

Aus dem Lehrstuhl für Molekularbiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Peter Becker



Die Bestimmung der Histon H4-Acetylierungsmuster in PBMCs im Alterungsprozess des Menschen mittels Massenspektrometrie

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von: Esther Marie Bux
aus: Schleswig

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Axel Imhof

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Vogeser
Prof. Dr. Dr. Matthias Kroiß

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Shahaf Peleg

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2022

Für meine Eltern und für meinen Seelenfrieden.

*Der Sturm wird immer stärker. Das macht nichts. Ich auch.
Astrid Lindgren, 'Pippi Langstrumpf'*

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Die Bestimmung der Histon H4-Acetylierungsmuster in PBMCs im Alterungsprozess des Menschen mittels Massenspektrometrie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

24214 Lindau, 7. November 2022

Esther Marie Bux

Papers und Veröffentlichungen

Bux, Esther Marie, et al. "Determining histone H4 acetylation patterns in human peripheral blood mononuclear cells using mass spectrometry." *Clinical Mass Spectrometry* (2019) (Bux *et al.* (2019))

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Chromatin - Einführung	3
2.1.1	Heterochromatin und Euchromatin	6
2.2	Epigenetik	8
2.3	Histone - Einführung	11
2.3.1	Die Histon-Code-Hypothese	13
2.4	Histonmodifikationen und Pathologien im Menschen	14
2.4.1	Histonacetylierung und maligne Erkrankungen	15
2.4.2	Epigenetik und das Alter	21
2.4.2.1	Diabetes	22
2.4.2.2	Epigenetische Veränderungen bei Diabetes Typ 1	24
2.4.2.3	Epigenetische Veränderungen bei Diabetes Typ 2	27
2.4.3	Histonacetylierung und Neurodegeneration	29
2.4.3.1	Globale Veränderung der Acetylierung bei der Alzheimer-Demenz	30
2.5	Aufgabenstellung	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Humane Proben	34
3.1.1	Vorversuche	35
3.1.1.1	Lymphozytenaufreinigung vs. neutrophile Granulozyten vs. PBMCs	35
3.1.1.2	Titrationversuch	39
3.1.2	Probandenselektion	41
3.1.3	Laborergebnisse	41
3.1.4	Ergebnisse der Massenspektrometrie	42
3.1.4.1	Prozentualer Anteil der Acetylierungen in humanen PBMCs	43

3.1.4.2	Aufschlüsselung des Monoacetylierungsmusters in humanen PBMCs	44
3.1.4.3	Aufschlüsselung des Diacetylierungsmusters in humanen PBMCs	45
3.1.4.4	Aufschlüsselung des Triacetylierungsmusters in humanen PBMCs	46
3.1.4.5	Aufschlüsselung des Tetraacetylierungsmusters in humanen PBMCs	47
3.2	Das Maus-Modell	48
3.2.1	Histonacetylierung in den mPBMCs	48
3.2.1.1	Prozentualer Anteil der Acetylierungen in murinen PBMCs	49
3.2.1.2	Aufschlüsselung des Monoacetylierungsmusters in murinen PBMCs	51
3.2.1.3	Aufschlüsselung des Diacetylierungsmusters in murinen PBMCs	51
3.2.1.4	Aufschlüsselung des Triacetylierungsmusters in murinen PBMCs	52
3.2.1.5	Aufschlüsselung des Tetraacetylierungsmusters in murinen PBMCs	53
3.2.2	Histonacetylierung im Hippocampus	54
3.2.2.1	Prozentualer Anteil der Acetylierungen im murinen Hippocampus	54
3.2.2.2	Aufschlüsselung des Monoacetylierungsmusters im murinen Hippocampus	56
3.2.2.3	Aufschlüsselung des Diacetylierungsmusters im murinen Hippocampus	57
3.2.2.4	Aufschlüsselung des Triacetylierungsmusters im murinen Hippocampus	57
3.2.2.5	Aufschlüsselung des Tetraacetylierungsmusters im murinen Hippocampus	58
4	Diskussion	60
4.1	Vor- und Nachteile der massenspektrometrischen Messung	60
4.2	Interpretation der Ergebnisse aus den humanen Proben unter dem Aspekt der zellulären Bedeutung	61
4.2.1	Veränderungen der Muster der Monoacetylierungen	61
4.2.2	Veränderungen der Muster der Diacetylierungen	63
4.2.3	Veränderungen der Muster der Triacetylierungen	64

4.2.4	Veränderungen der Muster der Tetraacetylierungen	65
4.3	Interpretation der Ergebnisse aus den murinen Proben unter dem Aspekt der zellulären Bedeutung	66
4.3.1	Veränderungen der Muster der Monoacetylierungen	67
4.3.2	Veränderungen der Muster der K5-Acetylierung	68
4.3.3	Veränderungen der Muster der K8-Acetylierung	69
4.3.4	Veränderungen der Muster der K12-Acetylierung	70
4.3.5	Veränderungen der Muster der K16-Acetylierung	71
4.4	Der Warburg Effekt - Eine Hypothese	72
4.5	Kritischer Ausblick	78
5	Material and Methoden	79
5.1	Ethik	79
5.2	Material	80
5.2.1	Reagenzien und Chemikalien	80
5.2.2	Enzyme und Antikörper	81
5.2.3	Material	81
5.2.4	Geräte	81
5.2.5	PBMC-Isolation aus humanem Blut	82
5.2.6	PBMC-Isolation aus murinem Blut	82
5.3	Methoden	83
5.3.1	Molekularbiologische Methoden	83
5.3.1.1	Herstellung von Tris-Glycin SDS-Polyacrylamid-Gelen für die Elektrophorese	83
5.3.1.2	Anfärbemethode - Kolloidalblau (Colloidal Blue)	84
5.3.1.3	Spektralphotometrie	84
5.3.2	Proteinmethoden	85
5.3.2.1	Histoneextraktion mit dem hypotonen Lysepuffer (A1)	85
5.3.2.2	Histoneextraktion mithilfe der Säureextraktion	86
5.3.2.3	SDS-Page	86
5.3.3	Proteom-Analyse	86
5.3.4	Enzym-Essays	88
5.3.4.1	ATP-Citrat-Lyase-Aktivitäts-Essay	88
5.3.5	Massenspektrometrie	89
5.3.5.1	In-Gel Trypsinverdau	89
5.3.5.2	Entsalzen	90
5.3.5.3	Massenspektrometrie-Analyse	91
5.3.5.4	Analyse der Histonmodifikationen	91

6	Abkürzungsverzeichnis	93
7	Danksagung	95
	Glossar	96
	Literaturverzeichnis	96
8	Anhang - Zustimmung der Ethikkommission	111

Abbildungsverzeichnis

2.1	Die Kristallstruktur der Kernhistone	4
2.2	Die Kristallstruktur des Nukleosoms	5
2.3	Vereinfachte Darstellung des Chromatosoms	6
2.4	Die Solenoid- und Zigzagstruktur des Chromatins	7
2.5	Effekte der DNA-Methylierung	11
2.6	Bekannte HDACs und ihre Dysregulation in Krebserkrankungen	16
2.7	Zusammenhang aus Infektanfälligkeit, Immunkompetenz und Alter	22
2.8	Atherosklerose in hyperglykämischen Mäusen	26
2.9	Die „Lernblockade“ von HDAC2	32
3.1	Heatmaps der Spezifität der H4-PTM-Antikörper	34
3.2	Schematische Isolation der PBMCs	36
3.3	Antikörper-Aufreinigung mit MicroBeads	37
3.4	Leukozyten-Arten im menschlichen Blut	38
3.5	Schematische Isolation der PBMCs	40
3.6	Übersicht der Acetylierungen in humanen PBMCs	43
3.7	Aufschlüsselung des Monoacetylierungsmusters in humanen PBMCs	45
3.8	Übersicht der Diacetylierungen in den hPBMCs	46
3.9	Übersicht der Triacetylierungen in den hPBMCs	47
3.10	Übersicht der Tetraacetylierungen in den hPBMCs	48
3.11	Übersicht der Acetylierungen in den mPBMCs	50
3.12	Übersicht der Monoacetylierungen in den mPBMCs	51
3.13	Übersicht der Diacetylierungen in den mPBMCs	52
3.14	Übersicht der Triacetylierungen in den mPBMCs	53
3.15	Übersicht der Tetraacetylierungen in den mPBMCs	54
3.16	Übersicht der Acetylierungen im murinen Hippocampus	55
3.17	Übersicht der Monoacetylierungen im murinen Hippocampus	56
3.18	Übersicht der Diacetylierungen im murinen Hippocampus	57
3.19	Übersicht der Triacetylierungen im murinen Hippocampus	58
3.20	Übersicht der Tetraacetylierungen im murinen Hippocampus	59
4.1	Vergleich der Monoacetylierungsmuster in mPBMCs und mHippocampi	68

4.2	Vergleich der Monoacetylierungsmuster in mPBMCs und mHippocampi	69
4.3	Vergleich der Monoacetylierungsmuster in mPBMCs und mHippocampi	70
4.4	Vergleich der Monoacetylierungsmuster in mPBMCs und mHippocampi	71
4.5	Vergleich der Monoacetylierungsmuster in mPBMCs und mHippocampi	72
4.6	Der Warburg-Effekt	74
4.7	Stoffwechselwege in nicht-proliferierenden und proliferierenden Zellen .	75
4.8	Genaktivierung bzw. -deaktivierung mittels HATs und HDACs	77
5.1	Die Aminosäuresequenz des Histons H4	92

Tabellenverzeichnis

2.1	Überblick: Eigenschaften des Euchromatins und Heterochromatins . . .	8
2.2	Regulation der Genexpression durch non-coding RNAs	12
2.3	Die veränderte Aktivität von HATs und HDACs in verschiedenen malignen Erkrankungen des Menschen	16
2.4	Übersicht der HATs und ihr Effekt auf Zellvorgänge	21
2.5	Formen der primären Demenz	30
3.1	Übersicht: PBMCs vs. Lymphozytenaufreinigung	39
3.2	Blutbild der Probanden	42
4.1	Vor- und Nachteile der massenspektrometrischen Messung	61
4.2	Durchschnittliche H4-Monoacetylierung	62
4.3	Durchschnittliche H4-Diacetylierungen	64
4.4	Durchschnittliche H4-Triacetylierungen	65
4.5	Durchschnittliche H4-Tetraacetylierungen	65
4.6	Durchschnittliche H4-Gesamtacetylierung in Mäusen	66
4.7	Durchschnittliche H4-Monoacetylierungen	67
4.8	Durchschnittliche H4-K12Ac	70
4.9	Durchschnittliche H4K16Ac	72

1

Kapitel 1

Zusammenfassung

Die Epigenetik ist ein relativ neues und sehr spannendes Forschungsgebiet, welches nicht nur neue Möglichkeiten für mehr Verständnis von Zellprozessen und der Physiologie von Organismen, sondern auch für die Entwicklungen neuer medikamentöser Therapien von Krankheiten eröffnen kann. Da es sich um ein - zu Beginn dieser Doktorarbeit (2014) - noch in vielen Bereichen unerforschtes Feld handelte, sollte ein Protokoll zur reproduzierbaren und schnellen Analyse von Histonacetylierungen des Histons H4 in leicht zugänglichen, menschlichen Zellen entwickelt werden. Hierfür wurden nach Vorversuchen die sogenannten PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells / mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) selektiert und die Analyse mittels Massenspektrometrie gewählt, um einer Kreuzreaktion der Antikörper und damit falschen Ergebnissen vorzubeugen (s. 3.1). Um den Rahmen dieser Arbeit einzuhalten, beschränkten sich die Versuche nur auf die Histonmodifikation der Acetylierung des Histons H4.

Zudem sollte herausgefunden werden, ob und wenn ja, inwiefern, sich die Modifikationen über den Alterungsprozess des Menschen hinweg verändern. Da ein Vergleich z.B. von Proben des zentralen Nervensystems und der mononukleären Zellen des peripheren Blutes mangels Studienlage und auf Grund der Nicht-Beschaffbarkeit dieser Proben nicht möglich war, wurde zusätzlich ein Mausversuch durchgeführt und die Ergebnisse aus dem murinen peripheren Blut mit denen aus dem murinen Hippocampus verglichen. Dies war insbesondere deswegen interessant, da bereits bekannt ist, dass Mäuse im Alter langsamer lernen (Peleg *et al.* 2010) und eine zunehmende Vergesslichkeit auch in unserer Gesellschaft als ein Symptom des Alterns angesehen wird.

Tatsächlich ließen sich einige Veränderungen der Histonmodifikationen über die Altersgruppen hinweg identifizieren. So sank die Monoacetylierung signifikant bei der mittelalten Gruppe ab, um im Alter wieder signifikant und annähernd auf das Level der jungen Gruppe anzusteigen, die Diacetylierungen sanken mit steigendem Alter signifikant ab und die Triacetylierungen stiegen signifikant an. Besonders interessant, wenngleich auch in gewisser Weise tragisch, war die Tatsache, dass einer der Probanden in seinem Blutbild deutliche Zeichen einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zeigte. Dieser Proband wies z.B. erniedrigte Level der Histon H4K16-Acetylierung auf, wie es auch andere Autoren bereits beschrieben (Fraga *et al.* 2005). Der Vergleich der

murinen Histonacetylierungslevel in PBMCs vs. Hippocampus zeigte, dass die Gesamt-Acetylierung in den Hippocampi deutlich höher war, als in den peripheren Blutzellen, was sinnvoll erscheint, da ein höheres Level an Acetylierungen mit einem besseren neuronalen Schutz einherzugehen scheint (Dmitriev & Papkovsky 2015).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass das Protokoll zur Prozessierung menschlicher, wie muriner Zellen mithilfe der Massenspektrometrie zuverlässig funktioniert und hiermit auch kleinste Veränderungen der Histonacetylierung ($< 1\%$) reliabel als solche identifiziert werden können. Diese Ergebnisse in der Sensitivität und Spezifität sind mit Antikörper-basierten Methoden derzeit nicht reproduzierbar. Am erfolgsversprechendsten für einen möglichen Biomarker für z.B. neuronale oder sogar maligne Erkrankungen im peripheren Blut bzw. in den PBMCs zeigten sich die Modifikationen der H4K12- und H4K16-Monoacetylierung (Vgl. s. 4.2.1 und 4.3.1). Hier müssten jedoch, genau wie zur Überprüfung und weiteren Untermauerung der anderen Ergebnisse dieser Arbeit, weitere Studien an größeren Kohorten durchgeführt werden. Allein schon um einen verlässlichen Normwertbereich mit hoher Sensitivität und Spezifität definieren zu können, muss die Kohorte groß genug sein, um die Gaußsche Normalverteilung anwenden und Ausreißer auch als solche identifizieren zu können. Da dies den Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch gesprengt hätte, kann sie als Grundstein für fortführende Studien und Untersuchungen an größeren Patientengruppen fundieren.

2 Kapitel 2

Einleitung

2.1 Chromatin - Einführung

Chromatin im medizinischen Sinne beschreibt den Komplex von Nukleinsäuren und Proteinen im eukaryontischen Zellkern, welche während der Zellteilung kondensieren und so die Chromosomen formen. Eine bedeutende Eigenschaft von ihnen ist die gute Anfärbbarkeit mit basischen Kernfarbstoffen, welche auch zu ihrem Namen **Chromatin** aus „*chroma*“ (griech. für Farbe) und dem chemischen Suffix „*in*“ führte. Der Wortursprung für das **Chromosom** ist ähnlich gehalten. „*Chroma*“ (griech. für Farbe) und „*soma*“ (griech. für Körper), der anfärbbare Körper der Zelle.

Chromatin hat die essentielle Aufgabe, die DNA so weit zu kondensieren, dass jene in den Zellkern passt. Ferner erlaubt es der Zelle, die Mitose einzuleiten, es verhindert Schäden an der DNA oder die Zellteilung geschädigter Zellen. Nicht zuletzt ist es auch dafür zuständig die Genexpression, das Ablesen der DNA und die Replikation zu kontrollieren. Je nach dem Grad der Kondensation kann Chromatin in *Heterochromatin* (stark kondensiert = „ausgeschaltete DNA“) und *Euchromatin* (offenere Struktur = „angeschaltete DNA“) unterschieden werden. Ein spezielles Beispiel für stark kondensiertes Chromatin ist das sogenannte Barr-Körperchen - das inaktive X-Chromosom in den weiblichen somatischen Zellen.

Um das Chromatin anschaulich zu erklären, kann sich eines Bildnisses bedient werden. Das humane Genom besteht aus ungefähr 3.2×10^9 DNA Bausteinen (human genome project HGP 2003). Wenn man davon ausgeht, dass 10bp in der Doppelhelixstruktur eine Länge von 3.4nm ($3,4 \times 10^{-9}$ m) aufweisen, so ergibt sich die Gesamtlänge von etwa 1m für eine Genomkopie. Da die meisten menschlichen Zellen jedoch diploid (2n) sind und auch die zirkuläre mitochondriale DNA mit ihrer Länge von 16569bp (Smith *et al.* 1981) hinzugezählt werden muss, entspricht die Gesamtlänge der menschlichen DNA, aufgeteilt auf ihre 46 Chromosomen, dem Äquivalent eines 2nm dünnen und 2m langen Fadens. Der Zellkern jedoch hat nur einen Durchmesser von etwa $6\mu\text{m}$, was, um bei dem Bildnis zu bleiben, etwa so wäre, als würde man versuchen einen 2000km langen Faden in eine kleine Kugel mit einem Durchmesser von 6mm zu pressen. Um es sich besser vorstellen zu können: Würde man von München aus einen 2nm dünnen

Faden nach Marseille und wieder zurück spannen, so müsste man jenen dann in eine kleine Erbse verpacken aber so, dass ein bestimmter Abschnitt von 2mm in kürzester Zeit gefunden werden könnte.

Da die DNA jedoch kein durchgängiger Faden ist, sondern auf die 46 Chromosomen und die mitochondriale zirkuläre DNA aufgeteilt ist, ergibt sich molekularbiologisch ein interessantes Bild. Der DNA-Doppelstrang liegt meist in der B-Konformation (Rotation gegen den Uhrzeigersinn „right-handed“, 10bp pro Drehung) vor und misst einen Durchmesser von etwa 2nm. Da die vertikalen Abstände der beiden DNA-Einzelstränge nicht gleich groß sind, entstehen eine *kleine* (etwa 1,2nm breit) und eine *große Furche* (etwa 2,2nm breit). Das Phosphatdesoxyribose Rückgrat weist dabei eine negative Ladung auf und so kann sich die DNA einem Proteinkomplex, dem sogenannten *Histonoktamer* anlagern. Dieses besteht aus jeweils zwei Kopien der positiv geladenen Histone H2A, H2B, H3 und H4 (Abb. 2.1). Diese sogenannten *Kernhistone* oder englisch *core histones* ordnen sich in einer flachen, scheibenähnlichen Form an und weisen eine Höhe von etwa 5.5nm und einen Durchmesser von etwa 11nm auf (Richmond *et al.* 1984, Luger *et al.* 1997). Die DNA wickelt sich mit einer Länge von etwa 146bp in 1.67 linksgängigen, superhelikalen Drehungen um diese *Kernhistone* (Abb. 2.2) und bildet mit ihnen die kleinste sich wiederholende Verpackungseinheit aus, das *Nukleosom* bzw. das *Nukleosom-Kernteilchen* (*engl. nucleosome core particle*) (Lorch & Kornberg 1994).

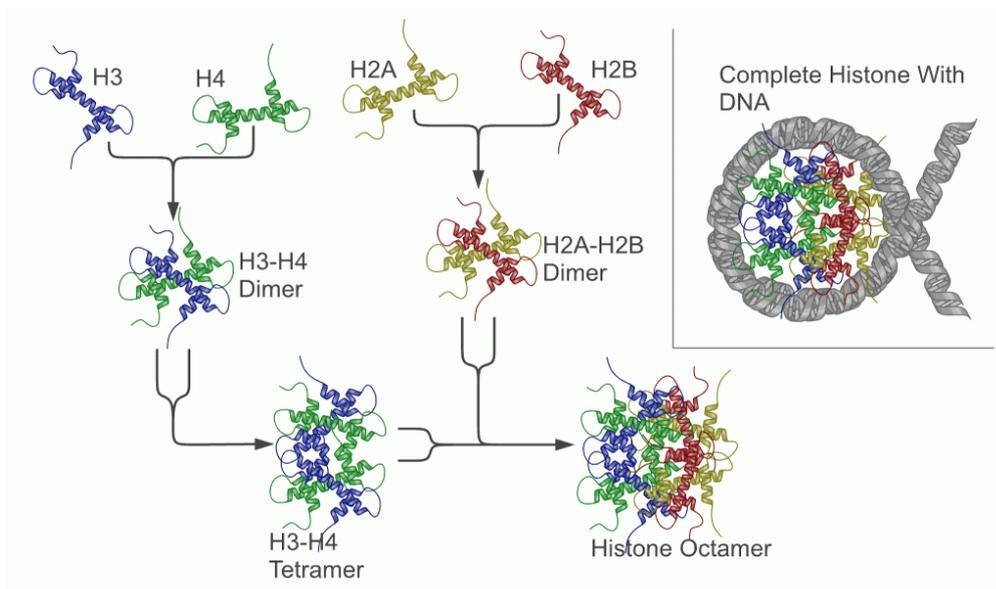


Abbildung 2.1: **Die Kristallstruktur der Kernhistone (H2A, H2B, H3, H4), welche gemeinsam das Histonoktamer bilden** [Ref: CC-Lizenz (Autor: Richard Wheeler (Zephyris))].

Die DNA Abschnitte zwischen den benachbarten Nukleosomen werden auch *linker*

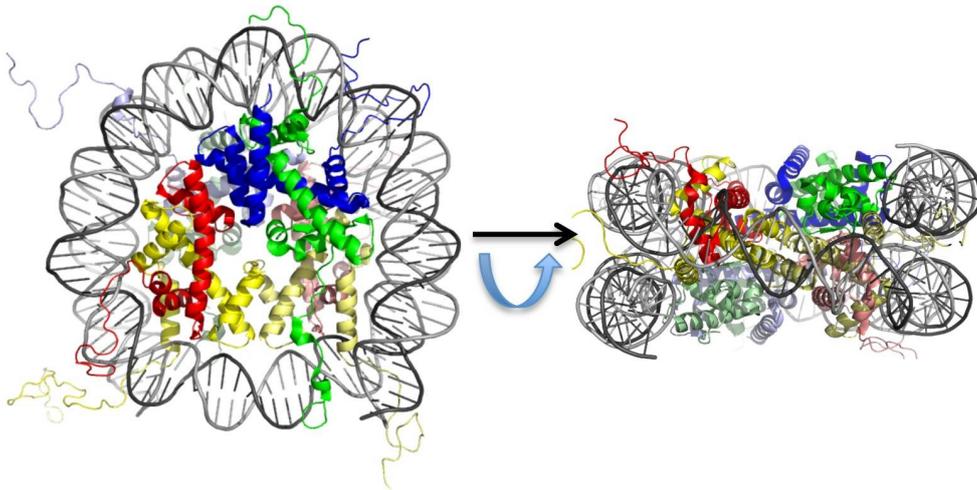


Abbildung 2.2: **Die Kristallstruktur des Nukleosoms.** Es wird ein Blick auf das Nukleosom mit den Kernhistonen durch die superhelikale Achse gezeigt und ein Blick auf das Nukleosom, welches um 90° um die horizontale Achse rotiert wurde. Die DNA wickelt sich mit einer Länge von etwa 146bp in 1.67 linksgängigen, superhelikalen Drehungen um die Kernhistone (H2A grün, H2B blau, H3 gelb, H4 rot; je weiter die Histone vom Auge des Betrachters entfernt liegen, desto heller ist die Farbe gewählt). [Ref: Cutter & Hayes 2015, PMC-Lizenz]

DNA genannt und haben eine variierende Länge von etwa 20-80bp. Das Histon H1, welches nicht Teil des Histonoktamers und deswegen auch kein Kernhiston ist, bindet nicht nur an das Nukleosom, sondern auch an die *linker DNA* und führt somit zu einer Stabilisierung der Konformation. Diese Bindung mit der *linker DNA* führte zu der Namensgebung *Linker Histon* für das Histon H1. Das *Nukleosom Kernteilchen* zusammen mit dem *Linker Histon* wird auch *Chromatosom* genannt (Abb. 2.3).

Auf Grund der unterschiedlichen Sequenzen des Nukleosoms zusammen mit der *linker DNA*, bildet sich unter niedrigen Salzkonzentrationen bei Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop eine Formation, die an eine Perlenkette erinnert. Dies führte zu der berühmten Namensgebung der sogenannten „beads-on-a-string-fibre“ (Olins & Olins 1974) - also der Perlenketten-Faser. Diese Formation gilt mit ihren 10-11nm als die kleinste Verpackungseinheit des Genoms. Um die DNA jedoch weiter zu kondensieren, verbinden die *linker DNA* und H1 benachbarte Nukleosomen miteinander und formen so die *30nm Chromatinfaser*. Nichtsdestotrotz ist es allgemein bekannt, dass die Chromatinkonformation stark von der Ionenkonzentration abhängig ist. Momentan existieren somit zwei Erklärungsmodelle für die in vitro nachfolgenden Formationen. Eine mögliche Konformation ist die *Solenoidstruktur* („solen“ griech. für Kanal und „eidōs“ für Form), bei der sich die aufeinanderfolgenden linker DNA und somit auch die aufeinanderfolgenden Nukleosomen weiterhin mit sich verdrillen und sich die „beads-on-

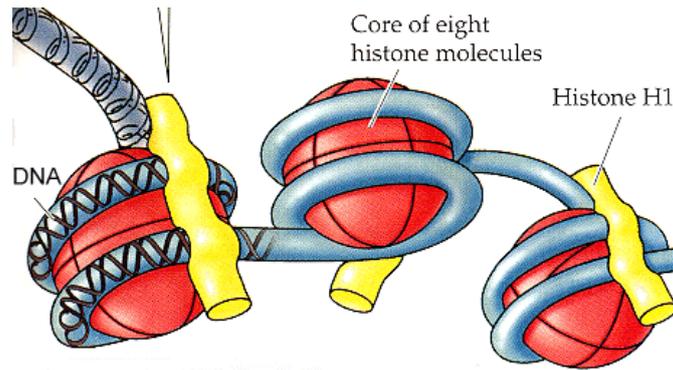


Abbildung 2.3: **Eine vereinfachte Darstellung des Chromatins mit dem gebundenen Histon H1 und der linken DNA.** Das Protein H1 bindet die aus dem Nukleosom eintretende und austretende DNA und stabilisiert so deren Windung um die Kernhistone. [Ref: CC-Lizenz (Autor: David O Morgan)]

a-string-Struktur durch Interaktion der N-terminalen Enden der Histonoktamere zu einer helikalen Struktur organisiert (diskutiert in Robinson *et al.* 2006). Die Namensgebung erklärt sich daraus, dass diese Form ähnlich wie eine Spule anmutet. Eine weitere mögliche Konformation ist die *Zigzagstruktur* bei der zwei gegenüberliegende Nukleosomen miteinander interagieren, wobei die linker DNA relativ geradlinig bleiben kann und sich ein Doppelstrang bildet (*two-start helix*) (Bednar *et al.* 1998). Es wurde lange Zeit angenommen, dass eine Mischung aus beiden Konformationen die 3D Struktur der 30nm Chromatinfaser ausbilden würde (Horowitz *et al.* 1994). Und obwohl neuere Ergebnisse die Annahme einer *Zigzagstruktur* unterstützen (Schalch *et al.* 2005), so zeigte sich doch, dass vermutlich eher asymmetrische und irreguläre Konformationen die 30nm Chromatinstruktur bilden (rezensiert in Tremethick 2007). Es ist somit zwar bekannt, dass die DNA weiter kondensiert werden kann aber detaillierte strukturelle Informationen oder Daten sind weiterhin ein diskutiertes Feld der Forschung (rezensiert in Hansen 2012).

