatographische Trennung des tryptischen Verdaus erzeugten Fraktionen erfolgen (vgl. 3.6.2).

Außerdem sollte überprüft werden in wie weit sich Deiminierung durch im Handel erhältliche PAD4 in Histon H2B erzeugen ließe um dies so mit Peptidylcitrullin „angereicherte“ Material der massenspektrometrischen Analytik zuzuführen (vgl. 3.6.3 bzw. Tab. 5).

#### **3.5.1 Chromatographische Auftrennung tryptischer Peptide und Identifikation von Fraktionen mit razemierten (deamidierten) und deiminierten Peptiden zum konzentrierten Einsatz in der Massenspektrometrie**

Die Auftrennung tryptisch verdauter Peptide erfolgte zur Identifikation von Fraktionen mit razemierten (deamidierten) Peptiden sowie zur Identifikation von Fraktionen mit deiminierten Peptiden, um diese dann vereinzelt der Massenspektrometrie zuführen zu können (vgl. 2.6.4). Die Auftrennung verlief erfolgreich, es setzen sich mehr als 20 Signale voneinander ab (vgl. Abb. 27). Die den Signalen zugehörigen Fraktionen wurden vakuumgetrocknet, hydrolysiert und der Razemisierungs – sowie der Aminosäureanalytik zugeführt.

Im Ergebnis erwiesen sich die Peptid-Fractionen als für die weitere Analytik allerdings zu gering konzentriert.

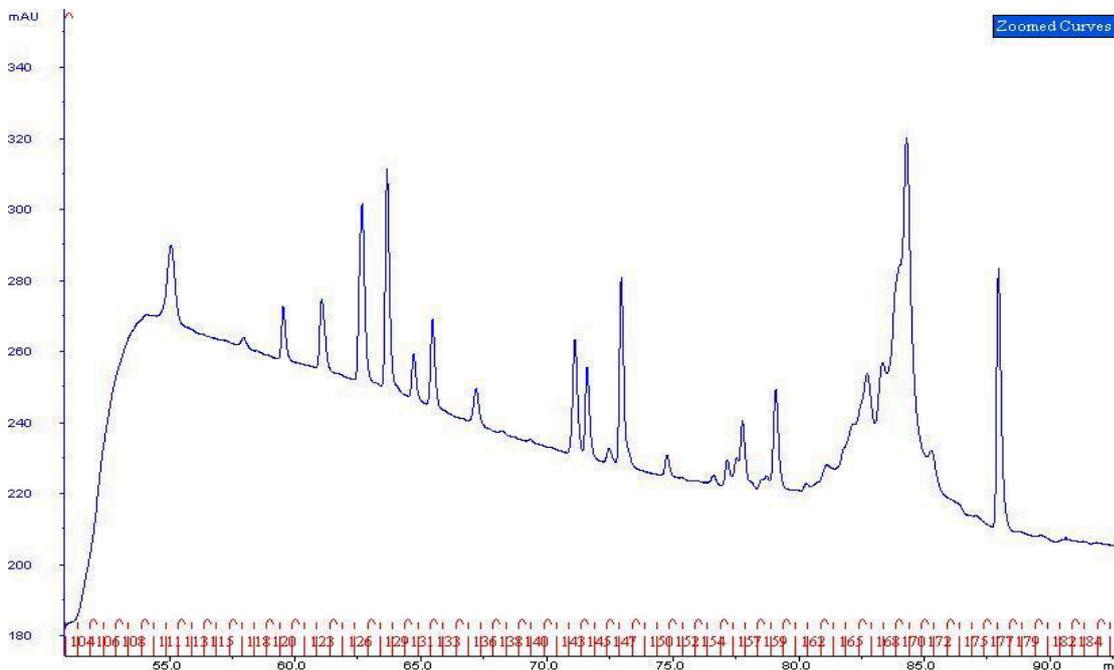


Abb. 27 Chromatographische Auftrennung tryptischer Peptide.

Y-Achse: Signalintensität in LU, X-Achse: Laufzeit (1 ml entspricht 1 min), außerdem Einteilung der Fraktionen (rot), in blau Signale der eluierenden tryptischen Peptide

### 3.5.2 ELISA zur Identifikation von Fraktionen mit deiminierten Peptiden zum konzentrierten Einsatz in der Massenspektrometrie

Als sensitiveres Nachweisverfahren kam für die Identifikation deiminiertes Peptide ein ELISA in Frage, da mit dem AB5612 von Millipore ein Antikörper zur Detektion von Peptidylcitrullin zur Verfügung stand. Ein solcher Antikörper zur Detektion von Razemisierung/Deamidierung stand nicht zur Verfügung.

Da vom Hersteller des Antikörpers keine Informationen darüber vorlagen, wie lang Peptide sein müssen, um vom Antikörper erkannt werden zu können musste zunächst getestet werden, ob der Antikörper an tryptische Peptide von Histonen binden kann. Dazu wurden tryptische Verdauung der einzelnen Histongruppen im Vergleich zu unverdaulichem Material aufgetragen (Durchführung siehe 2.8, Probenauftrag vgl. Tab. 4).

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

In allen Fällen konnte gezeigt werden, dass der Antikörper Peptidylcitrullin nur im unverdauten Histon detektieren konnte. Die Trypsinverdau der Histongruppen wiesen in allen 4 Fällen ebenso wie BSA, Trypsin und PAD4 ein negatives Ergebnis auf.

Eingesetzte Probe	Ergebnis im ELISA
BSA (Negativkontrolle)	-
Trypsin	-
H1	+
H1 <i>verdaut</i>	-
H2B	+
H2B <i>verdaut</i>	-
H3	+
H3 <i>verdaut</i>	-
H2A+H4	+
H2A+H4 <i>verdaut</i>	-
H3 + PAD4	+++
H2B + PAD4	++
PAD4	-

Tab. 4 Peptidylcitrullinnachweis – ELISA:  
Spalte 1 eingesetzte Proben,  
Spalte 2 Ergebnis: positiv (+), negativ (-).

### 3.6 Anreicherung von Peptidylcitrullin in Histon H2B & H3 mittels *in vitro* Deiminierung durch PAD4

Die *in vitro* Deiminierung erfolgte wie in 2.6.3 beschrieben. Histone, die mit PAD4 deiminiert worden waren, zeigten im ELISA eine für H3 3-fach (+++) und für H2B 2-fach (++) erhöhte Signalintensität (vgl. Tab. 4, hellblau unterlegt) als in den nicht deiminierten Proben (weiß unterlegt).

In so erzeugtem *in vitro* deiminierten Material von H3 erfolgte nach tryptischem Verdau die Detektion von Peptidylcitrullin (vgl. 3.4.3).

## **4. Diskussion**

Histone sind funktionell sehr wichtige Proteine. Ihre posttranslationalen Modifikationen vermitteln bzw. bestimmen entscheidend die Proteinfunktion. Die bislang zu posttranslationalen Histonmodifikationen vorliegenden Daten, stützen sich fast ausschließlich auf die Ergebnisse von in-vitro-Untersuchungen an Zellen aus Zellkulturen, die keiner natürlichen Alterung oder weiteren Einflüssen im Gesamtorganismus unterworfen waren.

Ziel der Arbeit war zunächst die Überprüfung der in-vitro gewonnenen Daten an Zellen aus einem Gewebsverband. Dazu wurden Lebergewebeproben aus autopsisch entnommenem Material analysiert. Von besonderem Interesse waren dabei die spontanen Modifikationen, die in Zusammenhang mit (altersbedingten) Funktionsveränderungen in der Literatur bereits angesprochen worden waren, nämlich insbesondere Razemisierung und Deiminierung. Dazu wurde ein umfangreiches Datenmaterial erhoben, das im Folgenden diskutiert wird.

Weiteres Ziel war die Prüfung einer Beziehung zwischen der Akkumulation solcher Modifikationen und dem Muster der kovalenten Aminosäuremodifikationen des Histon-Codes. Dieses Ziel konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur bedingt erreicht werden, weil trotz aufwändiger und umfangreicher experimenteller Ansätze insbesondere die Klärung der Lokalisation der betroffenen Aminosäurereste in den Histonmolekülen nicht befriedigend an dem Leichenmaterial gelang. Auch dieses (negative) Ergebnis wird nachfolgend diskutiert.

### **4.1 Qualität der Aufreinigung der Histone aus humanem Lebergewebe**

Die etablierte Methode zur Aufreinigung der Histone aus Lebergewebe hat sich als reproduzierbar, praktikabel und kompatibel mit den nachfolgenden Analysemethoden erwiesen. Das Elutionsmuster war für die Histone typisch (Garcia et al. 2007, Lindner & Helliger 1990) und gut reproduzierbar, die Signalintensitäten variierten jedoch

individuell, was durch die individuelle Beschaffenheit der jeweiligen Gewebeproben begründet sein dürfte (variierender Anteil an Bindegewebe und Fett etc.). Nach elektrophoretischer Trennung (Lindner 2008) konnten die entstandenen Banden durch einen mitgeführten Histonstandard eindeutig den Histon-Gruppen zugeordnet werden (vgl. Abb. 10). Dabei stellte sich das Linker-Histon H1 erwartungsgemäß als Doppelbande dar (Hnilica *et al.* 1978, Panyim & Chalkley 1969). In der Literatur wird dieses Verhalten damit erklärt, dass die Subtypen von H1 von allen Histonen (die ja an sich in ihrer Struktur (=Aminosäuresequenzen) sehr hoch konserviert sind (Doenecke *et al.* 1997) am deutlichsten in ihrer Struktur unterscheiden.

Auch die Tatsache, dass H2A und H4 zusammen in 2 Signalen eluieren (vgl. Abb. 10), wurde schon mehrfach beschrieben (Hagiwara *et al.* 2005, Zhang 2002, Young *et al.* 2001, Lindner & Helliger 1990). Histon H4 ist allerdings das einzige Histon, von dem keine Subtypen existieren. Zhang (2002) postulierte, dass das zweite Signal durch (mehrfach) acetylierte Isoformen zustande kommen könnte. Aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft wurden H2A und H4 als Mischfraktionen bei den weiteren Analysen vernachlässigt. Das Hauptaugenmerk wurde auf die Histongruppen gerichtet die als „Reinfraktionen“ gewonnen werden konnten; allerdings ist auch bei diesen nicht klar ob sie eine oder mehrere Subtypen der Histongruppen enthielten. Zur Histonausstattung humaner Leberzellen (Art und Menge der verschiedenen Subtypen) finden sich in der Literatur keine Erkenntnisse. Es muss daher immer davon ausgegangen werden, dass es sich um Subtypenmischungen handeln könnte. Die Bezeichnung „Reinfraktion“ bezieht sich damit auf die Reinheit der übergeordneten Histongruppen H2A, H2B, H3 und H1.

Methodenkritisch muss angemerkt werden, dass die Gewebeproben zwar ganz überwiegend Hepatozyten enthielten, aber natürlich auch Bindegewebe und Gefäße. Die Histone aus deren Zellen sind zwar als mögliche Kontamination zu werten, wegen der großen Dominanz der Hepatozyten sind die erhobenen Daten dennoch als typisch für diesen Zelltyp zu sehen.

## 4.2 Razemisierung von Asx in Histonen aus intravital gealtertem Lebergewebe

### 4.2.1. Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Razemisierungskinetik und die Untersuchungsergebnisse

Die Razemisierung von Aminosäuren ist abhängig von verschiedenen Umgebungsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert und Zeit (Friedmann 2010, Alkass *et al.* 2010, McCudden und Kraus 2006). Die Umgebungstemperatur ist im Regelfall im postmortalen Intervall niedriger als in-vivo, so dass eine postmortale Nachrazemisierung vernachlässigbar ist (Meissner & Ritz-Timme 2010, Ritz-Timme 1999). Für AAR in Dentin wurde geschätzt, dass eine durchschnittliche Umgebungstemperatur von 15 °C über ein Intervall von zehn Jahren zu einem Fehler von 0,2 Jahren führte (Ogino *et al.* 1985). Es wurde kein Material von Brandleichen oder bereits fäulnisverändertes Gewebe (Einfluss auf die Proteindegradation ist nicht vorhersagbar) für die Analytik verwendet um eine Beeinflussung der ermittelten Werte auszuschließen (Ritz-Timme 1999). Die saure Hydrolyse, der alle Proben unterzogen wurden, kann Razemisierung induzieren; diese in-vitro-Razemisierung ist bei der Interpretation der erhobenen Daten zu berücksichtigen (Waite *et al.* 1999). Da alle Proben dieser Studie den gleichen Hydrolysebedingungen unterlagen, kann die hierbei entstandene Razemisierung als immer gleich angenommen werden.

### 4.2.2 Razemisierungsgrad von Asx in den aufgereinigten Leberhistonen

Betrachtet man die niedrigen Werte des Razemisierungsgrades der Histongruppen H2A, H3 und H4, so ließen sich die durchweg gleichermaßen niedrigen Werte als durch die Hydrolyse verursachte Basis-Razemisierung interpretieren. Die höheren Werte bei den Histongruppen H1 und H2B (vgl. Abb. 12) deuten dagegen tatsächlich auf eine intravitale Akkumulation razemisierter Asx-Reste hin.

