

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

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in
Granulozyten unter physiologischen Bedingungen und bei
Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Dissertation

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

vorgelegt von

Julia Karthein
2017

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

gez.:

Dekanin/Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referentin/Referent: Prof. Dr. med. Stefanie Ritz-Timme

Korreferentin/Korreferent: Prof. Dr. med. Stephan vom Dahl

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen
und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Inhaltsverzeichnis

Meinen Eltern

Danksagung

Diese Arbeit wurde 2010 am Institut für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf begonnen. Ich möchte diese Seite nutzen, um all denjenigen zu danken, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Stefanie Ritz-Timme, danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas, die wertvollen Anregungen, die fachkundigen Überlegungen, die kritischen Anmerkungen und die freundschaftlich-konstruktiven Diskussionen, die Besprechungen „Pow-Wows“ und vor allem die stetige Motivation und Ermutigung und das nicht nur im Hinblick auf diese Arbeit sondern auch auf die Verbesserung der Lehr- und Lernbedingungen an der medizinischen Fakultät Düsseldorf.

Ganz besonders möchte ich mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. Schneider und dem gesamten Team der Rheumatologie Düsseldorf für die Bereitstellung der Proben, die wertvolle und kollegiale Unterstützung und die fachliche Hilfe bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Arbeitsgruppe:

Bärbel Seeling, Dr. rer. nat. Alexandra Reckert, Nazan Aksu Şirin, Dr. med. Anna Neufeind, Dr. med. univ. Christian Matzenauer, Blazenka Bosilj, Dr. rer. nat. Reimer Dobberstein, Dr. med. Benno Hartung und Dr. med. Felix Mayer. Es hat Spaß gemacht, mit Euch zu arbeiten, zu forschen, zu pipettieren, große und kleine Probleme zu lösen, zu diskutieren, Plätzchen zu backen, Schokolade zu essen, auf Hochzeiten zu tanzen und mit Blumen Zombies fernzuhalten. Außerdem danke ich den restlichen Mitarbeitern des Institutes für Rechtsmedizin für das stets freundliche, produktive und lustige Miteinander.

Weiterhin möchte ich mich auch bei denjenigen bedanken, die mich mein Studium hindurch begleitet und auch wesentlich am Entstehen, manchmal Durchstehen dieser Arbeit unterstützt haben: meine Eltern, mein Bruder, Jasso, Sven, Käddy, Näddy, Juliane, Anne Lene und Marbi.

Vielen Dank Euch allen für Eure großartige Unterstützung!

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	5
1. EINLEITUNG	8
1.1. RHEUMATOIDE ARTHRITIS, DEIMINIERT PROTEINE UND ANTIKÖRPER GEGEN DEIMINIERT PROTEINE	8
1.1.1. ANTIKÖRPER GEGEN DEIMINIERT PROTEINE	10
1.1.2. DEIMINIERUNG VON ARGININRESTEN IN PROTEINEN	12
1.1.3. DEIMINIERT HISTONE	15
1.1.4. DEIMINIERT HISTONE IN GRANULOZYTEN	16
1.2. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1. DAS UNTERSUCHUNGSMATERIAL: BLUTPROBEN ANTI-CCP POSITIVER RA-PATIENTEN UND GESUNDER PROBANDEN	20
2.2. AUFREINIGUNG DER GRANULOZYTEN	22
2.2.1. GEWINNUNG DER GRANULOZYTEN	22
2.2.2. KONTROLLE DER GRANULOZYTENGEWINNUNG IM AUSSTRICHPRÄPARAT	23
2.3. ISOLATION DER HISTONE	25
2.3.1. FÄLLUNG DER HISTONE NACH KERNLYSE	25
2.3.2. TRENNUNG DER VERSCHIEDENEN HISTON- SUBTYPEN MITTELS RP-HPLC	26
2.3.3. KONTROLLE DES ISOLATIONSERGEBNISSES MITTELS GELELEKTROPHORESE	27
2.4. DETEKTION DEIMINIERTER ARGININ- RESTE IN DEN AUFGEREINIGTEN HISTONEN	29
2.4.1. BESTIMMUNG DES VERHÄLTNISSSES VON CITRULLIN ZU ARGININ MITTELS HPLC	29
2.4.1.1. Deskriptive Statistik	31
2.4.2. DETEKTION VON CITRULLIN IN HISTONEN MITTELS WESTERN-BLOT	32
2.5. EINGESETZTE LÖSUNGEN	35
2.5.1. VORBEREITUNG DER PROBEN	35
2.5.1. KONTROLLE DES AUFREINIGUNGSERGEBNISSES IM AUSSTRICHPRÄPARAT	35
2.5.2. FÄLLUNG DER HISTONE NACH KERNLYSE	36
2.5.3. TRENNUNG DER VERSCHIEDENEN HISTON-SUBTYPEN MITTELS RP-HPLC	36
2.5.4. KONTROLLE DES ISOLATIONSERGEBNISSES MITTELS GELELEKTROPHORESE	37
2.5.5. BESTIMMUNG DES VERHÄLTNISSSES VON CITRULLIN ZU ARGININ MITTELS HPLC	39
2.5.6. DETEKTION VON CITRULLIN IN HISTONEN MITTELS WESTERN-BLOT	40

Inhaltsverzeichnis

3. ERGEBNISSE	42
3.1. KONTROLLE DER QUALITÄT DER ISOLATION VON GRANULOZYTEN IM AUSSTRICHPRÄPARAT	42
3.2. TRENNUNG DER VERSCHIEDENEN HISTONFRAKTIONEN MITTELS RP-HPLC	44
3.3. ANALYTIK: NACHWEIS VON CITRULLIN IN HISTONEN	48
3.3.1. QUALITATIVE DETEKTION VON CITRULLIN IN HISTONEN MITTELS WESTERN-BLOT	48
3.3.1.1. Histon H2b	48
3.3.1.2. Histon H2a	49
3.3.1.3. Histon H1	50
3.3.2. BESTIMMUNG DES VERHÄLTNISSSES DER CITRULLIN- ZUR ARGININKONZENTRATION (DEIMINIERUNGSRATE) IN HISTONEN MITTELS HPLC	51
3.3.3. DEIMINIERUNGSGRAD IN GRANULOZYTÄREN HISTONEN VON RA-PATIENTEN IM VERGLEICH ZU GESUNDEN PROBANDEN	53
3.3.3.1. Histon H1	54
3.3.3.2. Histon 2a	55
3.3.3.3. Histon H2b	56
3.3.3.4. Histon H3-1	57
3.3.3.5. Histon H3-2	58
3.3.3.6. Histon H4	59
3.3.4. DEIMINIERUNGSGRAD GRANULOZYTÄRER HISTONE AN RA ERKRANKTER PATIENTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON LABORCHEMISCHEN PARAMETERN UND KLINISCHEM VERLAUF	61
3.3.4.1. Histon H1	62
3.3.4.2. Histon 2a	63
3.3.4.3. Histon 2b	64
3.3.4.4. Histon 3-1	65
3.3.4.5. Histon 3-2	66
3.3.4.6. Histon H4	67
4. DISKUSSION	69
4.1. METHODENKRITIK	69
4.1.1. QUALITÄT DER AUFREINIGUNG DER GRANULOZYTEN	69
4.1.2. QUALITÄT DER AUFREINIGUNG DER HISTONE AUS DEN ISOLIERTEN GRANULOZYTENFRAKTIONEN	70
4.2. DEIMINIERUNG VON ARGININRESTEN IN HISTONEN	73
4.2.1. DEIMINIERUNG VON ARGININRESTEN IN HISTONEN BEI GESUNDEN PROBANDEN	74
4.2.2. VARIABILITÄT DES DEIMINIERUNGSGRADES IN HISTONEN AUS GRANULOZYTEN GESUNDER PROBANDEN	75
4.2.3. DEIMINIERUNGSGRAD IN HISTONEN BEI AN RA ERKRANKTEN PATIENTEN	77
4.2.4. DEIMINIERUNGSGRAD IN HISTONEN BEI AN RA ERKRANKTER PATIENTEN IN RELATION ZU LABORCHEMISCHEN PARAMETERN UND KLINISCHEM VERLAUF	78

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen
und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Inhaltsverzeichnis

4.3. SCHLUSSFOLGERUNG	80
5. ZUSAMMENFASSUNG	81
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	83
7. LITERATURVERZEICHNIS	86
8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	103

Einleitung

1. Einleitung

Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit steht die Frage, ob bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) eine übermäßige Deiminierung („Hypercitullinierung“) von Histonen in Granulozyten nachweisbar ist und dies eine Rolle in der Pathogenese der RA spielen könnte.

1.1. Rheumatoide Arthritis, deimierte Proteine und Antikörper gegen deimierte Proteine

Die RA ist eine systemische Autoimmunerkrankung bislang unklarer Genese. Sie ist die häufigste entzündliche periphere Gelenkerkrankung in den westlichen Industrienationen, etwa 0,5-1% der erwachsenen Bevölkerung sind betroffen (Scott et al. 2010). In Deutschland wird die Zahl der Betroffenen auf etwa 800.000 geschätzt. Das Manifestationsalter zeigt einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 35.- und dem 45. Lebensjahr und tritt bei Frauen etwa zwei bis drei Mal häufiger auf.

Die RA ist eine schubweise, progrediente Erkrankung, die zu Gelenkschwellungen, Versteifungen und Schmerzen mehrerer Gelenke führt. Außerdem geht sie mit einer fortschreitenden Gelenkdestruktion, damit verbundener zunehmender Behinderung und mit einer kürzeren Lebenserwartung der betroffenen Patienten einher (Pincus et al. 1984, McInnes et al. 2011). Eine frühzeitige Behandlung hat für den einzelnen Patienten, wie für das sozioökonomische System eine hohe Bedeutung (Huscher et al. 2006). Für die Standardisierung der RA für Studien wurden Klassifikationskriterien von dem *American College of Rheumatology* (ACR, 1987) eingeführt.

Die Klassifikationskriterien von 1987 wurden 2010 von dem *American College of Rheumatology* (ACR) und der *European League Against Rheumatism* (EULAR) erweitert, um Patienten frühzeitiger diagnostizieren und damit schneller behandeln zu können.

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Einleitung

Diese neuen Klassifikationskriterien verlangen zur Stellung der Diagnose der RA mindestens ein von Synovitis befallenes, geschwollenes Gelenk und zudem, dass die Gelenkentzündung nicht besser mit einer anderen Erkrankung erklärbar ist. Sie arbeiten mit einem Punktesystem, das für Schwellung, bzw. Druckschmerz von Gelenken maximal fünf Punkte, für die Serologie von Rheumafaktoren (Antikörper der Klasse M (IgM) gegen den konstanten Teil (Fc) von Antikörpern der Klasse G (IgG) (Firestein et al. 2003, Mimori et al. 2005)) und Antikörper gegen deiminierte („citrullinierte“) Proteine (*anti cyclic citrullinated peptides*, Anti-CCP) maximal drei Punkte, für Akute-Phase-Marker, wie das C-reaktive Protein (CRP) oder die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und für die Dauer der Symptomatik jeweils maximal einen Punkt vergibt (s. folgende Tab. 1).

Tab. 1 Klassifikationskriterien zur Diagnosestellung einer RA der ACR und EULAR 2010

	Kriterium	Punkte
Gelenkbeteiligung	1 großes Gelenk	0
	2 - 10 große Gelenke	1
	1 - 3 kleine Gelenke	3
	> 10 Gelenke (mind. 1 kleines)	5
Serologie	Negative Rheumafaktoren und negative Anti-CCP-Antikörper	0
	Leicht positiver Rheumafaktor oder Anti-CCP-Antikörper	2
	Hoch positiver Rheumafaktor oder Anti-CCP-Antikörper	3
Akute-Phase-Reaktion	Normales CRP und BSG	0
	Erhöhtes CRP oder erniedrigte BSG	1
Dauer der Symptome	< 6 Wochen	0
	> 6 Wochen	1

Ein Patient kann in dem o.g. Klassifizierungssystem maximal zehn Punkte erreichen. Bei einem Patienten mit sechs oder mehr Punkten wird eine RA angenommen und die Behandlung eingeleitet (Aletaha et al. 2010).

Einleitung

1.1.1. Antikörper gegen deiminierte Proteine

Die neuen Klassifikationskriterien (ACR, EULAR 2010) sehen neben dem serologischen Test auf Rheumafaktoren auch die Bestimmung der Serumkonzentration von Antikörpern gegen deiminierte Proteine (Anti-CCP-Antikörper) vor. Bis zu 80% der Patienten mit RA zeigen serologisch Antikörper gegen deiminierte Proteine (Vossenaar et al. 2003, Klareskog et al. 2008). Diese Patienten leiden häufiger an einer erosiven Form der RA (Forslind et al. 2004, Vencovský et al. 2003).

Anti-CCP-Assays werden heute routinemäßig in der rheumatologischen Diagnostik eingesetzt. Diese Assays haben eine diagnostische Sensitivität von bis zu 67%, sowie eine Spezifität von 95% (Nishimura et al. 2007) und haben damit einen wesentlichen Vorteil im Vergleich zu den schon länger eingesetzten Assays für Rheumafaktoren, die wesentlich weniger spezifisch sind. Für den Nachweis und die Quantifizierung der Anti-CCP-Antikörper werden ELISA-Systeme (*enzyme-linked immunosorbent assay*) eingesetzt, die als Antigene zirkuläre, Citrullin-haltige Peptide nutzen. An die zirkulären Peptide binden gegen Citrullin gerichtete, für die RA relativ spezifische Antikörper, die zusammenfassend als Anti-CCP-Antikörper bezeichnet werden (Girbal-Neuhauser et al. 1999, Schellekens et al. 2000, Schellekens et al. 1998, Yamada et al. 2005).

Studien an Blutspendern, die später eine RA entwickelt haben, zeigten, dass die Anti-CCP-Antikörper schon mehrere Jahre vor Krankheitsbeginn nachweisbar sein können (Nielen et al. 2004, Rantapää-Dahlqvist et al. 2003). Die Autoantikörper können demnach als ein wichtiger früher diagnostischer Marker angesehen werden, ihre Serumprävalenz ist jedoch alleine nicht ausreichend, um eventuell zu einem späteren Zeitpunkt eine aktive RA nachzuweisen (Klareskog et al. 2008).

Weiter ist bekannt, dass das Auftreten einer RA mit Anti-CCP-Antikörpern durch verschiedene genetische Prädispositionen getriggert werden kann.

So wurde eine bisher nur in der asiatischen Bevölkerung nachweisbare genetische Variante einer auffallend stabilen Peptidyl-Arginin-Deiminase (PAD) beschrieben, die sich

Einleitung

durch eine längere Halbwertszeit ausgezeichnet (Suzuki et al. 2003, Ikari et al. 2005, Kang et al. 2006, Vossenaar et al. 2004, Yamada et al. 2005). Die PAD Enzyme vermitteln die Deiminierung von Arginin zu Citrullin (Kapitel 1.3.3.). Die beschriebene Aktivitätsverlängerung der PAD kann bei betroffenen Individuen zu einer vermehrten Deiminierung von Argininresten, also zu einem vermehrten Auftreten von Citrullinresten in Proteinen, wie z.B. Histonen führen, was wiederum einen Bruch der immunologischen Toleranz bewirken könnte.

Als weitere wichtige genetische Komponente wird die starke Assoziation zwischen bestimmten Allelen des HLA-DR4 (Humanes Leukozyten Antigen) und dem Auftreten von Anti-CCP-Antikörpern beschrieben (Vossenaar et al. 2004, Wegner et al. 2009). Durch dieses HLA-DR4-Allel wird ein Subtyp der HLA-Klasse Typ II-Moleküle codiert, der in der Literatur als „shared epitope“ bezeichnet wird (Laki et al. 2012, Böcker et al. 2008, Gregersen et al. 1987). Die Assoziation zwischen einem bestimmten HLA-DR4-Allel und dem Auftreten von Anti-CCP-Antikörpern lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Entstehung der RA oder zumindest der Anti-CCP-Antikörper durch die Präsentation eines Antigens durch das HLA-DR4 getriggert wird. Dies führt zu der Frage nach der Identität des auf dem HLA-präsentierten (Citrullin enthaltenen) Antigens.

Außerdem werden in der Literatur weitere nicht-genetische prädisponierende Faktoren für das Auftreten von Anti-CCP-Antikörpern diskutiert, unter anderem Parodontose durch *Porphyromonas gingivalis* (Bright et al. 2015, De Pablo et al. 2014, König et al. 2014, Bartold et al. 2005), Rauchen (Lugli et al. 2015, Cartwright et al. 2014, Lee et al. 2014, Willemze et al. 2011, Källberg et al. 2011) und die Infektion mit Epstein-Barr Virus (Wulff Westergaard et al. 2015).

Bislang ist allerdings unbekannt, welches deiminierte Protein als Antigen über welchen pathophysiologischen Mechanismus die Bildung von Anti-CCP-Antikörpern induziert (Van Venrooij et al. 2014).

Einleitung

1.1.2. Deiminierung von Argininresten in Proteinen

Citrullin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure und kommt im menschlichen Stoffwechsel in zwei unterschiedlichen Formen vor. Zum einen spielt Citrullin als freie Aminosäure im Harnstoff-Stoffwechsel beim Abbau von Proteinen eine entscheidende Rolle. Zum anderen kann es nach Deiminierung von Argininresten in Proteinen als posttranslationale Modifikation (Klareskog et al. 2008) auftreten. Diese beiden Systeme sind als voneinander getrennt anzusehen und beeinflussen sich nicht gegenseitig (Curis et al. 2005).

Da es kein bekanntes Codon für den Einbau von Citrullin in menschliche Proteine gibt, ist jeder Citrullinrest in einem Protein sekundär durch eine posttranslationale Modifikation von Argininresten entstanden. Dieses geschieht durch enzymatische Deiminierung von Argininresten durch das Enzym Peptidylarginin-Deiminase (PAD), wobei die positiv geladene Aminogruppe des Arginins abgespalten wird (s. Abb. 1) (Rogers et al. 1977). Diese Reaktion wird als Deiminierung oder auch Citrullinierung bezeichnet (Suzuki et al. 2007).

Einleitung

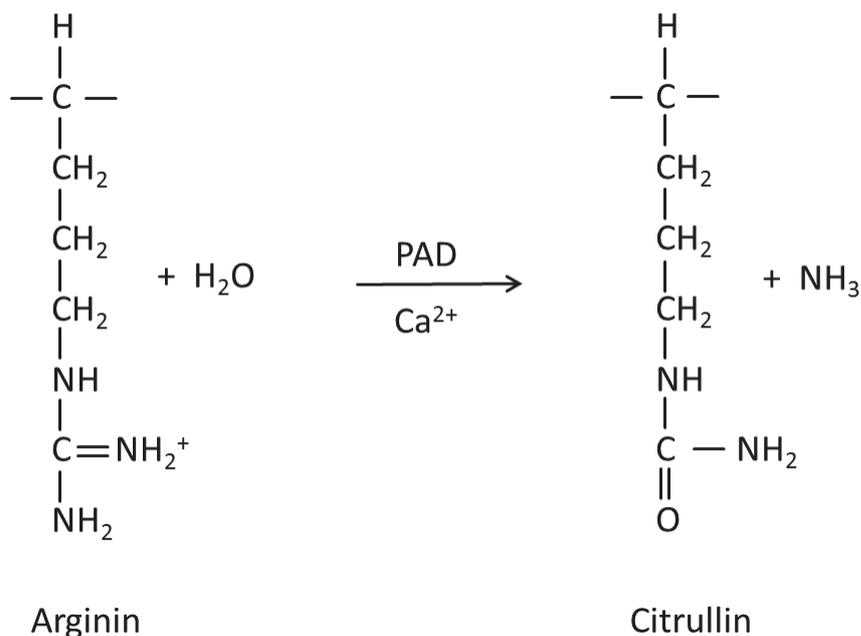


Abb. 1 Enzymatische Deiminierung von Peptidylarginin zu Peptidylcitrullin durch die PAD (Abbildung verändert nach Chavanas et al. 2006 und György et al. 2006)

Bisher wurden 5 Isoformen der PAD-Enzyme beim Menschen beschrieben (Ferrari-Lacraz et al. 2012). Fünf Gene codieren die humanen PAD-Isoformen, diese Formen werden als PAD 1, 2, 3, 4 und 6 bezeichnet. Die Isoformen zeichnen sich durch ihre unterschiedliche Gewebespezifität aus. Man findet PAD 1 hauptsächlich in der Epidermis und im Uterus, PAD 2 wird in Gehirnzellen, Gliazellen und Makrophagen synthetisiert, PAD 3 wird in der Epidermis oder in Haarfollikeln exprimiert (Nachat et al. 2005), PAD 4 im Zellkern und im Zytoplasma von Granulozyten (Kapitel 1.4.) (Nakashima et al. 2002), und PAD 6 in Embryonen, in den Ovarien (Eizellen) und im Thymus (Esposito et al. 2007).

Normalerweise kommen die PAD-Enzyme intrazellulär vor, da keine der Isotypen ein sekretorisches Signal hat, wobei PAD 4 als einziges Enzym der Enzymgruppe zusätzlich zum Zytoplasma im Zellkern vorkommt (Yamada et al. 2005).

Da eine höhere Kalzium-Konzentration nötig ist, als sie im intrazellulären Raum üblich ist, um die PADs in den aktiven Zustand zu überführen, liegen sie meist inaktiv vor. Durch z.B.

Einleitung

inflammatorische Stimuli kann die Kalzium-Konzentration die zur PAD-Aktivierung nötige Höhe erreichen (Vossenaar et al. 2003), indem zunächst die Plasmamembran für Ionen, unter anderem auch Kalzium, durchlässiger wird (Suwannalai et al. 2012), so dass durch eine Verschiebung der Konzentrationen die nötigen Spiegel erreicht werden können.

Das „Ersetzen“ von Argininresten durch Citrullin kann erhebliche Folgen für Struktur, Funktion und Schicksal eines Proteins haben. Es kommt zu einer wesentlichen Ladungsänderung, wodurch auch Konformationsänderungen resultieren können (György et al. 2006). Abhängig von der Anzahl der deiminierten Argininreste können diese Änderungen der Tertiärstruktur zu einer Auflockerung und somit zu einer weniger organisierten Struktur bis hin zur Denaturierung des Proteins führen (Tarcza et al. 1996).

Die Deiminierung von Proteinen kann sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch unter pathologischen Bedingungen auftreten. (Bakaa et al. 2012). Unter physiologischen Bedingungen ist sie unter anderem bei der Keratinisierung der Haut (Senshu et al. 1999), im Chemokinsystem (Loos et al. 2009), in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen (Nicholas et al. 2003) sowie in Histonen (Hagiwara et al. 2005) beschrieben.

Unter pathologischen Bedingungen tritt die Deiminierung von Proteinen insbesondere bei entzündlichen Prozessen auf (Makrygiannakis et al. 2006, Chapuy-Regaud et al. 2005). Sie wurde beispielsweise in *neutrophil extracellular traps* (NET) Formationen (Li et al. 2010, Wang et al. 2009), bei malignen Tumoren (Chang et al. 2006, Chang et al. 2009, Mohanan et al. 2012), Psoriasis (Ishida-Yamamoto et al. 2000), Multipler Sklerose (Harauz et al. 2007, Moscarello et al. 2007) und der RA (van Venroji et al. 2014, Yamada et al. 2005) beschrieben.

Einleitung

1.1.3. Deiminierte Histone

Im Nukleus eukaryotischer Zellen liegt inaktive DNA komprimiert und organisiert durch Histone als Chromatin vor (Kornberg et al. 1977). Das Nukleosom ist die kleinste Einheit des Chromatins, es wird aus einem Oktamer von Histonen und DNA-Doppelhelix, die mit 146 Basen ein dreiviertel Mal um das Oktamer gewickelt ist, gebildet. Das Histonoktamer wird aus jeweils zwei Kopien der Core-Histone H2A, H2B, H3 und H4 gebildet (Luger et al. 1997, Voigt et al. 2012). Histon 1 (H1) zählt zu den Linker-Histonen. Es kommt nicht in jedem Nukleosom vor, ist aber häufig damit assoziiert und stabilisiert den Komplex zusätzlich (McGhee et al. 1980).