2.1.1 Heterochromatin und Euchromatin

Basierend auf den mikroskopischen Beobachtungen kann das Genom in zwei Chromatindichtegrade eingeteilt werden: Zum einen in das fester verpackte und besser anfärbbare *Heterochromatin* und zum anderen in das etwas weniger komprimierte *Euchromatin* (Heitz 1928). Im Allgemeinen gilt, dass die DNA, welche als *Euchromatin* vorliegt, einfacher zugänglich ist und somit die genregulierenden Proteine und RNA-Polymerasen einfacher binden können. Dies führt dazu, dass die Transkription initiiert werden kann. *Heterochromatin*, auf der anderen Hand, kann weiterhin als eine *konstitutive* und eine *fakultative* Form existieren. Als *konstitutives Heterochromatin* wird häufig die

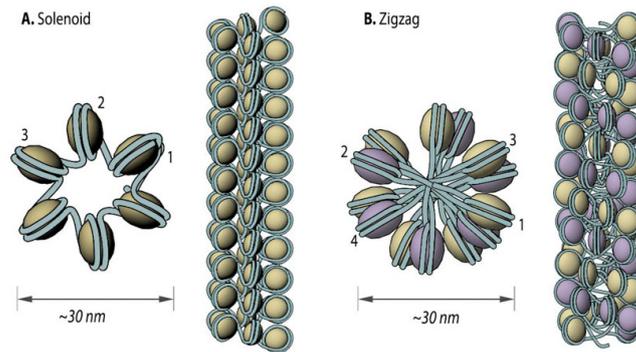


Abbildung 2.4: **Die Modelle der Solenoid- (A) und Zigzagstruktur (B) in der Chromatinkondensation.** Es wird angenommen, dass die 30nm Chromatinfaser in diesen zwei Konformationen vorkommen kann. Bei der Solenoidstruktur interagieren nachfolgende Nucleosomen und deren Linker-DNA miteinander, sodass sich eine Art gleichmäßige „Spulenform“ ergibt. Die Histonoktamere folgen ihrer Reihenfolge (1, 2, 3, etc.). Bei der Zigzagstruktur interagieren gegenüberliegende Nucleosomen miteinander, sodass die linker DNA relativ geradlinig verlaufen kann und wechselnde Histonoktamere in Kontakt miteinander treten (1 und 3, 2 und 4 etc.). [Ref: CC-Lizenz, MBInfo, Link: 10/21/2014 <http://mbinfo.mbi.nus.edu.sg/figure/1389943144002/>]

perizentromere und telomere Region des Chromosoms bezeichnet, da diese in allen somatischen Zellen eines eukaryontischen Organismus an derselben Stelle in ihrer hoch kondensierten Form vorkommt. Der Name *konstitutives Heterochromatin* beschreibt also jenes Heterochromatin, das in allen Zellen des Organismus an derselben Lokalisation vorkommt. Das *fakultative Heterochromatin* hingegen bildet sich nur in einigen Zellen. Das wohl bekannteste Beispiel hierfür ist das weibliche inaktivierte und stark kondensierte X-Chromosom - das sogenannte Barr-Körperchen.

Die Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die Eigenschaften des Euchromatins und Heterochromatins.

Eigenschaft	Euchromatin	Heterochromatin
Erscheinung in der Interphase	relativ unkondensiert	kondensiert
Lokalisation auf dem Chromosom	distal	perizentromer
Sequenz-Zusammensetzung	meist nicht repetitiv	repetitiv
Gendichte	hoch	gering oder fehlend
Replikationszeit	über die S-Phase	späte S-Phase
Meiotische Rekombination	normal	gering oder fehlend
Charakterisierende Proteine	GAGA Faktor und andere	HP-1 und manche SU(VAR)s
Positioneffekt-Variegation (PEV)	selten	häufig
Methylierungsstatus (in Wirbeltieren)	CpG Inseln hypomethyliert	vollständig methyliert
Histonacetylierung	gering bis hoch	gering
Nukleosomenabstand	variiert	regelmäßig
Nukleasenzugänglichkeit	variiert	gering
Micrococcal-Nukleasen-Verdau	variable Längen der Fragmente	gleichmäßige Länge der Fragmente

Tabelle 2.1: **Überblick über die Eigenschaften des Euchromatins und Heterochromatins** (verändert nach Henikoff 2000)

2.2 Epigenetik

Die Epigenetik beschreibt das Forschungsfeld, welches sich mit der Erforschung der mitotischen und meiotischen, vererbaren Veränderungen der Genfunktion beschäftigt, die nicht mit Veränderungen der DNA-Sequenz erklärt werden können (Kegel 2013). Somit erklärt sich auch die Namensgebung mit dem altgriechischen Präfix „*epi*“, welches so viel wie „dazu“ oder „außerdem“ bedeutet. In anderen Worten untersucht die Epigenetik also jene molekularbiologischen Informationen, welche Zellen speichern und an ihre Tochterzellen weiter geben können, welche jedoch nicht in Form von Veränderungen ihres Genotyps erkennbar sind.

Der menschliche Körper besteht aus rund 100 Billionen Zellen. Jede dieser Zellen enthält dasselbe Genom und somit auch dieselbe genetische Information. Dennoch unterscheidet sich z.B. eine Gehirnzelle doch sehr von einer Leberzelle. Die Gehirnzelle wiederum kann weitere Subtypen aufweisen, welche sehr verschiedene Aufgaben übernehmen können z.B. die Purkinjenzellen und die Astrozyten. Die Astrozyten können wiederum in weitere Subtypen mit spezialisierten Aufgaben und Eigenschaften eingeteilt werden, wie die fibrillären Astrozyten und die protoplasmatischen Astrozyten. Ihnen allen ist dennoch

derselbe genetische Code gemein, obwohl sie völlig verschiedene Erscheinungsbilder, Charakteristika und Funktionen haben können. Und während die gängige Genetik diesen Umstand nicht erklären kann, ebenso wenig wie die Tatsache, wieso manche Menschen, die dieselbe genetische Mutation aufweisen (z.B. monozygote Zwillinge) manchmal erkranken und manchmal nicht, so liefert die Epigenetik eine Antwort darauf.

Das relativ neue Forschungsfeld der Epigenetik erkundet die Details und Modifikationen - die sogenannten *epigenetischen Marker* - welche verantwortlich für die Zellidentität und/oder -pathologien sind. Die Gesamtheit der *epigenetischen Marker* wird hierbei auch als das *Epigenom* bezeichnet. Die Verteilung und Verbreitung des *Epigenoms* auf der DNA ist u.a. dafür verantwortlich, dass Gene vermehrt oder vermindert exprimiert werden. Weiterhin können ganze DNA-Regionen oder einzelne Gene „abgeschaltet“ werden (Gen Silencing). Diese Veränderungen der Genexpression können variabel, stabil oder weniger stabil sein. Manchmal ist es ein schnelles und veränderbares System, manchmal sind die Modifikationen permanent. Dennoch ist es für die Zelle von größter Bedeutung, dass sie das Muster der Genexpression bzw. ihr *Epigenom* trotz der möglichen Schäden durch die DNA Replikation, der DNA Reparatur, der Chromatinanordnung, wie auch der eher radikalen DNA Verpackung, welche während der Mitose ablaufen, behält. Man kann sich das *Epigenom* also wie die Software der Zelle vorstellen. Es ermöglicht der Zelle, die Hardware - in diesem Fall die DNA - auf die ökonomischste und beste Art und Weise zu nutzen, ohne Datenmüll zu kreieren, welcher entweder unvorteilhaft oder sogar giftig für die Zelle wäre (Spork 2010).

Weiterhin ist das *Epigenom* der Grund, weshalb Umweltfaktoren einen Einfluss auf unsere Zellen und sogar direkt auf die Regulation der Genexpression haben können. Der Vorteil hiervon ist, dass der Organismus anpassungsfähiger bleibt, selbst wenn sich seine Umwelt verändert. Nicht alle Veränderungen des *Epigenoms* sind jedoch von Vorteil. Genau wie genetischen Mutationen auftreten können, können auch sogenannte *Epimutationen* auftreten. Die Definition einer Epimutation ist die Veränderung der Genaktivität ohne ersichtliche Veränderungen in der DNA-Sequenz, also ohne Assoziation zu Mutationen der DNA, vielmehr beschreibt sie einen Verlust oder eine Steigerung der DNA-Methylierung oder anderer erblicher Veränderungen des Chromatins (Oey & Whitelaw 2014). Da genetische Mutationen sekundär auch zu epigenetischen Veränderungen führen können, welche auch als *Epimutationen* gedeutet werden könnten, führte Horsthemke 2006 die Unterscheidung in *primäre* und *sekundäre Epimutationen* ein (Horsthemke 2006). Die *primäre Epimutation* beschreibt hierbei die Veränderung der Genaktivität auf Grund von DNA Modifikationen nicht aber Mutationen und tritt häufig nach der Befruchtung auf, was zu einem somatischen Mosaizismus führt. Die *sekundäre Epimutation* jedoch ereignet sich auf Grund von einer Veränderung der DNA-Sequenz in einem cis- oder trans-agierenden Faktor, was zu einer möglicherweise beeinträchtigten

Zellfunktion führen kann. Somit hat das Forschungsfeld der *Epigenetik* auch gerade wegen der Erforschung kongenitaler Syndrome und maligner Vorgänge wie Krebs einen relativ großen Aufschwung erfahren.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Genaktivität zu verändern. Da die detaillierte Beschreibung all jener regulierenden Faktoren und Prozesse jedoch den Rahmen dieser Dissertation sprengen würden, so werden sie der Vollständigkeit halber nur kurz vorgestellt.

Die DNA-Methylierung ist der älteste bekannte epigenetische Mechanismus, welcher eng mit der Genrepression verknüpft ist (Razin & Riggs 1980). DNA-Methyltransferasen können Cytosinreste der CpG-Dinukleotide¹ der DNA-Matrize methylieren und damit die sogenannte „fünfte DNA-Base“ 5-Methylcytosin (5-mC) bilden. Die DNA-Methylierung ist jedoch nicht ubiquitär. In den meisten Zelltypen werden regulatorische Sequenzen, wie z.B. die House-keeping Gene von Methylierungen weitgehend frei gehalten. Zellspezifisch exprimierte Gene werden nur in den Zelltypen, in welchen sie auch transkribiert werden, unmethyliert belassen. Im Gegensatz dazu werden das Heterochromatin und jene Genregionen, welche nicht von Interesse für die Zelle sind, normalerweise in höchstem Maße methyliert und damit für die Bindung von Repressorproteinen und die Inaktivierung der korrespondierenden Gene zugänglich gemacht.

Histonproteine können einen großen Effekt auf die Regulierung der Genaktivität haben. Je nach Modifikation und Histonvariante können sie Gene unterdrücken oder aktivieren. Dies wird jedoch detaillierter im Kapitel 2.3 vorgestellt.

Nucleosome remodelers oder auf deutsch die Nukleosom-Umbauer können die Position der Nukleosomen auf der DNA ATP-abhängig verändern (Clapier & Cairns 2009), welches zu einer für Chromatinproteine besser oder schlechter zugänglichen DNA führen kann.

Non-coding RNAs (ncRNAs)² können eine große Anzahl von genregulierenden Funktionen ausüben. Chromatin-Modifikationen, Transkription, Splicing, RNA-Modifikationen, RNA-Translation und die RNA-Stabilität können von ihnen abhängig sein. Für einen Überblick sei auf die Tabelle 2.2 verwiesen.

¹Als CpG-Dinukleotide oder die CpG-Region wird jener Ort auf der DNA bezeichnet, auf welchem ein Guanin-Nukleotid auf ein Cytosin-Nukleotid in 5' → 3' Richtung folgt. CpG ist die Abkürzung für 5'—C—Phosphat—G—3'.

²Zelluläre RNA, welche nicht als transfer RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA) oder ribosomal RNA (rRNA) fungiert, wird gemeinhin als non-coding RNA (ncRNA) bezeichnet.

³Repeat-associated small interfering RNA

⁴Eine kleine, nukleäre RNA oder snoRNA

⁵Natural antisense small interfering RNA

⁶Trans-acting small interfering RNA

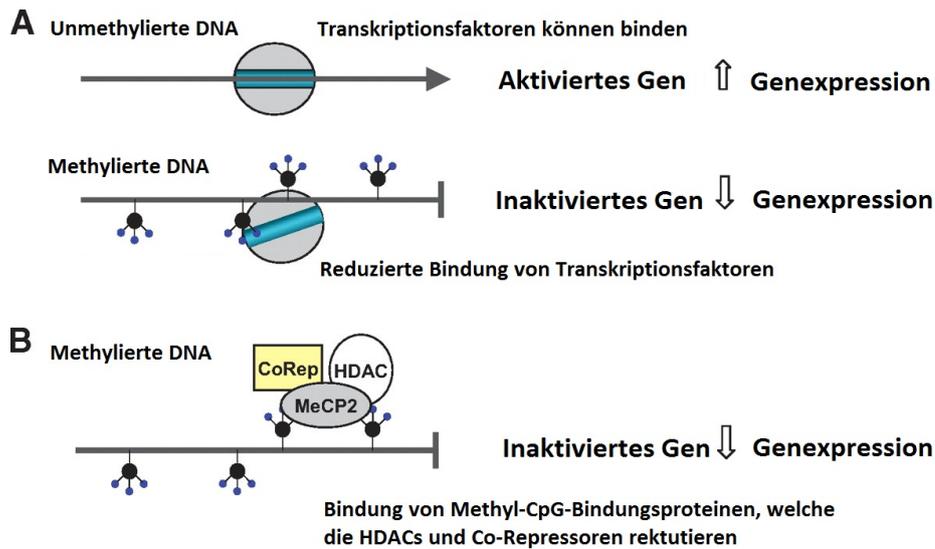


Abbildung 2.5: **Effekte der DNA-Methylierung auf die Genexpression.** A: Hohe Level an DNA-Methylierung verhindern die Bindung von Transkriptionsfaktoren und resultieren in inaktivierten Genabschnitten. B: Die DNA-Methylierung an Genpromotoren kann weiterhin die Gentranskription durch die Bindung von spezifischen repressiven Proteinen (Methyl-CpG-Bindungsproteine z.B. MeCP2) unterdrücken. Diese Proteine können wiederum HDACs und transkriptionale Co-Repressoren wie z.B. NCoR mobilisieren, was einen Effekt auf die Chromatinstruktur hat und zu einer Geninaktivierung führt (modifiziert nach Ling & Groop 2009, CC-Lizenz).

2.3 Histone - Einführung

Histone sind basische Proteine, welche Bestandteil des Chromatins sind und in jedem eukaryontischen Zellkern vorkommen - mit der Ausnahme von Fischsperma. Ihre Anzahl im Zellkern ist so zahlreich, dass ihre Gesamtmasse fast genauso groß ist, wie die Gesamtmasse der zellulären DNA⁷. Eine weitere erstaunliche Eigenheit der Histone ist der hohe Anteil an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (s.u.). Auch konnte gezeigt werden, dass Histone zwischen den Spezies hoch konserviert vorkommen. Dies zeigt, wie wichtig ihre Funktion und Aufgaben innerhalb der Zellen sind. Das Histon H4 z.B. unterscheidet sich zwischen der Spezies Rind und der Erbse nur um zwei seiner insgesamt 102 Aminosäurereste. Das Histon H3 mit seinen 135 Aminosäureresten variiert lediglich in vier Positionen, während H2A und H2B mehr signifikante und Spezies-spezifische Variationen zeigen. Demgegenüber steht die Gruppe der Histone H1, welche sich zwischen den Zelltypen und Spezies stark unterscheiden, oder, im Falle von der Hefe, sogar gänzlich fehlen können. Die Histone, welche Teil des Kernpartikels sind, sind also konserviert und ihre Gene, die sogenannten Histongene, durch fehlende Introns

⁷ cf. *Spektrum - Lexikon der Biologie: entry of "Histone"*

Prozess	Beispiel
Heterochromatinfunktion	rasiRNAs ³
DNA-Methylierung	siRNAs
DNA -Elimination	siRNAs
Genetische Prägung (Imprinting)	Xist RNA, mi-RNA-136, miRNA-127 and others
Transkription	Heat-shock RNA-1, steroid receptor RNA activator, non-coding repressor of NFAT and others
Alternatives Splicing	HBII-52 ⁴
mRNA s-Stabilität	natsiRNA ⁵ , tasiRNA ⁶ and miRNAs
Translation	miRNAs

Tabelle 2.2: **Überblick über die Regulation der Genexpression durch non-coding RNAs** (modifiziert nach Tost 2008).

(Spacer-Sequenzen) charakterisiert. Die Histongene sind typischerweise in Clustern organisiert (ein Gen für jedes der fünf Proteine) aber da sie teilweise in verschiedene Richtungen orientiert sind, können sie dennoch unabhängig voneinander abgelesen werden. Ferner fehlt der mRNA, welche von den Histongen kodiert wird, regelmäßig der poly(A)-Schwanz, welcher gewöhnlich in eukaryontischer mRNA vorkommt ⁸.

Die Histonproteine können in fünf Subtypen unterschieden werden: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Ihre molekulare Masse variiert von 11kDa (H4) bis 15kDa (H3). H2B wird mit seiner Molekularmasse von 14kDa häufig als sogenannte Loading Control - also Beladungskontrolle - z.B. bei Western Blots verwendet.

Bei der Bildung der Kernpartikel (s. Kapitel 2.1) überlagert die polyanionische DNA zum größten Teil die Histone, sodass lediglich die basischen Aminotermini aus dem Nukleosom herausragen wie kleine Schwänze (histone tails). Diese N-terminalen Enden können dann modifiziert werden und sind für die Interaktion zwischen den Histonen und anderen Molekülen verantwortlich. Auf Grund ihrer starken basischen Eigenschaften sind die Histone unter physiologischen Salz- und pH-Bedingungen positiv geladen. Diese positive Ladung kann durch den hohen Anteil der alkalischen Aminosäuren Lysin und Arginin erklärt werden und bildet die Basis zur Bildung des Nukleosoms. Die positiv geladenen Histone können mit dem negativ geladenen Ribose-Phosphat-Rückgrat der DNA (s. Kapitel 2.1) interagieren. Hierbei kann die kleine Furche der DNA ca. alle 10bp an die Histone und im Besonderen an die Argininseitenketten binden. Da die große Furche damit dem Nukleosomzentrum abgewandt ist, können hier z.B. regulatorische Proteine gebunden werden und interagieren.

Eine weitere gemeinsame Eigenschaft der Histone sind ihre globulären und überwiegend unpolaren carboxyterminalen Domänen, welche das Gerüst des Nukleosoms bilden.

⁸cf. *Spektrum - Lexikon der Biologie: entry of "Histone"*

Die N-terminalen Enden besitzen einen höheren Anteil an basischen Aminosäuren und halten daher polare Eigenschaften. Die globulären Regionen formen zum größten Teil Alpha-Helices (s. Abb. 2.2) und kreieren damit den eigentlichen Kernpartikel innerhalb des Nukleosoms. Die polaren N-Termini ragen dabei heraus und können modifiziert oder beeinflusst werden, was Auswirkungen auf das gesamte Nukleosom haben kann.

Die Abschnitte der DNA, in denen die DNA entweder aus dem Nukleosom austritt oder in jenes eintritt, liegen sehr nah beieinander, was zu der Theorie führte, dass das Linker Histon H1 hier lokalisiert sein muss. H1 kann relativ einfach vom Chromatin isoliert werden, ohne dass sich die Struktur des Nukleosoms dabei verändern würde, daher liegt die Annahme nahe, dass es außerhalb des Kernpartikels liegen muss. Da es Kontakt zu den Regionen der DNA, welche außerhalb des Nukleosoms liegen, hat und weiterhin zwei positiv geladene Enden aufweist, ist es ihm möglich, die entfernt gelegene DNA Abschnitte zusammen zu bringen und somit die sogenannten 30nm-Chromatinfibrillen (eine Superstruktur des Chromatins) aus den 10nm-Nukleofilamenten zu bilden ⁹.

Histone spielen eine große Rolle in der transkriptionalen Regulation und dem Prozess der Genhemmung und -aktivierung (Fischle *et al.* 2003, Emerson 2002, Berger 2002). Der strukturelle Übergang zwischen aktiven und gehemmten Chromatinzuständen ist durch die gemeinhin abgestimmten Handlungen der ATP-abhängigen Remodeling-Komplexe und der Aktivitäten der Histonendstücke bedingt (Narlikar *et al.* 2002, Kouskouti & Talianidis 2005). Die unterschiedlichen Eigenschaften der Histone können dabei durch die verschiedene post-translationale Modifikationen erklärt werden. Diese Histonmodifikationen setzen sich im Wesentlichen aus der Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung (Li *et al.* 1993, Spotswood & Turner 2002), der ADP-Ribosylierung (Messner & Hottiger 2011, Hottiger 2011), sowie Acyl-Modifikationen wie der Acetylierung, Propionylierung, Butylierung und die Crotylierung (Rousseaux & Khochbin 2015) zusammen. Die Variation dieser Modifikationen und deren Auftreten in einer konstanten Sequenz legte den Grundstein für die These eines Histon-Codes.

2.3.1 Die Histon-Code-Hypothese

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Histone lediglich die Aufgabe hätten, die DNA geordnet im Zellkern verpackt zu halten und das Genom um das mehr als 1000-fache zu kondensieren. Die Regulation der Genexpression wurde der Vielzahl an Transkriptionsfaktoren und Replikationsvorgänge zugeschrieben. Die neuesten Erkenntnisse zeigen jedoch ein anderes Bild. Heute ist vielmehr anzunehmen, dass die Histon-Modifikationen eher dazu dienen, andere z.T. regulierende Proteine zu rekrutieren, als nur die DNA-Histon-Interaktionen zu stabilisieren bzw. zu destabilisieren. Sie spielen weiterhin eine

⁹cf. *Spektrum - Lexikon der Biologie: entry of "Histone"*

unabdingbare Rolle bei der Regulation der Transkription und der Umordnung des Chromatins während der Mitose.

Ausschlaggebend für den Umschwung war die Entdeckung, dass bekannte Co-Aktivatoren der Transkription ebenfalls der Gruppe der Histon-Acetyltransferasen (HAT) zugehörig waren und zu einer Aktivierung der Genexpression führten (Brownell *et al.* 1996, Ogryzko *et al.* 1996, Bannister & Kouzarides 1996). Als wenig später bekannt wurde, dass die Genrepression und das Gen-Silencing mit Histon-Deacetylasen (HDAC) verknüpft zu sein schienen (Taunton *et al.* 1996, Heinzel *et al.* 1997), verdichteten sich die Hinweise darauf, dass acetylierte Histone mit einer höheren Expressionsrate zu korrelieren scheinen. Darauf folgende Publikationen führten dazu, dass immer weitere Histonmodifikationen und ihre Auswirkungen auf die Genexpression bekannt wurden. Hierbei wurde auch deutlich, wie spezifisch und kontrolliert diese Modifikationen auftreten. Auf Grund der kombinatorischen Komplexität dieser Modifikationen wurde ziemlich bald darauf die Hypothese des Histon-Codes aufgestellt, die darauf beruht, dass die Histonenden, welche die Zielstruktur von enzymkatalysierten Modifikationen sind, alleine oder in Kombination einen Schlüssel bilden (engl. code), der die Muster der Genexpression festlegt.

Jüngere Artikel konnten weitere Einblicke in die Möglichkeiten dieses kombinatorischen Codes geben und lassen diskutieren ob und wie jener gelesen oder beeinflusst werden könnte. Auch konnte gezeigt werden, dass die Modifikationen eines Aminosäurerestes, auf die der anderen Auswirkungen haben kann, selbst wenn diese Aminosäurereste auf ganz anderen Histonen lokalisiert sind. So können Hypothesen aufgestellt werden, wie Modifikationen an bestimmten genomischen Regionen auch im neu zusammengesetzten Chromatin weiterhin bestehen können. Zusammenfassend muss jedoch gesagt werden, dass zwar an der Existenz des Histon-Codes als solchen kein Zweifel mehr besteht, jedoch die Art und Weise wie verschiedene Proteine, Enzyme und RNAs diesen Code ab zu lesen vermögen oder wie dieser auch langfristig für der Zelle Bestand hat, obwohl sich gewisse Muster immer wieder verändern, leider bis zum heutigen Zeitpunkt weitgehend ungeklärt bleibt.

2.4 Histonmodifikationen und Pathologien im Menschen

Viele Erkrankungen des Menschen rückten in den Fokus der Epigenetik, nachdem großangelegte genomweite Untersuchungen auf genetischer Ebene z.T. unzureichende Erklärungen für die verschiedenen Symptome, Syndrome und Komplikationen lieferten. Im Folgenden sollen einige Pathologien beispielhaft vorgestellt und in einen Kontext mit

den bekannten Histonmodifikationen gebracht werden, welche entweder Auswirkungen auf ihre Entstehung oder den Verlauf der Krankheit haben.

2.4.1 Histonacetylierung und maligne Erkrankungen

Die Acetylierung als erste beschriebene Histonmodifikation (Phillips 1963) bezeichnet den Transfer einer Acetylgruppe vom Acetyl-CoA zu der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests durch eine Gruppe von Enzymen, welche als Histon-Acetyltransferasen - kurz HATs - zusammengefasst werden. Die HATs konnten in einer großen Vielzahl in eukaryontischen Organismen von der Hefe bis zum Menschen identifiziert werden und werden anhand von strukturellen Homologien in Gruppen bzw. Familien eingeteilt. Verschiedene Acetylierungen von Histonen und Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Zelldifferenzierung. Abnormale Acetylierungen oder Deacetylierungen können zu Störungen der normalen Zellfunktion, des normalen Zellzyklus und so sogar zu einer malignen Entartung der Zelle führen. Leukämie, Karzinome und verschiedene Tumor-Syndrome können die Folge sein. Im Folgenden soll beispielhaft erklärt werden, wie Defekte der HATs und HDACs¹⁰ sich negativ auf die Zelle auswirken können.

Generell geht man heute davon aus, dass aktiv transkribiertes Chromatin hyperacetyliert vorkommt und somit mit der Rekrutierung von HATs vergesellschaftet ist. Die HAT-Aktivität steht damit eher im Kontext einer Genaktivierung. Im Gegensatz dazu ist die HDAC-vermittelte Deacetylierung eher als Gendeaktivierung anzusehen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Hyperacetylierung von normalerweise „ausgeschalteten“ Genabschnitten oder die Deacetylierung von üblicherweise aktiv transkribierten Regionen (z.B. Tumorsuppressorgenen) zu verschiedenen Störungen bis zur Entwicklung von proliferativen Erkrankungen führen kann.

¹⁰Histon-Deacetylasen

Erkrankung	Acetylierungsdefekt	
Leukämie	HAT-Fusionen: MOZ/CBP MOZ/p300 MOZ/TIF-2 MLL/CBP MLL/p300	HDAC-vermittelt: AML1 Fusions-Gen
Karzinome	p300 Mutationen in kolorektalen, Magen-, Brust- und Pankreas-Ca Zelllinien	

Tabelle 2.3: **Die veränderte Aktivität von Histon-Acetyltransferasen und -Deacetylasen in verschiedenen malignen Erkrankungen des Menschen** (verändert nach Timmermann *et al.* 2001).

Table 1
Aberrant regulation of HDACs in cancer

HDAC	Normal and oncogenic protein associations	Expression in cancer	Genetic evidence
Class I (homologous to RDP3 yeast protein, nuclear location, ubiquitous tissue expression)			
HDAC1	HDAC2, CoREST, NuRD, Sin3, AML1-ETO, PML, PLZF, BCL6, p53, AR, ER, Rb/E2F1	Elevated in gastric ^a , breast ^b , colorectal, HL, lung ^a , liver ^a	KD induced growth arrest, decreased viability, and increased apoptosis in colon, breast, and osteosarcoma cancer cells and increased survival of mice with overt PML-RAR α -mediated APL; HDAC1 KO/HDAC2 KD induced growth arrest in fibroblasts; KO induced genomic instability and arrest and reduced survival of transformed cells in vivo
HDAC2	HDAC1, CoREST, NuRD, Sin3, AML1-ETO, PML, PLZF, Bcl6	Elevated in gastric ^a , prostate ^b , colorectal ^a , HL, CTCL	KD induced growth arrest, decreased viability, and increased apoptosis in colon and breast cancer cells and induced apoptosis and decreased lung cancer in vivo; HDAC1 KO/HDAC2 KD induced growth arrest in fibroblasts; KO induced genomic instability and arrest and reduced survival of transformed cells in vivo; KD induced apoptosis and decreased lung cancer in vivo
HDAC3	HDAC4, HDAC5, HDAC7, NCoR/SMRT, AML1-ETO, PML, PLZF, PML-RAR α , PLZF-RAR α , Bcl6, STAT1, STAT3, GATA1, GATA2, NF- κ B	Elevated in gastric ^a , breast ^{a,b} , ALL, colorectal, HL; decreased in liver	KD in colon cancer cells decreased survival, increased apoptosis, and relieved transcriptional repression mediated by PML-RAR α in APL cells
HDAC8		Elevated in neuroblastoma	KD reduced proliferation of lung, colon, and cervical cancer cells
Class IIa (homologous to Hda1 yeast protein, shuttle between nucleus and cytoplasm, tissue-restricted expression)			
HDAC4	HDAC3-NCoR, GATA1		KD in chondrosarcoma cells increased VEGF expression and reduced growth and induced apoptosis of colon and glioblastoma tumors in vivo
HDAC5	HDAC3-NCoR, GATA1, GATA2	Elevated in medulloblastoma; decreased in lung	KD decreased medulloblastoma cell growth and viability
HDAC7	HDAC3-NCoR, ER α	Elevated in ALL; decreased in lung	KD induced growth arrest in colon and breast cancer cells
HDAC9		Elevated in ALL, medulloblastoma	KD of HDAC9/10 inhibited homologous recombination and increased sensitivity to DNA damage and decreased medulloblastoma cell growth and viability
Class IIb (homologous to yeast protein Hda1, mostly cytoplasmic location, tissue-restricted expression)			
HDAC6	α -Tubulin, HSP90, HDAC11	Elevated in breast ^b , CTCL; decreased in lung	KD decreased VEGF expression and decreased cell viability due to accumulation of misfolded proteins
HDAC10			KD of HDAC9/10 inhibited homologous recombination and increased sensitivity to DNA damage and decreased VEGF expression
Class IV (unknown yeast protein homology, cytoplasmic location, tissue-restricted expression)			
Class 11	HDAC6	Elevated in breast, renal, liver	KD induced apoptosis in colon, prostate, breast, and ovarian cancer lines

^aIndependent prognosis indicator, ^bAssociated with enhanced prognosis. KD, knockdown; HL, Hodgkin lymphoma; ALL, acute lymphoblastic leukemia.