Bisher existieren nur wenige Daten zur Razemisierung von Histonen in der Literatur. Neufeind (2011) untersuchte Histone aus humanem Myokardgewebe. In Neufeinds Studie (2011) lagen vergleichbare Hydrolysebedingungen vor und die detektierten Werte des Razemisierungsgrades von H1 lagen mit ca. 1,6 % in einem sehr

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

ähnlichen Bereich wie hier die Werte von H2A, H3 und H4. Bei Histon H2B beschrieb Neufeind (2011) ein dem für H2B aus Leber beschriebenen Ergebnis sehr ähnliches Bild: es wurden deutlich höhere, stark streuende Werte des Razemisierungsgrades gemessen ohne eine feststellbare Altersabhängigkeit. Neufeind (2011) führte dies auf eine intravitale Akkumulation razemisierter Asx- Reste zurück, vermutete aber, dass myokardiale Histone zwar altern, jedoch keine permanenten Proteine sind, sondern einem Turnover unterliegen. Young (2005) berichtete, dass Histone der Gruppe H2B (isoliert aus Hirngewebe von Hunden), signifikant, nicht jedoch altersabhängig, razemisieren. Er detektierte Werte zwischen 5 % und 7%, was sich mit den in dieser Studie ermittelten Werten für razemisierte Asx-Reste in Histonen aus humaner Leber von bis zu 7 % gut vereinbaren lässt (vgl. Abb. 12).

Es ist nicht davon auszugehen, dass alle Asn-/Asp-Reste gleichmäßig von der Razemisierung betroffen sind. Young et al. (2005) stellten fest, dass z. B. H2B-Asp<sub>25</sub> stärker von Isomerisierung betroffen war als H2B-Asp<sub>51</sub>. Young et al. (2005, 2001) postulierten, dass die Aminosäurenkombination Asp-Gly, wie sie bei H2B an Pos 25-26 vorkommt, die anfälligste Aminosäurenkombination unter den in H2B vorkommenden ist. Wäre hier von den  $\approx 6,4$  Asx-Resten in H2B (vgl. Tab. 3) nur die Position Asp<sub>25</sub>-Gly<sub>26</sub> betroffen, würde dies bedeuten, dass bis zu 40 % dieses Asx-Restes razemisiert wären. Nach Young (2001) weist keines der anderen Core-Histone eine so instabile Stelle innerhalb ihrer Sequenzen auf. Die Ursache dieses Phänomens könne in der Lage der Modifikationsstelle begründet liegen. Diese liegt in exponierter Lage am N-Terminus des Proteins und ermöglicht dem Reparaturenzym PIMT den Zugang (Carter & Aswad 2008, Young et al. 2005). Weiterhin schätzen Young et al. (2005) die Bildung von Iso-Asp an Position Asp<sub>25</sub> auf bis zu 1% pro Tag, was für die PIMT (durch ihre beschriebene Insuffizienz) zu einem ständigen Substratnachschieben führen würde und somit zur Bildung des metastabilen Succinimid-Intermediates und u.a. auch zur Akkumulation von D-Asp und D-Iso-Asp (vgl. Abb. 2 & 3) (Young et al. 2005).

### **4.2.3 Korrelation der Akkumulation von Asx-Modifikationen mit dem Lebensalter**

Der Nachweis von D-Asx in Histonen belegt, dass Histone in Leberzellen tatsächlich altern. Es wurde beschrieben, dass Histone zwar einem Turnover unterliegen, sich dieser jedoch nicht am Turnover der Zelle orientiert – d.h. bei der Zellteilung werden „alte“ Histone an die Tochterzellen weitergegeben (Robinson & Robinson 2004, Anunziato *et al.* 2000, Piha *et al.* 1966, Bryvoet 1966). Piha (1966) berichtet weiter, dass der Turnover von Histonen in der Leber von Ratten schneller sei als der Turnover von Histonen in deren Hirngewebe.

Die erhobenen Daten (Akkumulation von D-Asx bei fehlender Altersabhängigkeit) sprechen für eine gewisse Überlebenszeit der Histone bei durchaus vorhandenem Turnover.

### **4.2.4 Biologische Folgen der intravitalen (Deamidierung und) Razemisierung sowie Isomerisierung von Asx-Resten in Histonen?**

Razemisierung und Isomerisierung (sowie Deamidierung) können zu einer veränderten Histon-DNA-Interaktion führen oder auch zu sterischen Behinderungen des Histoncodes (Carter & Aswad 2008). So stellt z. B. Lys<sub>23</sub> des Histons H2B eine Acetylierungs- bzw. Methylierungsstelle dar, die in direkter Nähe zu der oben beschriebenen instabilen Stelle Asp<sub>25</sub>-Gly liegt (Kim *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2003). Auch wurde bereits diskutiert, dass das Ausmaß der Razemisierung von Asx u.a. abhängig vom Funktionszustand der Zelle (der Nukleosomen) sein kann (Young *et al.* 2005), ohne dass bislang der Beweis dafür geführt wurde. Weiter wurde die Hypothese formuliert, dass die Razemisierung von Asp-Resten eine Moleküldegradation einleiten könnte (Robinson & Robinson 2004); sollte dies zutreffen, wäre dies als Erklärung für die Streuung der Werte in Betracht zu ziehen. Als Konsequenzen werden strukturelle und funktionelle Beeinträchtigungen des Chromatins diskutiert, außerdem die Möglichkeit der Genese einer Autoimmunität (H2B als Auto-Antigen; Young *et al.* 2005). Auch für diese Hypothesen gibt es bislang keine experimentellen Belege (Young *et al.* 2005). Welche Auswirkungen die

Modifikationen tatsächlich auf die Transkriptionskontrolle haben ist also noch ungeklärt (Carter & Aswad 2008).

Ein wichtiger experimenteller Schritt zur Klärung der biologischen Folgen der Asx-Modifikationen wäre deren exakte Lokalisation in den betroffenen Histonen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht massenspektrometrisch zumindest die deamidierten Asn-Reste darzustellen, was aus unten genannten Gründen nicht gelang.

#### **4.2.5 Lokalisation von Deamidierungsstellen in Histonen**

Die Lokalisation deamidierter Asparaginreste innerhalb der betroffenen Histone wäre ein wichtiger Schritt zur Klärung der funktionellen Konsequenzen der Deamidierung. Sie ist allerdings eine methodische Herausforderung.

Bisher wurde die Deamidierung im Zuge der Razemisierungsanalytik indirekt mitbestimmt. Dort liegen zwar nach saurer Hydrolyse summarisch alle Asparaginreste deamidiert vor, weshalb deamidierte Asparaginreste die schon vor der Hydrolyse vorlagen, nicht von solchen unterschieden werden können, die durch die Hydrolyse entstanden sind. Dennoch erhöhen intravital entstandene Deamidierungen die Razemisierungswahrscheinlichkeit und damit die Razemisierungsrate an den von Deamidierung betroffenen Asparaginresten. Daher belegt das Vorhandensein von D-Asparaginsäure indirekt das Vorhandensein von intravital entstandenen Deamidierungen (Robinson & Robinson 2004).

Die Detektion deamidierter Aminosäuren in Proteinen und Peptiden ist durch den geringen Massenshift (0,984 Da) besonders erschwert und gelang hier an den Proben aus postmortal gewonnenem Gewebe nicht. Es wurde ein deamidiertes Produkt mit isotopischen Peaks generiert, die sich mit dem nicht deamidierten des Precursors überlappten (vgl. Abb. 6, 19 & 20)(Cournoyer *et al.* 2009). Das Hindernis bei der Detektion war im Fall der Deamidierung (wie auch im Fall der Deiminierung) (siehe dort) die inkomplette Deamidierung der Asparaginreste.

Verdeutlicht wird dies in Abb. 20. Denn selbst nach Induktion der Deamidierung war dieses Peptid nicht zu 100 Prozent umgesetzt („Restsignal“ bei 703,44). Zusätzlich erschwert wurde die Detektion durch das Fehlen der in der Literatur beschriebenen Hot-Spots (vgl. 1.2.5) (Chelinus *et al.* 2005). So können ebenfalls keine Aussagen darüber getroffen werden welche Asn-Reste mehr oder weniger wahrscheinlich deamidiert werden könnten. Ein Ausweg aus dem „Detektions-Dilemma“ - wenn auch ein sehr aufwändiger und teurer - wäre die Entwicklung sequenzspezifischer Antikörper für das Histon der Wahl, die alle potentiell betroffenen Asparaginreste abdecken.

### 4.3 Citrullin in Histonen aus intravital gealtertem Lebergewebe

Deiminierung von Peptidylarginin zu Peptidylcitrullin erfolgt enzymatisch durch die Enzymfamilie der Peptidylarginindeiminasen „PADs“ (EC. 3.5.3.15) (Chanvanas *et al.* 2004, Arita *et al.* 2004, Vossenar *et al.* 2003, Terakawa *et al.* 1991) und wurde bisher beschrieben für die Core-Histone H2A, H3 und H4 aus diversen Zellkulturen (Pratesi *et al.* 2013, Hagiwara *et al.* 2005, Cuthbert *et al.* 2004, Hagiwara *et al.* 2002) sowie für H2B und H1 aus humanen Kardiomyozyten (Neufeind 2011), und H2B aus humanen Granulozyten (Michele 2008).

Um einen Eindruck zum Ausmaß dieser funktionell bedeutsamen Modifikation in Histonen aus humanem Lebergewebe zu bekommen, wurden im Sinne eines „Screenings“ die Citrullinkonzentration aufgereinigter Core-Histonfraktionen (Abb. 16+17), sowie der Linkerhistonfraktion (Abb. 15) bestimmt. Citrullin konnte in allen untersuchten Histonfraktionen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 15-17).

Die hier erhobenen Daten zeigen erstmals, dass in vivo Histone aus humanem Lebergewebe Deiminierungen in allen Histontypen in beachtlichem Maße aufweisen (vgl. Abb. 15-17). Theoretisch kann jeder Argininrest eines Proteins deiminiert werden, allerdings beeinflusst die unmittelbare Nachbarschaft der Argininreste die Wahrscheinlichkeit einer Deiminierung (Györgi *et al.* 2006). So wird die Kombination N- Arg – Asp – C sehr leicht deiminiert (N= Richtung des N-Terminus; C= Richtung des C-Terminus), die Kombination N – Arg – Glu – C eher schlecht, die Kombination

N – Arg – Arg – C mit zunehmender Nähe zum C-Terminus des Proteins immer schwerer; Die Kombination N – Pro – Arg – Pro – C wird in der *Praxis* überhaupt nicht deiminiert (Györgi *et al.* 2006, Tarcsa *et al.* 1996).

Die Ermittlung des Citrullingehaltes der Histone über die Aminosäureanalytik erfolgte summarisch, d.h. über alle Argininreste. Da aber, wie eben erwähnt, die Nachbarschaft der Argininreste die Deiminierung einzelner Arginine beeinflusst, ist anzunehmen, dass nicht alle Arginine der betroffenen Histone gleichmäßig von der Deiminierung betroffen sind und so die Deiminierungswerte der tatsächlich betroffenen Argininreste höher liegen müssten als die summarischen Daten angeben.

Diese Daten belegen zum ersten Mal die Deiminierung der Histone H1 und H2B intravital „gereifter“ Histone aus humanem Lebergewebe mit Maximalwerten von 10,4 % für H1 und 14,6 % für H2B, (11 % für H2A, 7,5 % für H4 und 5% für H3).

#### **4.3.1 Akkumulation von Citrullin in Histonen aus Lebergewebe mit zunehmendem Lebensalter ?**

Eine Altersabhängigkeit der Akkumulation der Citrullinreste war in keinem der Datensätze festzustellen.

Die Frage, ob eine altersbedingte Akkumulation von Peptidylcitrullin nachzuweisen ist, stellte sich, weil zum Einen nicht bekannt ist, ob die Deiminierung reversibel ist (György *et al.* 2006) oder die betroffenen Histone im Zuge von „Chromatin remodeling“ ausgetauscht werden, zum Anderen weil sich die Konsequenzen der bekannten, altersbedingten Histonmodifikationen und die der Deiminierungen in weiten Teilen ähnlich sind. Dies wird im Folgenden näher erläutert.

Es gibt in der Literatur einige Erkenntnisse zu altersbedingten Histonmodifikationen. Sarg *et al.* (2002), konnten zeigen, dass eine trimethylierte Form von Histon H4 in Rattenleber und -niere mit steigendem Alter der Tiere zunimmt; ebenso wurde berichtet, dass die Carbonylierung von Histon H3 mit dem Alter abnimmt (Kawakami

*et al.* 2009, Sharma *et al.* 2006). Und es gibt Berichte über eine altersbedingte Zunahme von deamidierten H1° Histonen, sowie eine Zunahme N-terminal acetylierter H1° Histonen aus Rattenhirn und –leber (Lindner *et al.* 1998).

All diese altersbedingten Modifikationen haben gemeinsam, dass sie sich auf die Struktur und/oder Funktion auswirken. Im Fall des Anstieges der H4K20-Trimethylierung ist diese assoziiert mit der Bildung von Heterochromatin, hat also die Kondensation des Chromatins zur Folge (Bannister & Kouzarides 2005). Die Deamidierung von Asn oder Gln hat Auswirkungen auf die physikochemischen Eigenschaften und die funktionelle Stabilität des Proteins (Patel *et al.* 2011). Im Fall der abnehmenden Carbonylierung sind die Konsequenzen denen der Deiminierung sehr ähnlich; die Carbonylierung reduziert um eine positive Ladung und ändert die Struktur des Proteins und damit dessen Interaktionsfähigkeit (Kawakami *et al.* 2009). Die N-terminale Acetylierung von Histonen wurde unter Anderem der Regulation der Proteindegradation, Protein-Translokation, Komplex-Formation und Apoptose zugerechnet (Schiza *et al.* 2013).

Letztlich schließt die fehlende Korrelation des Citrullingehaltes mit dem Lebensalter die Funktion der Deiminierung als Implentierung „molekularer Verfallsmechanismen“ nicht aus.