Lange wurde vermutet, dass Histone vor allem der statischen Komplexierung und Stabilisierung inaktiver DNA dienen. Inzwischen konnte jedoch mehrfach gezeigt werden, dass der Struktur der Histone und damit des Chromatins auch eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression zukommt (Rando 2012, Wang et al. 2008, Young et al 2010, Jenuwein et al. 2001, Dieker et al. 2010).

Posttranslationale Modifikationen der Histone, wie Acetylierung (Lysin), Methylierung, Deiminierung (Arginin) und Phosphorylierung (Serin, Threonin) vermitteln epigenetische Informationen („epigenetischer Code“) (Beck et al. 2006). Sie finden besonders am N-terminalen Ende des jeweiligen Histons statt und verursachen zum Beispiel Änderungen der Ladung und damit auch der dreidimensionalen Struktur des Histons und der Adhärenz an den jeweiligen Abschnitt der DNA, was zur Folge haben kann, dass ein Abschnitt verstärkt oder vermindert abgelesen wird (Garcia et al. 2001). Diese Modifikationen kommen an vielen verschiedenen, aber jeweils spezifischen Stellen vor. Außerdem scheinen sich verschiedene Modifikationen sowohl untereinander im selben Protein zu beeinflussen als auch die Interaktion mit anderen Proteinen und deren Kombinationen an posttranslationalen Modifikationen (Jenuwein et al. 2001).

Histone zeigen auch eine unter physiologischen Bedingungen stattfindende, enzymatische, posttranslationale Deiminierung von Argininresten, die durch die im Zellkern lokalisierte PAD 4 eingeleitet wird (Hagiwara et al. 2002, Nakashima et al. 2002). Die

Einleitung

Deiminierung von Histonen hat über die resultierende Ladungsänderung sowie durch das Fehlen der umgewandelten Argininreste als Methylierungsstellen Einfluss auf den oben beschriebenen „Histoncode“ (Thompson et al. 2006). So antagonisiert sie die Methylierung von Argininresten, die i.d.R. eine verstärkte Ablesung des jeweiligen DNA Abschnitts hemmt (Cuthbert et al. 2004).

1.1.4. Deiminierte Histone in Granulozyten

Granulozyten sind polymorphkernige Blutzellen, die mit Monozyten und Lymphozyten zu den Leukozyten zählen. Sie werden in Neutrophile (50-70% aller Leukozyten), Basophile (0-1%) und Eosinophile (4%) eingeteilt. Dabei unterscheiden sich die Granulozyten nicht nur aufgrund ihres der Benennung zugrundeliegenden verschiedenen Färbeverhaltens, sondern auch durch unterschiedliche Funktionen vor allem im Immunsystem des Körpers. Im menschlichen Blut ist die prominenteste Gruppe der Granulozyten die der Neutrophilen. Sie sind wichtige Immunzellen, die besonders an der Bekämpfung von Bakterien beteiligt sind, aber auch zahlreiche andere Immunprozesse beeinflussen. Ihre Lebensdauer im Blutkreislauf beträgt ca. 1-5 Tage.

In Granulozyten tritt eine übermäßige Deiminierung der Argininreste von Histonen insbesondere unter proinflammatorischen Stimuli auf (Neeli et al. 2008). Deiminierte Histone wurden auch als wichtiger Bestandteil der extrazellulären Fasern oder Neutrophil Extracellular Traps (NETs) beschrieben, die von neutrophilen Granulozyten im Falle einer Immunreaktion gebildet werden (Neeli et al. 2004, Neeli et al. 2008, Wang et al. 2009, Liu et al. 2012). Vor diesem Hintergrund werden deiminierte Histone aus Granulozyten auch als möglicher Induktor der Anti-CCP Antikörper diskutiert (Khandpur et al. 2013).

Einleitung

1.2. Fragestellung und Zielsetzung

Das Auftreten deimierter Proteine ist grundsätzlich nicht ungewöhnlich. Theoretisch ist die Annahme naheliegend, dass die Provokation einer Konformationsänderung durch den Aminosäureaustausch zum Zusammenbruch der immunologischen Toleranz und damit zur Bildung von Auto-Antikörpern führen kann. Dennoch entwickeln (fast) ausschließlich RA-Patienten Auto-Antikörper gegen deimiertes Protein, und zwar nicht selten bereits Jahre vor dem Auftreten erster Beschwerden (Nielen et al. 2004, Rantapää-Dahlqvist et al. 2003).

Letztlich ist die pathogenetische Rolle deimierter Proteine und der gegen sie gerichteten Auto-Antikörper in der RA noch nicht ausreichend verstanden. Dies betrifft sowohl die Frage nach der Entstehung von Autoimmunität, als auch die Frage möglicher unmittelbarer Folgen einer „Überdeimierung“ von Proteinen, wie sie von einigen Autoren diskutiert wurde (Wegner et al. 2009, van Gaalen et al. 2005, Cloos et al. 2004, Utz et al. 2000).

Ein Problem für das Verständnis der diesbezüglich offenen Fragen ist die Unklarheit darüber, über welche Antigene die Autoimmunität gegenüber deimierten Proteinen konkret ausgelöst wird. Als „Kandidaten-Autoantigene“ werden deimierte Formen von Fibrin, Vimentin und Histonen diskutiert (Vossenaar et al. 2004), wobei die Deimierung von Histonen bei Patienten, die unter RA leiden, bislang noch nicht untersucht worden ist.

Vor diesem Hintergrund geht die vorliegende Arbeit im Wesentlichen der Frage nach, ob in Granulozyten bei Patienten mit RA ungewöhnlich viele Citrullinreste in Histonen („Überdeimierung“) nachweisbar sind. Wenn das so wäre, wäre dieser Nachweis möglicherweise ein wichtiger Beitrag zu der aktuellen Diskussion der Bedeutung deimierter Proteine in der Pathogenese der RA.

Material und Methoden

2. Material und Methoden

Die Deiminierung von Argininresten humaner Histone (H1, H2a, H2b, H3 und H4) aus Granulozyten wurde bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) mit Antikörpern gegen deiminierte Proteine untersucht. Vergleichsdaten wurden durch Untersuchung von Granulozyten gesunder Probanden gewonnen.

Der Grad der Deiminierung der einzelnen Histone wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*) bestimmt. Zusätzlich wurde die Deiminierung durch Western Blot überprüft.

Die folgende Abbildung 2 gibt einen schematischen Überblick über die Methodik.

Material und Methoden

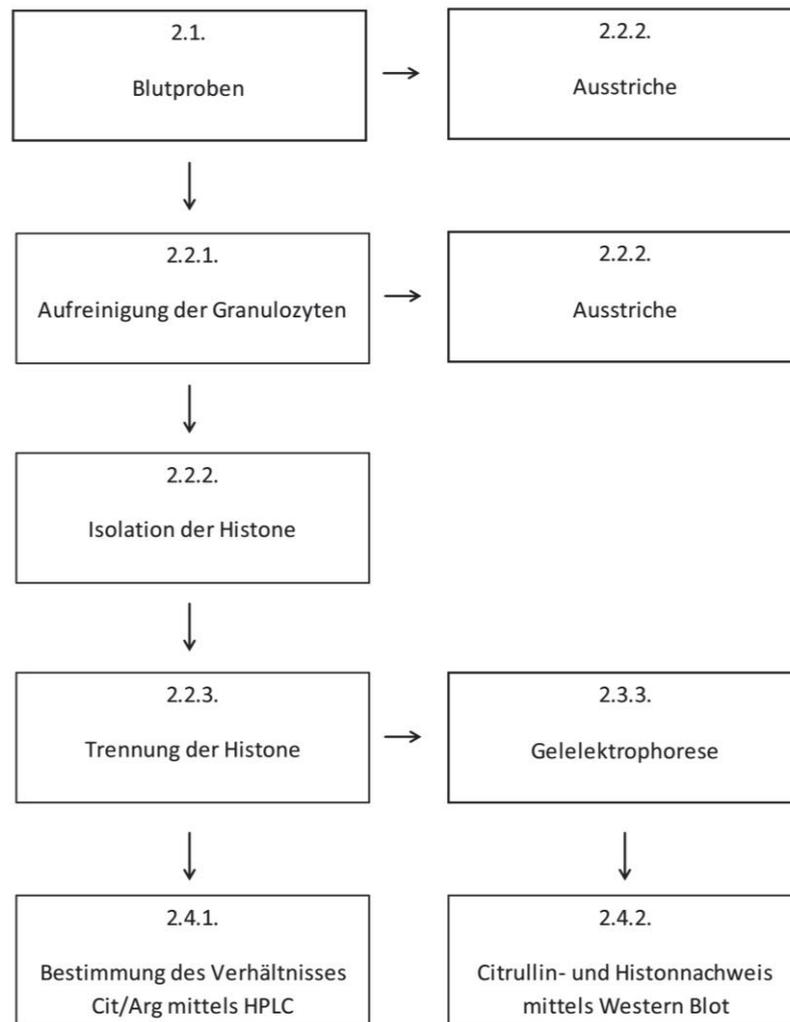


Abb. 2 Schematische Darstellung der angewandten Methodik

Material und Methoden

2.1. Das Untersuchungsmaterial: Blutproben Anti-CCP positiver RA-Patienten und gesunder Probanden

Die Anti-CCP positiven Blutproben wurden von 22 Patienten mit rheumatoider Arthritis der Poliklinik Rheumatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf mit deren Einverständnis nach Aufklärung gewonnen. Als Kontrollgruppe dienten 24 gesunde Probanden, denen ebenfalls mit deren Einverständnis nach erfolgter Aufklärung Blut entnommen wurde.

Für die Durchführung der Untersuchung lag die Zustimmung der Ethikkommission vor (Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Studiennummer 3931).

Den Patienten bzw. den Probanden wurden jeweils ca. 30 ml Venenblut entnommen. Die Proben wiesen keine makroskopischen Veränderungen auf (wie z.B. Hämolyse).

Die Patienten mit RA waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 26 und 77 Jahre alt mit einem Mittelwert von 56,1 Jahren. Es wurde das Blut von 21 weiblichen und einem männlichen Patienten untersucht: bei 14 Patienten lautete die Diagnose laut ICD- 10: seropositive chronische Polyarthritits, nicht näher bezeichnet (M05.9); bei fünf Patienten: sonstige seropositive chronische Polyarthritits, mehrere Lokalisationen (M05.80); bei einem Patienten: Vaskulitis bei seropositiver chronischer Polyarthritits, mehrere Lokalisationen (M05.2); bei einem Patienten: chronische Polyarthritits, nicht näher bezeichnet (M06.9) und bei einem Patienten: sonstige nicht näher bezeichnete chronische Polyarthritits (M06.8).

Alle Patienten zeigten Antikörper gegen deiminierte Proteine. Die Konzentration reichte von 5 U/ml bis ≥ 200 U/ml, wobei der Test nur Konzentrationen bis 200 U/ml erfasste. Der Mittelwert der Konzentration der Antikörper lag bei 92,4 U/ml.

Die Krankheitsdauer war zum Zeitpunkt der Abnahme im Bereich zwischen einem Jahr und 27 Jahren mit einem Mittelwert von 9,95 Jahren. Von 19 Patienten lag eine aktuelle Blutsenkungsgeschwindigkeit vor, die ermittelten Werte lagen hier im Bereich von 2 bis

Material und Methoden

80 mm/h mit einem Mittelwert von 18,7 mm/h. Die Serumkonzentrationen des C-reaktiven Proteins waren bei 19 Patienten bekannt und lagen zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 0 mg/dl und 4,5 mg/dl, der Mittelwert bei 0,6 mg/dl.

Die gesunden Probanden waren im Alter von 20 bis 61 Jahren und im Mittel 36,5 Jahre alt. Sie litten zum Zeitpunkt der Blutabnahme an keiner akuten oder chronischen Erkrankung und es lagen insbesondere keine Hinweise auf chronische entzündlich-rheumatische Erkrankungen vor. Es wurden Blutproben von sechs männlichen und 18 weiblichen Probandinnen untersucht.

Material und Methoden

2.2. Aufreinigung der Granulozyten

2.2.1. Gewinnung der Granulozyten

Die Gewinnung der Leukozyten (als sog. Buffy Coat) erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Sigma Aldrich (Percoll). Alle Lösungen, sofern nicht anders angegeben, wurden bei Raumtemperatur verwendet. Die einzelnen Aufarbeitungs- und Zentrifugationsschritte erfolgten ebenfalls, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Die Blutproben der untersuchten Personengruppen wurden mit je vier 10 ml fassenden ACD-Vakuum-Röhrchen (BD-Vacutainer®, 1,5 ml ACD-A, Acid-Citrate-Dextrose, 366645) abgenommen. Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Blut durch leichtes Schwenken mit der im Röhrchen vorhandenen gerinnungshemmenden Lösung vermischt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Röhrchen bis zu maximal drei Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden sie gepoolt und zusätzlich im Verhältnis 3:1 mit PBS (a) aufgefüllt und gemischt.

Ein 1,090 g/ml Dichte Gradient wurde mittels 12,96 ml Percoll-Lösung (Sigma, 77237, CAS 65455-52-9) und 7,04 ml 1,5 M Natriumchlorid-Lösung (b) hergestellt. Die Lösung wurde nach sorgfältigem Schütteln bei 20.000 g 20 min in einer Zentrifuge (Heraeus, Biofuge Stratos, Rotor 3335) ohne Bremse zentrifugiert.

Das Blut-PBS-Gemisch wurde anschließend vorsichtig mit einer Glaspipette auf den Gradienten geschichtet, ohne dass Blut und Gradient sich vermischten. Die überschichteten Blutproben wurden bei 650 rpm in einer Zentrifuge von Hettich (Typ Rotina 420R) zehn Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Nachfolgend wurden ca. 3 ml Serum abpipettiert und verworfen. Danach wurde die Zentrifugation wie oben beschrieben wiederholt. Nun war ein „Blutgradient“ mit den drei Fraktionen, Erythrozyten, Buffy-Coat (Leukozyten) und Serum sichtbar. Das Serum wurde verworfen. Die weißliche Schicht des Buffy-Coats mit der Zellfraktion wurde vorsichtig in ein neues

Material und Methoden

Falkon-Röhrchen überführt. Die so gewonnenen Leukozyten wurden erneut bei 1440 rpm zehn Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zellpellet vermischt. Von dem entstandenen Zellgemisch wurden jeweils 7 µl für ein Ausstrichpräparat abgenommen (s. 2.2.2.). Dies diente der Überprüfung der Granulozytenisolation.

Das Zellgemisch war durch die darin enthaltenden Erythrozyten leicht rötlich. Um die verbliebenen Erythrozyten herauszuwaschen, wurde eine Lyse der Erythrozyten angeschlossen. Hierfür wurden jeweils 45 ml 0°C kaltes Aqua bidest mit dem Röhrcheninhalt vermischt. Dieses wurde 25 Sekunden inkubiert und die Erythrozytolyse dann mit 5 ml 10x PBS (a) beendet. Anschließend folgte eine zehnminütige Zentrifugation in der Zentrifuge von Hettich (Typ Rotina 420R) bei 2000 rpm und 4°C. Nach Dekantieren des Überstands wurde die Erythrozytolyse so oft wiederholt, bis das Pellet weiß war und keine sichtbare rötliche Verfärbung mehr aufwies.

2.2.2. Kontrolle der Granulozytengewinnung im Ausstrichpräparat

Von jedem Patienten/Probanden wurde aus einem ca. 7 µl großen Tropfen des abgenommenen Blutes ein Blutausstrich angefertigt. Dieser wurde mindestens 2 Stunden an der Luft getrocknet.

Um die Blutzellen differenzieren zu können, wurden die Blutausstriche mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gefärbt. Zunächst wurden die Zellen mit 70%igen Ethanol fünf Minuten fixiert. Die Blutausstriche wurden anschließend mit Hämalaun-Lösung (Merk, 1.09249.2500) drei Minuten gefärbt. Nach dem Abspülen der Färbelösung mit Leitungswasser wurden die Zellen mit Eosin (c, Merk, 1.15935.0100) und

Material und Methoden

zwei Tropfen Essigsäure (Merk, 100063.1000) für 30 Sekunden gefärbt. Nach Beendigung der Färbung wurden die Blutausstriche erneut mit 70%igem Ethanol fixiert und mit Entellan (Merck, 107961) eingedeckt.

Stichprobenweise wurden zwecks Kontrollen auch Ausstriche mittels der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung (d, Sigma-Aldrich, 91C-1KT) behandelt. Auch hier wurden zunächst die Zellen auf dem Objektträger an der Luft getrocknet. Worauf die Ausstriche mit einer Citrat-Azeton-Formaldehyd (e) Lösung für 30 Sekunden fixiert und danach mit fließendem Wasser gespült wurden. Die Lösungen der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung (d) wurden, wie im Kit beschrieben, gemischt und die Zellen der Ausstriche damit 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach nachfolgender erneuter Spülung wurden die Ausstriche mit Hämalaun-Lösung (Merk, 1.09249.2500) für 2 Minuten gegengefärbt. Nach Beendigung der Färbung wurden die Ausstriche erneut unter fließendem Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Die Blutausstriche wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskopes des Typs DM 2000 von Leica mit angeschlossener Kamera und Bildbearbeitungsprogramm (Leica IM500) beurteilt und dokumentiert.

Des Weiteren wurden Ausstriche mit je 7 µl der Pellets nach der Gewinnung des Buffy-Coats angefertigt, um das Granulozyten-/Erythrozyten-Verhältnis vor den Hämolyse-schritten zu bestimmen. Diese Ausstriche wurden in gleicher Weise behandelt wie die Vollblutausstriche.

Material und Methoden

2.3. Isolation der Histone

2.3.1. Fällung der Histone nach Kernlyse

Die Isolation der Histone erfolgte nach dem modifizierten Protokoll nach Young et al. 2001. Das aufgereinigte Granulozytenpellet wurde in Abhängigkeit von dessen Volumen mit der zweifachen Menge 0,375 M Salzsäure (HCl) (f) und 1/10 des HCl-Volumens an Proteaseinhibitor (g) bei 4°C über Nacht geschüttelt, um die Kerne aufzuschließen und die Kernproteine in Lösung zu bringen.

Am nächsten Morgen erfolgte eine erneute Zentrifugation über 15 Minuten bei 3880 rpm und 4°C in der Zentrifuge Hettich (Typ Rotina 420R). Der proteinreiche Überstand wurde in einem neuen 50 ml Falcon- Röhrchen aufgefangen und das Pellet verworfen.

Der Überstand wurde mit 40 ml 4°C kaltem Aceton aufgefüllt. Die Histone wurden über Nacht bei 4°C daraus gefällt. Eine erfolgreiche Histonisolation konnte an der Bildung eines weißlichen Niederschlags im Röhrchen nach einigen Stunden erkannt werden.

Am nächsten Morgen erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 3880 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Histonpellet in 1 ml Aceton resuspendiert, um es in ein 2 ml fassendes Low- Bind- Eppendorf Gefäß zu überführen.

Die Histonpellets wurden bei Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge (Hettich, Mikro 200) bei 14000 g 8 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen. Das Histonpellet wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Material und Methoden

2.3.2. Trennung der verschiedenen Histon- Subtypen mittels RP-HPLC

Die Histone wurden nach Young (Young et al. 2001) mittels RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*) auf einer FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatograph*, ÄKTA Explorer 900 von Amersham Biosciences) getrennt. Als Säule wurde eine Jupiter C 18 Säule (5 μ , 300 Å, 250 x 10,00 mm der Firma Phenomenex®) verwendet.

Zur Trennung wurde das Histonpellet in 600 ml Eluent A (h) aufgenommen und gemischt. Danach wurde es zehn Minuten bei 37°C auf einem Schüttler bei 450 rpm inkubiert, um die Proteine in Lösung zu bringen. Die Probe wurde vorsichtig und unter Vermeidung von Luft einschüssen in eine Probenspritze aufgezogen und in die Probenschlaufe der RP-HPLC injiziert.

Ausgegangen wurde von einem Mischungsverhältnis von 65% Eluent A (h), der wässrigen Komponente, und 35% Eluent B (i), der organischen, lipophilen Komponente. Der lineare Anstieg des organischen Anteils trennte im Gradienten die einzelnen Histon-Subtypen auf der Säule auf, der lineare Gradient erreichte nach einer Laufzeit von 70 Minuten eine Konzentration der organischen Phase (Eluent B, i) von 70%.

Mit Hilfe einer UV-Lampe (UV- 900, Amersham Biosciences 900 Series) bei einer Wellenlänge von 214 nm wurden die Proteine detektiert. Mit einem Fraktionierer (Frac-920, Amersham Biosciences 900 Series) wurden jeweils 500 μ l des Eluats nach der Trennung durch die Säule in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen aufgefangen. Die Zuordnung gelang mittels eines UV-Spektrums eines Histonstandards (Roche, Histonmix mit H1, H2a, H2b, H3, H4 aus Kalbsthymus, 10 223 565 001), der in regelmäßigen Abständen in gleicher Weise über die Säule getrennt wurde. Damit konnten die Histonpeaks bestimmt werden und die darunter liegenden Fraktionen wurden in Low-bind-Eppendorf-Gefäßen gesammelt. Die Fraktionen wurden über Nacht in einem Vakuum- Trockner (Speed-Vac) getrocknet oder zunächst bei -80°C tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt getrocknet.

Material und Methoden

Die getrockneten Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert. In weiteren analytischen Schritten wurden sie mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese, HPLC-Analytik und Western-Blot näher untersucht.

2.3.3. Kontrolle des Isolationsergebnisses mittels Gelelektrophorese

Um die Reinheit der Histone in den präparierten Proben (s. 2.3.2.) zu prüfen, wurde bei allen Proben vor der weiteren Analytik eine Gelelektrophorese angeschlossen, dafür waren folgende Schritte nötig:

Die getrockneten Proben wurden in 50-100 µl Aqua bidest je nach Peak-Intensität im FPLC-Spektrum gelöst. Daraus wurde eine entsprechende Menge entnommen und mit Probenpuffer (j), dessen Menge sich nach dem Volumen des jeweiligen Aliquots richtete, versetzt und gemischt. Anschließend wurden die Aliquots für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und die Denaturierung unmittelbar im Anschluss bei -20°C gestoppt.

Pro Gel wurden sieben Proben, ein Molekulargewichtsmarker (SigmaMarker™, *low range*, M.W. 6,500-66,000kDa) und zwei Aliquots eines Histonstandards (Roche, Histonmix mit H1, H2a, H2b, H3, H4 aus Kalbsthymus, 10 223 565 001) vorbereitet. Zusätzlich wurde ein Slot mit Hämoglobin (Fluka Analytical, Cat.: 51290, aus Rinderblut) belegt, um eine potentielle Kontamination zu prüfen.

Die Aliquots wurden zur Auftrennung der Histone auf ein SDS-Page-Gel (*Sodium Dodecyl Sulfate*) aufgetragen (k). Dieses setzte sich aus einem Sammelgel (5%ig, s. (k)), welches die Slots für das einzelne Auftragen der Proben enthielt und dem Trenngel (16%ig, s. (k)), in dem die Proben nach der Laufzeit angefärbt werden konnten, zusammen. Als

Material und Methoden

Elektrophoresekammer diente das Model Mini- PROTEAN* 3 Cell von BIO-RAD, welches mit Laufpuffer (l) gefüllt wurde.

Die Elektrophoresekammer wurde auf 220 V, 60 mA und 9 W eingestellt bei einer Laufzeit von ca. 55 Minuten. Anschließend wurden die beiden Gele 25 Minuten in Coomassie-Lösung (m) gefärbt und in einer Lösung nach Schägger und Jagow [1987] (n) wieder entfärbt. Damit konnte man die Banden, die die Proteine enthielten, selektiv sichtbar machen und anschließend mit einem Gel- Imager (Intras) fotografieren.