Abbildung 2.6: **Bekannte HDACs und ihre Dysregulation in Krebserkrankungen.** Die Einteilung der Klassen erfolgte anhand ihrer Ähnlichkeit zu Proteinen aus der Hefe, ihrer Lokalisation (nukleär, cytoplasmatisch oder hybride) und ihrer enzymatischen Aktivität. Die HDACs zeigen eine erhöhte Expression in vielen Krebserkrankungen s. mittlere Spalte (modifiziert nach West *et al.* 2014, CC-Lizenz).

Wie bereits eingangs erwähnt, ist die physiologische Acetylierung der verschiedenen Histone und Transkriptionsfaktoren unabdingbar für einen funktionierenden Zellzyklus. Besonders wichtig sind hier die Aktivitäten einiger Acetyltransferasen aus der „HAT-Familie“ herauszustellen:

Die CBP/p300-Coaktivator-Familie besteht aus jeweils einem der transkriptionalen Coaktivator-Proteine CBP (auch als CREB-binding protein oder CREBP bekannt) und p300 (auch als E1A binding protein p300 bezeichnet). Jeder dieser Faktoren weist eine Histon-Acetyltransferase-Domäne auf, eine Bromodomäne, die acetylierte Lysine bindet und ein PHD-Finger-Motiv (Cys₄-His-Cys₃). Sie werden ubiquitär exprimiert und spielen eine entscheidende Rolle in der Regulierung des Zellwachstums, der Apoptose und der Transformation (Giordano & Avantaggiati 1999). Neben allen vier Histonen acetyliert CBP/p300 auch eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53, GATA-1, HIV-1 Tat, c-Myb, HNF1, HNF4 und weitere (für einen Review sei auf Sterner & Berger 2000 verwiesen). Die bedeutende Rolle von CBP in der Zelltransformation zeigt sich beim Vorgang der Chromosomentranslokation, bei der CBP mit MOZ (Monocytic leukemia zinc finger protein) oder MLL (Mixed lineage leukemia) fusioniert, da diese Translokationen zu der Entstehung einer Leukämie führen können (Taki *et al.* 1997, Sugita *et al.* 2000).

Der Faktor p300 konnte als Tumorsuppressor identifiziert werden. Während CBP vor allem für ein normal funktionierendes hämatopoetisches System zuständig zu sein scheint, konnte p300 jedoch keinem festen Organ oder keiner festen Zelllinie zugeteilt werden. Spontane Mutationen scheinen mit verschiedenen Tumorarten im Menschen assoziiert zu sein (Gayther *et al.* 2000, Bryan *et al.* 2002). Ihnen gemeinsam ist jedoch die Möglichkeit der malignen Entartung der Zelle bei Mutation oder Translokation der Faktoren. Da beide Faktoren eine Histon-Acetyltransferase darstellen, haben Veränderungen ihrer Aktivität entscheidende Auswirkungen auf die Histonacetylierung und die Acetylierung von Transkriptionsfaktoren und somit auch die Struktur des Chromatins, sowie die Genexpression.

TAF_{II}250 (TBP-assoziiertes Protein) ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIID und steuert unter anderem Mdm2-abhängig die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 (Allende-Vega *et al.* 2007). Eine fehlerhafte Funktion von TAF_{II}250 hat auf Grund seiner HAT-Region damit nicht nur Auswirkungen auf die Acetylierung der Histone und Transkriptionsfaktoren sondern auch einen direkten Einfluss auf den Zellarrest und Reparaturvorgänge.

Die GNAT-Superfamilie oder auch Gcn-5-verwandte N-Acetyltransferasen umfasst im Menschen zwei Proteine: Gcn5 und PCAF (p300/CBP-assoziiertes Protein). Beide Proteine können mit CBP/p300 interagieren und sind an der Transkriptionsregulierung und der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Die Überexpression von PCAF kann zu

einem Erliegen des Zellwachstums führen. Dieser Effekt lässt sich vorrangig durch die unausgewogene Interaktion von PCAF mit E2F und p53, zwei wichtigen Regulatoren des Zellzyklus, erklären. E2F ist ein Transkriptionsfaktor, der die S-Phase-spezifische Genexpression und den Eingang in die S-Phase induziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Acetylierung von E2F durch PCAF die Transkriptionsaktivität von E2F steigert und das Protein selber noch stabilisiert (Martínez-Balbás *et al.* 2000), sodass zu erwarten wäre, dass auch das Zellwachstum gesteigert würde. Ähnlich wie bei E2F vergrößert sich aber auch die DNA-Bindungsaffinität von p53, eines Tumorsuppressorproteins, bei Acetylierung. Die Acetylierung von p53 durch PCAF führt hier jedoch zu einer Verhinderung des Eingangs in die S-Phase und zu einer Verhinderung des Fortschreitens des Zellzyklus. PCAF kann also in zwei Richtungen in den Zellzyklus eingreifen: Durch die Acetylierung von E2F wird die Zellteilung angeregt, durch die Acetylierung von p53 kommt der Zellzyklus zum Erliegen. Es liegt also nahe eine Verlinkung zwischen der Mutation von PCAF-Regionen, welche die HAT-Aktivität steuern, und malignen Vorgängen, Zellproliferation und Tumorbildung zu vermuten. Erste Hinweise, dass diese Verbindung auch wissenschaftlich belegt werden kann, konnte eine Veröffentlichung aus dem Jahr 1996 liefern. Hier konnte gezeigt werden, dass onkogene virale Proteine wie das E1A, ein humanes Adenovirus, gebundene CBP/p300/PCAF-Komplexe spalten können und es infolge dieser Spaltung zu einem Verlust der Transformationsinduktion kommt (Yang *et al.* 1996). Die viralen Onkoproteine konkurrieren hierbei um die Bindungsstelle von PCAF mit CBP/p300 und können bei Verlust dieser Bindung mit dem CBP/p300-Komplex keine Transformation mehr induzieren. Dies lässt somit auch den Umkehrschluss zu, dass PCAF eine Rolle in der Tumorsuppression zu spielen scheint.

Im Jahr 2000 konnten Krebs *et al.* zeigen, dass die Regulierung der eukaryontischen Genexpression von der Aktivität ATP-abhängiger Chromatin-Remodeling Enzyme wie SWI/SNF und Histon-Acetyltransferasen wie Gcn5 abhängig ist. Ferner konnte in *Saccharomyces cerevisiae* bei gleichzeitiger Störung der Faktoren SAS3, dem Homolog für das humane MOZ und Gcn5, eine Letalität durch den Verlust der Histon-Acetyltransferasenaktivität gezeigt werden (Howe *et al.* 2001). Es kam hier zu einem exzessiven, globalen Verlust an Histon H3-Acetylierung und dem Zellzyklusarrest in der Phase G(2)/M. Neuere Veröffentlichungen konnten aufzeigen, dass die HAT Gcn5 auch eine entscheidende Rolle im Tumorwachstum spielt und ihre Expression z.B. mit der Tumorgroße im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom korreliert (Chen *et al.* 2013). Gcn5 begünstigt das Zellwachstum und die G1/S-Phasen-Transition in mehreren Zelllinien verschiedener Lungenkarzinoma, über die Zunahme der Promotoraktivität von E2F,

Cyclin D1¹¹ und Cyclin E1¹². Auch im Kolonkarzinom konnte ähnliches beobachtet werden. Hier fiel auf, dass Gcn5 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Karzinoms spielt, indem es hoch reguliert das Zellwachstum steigert und daher ein attraktives Ziel für neue Therapiemöglichkeiten bieten könnte (Yin *et al.* 2015).

Die MYST-Superfamilie umfasst die Histon-Acetyltransferasen MOZ (Monocytic leukemia zinc finger protein), MORF (MOZ-related factor), HBO1 (HAT bound to ORC1) und Tip60 (Tat-interactive protein, 60 kDa). Ihnen allen gemeinsam ist die homologe MYST-Domäne, eine Acetyl-CoA-Bindungsstelle der eine Zinkfingerkonformation oder Chromodomäne vorausgeht.

MOZ (MYST3) wurde erstmals als Fusionspartner von CBP bei der Chromosomentranslokation in der akuten myeloischen Leukämie (AML) bekannt (Borrow *et al.* 1996). Später wurde MORF anhand von seiner strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zu MOZ identifiziert (Champagne *et al.* 1999, Champagne *et al.* 2001). Beide Proteine besitzen die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung und wirken als Coaktivatoren für zwei Transkriptionsfaktoren mit Runt-Domänen¹³ - Runx1 und Runx2 (Kitabayashi *et al.* 2001b, Pelletier *et al.* 2002, Collins *et al.* 2006). Neben der MOZ/CBP-Chimäre konnten in der akuten myeloischen Leukämie auch weitere Translokationen festgestellt werden, zum Einen MOZ/p300 und MOZ/TIF2 und zum Anderen MORF/CBP (Carapeti *et al.* 1998, Kitabayashi *et al.* 2001a, Panagopoulos *et al.* 2001). Es ist davon auszugehen, dass bei der Entstehung einer solchen Protein-Chimäre die funktionellen katalytischen Untereinheiten der Fusionspartner fehlerhafte oder veränderte Bindungsstellen aufweisen und es somit zu einer Veränderung - hier im Allgemeinen eine Abnahme - der Aktivität, einer Verminderung der Acetylierungen und einer Sequestrierung von Schlüsselregulatoren kommt. So verhindern MOZ/CBP und MOZ/TIF2 die Aktivierung vom Retinsäurerezeptor- β 2 Promotor¹⁴ (RAR β 2 Promotor). MOZ/TIF2 ist weiterhin in der Lage myeloische Vorläuferzellen zu immortalisieren, ein Grund für die Entstehung der AML (Collins *et al.* 2006, Huntly *et al.* 2004). Mehrere Veröffentlichungen konnten seither die wichtige Rolle von MOZ in der Regulierung der Hämatopoese zeigen (für ein Review sei auf Perez-Campo *et al.* 2013 verwiesen).

HBO1 (MYST2) wurde im Zusammenhang mit der DNA-Replikation entdeckt. Die DNA-Replikation wird mit der Bindung des Origin Recognition Complex (ORC) an

¹¹Cycline sind Proteine, welche den Zellzyklus mitsteuern können. Sie aktivieren dabei Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) und ermöglichen so den Ablauf verschiedener Signalketten. Cyclin D1 ist für die Progression durch die G1-Phase und den Eingang in die S-Phase unabdingbar.

¹²Cyclin E1 bestimmt unter anderem den Übergang von der G1- zur S-Phase.

¹³Der Oberbegriff lautet tatsächlich Runt-Domäne, während die Genloki als RUNX1 und RUNX2 (und RUNX3) bezeichnet werden.

¹⁴Der humane Retinsäurerezeptor Beta2 (RAR β 2) ist Mitglied der Superfamilie der Nukleären Rezeptoren und spielt eine Schlüsselrolle in der Modulierung der Effekte von Retinsäure (RA) auf das Zellwachstum und die -differenzierung.

den Replikationsursprung (Origin of Replication) initiiert. HBO1 wurde durch seine Interaktion mit der größten Untereinheit der ORC - ORC1 - identifiziert, daher auch der Name „HAT bound to ORC1“ (Iizuka & Stillman 1999). Dabei wirkt HBO1 positiv auf die Zusammenlagerung der Präreplikationskomplexe (pre-RC) und die Initiierung der DNA-Replikation (Iizuka *et al.* 2006). Die für HBO1 kodierende Region wurde als eine häufige Stelle für retrovirale Integration identifiziert, ein Umstand, der nicht nur zur myeloischen Leukämie und B/T-Zell-Lymphomen in der Maus führt (Suzuki *et al.* 2002). Es konnte auch gezeigt werden, dass z.B. das Protein HBZ (HTLV-1 Basic leucine Zipper factor), das vom humanen T-Zell-Leukämie-Virus vom Typ 1 (HTLV1) kodiert wird, die HAT-Aktivität von CBP/p300 und HBO1 vermindert und somit zu einer Repression der Funktion vom Tumorsuppressorprotein p53 führt (Wright *et al.* 2016), was zum Ausbruch des adulten T-Zell-Lymphoms (ATL) führen kann. Ferner scheint HBO1 als Komplex mit ING4 und ING5 (s.u.) auch eine tumorsuppressive Wirkung zu haben, da die HAT-Aktivität von HBO1 die Transkriptionsaktivität von p53 über die Mediatoren ING4 und ING5 zu steigern scheint (Shiseki *et al.* 2003, Doyon *et al.* 2006).

Tip60 (HIV Tat-interacting protein of 60kDa) ist die katalytische Untereinheit des evolutionär sehr gut konservierten NuA4-Komplex (Nukleosome Acetyltransferase of histone H4) (Doyon *et al.* 2004). Die HAT ist an bedeutenden Funktionen wie der Regulation der Transkription beteiligt und fungiert als Co-Aktivatoren für u.a. nukleäre Hormonrezeptoren, NF- κ B, β -Catenin, E2F und das c-Myc Onkoprotein (Brady *et al.* 1999, Baek *et al.* 2002, Sierra *et al.* 2006, Taubert *et al.* 2004, Frank *et al.* 2003). Ferner spielt sie eine entscheidende Rolle bei DNA-Reparaturvorgängen. So konnten Ikura *et al.* 2000 zeigen, dass es bei einer Mutation innerhalb der HAT-Domäne von Tip60 zu keiner effektiven Induktion der Apoptose bei DNA-Schäden mehr kommen kann.

ING-Faktoren (INHibition of Growth) gehören der Tumorsuppressor-Familie vom Typ 2 an. Sie sind u.a. für die Regulation der Zellproliferation, -alterung, -apoptose, -differenzierung, die Angiogenese, DNA-Reparatur und die Metastasierung und Invasion von Tumorzellen verantwortlich. Zudem erhöhen sie die Sensibilität von Krebszellen auf die Chemo- oder Strahlentherapie (Zhang *et al.* 2016). Heute sind fünf verschiedene ING-Faktoren bekannt: ING1, ING2, ING3, ING4 und ING5. Ihnen ist als Familie gemein, dass sie in den Multisubunit Proteinkomplexen der MYST-Familie vorkommen (mit Ausnahme der von MOF) oder Bindungen mit HDACs eingehen können. Eine Rolle als potentielle Angriffspunkte für neue Möglichkeiten in der Krebstherapie wird derzeit diskutiert. Tab. 2.4 gibt einen Überblick über die wichtigsten HATs im Menschen und ihre zellulären Effekte.

Der Gewinn an oder der Verlust von Acetylierungen kann also einen entscheidenden

HAT	Effekt
CBP/p300	globaler Coaktivator
TAF _{II} 250	TBP-assoziiertes Faktor
GNAT-Superfamilie	
Gcn5	Coaktivator
PCAF	Coaktivator
MYST-Familie	
MOZ	Leukämogenese bei Chromosomen-Translokation
MORF	unbekannt (ähnlich wie MOZ)
HBO1	ORC Interaktion
Tip60	HIV-Tat Interaktion
Rezeptor-Coaktivatoren	Transkriptionsantwort auf hormonelle Signale
TIF-2	
SRC-1	
ACTR	
TFIIIC-Familie	Initiierung der RNA-Polymerase III Transkription

Tabelle 2.4: **Übersicht der Histon-Acetyltransferasen im Menschen und ihr Effekt auf die Zellvorgänge** (verändert nach Sterner & Berger 2000).

Einfluss auf die Tumorentstehung haben.

2.4.2 Epigenetik und das Alter

In den letzten Jahren hat die Forschung um epigenetische Veränderungen und deren Konsequenzen im Alterungsprozess einen wahren Aufschwung erlebt. Häufig im Maus- oder Drosophila-Modell oder in Zellkulturen untersucht (Peleg *et al.* 2016a, 2010), fehlen die humanen *in vivo* Studien noch. Allerdings konnten wichtige Prozesse identifiziert werden, die zu einem Funktionsabfall zwischen den verschiedenen Systemen und dem Organismus führen können. So gelten derzeit vier molekulare Veränderungen als die wichtigsten „Marker des Alterns“: genomische Instabilität, epigenetische Veränderungen, Telomerverkürzungen und der Verlust der Proteostase (die dynamische Regulation eines funktionellen Proteoms) (López-Otín *et al.* 2013). Auffällig ist, dass drei dieser vier Hauptmerkmale Chromatinveränderungen beschreiben, was die Bedeutung des Chromatinzustands für die Zellfunktion und die Gesundheit verdeutlicht.

Im Alter verändern sich sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem (Pinti *et al.* 2016). Das angeborene Immunsystem ist dabei der Teil des Immunsystems, der genomisch festgelegt ist, also vererbt wurde. Er wird auch als die „unspezifische Immunantwort“ beschrieben, da er vor allem sehr schnell aber auch nur begrenzt spezifisch agieren kann. Der adaptive Teil ist, wie der Name es schon vermuten lässt, der polytrope und anpassungsfähige Arm der Immunantwort, der stetig lernen kann. Hier

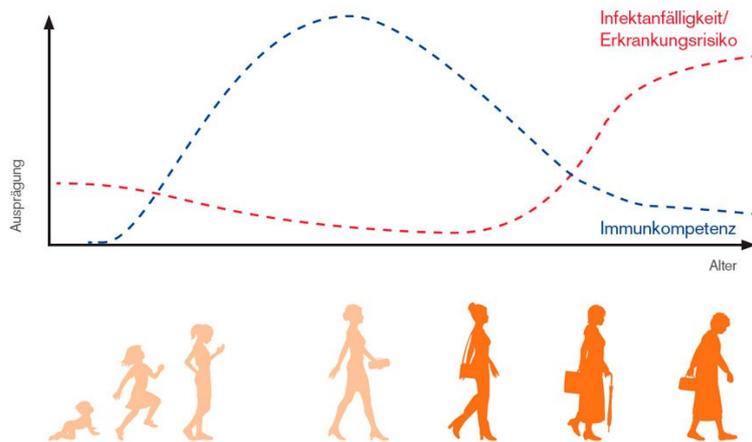


Abbildung 2.7: **Vereinfacht dargestellter Zusammenhang aus Infektanfälligkeit, Immunkompetenz und Alter.** Rot: Die zunehmende Infektanfälligkeit im Alter. Blau: Die abnehmende Immunkompetenz. Quelle: <https://www.impfen.de/impfungen/guertelrose-herpes-zoster/> (Ref.: NP-DE-VX-WCNT-200061)

verläuft die Immunantwort etwas verzögert, doch durch Erkennung und Bildung von z.B. Antikörpern sehr spezifisch und auf die einzelnen Erreger zugeschnitten. Ebenfalls beschrieben wurde ein Phänomen, dass sich „Inflammaging“ also Altern durch Entzündung nennt. Hierbei kommt es zu einer chronischen Stimulation des Immunsystems und hohen Konzentrationen an Entzündungsmediatoren wie Zytokinen und darüber zu pathologischen Veränderungen wie Atherosklerose, Osteoporose (Knochensubstanzschwund) und Diabetes mellitus Typ II (Frasca & Blomberg 2016). Chronische Entzündungen zehren somit nicht nur am Kräftehaushalt, sie gehen auch mit krankhaften Prozessen einher, die die Immunkompetenz weiter einschränken. So gelten auch insbesondere Atherosklerose und Diabetes mellitus als Risikofaktoren für schwerwiegende Infektionsverläufe (Romero Starke *et al.* 2020).

2.4.2.1 Diabetes

Der Diabetes mellitus ist ein weltweit wachsendes Problem. Eingeteilt werden kann er in drei Formen:

Den Diabetes mellitus Typ 1 - früher auch juveniler Diabetes genannt obwohl es auch eine late-onset Form im Erwachsenenalter (latent autoimmune diabetes in adults = LADA) gibt - welcher eine Autoimmunerkrankung darstellt, bei der das Immunsystem hauptsächlich die Beta-Zellen des Pankreas angreift und zerstört. Der Körper kann somit nicht mehr genug Insulin bilden und es kommt zu einem absoluten Insulinmangel im Blut, der wiederum zu einem erhöhten Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie) führt. Die typischen Beschwerden sind dabei ein vermehrter Harndrang, der durch die Glucose

im Urin erklärt werden kann. Die Nierenschwelle für Glucose beträgt etwa 180mg/dl. Übersteigt der Blutzuckerwert diese Schwelle, kann die Niere den Zucker im Harn nicht mehr rückresorbieren und es fällt vermehrt Glucose im Urin an. Diese Glucose ist nun osmotisch wirksam und sorgt für einen Wassereinstrom und zu einer vermehrten Urinmenge. Infolgedessen klagen viele Patienten über ein sehr belastendes Durstgefühl und eine ansteigende Trinkmenge auf mehrere Liter pro Tag. Auch ist ein Gewichtsverlust charakteristisch für den absoluten Insulinmangel, da die Energie aus der Nahrung ohne das anabole Hormon nicht in den Fettzellen des Körper gespeichert werden kann und der Körper auf seine Reserven zurückgreifen muss. Dadurch, dass die Zellen ohne das Insulin keinen Zucker aufnehmen können, da der GLUT4 Transporter nicht in die Zellmembran eingebaut wird, ist eine allgemeine körperliche Schwäche ebenso charakteristisch wie eine Konzentrationsschwäche, Müdigkeit und Kopfschmerzen. Unspezifische Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall sowie trockene, juckende Haut können sich auch dazu gesellen. Bleiben die Hyperglykämie und der absolute Insulinmangel unbehandelt, so kann es zu einer lebensgefährlichen Ketoazidose kommen. Hierbei bildet der Körper auf Grund seines Energiemangels in den Zellen vermehrt Ketonkörper, welche den pH verringern (Azidose). Da die Zellen keine Glucose mehr aufnehmen können, signalisieren sie einen absoluten Energiemangel. Infolgedessen schüttet der Körper vermehrt Adrenalin und Noradrenalin sowie andere Insulinantagonisten aus. Diese initiieren unter anderem den Fettabbau und die Bildung von Ketonkörpern u.a. Azetessigsäure und β -Hydroxybuttersäure. Nach anfänglich unspezifischen Symptomen fallen bei den Patienten der süßliche, azetonartige Mundgeruch, später die sogenannte Kußmaul-Atmung und eine Bewusstseinsstrübung auf. Unbehandelt endet das Krankheitsbild tödlich.

Den Diabetes mellitus Typ 2, der zum Formenkreis der Stoffwechselerkrankungen zählt und durch einen relativen Insulinmangel gekennzeichnet ist. In Deutschland leiden rund sieben Millionen Menschen an einem Diabetes, der medikamentös behandelt wird. 90% davon sind Typ-2-Diabetiker. Heute weiß man, dass auch der Diabetes mellitus Typ 2 erblich bedingt ist und vor allem durch Übergewicht, falsche Ernährung und Bewegungsmangel begünstigt wird. Im Gegensatz zum Typ-1-Diabetes leiden die Patienten aber nicht unter einem absoluten Insulinmangel, sondern unter einer Insulinresistenz. Das bedeutet, dass die Zellen weniger sensibel auf Insulin reagieren und die Bauchspeicheldrüse immer größere Mengen des Hormons produzieren muss, um den gleichen Effekt zu erzielen. Irgendwann erschöpft sich die Insulinproduktion und es treten Hyperglykämien und ihre bekannten Komplikationen an den Gefäßen, Nerven und Organen auf. Gerade weil diese Komplikationen z.T. erhebliche Folgen für den Patienten haben können z.B. Störungen des Vibrationsempfinden und der Propriozeption, Gefäßverschlüsse, Schlaganfälle, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Sehstörungen bis hin zur Erblindung und Organschäden bis zur Niereninsuffizienz ist die Erforschung der

Mechanismen der Erkrankung und die Entwicklung neuer Therapien unabdinglich.

Den pankreopriven Diabetes, bei dem die Ursache des absoluten Insulinmangels in einem entweder fehlendem Pankreas oder einer massiv beeinträchtigten Funktion jenes liegt. Dieses Krankheitsbild ist häufig nach Verletzungen oder operativen Eingriffen z.B. im Rahmen der Entfernung eines Pankreas-Karzinoms anzutreffen, es kommt aber auch als Komplikation im Rahmen der Hämochromatose (Eisenspeicherkrankheit), der Mukoviszidose oder nach Pankreatiden (Bauchspeicheldrüsenentzündungen) vor.

2.4.2.2 Epigenetische Veränderungen bei Diabetes Typ 1

Auf Grund der stetig wachsenden Problematik des Diabetes und dessen Komplikationen und Folgeerscheinungen rückte die Stoffwechselkrankheit auch in den Fokus epigenetischer Forschungen. Mehrere Publikationen der letzten Jahre unterstützen die These, dass auch epigenetische Veränderungen maßgeblich zum Komplikationsverlauf oder zu Stoffwechselbeeinträchtigungen beitragen können. So fanden Miao *et al.* 2008 mit einer Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) heraus, dass eine Untergruppe von Genen bei Typ-1-Diabetikern eine signifikante Zunahme der H3K9-Dimethylierung in Lymphozyten aufwies. Unter anderem zeigte CLTA4¹⁵, eine erhöhte Promotor-H3K9-Dimethylierung. Die Versuche von Miao *et al.* mit der sogenannten Ingenuity Pathway Analysis (IPA) fanden zwei Gen-Netzwerke in Typ-1-Diabetes Patienten, die Gene mit einer veränderten H3K9-Dimethylierung aufwiesen. Viele von diesen Genen werden mit autoimmunen Vorgängen und entzündungsbedingten Signalwegen in Verbindung gebracht, so sollen sie zum Beispiel für die Umwandlung des Transformierenden-Wachstumsfaktors- β (transforming growth factor- β), des Kernfaktors κ B, der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MEK) p38, eines Toll-like-Rezeptors und Interleukin-6 verantwortlich sein. Die IPA soll außerdem eine biologische Beziehung dieser Gen-Netzwerke mit Typ-1-Diabetes Kandidatengenen aufgezeigt haben. Da es sich bei dem Typ-1-Diabetes um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung handelt, scheinen diese Ergebnisse auf den ersten Blick schlüssig.

Autoimmune Erkrankungen und ihre Entstehung bleiben bis heute ein großes Rätsel der Medizin. Auch, wieso die Prävalenz stetig steigt, kann nur hypothetisch zu erklären versucht werden. Die Epigenetik kann hier einen wertvollen Beitrag leisten, indem sie versucht, die sich veränderten Umweltfaktoren (Ernährung, körperliche Aktivität, Virusinfektionen, Keimbelastung, Umwelttoxene, Hygiene etc.) sinnvoll in einen Kontext mit der Veränderung auf den Metabolismus zu setzen. Wieso es zu einer autoimmunen

¹⁵Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (Synonym: CD152 - Cluster of Differentiation 152) ist ein Protein aus der Immunglobulin-Superfamilie und wird von aktivierten T-Zellen exprimiert. Es agiert als Proteinrezeptor und „Immuno-Checkpoint“, der die Immunantwort herunter regulieren kann.

T-Zell-Antwort gegen körpereigene Strukturen kommen kann, kann so in der Zukunft vielleicht doch noch beantwortet werden. Ein weiteres Rätsel vor dem sich die moderne Medizin gestellt sieht, ist die Tatsache, dass selbst nach einer günstigen Stoffwechseleinstellung (hier die Normoglykämie) die Komplikationen dennoch fortschreitend sind. Die Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Studie (2003) und die neuere Follow-Up Prospective Diabetes Studie aus der UK (UKPDS) (2005) zeigten beide, dass die Effekte der Hyperglykämie auf die Endorgane bei Patienten mit Diabetes Typ 1 und Typ 2 selbst nach 5 Jahren noch Folgen für die Patienten hatten, obwohl diese wieder zu ihrer normoglykämischen Stoffwechsellage zurückgekehrt waren. Dieses Phänomen nennt man auch das „hyperglykämische Gedächtnis“ oder auf Englisch „the legacy effect“ (Chalmers & Cooper 2008).