#### **4.3.2 Biologische Folgen, Funktionen und Determinanten der Deiminierung von Argininresten in Histonen ?**

Als Konsequenzen der Deiminierung wurden unter anderem beschrieben: der Verlust der positiven Ladung des Arginins (Rohrbach *et al.* 2012, György *et al.* 2006, Van Venrooij *et al.* 2000), sowie die Beeinflussung der Komplettladung des Proteins (György *et al.* 2006, Vossenar *et al.* 2003), die Beeinflussung der Struktur und Funktion des Moleküls (Konformation) (Pratesi *et al.* 2013, Mohanan *et al.* 2012, Neeli *et al.* 2008, Hagiwara *et al.* 2005, Chanvanas *et al.* 2004, Vossenar *et al.* 2003), die Beeinflussung des isoelektrischen Punktes (IP) (György *et al.* 2006), die Beeinflussung der Wasserstoffbrückenbindungsfähigkeit (György *et al.* 2006), ein

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit (van Venrooij et al. 2000) und Dekondensation (Dawson & Kouzarides 2012). Ab Deiminierungswerten von 5 % beginnt sich die Struktur des Proteins aufzulösen, ab 10 % kommt es gar zur Denaturierung des Proteins (György et al. 2006), wobei diese Aussage von Tarcsa et al. (1996) dahingehen relativiert wurde, dass sie annehmen, dass es in vivo nicht tatsächlich zur Denaturierung kommt, sondern nur zu einer veränderten, losereren, weniger organisierten und offeneren Konfiguration. Bei den hier ermittelten Citrullingehalten von 10,4 % für H1, 14,6 % für H2B und 11 % für H2A, 5% für H3 und 7,5 % für H4, lägen schon drei der fünf Histongruppen in dem Bereich in dem Denaturierung der Proteine postuliert wurde (György et al. 2006). Es kann also zumindest davon ausgegangen werden, dass sich der hohe Citrullingehalt auf die Struktur der Histone auswirkt, ob es allerdings zu einer Denaturierung kommt kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend beurteilt werden.

Die Deiminierung ist mehrfach als antagonistische Modifikation zu Histoncode-zugehörigen Methylierungen an Arginin beschrieben worden, und zwar für Histon H2A, H3 und H4 (Raijmakers et al. 2007; Thompson und Fast 2006, Denman 2005; Tarcsa et al.1996). Es kann daher angenommen werden, dass die Deiminierung von Peptidylarginin zu Peptidylcitrullin in den Histonen H2B und H1 ebenso funktionell bedingt ist wie auch bei den übrigen Histongruppen (Pratesi et al. 2013, György et al. 2006, Vossenar et al. 2003, Hagiwara et al. 2002) und den epigenetischen Regulationsmechanismen zuzurechnen ist. Einzig Neufeind (2011) und Michele (2008) beschreiben ebenfalls die Detektion von deiminierten Histonen H2B und H1 (isoliert aus humanem Myokard) bzw. von H2B (isoliert aus Granulozyten). Auch bei Neufeind (2011) lag der maximaler Citrullingehalt von H2B mit 11 % relativ hoch (für H1 wurde ein Maximalwert von 6 % erreicht). Michele's Citrullingehalt lag für Histon H2B bei 9 % bis 17 %.

Interessant bleibt die Tatsache, dass eine Deiminierung von solchem Ausmaß nur in diesen beiden Studien und der hier vorgelegten beschrieben werden konnte. Viele Quellen unterstreichen hingegen, dass nur H2A, H3 und H4 deiniert gewesen sind (Neeli et al. 2008, György et al. 2006, Cuthbert et al. 2004, Arita et al. 2004, Nakashima et al. 2002). Hagiwara et al. (2005) betonen sogar, dass in H2B aus HL-60 Granulozyten kein Peptidylcitrullin zu detektieren gewesen sei.

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

Der Studie von Neufeind (2011) und der hier vorliegenden ist gemeinsam, dass humanes Gewebe untersucht wurde - und beide Studien haben gemeinsam, dass es sich um postmortal entnommenes Gewebe handelte. Aufgrund dieser Gemeinsamkeit käme in Betracht, dass es sich womöglich um „agonale Artefakte“ handeln könnte, die durch die besondere zelluläre Situation im Sterbeprozess des Organismus bedingt sein könnten. Dabei sind, anders als beim Zelltod *in vitro*, die Mechanismen des systematischen Kollapses, die den Tod eines Organismus begleiten, größtenteils noch unbekannt (Coburn *et al.* 2013). Die für die Deiminierung verantwortlichen Peptidylarginin-Deiminasen sind in ihrer Aktivität wie oben erwähnt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig (Asaga & Ishigami 2001, Takahara *et al.* 1986). Der Kalziumspiegel beträgt unter physiologischen Bedingungen  $10^{-8}$  M bis  $10^{-6}$  M, unter diesen Bedingungen wären die PADs inaktiv (György *et al.* 2006). Unter extremen Bedingungen, wie sie während apoptotischer (György *et al.* 2006) oder nekrotischer Prozesse auftreten (Coburn *et al.* 2013, McCall 2010, Golstein & Kroemer 2006, Zong & Thompson 2006, Orrenius *et al.* 2003), lägen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom genügend hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte für die PAD-Aktivität vor (die halbmaximale Aktivität von PAD2 liegt bei 40  $\mu\text{M}$  bis 60  $\mu\text{M}$ ) (György *et al.* 2006). Auch Neufeind (2011) argumentiert, dass die von ihr detektierten hohen Deiminierungswerte im Zusammenhang mit pathophysiologischen Zusammenhängen stehen könnten. So stellte sie fest, dass in Geweben, die mit Myokardnarben versehen waren, die Deiminierung von H1 besonders hoch war und vermutete, dass ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Zytosol - der bei einem Myokardinfarkt stattfindenden Nekrose - möglicherweise die Kernmembran ungehindert passieren kann und dort die PAD4 aktiviert (Neufeind 2011). Gegen diese Hypothese sprechen aber andererseits die Befunde, die Michele (2008) an Granulozyten erheben konnte. Bei diesen fand sich nach einer schonenden Aufreinigung im mikroskopischen Befund kein Hinweis auf apoptotische bzw. nekrotische Prozesse in den Zellen. Letztendlich kann aber anhand der bisher vorliegenden Ergebnisse weder die Entstehung im Zuge agonaler Vorgänge völlig ausgeschlossen werden, noch eine Funktionalität für die Histone H1 und H2B bestätigt werden. Weitere Hinweise könnte aber weiterhin die Identifizierung der tatsächlich betroffenen Argininreste liefern.

### 4.3.3 Lokalisation von Deiminierungsstellen

Ähnlich wie bei der Deamidierung wurde auch die massenspektrometrische Lokalisation der Citrullinreste in betroffenen Histonen angestrebt – als erster Schritt zum Verständnis funktioneller Konsequenzen.

Belegt werden konnte die „in vitro“ induzierte Deiminierung von H3Cit72 in dem Peptid H3: 70-83 mit der Sequenz L-V-Cit-E-I-A-Q-D-F-Q-T-D-L-R. Belege in der Literatur (Arita *et al.* 2006, Thompson & Fast 2006, Cuthbert *et al.* 2004) finden sich für eine Deiminierung von H3R2, H3R8, H3R17 und H3R26, nicht aber für die hier beschriebene H3R72. Allerdings muss einschränkend betont werden, dass es sich hierbei nicht um eine in vivo entstandene Deiminierung handelt, sondern um eine in vitro induzierte. Der Befund zeigt also, dass Deiminierung unter in vitro Bedingungen nicht nur im N-terminalen Bereich von H3 möglich ist.

Der Nachweis von Deiminierungsstellen ist ebenso wie die Detektion von Deamidierungsstellen eine methodische Herausforderung. Auch hier entsteht durch den geringen Massenshift von 0,984 Da (De Ceuleneer *et al.* 2012) ein Produkt mit isotopischen Peaks, die sich mit den nicht deiminierten des Precursors überlappen. Der Shift entsteht analog zu dem bei der Deamidierung (vgl. Abb. 6). Letztendlich dürfte das Problem hier ebenso wie bei der Deamidierung darin liegen, dass nicht alle Arginine gleichmäßig betroffen sind, jedoch aber deutlich mehr als 1 Arginin. So ist nicht der eine betroffene Arginirest zu 100 % deiminiert und zeigt deshalb auch nicht den kompletten Shift wie in Abb. 6 (c) oder (d) (Unvollständige Deiminierung (De Ceuleneer *et al.* 2012). Vielmehr ist zu befürchten, dass der Shift sich bei den betroffenen Peptiden wesentlich schwächer zeigt, in etwa wie es in einem Zwischenschritt zwischen (a) und (b) in Abb. 6 zu erwarten wäre. Zum Beispiel weisen die Subtypen von H3 im Durchschnitt 18 Argininreste auf (vgl. Tab. 3) und über all diese Reste beträgt die Deiminierung summarisch etwa 4-5 %. Wenn nun nur jeder dritte oder vierte Argininrest betroffen wäre, wäre dennoch fraglich, ob der Shift im konkreten Fall wirklich zu detektieren wäre. Daher wurde beschlossen, Versuche zur Identifikation/Anreicherung deiminierten Materials durchzuführen, um so Proben zu erhalten, in denen sich mehr als 50% deiminierten Materials befänden und um im Anschluss Spektren zu erzeugen, in denen sich der Shift besser darstellen und

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

identifizieren lassen würde. Leider scheiterte dieser Ansatz unter anderem an dem zu geringem Probenmaterial (vgl. 3.5) sowie der Tatsache, dass sich im immunologischen Ansatz der Antikörper für die Detektion von Peptidylcitrullin an tryptischen Peptiden als nicht geeignet erwies. Dies ist wahrscheinlich auf die Länge der tryptischen Peptide zurückzuführen, die im Mittel nur etwa 10-12 Aminosäurenreste lang waren.

#### 4.4 Detektion von posttranslationalen Histoncode-Modifikationen in Histonen

Es gibt bislang noch keine systematischen Daten zur Histonausstattung sowie zu Histon-Code-Modifikationen in humanem Hepatozyten aus dem physiologischen Gewebeverbund. Entsprechende Daten für humane Zellen wurden bislang für diverse Zellkulturen beschrieben [z.B. Garcia *et al.* 2007 (HEK293-Zellen), Bonenfant *et al.* 2006 (Jurkat Zellen), Beck *et al.* 2006 (OC-NYH), Bernstein *et al.* 2005 (HepG2-Zellen, CRL-1485-Zellen), Zhang *et al.* 2004 (HeLa-Zellen), Zhang *et al.* 2002 (HeLa-Zellen)].

Bei den am Häufigsten detektierten Modifikationen handelt es sich um Acetylierungen sowie Methylierungen. Die Literatur ordnet in den meisten Fällen die Acetylierung von Histonen einer transkriptionellen Aktivierung zu. So ist diese vermehrt im Euchromatin zu beobachten (Biel *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2002, Chaya *et al.* 2001). Methylierungen werden allgemein mit der Bildung von Heterochromatin in Verbindung gebracht und wirken häufig repressiv auf die Transkription (Biel *et al.* 2005).

Die Acetylierungsstelle **H3K23Ac** wurde unter anderem beschrieben von Garcia *et al.* 2007, Grant *et al.* 1999 sowie Ohe & Iwai (1981) wiesen die Modifikation an Histonen aus humaner Milz nach und Taverna (2007) beschrieben, dass die Modifikationsstelle bis zu fünffach acetyliert sein kann. H3K23 ist aber auch eine bekannte Methylierungsstelle (Cosgrove 2007).

Auch monomethyliertes **H3K9Me** wurde bereits beschrieben (Squazzo *et al.* 2007, Ohe & Iwai 1981). Die Monomethylierung wird mit Aktivierung, eine Trimethylierung an gleicher Stelle jedoch mit Repression in Verbindung gebracht und die

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

Methylierung von H3K9 und eine Phosphorylierung von H3S10 schließen sich gegenseitig aus (Biel *et al.* 2005). Hier finden Wechselwirkungen mit dem Heterochromatin assoziierten Protein (HP1) statt, die als am Silencing (= Inaktivierung von Genen) beteiligt beschrieben werden (Biel *et al.* 2005). H3K9 ist eine wichtige Modifikationsstelle, sie kann acetyliert oder methyliert werden (Abell *et al.* 2011) und damit die Bildung von Eu- wie Heterochromatin unterstützen (Biel *et al.* 2005).

Ebenso wurde **H3K27Me** bereits untersucht und beschrieben, (Dawson & Kouzarides 2012, Agger *et al.* 2007, Lachner *et al.* 2003, Ohe & Iwai 1981). Taverna *et al.* (2007), Fuchs *et al.* (2006) und Biel *et al.* (2005) nennen diese Monomethylierung im Zusammenhang mit Genrepression z.B. Inaktivierung des X-Chromosoms. Cosgrove (2007) beschreibt H3H27 auch als mögliche Acetylierungsstelle.

**H3K79Me**, vielfach beschrieben, z. B. von Dawson & Kouzarides (2012), Berger *et al.* (2007), Lachner *et al.* (2003), wird neben H3K4 und H3K36 den drei Stellen zugeordnet an denen aktives Euchromatin methyliert sein kann (Biel *et al.* 2005).

**H4S1Ac**: Als eine der am Häufigsten vorkommenden Modifikation an Proteinen von Säugetieren (80-90%) (Schiza *et al.* 2013) wird der N-terminalen Acetylierung eine Vielzahl von Aufgaben zugeschrieben wie die Regulation der Proteindegradation, der Protein-Translokation, Komplex-Formation, Apoptose und des zellulären Metabolismus (Schiza *et al.* 2013, Starheim 2012). Alle Histongruppen zeigen N-terminale Acetylierungen, am Häufigsten aber H2A und H4; Nat4 ist das verantwortliche Enzym (Schiza *et al.* 2013).