Material und Methoden

2.4. Detektion deiminierter Arginin- Reste in den aufgereinigten Histonen

2.4.1. Bestimmung des Verhältnisses von Citrullin zu Arginin mittels HPLC

Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) (Agilent 1100 Series) wurden die Aminosäuren nach saurer Hydrolyse der Histone getrennt und das Verhältnis Citrullin/Arginin bestimmt. Zur Trennung der Aminosäuren wurde eine Methode nach Kaufmann und Manley [1998], bzw. Heems et al. [1998] modifiziert.

Zunächst wurden die getrockneten Histone mit 1ml einer 6N Salzsäure (o) versetzt und in säuresaubere Röhrchen überführt. Die Proben wurden anschließend 24 Stunden bei 110°C im Heizblock hydrolysiert. Nachfolgend wurden diese unter Vakuum eingetrocknet und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Hydrolysate wurden je nach Intensität des FPLC-Peaks (in mAU) in 20-100 µl Probenpuffer (p) aufgenommen und in die Probengefäße der HPLC überführt. Die Proben wurden mit Hilfe eines Probengebers automatisch abgearbeitet.

Ein Aminosäurenstandard (q) diente der Prüfung der Qualität der Trennung und der Identifikation der Aminosäuren über ihre Retentionszeiten.

In der Methode wurde das Prinzip der Vorsäulenderivatisierung verwandt. Die primären Aminosäuren wurden mit ortho-Phthaldialdehyd-Reagenz und 3-Mercaptopropionsäure (Agilent Technologies, OPA und 3- MPA, 5061- 3335) in Borat-Puffer und die sekundären mit 9-Fluorenylmethylchloroformat (Agilent Technologies, FMOC, 6061337) in Acetonitril derivatisiert. Die Vorsäulenderivatisierung erfolgte in der Probenkapillare des Probenarms, welche zunächst 2 µl der Probe und dann jeweils 2,2 µl der Derivatisierungsreagenzien aufgezogen hatte.

Als stationäre Phase wurde eine C18-Säule (Thermo Scientific Typ BDS HYPERSIL C18, 150 x 4,6 mm, Partikelgröße 3 µm) verwendet. Die mobile Phase wurde aus einem Gradienten aus Eluent A (r) und Eluent B (s) gebildet, der zunächst bei 90% Eluent A (r) und 10%

Material und Methoden

Eluent B (s) startete und bei 30% Eluent A (r) und 70% Eluent B (s) endete. Bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min eluierten die Aminosäuren innerhalb von 70 Minuten bei einer Säulentemperatur von 40°C. Der Fluoreszenzdetektor wurde für die primären Aminosäuren auf eine Anregungswellenlänge von $\lambda = 335$ nm und eine Detektionswellenlänge von $\lambda = 440$ nm eingestellt. Wobei die FMOC-Derivate (sekundäre Aminosäuren) nach 35 Minuten mittels einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 260$ nm und Detektionswellenlänge von $\lambda = 315$ nm analysiert werden konnten. Mit Hilfe der Übereinstimmungen der Retentionszeiten der Histonchromatogramme und des Aminosäurenstandards (q) konnten die Aminosäuren zugeordnet werden. Zur Auswertung der Peaks wurde die Analysesoftware HP ChemStation benutzt. Mit ihrer Hilfe konnten die Peaks des Arginins und des Citrullins integriert werden. Anschließend wurden die Flächen zueinander ins Verhältnis gesetzt, wobei die Fläche unter dem Argininsignal als interner Standard (= 100 %) definiert wurde. Jede Probe wurde auf diese Weise mit Hilfe der Säule zweimal getrennt.

Material und Methoden

2.4.1.1. Deskriptive Statistik

Zur Ermittlung des Verhältnisses von Citrullin zu Arginin wurden mittels der ChemStation-Software die Integrale der beiden Peaks bestimmt und ins Verhältnis gesetzt, woraus das arithmetische Mittel aus den beiden Messungen gebildet und in der weiteren Auswertung verwendet wurde.

Die so gewonnenen Daten wurden zunächst in Excel-Tabellen gesammelt und in Diagramme transferiert. Zur besseren Veranschaulichung wurde in einzelnen Diagrammen eine Trendlinie eingefügt. Diese Trendlinie errechnet sich durch die Methode der kleinsten Quadrate aus der Punktwolke der gesammelten Daten. Die jeweils tabellierten Prozentangaben (s. Ergebnisse) sind proportional zur Steigung der berechneten Trendgeraden der altersabhängigen Deiminierungsgrade.

Material und Methoden

2.4.2. Detektion von Citrullin in Histonen mittels Western-Blot

In einigen, stichprobenartig ausgewählten Histon-Proben wurde Citrullin in den Histonen H1, H2a und H2b untersucht.

Zunächst wurde eine Gelelektrophorese wie in 2.3.3. beschrieben durchgeführt. Zwei SDS-Page-Gele wurden mit denselben Proben in der gleichen Reihenfolge versehen.

Auf dem Gel wurden je ein Molekulargewichtsmarker (SigmaMarker TM, Low Range, M.W. 6,500-66,000 kDa), ein Prestained Marker (Fermentas SpectraTM, Multicolor Low Range, M.W. 1,7-40 kDa), der jeweilige Histon-Einzelstandard (Histonstandard Roche 10 223 565 001, über FPLC getrennt) als Positiv-Kontrolle für den jeweiligen Anti-Histon-Antikörper, und eine Positiv-Kontrolle für den Anti-Citrullin-Antikörper (Sigma, Carboanhydrase aus bovinen Erythrozyten) und 2-3 Histon-Proben mitgeführt. Diese wurden jeweils zweifach auf einem Gel aufgetragen, um später das Signal des Anti-Histon-Antikörpers mit dem Signal des Anti-Citrullin-Antikörpers vergleichen zu können. Dabei wurden die Proben so angeordnet, dass man die Blot-Membran teilen und beide Seiten mit je unterschiedlichen Erstantikörpern weiter behandeln konnte.

Nach der Gelelektrophorese wurde das eine Gel wie in 2.3.3. beschrieben mit Coomassie-Lösung (m) gefärbt. Dieses gefärbte Gel diente nun als Vergleichskontrolle.

Das andere identische Gel wurde vor dem Blotten für 10 Minuten in Transferpuffer (t) äquilibriert. Währenddessen wurde die PVDF-Membran (Bio Rad, Porengröße 0,2 µm, 162-0176) in die richtige Größe gebracht und für 1 Minuten in Methanol (pur) geschwenkt. Danach wurde sie sofort für 2- 5 Minuten in Transferpuffer (t) überführt und geschüttelt. Die in Transferpuffer (t) gewässerten Filter, Schwammtücher, Blotmembran und Gel wurden luftblasenfrei in der Transferkassette geschichtet und fixiert. Als Blot-Kammer wurde das Tankblot-System von BIO-RAD (Model No. Mini-PROTEAN 3 Cell) verwendet. Dieses wurde nun mit 4°C kaltem Transferpuffer (t) aufgefüllt und die Transferkassette in die Kammer eingesetzt.

Material und Methoden

H1 wurde bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA und bei einer Spannung von 200 V drei Stunden geblottet, H2a und H2b wurden bei einer Stromstärke von 250 mA konstant bei 200 V über vier Stunden geblottet. Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte der Blot-Membran wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

Die Membran wurde nach Beendigung des Blottens ohne Anzutrocknen 3x5 Minuten in 1x PBS (a) bei 37°C gewaschen. Das Gel wurde währenddessen zur Erfolgskontrolle des Proteintransfers wie in 2.3.3. beschrieben in Coomassie-Lösung (m) gefärbt und in einer Lösung nach Schägger und Jagow [1897] (n) wieder entfärbt. Außerdem wurde der Molekulargewichtsmarker, der sich nun auf der Blot-Membran befand, abgeschnitten und für die spätere Auswertung des Blots separat 20 Minuten in Amidoschwarz (u) gefärbt. Anschließend wurden die Banden mit Amidoschwarz-Entfärber (v) sichtbar gemacht.

Der Blot wurde nun für eine Stunde in einer Blockier-Lösung (5% BSA, w) bei 37°C geblockt. Anschließend wurde sie mit 1 x PBST (x) 5 x 5 Minuten bei 37°C gewaschen und in frischem PBST (x) bei 4°C ca. zwölf Stunden gelagert.

Am nächsten Morgen wurde der Blot zunächst 20 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C aufgewärmt. Die Membran wurde anschließend geteilt, um den primären Antikörper an das jeweilige Histon bzw. Citrullin binden zu lassen. Im Folgenden wurden die beiden Teile getrennt voneinander behandelt. Dem Citrullin-Blot, der die Carboanhydrase als Positiv-Kontrolle für den Nachweis einer Deiminierung von Arginin-Resten beinhaltete, wurde ein polyklonaler Anti-Citrullin-Antikörper (Millipore, Rabbit, AB 5612) in einem Verhältnis von 1:2727 zu 0,5 %igem BSA (y) zugesetzt. Der Histon-Blot wurde mit dem jeweiligen Histon-Antikörper inkubiert.

H1 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Novus Biologicals, Rabbit, NBP1-19299) in einer Verdünnung von 1:3000 in 0,5 %igem BSA (y), H2a mit einem polyklonalen Antikörper (Millipore, Rabbit, Cat. 07-146) und H2b mit einem polyklonalen Antikörper (Millipore, Rabbit, AB1623) in einer Verdünnung von 1:1500 in 0,5%igem BSA (y) detektiert.

Material und Methoden

Die Antikörper wurden mit der Membran jeweils 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach der Primär-Antikörper-Bindung wurden die beiden Membranhälften erneut 5 x 5 Minuten bei 37°C mit 1x PBST (x) gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein polyklonaler Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Millipore, Goat, AP132P) vorbereitet, der in einem Verhältnis von 1:2000 mit 0,5%igem BSA (w) verwendet wurde. Mit diesem wurden die beiden Membranhälften getrennt voneinander für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgten erneut fünf Waschschrte für jeweils 5 Minuten in 1x PBST (x) bei 37°C.

Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz mit dem Substrat Super Signal® West Pico (Thermo Scientific, 34077). Die beiden Phasen wurden erst unmittelbar vor dem Auftragen auf die Membranen 1:1 gemischt, anschließend auf dem Blot verteilt und danach eine Minute im Dunkeln inkubiert. Die Immunreaktion konnte so mit Hilfe eines Imagers (FujiFilm, LAS-3000) in Abhängigkeit von der Signalstärke mit 5 Sekunden, 10 Sekunden und 15 Sekunden Belichtungszeit fotografiert werden.

Abschließend wurden die Membranen erneut 3 x 5 Minuten in PBST (x) bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Bandenidentifizierung und Erfolgskontrolle des Blot-Vorgangs wurden die Membranen für 20 Minuten mit Amidoschwarz (u) gefärbt und in Amidoschwarz-Entfärbelösung (v) wieder entfärbt und zuletzt an der Luft getrocknet und fotografiert.

Material und Methoden

2.5. Eingesetzte Lösungen

2.5.1 Vorbereitung der Proben

a) Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (10x), pH 7,2- 7,4 (1 l)

Natriumchlorid (NaCl): 80 g (1,37 M), Dinatriumhydrogenphosphat (NaHPO₄): 11,5 g (81 mM), Kaliumchlorid (KCl): 2 g (27 mM), Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄): 2 g (14,7 mM) ad 1000 ml Aqua bidest
Für die Herstellung von 1x PBS im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest verdünnen.

b) 1,5 M Natriumchloridlösung (NaCl) (1 l)

Natriumchlorid (NaCl): 87,4425 g (1,5 M) ad 1000 ml Aqua bidest

2.5.1. Kontrolle des Aufreinigungsergebnisses im Ausstrichpräparat

c) Eosin-Lösung (100 ml)

1 g Eosin G (Merk) in 100 ml Aqua bidest

d) Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung (Kit Sigma-Aldrich, 91C-1KT)

Natriumnitrit Lösung (10 ml)

Fast Red Violet LB Base (10 ml)

Naphthol-AS-D-Chloracetat-Lösung (10 ml)

Trizmal-Puffer ph 6,3 (50 ml)

Hemalaun Lösung (Merk, 1.09249.2500)

Material und Methoden

- e) Citrat-Azeton-Formaldehyd Lösung(CAF) (98 ml)
25 ml Citrat, 65 ml Azeton, 8 ml Formaldehyd (37%)

2.5.2. Fällung der Histone nach Kernlyse

- f) 0,375 M Salzsäure (HCl)(1 l)
13,6725 HCL ad 1000 ml Aqua bidest

- g) Proteaseinhibitor
45 ml 0,9% NaCl, 5 ml Proteaseinhibitor Stocklösung (+ 4°C), PMSF100 µl
(-20°C)

Proteaseinhibitor Stocklösung (100 mM) (50 ml)

Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF, C₇H₇FO₂S): 0,871 g ad 50 ml Ethanol absolut (C₂H₆O)

2.5.3. Trennung der verschiedenen Histon-Subtypen mittels RP-HPLC

- h) Eluent A (1 l)
Trifluoressigsäure (TFA, C₂HF₃O₂): 4 ml ad 1000 ml Wasser HPLC-grade
15 Minuten Ultraschallbad

Material und Methoden

i) Eluent B (1 l)

Acetonitril (C_2H_3N): 840 ml, Wasser HPLC-grade: 160 ml, TFA, $C_2HF_3O_2$: 4 ml
15 Minuten Ultraschallbad

2.5.4. Kontrolle des Isolationsergebnisses mittels Gelelektrophorese

j) Probenpuffer-Ansatz (9,5 ml)

Aqua bidest: 3,55 ml, Tris-HCl ($C_4H_{11}NO_3$): 0,5 M: 1,25 ml (pH 6,8), Glycerol ($C_3H_8O_3$): 2,5 ml, SDS 10%: 2,0 ml, Bromphenolblau ($C_{19}H_9Br_4NaO_5S$) 0,5 %: 0,2 ml

Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 % (100 ml)

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

Probenpuffer (gebrauchsfertig) (1 ml)

Probenpuffer-Ansatz (s.o.): 950 μ l, β -Mercaptoethanol ($C_2H_{11}OS$): 50 μ l

k) Pipetierschema für SDS-Page-Gel

Acrylamid A (100 ml)

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

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

Material und Methoden

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

Sammelgelpuffer (Tris-HCl 0,5 M), pH 6,8 (300 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

Ammoniumperoxidsulfat (APS) 10 % (1 ml)

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

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid A	2,65 ml	425 μ l
Trenngelpuffer	1,25 ml	
Sammelgelpuffer		625 μ l
SDS 10 % (s. h)		25 μ l
Aqua bidest	1,05 l	1,425 ml

Die Polymerisation des SDS-Page-Gels beginnt erst nach der Zugabe der folgenden Substanzen:

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

l) Laufpuffer (10x). pH 8,3 (1 l)

Tris-Base ($C_4H_{11}NO_3$): 30,3 g, Glycin ($C_2H_5NO_2$): 144 g,
Natriumdodecylsulfat (SDS, $C_{12}H_{25}NaO_4S$): 10 g, ad 1000 ml Aqua bidest
mit pH-Streifen kontrollieren, nicht mit Säure oder Lauge einstellen
Für die Herstellung von 1x Laufpuffer im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest
verdünnen.

Material und Methoden

m) 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

Die Lösung muss vor Verwendung filtriert werden.

n) Entfärber nach Schägger und Jagow (1987) (2,64 l)

Isopropanol (C_3H_8O): 500 ml, Essigsäure ($C_2H_4O_2$): 140 ml, ad 2000 ml Aqua bidest

2.5.5. Bestimmung des Verhältnisses von Citrullin zu Arginin mittels HPLC

o) 6N Salzsäure (HCL) (1 l)

Wasser HPLC-grade: 500 ml, konzentrierte Salzsäure (12 N): 500 ml

p) Probenpuffer (200 ml)

0,1 M Salzsäure (HCl): 100 ml, Natriumazid (NaN_3): 9,75 mg, ad 1000 ml Aqua bidest

q) Aminosäurenstandard (0,0234 nM) (50 ml)

Alanin 0,00445 g, Arginin 0,00871 g, Asparaginsäure 0,00666 g, Citrullin 0,00876 g, Glutaminsäure 0,00736 g, Glycin 0,00375 g, Isoleucin 0,00656 g, Leucin 0,00656 g, Methionin 0,00746 g, Phenylalanin 0,00821 g, Serin 0,00526 g, Threonin 0,00596 g, Tyrosin 0,00906 g, Valin 0,00596 g ad 50 ml Probenpuffer (s. p)

Material und Methoden

r) 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, Ethylen-Diamintetraessigsäure (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- 6,01 einstellen

s) Eluent B für Razemisierung nach Kaufmann & Manley (1998) (1,08 l)

Methanol (CH_4O): 1000 ml, Acetonitril (C_2H_3N): 83,4 ml

Da diese Substanzen beim Mischen eine Volumenkontraktion durchführen, ist es wichtig, dass man beide getrennt voneinander abmisst und erst dann mischt.

2.5.6. Detektion von Citrullin in Histonen mittels Western-Blot

t) 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. (j)), Methanol (CH_4O): 400 ml (20 %), ad 2000 ml Aqua bidest
Nur mit pH-Streifen kontrollieren, nicht mit Säure oder Lauge einstellen

u) Amidoschwarz-Färbelösung (200 ml)

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

Material und Methoden

v) Amidoschwarz-Entfärber (1 l)

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

w) Blockier-Lösung, 5 % BSA (25 ml)

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

x) Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween (PBST) (1 l)

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

y) BSA für die Antikörperreaktion (25 ml)

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

Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1. Kontrolle der Qualität der Isolation von Granulozyten im Ausstrichpräparat

Bei der Auswertung der Vollblutausstriche zeigten sich in den Präparaten physiologische Zellzusammensetzungen. Die etablierte Aufreinigung der Granulozyten aus den Vollblutproben führte zu einer gut reproduzierbaren Ausbeute an Granulozyten. Bei den lichtmikroskopischen Kontrollen waren nach dem Isolationsprozess die Granulozyten mittels Standardfärbung eindeutig erkennbar (Abb. 3), der Reinheitsgrad in den Ausstrichen lag bei etwa 95%. Nur vereinzelt wurden andere Leukozyten, wie Lymphozyten, Monozyten und Zellen, die nicht mehr eindeutig einer Zelllinie zugeordnet werden konnten, gefunden. Die hier vorgenommene Standardfärbung lässt eine aussagekräftige morphologische Beurteilung der Zellen zu, färbt aber die unterschiedlichen Granulozytentypen nicht spezifisch an. Stichprobenweise wurden zu Kontrollzwecken Ausstriche mit der für Granulozyten speziellen Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase gefärbt, die, wie bereits oben ausgeführt, die große Überzahl an Granulozyten in den aufgereinigten Proben zusätzlich bestätigte. Auf Grund der Kenntnis der Zusammensetzung des Blutes und der kennzeichnenden morphologischen Besonderheiten der Granulozyten und der anderen kernhaltigen Blutzellen konnte auf diese aufwändige Kontrolle im weiteren Verlauf verzichtet werden. Wie bereits oben erwähnt, wurden nur sehr vereinzelt auch andere kernhaltige Zellen wie Lymphozyten in den Ausstrichen gefunden (etwa 5%). Da diese Zellen auch Histone besitzen, ist durch die geringe Anzahl dieser Zellen jedenfalls theoretisch eine wenn auch sehr geringe Beeinflussung in den weiteren Messungen und Untersuchungen nicht auszuschließen.

Im Blick auf diese nachweislich relativ geringe Verunreinigung mit anderen kernhaltigen Zellen wurde die angewandte Aufreinigungsmethode unter der vorliegenden Fragestellung als ausreichend zuverlässig beurteilt und in Folge eingesetzt.

Ergebnisse

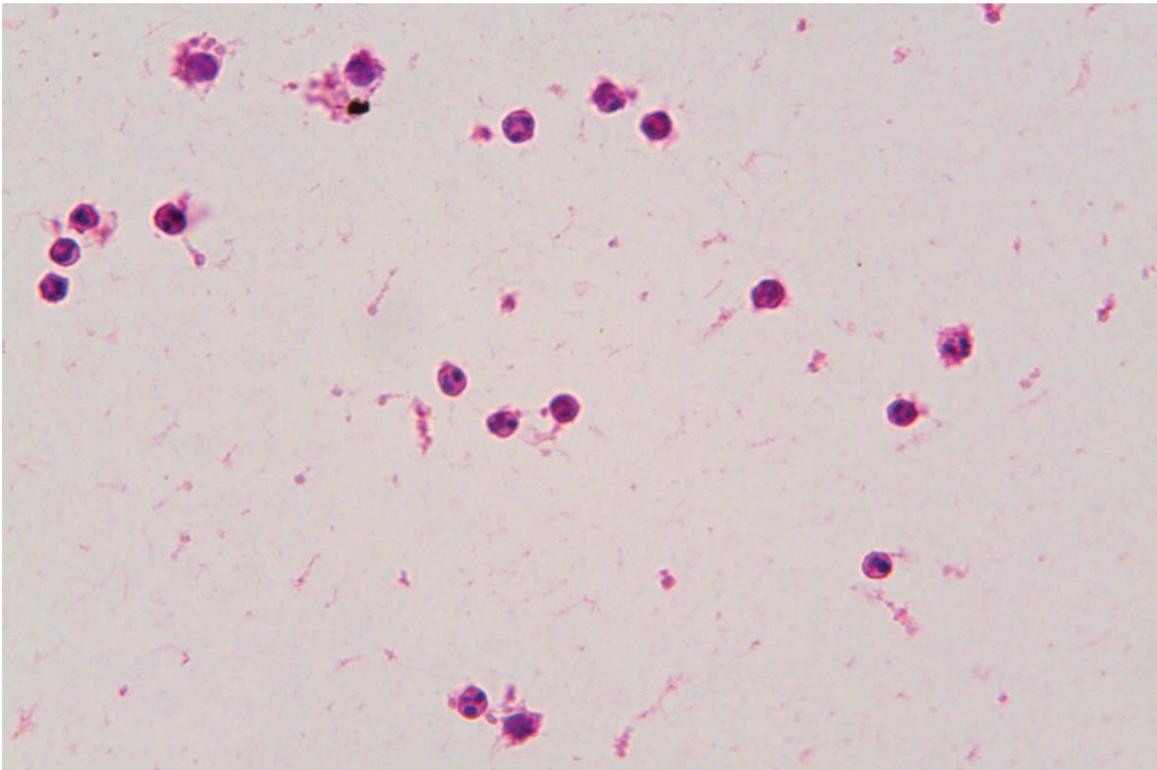


Abb. 3 Ausstrich einer Granulozytenfraktion nach Aufreinigung und vor der Lyse der Erthrozyten (HE, 40x): Kein Hinweis auf Kontamination mit anderen Leukozyten

Eine weiterbestehende Kontamination des Aufreinigungsergebnisses mit Erythrozyten, wie in der Abbildung 3 zu sehen, konnte vernachlässigt werden, da diese durch die anschließenden Erythrozytolyse-schritte vollständig herausgewaschen wurden. Dies zeigte sich zum einen darin, dass sich das Granulozytenisolat von rötlich bis rosa nach der Behandlung als makroskopisch weiß darstellte. Zum anderen wurde durch den anschließenden, erneuten lichtmikroskopischen Ausstrich das Fehlen der Erythrozyten bestätigt. Auch in der späteren Gelelektrophorese der einzelnen Histone zeigte sich nur in Ausnahmefällen eine Hämoglobinbande, diese Proben wurden in den weiteren Analyseschritten jedoch nicht weiter berücksichtigt, d.h. verworfen. Außerdem enthalten reife Erythrozyten keinen Kern und dementsprechend wenig bis keine Histone mehr.