Im Jahr 2009 konnten Brasacchio *et al.* zeigen, dass dieses „hyperglykämische Gedächtnis“ des menschlichen Organismus verschiedenen Histonmodifikationen zuzuschreiben ist. So konnte gezeigt werden, dass es nach einer Hyperglykämie zu einer Upregulation des NFκB-p65-Gens (s.u.) kommt, welche mit einer Zunahme der H3K4- und Abnahme der H3K9-Methylierung des p65 Promotors verbunden ist. Ferner fiel eine persistierend gesteigerte Rekrutierung der Histon-Demethylase LSD1 (Lysine-specific Demethylase 1), einer H3-Demethylase, zu dem p65-Promoter infolge einer Hyperglykämie auf, wobei die LSD1 als Gen-Repressor oder -Aktivator fungieren kann (Trojer & Reinberg 2006, Metzger & Schüle 2007). Interessanterweise konnte hier auch gezeigt werden, dass die Atherosklerose trotz Rückkehr zu normoglykämischen Stoffwechselluständen in vorher hyperglykämischen Mäusen weiter fortschreitend war. Es kam zu einer Zunahme des NFκB, VCAM¹⁶, MCP-1 mRNA¹⁷ in den diabetischen und früher hyperglykämischen nun normoglykämischen Mäusen. Es wurde daraufhin die Menge des Plaques gemessen, welcher sich in den drei Gruppen der apoE Mäusen (Apolipoprotein Knock-Out Mäuse) gebildet hatte. Die drei Gruppen bestanden aus normoglykämischen apoE Mäusen (NG→NG), diabetischen apoE Mäusen (HG→HG) und vorher hyperglykämischen, nun wieder normoglykämischen apoE Mäusen (HG→NG). Es fiel auf, dass die diabetischen Mäuse und die HG→NG-Mäuse dreimal so viel atherosklerotischen Plaque gebildet hatten, wie die immer normoglykämischen Kontrollen. Trotz adäquater Stoffwechseleinstellung schienen die HG→NG-Mäuse keinen Benefit in Hinsicht auf die Bildung von Atherosklerose zu haben (s. Abb. 2.8). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Zhong & Kowluru 2010, allerdings im Versuch mit Ratten. Auch sie konnten zeigen, dass trotz Normalisierung

¹⁶Vascular Cell Adhesion Protein, ein Protein, das u.a. die Zelladhäsion von Immunzellen zu vaskulären Endothelzellen vermittelt und als ein Faktor in der Entstehung von Atheroskleroseplaques diskutiert wird.

¹⁷Monocyte Chemoattractant Protein-1 messenger RNA; Der Rekrutierung von Monozyten wird eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Atherosklerose zugeschrieben.

der Blutzuckerwerte eine Veränderung des Epigenoms auftrat, welche auch weiterhin Fortbestand hatte. Ihnen fiel eine verminderte Acetylierung des Histons H3 auf. So konnte in diesem Zusammenhang erklärt werden, wieso es trotz einer Normalisierung der Blutzuckerwerte weiterhin zu einem Fortschreiten der Retinopathie kommen konnte.

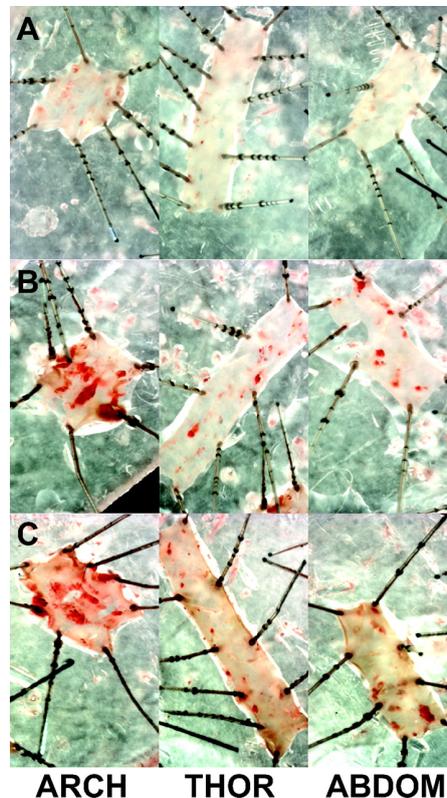


Abbildung 2.8: **Trotz wieder normoglykämischer Stoffwechselzustände bilden sich in den Gefäßen der HG→NG-Mäuse atherosklerotische Plaques.** Atherosklerotische Plaques in der Aorta mit Sudan IV-Färbung. (A) apoE KO Kontrolle, (B) diabetische apoE KO, (C) vorher hyperglykämisch nun normoglykämische apoE KO (HG→NG-Mäuse). ARCH: Aortenbogen; ABDOM: abdominal; THOR: thorakal. (modifiziert nach Brasacchio *et al.* 2009, PMC-Lizenz).

Auch eine Studie aus dem Jahr 2014 stellte einen interessanten Zusammenhang zwischen den HbA1c-Werten, also dem Langzeitblutzuckerwert der Probanden, und der H3K9-Monoacetylierung als möglichen Grund für das „metabolische Gedächtnis“ des menschlichen Organismus her (Miao *et al.* 2014). So wurden zwei Gruppen von Patienten untersucht - einmal eine Gruppe mit intensiver Insulintherapie (mittlerer HbA1c = 7.3%, n=30) und einmal eine Gruppe, welche nicht intensiviert behandelt wurde und somit erhöhte Blutzuckerwerte aufwies (mittlerer HbA1c = 9.1%, n=30). Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem mittleren HbA1c und der H3K9Ac beobachtet werden. Weiterhin beinhalteten die 38 meist hypermethylierten

Promotoren ($p < 0.05$) über fünfzehn Gene, welche im Zusammenhang mit dem entzündungsfördernden NF- κ B Signalweg stehen und ferner angereichert in jenen Genen vorkommen, welche für diabetische Komplikationen mitverantwortlich gemacht werden.

Der NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) hält wichtige Funktionen innerhalb des Immunsystems und der lymphatischen Organe inne. Er reguliert dabei nicht nur die Immunantwort, die Zellproliferation sowie den Zelltod, seine Aktivierung gilt auch als kritisch für die Entstehung von Entzündungen. Selbst bei verschiedenen Krebsarten wird eine wichtige Rolle des Faktors als wahrscheinlich diskutiert, weswegen Zwischenwege des NF- κ B-Signalweges als Zielstrukturen für neue Medikamente studiert werden.

2.4.2.3 Epigenetische Veränderungen bei Diabetes Typ 2

Im Gegensatz zum Diabetes Typ 1, welcher eine Autoimmunerkrankung darstellt, wird der Diabetes Typ 2 gerne als sogenannte „Lifestyle-Erkrankung“ angesehen. Doch obwohl Übergewicht, ein ungünstiger Ernährungsstil, verminderte körperliche Aktivität und das Alter das Risiko erhöhen, an Typ-2-Diabetes zu erkranken, tritt die Erkrankung dennoch nicht bei allen Menschen auf, die diese Risikofaktoren aufweisen. Viele Studien bemühten sich daraufhin in genomweiten Untersuchungen eine Erklärung für dieses Phänomen auf genetischer Ebene zu finden (Saxena *et al.* 2007, Scott *et al.* 2007, Sladek *et al.* 2007). Vielversprechender erscheint aber auch hier der Ansatz, nach epigenetischen Veränderungen zu suchen und solche in einen Kontext mit den Umweltfaktoren und dem veränderten Stoffwechsel der Patienten zu setzen.

Ein Faktor, weswegen die Prävalenz des Typ-2-Diabetes weltweit immer mehr und schneller steigt ist die auch steigende Rate an Übergewichtigen in der Bevölkerung. Heute ist bekannt, dass zum Beispiel der Funktionsverlust der Histon-Demethylase Jhdm2a mit Übergewicht assoziiert ist und zu einer verringerten Expression von metabolisch aktiven Genen im Skelettmuskel führt (Tateishi *et al.* 2009). Das Enzym SIRT1, ein HDAC der Klasse III (NAD-abhängige Sirtuine), greift nicht nur in mehrere Signalwege des Metabolismus wie die Adipogenese, die Glukoseausnutzung, die Fettsäureoxidation und die Biogenese der Mitochondrien ein, es reguliert unter anderem auch die Insulinsekretion (Schwer & Verdin 2008). Ferner wird es dafür verantwortlich gemacht, die Differenzierung von Muskelzellen auszubremsen und den Stoffwechsel auf Fettverbrennung umzustellen. Eine Studie an Mäusen zeigte in einem experimentellen Versuch mit dem Sirtuin-1-aktivierenden Wirkstoff SRT1720 eine Stoffwechselumstellung, bei der die Mäuse trotz kalorien- und fettreicherer Kost schlank und leistungsstark blieben (Feige *et al.* 2008). Ein uns bekannter SIRT1 aktivierender Wirkstoff ist interessanterweise das Resveratrol, ein Phytoalexin, das vor allem in der blauen Weinbeere zu finden ist.

Aber auch weitere epigenetische Hinweise auf eine tiefgreifende Verlinkung zwischen metabolischen Ereignissen und der Entstehung von Diabetes Typ 2 lassen sich ableiten. Die ATP-Citrat-Lyase (ACL) ist für die Umwandlung von Citrat zu Acetyl-CoA verantwortlich. Das so gewonnene CoA ist ein Metabolit der HATs, welche die Acetylierung von Histonen steuern. Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2009 konnte zeigen, dass das Glukoseangebot die Histonacetylierung ACL-abhängig beeinflussen kann. Somit scheint die Aktivität der ACL die wachstumsfaktorbedingte Zunahme des Nährstoffbedarfs im Stoffwechsel mit der Regulation der Histon-Acetylierung und somit der Genexpression zu verbinden (Wellen *et al.* 2009). Ein weiterer Baustein um die Kopplung des Energiestoffwechsels mit der epigenetischen Regulation zu verknüpfen.

Doch auch die Behandlung der Komplikationen des Diabetes rückt immer mehr in den Fokus epigenetischer Forschungen. So ist zwar die Entstehung der Erkrankung nicht zufriedenstellend geklärt, einige Pathomechanismen der Spätfolgen, die es zu verhindern gilt, wurden jedoch schon in mehreren Publikationen diskutiert. Neben der Retinopathie ist auch die Nierenfibrose und der Nierenfunktionsverlust bis hin zur Dialysepflicht des Patienten eine gefürchtete Komplikation der Stoffwechselerkrankung. Noh *et al.* veröffentlichten 2009 eine Publikation, die einen Zusammenhang zwischen der Histon-Deacetylase-2 und dem fibrotischen Umbau der Nierenmatrix herstellen konnte. So konnten sie zeigen, dass der Einfluss des TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) als Aktivator der HDAC-2 einen maßgeblichen Anteil an der Entstehung der sogenannten ECM (exzessive Akkumulation an extrazellulärer Matrix) und dem Übergang von Epithel- zu Mesenchymalzellen (EMT) in der Niere hat. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit einem nonselektiven HDAC-Inhibitor, Trichostatin A, die Proteinexpression und Bildung von mRNA verringerte, was zu einer Abnahme von ECM-induzierenden Faktoren führte, welches wiederum die Epithel-Mesenchymal-Transition verhinderte. Valproinsäure, ein Wirkstoff aus der Klasse der Antiepileptika, konnte einen ähnlichen Effekt zeigen. Interessanterweise agierte Hydrogenperoxid als Mediator der HDAC-2 Aktivierung und auch dieser Effekt konnte mit der Gabe eines Antioxidants, dem N-Acetylcystein (ACC), ausgenutzt und HDAC-2 nicht mehr durch TGF- β 1 aktiviert werden. Auch hier zeigen sich wieder die spannenden Möglichkeiten, die die Erforschung epigenetischer Mechanismen bei der Krankheits- oder Komplikationsentstehung bietet.

Die alleinige Gen-Analyse konnte bislang zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis bei der Erklärung der Pathogenese oder der Ätiologie des Diabetes führen und somit bleibt mit Spannung die weitere Entwicklung in diesem Feld abzuwarten. Als größtes Ziel und größte Chance wäre die Ableitung primär präventiver Maßnahmen zu sehen, sodass die Krankheitsentstehung aufgrund des Verständnisses der Pathomechanismen gänzlich verhindert werden kann. Aber auch sekundäre und tertiäre Prävention zur Eindämmung von Spätfolgen, komplikativen Verläufen und lebens einschränkenden Funktionsverlusten

sind ebenso als klare Ziele und Möglichkeiten dieses Forschungsfeldes zu sehen wie auch die Ableitung von neuen Leitlinien und Therapieempfehlungen.

2.4.3 Histonacetylierung und Neurodegeneration

Die Demographie ist im Wandel. Durch die verbesserte medizinische Versorgung und daraus folgend eine erhöhte Lebenserwartung im Gegensatz zu der sinkenden Geburtenraten verlagert sich die Altersstruktur immer mehr dahin, dass die bevölkerungsstärksten Jahrgänge in einem immer höheren Alter anzutreffen sind. Die über 85-jährigen sind derzeit die wachstumsstärkste Bevölkerungsgruppe in Deutschland. Dies führt auch dazu, dass altersbedingte Erkrankungen immer mehr in den Fokus der Gesellschaft rücken, so auch neurodegenerative Krankheiten wie die Demenz.

Als Demenz wird ein neurologisches Krankheitsbild bezeichnet, welches sich durch einen progredienten Verlust der kognitiven Fähigkeiten auszeichnet und länger als 6 Monate besteht. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einem typischen Verlust der Alltagskompetenz und einem Zerfall der Persönlichkeit. Da die Demenz im höheren Lebensalter die häufigste Ursache für Pflegebedürftigkeit ist und für die Betroffenen wie die Angehörigen als besonders quälend empfunden wird, rückte sie schnell in den Fokus der Forschung. Die Demenz lässt sich einteilen in eine *primäre Demenz* und eine *sekundäre Demenz*. Ferner sollte eine „Pseudodemenz“ im Rahmen einer Depression differentialdiagnostisch abgeklärt werden.

Die *primäre Demenz* beschreibt eine eigenständige neurologische Erkrankung. Tabelle 2.5 gibt einen Überblick über die Einteilung der Formen der primären Demenz und ihre Symptomatik.

Die *sekundäre Demenz* beschreibt eine z.T. reversible kognitive Störung mit potentiell heilbarer Ursache, weswegen die Patienten differentialdiagnostisch immer neurologisch und internistisch abgeklärt werden sollten. Elektrolytverschiebungen (v.a. Natrium), ein Vitaminmangel (z.B. B12), die Hypothyreose, Medikamentennebenwirkungen aber auch chronische Erkrankungen wie der Morbus Parkinson können ursächlich für eine sekundäre Demenz sein.

Da eine Untersuchung der epigenetischen Veränderungen aller Demenzformen den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, soll im Folgenden vor allem auf den Stand der Forschung im Hinblick auf die Veränderung der Histonacetylierung bei der Alzheimer-Demenz eingegangen werden.

Erkrankung	Abkürzung	Häufigkeit	Symptomatik
Alzheimer-Demenz	AD	50-60%	Primär degenerativ, eine Früh- und eine Spätform ist bekannt, die Lebenserwartung ist um 6-8 Jahre reduziert
Vaskuläre Demenz	VD	20%	Ursächlich sind multiple Infarkte (deswegen auch Multiinfarktdemenz), kognitive Defizite und fokal neurologische Symptomatik
Levy-Body-Demenz	LBD	10-15%	Parkinson-Symptome, räumlich-konstruktive Störungen, erhöhte Sturzgefahr, unauffällige Gedächtnisfunktion
Fronto-Temporal-Demenz	FTD	5%	Meist frühes Auftreten (unter 65 Jahren) und rapide Progression der Symptomatik, Persönlichkeitsveränderungen, Verhaltensauffälligkeiten, Enthemmung, z.T. sehr aggressives Verhalten, Sprachstörungen

Tabelle 2.5: **Formen der primären Demenz**

2.4.3.1 Globale Veränderung der Acetylierung bei der Alzheimer-Demenz

Die Histonacetylierung ist im Gegensatz zur Histonmethylierung in diesem Feld weniger gut erforscht, doch da sich diese Arbeit vorrangig auf die Acetylierung bezieht, soll auch hier der Fokus auf jener Modifikation liegen. Viele Erkenntnisse stammen aus indirekten Hinweisen, da gerade die HDAC-Inhibitoren in verschiedenen AD-Mausmodellen einen protektiven Effekt zu haben scheinen. Sie stärken die Dichte der dendritischen Dornen und helfen bei Lernvorgängen und Gedächtnisbildung, wichtige Faktoren bei der Alzheimer-Erkrankung (Fischer *et al.* 2007, Francis *et al.* 2009, Ricobaraza *et al.* 2009, Zhang & Schluesener 2013, Rumbaugh *et al.* 2015). Kilgore *et al.* zeigten 2010 sogar eine komplette Wiederherstellung der Gedächtnisbildung bei transgenen AD-Mäusen durch die Gabe der HDAC-Inhibitoren Natriumvalproat, Natriumbutyrat und Vorinostat (Suberoylanilidhydroxamisäure; Zolinza®)¹⁸. Ob eine Anwendung beim Menschen erfolgversprechend sein kann, bleibt noch Gegenstand der Forschung.

Interessanterweise scheint die HDAC2 in Mäusen, wie im Menschen, im Alter erhöht zu sein (Chouliaras *et al.* 2013, Singh & Thakur 2014, Mastroeni *et al.* 2011). In post-mortem akquirierten Proben konnte ebenfalls eine Elevation von HDAC2 im Hippocampus und entorhinalen Kortex festgestellt werden (Gräff *et al.* 2012), beides Areale, die für das Erinnern zuständig sind. Leider sind die Publikationen, die sich mit der globalen Veränderung der Histonacetylierung befassen, momentan noch sehr

¹⁸Diese Inhibitoren sind vor allem Inhibitoren der Klasse I (HDAC1, 2, 3 und 8) mit Ausnahme von Vorinostat, das auch die HDAC6 inhibiert.

widersprüchlich. Es gibt Veröffentlichungen, die eine Zunahme der Histonacetylierung festgestellt haben, eine Abnahme oder auch gar keine Änderung feststellen konnten (Narayan *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2012, Rao *et al.* 2012). Vom Maus-Modell weiß man jedoch, dass das Level an H4K12ac zwar durch die verschiedenen Altersgruppe hindurch konstant bleibt, die jungen Mäuse jedoch im Gegensatz zu den alten, als einzige bei einem Lernstimulus in der Lage sind, diesen Grad der Acetylierung zu steigern (Peleg *et al.* 2010). Die Vernetzung der Histonacetylierung und der Gedächtnisbildung im Gehirn ist also nicht von der Hand zu weisen, auf Grund der Schwierigkeit der Generierung von Proben (z.B. Biopsien aus dem menschlichen Gehirn) aber sehr schwer zu beweisen.

Wie beim Diabetes scheint es aber auch bei der AD ein „epigenetisches Gedächtnis“ zu geben. Bei der Pathogenese des Alzheimers spielt das Amyloid- β eine entscheidende Rolle, welches sich in Plaques ablagert (die sogenannten *senilen Plaques*) und so zum Absterben von Gehirnzellen führt. Mikroskopisch lassen sich intrazellulär hyperphosphorylierte Neurofibrillenbündel bestehend aus dem Tau-Protein nachweisen. Lange Zeit ging man davon aus, dass die Beseitigung der senilen Plaques zu einer Verbesserung der Krankheitsprogression- und symptomatik führen müsste, was sich jedoch überraschend als frustan herausstellte (Holtzman *et al.* 2011). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Zunahme der HDAC2-Aktivität über die fehlende Histonacetylierung wichtige Gene runterreguliert, welche für das Gedächtnis und das Lernen zuständig sind (Gräff *et al.* 2012). Diese „epigenetische Lernblockade“ hält auch weiterhin an, obwohl die senilen Plaques beseitigt wurden, sodass für zukünftige pharmakologische Therapiekonzepte die Hemmung der HDAC2 in Kombination mit der Beseitigung der Amyloid- β -Plaques in den frühen Stadien der Alzheimer-Erkrankung in den Fokus gerückt ist (s. Abb. 2.9).

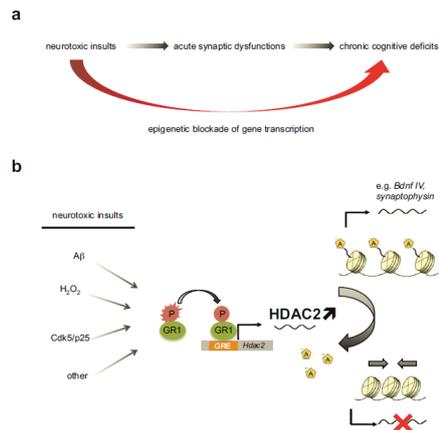


Abbildung 2.9: **Die „Lernblockade“ von HDAC2.** a: Zwar führen neurotoxische Insulte zu akuten synaptischen Funktionsstörungen, doch scheinen auch gerade epigenetische Mechanismen, die zur Blockade der Expression von Genen, die für das Lernen und die Gedächtnisbildung wichtig sind, einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankung zu haben. b: Neurotoxische Noxen wie Amyloid- β -Fibrillen ($A\beta$), H_2O_2 , intrazelluläre Akkumulation von Cdk5 oder p25 und weitere führen zu einer Phosphorylierung vom Glucocorticoidrezeptor 1 (GR1). Phosphoryliertes GR1 bindet im Mausmodell an das GR-responsive Element (GRE) in der proximalen Promotorregion von HDAC2 und stimuliert die Expression von HDAC2. HDAC2 wiederum bindet an die Promotorregionen von Genen, welche essentiell für die Gedächtnisbildung und das Lernvermögen sind (z.B. Bdnf IV, Synaptophysin) und führt so über eine vermehrte Kondensation des Chromatins zu einer Abnahme der Genaktivität. Dieses spiegelt sich in einer Abnahme der Neuroplastizität und einem Verlust der Gedächtnisfunktion und der Lernfähigkeit wider (verändert nach Gräff *et al.* 2012, PMC-Lizenz).

2.5 Aufgabenstellung

In der vorgelegten Arbeit soll gezeigt werden, ob sich die Acetylierungsmuster von Histon H4 in peripheren mononukleären Blutzellen als Biomarker des Alterns oder sogar zur Detektion von Pathologien im Menschen eignen. Da bekannt ist, dass sich die Immunkompetenz im Alter verändert s. 2.4.2 soll ein Protokoll entwickelt werden, dass menschliche *in vivo* Studien ermöglicht. Blutproben von Patienten sollen so prozessiert werden, dass sie dem Massenspektrometer zugeführt und sinnvoll auf Veränderungen der Histonacetylierung untersucht werden können. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob und inwiefern die Histonacetylierung sich physiologisch verändert, müssen zuerst Proben von gesunden Individuen gewonnen und analysiert werden, damit eine Aussage über den Normwertbereich bzw. die Verwendbarkeit und Reproduzierbarkeit dieser Daten

getroffen werden kann.

Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich ist, die Blutprobenergebnisse mit Gewebebiopsien im Menschen zu vergleichen (z.B. Proben aus dem Hippocampus), soll ein Mausmodell für den Vergleich der Ergebnisse im peripheren Blut und dem Hippocampus auf eine eventuelle Korrelation untersucht werden. So soll gezeigt werden ob z.B. neurodegenerative Vorgänge schon im Rahmen von Screeninguntersuchungen im peripheren Blut festzustellen wären.

Um den Rahmen dieser Arbeit einzuhalten, beschränken sich die folgenden Versuche nur auf das Histon H4.

Kapitel 3

3 Ergebnisse

3.1 Humane Proben

Um die Acetylierung von Histon H4 in humanen PBMCs zu untersuchen, wurde Probanden aus drei Altersklassen Blut abgenommen. Damit eine zuverlässige Aussage über die Veränderung der Acetylierung getroffen werden konnte, wurde ein neuer Ansatz in der Untersuchung jener gewählt. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass bei Untersuchungen mit Antikörpern eine große Verzerrung auf Grund von fehlender Spezifität auftritt und die Antikörper eine höhere Affinität zu polyacetylierten Zuständen haben (Rothbart *et al.* 2012, Rothbart *et al.* 2015; s. auch Abb. 3.1). Aus diesem Grund wurden die Proben mithilfe eines neuen Ansatzes - der Massenspektrometrie - analysiert.

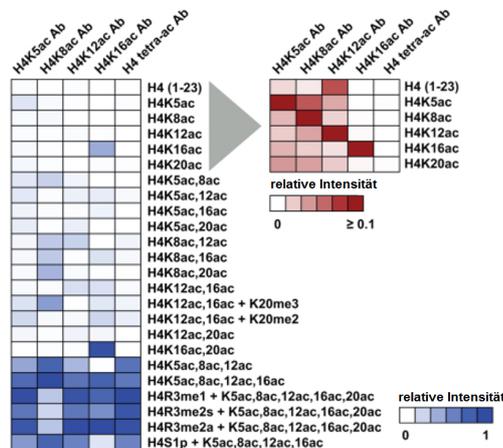


Abbildung 3.1: **Heatmaps, die die Spezifität der Antikörper für die H4-Acetylierungen zeigen.** Die Ergebnisse der einzelnen Spalten wurden zum am häufigsten auftretenden Peptidergebnis normalisiert. Es ist gut erkennbar, dass die Antikörper polyacetylierte Stadien von H4 abundanter anzeigen, als die für sie eigentlich vorgesehenen Monoacetylierungen der verschiedenen Lysinreste. Die Ergebnisse werden verzerrt und spiegeln nicht die Realität wider. Daher wurde für diese Doktorarbeit die Messung der Acetylierungen mithilfe der Massenspektrometrie gewählt. (Abb. modifiziert nach Rothbart *et al.* 2012, PMC-Lizenz).

Die Probanden wurden wie folgt in die drei Gruppen eingeteilt; „Jung“ (Alter 18-25, n=13), „Mittelalt“ (Alter 33-47, n=8) und „Alt“ (Alter >65, n=5). Um Infektionen und Erkrankungen des blutbildenden Systems auszuschließen wurde bei allen Probanden ein großes Blutbild angefertigt. Leider fiel hier ein Proband auf Grund von einer sehr hohen Leukozytenzahl und atypischen Lymphozyten auf, weshalb er aus der Gruppe „Alt“ (n=4) herausgenommen wurde und im Weiteren als „Fall“ bezeichnet wird. Nach der Blutabnahme, wurden die PBMCs isoliert (s. 5.1.5) und ca. 10.000.000 Zellen pro Probe bis zur Massenspektrometrie prozessiert.

3.1.1 Vorversuche

Da das Protokoll zuvor noch nicht mit humanen Zellen durchgeführt wurde, welche frisch im Rahmen einer Blutabnahme akquiriert wurden, bedurfte es eines Vorversuchs. Um sicher zu gehen, dass reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse erzielt werden und so wenig Störfaktoren wie möglich die Ergebnisse verfälschen, wurde zuerst eine Selektion des Zelltyps der Immunzellen und dann ein Titrationsversuch für das Massenspektrometer durchgeführt.

3.1.1.1 Lymphozytenaufreinigung vs. neutrophile Granulozyten vs. PBMCs

Um die Reliabilität der Versuche zu gewährleisten, sollten nur Lymphozyten, welche mithilfe einer Antikörper-Aufreinigung oder PBMCs, welche durch eine spezielle Waschung der Blutproben gewonnen werden konnten (5.2.5 auf Seite 82), für die Messung der Histonacetylierung von H4 genutzt werden. Andere Blutbestandteile wie die Erythrozyten, Thrombozyten, sowie polymorphkernige Immunzellen sollten abgetrennt werden. Die Aufreinigung der Lymphozyten hat den Vorteil, dass nur eine Gruppe der Immunzellen zu den Ergebnissen beiträgt, dem gegenüber stehen die Nachteile der längeren Prozessierung ohne Kühlung und die gesteigerten Kosten für die Antikörper-MicroBeads. Daher sollte durch einen Vorversuch der Nutzen dieser Methode eruiert werden.

Es wurde zunächst n=1 Probanden Blut abgenommen und ein großes Blutbild¹ angefertigt. Dann wurden die einzelnen Blutbestandteile mithilfe der Leucosep-Röhrchen (Greiner Bio One) voneinander getrennt (s.Abb. 3.2).

Die Waschungen wurden wie in Abschnitt 5.2.5 beschrieben durchgeführt und somit am Ende 1ml PBMCs in PBS-Lösung gewonnen und mithilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert. Um die neutrophilen Granulozyten zu isolieren, wurde das Protokoll mit den

¹Großes Blutbild = Kleines Blutbild (vereinfacht: Erythrozyten + Indizes, Thrombozyten, Leukozyten_{gesamt}) + Differentialblutbild (Zusammensetzung der Untergruppen der Leukozyten)

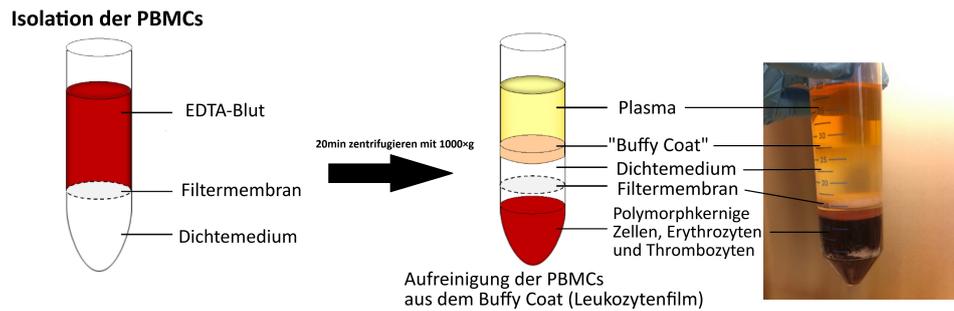


Abbildung 3.2: **Die schematische Isolation der PBMCs aus dem Vollblut (EDTA) der Probanden.** 22ml Probandenblut (EDTA) werden in die Leucosep-Röhrchen gefüllt und bei $1000\times g$ 20min zentrifugiert. Danach wird das Plasma zusammen mit dem sogenannten Buffy Coat (Leukozytenfilm) in ein neues Zentrifugenröhrchen transferiert und mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen (5.2.5 auf Seite 82) (Abbildung modifiziert nach Coughlan & Lambe 2015, PMC-Lizenz).