**H4K16Ac** wurde unter anderem beschrieben von Unnikrishnan *et al.* (2010), Berger *et al.* (2007), Fuchs *et al.* (2006), Lachner *et al.* (2003). Biel *et al.* (2005) ordnet diese Modifikation aktiver Transkription zu. Die Acetylierung an K16 kann einzeln vorkommen, die Acetylierung an Lysin 12 ist jedoch immer an ein Vorhandensein der Acetylierung von K16 gekoppelt (Zhang *et al.* 2002). Hayashi *et al.* (1982) fanden bis zu 40% aller H4 Moleküle an K16 acetyliert vor.

Auch **H4K12Ac** wurde schon häufig dokumentiert. Die Position H4K12 wurde von Cosgrove (2007) auch als mögliche Methylierungsstelle beschrieben und Fuchs *et al.* (2006) und die Arbeitsgruppe um Lachner (2003) stellten einen Zusammenhang von *Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

H4K12Ac mit der Deposition von Histonen her. Die Acetylierung von H4K12 ist immer an das Vorhandensein einer Acetylierung an H4K16 gekoppelt (Zhang *et al.* 2002).

Die Monomethylierung von **H4K20Me** wurde dokumentiert durch Dawson & Kouzarides (2012), Berger *et al.* (2007), Fang *et al.* (2002) und im Zusammenhang mit der Repression der Transkription gebracht (Biel *et al.* 2005). Außerdem wurde von Cosgrove (2007) beschrieben, dass die Monomethylierung von H4K20 die Acetylierung von H4K16 inhibieren kann. Im Übrigen kommt auch H4K20 als Methylierungsstelle vor (Cosgrove 2007).

Methylierungen an Glutaminsäure wie bei **H2AE41Me** und **H2AE92Me** gehören zu den bisher noch nicht dem Histoncode zugeordneten Modifikationen. Beschrieben wurde die Möglichkeit der posttranslationalen Methylierung von Glutaminsäure bereits durch Sprung *et al.* (2008). Demnach neutralisiert die Methylierung die negative Ladung der Aminosäure und hat dadurch ähnlich starke Auswirkungen auf die Proteinstruktur wie eine Acetylierung oder eine Phosphorylierung.

Bei der in H2B detektierten Acetylierungsstelle ergibt sich die Frage nach der Position innerhalb der Aminosäuresequenz, denn die Sequenz des Peptides an dem die Modifikation detektiert wurde, gibt es in H2B zweimal. Es könnte sich also entweder um **H2BK16Ac** oder **H2BK116Ac** handeln. Cosgrove (2007) beschreibt beide Positionen als mögliche Acetylierungsstellen, zusätzlich könnte an Position K116 alternativ Methylierung auftreten. Berger *et al.* (2007) setzten Acetylierungen an H2B grundsätzlich in Zusammenhang mit Aktivierung und Myres *et al.* (2003) postulieren, die Acetylierung von H2B sei eine Modifikation, die nur die am aktivsten transkribierten Gene/Loci betrafte. Da exakt dieses Peptid detektiert wurde, kann nicht abschließend gesagt werden ob es sich um den vorderen Sequenzabschnitt (also H2BK16ac) handelt oder den hinteren (H2BK116Ac) oder ob gar beide auftraten und auch beide Stellen acetyliert waren.

Bei **H2BE94** handelt es sich um eine noch nicht beschriebene Sequenz-Abweichung, eine Abweichung in der Primärsequenz, die sich keiner bisher bekannten natürlichen Variante oder einem speziellen Subtyp zuordnen lässt. In diesem Fall konnte an Position 94 statt einer Glutaminsäure ein Glutamin nachgewiesen werden. Der Ursprung dieser Modifikation bleibt vorerst ungeklärt.

Bei der bei den Linkerhistonen detektierten Modifikation der **Propionylierung** handelt es sich um eine Modifikation, die nicht dem Histon-Code zugerechnet wird, dennoch aber in vivo vorkommt (Chen *et al.* 2007). Es gibt bis dato noch nicht viele Studien, die sich mit der Propionylierung beschäftigt haben. Für H1 kann sie hier erstmals beschrieben werden. Zur Bedeutung dieser Modifikation postulierten Chen *et al.* (2007), dass alle bis dato bekannten Modifikationen an Lysin eine zentrale Rolle in der Zellphysiologie und Pathologie spielen und die Modifikation durch den durch sie hervorgerufenen Ladungsverlust wichtige Funktionen bei der Regulation biologischer Prozesse haben könnte. Auch Liu *et al.* (2009) vermuten hinter der Propionylierung eine Modifikation mit ganz ähnlichen Funktionen wie eine Acetylierung, z.B. für H2BK23Prop, auch beschrieben sie die Histon-Acetyltransferase p300 als Vermittler der Modifikation und Sir2 als entsprechenden Antagonisten. Beschrieben haben Chen *et al.* (2007) die Propionylierung an Histon H4, Liu *et al.* (2009) an H4 und H3 und Zhang *et al.* (2009) in H2B, H3 und H4. Über die Funktion und Bedeutung der Propionylierung für die Linker-Histone können aber noch keine konkreten Aussagen gemacht werden, jedoch bietet diese Modifikation viel Potential für weiterführende Studien.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden erstmals Daten zu Histonmodifikationen aus humanem, intravital gealtertem Lebergewebe erhoben. Diese Daten stimmen weitgehend mit den für Zellkulturen beschriebenen Daten überein. Erstmals belegt ist der Befund von propionylierten Lysinresten in der Linker-Histongruppe H1. Allerdings sind die vorliegenden Daten sicherlich nicht vollständig, da nicht alle Modifikationen auch gleich häufig oder für die angewandte Analytik vielleicht auch nicht in ausreichender Menge vorlagen. So wird es Modifikationen geben, die aufgrund ihrer geringen Häufigkeit nicht detektiert werden konnten. Außerdem bleibt zu bedenken, dass die Daten im vorliegenden Fall an Histonen aus Gewebeproben erhoben wurden, die bei Obduktionen entnommen wurden. Da weitgehend unbekannt ist, was nach dem Ableben eines Organismus mit dessen Histonen geschieht, kann nicht ausgeschlossen werden, dass lytische Prozesse in der Zelle nach dem Tod dazu führen, dass Modifikationen nicht (mehr) nachweisbar waren.

## 5. Zusammenfassung

### (Deutsche Version)

Histone zeigen eine Vielzahl posttranslationaler Proteinmodifikationen, die von großer Bedeutung für Struktur und Funktion der Proteine sind. In der Literatur gibt es umfangreiches Datenmaterial zu den Histonmodifikationen, die dem epigenetischen Histon-Code zugeordnet werden (insbesondere Acetylierung und Methylierung). Weniger Daten gibt es zu der offenbar irreversiblen Deiminierung von Arg-Resten, deren biologische Folgen noch nicht vollständig verstanden sind. Noch weniger Daten gibt es zu den spontanen, nicht enzymatischen Modifikationen, insbesondere zu der Deamidierung von Asn-Resten und der Razemisierung von Asp-Resten, die allerdings als funktionell bedeutsame Altersveränderungen der Histone angesprochen wurden. Fast alle publizierten Daten zu posttranslationalen Histonmodifikationen wurden bislang an Zellkulturmaterial erhoben, sodass unklar ist ob die beschriebenen Modifikationen auch unter in-vivo-Bedingungen vorliegen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Erkenntnislücken durch Nachweis der einschlägigen posttranslationalen Histonmodifikationen an in-vivo-gealtertem Gewebe zu schließen.

Der Arbeit lagen folgende **Arbeitshypothesen** zugrunde:

- (1) Humane Histone zeigen auch *intra vitam* eine alters- und/oder umweltbedingte Akkumulation (spontaner) posttranslationaler Aminosäuremodifikationen, hierbei besonders an Asparagin-, Asparaginsäureresten sowie Argininresten (Bildung von Citrullinresten).
- (2) Diese verändern die Struktur sowie die physikochemischen Eigenschaften der Moleküle und können so die enzymatische Vermittlung des Histon-Codes und damit die Transkriptionskontrolle stören.

Zusammenfassend wurde dazu folgendes Prozedere gewählt:

- Aufreinigung der Histone aus in vivo gealterten Zellen (autoptisch entnommenes Lebergewebe)
- Bestimmung des Razemisierungsgrades der Asx-Reste in den aufgereinigten Histonen; Prüfung des Zusammenhangs zwischen Lebensalter und dem D-Asp-Reste-Gehalt der Proben
- Bestimmung des Deiminierungsgrades der Arg-Reste in den aufgereinigten Histonen; Prüfung des Zusammenhangs zwischen Lebensalter und dem Citrullingehalt der Proben
- Massenspektrometrische Lokalisation deamidierter Asn-Reste, deiminierter Arg-Reste und der dem Histon-Code zugerechneten Modifikationen
- Auswertung und Interpretation der resultierenden „Modifikationskarte“.

**Hypothese (1)** wurde insoweit bestätigt, dass eine Akkumulation von D-Asx für die Histone H1 (bis 8,7 %) und H2B (bis 7 %) belegt werden konnte, die allerdings nicht mit dem Lebensalter korrelierte. Die Akkumulation dieser spontanen Modifikationen belegt eine gewisse Langlebigkeit der Histone, die aber dennoch einem Turnover zu unterliegen scheinen. Weiter wurde eine relevante Deiminierung von Argininresten festgestellt, insbesondere in den Histonen H2A (bis 11 %), H2B (bis 14,6 %) und H1 (bis 10,4 %); Citrullinreste in H2B und H1 werden hier für Histone aus humanem Lebergewebe erstmalig beschrieben. Die Deiminierung der Argininreste wird enzymatisch vermittelt. Dabei wird sie teils dem Histon-Code zugerechnet, teils wird von einer Induktion im Rahmen zellulären Stresses (Apoptose, Zelltod) ausgegangen. Hohe Deiminierungsraten der Arg-Reste sowie die Deamidierung von Asn-Resten und Asp-Resten sollen die Moleküle destabilisieren bzw. zur Denaturierung führen; insoweit könnten diese Modifikationen auch die Eliminierung „alter“ Histone einleiten.

Auch die Detektion einiger Histon-Code-Modifikationen an den Histonen aus postmortal entnommenem Lebergewebe war erfolgreich, so konnten einige in der Literatur an Zellkulturen beschriebene Acetylierungen und Methylierungen auch an Histonen aus Lebergewebe belegt werden. Propionylierungsstellen an Histon H1

konnten hier sogar erstmalig gezeigt werden; auch sie könnten dem Histon-Code zugeordnet werden, zu dieser Modifikation ist allerdings noch wenig bekannt.

**Hypothese (2)** ist unter Berücksichtigung der einschlägigen Literatur zu bejahen. Der Einfluss der Deamidierung von Asn-Resten, der Razemisierung von Asp-Resten und der Deiminierung von Arg-Resten auf Struktur und Ladung der Moleküle dürfte dadurch sicher auch Einfluss auf ihre Funktionalität bei der Vermittlung des epigenetischen Codes haben. Allerdings gelang in der vorliegenden Arbeit weder die massenspektrometrische Lokalisation deamidierter Asn-Reste noch deiminierter Argininreste in vivo entstandener Modifikationen als jeweils erster Schritt zur Klärung der Frage der biologischen Folgen der Modifikationen, da diese Modifikationen nicht in genügend hohen Konzentrationen in den Proben vorlagen. Eine weitere Eingrenzung der tatsächlich von Deamidierung betroffenen Asparaginreste sowie der von Deiminierung betroffenen Argininreste wäre unter anderem durch Generierung und Nutzung sequenzspezifischer Antikörper in diversen Immunologischen Ansätzen denkbar, auch über ein Bioinformatik gestütztes „modeling“ der potentiell betroffenen Sequenzbereiche. Für die Detektion der Deiminierungsstellen wäre ein weiterer Massenspektrometrie-basierter Ansatz möglich, über eine selektive Anreicherung deiminierter Peptide nach Modifikation mit 4-Hydroxyphenylglyoxal.

## Abstract

Histone proteins show lots of posttranslational modifications that are essential for structure and function of proteins. Lots of data on histone modifications have been published regarding the “histone-code” (especially acetylation and methylation). There is less data on the possibly irreversible deimination of arg residues whose biological consequences are not yet understood. Even less data is available on spontaneous, non enzymatic modifications like deamidation of asn residues or racemization of asp residues. However, some authors consider them to be functionally important alterations of histones during the aging process. Nearly all data on Histone modifications were collected by performing cell-culture-experiments and it is not yet clear if all of those modifications also occur in vivo.

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

The aim of this study was to fill this gap of knowledge by detecting posttranslational Histone modification in in vivo aged tissue. The following hypotheses formed the basis of the study:

- Human histones show *intra vitam* age- and environmental dependent accumulation of (spontaneous) posttranslational modification of amino acids, especially in asn, asp and arg residues (formation to citrulline)
- These modifications alter structure and physicochemical features of the molecules and may interfere with the histone code and by doing so disturb the transcriptional regulation.