Auch Thrombozyten konnten vereinzelt gefunden werden. Da diese jedoch keine Kerne besitzen und dementsprechend Histone keine wesentlichen Bestandteile sind (Marcus et al. 2002), wurden diese als nicht relevant angesehen und im Folgenden vernachlässigt.

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Ergebnisse

3.2. Trennung der verschiedenen Histonfraktionen mittels RP-HPLC

In der Abbildung 4 ist ein typisches RP-HPLC-Elutionsprofil einer isolierten Histonfraktion aus Granulozyten eines Probanden im Vergleich mit dem RP-HPLC-Elutionsprofil eines bovinen Histonstandards dargestellt.

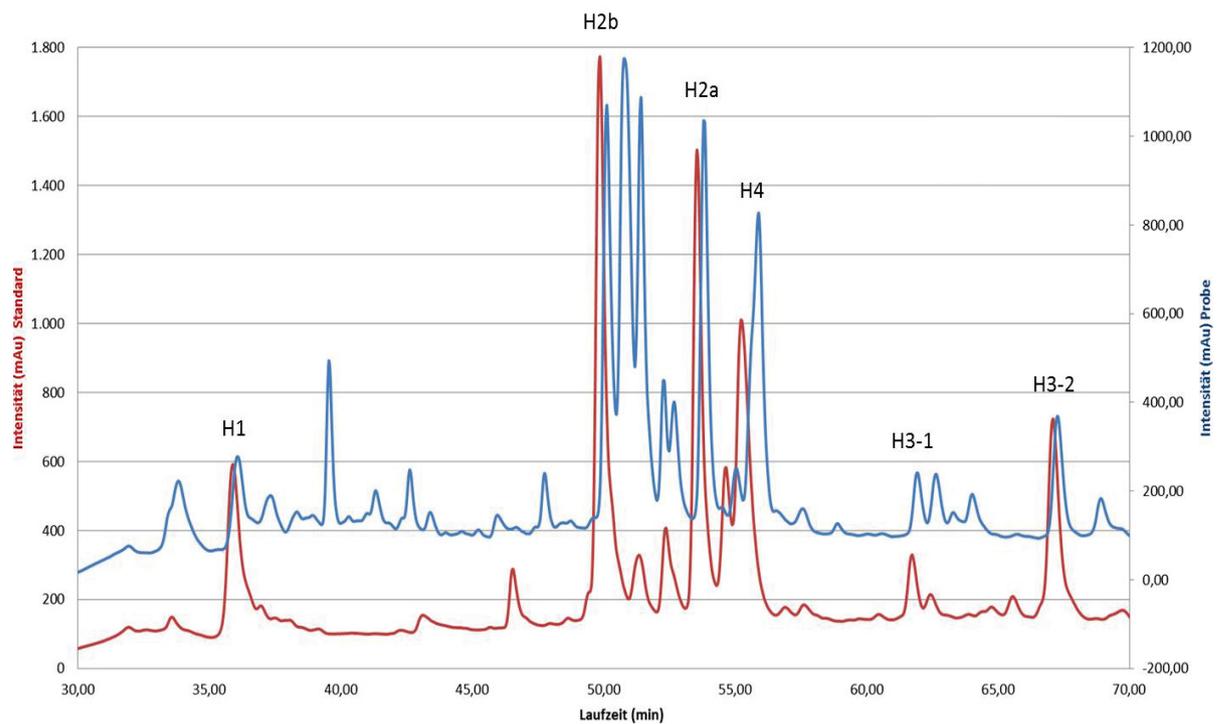


Abb. 4 Typisches RP-HPLC-Elutionsprofil einer granulozytären Histonfraktion (blau) im Vergleich zu einem Elutionsprofil eines bovinen Histonstandards (rot).

Das Elutionsprofil der RP-HPLC zeigte eine sehr hohe Konstanz. Kleine zeitliche Verschiebungen ergaben sich wahrscheinlich durch leichte Verunreinigung der Säule, weswegen in regelmäßigen Abständen ein Leerlauf zur Reinigung erfolgte. Lediglich die Ausbeute der Histone variierte, was sich in der Höhe der Signale bemerkbar machte.

Die jeweiligen Peaks des Elutionsprofils wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese den einzelnen Histontypen zugeordnet (s. Abb. 5).

Ergebnisse

Zeigten sich Verunreinigungen durch Fremdprotein in der Gelelektrophorese, fanden die betroffenen Proben keine Berücksichtigung in der weiteren Analytik. Auch eine zu geringe Ausbeute konnte zum Ausschluss der Proben für die weitere Bearbeitung führen. Dies geschah insbesondere dann, wenn in der Gelelektrophorese die Banden zu schwach waren, um eine ausreichend sichere Beurteilung zu ermöglichen.

Ergebnisse

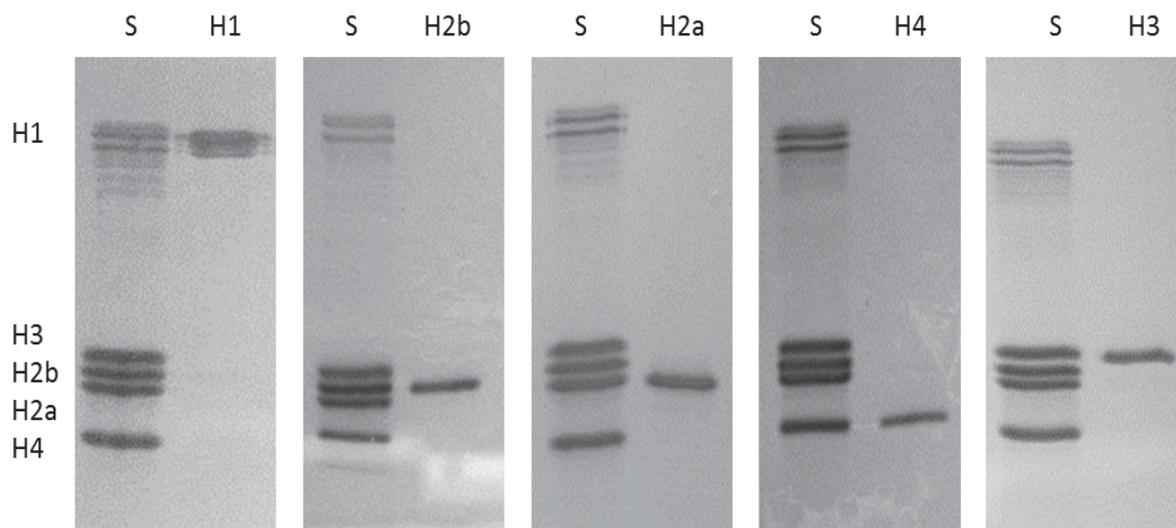
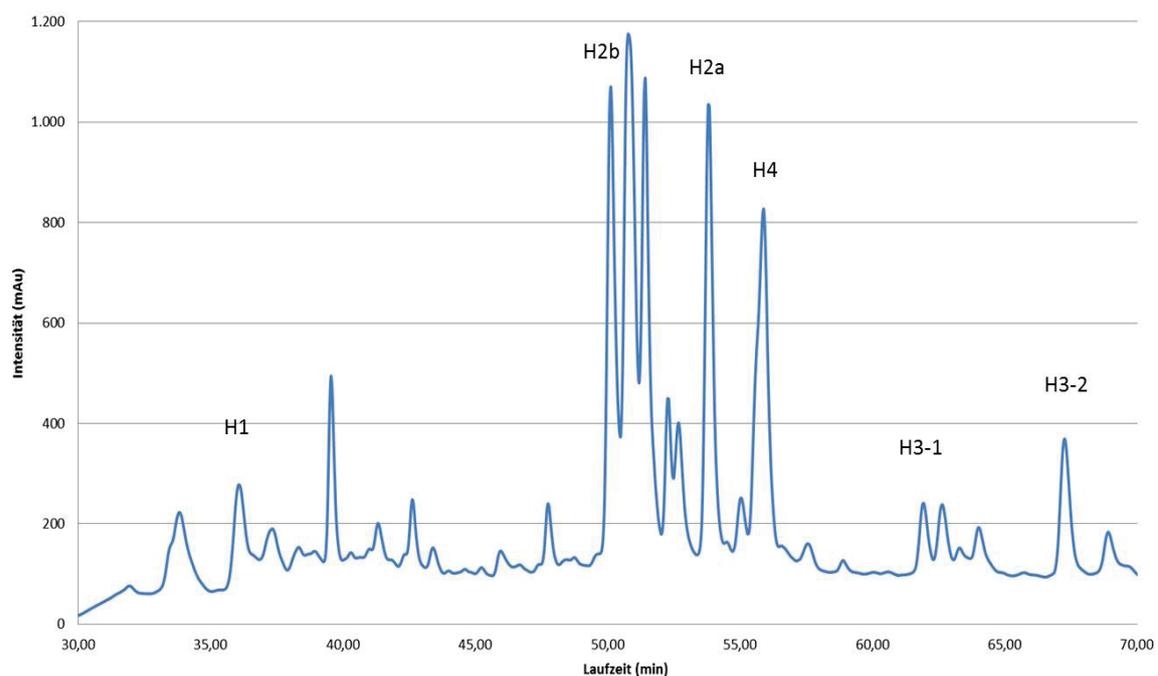


Abb.5 Zuordnung eines typischen Elutionsprofils (obere Abbildung) einer aus Granulozyten isolierten Histonfraktion zum gelelektrophoretischen Befund der eluierten RP-HPLC-Fractionen (untere Abbildung), S= Standard

Histon H3 eluierte auf der RP-HPLC zu zwei unterschiedlichen Zeiten von der Säule mit einem ersten Peak bei ca. 62 min und einem zweiten Peak bei ca. 69 min Laufzeit. Diese Fraktionen wurden im Folgenden getrennt analysiert und mit der Bezeichnung H3-1 und

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Ergebnisse

H3-2 unterschieden. In der Gelelektrophorese zeigten die beiden Histonfraktionen ein gleiches Laufverhalten und boten damit ein gleiches Bild, sodass in Abbildung 5 (unten) beispielhaft nur eine H3 Bande abgebildet ist.

Insgesamt wurden von 56 Probanden (RA-Patienten und gesunde Probanden) alle Histongruppen aus Granulozyten isoliert. Diese Histongruppen wurden anschließend in der Gelelektrophorese auf Verunreinigung durch andere Proteine mit folgendem Ergebnis überprüft:

Bei 96,4% der untersuchten H1-Proben wurde keine Verunreinigung gefunden. H2a-Proben konnten in 43,6% ohne Verunreinigung isoliert werden, H2b-Proben in 78,2%, H3-1-Proben in 94,5%, H3-2-Proben in 69,17% und H4-Proben in 80,0%.

Nur Proben ohne detektierbare Verunreinigungen wurden weiter analysiert.

Ergebnisse

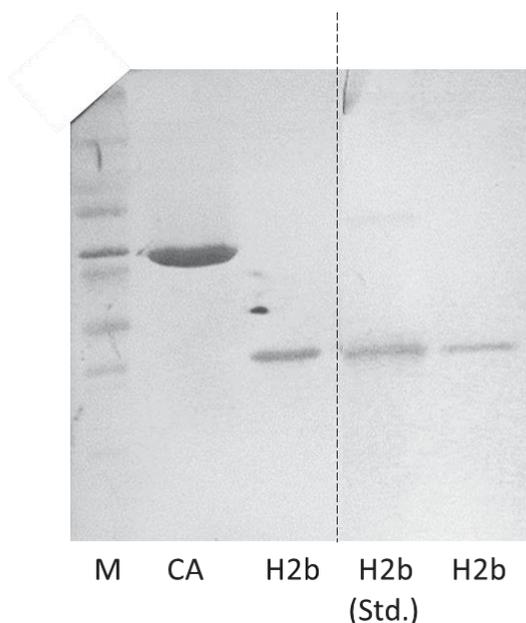
3.3. Analytik: Nachweis von Citrullin in Histonen

3.3.1. Qualitative Detektion von Citrullin in Histonen mittels Western-Blot

Exemplarisch wurde mittels Western-Blot nachgewiesen, dass die Histone H1, H2a und H2b in den isolierten Proben vorlagen und Citrullin in allen Histonbanden nachweisbar war. Die folgenden Abbildungen 6-8 zeigen beispielhaft für das jeweilige Histon einen solchen Nachweis.

3.3.1.1. Histon H2b

a)



b)

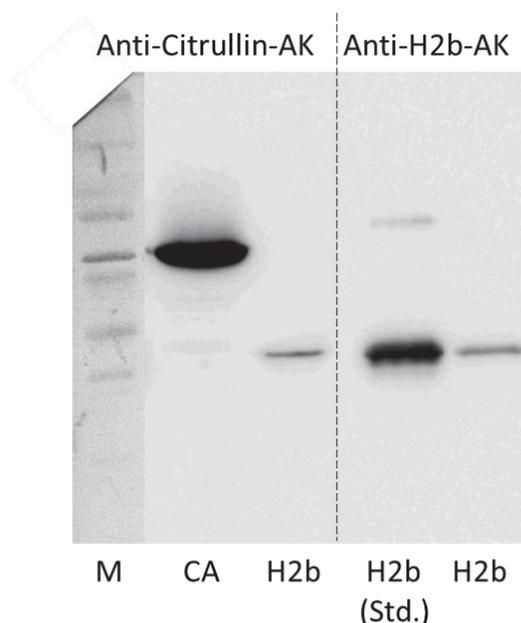
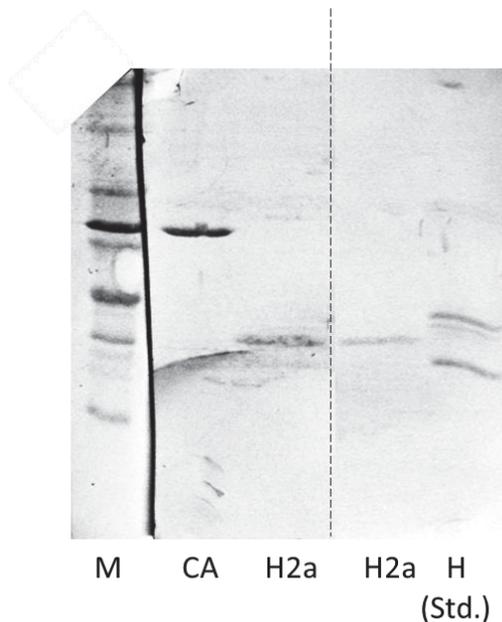


Abb. 6 a und b: Qualitativer Nachweis deiminierter Histone H2b mittels Western-Blot; a: Blot nach Proteinfärbung mit Amidoschwarz – es ergibt sich kein Anhalt für Fremdprotein; b: Blot nach Immunreaktion (Anti-Citrullin-Antikörper und Anti-H2b-Antikörper) – die für Anti-H2b positive Bande wird auch durch den Anti-Citrullin-Antikörper detektiert. H2b: Histonprobe einer gesunden, 52 j. Probandin, CA = Carboanhydrase (Positiv-Kontrolle des Anti-Citrullin-Antikörpers), H2b (Std.) = Histon 2b-Einzelstandard (Positiv-Kontrolle des Anti-H2b-Antikörpers)

Ergebnisse

3.3.1.2. Histon H2a

a)



b)

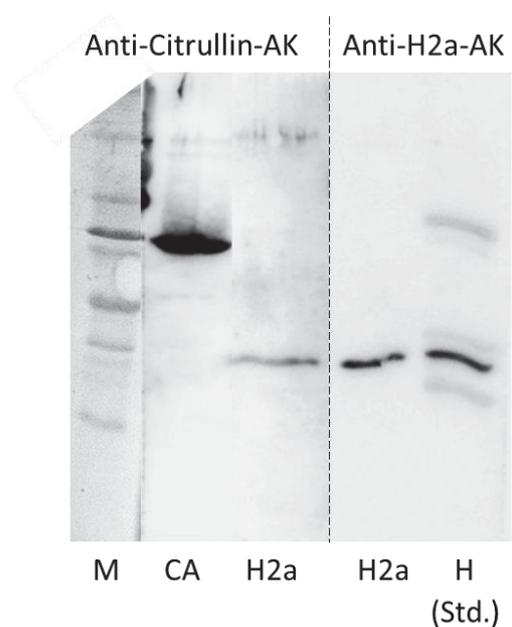
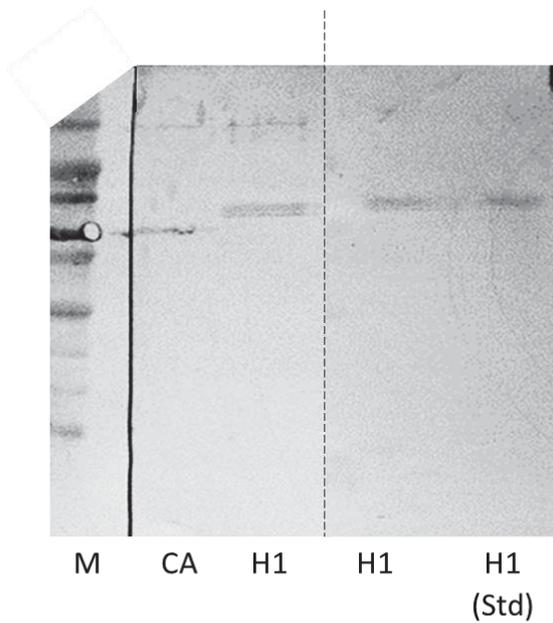


Abb. 7 a und b: Qualitativer Nachweis deiminierter Histone H2a mittels Western-Blot; a: Blot nach Proteinfärbung mit Amidoschwarz – es ergibt sich trotz Artefakte durch einen Knick in der Membran kein Anhalt für Fremdprotein; b: Blot nach Immunreaktion (Anti-Citrullin-Antikörper und Anti-H2a-Antikörper) – die für Anti-H2a positive Bande wird auch durch den Anti-Citrullin-Antikörper detektiert. H2a: Histonprobe einer gesunden, 23 j. Probandin, CA = Carboanhydrase (Positiv-Kontrolle des Anti-Citrullin-Antikörpers), H2a (Std.) = Histon 2a-Einzelstandard (Positiv-Kontrolle des Anti-H2b-Antikörpers)

Ergebnisse

3.3.1.3. Histon H1

a)



b)

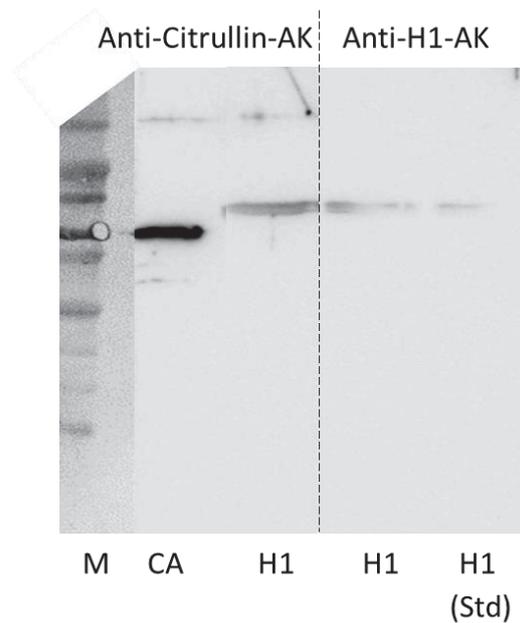


Abb. 8 a und b: Qualitativer Nachweis deiminierten Histons H1 mittels Western-Blot; a: Blot nach Proteinfärbung mit Amidoschwarz – es ergibt sich kein Anhalt für Fremdprotein; b: Blot nach Immunreaktion (Anti-Citrullin-Antikörper und Anti-H1-Antikörper) – die für Anti-H1 positive Bande wird auch durch den Anti-Citrullin-Antikörper detektiert. H1 Histonprobe eines gesunden 20 j. Probanden CA = Carboanhydrase (Positiv-Kontrolle des Anti-Citrullin-Antikörpers)

Ergebnisse

3.3.2. Bestimmung des Verhältnisses der Citrullin- zur Argininkonzentration (Deiminierungsrate) in Histonen mittels HPLC

Mit Hilfe der HPLC konnten die einzelnen Aminosäuren der Histone H1, H2a, H2b, H3-1, H3-2 und H4 detektiert werden. In allen Histonen konnte Citrullin als Folge einer posttranslationalen enzymatischen Deiminierung von Argininresten gefunden werden.

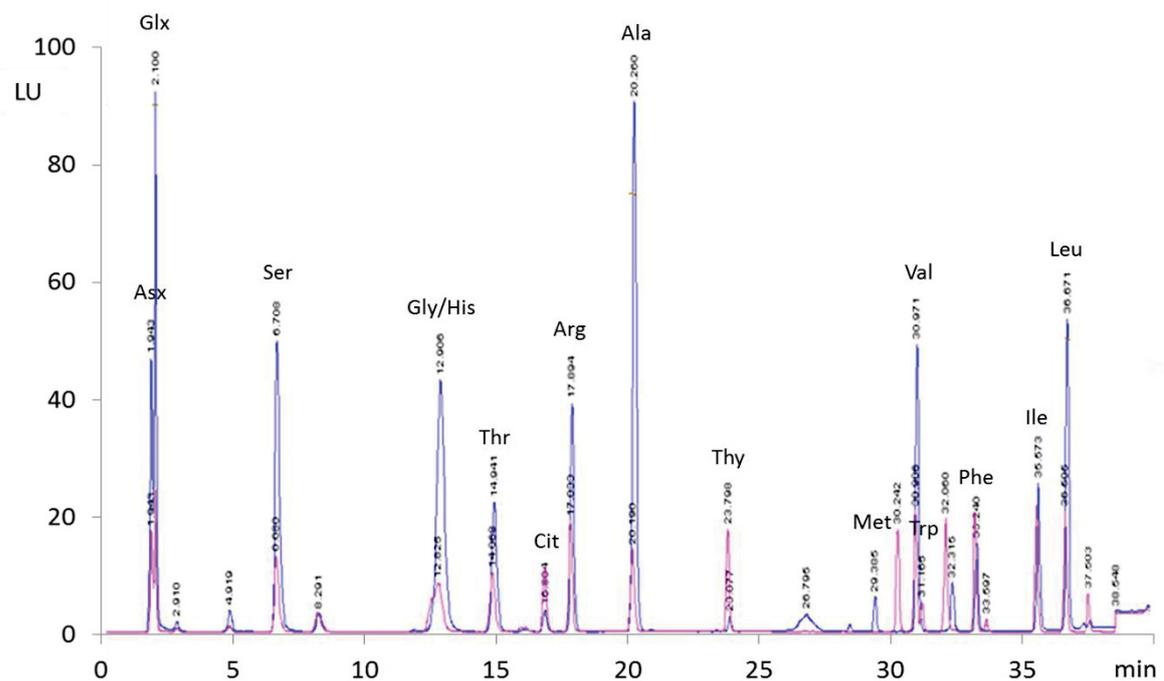


Abb. 9 HPLC-Chromatogramm eines Aminosäurenstandards (q, rot) und einer Histonprobe H1 (blau), der Citrullin und Arginin enthaltende Abschnitt wird in der folgenden Abb. 10 vergrößert dargestellt

Abbildung 9 zeigt beispielhaft ein charakteristisches Aminosäurespektrum eines Histons H1 bei einer 57-jährigen Patientin mit rheumatoider Arthritis im direkten Vergleich mit einem Aminosäurenstandard.