CD15-MicroBeads (MACS) durchgeführt. Die Lymphozytenisolation erfolgte mithilfe der CD45-MicroBeads (MACS). Obwohl sich bei der Quantifizierung der PBMCs schon eine komplette Depletion der neutrophilen Granulozyten zeigte (s. Tab. 3.1), wurde die Anreicherung mit den CD15-MicroBeads dennoch durchgeführt, um Messfehler auszuschließen.

Je $400\mu\text{l}$ der PBMC-PBS-Lösung wurden der Prozessierung mit den CD15-MicroBeads und den CD45-MicroBeads zugeteilt. Die Proben wurden zunächst bei $300\times g$ 10min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. $80\mu\text{l}$ der Pufferlösung wurden zu den Rückständen gegeben und die entstandenen Zelllösungen mit $20\mu\text{l}$ CD15-MicroBeads bzw. CD45-MicroBeads gemischt. Die so entstandene Lösung wurde 15min bei -4°C inkubiert. Die Zellen wurden danach mit 1ml Pufferlösung gewaschen und der Überstand nach dem Zentrifugieren ($300\times g$ 10min) aspiriert und verworfen. Eine Resuspension mit $500\mu\text{l}$ Pufferlösung wurde durchgeführt und die magnetische Markierung der Zielzellen damit abgeschlossen. Die CD45^{+} - bzw. die CD15^{+} -Zellen binden an die Antikörperschicht der MicroBeads und werden somit an den Metallkügelchen gehalten und angereichert.

Die Lösung wurde anschließend in eine spezielle Trennsäule (MACS MS Column) gegeben und diese in einer magnetischen Halterung befestigt (s. Abb. 3.3). Da es sich bei den MicroBeads um antikörperbeschichtete Metallkügelchen handelt, verhindert der Einschluss in ein magnetisches Feld die Auswaschung der Kugeln und somit auch die Auswaschung der Zielzellen. Durch einen Waschschriff mit der Pufferlösung erfolgte eine negative Selektion, bei der alle Zellen, welche nicht CD45^{+} - bzw. CD15^{+} waren, ausgewaschen wurden. Anschließend wurde die Trennsäule aus dem magnetischen Feld entfernt und die angereicherten CD45^{+} - bzw. CD15^{+} mit Zugabe von 1ml der Pufferlösung und einem mechanischen Manöver von den Metallkügelchen gelöst. Hierbei

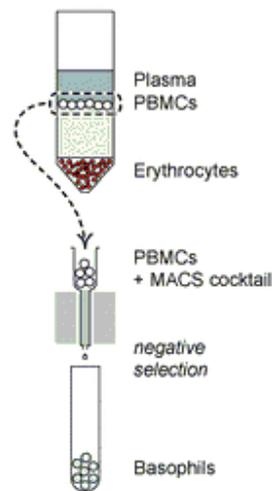


Abbildung 3.3: **Schematische Darstellung der Zellaufreinigung durch die magnetischen MicroBeads.** Die aufgereinigten PBMCs werden mit den magnetischen Antikörper-Kügelchen gemischt und inkubiert. Danach wird die Lösung in eine spezielle Trennsäule gegeben und die Zellen mittels eines magnetischen Felds getrennt. Die CD45⁺- bzw. CD15⁺-Zellen bleiben an den Metallkügelchen hängen, welche durch das magnetische Feld nicht ausgewaschen werden können. Es folgt eine negative Selektion, bei der alle anderen Zellen, welche nicht die gewünschten Eigenschaften aufweisen, mit der Pufferlösung ausgewaschen werden. Danach wird die Trennsäule aus dem magnetischen Feld entfernt und die CD45⁺- bzw. CD15⁺-Zellen werden durch einen erneuten Wasch-Schritt mechanisch von den Kügelchen gelöst.

wurde der Stopfen, welcher der Trennsäule beilag, fest in jene hineingedrückt, bis die gesamte Flüssigkeit in die vorher präparierten Eppendorfröhrchen geflossen ist. Diese Proben wurden erneut durch eine Durchflusszytometrie im Rahmen eines Differential-Blutbildes quantifiziert.

PBMCs oder auf Deutsch die mononukleären Zellen des peripheren Blutes, also Abwehrzellen mit nur einem runden Zellkern, setzen sich vor allem aus Lymphozyten und Monozyten zusammen. Die neutrophilen Granulozyten zählen mit ihren länglichen und z.T. amorphen Zellkernen nicht dazu (s. 3.4). Überraschend war jedoch, dass die Aufreinigung der PBMCs mit dem Leukosep-Protokoll (s. 3.1.1.1) bereits zu einer so zuverlässigen Depletion der neutrophilen Granulozyten führte, dass selbst die Verwendung von CD45⁺ MicroBeads keinen entscheidenden Vorteil bot. Das CD45-Antigen ist ein membranständiges Protein, das von beinahe allen Leukozytenarten präsentiert wird. Allerdings werden neutrophile Granulozyten ebenso wie Plasmazellen klassischerweise nicht CD45⁺ markiert, ein Umstand, den man sich zum Beispiel in der Pathologie zu Nutze machen kann. Zu erwarten wäre gewesen, dass die Aufreinigung der PBMCs erst durch die MicroBeads so sicher erreicht werden kann, dass es zu keinen Störfaktoren

(z.B. durch verbleibende Granulozyten) in der Messung kommt. Dies war aber nicht der Fall. Wie in Tab. 3.1 zu sehen ist, rechtfertigte der Nutzen nicht die Kosten und somit wurde dieser Schritt aus dem Protokoll verworfen.

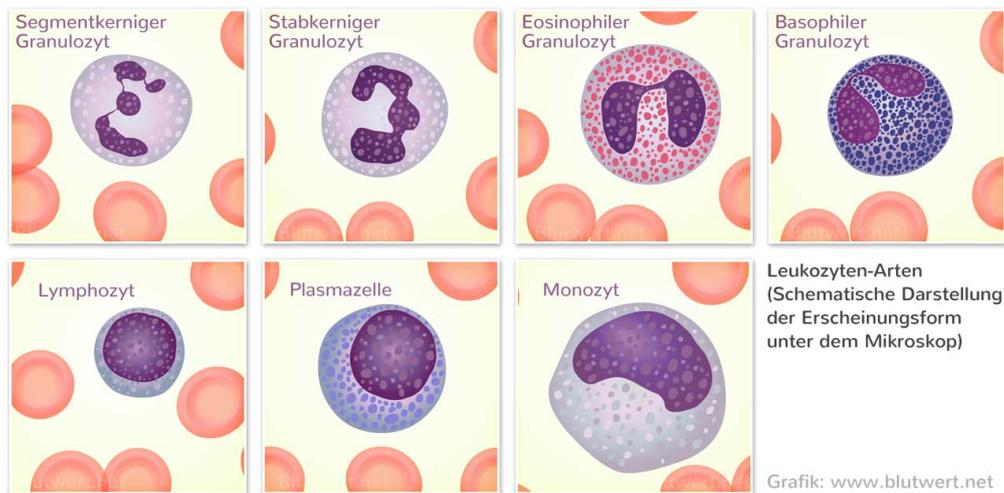


Abbildung 3.4: **Leukozyten-Arten im menschlichen Blut.** Grobe, schematische und vereinfachte Darstellung der wichtigsten Leukozyten-Arten im peripheren menschlichen Blut. Zu den PBMCs werden nur die Zellen mit einem runden Zellkern gezählt, also z.B. die Lymphozyten und die Monozyten. Die Granulozyten fallen durch ihre länglichen Zellkerne auf und sind deshalb per definitionem keine PBMCs. (Ref.: Martin Mißfeldt, CC-Lizenz)

Nachdem auch in der CD15-MicroBeads Probe keine Neutrophilen mehr zu finden waren, wurde diese Zellfraktion für weitere Versuche oder die Prozessierung zur Quantifizierung der Histon H4Ac verworfen. Überraschenderweise veränderte sich jedoch auch das Differentialblutbild bei den CD45⁺-Zellen nicht. Hier fand sich dasselbe Ergebnis wie zuvor nach der PBMC-Aufreinigung. Um diese Ergebnisse zu validieren wurde der Versuch an n=5 Probanden durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.1 aufgelistet.

Anhand des Vergleichs der Differentialblutbilder vor und nach der CD45-MicroBeads-Behandlung der Proben wird ersichtlich, dass die Veränderungen minimal ausfallen, zumal die Monozyten weiterhin in der Lösung bestehen bleiben. Der Sinn der Lymphozytenaufreinigung wäre jener gewesen, nur eine Zellpopulation, hier die Lymphozyten, zur Analyse der H4Ac zu haben, um die Reliabilität zu steigern. Da dies mithilfe der MicroBeads jedoch nicht erreicht werden konnte, wurde dieser Schritt im Protokoll verworfen und es wurden die PBMCs zur Analyse gewählt. Die kleinen Veränderungen rechtfertigen nicht die kostspielige Aufreinigung mit den MicroBeads.

Tabelle 3.1: Übersicht PBMCs vs. Lymphozytenaufreinigung.

	Vollblut	nach PBMC-Aufreinigung	nach CD45-MicroBeads	Veränderung in %
Proband 1				
Lymphozyten [%]	26,1	70,9	73,1	+ 3,10%
Monozyten [%]	8,7	28,1	25,5	- 9,25%
Neutrophile [%]	64,1	0	0	+ 0 %
Proband 2				
Lymphozyten [%]	30,6	76	74,3	- 2,24%
Monozyten [%]	6,2	20,3	21,6	+ 6,40%
Neutrophile [%]	60,8	2,1	2,7	+ 28,57%
Proband 3				
Lymphozyten [%]	46,1	81,6	82,2	+ 0,74%
Monozyten [%]	8,5	15,9	15,9	+ 0,00%
Neutrophile [%]	40,8	2	0,7	- 65,00%
Proband 4				
Lymphozyten [%]	33,8	70,8	74,1	+ 4,45%
Monozyten [%]	10,1	24,3	24,4	+ 0,41%
Neutrophile [%]	52,2	3,8	0	- 100,00 %
Proband 5				
Lymphozyten [%]	27	70,2	71,4	+ 1,71%
Monozyten [%]	9,8	23,7	23,7	- 0,42%
Neutrophile [%]	61,8	0	0	+ 0%

3.1.1.2 Titrationsversuch

Für die Analyse mit der Massenspektrometrie ist es wichtig, dass die Proben ungefähr dieselbe Anzahl an Zellen aufweisen, um keine Verzerrung der Ergebnisse oder Signalfehler zu konstruieren. Deswegen wurde ein Titrationsversuch durchgeführt, um die Zellzahl für die kommenden Versuche festzulegen. Es wurden zunächst zwei PBMC-Pellets aus dem -80°C Gefrierschrank nach dem ersten Tag des Histon-Extraktionsprotokolls (s.5.3.2.1 auf Seite 85) prozessiert. Hierbei wurden allerdings die PBMC-Pellets zweier Probanden zusammengefügt, sodass sich eine Lösung von insgesamt ca. 80 Millionen Zellen in 1ml Pufferlösung ergab.

Am Tag 2 des Protokolls wurden jeweils 5 aliquote Teile dreimal in neue Eppendorf-Röhrchen verteilt. Diese wurden mit 400%, 200%, 100%, 50% und 20% bezeichnet, wobei 100% für ca. 2 - 3 Millionen Zellen und eine Lösungsmenge von 50µl stand. Die Ergebnisse aus der Massenspektrometrie sollten einen Überblick darüber geben, wie viele Zellen von den finalen Proben gebraucht werden würden und welche Zellmenge

die zuverlässigsten Signale gibt.

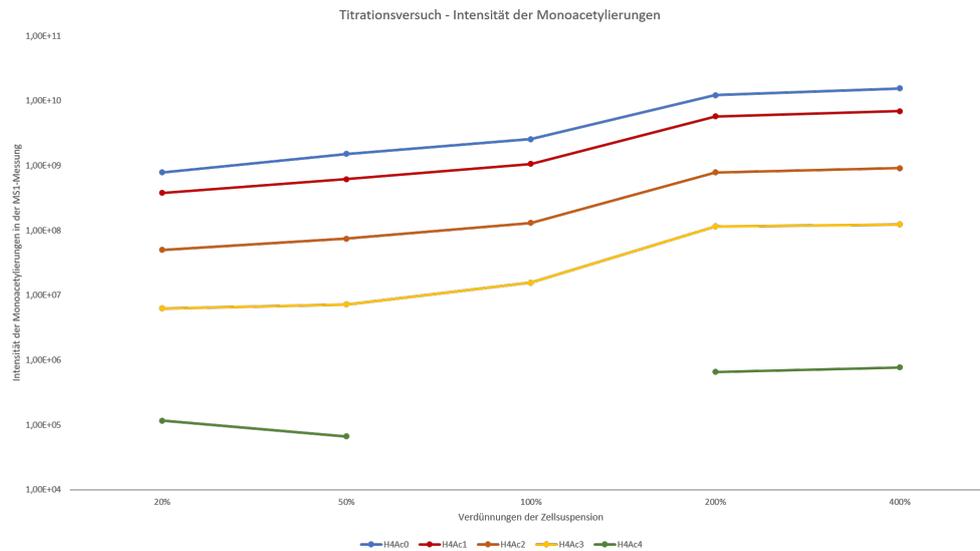


Abbildung 3.5: **Titrationsversuch zur Determination der benötigten Zellmenge.**

Die Probandenproben wurden in 5 aliquote Teile aufgeteilt. 100% stehen für 2-3 Millionen Zellen und entsprechen einer Menge von 50µl der Zellsuspension. Entsprechend stehen 400% für ca. 8 Millionen Zellen und ein Suspensionsvolumen von 200µl; 200% für etwa 4 Millionen Zellen und ein Suspensionsvolumen von 100µl; 50% für etwa 1 Millionen Zellen und ein Volumen von 25µl und 20% für etwa 400.000 Zellen und ein Lösungsvolumen von 10µl. Auffällig ist, dass mit der Zunahme der Zellzahl die Intensität in der MS1-Messung steigt. Bei einer Zellzahl von etwa 8 Millionen scheint ein Plateau nahezu erreicht zu sein, allerdings ist die Messung der H4Ac4 noch nicht zuverlässig möglich. Bei einer von drei Messungen der 400%-Probe war die Konzentration für die MS1-Messung zu gering, um detektiert zu werden.

Wie in Abb. 3.5 ersichtlich ist, steigt die Intensität in der MS1-Messung mit der Zellzahl. Um reliable Daten zu erhalten, war besonders die Messung der H4Ac4-Anteile wichtig. Hier fiel auf, dass gerade bei den niedrigeren Zellzahlen eine Messung meist durch eine zu niedrige Intensität nicht möglich war. Selbst bei 8 Millionen Zellen ($\hat{=}$ 400%) war bei einer von drei Proben eine Bestimmung der H4Ac4 nicht möglich. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche zur Bestimmung der H4-Acetylierungen im Alter der Maus und des Menschen eine Zellzahl von etwa 10 Millionen ($\hat{=}$ 250µl der PBMC-Suspension) gewählt. Diese konnte verlässliche Signale im Massenspektrometer liefern.

3.1.2 Probandenselektion

Um zuverlässige und interpretierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde eine Vorauswahl der Probanden anhand eines dreiseitigen Fragebogens getroffen. Dieser Fragebogen sollte auch sicherstellen, dass nur gesunde Probanden zugelassen werden. Um dies zu erreichen, wurden das Alter, das Geschlecht, die Größe und das Gewicht zur Berechnung des BMIs abgefragt. Ferner sollten sich die Versuche erst mal auf kaukasische Probanden beschränken und eine Blutsverwandtschaft der Eltern ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde nach dem Bildungs- und Familienstand gefragt.

Um überdies auszuschließen, dass die Histonacetylierung sich durch Suchtverhalten, Medikamenteneinnahme oder andere bestehende Erkrankungen verändert, wurden auch Rauchverhalten, der Alkohol- und Drogenkonsum, Allergien, Sportverhalten, Medikamentenanamnese und die Vorerkrankungen abgefragt. Da gewisse Erkrankungen auch eine erbliche Komponente aufweisen, wurde weiterhin auch eine Familienanamnese durchgeführt.

Nur Probanden, die einen unauffälligen Fragebogen aufwiesen und noch keine Knochenmarktransplantation erhalten haben, wurden zu dieser Studie zugelassen. Ihnen wurde Blut abgenommen und jenes anonymisiert prozessiert, um einer etwaigen Verzerrung bei der Analyse oder Prozessierung vorzubeugen. Ausnahme bildete hier der Proband Nr. 23, welcher aus ethischen Gründen über die Auffälligkeiten in seinem Blutbild informiert wurde (s. 3.1.3).

3.1.3 Laborergebnisse

Da Infektionen und maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems die Histonacetylierung in den PBMCs massiv beeinträchtigen könnten, wurde bei allen Probanden ein großes Blutbild durchgeführt. Hier konnte eine akute Infektion ausgeschlossen und wie im „Fall“ auch auf eine maligne Grunderkrankung geschlossen werden, was als Konsequenz eine Herausnahme aus der Altersgruppe bedeutete. Weiterhin musste die Zellzahl für die Proben für das Massenspektrometer berechnet werden und auch hierfür eignete sich die Quantifizierung der Blutzellen hervorragend.

Der Tabelle 3.2 kann man entnehmen, dass die Anzahl der PBMCs im Blut der verschiedenen Altersgruppen vergleichbar war, nicht jedoch im „Fall“. Hier imponiert eine Leukozytose² in Kombination mit einer leichten Thrombopenie³ und in der Hämatologie fielen im Differentialblutbild atypische Zellen (Kernschatten, toxische Granulierung und eine Anisozytose) und eine Granulozytopenie⁴ auf, was die Verdachtsdiagnose

²Erhöhung der Leukozytenzahl; Referenzbereich hier: 4.0-11.0 G/l

³Verringerung der Thrombozytenzahl; Referenzbereich hier: 150-400 G/l

⁴auch Neutropenie; Mangel an Granulozyten (spezialisierte Abwehrzellen)

einer chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL) zulässt. Für eine Diagnosesicherung hätten jedoch weitere Untersuchungen erfolgen müssen (z.B. Knochenmarksstanze/-biopsie), was der Proband auf Grund seines Alters und der fehlenden Konsequenz für sich ablehnte. Aus ethischen Gründen folgte deswegen keine weitere Abklärung der dringenden Verdachtsdiagnose.

Tabelle 3.2: **Durchschnittliche Anzahl der Leukozyten und PBMCs im Blutbild der Probanden**

Probandengruppe	Durchschnittliche Anzahl der Leukozyten (G/l)	Durchschnittliche Anzahl der PBMCs (G/l)
Jung	6130	2224
Mittelalt	5500	2258
Alt	6233	2063
Fall	31.500	13.860

3.1.4 Ergebnisse der Massenspektrometrie

Das Probandenblut wurde mithilfe der Leucosep-Röhrchen aufgetrennt, und die PBMCs, wie in 5.2.5 auf Seite 82 beschrieben, gewonnen. Die Histone wurden mit einem hypotonen Lysepuffer extrahiert, auf 4-20% SDS-Gelen aufgetrennt und eine In-Gel-Acetylierung mit Essigsäureanhydrid-d₆ (D3AA) (Smith *et al.* 2003) sowie ein Trypsinverdau durchgeführt. Die artifizielle Acetylierung mit D3AA führt zu einem Massenshift von +3 an allen nicht-modifizierten Lysinresten, sodass später in den Daten der Massenspektrometrie unterschieden werden kann, wo zuvor eine natürliche Acetylierung vorlag und wo nicht. Nach der Messung im Massenspektrometer wurden die Daten mithilfe von Xcalibur, einem Programm für die Datenanalyse der vom Massenspektrometer akquirierten Ergebnisse, und Excel bearbeitet. Die Datenanalyse ist in Abschnitt 5.3.5.4 auf Seite 91 detailliert beschrieben. 2019 erfolgte eine Aktualisierung mithilfe von Skyline und die Daten wurden entsprechend neu auf eine statistische Signifikanz geprüft. Dies geschah mit dem Mann-Whitney-U-Test.

Der Mann-Whitney-U-Test (engl. "Wilcoxon rank-sum test", kurz: WRS) eignet sich vor allem dazu, die Frage zu beantworten, ob sich die zentrale Tendenz zweier unabhängiger Stichproben voneinander unterscheidet. Dabei müssen die Daten nicht normal verteilt sein und er kann auch bei kleineren Stichproben und Ausreißern Anwendung finden. Die Daten müssen lediglich ordinal skaliert sein. Da die Datenmenge durch die Probanden nicht allzu groß und bislang auch nicht klar war, ob die Ergebnisse einer Normalverteilung folgen, wurde dieser Test zur Berechnung einer statistischen Signifikanz herangezogen.

3.1.4.1 Prozentualer Anteil der Acetylierungen in humanen PBMCs

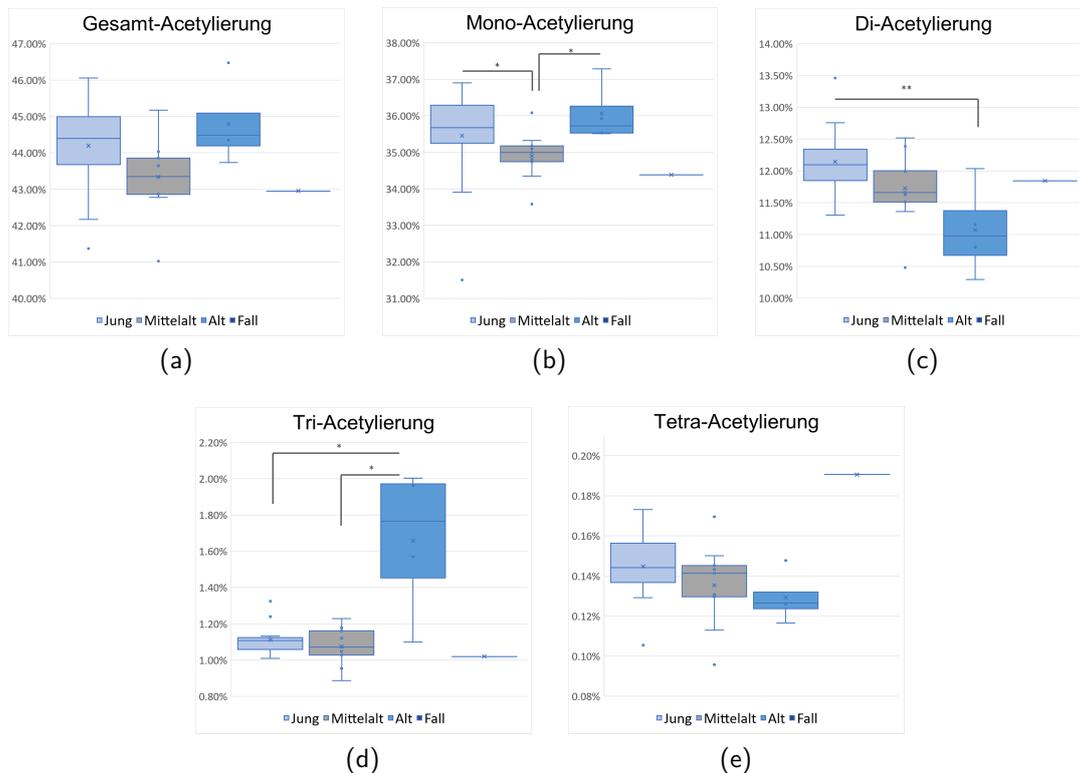


Abbildung 3.6: **Prozentualer Anteil der Acetylierungen in humanen PBMCs.** (a): Vergleich der prozentualen Anteile der Gesamtacetylierung des Histons H4 (4-17 Peptide) in alternden PBMCs des Menschen. Die Ergebnisse wurden mit der Messung in einem Massenspektrometer gewonnen. (b): Quantifikation der Monoacetylierung basierend auf den MS1 Peaks. Auffällig ist, dass der prozentuale Anteil an Monoacetylierungen im mittleren Alter signifikant abfällt, um dann wieder signifikant beinahe auf das Level der „jungen“ Altersgruppe anzusteigen. (c): Das Level an Diacetylierungen fällt im Alter signifikant ab. (d): Der prozentuale Anteil an Triacetylierungen steigt im Alter signifikant an, während „junge“ und „mittelalte“ Probanden sehr ähnliche Werte aufweisen. Auch der „Fall“ zeigt trotz seines Alters eher Werte eines jungen oder mittelalten Probandens. (e): Die Tetraacetylierungen weisen keine signifikanten Veränderungen auf, jedoch zeigt der „Fall“ höhere Werte als der Rest der Probanden. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Wie in Abbildung 3.6 ersichtlich ist, sinkt die Gesamtacetylierung im mittleren Alter ab, um dann im „Alter“ sogar wieder über das Level der „jungen“ Probanden zu steigen. Ähnlich verhält es sich auch mit der Monoacetylierung, wobei diese Veränderung auch statistische Signifikanz aufweist. Während die Diacetylierung im Alter signifikant abfällt, kommt es bei den Triacetylierungen zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg

im Alterungsprozess. Die Tetraacetylierung nimmt hingegen wieder stetig ab.

Der „Fall“ scheint sich bei der Gesamt-, Mono-, Di- und Triacetylierung eher wie ein „mittelalter“ Proband zu verhalten, als wie ein 95-Jähriger, der der Gruppe „alt“ zugeordnet werden sollte. Bei der Tetraacetylierung fällt jedoch eine massive Veränderung des Acetylierungsmusters auf. Hier weist der „Fall“ eine Zunahme von über 40% im Gegensatz zu den gesunden „alten“ auf (s. Abb. 3.6).

3.1.4.2 Aufschlüsselung des Monoacetylierungsmusters in humanen PBMCs

Die Abbildung 3.7 zeigt die Aufschlüsselung der verschiedenen Monoacetylierungen in humanen PBMCs im Alterungsprozess des Menschen. Die Quantifizierung der H4K5-Monoacetylierung ergab keine signifikanten Veränderungen. Bei der H4K8-Monoacetylierung fällt ein stetiger Abfall im Alterungsprozess auf, wenngleich sich eine Signifikanz nicht nachweisen lässt. Die H4K12-Monoacetylierung zeigt bei dem „Fall“ erhöhte Werte, ansonsten aber keine statistisch signifikanten Tendenzen zwischen den Gruppen. Die H4K16-Monoacetylierung sinkt im mittleren Alter signifikant ab, um dann ebenfalls signifikant wieder anzusteigen. Auffällig ist, dass der prozentuale Anteil der H4K16-Monoacetylierung beim „Fall“ im Gegensatz zu den anderen Gruppen sehr niedrig ist.

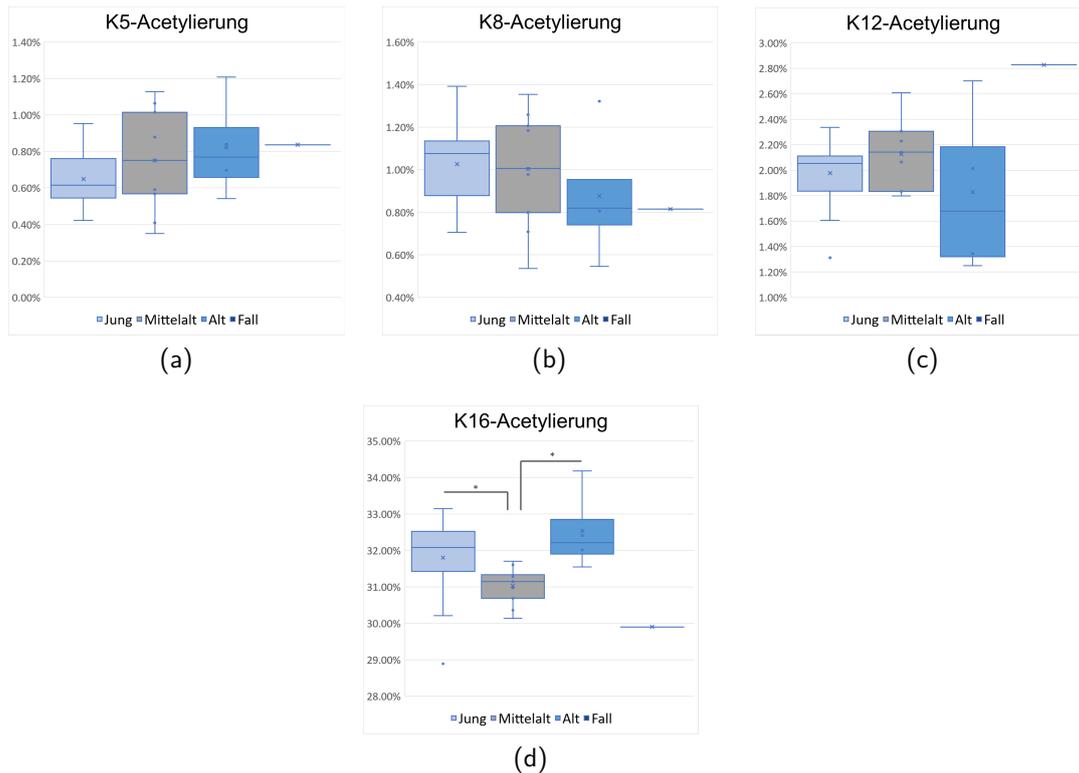


Abbildung 3.7: **Prozentualer Anteil der Monoacetylierungen in humanen PBMCs (hPBMCs).** (a): Die Quantifizierung ergab keine signifikanten Veränderungen. (b) Bei der H4K8-Monoacetylierung fällt der Abfall im Alterungsprozess auf, wenngleich eine Signifikanz nicht nachweisbar ist. (c): Die H4K12-Monoacetylierung weist keine signifikanten Veränderungen auf, allerdings zeigt der „Fall“ erhöhte Werte für diese PTM. (d) Die H4K16-Monoacetylierung sinkt im mittleren Alter signifikant ab, um dann ebenfalls signifikant wieder anzusteigen. Der prozentuale Anteil der H4K16-Monoacetylierung ist beim „Fall“ im Gegensatz zu den anderen Gruppen sehr niedrig. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Auffällig ist, dass der prozentuale Anteil der H4K16-Monoacetylierung beim „Fall“ im Gegensatz zu den anderen Gruppen sehr niedrig ist.