In summary the following procedure was chosen:

- Purification of histones out of in vivo aged human liver tissue (removed during autopsy)
- Determination of the extent of aspartic acid racemization in purified histones; evaluation of a correlation between age and extend of D-asp-content
- Determination of the extent of deimination in purified histones investigation of a correlation between Age and extend of D-asp-content
- Mass spectrometric localization of deamidated asn residues, deiminated arg residues and posttranslational histone code modifications
- Analysis and interpretation of the resulting „modification map”

**Hypothesis (1)** an accumulation of D-asx could be confirmed for histones H1 and H2B. No age-correlation was observed. The accumulation confirmed certain longevity of histones, but however there seems to be a protein turnover. In addition, an accumulation of deiminated arg residues has been detected for H1 (10,4%), H2B (14,6%) and H2A (11 %). This is the first time that deiminated arg residues have been detected in Histones H1 and H2B of human liver tissue.

Deimination is an enzymatic modification partly assigned to the histone code, partly assigned to cellular stress (apoptosis, cell-death). It is assumed that high rates of

deimination or deamidation lead to a destabilization of protein structure or even denaturation of affected molecules. Therefore those modifications might even initiate the elimination of “old” histones.

Furthermore some certain acetylation and methylation sites that have been detected in cell-cultures could also be detected in histones of human liver tissue. Propiolylation has been detected within Histone H1 for the first time. It is considered to be part of the histone code too, however, there is too little knowledge concerning this modification to be sure.

Considering existing literature data, **hypothesis (2)** has been confirmed. The influence of deamidation, racemization and deimination on structure and charge of molecules can be considered to have also an effect on histone code modifications. Due to a low extend of modified peptides in the samples it was not possible to detect affected amino acid residues in mass spectrometric analysis as the first step in evaluating the biological consequences of this modifications. It might be possible to identify affected amino acids by creating sequence dependent antibodies for usage in an immunological approach, or by enriching of affected arg residues by modifying them with 4-hydroxyphenylglyoxal. Furthermore a bioinformatical approach involving modeling of potential affected sequences might be promising.

## 6. Tabellen und Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Theoretische Beziehung zwischen dem Razemisierungsgrad von Asx und dem Proteinalter
- Abbildung 2: Entstehung von D-Asparaginsäureresten durch spontane Modifikation von Asn- und Asp-Resten (verändert nach Clarke 1987)
- Abbildung 3: 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 (verändert nach Reissner und Aswad (2003)).
- Abbildung 4: Deamidierung von Asparagin resultiert in Bildung von Asparaginsäure
- Abbildung 5: Deamidierung von Glutamin resultiert in Bildung von Glutaminsäure
- Abbildung 6: Massenshift durch zunehmende Deamidierung eines tryptischen Peptides von Asn zu Asp.
- Abbildung 7: Deiminierung von Peptidylarginin resultiert in der Bildung von Peptidylcitrullin (van Venrooij & Pruijn 2000)
- Abbildung 8: Schematische Übersicht über das methodische Vorgehen
- Abbildung 9: Nomenklatur der Peptid-Fragmentierung verändert nach Roepstorff & Fohlmann (1984)
- Abbildung 10: Auftrennung der Histonsubtypen
- Abbildung 11: Chromatographische Trennung von L-Asx und D-Asx
- Abbildung 12: Razemisierungsgrad von Asx in humanen Leberhistonen
- Abbildung 13: Flüssigkeitschromatogramm der Trennung primärer und sekundärer Aminosäuren nach 24 h Hydrolyse eines Histons H2B

- Abbildung 14: Ausschnittsvergrößerung des Citrullinsignales aus Abb. 13
- Abbildung 15: Citrullingehalt in Linkerhiston H1 aus humanem Lebergewebe
- Abbildung 16: Citrullingehalt in H2B aus humanem Lebergewebe
- Abbildung 17: Citrullingehalt in H2A, H3 & H4 aus humanem Lebergewebe
- Abbildung 18: Citrullinnachweis in H1 und H2B mittels Western-Blot
- Abbildung 19: De novo sequenzierte MS/MS-Spektren eines nicht deamidierten Peptides (H2A 21-29: AGLQFPVGR) und eines deamidierten Peptides (H2A 21-29: AGLEFPVGR) im Vergleich
- Abbildung 20: Overlay – Deamidierungsstelle
- Abbildung 21: MS/MS-Spektrum von H4:9-17.
- Abbildung 22: Posttranslationale Modifikationen des Histoncodes an Histon H3
- Abbildung 23: Posttranslationale Modifikationen des Histoncodes an Histon H4
- Abbildung 24: Posttranslationale Modifikationen des Histoncodes an Histon H2A
- Abbildung 25: Posttranslationale Modifikationen des Histoncodes an Histon H2B
- Abbildung 26: *De novo* sequenziertes Sepktrum eines deiminierten Peptides H3:70-83
- Abbildung 27: Chromatographische Auftrennung tryptischer Peptide
- Tabelle 1: Daten zur Regressionsanalyse der Datensätze aus Abb. 12
- Tabelle 2: Durchschnittliche Anzahl der Asx-Reste pro Histonmolekül
- Tabelle 3: Übersicht über die durchschnittliche Anzahl der Arg-Reste prp Histon der einzelnen Subtyp-Gruppen
- Tabelle 4: Peptidylcitrullinnachweis - ELISA

**Abkürzungsverzeichnis**

µl	Mikroliter
AAR	Aminosäurenrazemisierung
Ac	Acetylierung
ACN	Acetonitril
Aqa dest.	Destilliertes Wasser
Asx	Asparaginsäure und/oder Asparagin
BSA	bovine serum albumin
Cit	Citrullin
Da	Dalton
Dea	Deamidierung
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
EvG	Elastika van Gieson
FLD	Fluoreszenzdetektor
FMOc	9-Fluorenylmethyl-chloroformat
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	Gramm
Glx	Glutaminsäure und/oder Glutamin
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
M, mol	Mol, molar
M.W.	molecular weight (Molekulargewicht)
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
mA	Milliampere
Me	Methylierung
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
MTA	Medizinisch-Technische(r) Assistent(in)
nm	Nanometer
OPA/3-MPA	ortho-Phthaldialdehyd + 3-Mercaptopropionsäure (in Borat-Puffer)
PAD4	Peptidylarginin-Deiminase 4
PBST	Phosphate Buffered Saline + Tween
Pos	Position
PSA	Propionsäureanhydrid
RP-HPLC	High Performance Liquid Chromatography
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sek.	Sekunde(n)
sq.m/g	Surface area
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
PBS	Phosphate Buffered Saline

N-terminus	Amino-Terminus
C-terminus	Carboxyl-Terminus
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
IP	Isoelektrischer Punkt
Q	Quadrupol
TOF	Time-of-Flight
ESI	electrospray ionisation
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionisation
PIMT	Protein-L-Isoaspartyl-Methyltransferase

### Aminosäuren: 3-Buchstaben-Code & 1-Buchstaben-Code

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

- Abell, A. N., Vincent Jordan, N., Huang, W., Prat, A., Midland, A. A., Johnson, N. L., Granger, D. a., Mieczkowski, P. a., Perou,, C. M., Gomez, S. M., Li, L., Johnson, G. L. (2011):** MAP3K4/CBP-Regulated H2B Acetylation Controls Epithelial- esenchymal Transition in Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8, 525–537
- Agger, K., Cloos, P. A. C., Christensen, J., Pasini, D., Rose, S., Rappsilber, J., Issaeva, I., Canaani, E., Salcini, A. C., Helin, K. (2007):** UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature Letters*, doi:10.1038/nature06145
- Akram, M., Asif, H. M., Uzair, M., Akhtar, N., Madni, A., Shah, S. M., ul Hasan, Z., Ullah, A. (2011):** Amino acids: A review article. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5 (17), pp. 3997-4000
- Alkass, K., Buchholz, B. A., Ohtani, S., Yamamoto, T., Druid, H., Spalding, K. L. (2010):** Age Estimation in Forensic Sciences: APPLICATION OF COMBINED ASPARTIC ACID RACEMIZATION AND RADIOCARBON ANALYSIS. *Molecular & Cellular Proteomics* 9:1022–1030
- Anctil, M., Poulain, I., Pelletier, C. (2005):** Nitric oxide modulates peristaltic muscle activity associated with fluid circulation in the sea pansy *Renilla koellikeri*. *The Journal of Experimental Biology* 208, 2005-2017
- Anunziato, A. T., Hansen, J. C. (2000):** Role of histone acetylation in the assembly and modulation of chromatin structures. *Gene Expression* 9, 37-61
- Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M., Sato, M. (2004):** Structural basis for Ca<sup>2+</sup>-induced ctivation of human PAD4. *Nature structural & molecular biology* Vol. 11 No. 8 pp. 777
- Asaga, H., Ishigami, A. (2001):** Protein deimination in the rat brain after kainate administration: citrulline-containing proteins as a novel marker of neurodegeneration. *Neuroscience Letters* 299: 5-8
- Asward, D. W. (1995):** Deamidation and Isoaspartat Formation in Proteins. *Promega Notes Magazine*, Number 52, pp. 27-32
- Azuma, N., Furuuchi, S., Takahara, H., Sugawara, K., Kanno, C. (1998):** Electron Microscopic Study on the Influence of Deimination on Casein Micelle Formation. *J Dairy Sci* 81:64–68
- Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (2005):** Reversing histone methylation. *NATURE*, Vol 436, pp. 1103-1106
- Bassett, A., Cooper, S., Wu, C., Travers, A. (2009):** The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* 19:1–7
- Berger, S. L. (2007):** The complex language of chromatin regulation during transcription. *NATURE* Vol. 447. pp. 407 ff
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Huebert, D. J., McMahon, S., Karlsson, E. K., Kulbokas, E. J., Gingeras, T. R., Schreiber, S. L., Lander, E. S. (2005):** Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse. *Cell*, Vol. 120, 169–181

- Bicker, K. L. & Thompson, P. R. (2012):** The Protein Arginine Deiminases: Structure, Function, Inhibition, and Disease. *Biopolymers Volume 99, Number 2*, pp. 155-163
- Biel, M., Wascholowski, V., Giannis, A. (2005):** Epigenetik – ein Epizentrum der Genregulation: Histone und histonmodifizierende Enzyme. *Angew. Chem.* 2005, 117, 3248 – 3280
- Bischoff, R. & Kolbe, H. V. J. (1994):** Deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins and peptides: structural determinants and analytical methodology. *Journal of Chromatography B*: 5, 662, 261-278
- Bonenfant, D., Coulot, M., Towbin, H., Schindler, P. van Oostrum, J. (2006):** Characterization of Histone H2A and H2B Variants and Their Post-translational Modifications by Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* 5.3, pp. 541
- Byvoet, P. (1966):** Metabolic integrity of deoxyribonucleohistones. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 17, Issue 2, pp 311-318
- Capasso, S. (1999):** Estimation of the deamidation rate of asparagine side chains. *J. Peptide Res.* 55, 224-229.
- Carolan, V. A., Gardner, M. L. G., 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, pp. 10757–10764
- Cervantes-Laurean, D., Roberts, M. J., Jacobson, E. L., Jacobson, M. K. (2005):** Nuclear proteasome activation and degradation of carboxymethylated histones in human keratinocytes following glyoxal treatment. *Free Radical Biology & Medicine* 38, pp. 786– 795
- Chavanasa, S., Me´china, M.-C., Takaharab, H., Kawadac, A., Nachata, R., Serrea, G., Simona, M. (2004):** Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene* 330: 19–27
- Chaya, D., Hayamizu, T., Bustin, M., Zaret, K. S. (2001):** Transcription Factor FoxA (HNF3) on a Nucleosome at an Enhancer Complex in Liver Chromatin. *The Journal of Biological Chemistry*: Vol. 276, No. 48, pp. 44385–44389
- Chelius, D., Rehder, D. S., Bondarenko, P. V. (2005):** Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human immunoglobulin gamma antibodies. *Anal. Chem.*; 77 (18):6004-11.
- Cloos, P. A. C. & Christgau, S. (2002):** Non-enzymatic covalent modifications of proteins: mechanisms, physiological consequences and clinical applications. *Matrix Biology* 21, pp. 39-52
- Cloos, P. A. C. & Christgau, S. (2004):** Post-translational modifications of proteins: implications for aging, antigen recognition, and autoimmunity. *Biogerontology* 5: 139–158
- Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

- Coburn, C., Allman, E., Mahanti, P., Benedetto, A., Cabreiro, F., Pincus, Z., Matthijssens, F., Araiz, C., Mandel, A., Vlachos, M., Edwards, S.-E., Fischer, G., Davidson, A., Pryor, R. E., Stevens, A., Slack, F. J., Tavernarakis, N., Braeckman, B. P., Schroeder, F. C., Nehrke, K., Gems, D. (2013):** Anthranilate Fluorescence Marks a Calcium-Propagated Necrotic Wave That Promotes Organismal Death in *C. elegans*. *PLOS Biology*, Volume 11, Issue 7, e1001613
- Cosgrove, M. S. (2007):** Histone proteomics and the epigenetic regulation of nucleosome mobility. *Expert Rev. Proteomics* 4 (4)
- Cournoyer, J. J. & O'Connor, P. B. (2009):** Analysis of Deamidation in Proteins. *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 52, pp. 375-411
- 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*, Vol. 118, pp. 545–553
- Dawson, M. A. & Kouzarides, T. (2012):** Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell* 150, pp. 12
- Denman, R. B. (2005):** PAD: the smoking gun behind arginine methylation signaling? *BioEssays* 27:242–246,
- 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, B., Franke, K., Gavenis, K., Witt, O. (1997):** Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochem Cell Biol* 107:1–10
- Domon, B. & Aebersold, R. (2006):** Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, Vol 312 pp. 212-217
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P. A. (2004):** Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, Vol 429, pp. 457-463
- Fang, J., Feng, Q., Ketel, C. S., Wang, H., Cao, Ru, Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Simon, J. A., Zhang, Y. (2002):** Purification and Functional Characterization of SET8, a Nucleosomal Histone H4- Lysine 20-Specific methyltransferase. *Current Biology*, Vol. 12, 1086–1099
- Friedman, M. (2010):** Origin, Microbiology, Nutrition, and Pharmacology of D-Amino Acids. *Chemistry & Biodiversity*, Vol. 7, 1491-1530
- Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A., Schubert, I. (2006):** Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *TRENDS in Plant Science* Vol.11 No.4 pp. 199-208
- Fujii, N., Momose, Y., Ishii, N., Takita, M., Akaboshi, M., Kodama, M. (1999):** The mechanisms of simultaneous stereoinversion, racemization, and isomerization at specific aspartyl residues of aged lens proteins. *Mech Ageing Dev* 107 347-358
- Fujii, N., Tajima, N., Fujimoto, N., Takata, T., Shimo-Oka, T. (2002):** The presence of D- $\beta$ -aspartic acid-containing peptides in elastic fibres of sun-damaged skin: a potent marker for ultraviolet-induced skin aging. *Biochem Biophys Res Comm* 294, 1047-1051