Ergebnisse

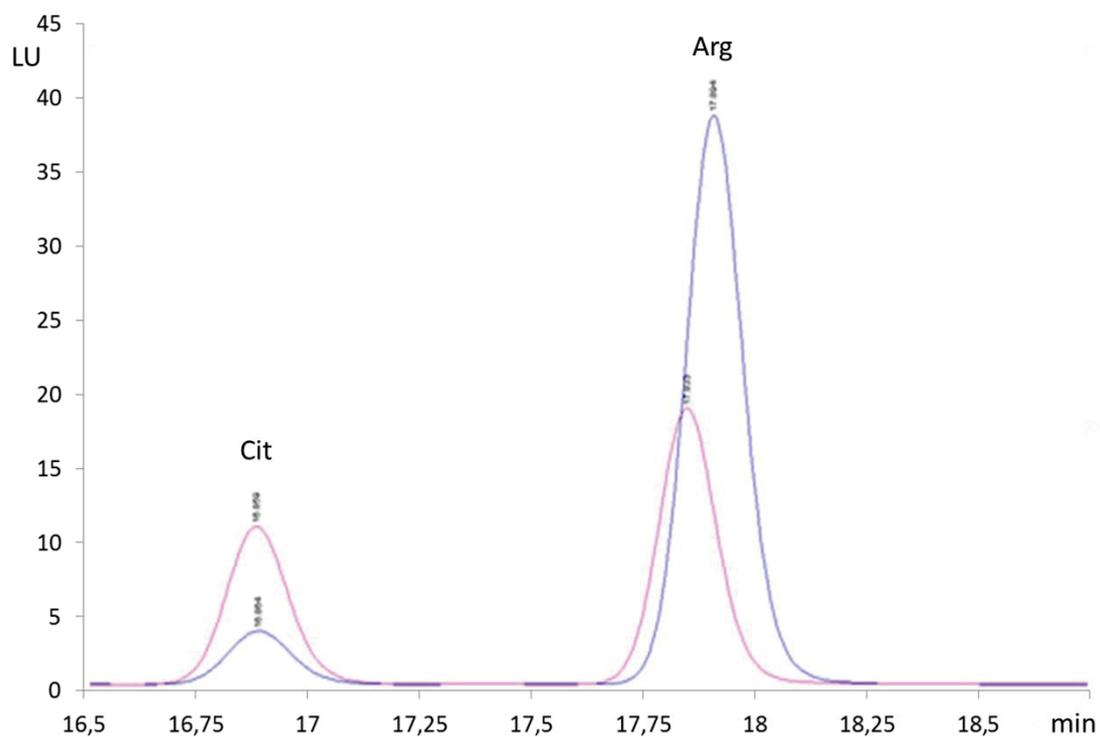


Abb. 10 Vergrößerung des Citrullin und Arginin enthaltenen Abschnitts des HPLC-Chromatogramms aus Abb. 9 (rot: Aminosäurenstandard, blau: Histonprobe H1)

In der obigen Abbildung 10 ist der aus Abb. 9 vergrößerte Ausschnitt mit den Peaks von Citrullin und Arginin dargestellt. In der Probe der Patientin waren somit 10,35 % (Deiminierungsgrad) der Argininreste zu Citrullin deiminiert.

Ergebnisse

3.3.3. Deiminierungsgrad in granulozytären Histonen von RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden

Die folgenden Abbildungen 11-16 für die Histone H1, H2a, H2b, H3-1, H3-2 und H4 wurden anhand der aus den Elutionsprofilen ermittelten Citrullin- und Argininkonzentrationsverhältnisse (Deiminierungsgrad) erstellt. Dargestellt sind die bei an RA erkrankten Patienten und gesunden Probanden ermittelten Deiminierungsgrade (= prozentuales Verhältnis der Citrullin- zur Argininkonzentration granulozytärer Histone) in den verschiedenen Histongruppen in Abhängigkeit vom Lebensalter.

In den folgenden Tabellen 2-7 sind deskriptiv statistische Daten (Schwankungsbereich, Mittelwert, Standardabweichung und Trend) aus den altersabhängig gemessenen Deiminierungsgraden angegeben.

Ergebnisse

3.3.3.1. Histon H1

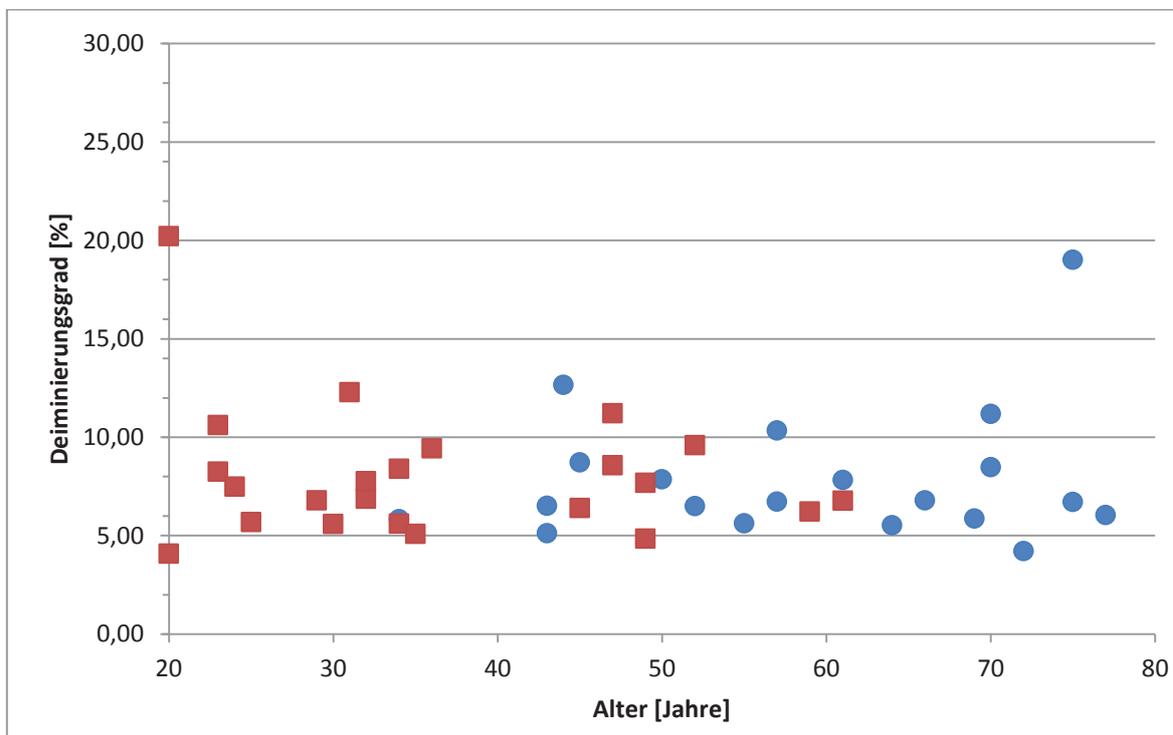


Abb. 11 Deiminierungsgrad als Quotient Citrullin-/Argininkonzentration (%) in granulozytären Histonen des Typs H1 in Abhängigkeit vom Alter: an RA erkrankte Patienten (blau), gesunde Probanden (rot)

Tab. 2 Deskriptiv statistische Daten aus den in Abb. 11 dargestellten Deiminierungsgraden in granulozytären Histonen des Typs H1 (RA = an RA erkrankte Patienten; Gesund = gesunde Probanden)

	Schwankungsbreite	Mittelwert	Standardabweichung	N
RA	4,217 %; 19,022 %	7,885 %	3,371 %	20
Gesund	4,085 %; 20,217 %	8,305 %	3,275 %	26
Differenz		- 0,42 %		

$p = 0,4646$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test)

Ergebnisse

3.3.3.2. Histon 2a

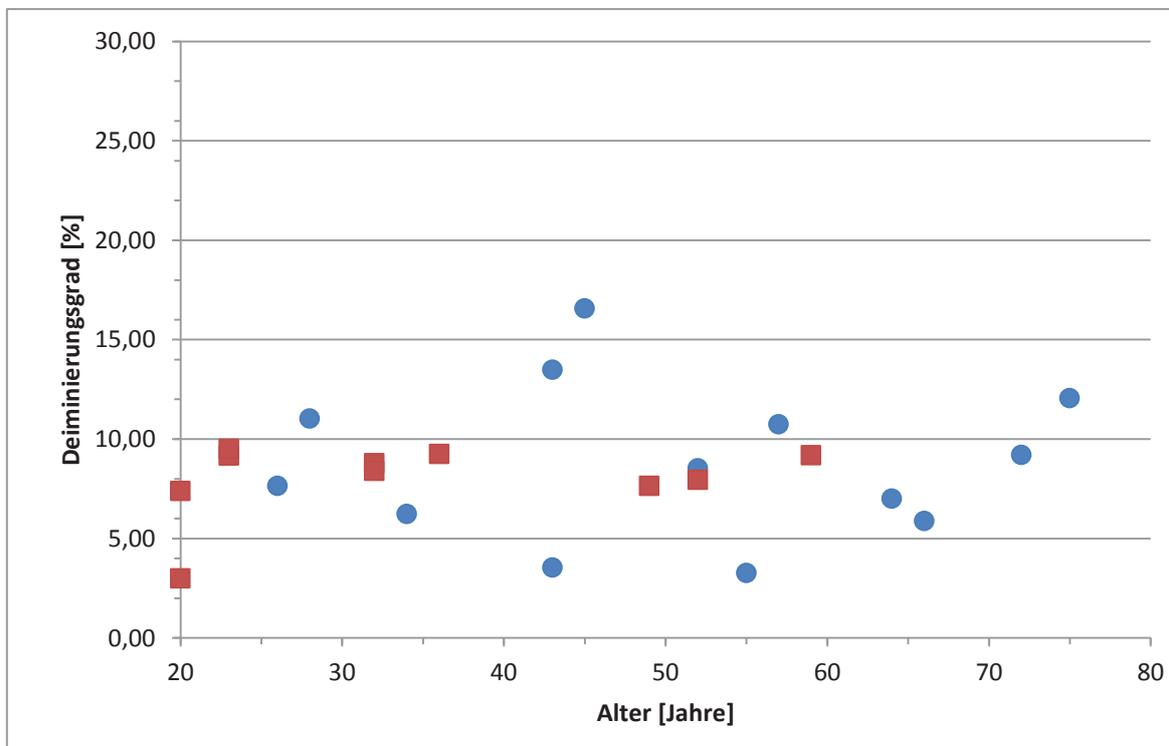


Abb. 12 Deiminierungsgrad als Quotient Citrullin-/Argininkonzentration (%) in granulozytären Histonen des Typs H 2a in Abhängigkeit vom Alter: an RA erkrankte Patienten (rot), gesunde Probanden (blau)

Tab. 3 Deskriptiv statistische Daten aus den in Abb. 12 dargestellten Deiminierungsgraden in granulozytären Histonen des Typs H2a (RA = an RA erkrankte Patienten; Gesund = gesunde Probanden)

	Schwankungsbreite	Mittelwert	Standardabweichung	N
RA	3,274 %; 16,570 %	8,867 %	3,873 %	13
Gesund	3,005 %; 11,628 %	8,500 %	1,973 %	13
Differenz		- 0,367 %		

$p = 0,9795$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test)

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Ergebnisse

3.3.3.3. Histon H2b

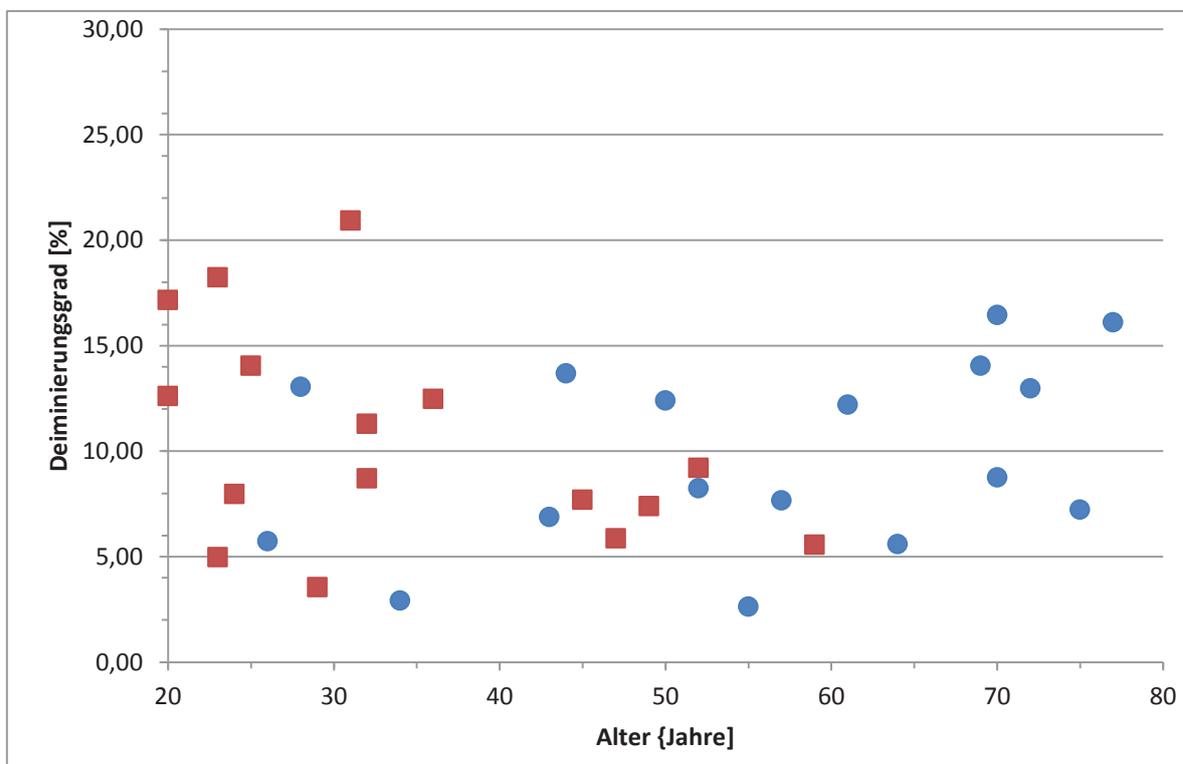


Abb. 13 Deiminierungsgrad als Quotient Citrullin-/Argininkonzentration (%) in granulozytären Histonen des Typs H2b in Abhängigkeit vom Alter: an RA erkrankte Patienten (blau), gesunde Probanden (rot)

Tab. 4 Deskriptiv statistische Daten aus den in Abb. 13 dargestellten Deiminierungsgraden in granulozytären Histonen des Typs H2b (RA = an RA erkrankte Patienten; Gesund = gesunde Probanden)

	Schwankungsbreite	Mittelwert	Standardabweichung	N
RA	2,639 %; 16,458 %	9,800 %	4,377 %	17
Gesund	3,558 %; 20,932 %	11,173 %	5,234 %	18
Differenz		- 1,373 %		

$p = 0,4051$ (t-Test)

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Ergebnisse

3.3.3.4. Histon H3-1

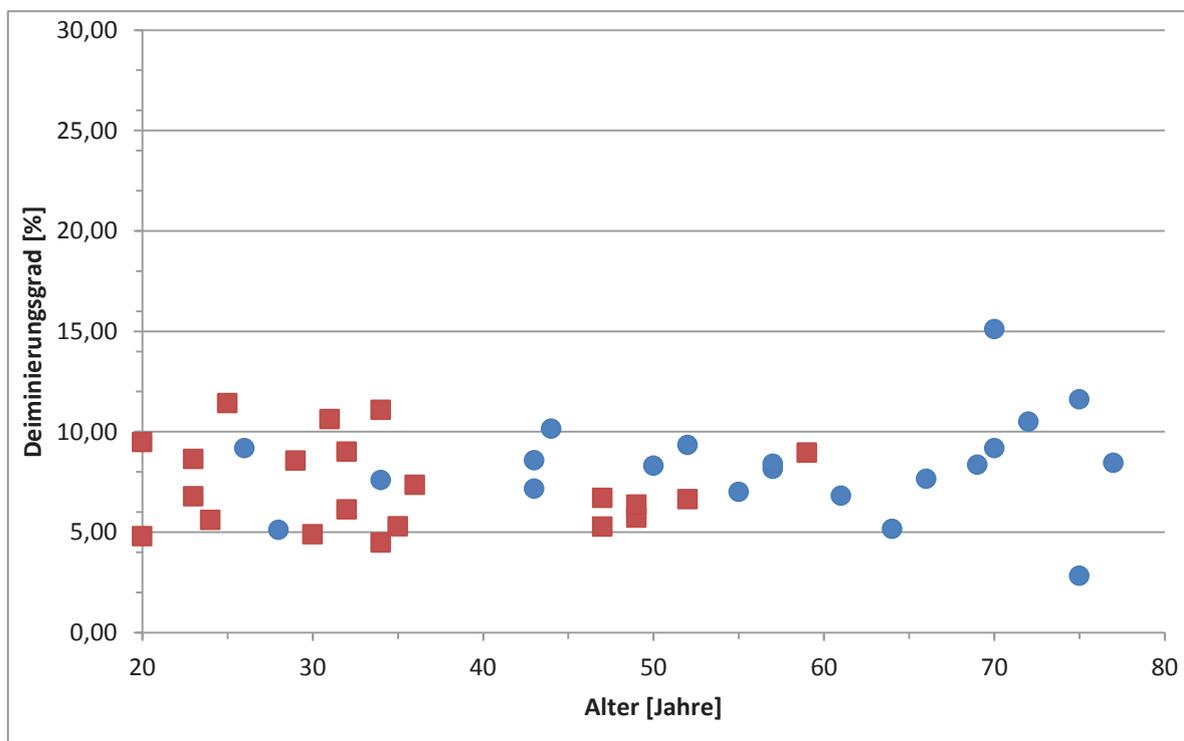


Abb. 14 Deiminierungsgrad als Quotient Citrullin-/Argininkonzentration (%) in granulozytären Histonen des Typs H3-1 in Abhängigkeit vom Alter: an RA erkrankte Patienten (blau), gesunde Probanden (rot)

Tab. 5 Deskriptiv statistische Daten aus den in Abb. 14 dargestellten Deiminierungsgraden in granulozytären Histonen des Typs H3-1 (RA = an RA erkrankte Patienten; Gesund = gesunde Probanden)

	Schwankungsbreite	Mittelwert	Standardabweichung	N
RA	2,826 %; 15,113 %	8,323 %	2,494 %	21
Gesund	4,489 %; 11,431 %	7,109 %	2,117 %	24
Differenz		1,214 %		

$p = 0,0621$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test)

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Ergebnisse

3.3.3.5. Histon H3-2

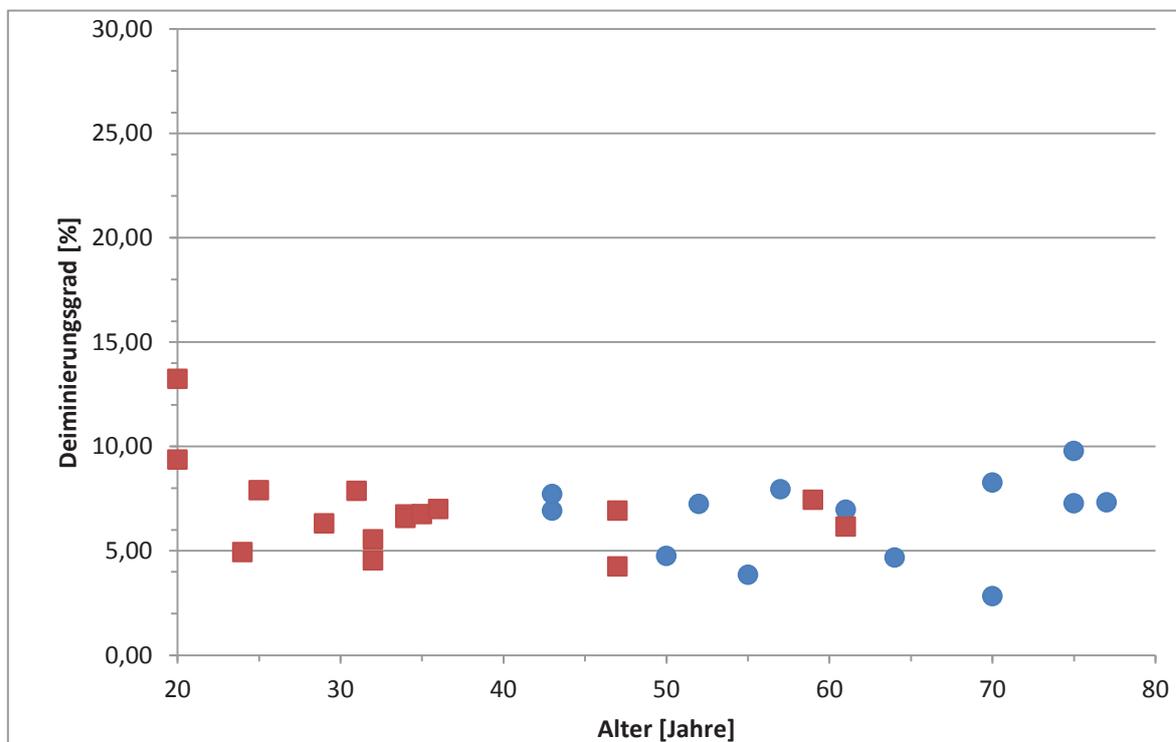


Abb. 15 Deiminierungsgrad als Quotient Citrullin-/Argininkonzentration (%) in granulozytären Histonen des Typs H3-2 in Abhängigkeit vom Alter: an RA erkrankte Patienten (rot), gesunde Probanden (blau)

Tab. 6 Deskriptiv statistische Daten aus den in Abb. 15 dargestellten Deiminierungsgraden in granulozytären Histonen des Typs H3-2 (RA = an RA erkrankte Patienten; Gesund = gesunde Probanden)

	Schwankungsbreite	Mittelwert	Standardabweichung	N
RA	2,835 %; 9,784 %	6,583 %	1,968 %	13
Gesund	4,255 %; 13,245 %	6,990 %	2,059 %	17
Differenz		- 0,407 %		

$p = 0,7220$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test)

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Ergebnisse

3.3.3.6. Histon H4

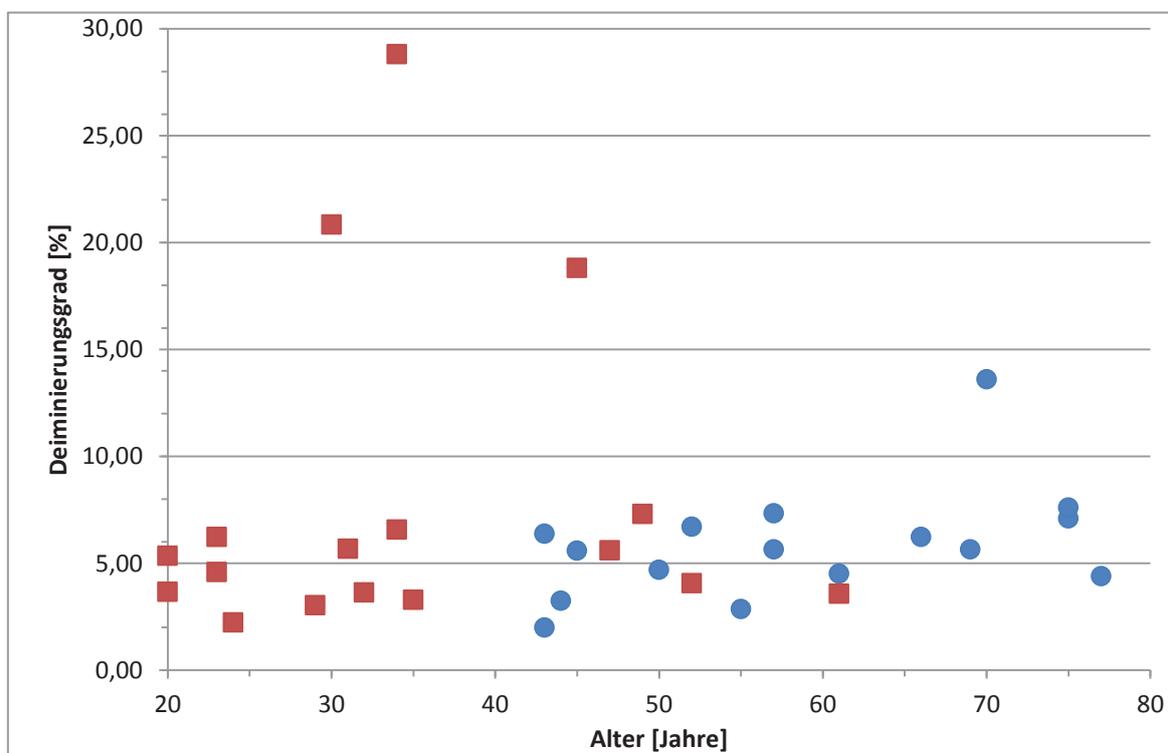


Abb. 16 Deiminierungsgrad als Quotient Citrullin-/Argininkonzentration (%) in granulozytären Histonen des Typs H4 in Abhängigkeit vom Alter: an RA erkrankte Patienten (blau), gesunde Probanden (rot)

Tab. 7 Deskriptiv statistische Daten aus den in Abb. 16 dargestellten Deiminierungsgraden in granulozytären Histonen des Typs H4 (RA = an RA erkrankte Patienten; Gesund = gesunde Probanden)

	Schwankungsbreite	Mittelwert	Standardabweichung	N
RA	2,001 %; 13,612 %	5,898 %	2,488 %	18
Gesund	2,234 %; 28,807 %	7,508 %	7,153 %	19
Differenz		- 1,61 %		

$p = 0,4846$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test)

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Ergebnisse

Insgesamt zeigen die in den Abbildungen 11-16 dargestellten, gegen das Lebensalter aufgetragene Deiminierungsgrade folgende Auffälligkeiten und Tendenzen (s. auch Tab. 2-7):

Bei Betrachtung fällt auf, dass die Schwankungsbereiche beider Gruppen insbesondere im gleichen Altersbereich nahezu gleich sind. Prinzipiell kann man auch erkennen, dass die Ergebnisse bei den an RA erkrankten Patienten eher zu einer mit steigendem Alter zunehmendem Deiminierungsgrad (s. Trend in Tab. 2-7) und bei den gesunden Probanden abhängig von der Histongruppe zu abnehmenden Deiminierungsgraden tendieren.