3.1.4.3 Aufschlüsselung des Diacetylierungsmusters in humanen PBMCs

Die Abbildung 3.8 zeigt die Aufschlüsselung der verschiedenen Diacetylierungen in humanen PBMCs im Alterungsprozess des Menschen. Die H4K5K8-Diacetylierung zeigt interessanterweise kaum Veränderungen zwischen den unterschiedlichen Gruppen. Die H4K12K16-Diacetylierung fällt im Alter signifikant ab. Auch hier verhält sich der „Fall“ wieder eher wie die jüngeren Gruppen.

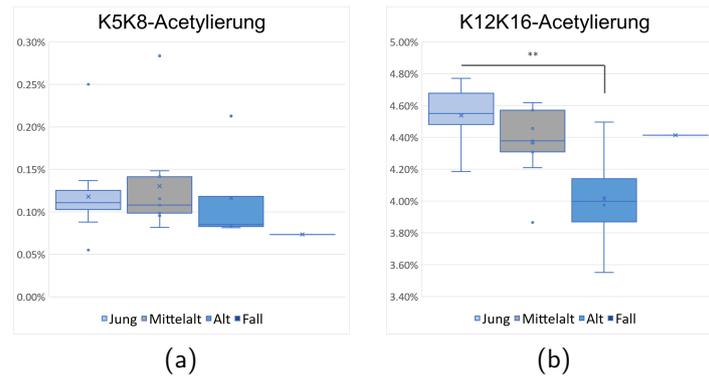


Abbildung 3.8: **Prozentualer Anteil der Diacetylierungen in den humanen PBMCs (hPBMCs).** (a): Die Quantifizierung der Histon H4K5K8Ac zeigt keine signifikanten Veränderungen in den verschiedenen Altersgruppen. Es fällt auf jedoch auf, dass alle Altersgruppe ähnliche Werte zeigen. Der Fall weist einen erniedrigten prozentualen Anteil dieser Modifikation auf. (b): Die H4K12K16-Diacetylierung fällt im Alter signifikant ab. Auch hier zeigt der Fall wieder ähnliche Werte wie jüngere Probanden. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.1.4.4 Aufschlüsselung des Triacetylierungsmusters in humanen PBMCs

Die Abbildung 3.9 zeigt die Aufschlüsselung der verschiedenen Triacetylierungen in humanen PBMCs im Alterungsprozess des Menschen. Die Tendenzen der H4K5K8K12-, H4K5K8K16-, und H4K5K12K16-Tetraacetylierungen weisen keine statistische Signifikanz auf. Die H4K8K12K16-Tetraacetylierung steigt im Alter signifikant an. Auffällig ist aber, dass der „Fall“ sich hier ebenfalls wieder eher wie die jüngeren Probanden zu verhalten scheint.

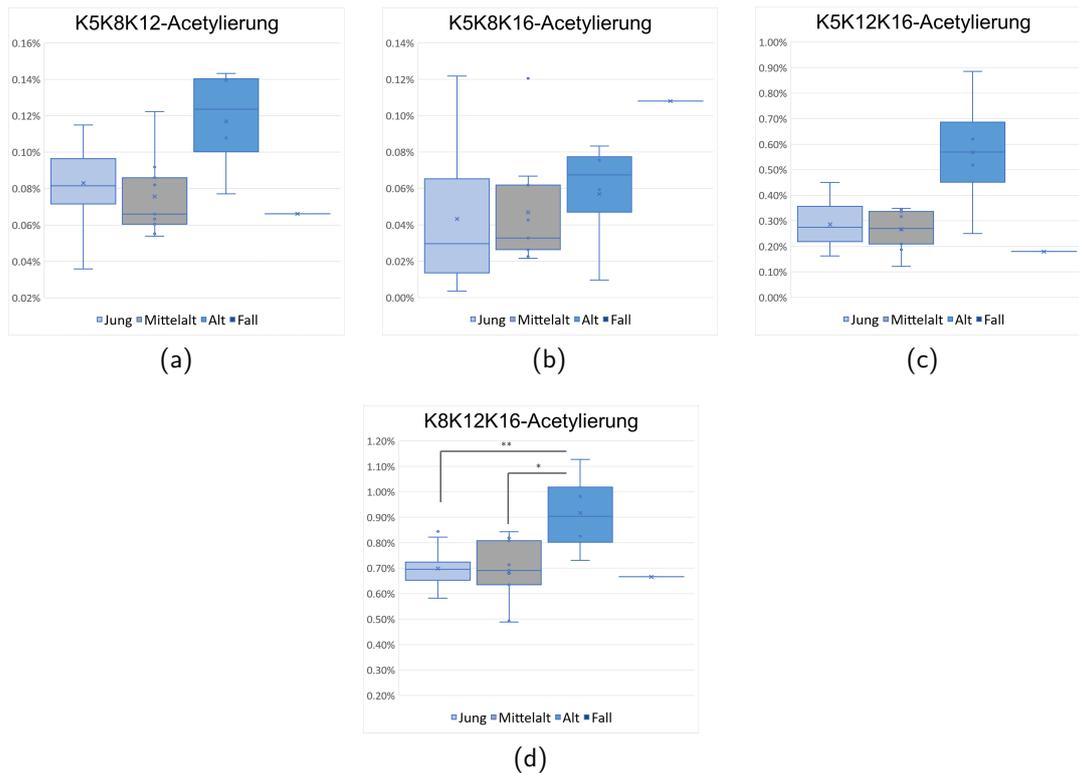
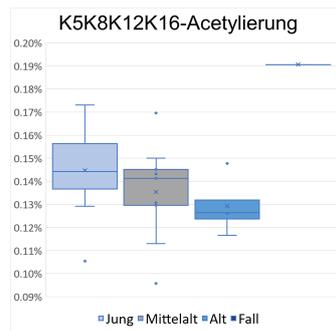


Abbildung 3.9: **Prozentualer Anteil der Triacetylierungen in den humanen PBMCs (hPBMCs).** (a) - (c): Die Quantifizierung der Histon-Triacetylierungen zeigt keine signifikanten Veränderungen in den verschiedenen Altersgruppen. Bei der H4K5K12K16-Tetraacetylierung zeigt der Fall wieder ähnliche Werte wie die jüngeren Probanden. (d): Die H4K8K12K16-Triacetylierung steigt im Alter signifikant an. Auch hier zeigt der Fall wieder ähnliche Werte wie die jüngeren Probanden. Box-plots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.1.4.5 Aufschlüsselung des Tetraacetylierungsmusters in humanen PBMCs

Die Abbildung 3.10 zeigt die Aufschlüsselung der verschiedenen Tetraacetylierungen in humanen PBMCs im Alterungsprozess des Menschen. Die Quantifizierung der Histon Tetraacetylierung zeigt keine signifikanten Veränderungen in den verschiedenen Altersgruppen. Der prozentuale Anteil der Tetraacetylierung des Falls ist jedoch deutlich höher als der der gesunden Probanden.



(a)

Abbildung 3.10: **Prozentualer Anteil der Tetraacetylierungen in den humanen PBMCs (hPBMCs).** (a): Die Quantifizierung der Histon Tetraacetylierung zeigt keine signifikanten Veränderungen in den verschiedenen Altersgruppen. Der prozentuale Anteil der Tetraacetylierung des Falls ist jedoch deutlich höher als der der gesunden Probanden. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2 Das Maus-Modell

Der nächste Schritt bestand darin, Mäuse auf ähnliche Veränderungen der Histon H4 Acetylierung zu untersuchen. Da die C57BL/6J Mäuse (Janvier) eine bekannte Lebenserwartung von etwa 26 Monaten haben, wurde das Mausmodell aus drei Altersgruppen männlicher Mäuse gebildet - 3 Monate („Jung“), 8 Monate („junge Erwachsene“) und 20 Monate (vergleichbar mit der Gruppe „Mittelalt“ im Menschen) alt. Da es nicht möglich war, menschliche Proben des Hippocampus zu untersuchen, sollte anhand dieses Modells auch eine eventuelle Korrelation zwischen den Ergebnissen der Analyse der Histonacetylierung im peripheren Blut und im Hippocampus geprüft werden. Ebenfalls sollte eine Übertragbarkeit von Ergebnissen im Mausversuch auf den Menschen eruiert werden.

3.2.1 Histonacetylierung in den mPBMCs

Das Blut wurde den Mäusen durch Dr. Shahaf Peleg aus der rechten Herzkammer entnommen. Um die für das Dichtemedium benötigten 3ml zu erreichen, wurden jeweils 4-5 Blutproben der Mäuse innerhalb der jeweiligen Gruppe zusammen gepoolt. Die PBMCs wurden mithilfe eines Dichtemediums (Optiprep von Axis-Shield) und den Leucosep Falcons (Greiner Bio-One) isoliert (s. 5.1.6). Die Histone wurden mit einem hypotonen Lysepuffer extrahiert, auf 4-20% SDS-Gelen aufgetrennt und eine In-Gel-Acetylierung mit Essigsäureanhydrid- d_6 (D3AA) (Smith *et al.* 2003) sowie ein Trypsinverdau durchgeführt. Wie bei den menschlichen Proben führt die artifizielle

Acetylierung mit D3AA zu einem Massenshift von +3 an allen nicht-modifizierten Lysinresten, sodass später in den Daten der Massenspektrometrie unterschieden werden kann, wo zuvor eine natürliche Acetylierung vorlag und wo nicht. Nach der Messung im Massenspektrometer wurden die Daten anfangs mithilfe von Xcalibur analysiert, 2019 lief eine erneute Analyse mit Skyline und die Daten wurden entsprechend aktualisiert.

3.2.1.1 Prozentualer Anteil der Acetylierungen in murinen PBMCs

Wie in Abbildung 3.11 auf der nächsten Seite ersichtlich, zeigt sich die quantitative Verteilung der Gesamtacetylierung nicht signifikant verändert. Ebenfalls bleiben die aufgeschlüsselten Monoacetylierungen ohne signifikante Veränderung. Es fällt jedoch auf, dass die Gesamt-, Mono-, Di- und Triacetylierung im Alter etwas abzufallen scheint. In Abbildung 3.12 auf Seite 51 wird die Veränderung der Monoacetylierungen an den einzelnen Lysinresten (K5, K8, K12 und K16) aufgeschlüsselt. Auch hier fällt keine Signifikanz der Ergebnisse auf, wobei sich die Histon H4K16-Monoacetylierung in den murinen PBMCs ähnlich verhält wie in den Hippocampi s. Abb. 3.17 auf Seite 56.

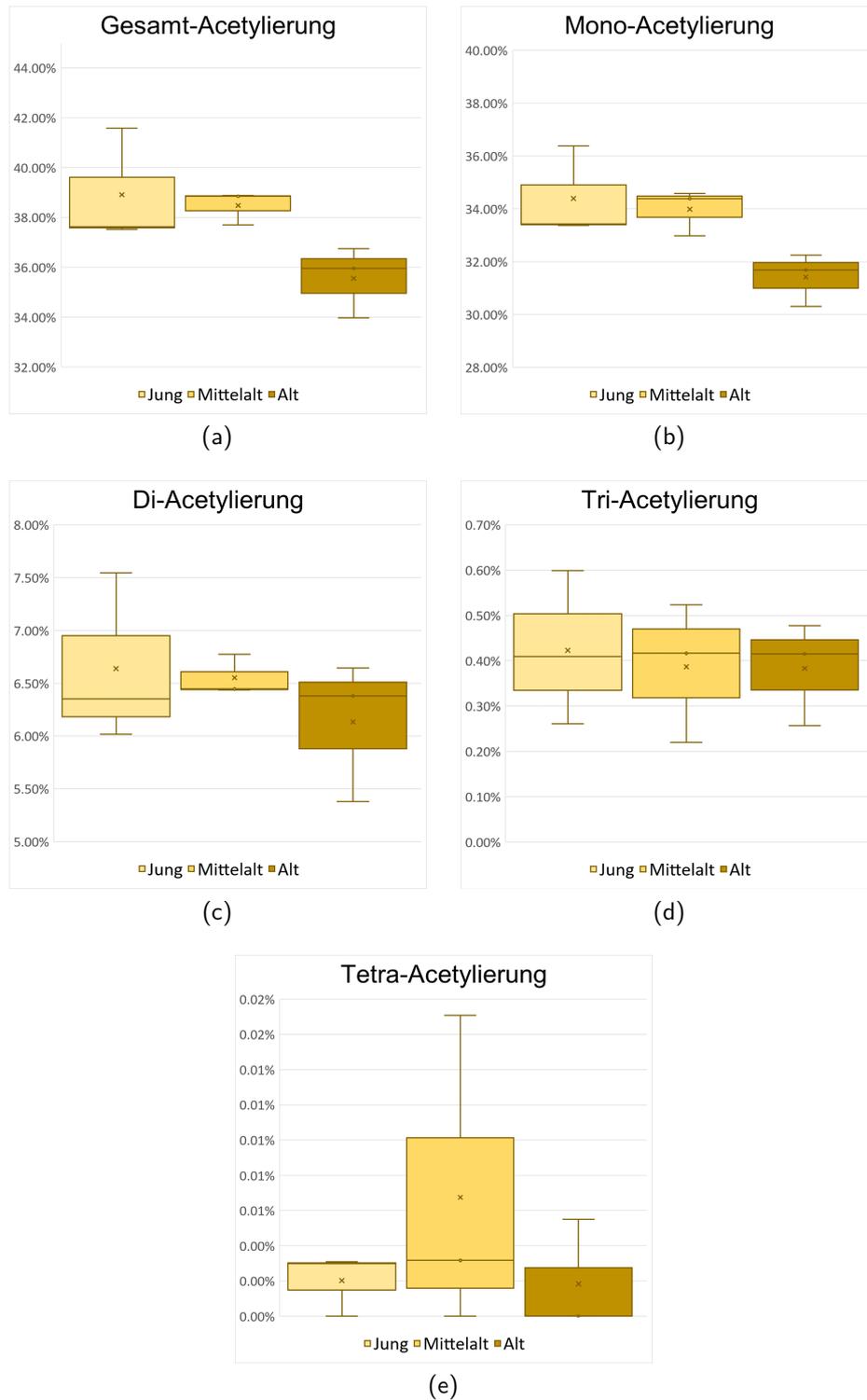


Abbildung 3.11: **Prozentualer Anteil der Acetylierungen in den murinen PBMCs (mPBMCs).** (a) - (e): Die Quantifizierung ergab keine signifikanten Veränderungen, allerdings fällt der leichte Abfall der Gesamt-, Mono-, Di-, und Triacetylierung im Alter auf. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2.1.2 Aufschlüsselung des Monoacetylierungsmusters in murinen PBMCs

Die Abbildung 3.12 zeigt die Aufschlüsselung der verschiedenen Monoacetylierungen in murinen PBMCs im Alterungsprozess der Maus.

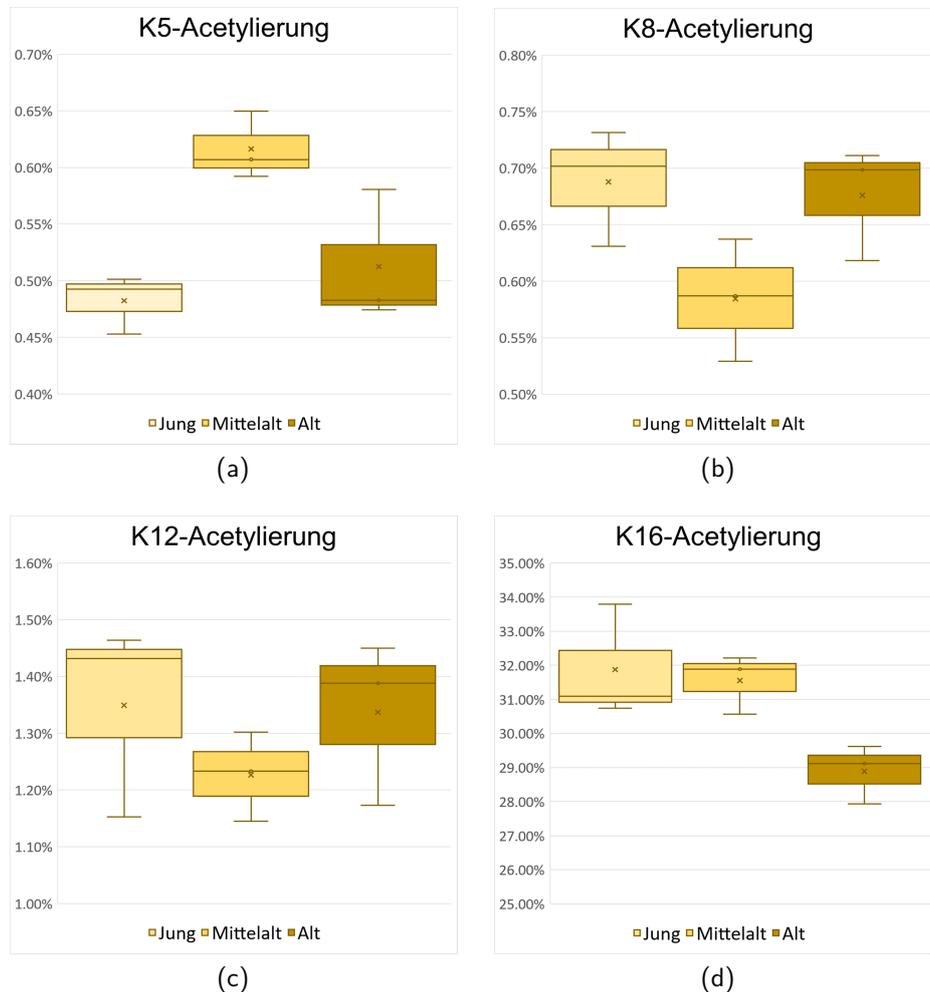


Abbildung 3.12: **Prozentualer Anteil der Monoacetylierungen in den murinen PBMCs (mPBMCs).** (a) - (d): Die Quantifizierung Histon H4K5-, K8- und K12-Monoacetylierung zeigt keine signifikanten Veränderungen in den verschiedenen Altersgruppen. Die H4K16-Monoacetylierung verhält sich interessanterweise ähnlich wie die, die in den Hippocampi der Mäuse beobachtet werden konnte. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2.1.3 Aufschlüsselung des Diacetylierungsmusters in murinen PBMCs

Die Abbildung 3.13 zeigt die Aufschlüsselung der verschiedenen Diacetylierungen in murinen PBMCs im Alterungsprozess der Maus.

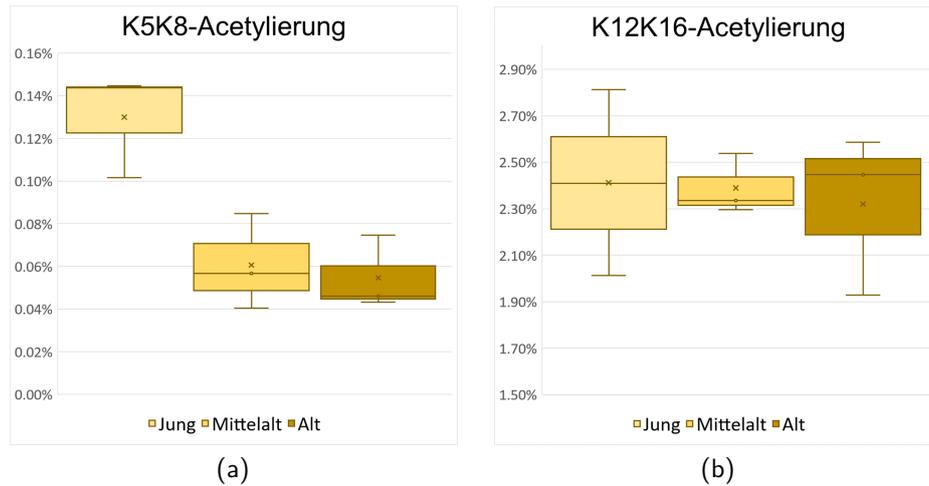


Abbildung 3.13: **Prozentualer Anteil der Diacetylierungen in den murinen PBMCs (mPBMCs).** (a) - (b): Die Quantifizierung der Histon H4K5K8- und K12K16-Diacetylierung zeigt keine signifikanten Veränderungen in den verschiedenen Altersgruppen. Bei der H4K5K8-Diacetylierung fällt jedoch ein deutlicher Abfall im Alter auf. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2.1.4 Aufschlüsselung des Triacetylierungsmusters in murinen PBMCs

Die Abbildung 3.14 zeigt die Aufschlüsselung der verschiedenen Triacetylierungen in murinen PBMCs im Alterungsprozess der Maus.

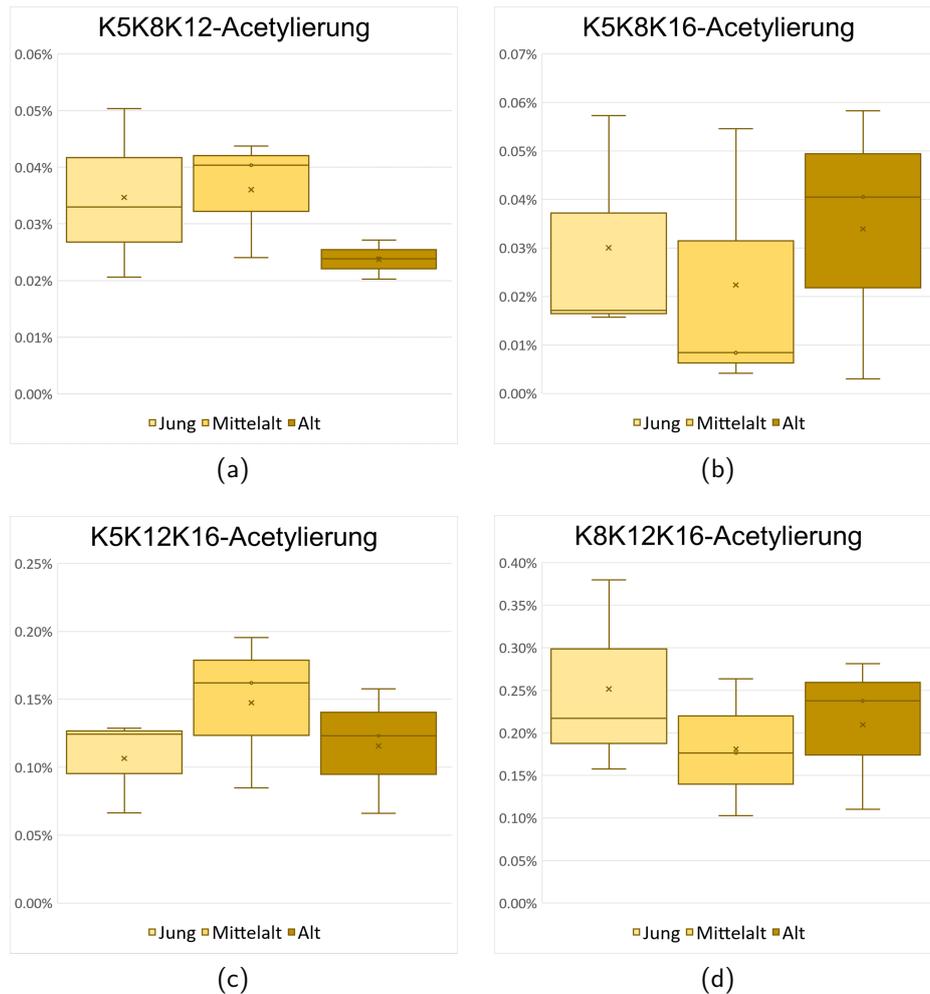


Abbildung 3.14: **Prozentualer Anteil der Triacetylierungen in den murinen PBMCs (mPBMCs).** (a) - (d): Die Quantifizierung Histon Triacetylierungen zeigt keine signifikanten Veränderungen in den verschiedenen Altersgruppen. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2.1.5 Aufschlüsselung des Tetraacetylierungsmusters in murinen PBMCs

Die Abbildung 3.14 zeigt die Aufschlüsselung der Tetraacetylierung in murinen PBMCs im Alterungsprozess der Maus.

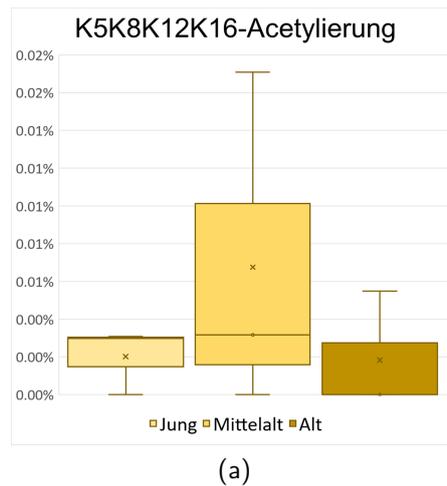


Abbildung 3.15: **Prozentualer Anteil der Tetraacetylierungen in den murinen PBMCs (mPBMCs).** (a): Die Quantifizierung der Histon Tetraacetylierung zeigt keine signifikanten Veränderungen in den verschiedenen Altersgruppen. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2.2 Histonacetylierung im Hippocampus

Denselben Mäusen, denen bereits im ersten Schritt des Versuchs Blut zur PBMC-Gewinnung abgenommen wurde, wurde post mortem zudem der Hippocampus entfernt. Dieser wurde nach dem Protokoll in Kap. 5.3.2.1 auf Seite 85 prozessiert. Die Histone der Hippocampi wurden wie die der PBMCs zunächst mit einem Lysepuffer extrahiert und dann mit einer 4-20% SDS-PAGE aufgetrennt. Die In-Gel-Acetylierung wurde auch hier mit Essigsäureanhydrid- d_6 (D3AA), der Verdau mit Trypsin durchgeführt. Die Analyse der Massenspektrometrie-Daten erfolgte abermals mit Xcalibur und wurde 2019 durch eine Skyline-Analyse ergänzt.

3.2.2.1 Prozentualer Anteil der Acetylierungen im murinen Hippocampus

In Abb. 3.16 auf der nächsten Seite sind die Ergebnisse dargestellt. Hier fällt der Abfall der Gesamtacetylierung im murinen Hippocampus im Alterungsprozess auf. Auch die gesamte H4-Monoacetylierung sinkt im Alter im Hippocampus deutlich ab, ihr fehlt jedoch ebenfalls der Nachweis einer Signifikanz. Die anderen PTMs bleiben ebenfalls ohne signifikante Veränderungen. In Abbildung 3.17 auf Seite 56 werden die Verteilungen der Monoacetylierungen gemäß der spezifischen Lysinreste aufgeschlüsselt und untersucht. Abermals fällt ein Abfall der H4K16-Monoacetylierung auf, der sich ähnlich verhält, wie der, der in den murinen PBMCs beobachtet werden konnte.