- Garcia, B. A., Hake, S. B., Diaz, R. L., Kauer, M., Morris, S. a., Recht, J., Shabanowitz, J., Mishra, N., Strahl, B. D., Allis, C. D., Hunt, D. F. (2007):** Organismal Differences in Post-translational Modifications in Histones H3 and H4. *The Journal of Biological Chemistry*: Vol. 282, No. 10, pp. 7641–7655
- Garcia, B. A., Mollah, S., Ueberheide, B. M., Busby, S. A., Muratore, T. L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F.(2007):** Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nature protocols* Vol.2 No.4 pp.933-938
- Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. (2006):** Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* 2007, 11: 66–73
- Golstein, P. & Kroemer, G. (2006):** Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.32, No.1, pp. 37-43
- Grant, P. A., Eberharter, A., John, S., Cook, R. G., Turner, B. M., Workman, J. L (1999):** Expanded Lysine Acetylation specificity of Gcn5 in Native Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*: Vol. 274, No. 9, pp. 5895–5900
- György, B., Toth, E., Tarcsa, E., Falus, A., Buzas, 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, pp. 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, pp. 979–983
- Hayashi, T., Ohe, Y., Hayashi, H., Iwai, K. (1982):** Human Spleen Histone H4. Isolation and Amino Acid Sequence. *J. Biochem.* 92, pp. 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, pp. 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
- Hnilica, L., Grimes, S. R., Chiu, J.-F. (1978):** Electrophoretic Fractionation of Histones Utilizing Starch Gels and Sodium Dodecyl Sulfate-Urea Gels. *Methods in Cell Biology*, Vol. 17, Part C
- Holm, A., Rise, F., Sessler, N., Sollid, L. M., Undheim, K., Fleckenstein, B. (2006):** Specific modification of peptide-bound citrulline residues. *Analytical Biochemistry* 352, pp. 68–76
- Ingrosso, D., D'Angelo, S., di Carlo, E., Perna, A. F., Zappia, V., Galletti, P. (2000):** Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. *Eur J Biochem* 267, 4397-4405
- Jenuwein, T. & Allis, C. D. (2001):** Translating the Histone Code. *Science* 293, 1074. DOI: 10.1126/science.1063127

- Kaufman D. S. und Manley W. F. (1998):** A new procedure for determining DL amino acid ratios in fossils using reverse phase liquid chromatography. *Quaternary Science Reviews* Vol. 17, No. 11, pp. 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, E., Lowenson, J. D., Maclaran, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, pp. 6132–6137
- 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 Proteomics Survey. *Molecular Cell* 23, pp. 607–618
- Kühlberg, A. (2008):** Phosphohydroxyprolin – Identifizierung und Charakterisierung in Proteinen. Inaugural-Dissertation; Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Lachner, M., O’Sullivan, R. J., Jenuwein, T. (2003):** An epigenetic road map for histone lysine methylation. *Journal of Cell Science* 116, 2117-2124
- 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* Vol. 30, No. 9/10, pp. 518
- Lindner, H. H. (2008):** Analysis of histones, histone variants, and their post-translationally modified forms. *Electrophoresis* Vol. 29, Issue 12, pp. 2516-2532, No.12
- Lindner, H., Sarg, B., Grunicke, H., Helliger, W. (1999):** Age-dependent deamidation of H1<sup>o</sup> histones in chromatin of mammalian tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 125:182-186
- Lindner, H., Sarg, B., Hoertnagl, B., Helliger, W. (1998):** The Microheterogeneity of the Mammalian H10 Histone Evidence for an age-dependent deamidation. *JBC*: Vol. 273, No. 21, pp. 13324–13330
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J. (2007):** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å<sup>o</sup> resolution. *Nature*, Vol 389, pp. 251-260
- McCall, K. (2010):** Genetic control of necrosis – another type of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*; 22(6): 882–888. doi:10.1016/j.ceb.2010.09.002.
- McCudden, C. R. & Kraus, V. B. (2006):** Biochemistry of amino acid racemization and clinical application to musculoskeletal disease. *Clinical Biochemistry* 39, pp.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
- Meissner, C. & Ritz-Timme, S. (2010):** Molecular pathology and age estimation. *Forensic Science International* 203: 34–43
- Mellor, J. (2006):** It Takes a PHD to Read the Histone Code. *Cell* 126, pp. 22-24

- Michele, I. (2008):** Intravitale Deiminierung von Argininresten in Histonen humaner Granulozyten. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf
- Mohanam, S., Cherrington, B. D., horibata, S., McElwee, J. L., Thompson, P. R., Coonrod, S. A. (2012):** Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. *Biochemistry Research International* Vol. 2012, pp. 1-11
- Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N., Jyothy, A. (2009):** Histone modifications dictate specific biological readouts. *J. Genet. Genomics* 36, 75-88
- Myers, F. A., Chong, W., Evans, D. R., Thorne, a. W., Crane-Robinson, C. (2003):** Acetylation of Histone H2B Mirrors that of H4 and H3 at the Chicken beta-Globin Locus but Not at Housekeeping Genes. *The Journal of Biological Chemistry*: Vol. 278, No. 38, pp. 36315–36322
- Nakashima, K., Hagiwara, T, Yamada, M. (2002):** Nuclear Localization of Peptidylarginine Deiminase V and Histone Deimination in Granulocytes. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 277, No. 51, Issue of December 20, pp. 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
- Nesse, W., Westra, J., van der Wal J. E., Abbas, F., Nicholas, A. P., Vissink, A., Brouwer, E. (2012):** The periodontium of periodontitis patients contains citrullinated proteins which may play a role in ACPA (anti-citrullinated protein antibody) formation. *J Clin Periodontol*; 39: 599–607, doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01885.x
- Neufeind, A. (2011):** Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe. Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät Heinrich-Heine-Universität
- Nowak, S. J., Corces, V. G. (2000):** Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes & Development* 14:3003–3013
- Ogè, L., Bourdais, G., Bove, J., Collet, B., Godin, B., Granier, F., Boutin, J.-P., Job, D., Jullien, M., Grappina, P. (2008):** Protein Repair L-Isoaspartyl Methyltransferase1 Is Involved in Both Seed Longevity and Germination Vigor in Arabidopsis. *The Plant Cell*, Vol. 20: 3022–3037
- Ogino, H., Nagy, B. (1985):** application of aspartic acid racemization to forensic odontology: post mortem designation of age of death, *Forensic Sci. Int.* 29 pp. 259-267
- Ohe, Y. & Iwai, K.(1981):** Human Spleen Histone H3. Isolation and Amino Acid Sequence. *J. Biochem.* 90, 1205-1211
- 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*, Vol. 4, pp. 252-265
- Panyim, S. & Chalkley, R. (1969):** The Heterogeneity of Histones. I. A Quantitative Analysis of Calf Histones in Very Long Polyacrylamide Gels. *Biochemistry*, Vol. 10, No. 10. pp.3972-3979

- Patel, J., Kothari, R., Tunga, R., Ritter, N. M., Tunga, B. S. (2011):** Stability Considerations for Biopharmaceuticals, Part 1 Overview of Protein and Peptide Degradation Pathways. *BioProcess International* pp. 20-31
- Piha, R. S., Cuinod, M., Waelsch, H. (1966):** Metabolism of Histones of Brain and Liver. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 241, No. 10 ,pp. 2397-2404
- Pratesi, F., Dioni, I., Tommasi, C., Alcaro, M. C., Paolini, I., Barbetti, F., Boscaro, F., Panza, F., Puxeddu, I., Rovero, P., Migliorini, P. (2013):** Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis* 0:1–9.
- Probst, A. V., Dunleavy, E., Almouzni, G. (2009):** Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nature Reviews- Molecular cell Biology* Volume 10, pp. 192-206
- Raijmakers, R., Zendman, A. J. w., Egberts, W. F., Vossenaar, E. R., Raats, J., Soede-Huijbregts, C., Rutjes, F. P. J. T., van Veelen, P. A., Drijfhout, J. W., Pruijn, G. J. M. (2007):** Methylation of Arginine Residues Interferes with Citrullination by Peptidylarginine Deiminases in vitro. *J. Mol. Biol.* 367, 1118–1129
- Reissner, K. J. & Aswad, D. W. (2003):** Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1281–1295
- Ritz, S., Schlitz, H. W., Peper, C. (1993):** Postmortem estimation of age at death based on aspartic acid racemization in dentin: its applicability for root dentin. *Int J Leg Med* 105 : 289-293
- Ritz, S., Schlitz, H.-W., Schwarzer, B. (1990):** The extent of aspartic acid racemization in dentin: a possible method for a more accurate determination of age at death? *Z Rechtsmed* 103 : 457-462
- 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
- Ritz-Timme, S., Laumeier, I., Collins, M. J. (2003):** Cutaneous Biology: Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *British Journal of Dermatology*; 149: 951–959.
- Robinson N. E. & Robinson, A. B. (2004):** *Molecular Clocks. Deamidation of Asparaginyl and Glutaminyl Residues in Peptides and Proteins.* Althouse Press, Cave Junction, OR.
- Roepstorff P., and J. Fohlman. (1984):** Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom* 11:601.
- Rohrbach, A. S., Slade, D. J., Thompson, P. R., Mowen, K. A. (2012):** Activation of PAD4 in NET formation. *Frontiers in Immunology..* Vol. 3, Article 360, pp. 1-10
- Schägger, Hermann and von Jagow, Gebhard (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
- Schiza, V., Molina-Serrano, D., Kyriakou, D., Hadjiantoniou, A., Kirmizis, A.(2013):** N-alpha-terminal Acetylation of Histone H4 Regulates Arginine Methylation and Ribosomal DNA Silencing. *PLOS Genetics*. Volume 9, Issue 9

- Sharma, R., Nakamura, A., Takahashi, R., Nakamoto, H., Goot, S. (2006):** Carbonly modification in rat liver histones: Decrease with age and increase ba dietary restriction. *Free Radical Biology and Medicine* 40:1179-1184
- Shiio, Y. & Eisenman, R. N. (2003):** Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *PNAS*, Vol. 100, no. 23, pp. 13225–13230
- Sprung, R., Chen, Y., Zhang, K., Cheng, D., Zhang, T., Peng, J., Zhao, Y. (2008):** Identification and Validation of Eukaryotic Aspartate and Glutamate Methylation in Proteins. *Journal of Proteome Research* 7, pp. 1001–1006
- Squazzo, S. L., O'Geen, H., Komashko, V. M. et al. (2006):** Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome Res.* 16: 890-900
- Starheim, K. K., Gevaert, K., Arnesen, T. (2012):** Protein N-terminal acetyltransferases: when the start matters. *Trends in Biochemical Sciences* , Vol. 37, No. 4, pp. 152-161
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000):** The language of covalent histone modifications. *Nature*, Vol. 403, pp. 41-45
- Sun, Z.-W., & Allis, C. D. (2002):** Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, Vol. 418, pp. 104-108
- Takahara, H., Okamoto, H., Sugawara, K. (1986):** Calcium-dependent Properties of Peptidylarginine Deiminase from Rabbit Skeletal Muscle. *Agric. Biol. Chem.* 50:11, pp. 2899-2904
- Talasz, H., Wasserer, S., Puschendorf, B. (2002):** Nonenzymatic Glycation of Histones In Vivo and In Vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* Vol. 85, Issue 1, pp. 24-34
- Tan, M., Luo, H. Lee, S., jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, W., Kochbin, S., Ren, B., Zhao, Y.(2011):** Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a new Type of Histone Modifikation. *Cell*, Vol. 146, pp.1016-1028
- Taverna, S. D., Ueberheide, B. M., Liu, Y., Tacket, A. J., Diaz, R. L., Shabanowitz, J. Chait, B. T., Hunt, D. F., Allis, C. D. (2007):** Long-distance combinatorial linkage between methylation and acetylation on histone H3 N termini. *PNAS*: Vol. 104, No. 7, pp. 2086-2091
- Terakawa, H., Takahara, H., Sugawara, K. (1991):** Three Types of Mouse Peptidylarginine Deiminase: Characterization and Tissue Distribution. *J. Biochem.* 110: 661-666
- Thompson, P. R., & Fast, W. (2006):** Histone Citrullination by Protein Arginine Deiminase: Is Arginine Methylation a Green Light or a Roadblock? *ACS Chemical Biology*: Vol.1 No.7 pp. 433-441
- Turner, B. M. (2005):** Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modifies Histones. *Nature Struktural and Molecular Biology* Vol. 12, No. 2, pp 110-112
- U. K. Laemmli (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*. Bd. 227, 1970, S. 680–685.
- Unnikrishnan, A., Gafken, P. R., Tsukiyama, T. (2010):** Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nat Struct Mol Biol.*: 17(4): 430–437. doi:10.1038/nsmb.1780.