Insbesondere in den Abbildungen 11 (H1), 13 (H2b) und 16 (H4) fällt auf, dass der Deiminierungsgrad der Histone in der Gruppe der gesunden Probanden mit zunehmenden Alter weniger streut, wohingegen die Werte der RA-Patienten mit zunehmendem Alter eine höhere Streubreite aufweisen.

Insgesamt lässt sich allerdings bei keiner der untersuchten Histongruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den von RA-Patienten und den gesunden Probanden ermittelten Daten erkennen.

Ergebnisse

3.3.4. Deiminierungsgrad granulozytärer Histone an RA erkrankter Patienten in Abhängigkeit von laborchemischen Parametern und klinischem Verlauf

Mit zunehmendem, zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmtem Anti-CCP-Titer zeigt sich in den folgenden Abbildungen 17-22 bei allen Histonen H1, H2a, H2b, H3-1, H3-2 und H4 bei an RA erkrankter Patienten ein mehr oder weniger schwach ausgeprägter, hier als linear angenommener Anstieg des Deiminierungsgrades (nicht signifikant). Bei den Histonen H2a und H2b (s. Abb. 18 und 19) zeigt sich dies von allen Histongruppen am deutlichsten.

Auffällig ist dass sich durch die Verteilung der Titer zwei Kluster zu bilden scheinen. Das erschwert die statistische Auswertung. Die Kluster werden jedoch als durch die relativ geringe Fallzahl verursacht gewertet.

Ergebnisse

3.3.4.1. Histon H1

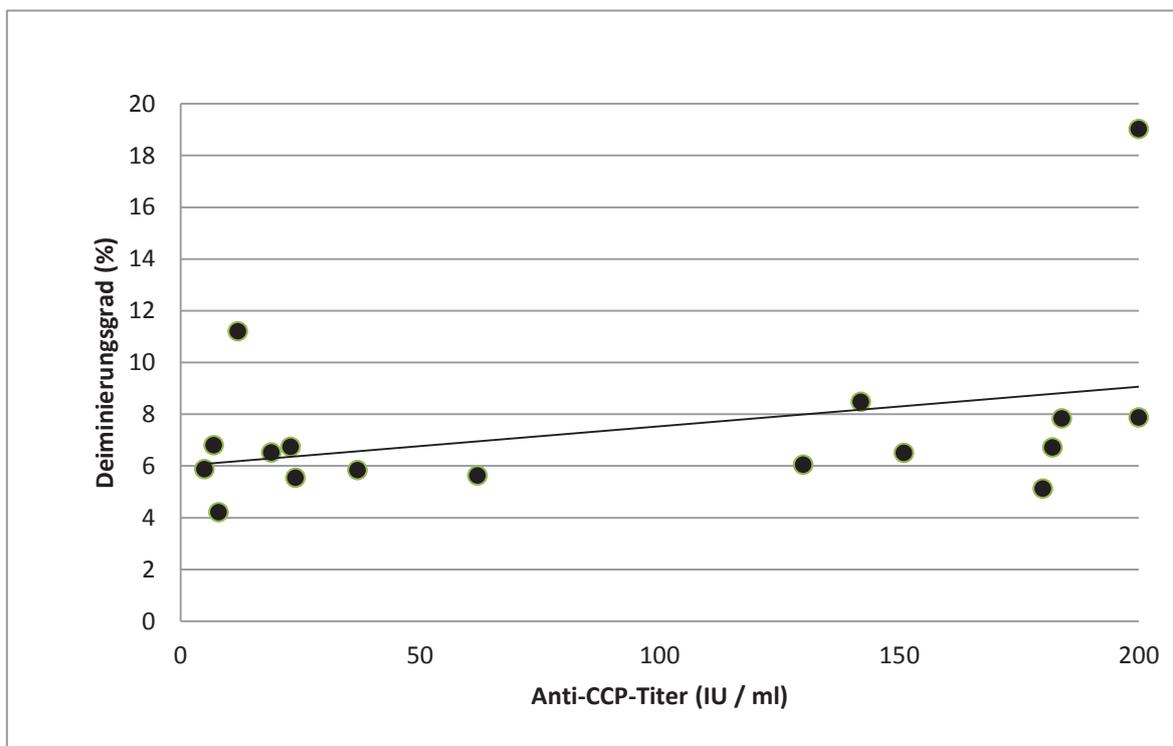


Abb. 17 Deiminierungsgrad (%) in Abhängigkeit vom zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmten Anti-CCP-Titer mit Trendgerade

Ergebnisse

3.3.4.2. Histon 2a

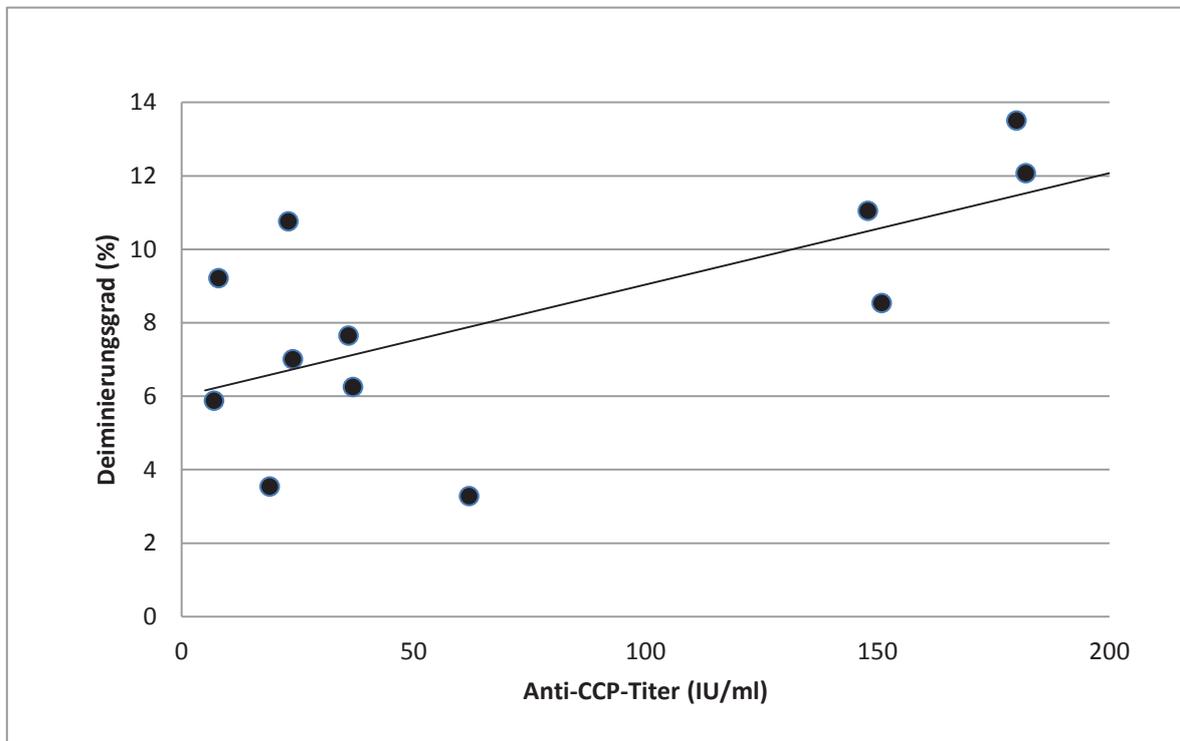


Abb. 18 Deiminierungsgrad (%) in Abhängigkeit vom zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmten Anti-CCP- Titer mit Trendgerade

Ergebnisse

3.3.4.3. Histon 2b

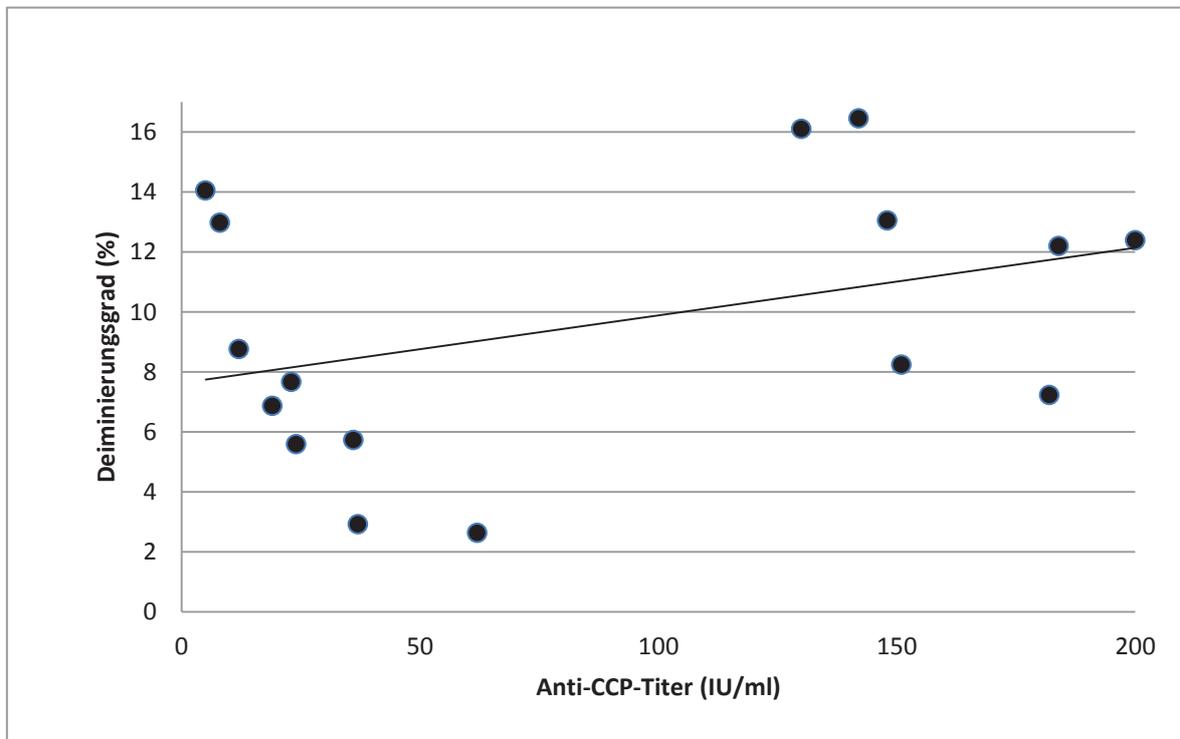


Abb. 19 Deiminierungsgrad (%) in Abhängigkeit vom zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmten Anti-CCP- Titer mit Trendgerade

Ergebnisse

3.3.4.4. Histon 3-1

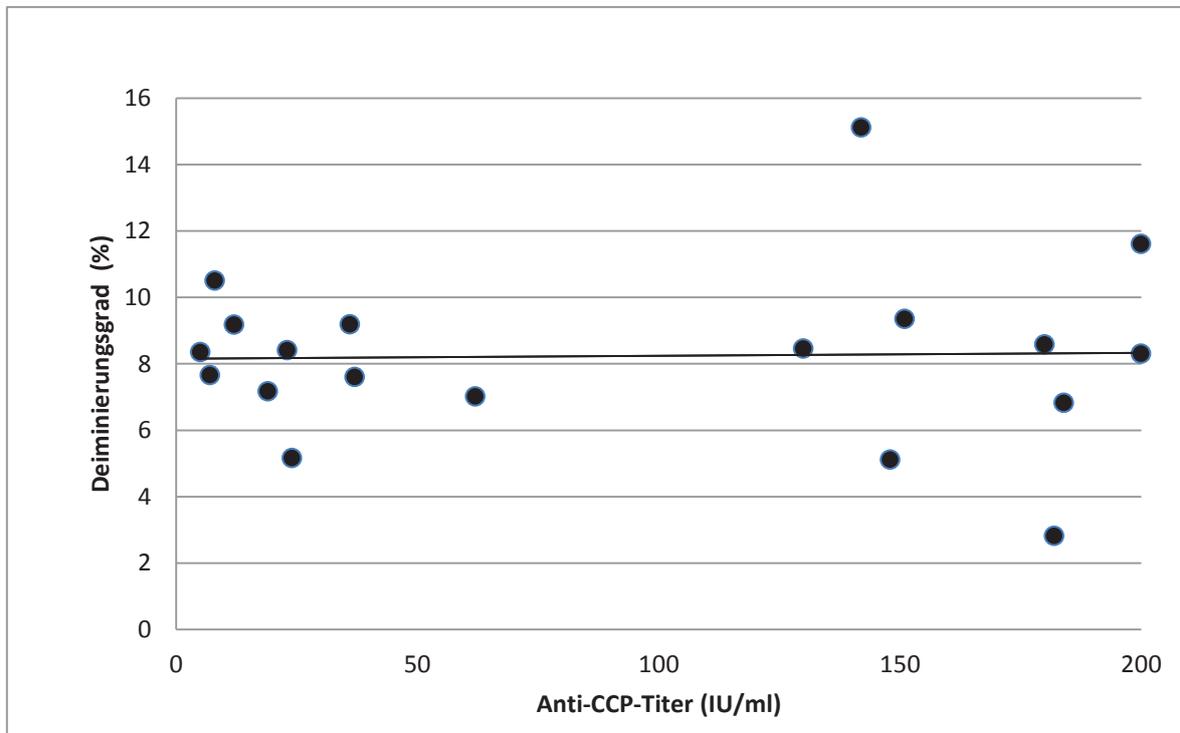


Abb. 20 Deiminierungsgrad (%) in Abhängigkeit vom zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmten Anti-CCP- Titer mit Trendgerade

Ergebnisse

3.3.4.5. Histon 3-2

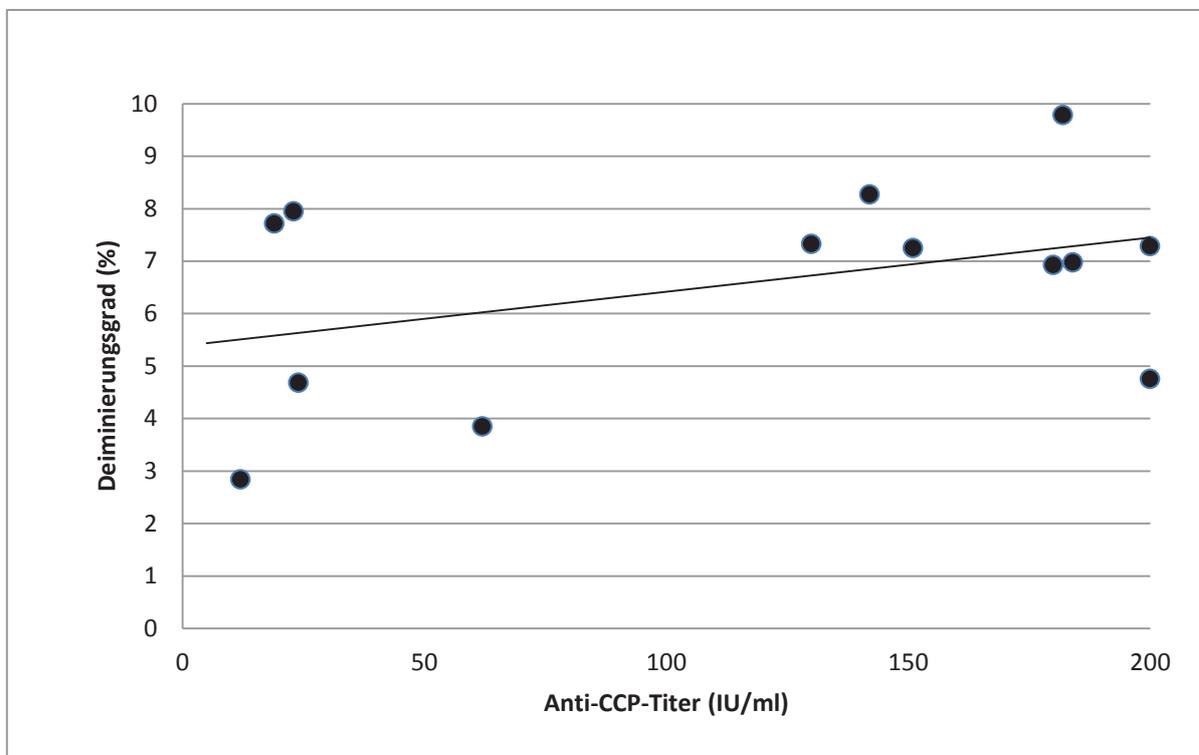


Abb. 21 Deiminierungsgrad (%) in Abhängigkeit vom zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmten Anti-CCP- Titer mit Trendgerade

Ergebnisse

3.3.4.6. Histon H4

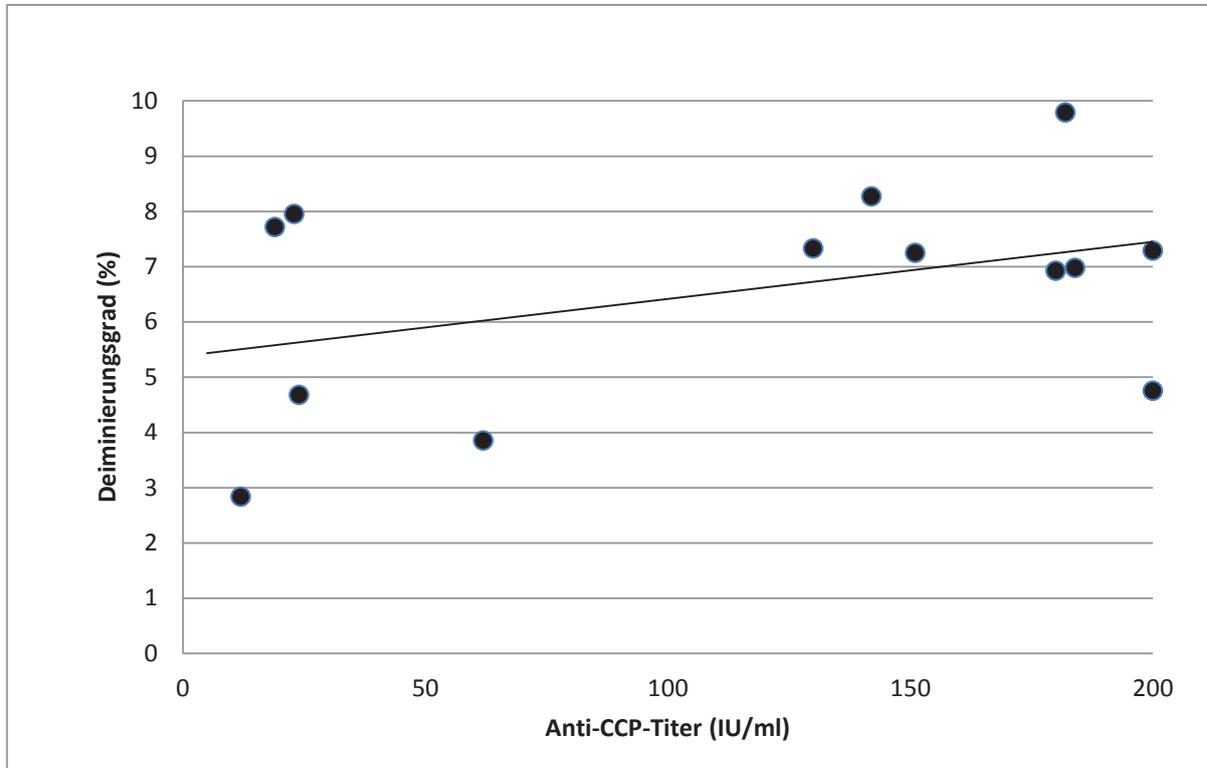


Abb. 22 Deiminierungsgrad (%) in Abhängigkeit vom zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmten Anti-CCP- Titer mit Trendgerade

Ergebnisse

Die gleichzeitig ermittelten weiteren laborchemischen und klinischen Parameter wie die Höhe der Blutsenkungsgeschwindigkeit, der CRP-Konzentration, die Krankheitsdauer, die Krankheitsaktivität (nicht dargestellt) ergaben keine weiteren, sicher nachweisbaren Zusammenhänge mit den ermittelten Deiminierungsgraden der verschiedenen Histongruppen.

Diskussion

4. Diskussion

4.1. Methodenkritik

4.1.1. Qualität der Aufreinigung der Granulozyten

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, konnte mit der angewandten Methode nach einem Protokoll von Sigma Aldrich (Percoll) eine gut reproduzierbare Ausbeute an Granulozyten gewonnen werden. Eine Verunreinigung mit anderen kernhaltigen Zellen konnte auf diese Weise sehr gering (< 5 %) gehalten, jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Auch in der Literatur (Arnould et al. 1994, Conway et al. 1992) finden sich vergleichbare Methoden, die zu ähnlichen Ergebnissen führten. So konnte die gut reproduzierbare Aufreinigungsmethode unter der vorliegenden Fragestellung als zuverlässig beurteilt und eingesetzt werden.

Verunreinigungen durch Thrombozyten wurden, wie in Kapitel 3.1. beschrieben, vernachlässigt. Die Erythrozyten wurden lysiert und mit Hilfe der später durchgeführten Gelelektrophorese konnte eine mögliche Verunreinigung durch eine fehlende Hämoglobin-Bande sicher ausgeschlossen werden. Außerdem besitzen beide Zellreihen im adulten Zustand keinen Zellkern, womit die verbleibende Histonmenge und damit die Beeinflussung der Ergebnisse vernachlässigbar einzuschätzen ist (Marcus et al. 2002, Kakhniashvili et al. 2004, McRedmond et al. 2004).

Um den hier schon sehr geringen verunreinigenden Anteil durch andere Zellen weiter zu verringern, wäre es ggfs. möglich gewesen, die Aufreinigung der Granulozyten z.B. über eine Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) durchzuführen, bei der die Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene getrennt werden können. Dies war aber aufgrund des schon sehr geringen Verunreinigungsgrades für die vorliegende Fragestellung nicht erforderlich.