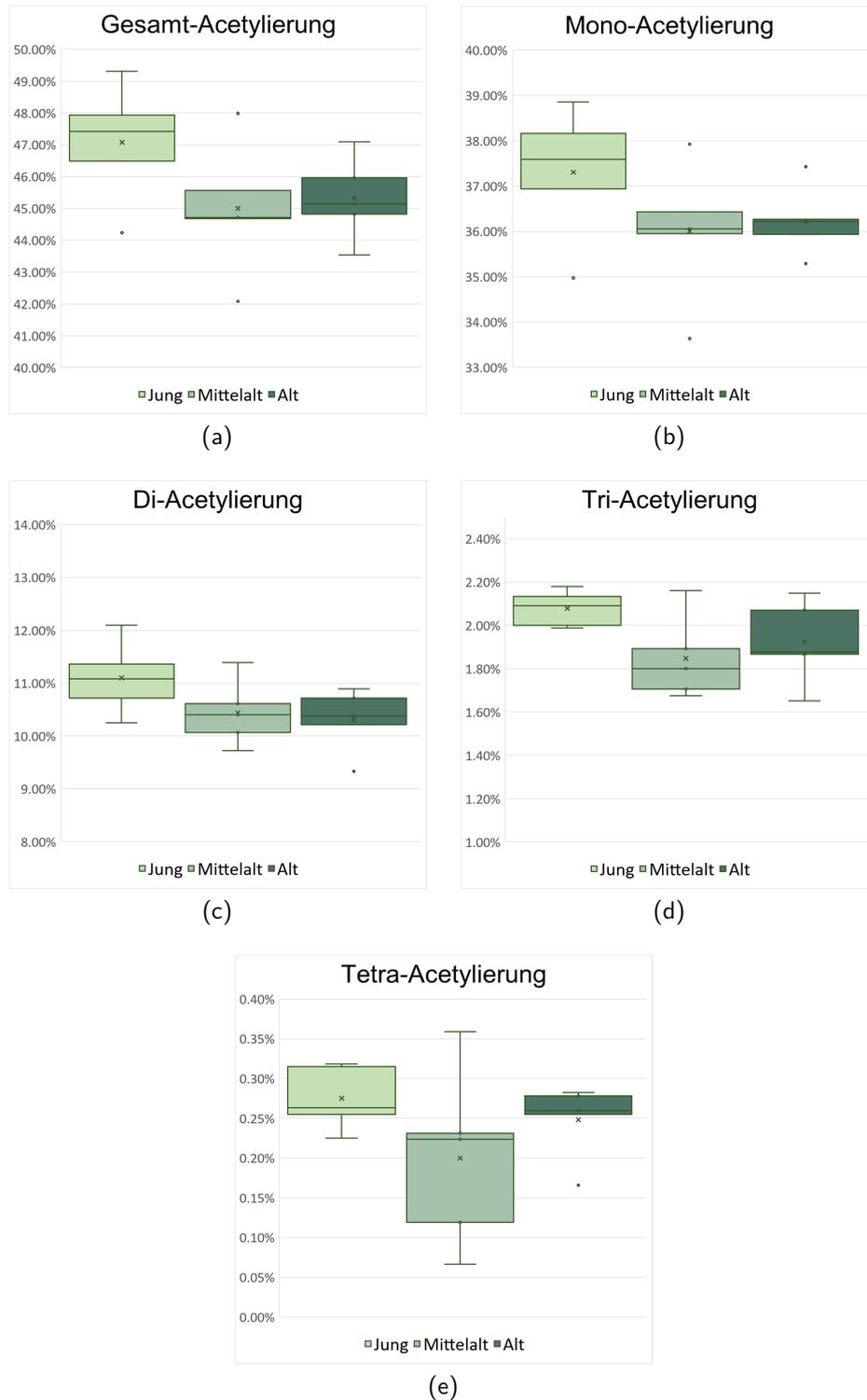


Abbildung 3.16: **Prozentualer Anteil der Acetylierungen im murinen Hippocampus.** (a): Die H4-Gesamtacetylierung sinkt im Alter im murinen Hippocampus nicht signifikant ab. (b) - (e) Die Quantifizierung ergab keine signifikanten Veränderungen. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2.2.2 Aufschlüsselung des Monoacetylierungsmusters im murinen Hippocampus

Die Abbildung 3.17 zeigt die Aufschlüsselung der verschiedenen Monoacetylierungen im murinen Hippocampus im Alterungsprozess der Maus.

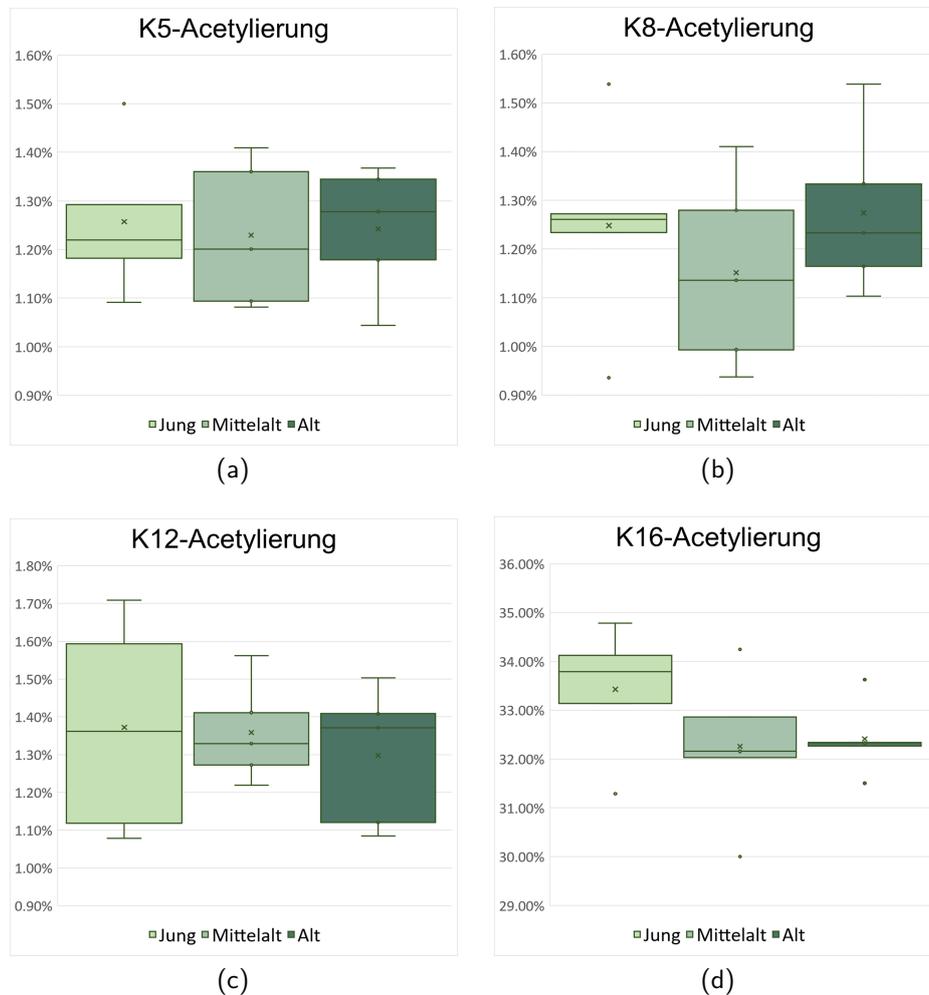


Abbildung 3.17: **Prozentualer Anteil der Monoacetylierungen im murinen Hippocampus.** (a) - (c): Die Quantifizierung der Histon H4K5-, K8- und K12-Monoacetylierung zeigt keine signifikanten Veränderungen im Alter. (d) Die H4K16Ac sinkt im Alterungsprozess deutlich ab, wobei jedoch der Nachweis einer Signifikanz nicht gelingt. Ähnliches kann auch in den murinen PBMCs beobachtet werden. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2.2.3 Aufschlüsselung des Diacetylierungsmusters im murinen Hippocampus

Die Abbildung 3.18 zeigt die Aufschlüsselung der verschiedenen Diacetylierungen im murinen Hippocampus im Alterungsprozess der Maus.

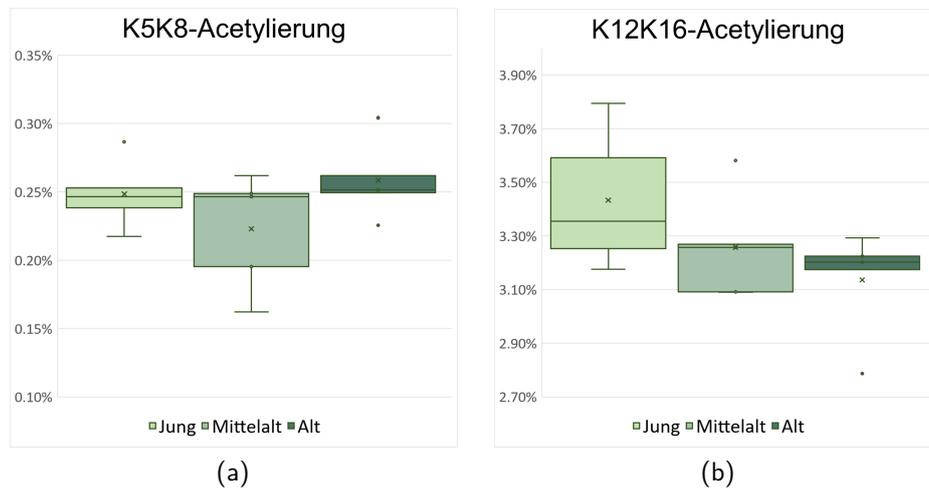


Abbildung 3.18: **Prozentualer Anteil der Diacetylierungen im murinen Hippocampus.** (a) - (b): Die Quantifizierung der Histon H4K5K8- und K12K16-Diacetylierungen zeigt keine signifikanten Veränderungen im Alter. Auffällig ist jedoch ein beinahe gleichbleibendes Level an H4K5K8-Diacetylierungen in allen Altersgruppen. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2.2.4 Aufschlüsselung des Triacetylierungsmusters im murinen Hippocampus

Die Abbildung 3.19 zeigt die Aufschlüsselung der verschiedenen Triacetylierungen im murinen Hippocampus im Alterungsprozess der Maus.

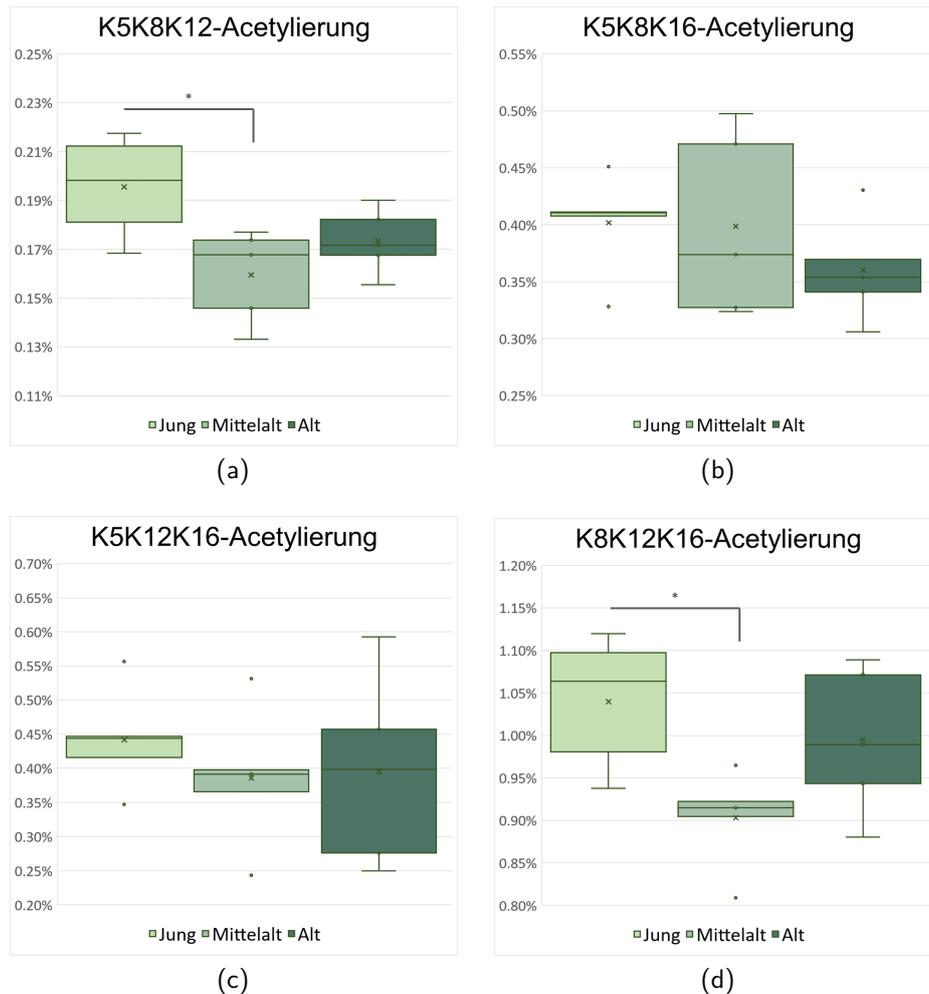


Abbildung 3.19: **Prozentualer Anteil der Triacetylierungen im murinen Hippocampus.** (a): Die Quantifizierung der Histon Triacetylierung H4K5K8K12 zeigt einen signifikanten Abfall zwischen den Altersgruppen „jung“ und „mittelalt“. (b) - (c): Die Triacetylierungen H4K5K8K16 und H4K5K12K16 weisen keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Altersgruppen auf. (d): Die H4K8K12K16-Triacetylierung fällt bei den mittelalten Mäusen im Vergleich zu den jungen Mäusen signifikant ab. Boxplots mit Median. (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

3.2.2.5 Aufschlüsselung des Tetraacetylierungsmusters im murinen Hippocampus

Die Abbildung 3.20 zeigt die Aufschlüsselung der Tetraacetylierung im murinen Hippocampus im Alterungsprozess der Maus.

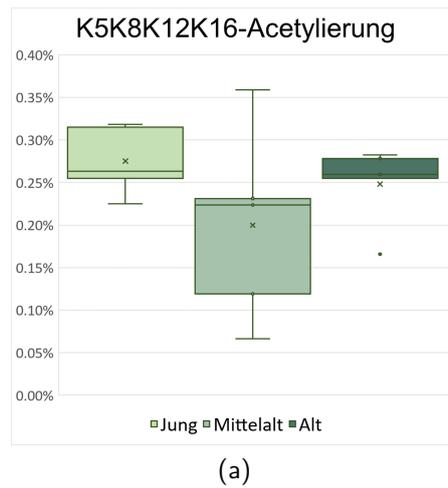


Abbildung 3.20: **Prozentualer Anteil der Tetraacetylierungen im murinen Hippocampus.** (a): Die Quantifizierung der Histon H4-Tetraacetylierung zeigt keine signifikanten Veränderungen im Alter. Auffällig ist jedoch, dass die Tetraacetylierung im Hippocampus höher ausfällt als in den murinen PBMCs. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4 Kapitel 4 Diskussion

4.1 Vor- und Nachteile der massenspektrometrischen Messung

Wie bereits in 3.1 kurz diskutiert, fußen viele publizierte Arbeiten auf dem Antikörpernachweis der einzelnen Histonacetylierungen (zumeist Monoacetylierungen). Was beim Antikörpernachweis jedoch als der Nachweis der Acetylierung eines Lysinrests imponiert, stellt sich bei genauerer Untersuchung als der Nachweis eines Gemischs aus verschiedenen Polyacetylierungen heraus. So steigt die Abundanz der Antikörper bei Polyacetylierungen deutlich an, während sich die reine Monoacetylierung kaum reliabel nachweisen lässt (Rothbart *et al.* 2012, Rothbart *et al.* 2015; und s. 3.1). Die Ergebnisse aus den Antikörper-Essays können also zum Einen nicht korrekt interpretiert werden, zum Anderen spiegeln sie nicht die Realität wider. Aus diesem Grund wurde für die Messung der verschiedenen Histonmodifikationsmuster im Rahmen dieser Doktorarbeit die massenspektrometrische Messung gewählt.

Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit, die möglichen Histonmodifikationen nicht nur quantitativ korrekt bestimmen, sondern sie auch ins Verhältnis setzen zu können. So entsteht ein reliables Bild von Veränderungen in bestimmten Situationen - z.B. im Alterungsprozess des Menschen.

In 3.1 wurde bereits auf die Problematik Bezug genommen, dass zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeit an dieser Dissertation kein Protokoll zur Bestimmung der Histonmodifikationen in humanen, mononukleären Abwehrzellen mithilfe der Massenspektrometrie zur Verfügung stand. Wie bereits publiziert, konnte ein Protokoll entwickelt werden, das zu reliablen und reproduzierbaren Ergebnissen führte (Bux *et al.* (2019)). Daher soll das Protokoll an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden.

Tabelle 4.1: **Vor- und Nachteile der massenspektrometrischen Messung (Zwer-nemann 2005)**

Vorteile	Nachteile
relativ schnell	teure Hardware
hohe Nachweisempfindlichkeit	Probe wird z.T. zerstört
Quantifizierbarkeit	Möglichkeit komplexer Spektren und damit einer aufwendigen Auswertung
Kombinationsmöglichkeiten mit anderen analytischen Methoden	die Probe muss sauber sein

4.2 Interpretation der Ergebnisse aus den humanen Proben unter dem Aspekt der zellulären Bedeutung

Histonmodifikationen spielen eine essentielle Rolle in unserem Körper. So setzten sich bereits mehrere Forschungsgruppen mit der Frage auseinander, ob eine Veränderung der Acetylierungsmuster im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses in Eukaryoten auftreten kann - und wenn ja mit welchen Folgen (Peleg *et al.* (2016a), Peleg *et al.* (2016b), Maleszewska *et al.* (2016), Cencioni *et al.* (2013), u.v.m.).

4.2.1 Veränderungen der Muster der Monoacetylierungen

Heute ist bekannt, dass die Histonmodifikationen maßgeblich an vielen Prozessen innerhalb und außerhalb der Zellen beteiligt sind. Gerade die Monoacetylierungen sind hier in den Fokus der Forschung gerückt. Die Histonacetylierung an H4K16 z.B. führt zu einer Förderung der Transkription, indem es verhindert, dass das Chromatin Querverbindungen mit den Histonen oder den benachbarten Nukleosomen ausbilden kann (Shogren-Knaak *et al.* 2006). Ebenfalls spielt diese Histonmodifikation eine große Rolle in der Mdc1-vermittelten DNA-Reparatur. Eine globale Reduktion der H4K16-Acetylierung führt zu Zellzyklusstillständen am G₂-M-DNA-Kontrollpunkt (ein Schadenskontrollpunkt), massiven Chromosomenanomalien und Defekten bei der durch ionisierende Strahlung induzierten Reparatur von DNA-Schäden. (Li *et al.* 2010).

In Abb. 3.7 ist zu sehen, dass der prozentuale Anteil an Monoacetylierungen im mittleren Alter signifikant abfällt, um dann wieder signifikant beinahe auf das Level der jungen Altersgruppe anzusteigen. Der Fall zeigt auffällig niedrige Werte. Auch ist zu sehen, dass die H4K16-Acetylierung des Falls im Vergleich zu den jungen Probanden deutlich abgenommen hat, wenngleich diese Abnahme wegen des Einzelfallvergleichs statistisch nicht untersucht werden kann (s. Tab.4.2). Auf Grund der Ergebnisse des Blutbildes des als „Fall“ ausgenommenen Probandens ist bei ihm von einer malignen Erkrankung, der chronisch lymphatischen Leukämie, auszugehen (s. 3.1.3). Die CLL zählt sowohl zu den Leukämien als auch zu den Lymphomen, da sich ihre entarteten Zellen nicht nur im Knochenmark und Blut finden, sondern auch in den lymphatischen Organen. Eine Abnahme der H4K16-Acetylierung und der H4K20-Methylierung führt in Lymphomzellen zu einer DNA-Hypomethylierung repetitiver Elemente, was somit zu einer höheren Expression dieser ansonsten unterdrückten Genregion führen kann (Fraga *et al.* 2005). Ebenfalls ist bekannt, dass ein abnormes Level an H4K16Ac zu Problemen bei der DNA-Reparatur, der RNA-Polymerase II-initiierten Transkription, zu veränderten Zellzyklus-Arresten und Recycling-Prozessen innerhalb der Zelle und auch zu einer erhöhten Rate an Geburtsdefekten führen kann (u.a. Füllgrabe *et al.* 2013; Krishnan *et al.* 2011; Kapoor-Vazirani *et al.* 2011), wie es bei Krebszellen auch auftreten kann. Wie in 2.4.1 bereits aufgezeigt, sind in Säugetieren vor allem die HATs KAT8 (MYST1, MOF), KAT5 (TIP60) und KAT2A (GCN5) an der Acetylierung von H4K16 beteiligt (Taipale *et al.* 2005; Miyamoto *et al.* 2008; Orpinell *et al.* 2010). Die Deacetylierung wird vor allem durch die HDACs Sirt1 und HDAC1 gewährleistet (u.a. Mulligan *et al.* 2011).

Auch beim Fall konnte eine Abnahme der H4K16-Acetylierung festgestellt werden. Das Ergebnis zeigt sich somit kohärent zu den von Fraga *et al.* (2005) publizierten Daten. Die Tatsache, dass die Monoacetylierung von H4K16 den höchsten prozentualen Anteil aufweist, wurde ebenfalls von anderen Autoren beschrieben (Taipale *et al.* 2005).

Tabelle 4.2: **Durchschnittliche H4-Monoacetylierungen in Prozent aufgeschlüsselt nach Altersgruppe**

Histonmodifikation	Jung	Mittelalt	Alt	Fall
H4K5ac	0,65	0,75	0,82	0,84
H4K8ac	1,03	1,00	0,88	0,82
H4K12Ac	1,98	2,13	1,83	2,83
H4K16Ac	31,80	31,03	32,54	29,90

Auch die Tatsache, dass sich der Gesamtanteil an Monoacetylierungen über den Alterungsprozess hinweg signifikant verändert, erscheint vor diesem Aspekt sehr interessant. Während die H4K8-Acetylierung im Alter konstant abzufallen scheint und die

H4K12-Acetylierung mit steigendem Alter eine deutlich breitere Streuung unter den Individuen zeigt, steigt die H4K5-Acetylierung etwas an. Fang *et al.* (2020) konnten in ihrem Paper zeigen, dass eine Zunahme der H4K5-Acetylierung über die Zunahme der BDNF-Expression (brain-derived neurotrophic factor) vor Schäden durch Hypoperfusion (Minderdurchblutung) und Minderversorgung mit Glucose schützen kann. Es scheint also auch evolutionär durchaus Sinn zu machen, dass diese Acetylierung im Alter hoch geregelt werden muss, um das Gehirn besser vor neuronalen Schäden (Huang & Reichardt 2001, Acheson *et al.* 1995) und Einschränkungen des Langzeitgedächtnisses (Bekinschtein *et al.* 2008) und damit auch vor einer möglichen Demenz zu schützen, da Gefäßveränderungen und dadurch auch Veränderungen der Nähr- und Sauerstoffversorgung im Alter zunehmen (Love & Miners 2016). Hier könnte eine größer angelegte Studie wichtige Erkenntnisse zu möglichen Schutzmechanismen zur Vorbeugung einer vaskulären Demenz bieten.

4.2.2 Veränderungen der Muster der Diacetylierungen

Wie in Tab. 4.3 zu sehen ist, nimmt der Anteil der gesamten Diacetylierungen mit dem Alter stetig ab, wobei der Fall hier - trotz seines Alters - höhere Werte zeigt als die Probanden seiner Altersgruppe. Die H4K5K8-Diacetylierung zeigt sich über das Alter hinweg stabil und weist keine signifikanten Veränderungen auf, während der Fall einen geringeren prozentualen Anteil dieser Modifikation zeigt. Auf Grund der sehr geringen Abundanz über alle Altersgruppen hinweg erscheinen hier Aussagen über eine Zu- oder Abnahmetendenz und ihre Relevanz im Alter jedoch eher schwierig. Um mögliche Auswirkungen z.B. im Rahmen von Krebserkrankungen wie der Leukämie und eine eventuelle Relevanz für den Metabolismus der Abwehrzellen zu untersuchen, sollte eine größer angelegte Studie mit mehr Probanden erfolgen, gerade auch, weil diese Arbeit die erste ist, die diese Veränderung zeigen konnte. Die H4K12K16-Diacetylierung fällt im Alter stufenweise signifikant ab, während der Fall ähnliche Werte wie die jüngeren bzw. mittelalten Probanden zeigt. Dies könnte für eine etwas erhöhte Genexpression in den erkrankten Abwehrzellen, im Gegensatz zu den gesund alternden, sprechen, da Histone bekanntermaßen eine große Rolle in der transkriptionalen Regulation und den Prozessen der Genhemmung oder -aktivierung spielen (Fischle *et al.* 2003, Emerson 2002, Berger 2002).

Da diese Arbeit sich ebenfalls mit der Grundlagenforschung beschäftigt, ist zu dieser Modifikation und ihrer Bedeutung in menschlichen Zellen bislang nichts sicher bekannt, sodass zu der Bedeutung des signifikanten Abfalls im Alter im Gegensatz zur Zunahme bei einer Leukämie zum heutigen Zeitpunkt keine sichere Aussage getätigt werden kann. Auch hier sollten die Ergebnisse in einer größer angelegten Studie verifiziert werden.

Tabelle 4.3: **Durchschnittliche H4-Diacetylierungen in Prozent aufgeschlüsselt nach Altersgruppe**

Histonmodifikation	Jung	Mittelalt	Alt	Fall
Diacetylierungen gesamt	12,14	11,73	11,07	11,84
H4K5K8Ac	0,12	0,13	0,12	0,07
H4K12K16Ac	4,54	4,37	4,01	4,41

4.2.3 Veränderungen der Muster der Triacetylierungen

Auch bei der Triacetylierung gibt es derzeit leider keine Studienlage zu der Bedeutung von Zu- und Abnahmen der spezifischen Modifikationen und ihrer Bedeutung für die Abwehrzellen. Wie in Abb. 3.6 zu sehen ist, nimmt die Triacetylierung im Alter deutlich und signifikant zu. Der Fall verhält sich hier auffällig, da er - trotz seines Alters - niedrigere Werte für diese Modifikation zeigt. Auch die mittelalten Probanden verhalten sich ähnlich wie die jungen, sodass hier ein Ansatzpunkt für die Forschung des Alterns gegeben sein könnte. Die Ergebnisse sollten zwar mit einer größeren Kohorte verifiziert werden, doch ist hier ein Trend sichtbar. Wie bereits geschrieben, beschäftigt sich diese Arbeit auch mit der Grundlagenforschung, sodass nicht immer eine sichere Aussage zu den einzelnen Veränderungen getroffen werden kann. Interessant erscheint aber die Zunahme der H4K5K12K16- und die signifikante Zunahme der K8K12K16-Triacetylierung im Alter, während sich der Fall so wie die jüngeren Probanden verhält. Dies könnte ein Hinweis auf eine veränderte Genexpression in den alternden Abwehrzellen sein. Ob diese Veränderungen zu einer vermehrten Expression von schützenden Faktoren wie bei der H4K5-Monoacetylierung (s. 4.2.1) führen, sodass die Zellen besser mit den erhöhten Anforderungen im Alterungsprozess umgehen können oder gar zu einer eingeschränkten Funktion, ist derzeit noch nicht bekannt. Die Immunkompetenz nimmt jedoch im Alter bekanntermaßen ab s. 2.4.2. So sind ältere Menschen anfälliger für schwerere Krankheitsverläufe im Rahmen von Infektionen wie z.B. eindrücklich während der Covid-19-Pandemie ersichtlich geworden (u.a. Romero Starke *et al.* 2020) und das erhöhte Risiko kann durch eine erniedrigte Immunkompetenz erklärt werden (Dorshkind *et al.* 2009, Kline & Bowdish 2016).

Viele Krebszellen zeigen - im Gegensatz zu alternden Zellen - ein völlig gegensätzliches Verhalten. Vorstellbar ist dies mit dem Vergleich von sehr aktiven Zellen mit schnellerer Zellteilung, vermehrtem Energiebedarf und erhöhtem Zellmetabolismus in Krebszellen versus einer verminderten Zellaktivität, Zellteilungsrate und einem eingeschränkten Zellmetabolismus in alternden Zellen (Aunan *et al.* 2017). Die Tatsache, dass sich der erkrankte Fall in seinem Triacetylierungs-Muster also den jungen Probanden äh-

Tabelle 4.4: **Durchschnittliche H4-Triacetylierungen in Prozent aufgeschlüsselt nach Altersgruppe**

Histonmodifikation	Jung	Mittelalt	Alt	Fall
Triacetylierungen gesamt	1,11	1,07	1,66	1,02
H4K5K8K12Ac	0,08	0,08	0,12	0,07
H4K5K8K16Ac	0,04	0,05	0,06	0,11
H4K5K12K16Ac	0,29	0,27	0,57	0,18
H4K8K12K16Ac	0,70	0,69	0,92	0,67

nelt, könnte einen wichtigen Hinweis auf die veränderten Histonmodifikationen und deren Auswirkungen in Leukämie-Zellen geben. Im Umkehrschluss könnte dies wichtige Erkenntnisse über die Ursachen des verlangsamten Zellmetabolismus und damit gegebenenfalls auch über die Ursachen der eingeschränkten Immunkompetenz von älteren Patienten geben.

Auch hier sollten die Ergebnisse in einer größer angelegten Studie verifiziert werden.

4.2.4 Veränderungen der Muster der Tetraacetylierungen

Die Quantifizierung der Histon Tetraacetylierung zeigt keine signifikanten Veränderungen in den verschiedenen Altersgruppen, die Ergebnisse scheinen im Durchschnitt sogar recht gleichbleibend s. Tab. 4.5. Im Gegensatz dazu weist der Fall einen um 30% höheren Anteil an Tetraacetylierungen auf.