- van Venrooij, W. J. & Pruijn, G. J. M. (2000):** Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000, 2:249–251
- 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*: Vol. 281, No. 43, pp. 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., Borrman, 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, Z., Schones, D. E., Zhao, K. (2009):** Characterization of human epigenomes. *Current Opinion in Genetics & Development* 2009, 19:1–8
- Yang, L., Tu, S., Ren, C., Bulloch, E. M. M., Liao, C., Tsai, M., Freitag, M. A. (2009):** Unambiguous determination of isobaric histone modifications by reversed-phase retention time and high-mass accuracy. *Analytical Biochemistry* - doi:10.1016/j.ab.2009.08.027
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., Beppu, T. (1990):** Potent and Specific Inhibition of Mammalian Histone Deacetylase Both in Vivo and in Vitro by Trichostatin A. *JBC*, Vol. 265, No. 28, Issue of October 5, Pl, 17174-17179
- 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, pp. 26094-26098
- Young, Arlene L., Carter, Wayne G., Doyle, Hester A., Mamula, Mark J. and Aswad, Dana W. (2001):** Structural Integrity of Histone H2B in Vivo Requires the Activity of Protein L-Isoaspartate O-Methyltransferase, a Putative Protein Repair Enzyme. *JBC* Vol. 276, No. 40, Issue 5, 2001, pp. 37161ff
- Zhang, K., Williams, K. E., Huang, L., Yau, P., Siino, J. S., Bradbury, E. M., Jones, P. R., Minch, M. J., Burlingame, A. L.(2002):** Histone Acetylation and Deacetylation IDENTIFICATION OF ACETYLATION AND METHYLATION SITES OF HeLa HISTONE H4 BY MASS SPECTROMETRY. *Molecular & Cellular Proteomics* 1.7
- Zhang, K., Yau, P. M., Chandrasekhar, ., New, R., Kondrat, R., Imai, B. S., Bradbury, M. E.(2004):** Differentiation between peptides containing acetylated or tri-methylated lysines by mass spectrometry: An application for determining lysine 9 acetylation and methylation of histone H3. *Proteomics* 4, 1-10
- Zhang, K., Yau, P. M., Chandrasekhar, B., New, R., Kondrat, R., Imai, B. S., Bradbury, M. E. (2004):** Differentiation between peptides containing acetylated or tri-methylated lysines by mass spectrometry: An application for determining Lysine 9 acetylation and methylation of histone H3. *Proteomics* 4, pp. 1–10
- Zhang, Y. (2003):** Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes & Dev.* 17, pp. 2733-2740

- Zhang, Y. (2004):** No exception to reversibility. NATURE, VOL 431, pp. 1037-1039
- 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: Vol. 281, No. 44, pp. 33802–33813
- Zong, W.-X. & Thompson, C. B. (2006):** Necrotic death as a cell fate. Genes Dev. 20: 1-15

**Histonsequenzen ((Accession-Number) Quelle: <http://www.uniprot.org/>)  
Schnittstellen des Enzyms Trypsin**

**H2A.1A (Q96QV6)**

SGR**R**GK**Q**GG**K**ARAK**K**SRSS**R**AGLQFPVGR**I**HR**L**LR**K**GNYA**E**RIGAGAPVYLAAVLE  
 LTAEIILELAGNAS**R**DN**K**K**T**R**I**IP**R**H**L**Q**L**A**I**R**N**DEEL**N****K**LLGGV**T**IAQGGVLPNIQAVLL**P****K**  
**K**TESH**H**H**K**AQ**S****K**

**H2A.1B / H2A.M (P04908)**

SGR**R**GK**Q**GG**K**ARAK**A**K**T**RSS**R**AGLQFPVGR**V**HR**L**LR**K**AHY**S**E**R**VGAGAPVYLAAVLE  
 YLTAEIILELAGNA**A**RDN**K**K**T**R**I**IP**R**H**L**Q**L**A**I**R**N**DEEL**N****K**LLGR**V**TIAQGGVLPNIQAVLL**P**  
**K**K**T**ESH**H****K**A**K**G**K**

**H2A.1C / H2A.L (Q93077)**

SGR**R**GK**Q**GG**K**ARAK**A**K**S**RSS**R**AGLQFPVGR**V**HR**L**LR**K**GNYA**E**RVGAGAPVYLAAVLE  
 YLTAEIILELAGNA**A**RDN**K**K**T**R**I**IP**R**H**L**Q**L**A**I**R**N**DEEL**N****K**LLGR**V**TIAQGGVLPNIQAVLL**P**  
**K**K**T**ESH**H****K**A**K**G**K**

**H2A.1D / H2A.G (P20671)**

SGR**R**GK**Q**GG**K**ARAK**A**K**T**RSS**R**AGLQFPVGR**V**HR**L**LR**K**GNY**S**E**R**VGAGAPVYLAAVLE  
 YLTAEIILELAGNA**A**RDN**K**K**T**R**I**IP**R**H**L**Q**L**A**I**R**N**DEEL**N****K**LLG**K**V**T**IAQGGVLPNIQAVLL**P**  
**K**K**T**ESH**H****K**A**K**G**K**

**H2A.1E / H2A. A / H2A.2 (P28001)**

SGR**R**GK**Q**GG**K**ARAK**A**K**T**RSS**R**AGLQFPVGR**V**HR**L**LR**K**GNY**S**E**R**VGAGAPVYLAAVLE  
 YLTAEIILELAGNA**A**RDN**K**K**T**R**I**IP**R**H**L**Q**L**A**I**R**N**DEEL**N****K**LLGR**V**TIAQGGVLPNIQAVLL**P**  
**K**K**T**ESH**H****K**A**K**G**K**

**H2A.1H (Q96KK5)**

SGR**R**GK**Q**GG**K**ARAK**A**K**T**RSS**R**AGLQFPVGR**V**HR**L**LR**K**GNYA**E**RVGAGAPVYLAAVLE  
 YLTAEIILELAGNA**A**RDN**K**K**T**R**I**IP**R**H**L**Q**L**A**I**R**N**DEEL**N****K**LLG**K**V**T**IAQGGVLPNIQAVLL**P**  
**K**K**T**ESH**H****K**A**K**

**H2A.1J / H2A.E (Q99878)**

SGR**R**GK**Q**GG**K**ARAK**A**K**T**RSS**R**AGLQFPVGR**V**HR**L**LR**K**GNYA**E**RVGAGAPVYLAAVLE  
 YLTAEIILELAGNA**A**RDN**K**K**T**R**I**IP**R**H**L**Q**L**A**I**R**N**DEEL**N****K**LLG**K**V**T**IAQGGVLPNIQAVLL**P**  
**K**K**T**ESH**H****K**T**K**

**H2A.1 / H2A.C (P0C0S8)**

SGR**R**GK**Q**GG**K**ARAK**A**K**T**RSS**R**AGLQFPVGR**V**HR**L**LR**K**GNYA**E**RVGAGAPVYLAAVLE  
 YLTAEIILELAGNA**A**RDN**K**K**T**R**I**IP**R**H**L**Q**L**A**I**R**N**DEEL**N****K**LLG**K**V**T**IAQGGVLPNIQAVLL**P**  
**K**K**T**ESH**H****K**A**K**G**K**

**H2A.2A / H2A.O (Q6FI13)**

SGR**R**GK**Q**GG**K**ARAK**A**K**S**RSS**R**AGLQFPVGR**V**HR**L**LR**K**GNYA**E**RVGAGAPVYMAAVL  
 EYLTAEIILELAGNA**A**RDN**K**K**T**R**I**IP**R**H**L**Q**L**A**I**R**N**DEEL**N****K**LLG**K**V**T**IAQGGVLPNIQAVLL  
**P****K**K**T**ESH**H****K**A**K**G**K**

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

**H2A.2B (Q8IU6)**

SGR**GK**QGG**KARAKAKS**RSS**R**AGLQFPVGR**RVHRLLRKG**NYA**ER**VGAGAPVYLAAVLE  
 YLTAEILELAGNAARDN**KKTR**IIP**R**H**L**QLAVR**NDEELNK**LLGGVTIAQGGVLPNIQAVLL  
 P**KK**TESHK**PGKNK**

**H2A.2C / H2A.Q (Q16777)**

SGR**GK**QGG**KARAKAKS**RSS**R**AGLQFPVGR**RVHRLLRKG**NYA**ER**VGAGAPVYMAAVL  
 EYLTAEILELAGNAARDN**KKTR**IIP**R**H**L**QLA**IR**NDEELN**K**LLG**K**VTIAQGGVLPNIQAVLL  
 P**KK**TESH**KAKSK**

**H2A.3 (Q7L7L0)**

SGR**GK**QGG**KARAKAKS**RSS**R**AGLQFPVGR**RVHRLLRKG**NY**SER**VGAGAPVYLAAVLE  
 YLTAEILELAGNAARDN**KKTR**IIP**R**H**L**QLA**IR**NDEELN**K**LLG**R**VTIAQGGVLPNIQAVLLP  
**KK**TESHH**KAKGK**

**H2A.F/Z / H2A.V (Q71UI9)**

AGG**KAGK**DSG**KAKAK**AVS**RSQR**AGLQFPVGR**IHRHLKTR**TTSHGR**VG**ATAAVYSAAI  
 LEYLTAEVLELAGNAS**KDLKVKR**ITP**R**H**L**QLA**IR**GDEELDSL**IK**ATIAGGGVIPHI**K**SLI  
 G**KK**GQ**QK**TA

**H2A.X (P16104)**

SGR**GKT**GG**KARAKAKS**RSS**R**AGLQFPVGR**RVHRLLRKG**H**Y**A**ER**VGAGAPVYLAAVLE  
 YLTAEILELAGNAARDN**KKTR**IIP**R**H**L**QLA**IR**NDEELN**K**LLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLP  
**KK**TSATVGP**KAPSGGKK**ATQASQ**EY**

**H2A.Z (P0C0S5)**

AGG**KAGK**DSG**KAKT**KAVS**RSQR**AGLQFPVGR**IHRHLKSR**TTSHGR**VG**ATAAVYSAAI  
 LEYLTAEVLELAGNAS**KDLKVKR**ITP**R**H**L**QLA**IR**GDEELDSL**IK**ATIAGGGVIPHI**K**SLI  
 G**KK**GQ**QK**TV

**H2B.FS / H2B.S (P57053)**

MPEPA**K**SAPAP**KK**GS**KK**AVT**K**AQ**KK**DG**KRKR**SR**K**ESYSVYVY**KV**L**K**QVHPDTGISS  
 KAMGIMNSFVNDIFER**I**AGEAS**R**LPHYN**KR**STIT**S**REIQTAV**R**LLLP**GELAK**HAVSEGT  
 KAVT**K**Y**T**SA**K**

**H2B.2F (Q5QNW6)**

MPDPA**K**SAPAP**KK**GS**KK**AVT**K**VQ**KK**DG**KRKR**SR**K**ESYSVYVY**KV**L**K**QVHPDTGISS  
 KAMGIMNSFVNDIFER**I**AGEAS**R**LAHYN**KR**STIT**S**REIQTAV**R**LLLP**GELAK**HAVSEGT  
 KAVT**K**Y**T**SS**K**

**H2B.1K / H2B.K (O60814)**

MPEPA**K**SAPAP**KK**GS**KK**AVT**K**AQ**KK**DG**KRKR**SR**K**ESYSVYVY**KV**L**K**QVHPDTGISS  
 KAMGIMNSFVNDIFER**I**AGEAS**R**LAHYN**KR**STIT**S**REIQTAV**R**LLLP**GELAK**HAVSEGT  
 KAVT**K**Y**T**SA**K**

**H2B.3B / H2B.X (Q8N257)**

MPDPS**K**SAPAP**KK**GS**KK**AVT**K**AQ**KK**DG**KRKR**GR**K**ESYSIYVY**KV**L**K**QVHPDTGISS  
 KAMGIMNSFVNDIFER**I**ASEAS**R**LAHYN**KR**STIT**S**RE**V**QTAV**R**LLLP**GELAK**HAVSEGT  
 KAVT**K**Y**T**SS**K**

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

**H2B.1D / H2B.B (P58876)**

MPEPTK<sup>K</sup>SAPAP<sup>KK</sup>GS<sup>KK</sup>AVTK<sup>K</sup>AQ<sup>KK</sup>DG<sup>KKRKR</sup>SR<sup>K</sup>ESYSVYVY<sup>K</sup>VL<sup>K</sup>QVHPDTGISS  
KAMGIMNSFVNDIFER<sup>I</sup>IAGEAS<sup>R</sup>LAHYN<sup>KR</sup>STIT<sup>S</sup>REIQTAV<sup>R</sup>LLLLPGELAK<sup>H</sup>AVSEGT  
KAVTK<sup>K</sup>YTSS<sup>K</sup>

**H2B.1N / H2B.D (Q99877)**

MPEPSK<sup>K</sup>SAPAP<sup>KK</sup>GS<sup>KK</sup>AVTK<sup>K</sup>AQ<sup>KK</sup>DG<sup>KKRKR</sup>SR<sup>K</sup>ESYSVYVY<sup>K</sup>VL<sup>K</sup>QVHPDTGISS  
KAMGIMNSFVNDIFER<sup>I</sup>IAGEAS<sup>R</sup>LAHYN<sup>KR</sup>STIT<sup>S</sup>REIQTAV<sup>R</sup>LLLLPGELAK<sup>H</sup>AVSEGT  
KAVTK<sup>K</sup>YTSS<sup>K</sup>