Diskussion

4.1.2. Qualität der Aufreinigung der Histone aus den isolierten Granulozytenfraktionen

Die Histone wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Young (Young et al. 2001) isoliert. Das so gewonnene Histonpellet wurde über die RP-HPLC aufgetrennt. Hier zeigten die Histonfraktionen ein konstant reproduzierbares, typisches Elutionsprofil (s. Abb. 4), was sich mit Ergebnissen aus der Literatur deckt (Gurley et al. 1982, Strahl et al. 1999, Kurokawa et al. 1985, Hagiwara et al. 2005, Su et al. 2007, Garcia et al. 2007). Hinweise auf spezifische Veränderungen oder eine Beeinflussung der Elutionsprofile durch die Erkrankung an RA oder durch das Alter der Probanden wurden nicht gefunden.

Die chromatographischen Signalintensitäten zeigten eine Variabilität, die auf die unterschiedliche Ausbeute an isolierten Granulozyten aus den Vollblutproben und die daraus resultierenden unterschiedlichen Mengen des jeweils extrahierten Histonpellets zurückzuführen ist. Der Reinheitsgrad der gewonnenen und getrennten Histonfraktionen wurde durch die gelchromatographische Kontrolle der aufgereinigten Histonfraktionen belegt.

In den Elutionsprofilen der Trennverfahren ergaben sich folgende Auffälligkeiten:

- Das Histon H1 stellte sich in der Gelelektrophorese immer als Doppelbande dar. Dieses Phänomen wird in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Parseghian et al. 2001, Doenecke et al. 1997, Cole et al. 1987). Als Erklärung werden hier die unterschiedlichen Subtypen der Histone herangezogen. Die Subtypen des Histon H1 unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz von allen anderen Histongruppen am stärksten. Dieses wirkt sich bei einem Gemisch aus verschiedenen Subtypen von Histon H1 in der Laufgeschwindigkeit im Gel aus. Um zu überprüfen, welche genauen Subtypen des Histons H1 im Einzelnen untersucht wurden, könnte man zur Subtypen-Spezifizierung z.B. massenspektrometrische Untersuchungen durchführen.

Diskussion

- Bei der Interpretation der hier dargestellten Ergebnisse sind auch die Subtypen des Histons H3 zu berücksichtigen. Es sind drei verschiedene Subtypen von Histon H3 beim Menschen bekannt. Zwei dieser Subtypen unterscheiden sich nur in einer Aminosäure, der dritte Subtyp unterscheidet sich in fünf bzw. sechs Aminosäuren von den anderen beiden. Bei der hier durchgeführten Trennung der Histone mittels RP-HPLC eluierte H3 zu zwei unterschiedlichen Zeiten (bei ungefähr 57 min und 69 min (s. Abb. 4). In der Literatur wird entsprechend beschrieben, dass zwei der drei H3-Subtypen im ersten Peak und einer im zweiten Peak eluieren (Gurley et al. 1982 an chinesischen Hamster CHO-Zellen, Hake et al. 2005 an HeLa-Zellen). Jedoch liegen derzeit noch keine Daten vor, zu welchen Anteilen die unterschiedlichen Subtypen von H3 in menschlichen Granulozyten vorkommen. Auf Grund der hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse kann man nur davon ausgehen, dass mindestens zwei unterschiedliche Subtypen vertreten sind. Ob in dem einen Peak jedoch wirklich beide beschriebenen Subtypen enthalten sind, oder ob nur einer vorliegt, wurde nicht untersucht und könnte durch massenspektroskopische Analysen geklärt werden. Wie zu Abbildung 5 beschrieben, laufen in der Gelelektrophorese die Subtypen in einer Bande. Da es hier im Gegensatz zum Histon H1 (s. o.) möglich war, die Peaks nach der Trennung in der RP-HPLC einzeln zu fraktionieren, wurden sie in den weiteren Analysen getrennt voneinander untersucht.
- Die Histone H2a und H4 eluierten in der RP-HPLC häufig gemeinsam in zwei Peaks. Diese Beobachtung ist aus der Literatur bereits bekannt (Gurley et al. 1982, Hagiwara et al. 2005, Zhang et al. 2002). Dafür verantwortlich könnten nach Zhang (Zhang et al. 2002) mehrfach acetylierte Isoformen der beiden Histontypen sein. War es nur möglich, die beiden als Mischfraktion zu gewinnen, wurden sie nicht in der weiteren Auswertung berücksichtigt. Aus diesem Grund konnten zu diesen beiden Histontypen weniger Werte erhoben werden als zu den anderen Histonarten (vergleiche Abbildungen 11-16).

Diskussion

Insgesamt ist bisher noch nicht näher spezifiziert, welche einzelnen Subtypen der Histongruppen und in welchem Verhältnis diese im humanen Granulozyten vorkommen. Die einzige Ausnahme stellt dabei das Histon H1 da. Hier konnten die Subtypen H1.2, H1.3, H1.4 und H1.5 in Granulozyten nachgewiesen werden (Olins et al. 2005). Für eine verlässliche Aussage über die Zusammensetzung der Subtypen der Histongruppen, die in Granulozyten vorkommen, könnten massenspektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden.

Diskussion

4.2. Deiminierung von Argininresten in Histonen

In der Literatur wurde die Deiminierung von Histonen der Gruppen H2a, H3 und H4 in HL-60 Granulozyten aus Zellkulturen bereits mehrfach beschrieben (Hagiwara et al. 2002, Hagiwara et al. 2005, Nakashima et al. 2002, Wang et al. 2004). Die Deiminierung von Histonen der Gruppen H1 und H2b aus Herzmuskelzellen (Neufeind 2011), von Histonen der Gruppe H1, H2a, H2b und H4 aus Granulozyten (H1: Dwivedi et al. 2014, H2a, H2b, H4: Michele 2008, H4: Pratesi et al. 2013), sowie aller fünf Histongruppen aus Lebergewebe (Reckert 2014) wurden ebenfalls bereits untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun die Histongruppen (H1, H2a, H2b, H3 (hier als „H3-1“ und „H3-2“) sowie H4) aus Granulozyten aufgereinigter Blutproben isoliert und auf ihre Citrullinkonzentration untersucht. Über zwei verschiedene Methoden (Chromatographie und Western-Blot) konnte in allen hier untersuchten Histongruppen Citrullin nachgewiesen werden. Die hier gefundenen Ergebnisse stehen somit in Einklang mit den bereits oben genannten Untersuchungsergebnissen für diverse humane Gewebe und Blut von Dwivedi (2014), Neufeind (2011), Michele (2008) und Reckert (2014).

Der Nachweis von Citrullin in den Histonen H1 und H2b aus Granulozyten steht dagegen in Widerspruch zu anderen Arbeiten, die Citrullin nur in den Histongruppen H2a, H3 und H4 beschreiben (Hagiwara et al. 2002, Hagiwara et al. 2005, Nakashima et al. 2002, Wang et al. 2004). Diesen scheinbar widersprüchlichen Arbeiten ist gemeinsam, dass die untersuchten Histonproben aus Zellkulturzellen isoliert wurden. Dagegen wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Histone, wie oben bereits angegeben, aus Granulozyten isoliert, die aus dem Blut lebender Probanden stammten. Auch die Proben der Studien, deren Ergebnisse in Einklang mit den jetzt erhobenen Daten stehen (Dwivedi et al. 2014, Michele 2008, Pratesi et al. 2013, Reckert 2014), wurden aus humanen Gewebe bzw. Blut von Probanden isoliert. Sie wurden also postmortal (Herz-, Lebergewebe) bzw. aus dem lebenden Organismus (Granulozyten) gewonnen, was heißt, dass die untersuchten Zellen in ihrer Lebenszeit physiologischen und pathologischen Stimuli und Stressfaktoren ausgesetzt waren, die sich sicher von den Faktoren unterscheiden, denen in vitro kultivierte Zellen ausgesetzt sind.

Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Granulozyten unter physiologischen Bedingungen und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Diskussion

4.2.1. Deiminierung von Argininresten in Histonen bei gesunden Probanden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Citrullinkonzentration in Histonen summarisch bestimmt, d.h. über jeweils alle vorhandenen Argininreste. Das Ausmaß der Deiminierung von Argininresten in Proteinen ist stark vom sterischen Umfeld der Argininreste, d.h. von der Struktur des Proteins und der Position im Protein abhängig (Tarcza et al. 1996, Hidaka et al. 2005, György et al. 2006). Es kann also Argininreste in einem Protein geben, die nicht oder nur schwierig deiminiert werden, andererseits aber auch Reste, die sehr stark von einer Deiminierung betroffen sind. Daher lassen die hier jeweils über das Gesamthiston summarisch erhobenen Daten keine Rückschlüsse auf den Zustand der einzelnen Argininreste zu. Theoretisch könnte also z.B. positionsabhängig die Deiminierung an einzelnen Argininresten deutlich höher sein, als es die hier gemessene Gesamtcitrullinkonzentration im Histon (proportional zum Deiminierungsgrad) impliziert. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass auch die Struktur und Ladung im Protein an hoch „citrullinierbaren“ Stellen wesentlich verändert sein könnte, was funktionelle Auswirkungen haben könnte (vgl. Abschnitt 1.1.2.).

Besonders interessant erscheinen in diesem Zusammenhang die für Histon H1 erhobenen Daten:

Summarisch lagen die Anteile deimierter Argininreste an der Gesamtzahl der Argininreste (Deiminierungsgrad) für H1 im Bereich von 4,09% bis 20,22% bei den gesunden Probanden (s. Abb. 11 und Tabelle 2). In der Literatur ist bisher diesbezüglich beschrieben, dass unabhängig vom Subtyp des Histons H1 allein das Arginin an der Stelle Arg 54 deiminiert wird (Christophorou et al. 2014). Die unterschiedlichen Histonsubtypen des Histons H1 beinhalten je nach Subtyp drei bis sechs Arginine in ihrer Aminosäuresequenz (Doenecke et al. 1988). Wenn lediglich ein einziger Argininrest deiminiert wird, würde das bei einem summarischen Deiminierungsgrad von 20,22% bedeuten, dass das Arginin an der von Christophorou benannten Stelle Arg 54, abhängig von der jeweiligen Subtypenzusammensetzung, dort nahezu vollständig deiminiert sein muss.

Diskussion

4.2.2. Variabilität des Deiminierungsgrades in Histonen aus Granulozyten gesunder Probanden

Die ermittelten Deiminierungsgrade der untersuchten Histone zeigten bei den gesunden Probanden in Abhängigkeit vom Alter erhebliche Schwankungsbreiten (H1: 4,085% - 20,217%, H2a: 3,005% - 11,628%, H2b: 3,558% - 20,932%, H3-1: 4,489% - 11,431%, H3-2: 4,255% - 13,245% und H4: 2,234% - 28,807% (s. Abb. 11-16 und Tabellen. 2-7).

Für diese verhältnismäßig breite Variabilität der Deiminierungsgrade sind unterschiedliche Erklärungsansätze denkbar. So ist bekannt, dass es genetisch unterschiedliche Formen der Peptidylarginindeiminasen (PAD) gibt, die sich unter anderem durch längere Lebensdauern auszeichnen. Enzymvarianten mit längerer Lebensdauer können folglich längere Zeit aktiv sein (Kurko et al. 2013, Suzuki et al. 2003, Ikari et al. 2005, Kang et al. 2006, Vossenaar et al. 2004, Yamada et al. 2005). Die bisher bekannte Variante, die durch die längere Lebensdauer des Enzyms zu einer erhöhten Enzymkonzentration und so zu höheren Deiminierungsgraden führt, soll zur Entstehung einer Anti-CCP-Antikörper-positiven RA beitragen können. Dieser Effekt wurde bisher jedoch nur in der asiatischen Bevölkerung gefunden (Suzuki et al. 2003, Ikari et al. 2005, Kang et al. 2006, Vossenaar et al. 2004, Yamada et al. 2005) (s. 1.1.1). Es ist bis jetzt zwar noch keine vergleichbare Genvariante in der kaukasischen Bevölkerung nachgewiesen worden, aber die Frage des Vorkommens weiterer solcher Varianten ist immer noch Gegenstand der Forschung und wäre eine mögliche Erklärung der hier beobachteten Variabilität der Deiminierungsgrade bei gesunden Probanden.

Eine weitere denkbare Ursache für höhere Deiminierungsgrade ist die erhöhte Aktivität der PADs bei Entzündungsgeschehen (Makrygiannakis et al. 2006, Chapuy-Regaud et al. 2005). Die PAD arbeiten, wie in Kapitel 1.1.2. beschrieben, insbesondere unter sehr hohen Kalziumkonzentrationen von ungefähr 1 μM , die intrazellulär vor allem durch Entzündungsprozesse erreicht werden können. Unter physiologischen Bedingungen ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration jedoch deutlich geringer bei ca. 200 nM, was

Diskussion

bedeutet, dass die Enzyme in diesem Zustand inaktiv vorliegen dürften (Suzuki et al. 2007).

Die erhobenen Werte vermitteln den Eindruck, dass in der Gruppe der Gesunden die Höhe des Citrullins am Argininanteil mit zunehmendem Alter deutlich weniger streuen, dies deutet sich für H1, H2b, und H4 an (s. Abb. 11-16 und 3.3.3.3.). Diese Feststellung führt zu der Frage, ob das Enzym einer altersabhängigen Kinetik folgt. In der Literatur gibt es jedoch noch keine Analysen zu der Veränderung der Enzymaktivität der PAD mit zunehmendem Alter. Zur Bestätigung eines solchen altersabhängigen Zusammenhangs könnten z.B. weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen nähere Erkenntnisse liefern.

Auffallend waren in allen Histongruppen Einzelfälle mit relativ hohen Citrullinkonzentrationen. Diese „erhöhten Werte“ wurden sowohl in der Gruppe der Gesunden als auch in der Gruppe der RA-Patienten, gesehen (s. Abb. 11-16). Bei Betrachtung der Werte der einzelnen Probanden, die hinter den relativ hoch deiminierten Werten stehen, fällt auf, dass in fast allen Fällen bei diesen Probanden nicht nur ein Histontyp betroffen war, sondern meist zwei, drei, vier oder sogar alle untersuchten Typen. Daraus ergibt sich die Frage, ob es Menschen gibt, die grundsätzlich hohe Deiminierungsgrade aufweisen (z.B. durch Enzymvarianten mit langer Halbwertszeit) oder ob jeweils nur in dem Moment der Blutentnahme eine „Überdeiminierung“ der Histone vorlag, z.B. getriggert durch ein akutes, subklinisches Entzündungsgeschehen. Zur weiteren Klärung dieser Frage könnten auch hier entsprechende Untersuchungen z.B. an einer größeren Zahl von Probanden und zu unterschiedlichen Zeitpunkten möglicherweise nähere Erkenntnisse bringen.

Diskussion

4.2.3. Deiminierungsgrad in Histonen bei an RA erkrankten Patienten

Die RA ist eine chronisch entzündliche Erkrankung. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, kann unter entzündlichen Bedingungen die o.g. nötige intrazelluläre Kalzium-Konzentration von ca. 1 μM erreicht werden, um die PAD 4 zu aktivieren (Vossenaar et al. 2003, Neeli et al. 2008). Dies führt zu der Frage, ob die Erkrankung bzw. die damit assoziierte Situation der (chronischen) Entzündung zu höheren Citrullingehalten in den Histonen führen kann. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen am Blut zeigten jedoch nur sehr geringe Unterschiede zwischen denen bei an RA erkrankten Patienten und gesunden Probanden altersabhängig ermittelten Deiminierungsgrade.

Als mögliche Gründe dafür lassen sich insbesondere unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse aus den durchgeführten Untersuchungen diskutieren:

- Alle untersuchten Patienten waren zum Zeitpunkt der Probengewinnung behandelt. Im Mittelpunkt des therapeutischen Regimens steht bei der RA die Hemmung der Entzündungsreaktionen durch immunsuppressive Medikamente (Smolen et al. 2010, Takakubo et al. 2013). Ist die Therapie also erfolgreich, ist davon auszugehen, dass die entzündliche Aktivität minimiert ist.
- Einen anderen möglichen Grund könnte man darin vermuten, dass eventuell am Anfang der Therapie bei einem akuten, entzündlichen Geschehen vermehrt neue, noch nicht deimierte Granulozyten ins periphere Blut gelangen (Temme et al. 2014, Kolaczowska et al. 2013, Summers et al. 2010).
- Durchaus und nicht zuletzt wäre es auch möglich, dass die Histone der in der Blutbahn zirkulierenden Granulozyten nur zu einem geringen Anteil deimiert sind und ihre Eigenschaft als mögliches Antigen erst im aktivierten Zustand in granulozytären, extrazellulären Netzen (NET) zeigen (Khandpure et al. 2013, Dwivedi et al. 2014, Li et al. 2010, Neeli et al. 2008). Diese aktivierten Granulozyten würden sich dann im Gewebe (bei einem akuten rheumatischen Geschehen typischerweise im Gelenk) befinden, d.h. sie würden umgekehrt nur in sehr geringer Konzentration ins periphere Blut gelangen und bei einer Analyse der

Diskussion

aus dem zirkulierenden Blut aufgereinigten Granulozyten gar nicht erfasst werden.

4.2.4. Deiminierungsgrad in Histonen bei an RA erkrankter Patienten in Relation zu laborchemischen Parametern und klinischem Verlauf

Nachdem deimierte Histone als mögliches Autoantigen beschrieben wurden (van Venrooij et al. 2014), lag die Annahme nahe, dass die Deiminierung von granulozytären Histonen im Blut im Zusammenhang mit dem Anti-CCP-Titer stehen könnte. Die erhobenen Daten deuten auf einen, wenn auch nur geringen, jedenfalls nicht signifikanten Zusammenhang zwischen dem Deiminierungsgrad aller Histone und dem zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmten Anti-CCP-Titer hin.

Bei den Histonen H2a und H2b ist dieser Trend deutlicher ausgeprägt. Mit zunehmendem Antikörpertiter steigt hier die Citrullinkonzentration deutlich stärker als bei den übrigen Histonen (s. Abb. 18 und 19). Die Tendenz war jedoch relativ schwach ausgeprägt (möglicherweise auch aufgrund der zu geringen Zahl sauber isolierter Histone (vgl. 4.1.2.)), um valide Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen Anti-CCP-Antikörpertiter und Citrullingehalt für diese beiden Histone treffen zu können. Dennoch ist die beobachtete Tendenz interessant, weil sie die o.g. Hypothese stützen würde, nach der die Höhe des Anti-CCP-Titers in einen Zusammenhang zu der Höhe des nachgewiesenen Antigens (hier: citrulliniertes Histon) stehen würde. Möglicherweise spiegelt diese Tendenz im peripheren Blut auch das Vorhandensein aktivierter Granulozyten (Khandpure et al. 2013, Dwivedi et al. 2014, Li et al. 2010, Neeli et al. 2008). mit „überdeimierten“ Histonen im entzündlich veränderten Gewebe (bei einem akuten rheumatischen Geschehen typischerweise im Gelenk) wieder.

Diskussion

Für alle weiteren untersuchten klinischen und laborchemischen Parameter CRP, BSG, Krankheitsdauer und Krankheitsaktivität lässt sich kein signifikanter Zusammenhang zu den ermittelten Deiminierungsdaten der Histone feststellen, weshalb die ermittelten Daten hier nicht dargestellt wurden. Damit lässt sich auf dem Stand der hier gewonnenen Erkenntnisse vermuten, dass die Deiminierung der granulozytären Histone aus dem Blut - wenn überhaupt – allenfalls nur in einer schwachen Beziehung zu Parametern, die den klinischen Verlauf und die Krankheitsaktivität beschreiben, steht.

Diskussion

4.3. Schlussfolgerung

Nach den erarbeiteten Daten zeigen Histone aller untersuchten Typen in Granulozyten eine teils erhebliche Deiminierung ihrer Argininreste. Der Nachweis von Citrullin auch in den Histonen H1 und H2b von Granulozyten wurde bislang noch nicht geführt. Er steht in scheinbarem Widerspruch zu anderen Arbeiten, die Citrullin nur in den Histongruppen H2a, H3 und H4 beschreiben (Hagiwara et al. 2002, Hagiwara et al. 2005, Nakashima et al. 2002, Wang et al. 2004), wobei sich diese Arbeiten aber auf Granulozyten aus Zellkulturen beziehen. Diese scheinbare Diskrepanz ist z.B. darauf zurückführbar, dass die hier untersuchten Granulozyten aus peripherem Blut von Probanden in ihrer Lebenszeit anderen Stimuli und Stressfaktoren ausgesetzt waren als die in vitro kultivierten Zellen.

Die bei RA-Patienten festgestellten Deiminierungsgrade unterschieden sich nicht wesentlich von denen der gesunden Probanden. Damit erbrachte die Untersuchung von Granulozyten aus peripherem Blut keinen Anhalt für eine „Überdeiminierung“ von Histonen im Rahmen der RA.

Allerdings fiel die Tendenz zu höheren Deiminierungsgraden bei Patienten mit hohen Anti-CCP-Titern auf. Diese war zwar nicht signifikant, könnte aber als Indiz dafür gewertet werden, dass aktivierte, „überdeiminierte“ Histone dennoch in Zusammenhang mit der Bildung dieser Auto-Antikörper stehen, beispielsweise durch ihre Präsenz in von chronisch entzündlichen Prozessen betroffenen Geweben (z.B. in Gelenken).

Letztlich lässt sich aufgrund der erhobenen Daten nicht belegen, dass deiminierte Argininreste in Histonen das Auto-Antigen darstellen, das die Bildung von Anti-CCP-Autoantikörpern induziert. Diese Möglichkeit lässt sich allerdings allein aufgrund der Daten auch nicht ausschließen, weil die Daten nur Rückschlüsse auf Granulozyten in peripherem Blut zulassen.

Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische Autoimmunerkrankung bislang unklarer Genese. Antikörper gegen deimierte Proteine gelten als wichtige spezifische und sensitive serologische Marker für die Diagnose der RA. Dabei ist nach wie vor unbeantwortet, welches deimierte Protein als Antigen die Bildung von Anti-CCP-Antikörpern über welchen pathophysiologischen Mechanismus induziert. Bekannt ist, dass sich diese Antikörper gegen deimierte Argininreste, die als posttranslationale Modifikation durch Deiminierung von sterisch exponierten Argininresten entstehen, richten.

In der Literatur wird diskutiert, ob Histone das Auto-Antigen, das die Produktion von Anti-CCP-Antikörpern provoziert, tragen bzw. präsentieren. Vor diesem Hintergrund geht die vorliegende Arbeit der Frage nach, ob sich in aus Granulozyten des peripheren Bluts extrahierten Histonen von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden unterschiedliche Konzentrationen von Citrullin zu Arginin (= Deiminierungsgrad) nachweisen lassen.

Zur Klärung dieser Frage wurden Granulozyten aus peripherem Blut von 22 Patienten mit rheumatoider Arthritis und 24 gesunden Probanden isoliert, deren Histone aufgereinigt und die Deiminierungsgrade ihrer Argininreste mittels RP-HPLC bestimmt.

Die Histone der untersuchten Typen H1, H2a, H2b, H3 und H4 zeigten bei gesunden und erkrankten Probanden eine teils erhebliche Deiminierung ihrer Argininreste. Der Nachweis von Citrullin auch in den Histonen H1 und H2b von Granulozyten wurde bislang noch nicht geführt und steht in scheinbarem Widerspruch zu an Granulozyten aus Zellkulturen erhobenen Daten, nach denen Citrullin nur in den Histogruppen H2a, H3 und H4 nachweisbar ist. Diese scheinbare Diskrepanz dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die hier untersuchten Granulozyten aus peripherem Blut von Probanden in ihrer

Zusammenfassung

Lebenszeit anderen Stimuli und Stressfaktoren ausgesetzt waren als die in vitro kultivierte Zellen.

Hinsichtlich der Deiminierungsgrade der Histone fanden sich zwischen den RA-Patienten und den gesunden Probanden keine wesentlichen Unterschiede.

Die Untersuchungsergebnisse sind letztlich nicht ohne weiteres geeignet, die These, dass eine „Überdeiminierung“ von Histonen in Granulozyten vorläge und diese für die Entstehung der Auto-Antikörper verantwortlich sein könnte, zu belegen. Allerdings beziehen sich die Untersuchungsergebnisse ausschließlich auf Granulozyten des peripheren Blutes und lassen keinen Rückschluss darauf zu, ob eine „Überdeiminierung“ der Histone von Granulozyten am unmittelbaren Ort der Entzündung, dem Gelenk, vorliegt und eine Rolle bei der Entstehung von Auto-Antikörpern spielt. Als indirektes Indiz darauf, dass dies zumindest nicht ausschließbar ist, könnte – mit größter Vorsicht – der Befund gewertet werden, dass die Deiminierungsgrade der Histone peripherer Granulozyten von Patienten sich angedeutet proportional zu den Anti-CCP-Titern verhielten.

Abkürzungsverzeichnis

6. Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid-Citrat-Dextrose
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
Ala	Alanin
amu	<i>atomic mass unit</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arg	Arginin
Asx	Asparagin und/oder Asparaginsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CA	Carboanhydrase (Positiv-Kontrolle des Anti-Citrullin-Antikörpers)
CCP	<i>cyclic citrullinated proteins/ peptides</i>
Cit	Citrullin
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	konstanten Teil von Antikörpern
FMOC	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	<i>fast protein liquid chromatograph</i>
Glx	Glutamin und/oder Glutaminsäure
Gly	Glycin

Abkürzungsverzeichnis

GPMAW	<i>General Protein/Mass Analysis for Windows</i>
H	Histon
H2b (Std.)	Histon 2b-Einzelstandard (Positiv-Kontrolle des Anti-H2b-Antikörpers)
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
His	Histidin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IgM	Antikörper der Klasse M
IgG	Antikörpern der Klasse G
Ile	Isoleucin
J	Jahre
Leu	Leucin
m	Männlich
Met	Methionin
3-MPA	3-Mercaptopropionsäure
m/z	Masse-/Ladungsverhältnis
N-Terminus	Amino-Terminus
NaCl	Natriumchloridlösung
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd
PAD	Peptidyl-Arginin-Deiminase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

Abkürzungsverzeichnis

Phe	Phenylalanin
pmf	<i>peptide mass fingerprints</i>
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
RA	rheumatoide Arthritis
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
S	Standard
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Ser	Serin
Std.	Standard
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
Thy	Tyrosin
Trp	Tryptophan
Val	Valin
w	Weiblich

Literaturverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

Adelman RC (1970) An Age-dependent Modification of Enzyme Regulation, *The Journal of Biochemistry* 245, 5, 1032-1035

Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JMW, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G (2010), Rheumatoid Arthritis Classification Criteria, *Arthritis & Rheumatism* 62, 9, 2569–2581

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG (1988), The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis, *Arthritis & Rheumatism* 31, 315–24

Arnould T, Michiels C, Remacle J (1994), Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes, *Blood* 83, 12

Baka Z, Györgya B, Géherb P, Buzása EI, Falusa A, Nagya G (2012), Citrullination under physiological and pathological conditions, *Joint Bone Spine* 79, 431–436

Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR (2005), Periodontitis and rheumatoid arthritis: a Review, *Journal of Periodontology*, 76, 2066-2074

Literaturverzeichnis

Beck HC, Nielsen EC, Matthiesen R, Jensen LH, Sehested M, Finn P, Grauslund M, Hansen AM, Nørregaard O (2006), Quantitative Proteomic Analysis of Post-translational Modifications of Human Histones, *Nature reviews: Molecular cell biology* 9, 10, 815 -820

Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (2008), Pathologie, 4. Vollständig Überarbeitete Auflage, *Elsevier Urban & Fischer*, 73-116

Bright R, Proudman SM, Rosenstein ED, Bartold PM (2015), Is there a link between carbamylation and citrullination in periodontal disease and rheumatoid arthritis?, *Medical Hypotheses* 03, 006

Cartwright AJ, Quirke AM, de Pablo P, Romaguera D, Panico S, Mattiello A, Gavrila D, Navarro Sanchez C, Sacerdote C, Vineis P, Tumino R, Michaud D, Riboli E, Fisher BA, Venables PJ (2014), Smoking affects immune response to citrullinated autoantigens before clinical onset of rheumatoid arthritis in a southern European cohort, *oral abstracts: rheumatoid arthritis*

Chang X, Han J (2006), Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors, *Molecular Carcinogenesis* 45, 3, 183–196

Chang X, Han J, Pang L, Zhao Y, Yang Y, Shen Z (2009), Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors, *BioMed Central Cancer* 9, 40-51

Chapuy-Regaud S, Sebbag M, Baeten D, Clavel C, Foulquier C, De Keyser F, Serre G (2005), Fibrin Deimination in Synovial Tissue Is Not Specific for Rheumatoid Arthritis but Commonly Occurs during Synovitides, *The Journal of Immunology* 174, 5057-5064

Literaturverzeichnis

Chavanas S, Méchin MC, Nachat R, Adoue A, Coudane F, Serre G, Simon M (2006), Peptidylarginine deiminases and deimination in biology and pathology: Relevance to skin homeostasis, *Journal of Dermatological Science* 44, 63-72

Cole RD (1987), Microheterogeneity in H1 histones and its consequences, *International journal of peptide and protein research* 30, 4, 433-449

Christophorou MA, Castelo-Branco G, Halley-Stott RP, Oliveira CS, Loos R, Radzisheuskaya A, Mowen KA, Bertone P, Silva JC, Zernicka-Goetz M, Nielsen ML, Gurdon JB, Kouzarides T (2014), Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin, *Nature* 507, 104-108

Conway EM, Nowakowski B, Steiner-Mosonyi M (1992), Human neutrophils synthesize thrombomodulin that does not promote thrombin-dependent protein C activation, *Blood* 80, 5, 1254-1263

Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Bénazeth S, Cynober L (2005), Almost all about citrulline in mammals, *Amino Acids* 29, 177-205

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, D. Gregory G, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T (2004), Histone Deimination Antagonizes Arginine Methylation, *Cell* 118, 545-553

De Pablo P, Dietrich T, Chapple ILC, Milward M, Chowdhury M, Charles PJ, Buckley CD, Venables PJ (2014), The autoantibody repertoire in periodontitis: a role in the induction of autoimmunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis?, *Annals of the rheumatic diseases* 73, 3, 580-586

Literaturverzeichnis

Dieker J, Muller S (2010), Epigenetic Histone Code and Autoimmunity, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 39, 78-84

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

Doenecke D, Tönjes R, Kress H (1988), The H1 and core histone subtypes: Differential gene expression and varied primary structures, *Advances in Enzyme Regulation* 27, 93-104

Dwivedi N, Neeli I, Schall N, Wan H, Desiderio DM, Csernok E, Thompson PR, Dali H, Briand JP, Muller S, Radic M (2014), Deimination of linker histones links neutrophil extracellular trap release with autoantibodies in systemic autoimmunity, *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28, 7, 2840-2851

Esposito G, Vitale AM, Leijten FPJ, Strik AM, Koonen-Reemst AMCB, Yurttas P, Robbena TJAA, Coonrod S, Gossen JA (2007), Peptidylarginine deiminase (PAD) 6 is essential for oocyte cytoskeletal sheet formation and female fertility, *Molecular and Cellular Endocrinology* 273, 25–31

Firestein GS (2003), Evolving concepts of rheumatoid arthritis, *Nature* 423, 356-361

Forslind K, Ahlme'n M, Eberhardt K, Hafström I, Svensson B (2004), Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP), *Annals of the Rheumatic Diseases* 63, 1090–1095

Literaturverzeichnis

Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF (2007), Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry, *Current Opinion in Chemical Biology* 11, 66–73

Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon D, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson-Bessière C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, Serre G (1999), The Epitopes Targeted by the Rheumatoid Arthritis-Associated Antifilaggrin Autoantibodies are Posttranslationally Generated on Various Sites of (Pro)Filaggrin by Deimination of Argininen Residues, *The Journal of Immunology* 162, 585-594

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987), The shared epitope hypothesis - An Approach to Understanding The Molecular Genetics of Susceptibility to Rheumatoid Arthritis, *Arthritis & Rheumatism* 30, 11, 1205-1213

Gurley LR, Valdez JG, Prentice DA, Spall WD (1982), Histone fractionation by high-performance liquid chromatography, *Cell* 123, 2, 219-231

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

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

Hagiwara T, Nakashima K, Hirano H, Senshu T, Yamada M (2002), Deimination of Arginine Residues in Nucleophosmin/B23 and Histones in HL-60 Granulocytes, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 979–983

Literaturverzeichnis

- Hake S, Garcia BA, Ducan EM, Kauer M, Dellairei G, Shabanowitz J, Bazett-Jones DP, Allis CD, Hunt DF** (2005), Expression Patterns and Post-Translational Modifications Associated with Mammalian Histone H3 Variants, *The Journal of Biological Chemistry* 281, 559-568
- Harauz G, Musse AA** (2007), A Tale of Two Citrullines-Structural and Functional Aspects of Myelin Basic Protein Deimination in Health and, *Neurochemical Research* 32, 137–158
- Hidaka Y, Hagiwara T, Yamada M** (2005), Methylation of the guanidino group of arginine residues prevents citrullination by peptidylarginine deiminase IV, *FEBS Letters* 579, 19, 4088–4092
- Huscher D, Merkesdal S, Thiele K, Zeidler H, Schneider M, Zink A** (2006), Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65, 1175–1183
- Ishida-Yamamoto A, Senshu T, Takahashi H, Akiyama K, Nomura K, Iizuka H** (2000), Decreased Deiminated Keratin K1 in Psoriatic Hyperproliferative Epidermis, *Journal of Investigative Dermatology* 114, 701–705
- Ikari K, Kuwahara M, Nakamura T, Momohara S, Hara M, Yamanaka H** (2005) Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a replication study, *Arthritis & Rheumatism* 52, 3054–3057
- Jenuwein T, Allis CD** (2001), Translating the Histone Code, *Science* 293, 1074-1080
- Kakhniashvili DG, Bulla LA, Goodman SR** (2004), The Human Erythrocyte Proteome, analysis by ion trap mass spectrometry, *Molecular & Cellular Proteomics* 3, 501-509.

Literaturverzeichnis

Källberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Rönnelid J, Klareskog L, Alfredsson L (2011), Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke, *Annals of Rheumatic Diseases* 70, 508-511

Kang CP, Lee HS, Ju H, Cho H, Kang C, Bae SC (2006), A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans *Arthritis & Rheumatism* 54, 90-96

Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V, Thompson P, Chen P, Fox DA, Pennathur S, Kaplan MJ (2013), NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis, *Science translational medicine* 5, 178, 1-10

Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L (2008), Immunity to Citrullinated Proteins in Rheumatoid Arthritis, *The Annual Review of Immunology* 26, 651–675

Kolaczowska E, Kubes P (2013), Neutrophil recruitment and function in health and inflammation, *Nature Reviews Immunology* 13, 159-175

Kornberg RD (1977), Structure of Chromatin, *Annual Review of Biochemistry* 46, 931-954

Kurko J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z (2013), Genetics of rheumatoid arthritis—a comprehensive review, *Clinical Reviews - Journal of Allergy and Clinical Immunology* 45, 170–9

Literaturverzeichnis

Kurokawa M, MacLeod MC (1985), Separation of Histones by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Analysis of the Binding of Carcinogens to Histones, *Analytical Biochemistry* 14, 47-54

Laki J, Lundström E, Snir O, Rönnelid J, Ganjo I, Catrina AI, Bengtsson C, Saevarsdottir S, Wick MC, Alfredsson L, Klareskog L, Padyukov L (2012), Very High Levels of Anti-Citrullinated Protein Antibodies Are Associated With HLA-DRB1 Non-Shared Epitope Allele in Patients With Rheumatoid Arthritis, *Arthritis & Rheumatism* 64, 7, 2078-2084

Lee YH, Bae SC, Song GG (2014), Gene-environmental interaction between smoking and shared epitope on the development of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: a meta-analysis, *International Journal of Rheumatic Diseases* 17, 528-535

Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y (2010), PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps, *The Journal of Experimental Medicine* 207, 9, 1853-1862

Loos T, Opdenakker G, Van Damme J, Proost P (2009), Citrullination of CXCL8 increases this chemokine's ability to mobilize neutrophils into the blood circulation, *Haematologica* 94, 1346-1353

Liu CL, Tangsombatvisit S, Rosenberg JM, Mandelbaum G, Gillespie EC, Gozani OP, Alizadeh AA, Utz PJ (2012), Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies, *Arthritis Research & Therapy* 25, 1-14

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997), Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, *Nature* 389, 251-260

Literaturverzeichnis

Lugli EB, Correia RESM, Fischer R, Lundberg K, Bracke KR, Montgomery AB, Kessler BM, Brusselle GG, Venables PJ (2015), Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis, *Arthritis Research & Therapy* 17, 9, 1-8

Makrygiannakis D, af Klingt E, Lundberg IE, Löfberg R, Ulfgren AK, Klareskog L, Catrina AI (2006), Citrullination is an inflammation-dependent process, *Annals of the Rheumatic Diseases* 65, 1219–1222

Marcus K (2002), Analyse des Phosphoproteoms humaner Thrombin-stimulierter Thrombozyten, *Dissertation, Ruhr-Universität Bochum*

McGhee JD, Felsenfeld G (1980), Nucleosome structure, *Annual Reviews of Biochemistry* 49, 1115-1156

McInnes IB, Schett G (2011), The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, *The New England Journal of Medicine* 365, 2205-2219

McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC, Fitzgerald DJ (2004), Integration of Proteomics and Genomics in Platelets – A profile of platelet Proteins and platelet-specific genes, *Molecular & Cellular Proteomics*, 3, 133-144

Michele I (2008), Intravitale Deiminierung von Argininresten in Histonen humaner Granulozyten, *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

Mimori T (2005), Clinical significance of anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis, *Internal Medicine* 44, 1122–1126

Literaturverzeichnis

Mohanan S, Cherrington BD, Horibata S, McElwee JL, Thompson PR, Coonrod SA (2012), Potential Role of Peptidylarginine Deiminase Enzymes and Protein Citrullination in Cancer Pathogenesis, *Biochemistry Research International* 2012, Article ID 895343

Moscarello MA, Mastronardi FG, Wood DD (2007), The Role of Citrullinated Proteins Suggests a Novel Mechanism in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis, *Neurochemical Research* 32, 251–256

Nachat R, Mechin MC, Takahara H, Chavanoz S, Charveron M, Serre G, Simon M (2005) Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin, *Journal of Investigative Dermatology* 124, 384–393

Nachat R, Mechin MC, Charveron M, Serre G, Constans J, Simon M (2005) Peptidylarginine deiminase isoforms are differentially expressed in the anagen hair follicles and other human skin appendages, *Journal of Investigative Dermatology* 125, 34–41

Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M (2002), Nuclear Localization of Peptidylarginine Deiminase V and Histone Deimination in Granulocytes, *The Journal of Biological Chemistry* 277, 51, 49562–49568

Neeli I, Khan SN, Radic M (2008), Histone Deimination as a Response to Inflammatory Stimuli in Neutrophils, *The Journal of Immunology* 180, 1895–1902

Neeli I, Radic M (2012), Knotting the NETs: Analyzing histone modifications in neutrophil extracellular traps, *Arthritis Research & Therapy* 14, 115

Literaturverzeichnis

Neufeind A (2011), Razemisierung von Asparaginsäureresten und Deiminierung von Argininresten humaner Histone in Myokardgewebe, *Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät Heinrich-Heine-Universität*

Nicholas AP, King JL, Sambandam T, Echols JD, Gupta KB, McInnis C, Whitaker JN (2003), Immunohistochemical Localization of Citrullinated Proteins in Adult Rat Brain, *The Journal of Comparative Neurology* 459, 251–266

Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHT, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BAC (2004), Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, 50, 2, 380–386

Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshiba M, Kuntz KM, Kamae I, Kumagai S (2007): Metaanalysis: Diagnostic Accuracy of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody and Rheumatoid Factor for Rheumatoid Arthritis, *Annals of Internal Medicine* 146, 797–808

Olins DE, Olins AL (2005), Granulocyte heterochromatin: defining the epigenome, *BMC Cell Biology* 15, 6, 39

Parseghian MH, Hamkalo BA (2001), A compendium of the histone H1 family of somatic subtypes: An elusive cast of characters and their characteristics, *Biochemistry and Cell Biology* 79, 3, 289-304

Pincus T, Callahan LF, Sale WG, Brooks AL, Payne LE, Vaughn WK (1984), Severe functional declines, work disability, and increased mortality in studied over nine years seventy-five rheumatoid arthritis patients, *Arthritis and Rheumatism* 27, 8

Literaturverzeichnis

Pratesi F, Dioni I, Tommasi C, Alcaro MC, 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, *Annals of the Rheumatic Diseases* 0, 1–9

Rando OJ (2012), Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code, *Current Opinion in Genetics & Development* 22, 148–155

Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ (2003), Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of Rheumatoid Arthritis, *Arthritis & Rheumatism* 48, 10, 2741–2749

Reckert AS (2014), Posttranslationale Modifikationen von Histonen aus humanem Lebergewebe: Deiminierung von Arginin und Razemisierung von Asparaginsäure, *Inauguraldissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

Rogers G, Harding HWJ, Llewellyn-Smith IJ (1977), The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor, *Biochimica et Biophysica Acta* 495, 159-175

Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins MJ (2003), Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin, *British Journal of Dermatology* 2003, 149, 951-959

Sakkas LI, Bogdanos DP, Katsiari C, Platsoucas CD (2014), Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis—relevance to treatment, *Autoimmunity Reviews* <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.08.012>

Literaturverzeichnis

Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA, van Venrooij WJ (1998), Citrulline is an Essential Constituent of Antigenic Determinants Recognized by Rheumatoid Arthritis-specific Autoantibodies, *The Journal of Clinical Investigation* 101, 1, 273–281

Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, van den Hoogen, Hazes JMW, Breedveld FC, van Venrooij WJ (2000), The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide, *Arthritis & Rheumatism* 43, 1, 155–163

Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW (2010), Rheumatoid arthritis, *Lancet* 376 (9746), 1094-1108

Senshu T, Akiyama K, Nomura K (1999), Identification of citrulline residues in the V subdomains of keratin K1 derived from the cornified layer of newborn mouse epidermis, *Experimental Dermatology* 8, 392–401

Sharma P, Azebi S, England P, Christensen T, Møller-Larsen A, Petersen T, Batsché E, Muchardt C (2012), Citrullination of Histone H3 Interferes with HP1-Mediated Transcriptional Repression, *PLOS Genetics* 8, 9, e1002934

Smolen J, Landewé R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Viala CG, Gorter S, Knevel R, Nam J, Schoels M, Aletaha D, Buch M, Gosse L, Huizinga T, Bijlsma JW, Burmester G, Combe B, Cutolo M, Gabay C, Reino JG, Kouloumas M, Kvien TK, Martin-Mola E, McInnes I, Pavelka K, van Riel P, Scholte M, Scott DL, Sokka T, Valesini G, van Vollenhoven R, Winthrop KL, Wong J, Zink A, van der Heijde D (2010), EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs, *Annals of the Rheumatic Disease* 69, 964-975

Literaturverzeichnis

Song YW, Kang EH (2010) Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies, *Oxford University Press QJM* 103, 3, 139-146

Strahl BD, Allis CD (2000), The language of covalent histone modifications, *Nature* 403, 41-45

Strahl BD, Reiko R, Cook RG, Allis CD (1999) Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena, *PNAS* 96, 26, 14967–14972

Su X, Jacob NK, Amunugama R, Lucas DM, Knapp AR, Ren C, Davis ME, Marcucci G, Parthun MR, Byrd JC, Fishel R, Freitas MA (2007), Liquid chromatography mass spectrometry profiling of histones, *Journal of Chromatography B* 850, 440–454

Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters M, Chilvers ER (2010) Neutrophil kinetics in health and disease, *Trends in Immunology* 31, 318–324

Suwannalai P, Trouw LA, Toes REM, Huizinga TWJ (2012), Anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in early rheumatoid arthritis, *Modern Rheumatology* 22, 15–20

Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Ryota Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K (2003), Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4 are associated with rheumatoid arthritis, *Nature genetics* 34, 395-402

Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K (2007), Citrullination by Peptidylarginine Deiminase in Rheumatoid Arthritis, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1108, 323–339

Literaturverzeichnis

Takakubo Y, Tamaki Y, Hirayama T, Iwazaki K, Sasaki K, Sasaki A, Ohki H, Takakubo N, Konttinen YT, Takagi M (2013), Inflammatory immune cell responses and Toll-like receptor expression in synovial tissues in rheumatoid arthritis patients treated with biologics or DMARDs, *Clinical Rheumatologie* 32, 853–861

Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM (1996), Protein Unfolding by Peptidylarginine Deiminase, *The Journal of Biological Chemistry* 271, 48, 30709–30716

Temme S, Jacoby C, Ding Z, Bönner F, Borg N, Schrader J, Flögel U (2014), Technical Advance: Monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive 19F MRI, *Journal of Leukocyte Biology* 95, 689-697

Van Venrooij WJ, Pruijn GJM (2014) How citrullination invaded rheumatoid arthritis Research, *Arthritis Research & Therapy* 16, 103, 1-5

Vencovský J, Macháček S, Šedová L, Kafková J, Gatterová J, Pešáková V, Růžičková Š (2003), Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis, *Annals of the Rheumatic Diseases* 62, 427–430

Voigt P, LeRoy G, Drury WJ, Zee BM, Son J, Beck DB, Young NL, Garcia BA, Reinberg D (2012), Asymmetrically Modified Nucleosomes, *Cell* 151, 181–193

Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MMA, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg W, van Venrooij WJ, Joosten LAB (2003): Citrullination of Synovial Proteins in Murine Models of Rheumatoid Arthritis, *Arthritis & Rheumatism* 48, 9, 2489-2500

Literaturverzeichnis

Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij WJ (2004), Citrullination, a possible functional link between susceptibility genes and rheumatoid arthritis, *Arthritis Research & Therapy* 6, 1-5

Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM (2003), PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease, *BioEssays* 25, 1106–1118

Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis D, Coonrod SA (2009), Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation, *The Journal of Cell Biology* 184, 2, 205–213

Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA (2004), Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethylation, *Science* 306, 279-283

Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ (2008), Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome, *Nature Genetics* 40, 897–903

Willemze A, van der Woude D, Ghidey W, Lebarht EWN, Stoeken-Rijsbergen G, Verduyn W, de Vries RRP, Houwing-Duistermaat JJ, Huizinga TWJ, Trouw LA, Toes REM (2011), The Interaction Between HLA Shared Epitope Alleles and Smoking and Its Contribution to Autoimmunity Against Several Citrullinated Antigens, *Arthritis & Rheumatism* 63, 7, 1823-1832

Literaturverzeichnis

Wulff Westergaard M, Holck Draborg A, Troelsen L, Jacobsen S, Houen G (2015), Isotypes of Epstein-Barr Virus Antibodies in Rheumatoid Arthritis: Association with Rheumatoid Factors and Citrulline-Dependent Antibodies, *BioMed Research International* 472174

Yamada R, Suzuki A, Chang X, Yamamoto K (2005), Citrullinated proteins in rheumatoid Arthritis, *Frontiers in Bioscience* 10, 54-64

Young AL, Carter WG, Doyle HA, Mamula MJ, Aswad DW (2001), Structural Integrity of Histone H2B in Vivo Requires the Activity of Protein L-Isoaspartate O-Methyltransferase, a Putative Protein Repair Enzyme, *The Journal of Biological Chemistry* 276, 40, 37161-37165

Young NL, DiMaggio PA, Garcia BA (2010), The significance, development and progress of high-throughput combinatorial histone code analysis, *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 3983–4000

Zhang K, Williams KE, Huang L, Yau P, Siino JS, Bradbury EM, Jones PR, Minch MJ, Burlingame AL (2002), Histone Acetylation and Deacetylation: Identification of Acetylation and Methylation Sites of HeLa Histone H4 by Mass Spectrometry, *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 500-508

Eidesstattliche Versicherung

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum,

Julia Karthein