**H2B.1B / H2B.F (P33778)**

MPEPSK<sup>K</sup>SAPAP<sup>KK</sup>GS<sup>KK</sup>AIT<sup>K</sup>AQ<sup>KK</sup>DG<sup>KKRKR</sup>SR<sup>K</sup>ESYSIYVY<sup>K</sup>VL<sup>K</sup>QVHPDTGISS<sup>K</sup>  
AMGIMNSFVNDIFER<sup>I</sup>IAGEAS<sup>R</sup>LAHYN<sup>KR</sup>STIT<sup>S</sup>REIQTAV<sup>R</sup>LLLLPGELAK<sup>H</sup>AVSEG<sup>TK</sup>  
AVTK<sup>K</sup>YTSS<sup>K</sup>

**H2B.1J / H2B.R / H2B.1 (P06899)**

MPEPAK<sup>K</sup>SAPAP<sup>KK</sup>GS<sup>KK</sup>AVTK<sup>K</sup>AQ<sup>KK</sup>DG<sup>KKRKR</sup>SR<sup>K</sup>ESYSIYVY<sup>K</sup>VL<sup>K</sup>QVHPDTGISS  
KAMGIMNSFVNDIFER<sup>I</sup>IAGEAS<sup>R</sup>LAHYN<sup>KR</sup>STIT<sup>S</sup>REIQTAV<sup>R</sup>LLLLPGELAK<sup>H</sup>AVSEGT  
KAVTK<sup>K</sup>YTS<sup>AK</sup>

**H2B.1L / H2B.C (Q99880)**

MPELAK<sup>K</sup>SAPAP<sup>KK</sup>GS<sup>KK</sup>AVTK<sup>K</sup>AQ<sup>KK</sup>DG<sup>KKRKR</sup>SR<sup>K</sup>ESYSVYVY<sup>K</sup>VL<sup>K</sup>QVHPDTGISS  
KAMGIMNSFVNDIFER<sup>I</sup>IASEAS<sup>R</sup>LAHYN<sup>KR</sup>STIT<sup>S</sup>REIQTAV<sup>R</sup>LLLLPGELAK<sup>H</sup>AVSEG<sup>TK</sup>  
AVTK<sup>K</sup>YTSS<sup>K</sup>

**H2B.1O / H2B.N / H2B.2 (P23527)**

MPDPAK<sup>K</sup>SAPAP<sup>KK</sup>GS<sup>KK</sup>AVTK<sup>K</sup>AQ<sup>KK</sup>DG<sup>KKRKR</sup>SR<sup>K</sup>ESYSIYVY<sup>K</sup>VL<sup>K</sup>QVHPDTGISS  
KAMGIMNSFVNDIFER<sup>I</sup>IAGEAS<sup>R</sup>LAHYN<sup>KR</sup>STIT<sup>S</sup>REIQTAV<sup>R</sup>LLLLPGELAK<sup>H</sup>AVSEGT  
KAVTK<sup>K</sup>YTSS<sup>K</sup>

**H2B.1M / H2B.E (Q99879)**

MPEPVK<sup>K</sup>SAPVP<sup>KK</sup>GS<sup>KK</sup>AINK<sup>K</sup>AQ<sup>KK</sup>DG<sup>KKRKR</sup>SR<sup>K</sup>ESYSVYVY<sup>K</sup>VL<sup>K</sup>QVHPDTGISS  
KAMGIMNSFVNDIFER<sup>I</sup>IAGEAS<sup>R</sup>LAHYN<sup>KR</sup>STIT<sup>S</sup>REIQTAV<sup>R</sup>LLLLPGELAK<sup>H</sup>AVSEGT  
KAVTK<sup>K</sup>YTSS<sup>K</sup>

**H2B.1H / H2B.J (Q93079)**

MPDPAK<sup>K</sup>SAPAP<sup>KK</sup>GS<sup>KK</sup>AVTK<sup>K</sup>AQ<sup>KK</sup>DG<sup>KKRKR</sup>SR<sup>K</sup>ESYSVYVY<sup>K</sup>VL<sup>K</sup>QVHPDTGISS  
KAMGIMNSFVNDIFER<sup>I</sup>IAGEAS<sup>R</sup>LAHYN<sup>KR</sup>STIT<sup>S</sup>REIQTAV<sup>R</sup>LLLLPGELAK<sup>H</sup>AVSEGT  
KAVTK<sup>K</sup>YTSS<sup>K</sup>

**H2B.2E / H2B Q (Q16778)**

MPEPAK<sup>K</sup>SAPAP<sup>KK</sup>GS<sup>KK</sup>AVTK<sup>K</sup>AQ<sup>KK</sup>DG<sup>KKRKR</sup>SR<sup>K</sup>ESYSIYVY<sup>K</sup>VL<sup>K</sup>QVHPDTGISS  
KAMGIMNSFVNDIFER<sup>I</sup>IAGEAS<sup>R</sup>LAHYN<sup>KR</sup>STIT<sup>S</sup>REIQTAV<sup>R</sup>LLLLPGELAK<sup>H</sup>AVSEGT  
KAVTK<sup>K</sup>YTSS<sup>K</sup>

**H2B.1C / H2B.A / (H2B.1A, testis) (P62807)**

MPEPAK<sup>K</sup>SAPAP<sup>KK</sup>GS<sup>KK</sup>AVT<sup>K</sup>AQ<sup>KK</sup>DG<sup>KKRKR</sup>SR<sup>KE</sup>ESYSVYVY<sup>K</sup>VL<sup>K</sup>QVHPDTGISS  
 KAMGIMNSFVNDIFER<sup>I</sup>IAGEASRLAHYN<sup>KR</sup>STITSR<sup>E</sup>EIQTAV<sup>R</sup>LLLLPGELAK<sup>H</sup>AVSEGT  
 KAVT<sup>K</sup>YTS<sup>K</sup>

**H3.CENP A (P49450)**

MGPRRR<sup>SR</sup>KPEAP<sup>RRR</sup>SPSPTPTPGPS<sup>RR</sup>GPSLGASSHQHS<sup>RRR</sup>QGWL<sup>KE</sup>IRKLQ  
 KSTHLLIR<sup>K</sup>LPFS<sup>R</sup>LARE<sup>I</sup>CV<sup>K</sup>FT<sup>R</sup>RGVDFNWQAQALLALQEAAEAFVHLFEDAYLLTL  
 HAG<sup>R</sup>VTLFP<sup>K</sup>DVQLARR<sup>I</sup>R<sup>R</sup>GLEEGLG

**H3.1 (P68431)**

ART<sup>K</sup>QTARK<sup>ST</sup>GG<sup>K</sup>AP<sup>RK</sup>QLAT<sup>K</sup>AARK<sup>S</sup>APATGGV<sup>K</sup>KPHRYRPGTVAL<sup>RE</sup>IRRYQ<sup>KS</sup>  
 TELLIR<sup>K</sup>LPFQ<sup>R</sup>LVREIAQDF<sup>K</sup>TDLR<sup>F</sup>QSSAVMALQEACEAYLVGLFEDTNLCAIHAK<sup>R</sup>  
 VTIMP<sup>K</sup>DIQLARR<sup>I</sup>RGERA

**H3.2 (Q71D13)**

ART<sup>K</sup>QTARK<sup>ST</sup>GG<sup>K</sup>AP<sup>RK</sup>QLAT<sup>K</sup>AARK<sup>S</sup>APATGGV<sup>K</sup>KPHR<sup>R</sup>YRPGTVAL<sup>RE</sup>IRRYQ<sup>KS</sup>  
 TELLIR<sup>K</sup>LPFQ<sup>R</sup>LVREIAQDF<sup>K</sup>TDLR<sup>F</sup>QSSAVMALQEASEAYLVGLFEDTNLCAIHAK<sup>R</sup>  
 VTIMP<sup>K</sup>DIQLARR<sup>I</sup>RGERA

**H3.3 (P84243)**

ART<sup>K</sup>QTARK<sup>ST</sup>GG<sup>K</sup>AP<sup>RK</sup>QLAT<sup>K</sup>AARK<sup>S</sup>APSTGGV<sup>K</sup>KPHRYRPGTVAL<sup>RE</sup>IRRYQ<sup>KS</sup>  
 TELLIR<sup>K</sup>LPFQ<sup>R</sup>LVREIAQDF<sup>K</sup>TDLR<sup>F</sup>QSAALGALQEASEAYLVGLFEDTNLCAIHAK<sup>R</sup>  
 TIMP<sup>K</sup>DIQLARR<sup>I</sup>RGERA

**H4 (P62805)**

SGR<sup>G</sup>GGG<sup>K</sup>GLG<sup>K</sup>GGAK<sup>R</sup>HR<sup>K</sup>VLR<sup>D</sup>NIQGITKPAI<sup>RR</sup>LARR<sup>GGV</sup>KR<sup>I</sup>SGLIYEETR<sup>R</sup>GVL  
 KVFLENVIR<sup>D</sup>AVTYTEHAK<sup>RK</sup>TVTAMDVVYAL<sup>KR</sup>QGR<sup>T</sup>LYGFGG

**H1.0 (P07305)**

MTENSTSAPAAK<sup>PK</sup>RAK<sup>AS</sup>KK<sup>ST</sup>DHPK<sup>Y</sup>SDMIVAAIQAEK<sup>NR</sup>AGSS<sup>R</sup>QSIQKYIKSHYK<sup>V</sup>GE  
 NADSIKLSIK<sup>R</sup>LVTTGVL<sup>K</sup>QTK<sup>G</sup>VGASGSFRLAK<sup>S</sup>DEPK<sup>KS</sup>VAF<sup>KK</sup>TK<sup>KE</sup>IK<sup>K</sup>VATPK<sup>KS</sup>  
 KP<sup>KA</sup>ASK<sup>A</sup>PT<sup>KK</sup>KATPV<sup>KK</sup>AK<sup>KK</sup>LAATP<sup>KK</sup>AK<sup>K</sup>PKTV<sup>K</sup>AKPV<sup>K</sup>ASKP<sup>KK</sup>AKPV<sup>K</sup>PK<sup>AK</sup>SS  
 AKRAGKKK

**H1.1 (Q02539)**

MSETVPPAPAASAAPEKPLAG<sup>KK</sup>AK<sup>K</sup>PA<sup>K</sup>AAAAS<sup>KK</sup>KPAGPSVSELIVQAASS<sup>SK</sup>ERGGVSL  
 AAL<sup>KK</sup>ALAAAGYDVEK<sup>NNS</sup>RIK<sup>L</sup>GIK<sup>S</sup>LVSKGTLVQTK<sup>G</sup>TGASGSF<sup>KL</sup>NKKASSVETKPGAS  
 KVAT<sup>KT</sup>KATGASK<sup>KL</sup>KKATGASK<sup>KS</sup>SV<sup>K</sup>TP<sup>KK</sup>AK<sup>K</sup>PAATR<sup>KS</sup>SNP<sup>K</sup>KPK<sup>T</sup>VPK<sup>PK</sup>VAK<sup>SP</sup>AK  
 AKAVK<sup>PK</sup>AAK<sup>AR</sup>VTK<sup>PK</sup>TAK<sup>PK</sup>KAAP<sup>KK</sup>

**H1.2 (P16403)**

MSETAPAAPAAAPPAEK<sup>AP</sup>V<sup>KK</sup>KA<sup>AK</sup>AGGTP<sup>RK</sup>ASGPPVSELIT<sup>K</sup>AVAAS<sup>K</sup>ERSGVSLAAL  
<sup>KK</sup>ALAAAGYDVEK<sup>NNS</sup>RIK<sup>L</sup>LGL<sup>K</sup>SLVSKGTLVQTK<sup>G</sup>TGASGSF<sup>KL</sup>NKKAASGEAK<sup>PK</sup>V<sup>KK</sup>AG  
 GTKP<sup>KK</sup>PVGA<sup>AK</sup>PK<sup>KA</sup>AGGATP<sup>KS</sup>AK<sup>K</sup>TP<sup>KK</sup>AK<sup>K</sup>PAATV<sup>TK</sup>VAK<sup>SP</sup>PK<sup>AK</sup>VAK<sup>PK</sup>AA  
 KSAAKAVK<sup>PK</sup>AAK<sup>PK</sup>VV<sup>PK</sup>KAAP<sup>KK</sup>

*Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure*

**H1.3 (P16402)**

MSETAPLAPTIPAPAEKTPVKKKAKKAGATAGKRRKASGPPVSELITKAVAASKERSGVSLAA  
LKKALAAAGYDVEKNNSRIKLGKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEGPKAKKA  
GAAKPRKPAGAAKPKKKVAGAATPKKSIKKTPKKVKKPATAAGTKKVAKSAKKVKTPQPKKA  
AKSPAKAKAPKPKAAKPKSGKPKVTKAKKAAPKKK

**H1.4 (P10412)**

MSETAPAAPAAPAPAEKTPVKKKARKSAGAAKRRKASGPPVSELITKAVAASKERSGVSLAAL  
KKALAAAGYDVEKNNSRIKLGKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKPKAKKAG  
AAKAKKPAGAAKPKKKATGAATPKKSAKKTTPKAKKPAAAAGAKKAKSPKKAKAAPKPKAPK  
SPAKAKAVKPKAAKPKTAKPKAAKPKKAAAKK

**H1.5 (P16401)**

MSETAPAETATPAPVEKSPAKKKATKKAAGAGAAKRRKATGPPVSELITKAVAASKERNGLSL  
AALKKALAAGGYDVEKNNSRIKLGKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKPKAK  
KAGAAKAKKPAGATPKKAKKAAGAKKAVKKTTPKAKKPAAAGVKKVAKSPKKAKAAAKPKKA  
TKSPAKPKAVKPKAAKPKAAKPKAAKPKAAKAKKAAAKK