Tabelle 4.5: **Durchschnittliche H4-Tetraacetylierungen in Prozent aufgeschlüsselt nach Altersgruppe**

Histonmodifikation	Jung	Mittelalt	Alt	Fall
H4K5K8K12K16Ac	0,14	0,14	0,13	0,19

Auch zu dieser Modifikation und ihrer Bedeutung in menschlichen Abwehrzellen ist die Datenlage noch sehr spärlich. Es wurde beschrieben, dass die H4K5K8K12K16-Tetraacetylierung in Hep3B-Zellen über die Rekrutierung von p300 zur einer Stimulation der EPO-Expression führt, wenn die Zellen hypoxischem Stress ausgesetzt werden (Wang *et al.*). EPO (Erythropoietin) ist ein Hormon, das bei Sauerstoffmangel z.B. im Rahmen von einer Blutarmut in der Niere gebildet wird und das Wachstum von roten Blutkörperchen stimuliert. Berühmtheit hat es durch seine missbräuchliche Nutzung als Dopingmittel im Sport erlangt. Eine Anwendung dieser Beobachtung auf Abwehrzellen erscheint allerdings fraglich, sodass eine Aussage über die Funktion und Auswirkungen dieser Modifikation auf den Metabolismus der Immunzellen zu diesem Zeitpunkt

nicht getroffen werden kann. Auch hier wären weitere Studien mit größeren Kohorten notwendig, um weitere Erkenntnisse über mögliche pathologische Auswirkungen zu erlangen.

4.3 Interpretation der Ergebnisse aus den murinen Proben unter dem Aspekt der zellulären Bedeutung

Auf Grund der sehr dünnen Studienlage, die Di-, Tri- und Tetraacetylierungen in murinen Zellen betreffend, wird im Folgenden im Besonderen auf die Monoacetylierungsmuster eingegangen werden. Hier ist besonders der Vergleich zwischen den Werten in den peripheren Blutzellen im Gegensatz zu den Werten im Hippocampus interessant.

Peleg *et al.* konnten 2010 in ihrem Paper zeigen, dass eine veränderte Histonacetylierung im Histon H4K12 im Hippocampus mit einer Beeinträchtigung von Lernprozessen einhergehen kann. Dies geschieht über eine Dysregulation von Genexpressionsprogrammen, die mit der Gedächtniskonsolidierung assoziiert sind. Wird das Level an H4K12-Acetylierungen während der Lernprozesse durch HDACs wieder normalisiert, so normalisiert sich auch die Lernstörung wieder. Gerade vor diesem Gesichtspunkt ist der Vergleich der Ergebnisse aus den murinen PBMCs mit den Ergebnissen aus den murinen Hippocampi so interessant, da hier möglicherweise ein Biomarker für Demenzen im Blut abgeleitet werden könnte. Aus diesem Grund wurden die Acetylierungsveränderungen im Hippocampus mit denen in den murinen PBMCs verglichen.

In Tab. 4.6 ist zu sehen, dass der prozentuale Anteil Gesamtacetylierung in den Hippocampus-Proben höher ist, als der in den murinen Abwehrzellen. Der Anteil variiert um bis zu fast 10%.

Tabelle 4.6: **Durchschnittliche H4-Gesamtacetylierung in Prozent aufgeschlüsselt nach Altersgruppe in Mäusen**

Histon-modifikation	Jung mPBM-Cs	Jung Hippocampus	Mittel mPBM-Cs	Mittel Hippocampus	Alt mPBM-Cs	Alt Hippocampus
Gesamtacetylierung	38,91	47,07	38,48	45,00	35,56	45,31

4.3.1 Veränderungen der Muster der Monoacetylierungen

Stellt man die Monoacetylierungsmuster der murinen PBMCs und der Hippocampus-Proben nebeneinander (s. Tab. 4.7), so fällt auf, dass die Hippocampus-Proben einen höheren Anteil an Monoacetylierungen aufweisen, als die mPBMCs (junge Mäuse: um 2,91% höher, mittlere Mäuse: um 2,02% höher und alte Mäuse: um 4,82% höher). Auffällig ist hier auch sicherlich, dass die Werte der älteren Mäuse einen größeren Unterschied aufweisen.

Besonders interessant sind die Veränderungen der H4K12-Acetylierungen. Sowohl Peleg *et al.* (2010) als auch Plagg *et al.* (2015) konnten zeigen, dass die Acetylierung von H4K12 essentiell für Lernprozesse und die neuronale Funktion ist. Plagg *et al.* wiesen 2015 erhöhte Level von H4K12-Acetylierungen in den Monozyten von Alzheimer-Mäusen und Patienten mit milder kognitiver Beeinträchtigung (MCI für **mild cognitive impairment**) nach, sodass die H4K12-Acetylierungslevel möglicherweise als Anhaltspunkt für die Früherkennung des Alzheimer-Risikos dienen könnten. In Tab. 4.7 ist zu sehen, dass die Level an H4K12-Acetylierungen im peripheren Blut bei den jungen und den alten Mäusen ähnlich hoch ist. Auffällig ist jedoch, dass sie bei den alten Mäusen im Gegensatz zu den mPBMCs im Hippocampus sinkt, anstatt, wie bei den anderen Altersgruppen, zuzunehmen. Da ein geringeres Level an H4K12-Acetylierungen mit einer Dysregulation der Gedächtniskonsolidierung verlinkt ist, erscheint dies konform mit dem Alterungsprozess, wie wir ihn kennen (Burke & MacKay 1997). Die älteren Mäuse werden etwas vergesslicher, als ihre jungen Mitstreiter.

Tabelle 4.7: **Durchschnittliche H4-Monoacetylierungen in Prozent aufgeschlüsselt nach Altersgruppe**

Histon-modifikation	Jung mPBM-Cs	Jung Hippocampus	Mittel mPBM-Cs	Mittel Hippocampus	Alt mPBM-Cs	Alt Hippocampus
Monoacetylierung gesamt	34,39	37,39	33,98	36,00	31,41	36,23
H4K5ac	0,48	1,26	0,62	1,23	0,51	1,24
H4K8ac	0,69	1,25	0,58	1,15	0,68	1,27
H4K12Ac	1,35	1,37	1,23	1,36	1,34	1,30
H4K16Ac	31,87	33,43	31,56	32,26	28,89	32,41

Zur visuellen Verdeutlichung s. auch Abb. 4.1.

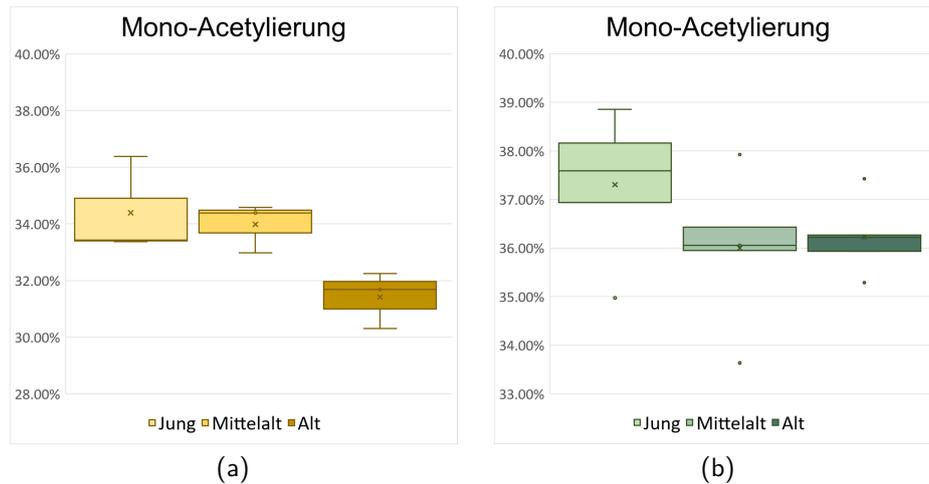


Abbildung 4.1: **Prozentualer Anteil der Monoacetylierungen in murinen PBMCs und den Hippocampi im Vergleich.** (a): Monoacetylierungen in murinen PBMCs aufgeschlüsselt nach Altersklasse. (b): Monoacetylierungen in murinen Hippocampi aufgeschlüsselt nach Altersgruppe. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4.3.2 Veränderungen der Muster der K5-Acetylierung

2013 publizierten Park *et al.* ein Paper, in dem sie die Rolle der H4K5-Acetylierung und der Genexpression im murinen Hippocampus diskutierten. Hierbei erschien die H4K5Ac als ubiquitäre, epigenetische Modifikation über das gesamte Genom hinweg und etwa ein Drittel der Gene wiesen eine erhöhte H4K5Ac auf. Von diesen Genen sind etwa 15% mit der Gedächtnisbildung assoziiert und 114 dieser Gene scheinen spezifisch auch an der Bildung des Furchtgedächtnisses (fear memory) beteiligt zu sein, sodass es einen engen Zusammenhang zwischen erhöhten H4K5-Acetylierungen und der Angstkonditionierung zu geben scheint.

Wie in Abb. 4.2 zu sehen ist, sind die Level der H4K5-Acetylierung im murinen Hippocampus höher als im peripheren Blut. Unter dem Aspekt der Beteiligung an Gedächtnisprozessen erscheint dies nur sinnvoll, da die Abwehrzellen eine solche Funktion nicht benötigen. Somit untermauern diese Daten die Bedeutung der H4K5-Acetylierung spezifisch auch für das Gehirn und die Daten erscheinen kohärent mit anderen Publikationen. Hier wäre es sicherlich sehr interessant weitere Studienmodelle zu entwickeln, in denen sich der erhöhte Stresslevel z.B. im peripheren Blut in Zusammenhang mit der H4K5Ac und der Angstkonditionierung (=Stress) untersuchen ließe.

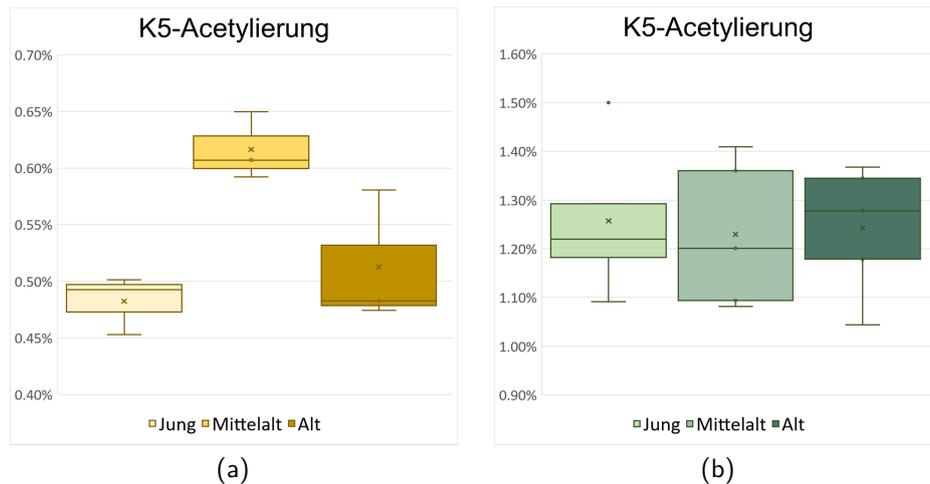


Abbildung 4.2: **Prozentualer Anteil der K5-Acetylierung in murinen PBMCs und den Hippocampi im Vergleich.** (a): K5-Acetylierung in murinen PBMCs aufgeschlüsselt nach Altersklasse. (b): K5-Acetylierung in murinen Hippocampi aufgeschlüsselt nach Altersgruppe. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4.3.3 Veränderungen der Muster der K8-Acetylierung

Auch bei der H4K8-Acetylierung fällt auf, dass die Level dieser Modifikation im murinen Hippocampus höher sind als in den Abwehrcellen im peripheren Blut. Hier zeichnet sich also ebenfalls eine Bedeutung für die Funktionalität der neuronalen Systeme ab. Bekannt ist, dass auch H4K8Ac eine Rolle für die Gesunderhaltung des Gehirns zu spielen scheint. Subbanna *et al.* (2015) zeigten einen Zusammenhang zwischen der erhöhten H4K8-Acetylierung am Cannabinoid Type 1 (CB1R) Exon1, der CB1R Bindung und der Bindung des CB1R Agonist-stimulated $GTP\gamma S$ im Hippocampus und Neocortex bei Gabe von Ethanol an P7-Mäuse (= sieben Tage alte Mäuse). Dieses Modell sollte Aufschluss darüber geben, was passiert, wenn Frauen im dritten Trimester ihrer Schwangerschaft Alkohol konsumieren. Die Resultate der Mäuse spiegelten das klinische Bild des Fetalen Alkoholsyndroms wider. Sie zeigten ein eingeschränktes räumliches und soziales Gedächtnis, sowie Verhaltensauffälligkeiten.

Interessant erscheint auch der Abfall der K8-Acetylierung in murinen PBMCs im mittleren Alter, während die alten Mäuse wieder ein ähnliches Bild wie die jungen zeigen. Auch hier wären Untersuchungen an größeren Kohorten sinnvoll, um eine eventuelle physiologische oder pathologische Rolle dieser Modifikation in den Abwehrcellen untersuchen zu können.

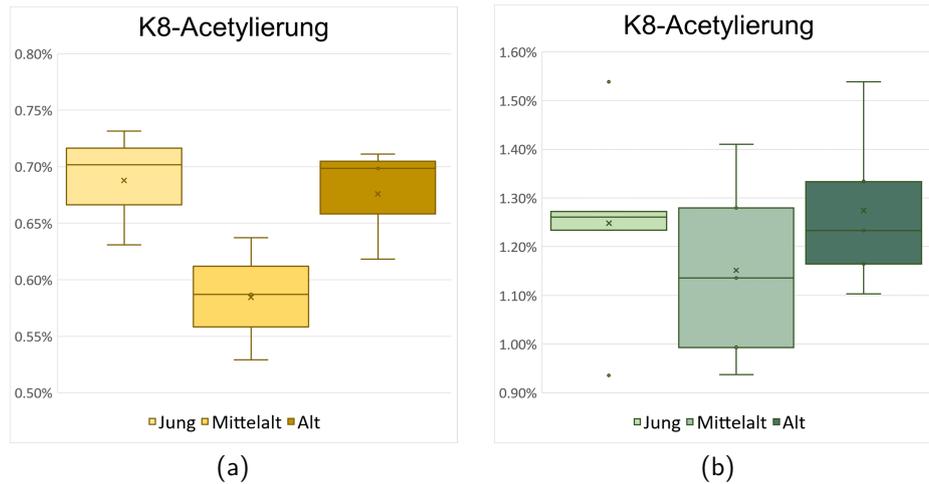


Abbildung 4.3: **Prozentualer Anteil der K8-Acetylierungen in murinen PBMCs und den Hippocampi im Vergleich.** (a): K8-Acetylierungen in murinen PBMCs aufgeschlüsselt nach Altersklasse. (b): K8-Acetylierungen in murinen Hippocampi aufgeschlüsselt nach Altersgruppe. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4.3.4 Veränderungen der Muster der K12-Acetylierung

Auf diese Veränderung wurde im Abschnitt 4.3.1 bereits eingegangen. Die Ergebnisse scheinen konform mit anderen Studien zu sein (u.a. Peleg *et al.* 2010; Plagg *et al.* 2015; Burke & MacKay 1997) und zeigen die Bedeutung des Levels an H4K12-Acetylierungen als möglichen Biomarker für eine frühzeitige Alzheimer-Diagnostik. Nur bei den alten Mäusen sinkt die Konzentration der H4K12-Acetylierung im Hippocampus im Gegensatz zu der in den mPBMCs ab. Bei allen anderen Altersgruppen ist die Konzentration im Hippocampus höher als in den mPBMCs. Am deutlichsten ist dieser Unterschied bei den mittelalten Mäusen zu sehen.

Tabelle 4.8: **Durchschnittliche H4K12Ac in Prozent aufgeschlüsselt nach Altersgruppe**

Histon-modifikation	Jung mPBM-Cs	Jung Hippocampus	Mittel mPBM-Cs	Mittel Hippocampus	Alt mPBM-Cs	Alt Hippocampus
H4K12Ac	1,35	1,37 ↑	1,23	1,36 ↑	1,34	1,30 ↓

Gibt es also zu einem bestimmten Zeitpunkt einen Shift zwischen dem peripheren und dem neuronalen Level an H4K12-Acetylierungen? Führt dieser gegebenenfalls sogar zu Funktionsbeeinträchtigungen? Wie könnte dieser Shift mit Hilfe von Blutwerten dargestellt werden? All diese Fragen würden weiterer Studien und Versuche bedürfen. Anhand

dieser kleinen Kohorte lässt sich die H4K12Ac-Konzentration nicht als zuverlässiger Biomarker im peripheren Blut identifizieren, es sei denn, es käme bei gesunden, mittelalten Mäusen regelmäßig zu einem Abfall und dann im Sinne eines Shifts, im Alter wieder zu einem Anstieg. Hiermit könnte dann eine nachlassende neuronale Funktionsfähigkeit mit diesem Shift in Verbindung gebracht werden.

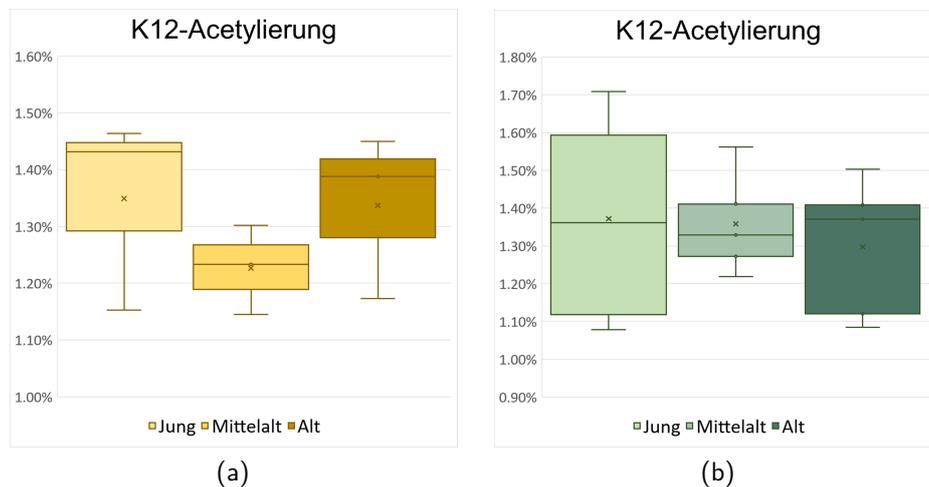


Abbildung 4.4: **Prozentualer Anteil der K12-Acetylierungen in murinen PBMCs und den Hippocampi im Vergleich.** (a): K12-Acetylierungen in murinen PBMCs aufgeschlüsselt nach Altersklasse. (b): K12-Acetylierungen in murinen Hippocampi aufgeschlüsselt nach Altersgruppe. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Es gibt auch bei humanen Blutwerten einige, die nur mit Hilfe des Alters des Patienten als sicher krankhaft oder gesund identifiziert werden können. Beispiele hierfür sind z.B. Hormone, die alkalische Phosphatase (in der Wachstumsphase bei Kindern z.B. deutlich erhöht aber dann trotzdem kein Hinweis auf eine Lebererkrankung, sondern als physiologisch zu werten), die GFR nach CKD-EPI-Formel und viele mehr. Es erscheint also nicht abwegig, einen altersabhängigen Normbereich zu definieren, um auf Grundlage dessen, pathologische Werte oder Ausreißer sicherer identifizieren zu können.

4.3.5 Veränderungen der Muster der K16-Acetylierung

2015 konnten Dmitriev & Papkovsky in einer in vitro Studie zeigen, dass ein Mangel an Sauerstoff und Glucose (oxygen and glucose deprivation = OGD model) zu einer vermehrten Deacetylierung von H4K16 führt, während HDAC-Inhibitoren (HDACi) wie Trichostatin A oder Valproinsäure sogar als neuroprotektiv gelten u.a. Kim *et al.* (2007) und die Schäden, zumindest teilweise, reversibel halten. Ein normales Level an H4K16 Ac gilt also als günstig für den neuronalen Stoffwechsel.

Tabelle 4.9: **Durchschnittliche H4K16Ac in Prozent aufgeschlüsselt nach Altersgruppe**

Histon-modifikation	Jung mPBMCs	Mittel mPBMCs	Alt mPBMCs	Jung Hippocampus	Mittel Hippocampus	Alt Hippocampus
H4K16Ac	31,87	31,56 (↘)	28,89 ↓	33,43	32,26 (↘)	32,41 (↗)

Interessanterweise scheinen die Level an H4K16Ac in den murinen PBMCs im Alter zu sinken, während sie im Hippocampus zumindest zwischen den mittelalten und alten Mäusen annähernd gleich bleiben (s. Tab. 4.9). In 4.2.1 wurde bereits dargestellt, wieso abnorme Level an H4K16Ac auch in peripheren Zellen zu massiven Problemen führen können. Hier könnten weitere Versuche Aufschluss darüber bringen, welche Funktionsveränderungen ins Besondere Immunzellen bei einer geringeren H4K16Ac aufweisen. Vorstellbar wäre eine eingeschränkte Immunfunktion, wie sie mit dem Alter einhergehen kann. Dieses zu belegen würde aber größerer Kohorten bedürfen.

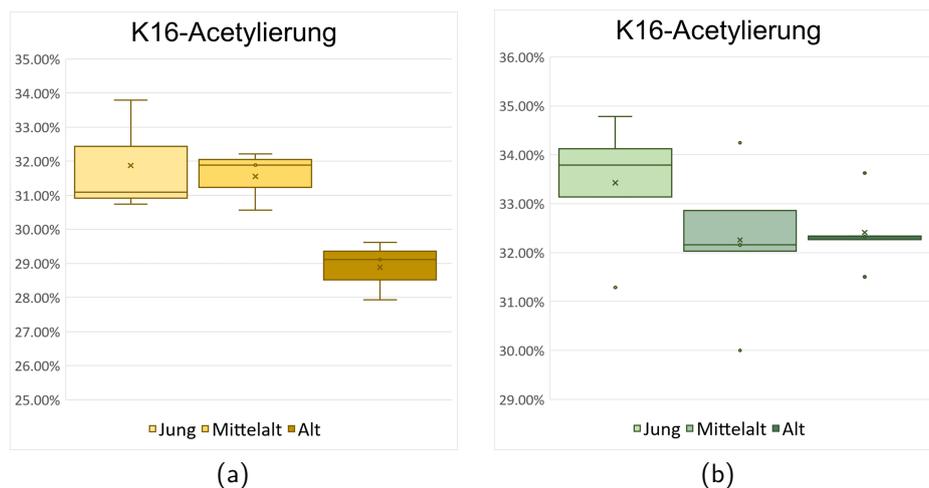


Abbildung 4.5: **Prozentualer Anteil der K16-Acetylierungen in murinen PBMCs und den Hippocampi im Vergleich.** (a): K16-Acetylierungen in murinen PBMCs aufgeschlüsselt nach Altersklasse. (b): K16-Acetylierungen in murinen Hippocampi aufgeschlüsselt nach Altersgruppe. Boxplots mit Median. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4.4 Der Warburg Effekt - Eine Hypothese

Der Warburg-Effekt (benannt nach Otto Heinrich Warburg) beschreibt die Beobachtung, dass Krebszellen selbst bei ausreichender Sauerstoffversorgung zur ATP-Gewinnung den Weg der anaeroben Glykolyse über die Bildung von Lactat wählen (s. 4.6), selbst wenn

dies eine eher ineffiziente Variante der Energiegewinnung darstellt (u.a. Vander Heiden *et al.* 2009). Wieso Tumorzellen eine ineffizientere ATP-Gewinnung in Kauf nehmen (~ 4 mol ATP/mol Glucose im Gegensatz zu bis zu 36 mol ATP/mol Glucose), obwohl sie unter aeroben Bedingungen wachsen, war lange Zeit Gegenstand der Forschung, da dies bei schnell proliferierenden Zellen mit vielen Energie verbrauchenden Prozessen auf den ersten Blick eher paradox erscheint.

Um den Warburg Effekt zu verstehen, wird im Folgenden kurz auf die Grundlagen der Glykolyse, des Citratzyklus und der Atmungskette eingegangen.

Der Abbau von Glucose kann in Zellen über die Glykolyse je nachdem, ob eine ausreichende Sauerstoffversorgung gegeben ist, in einem aeroben oder anaeroben Weg münden. Vereinfacht wird über den Abbau von Kohlenhydraten Pyruvat generiert. Dieses wird - bei ausreichender Sauerstoffversorgung - über die Bildung von Acetyl-CoA in den Citratzyklus und damit in die mitochondriale Atmungskette eingespeist. Über diesen Stoffwechselweg können bis zu 36 mol ATP/mol Glucose gewonnen werden. Der auch oxidative Phosphorylierung oder aerobe Glykolyse genannte Weg ist die effizienteste Möglichkeit der Energiegewinnung in menschlichen Zellen (s. Abb. 4.6).

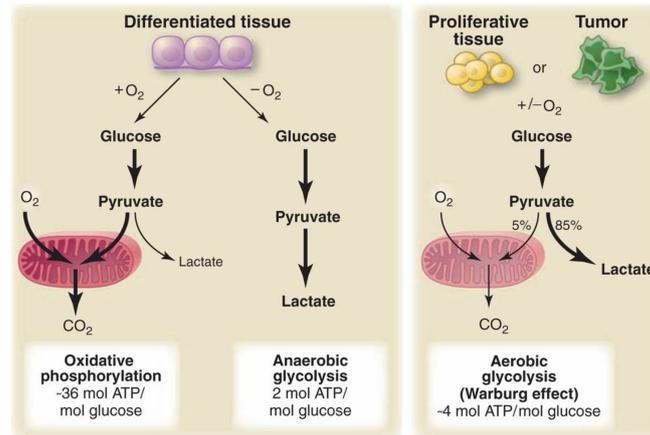


Abbildung 4.6: **Die Veränderungen des Stoffwechsels in Tumorzellen (Warburg-Effekt).** „Gesunde“ Zellen bzw. solche mit ausreichender Sauerstoffversorgung zeigen einen Glukosestoffwechsel, der durch die sogenannte **oxidative Phosphorylierung** (oxidative phosphorylation) gekennzeichnet ist. Dabei wird das Endprodukt der Glykolyse, das Pyruvat, den Mitochondrien zugeführt, um hier im Rahmen des Citratzyklus ATP gewinnen zu können. Lactat fällt nur in kleinem Rahmen an. (links) Im Gegensatz dazu nutzen Krebszellen selbst bei ausreichender Sauerstoffversorgung den Weg, der normalerweise nur von Zellen, welche unter einem Sauerstoffmangel (**anaeroben Bedingungen**, daher auch die Namensgebung **anaerobe Glykolyse**) stehen, zur ATP-Gewinnung. Da dies bei Krebszellen jedoch unter ausreichender Sauerstoffversorgung stattfindet, wird dieser Stoffwechselweg im Rahmen des Warburg-Effekts auch als **aerobe Glykolyse** definiert. Durch die Gewinnung von Lactat kann z.B. NADH wieder zu NAD^+ reduziert werden und dadurch in andere Stoffwechselwege eingespeist werden. Wie aus der Grafik ersichtlich, ist diese Form der Energiegewinnung jedoch ineffizienter und es wird davon ausgegangen, dass Krebszellen daher auch einen erhöhten Glukosebedarf haben. (nach Vander Heiden *et al.* 2009, PMC-Lizenz).

Bei Sauerstoffmangel oder in Tumorzellen kommt es zu einer Veränderung der Verstoffwechslung der Glukose. Da Sauerstoff als finaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette essentiell ist, wird normalerweise bei fehlender O_2 -Sättigung das Pyruvat nicht in die Mitochondrien eingespeist, sondern über die Lactat-Dehydrogenase A zu Lactat umgewandelt. Hier kann über den Co-Faktor $\text{NADH} + \text{H}^+$ wieder NAD^+ aber kein zusätzliches ATP generiert werden. Diese Form des Glukose-Stoffwechsels gilt daher als eher ineffizient, zumal das Lactat im Rahmen der Milchsäuregärung ein Abfallprodukt ist. Warum also stellt eine Tumorzelle ihren Stoffwechsel trotz ausreichender Sauerstoffversorgung auf einen, auf den ersten Blick, ineffizient wirkenden Weg um?

Um den Vorteil dieser Stoffwechsellumstellung zu verstehen, muss zuerst der Unterschied zwischen einer nicht-prolierierenden und einer proliferierenden Zelle verstanden werden.

Nicht-prolierierende Zellen müssen vor allem ihren eigenen Energiebedarf decken und können dies mit der effizienten oxidativen Phosphorylierung gut gewährleisten. Proliferierende Zellen, also z.B. wachsende Tumorzellen, müssen aber noch eine Vielzahl anderer Stoffwechselwege bedienen. Allein die Replikation der DNA benötigt ca. 12 Billionen Nukleotide (bei 6 Billionen Basenpaaren der DNA). Dazu kommen noch die für das Zellwachstum notwendigen Lipide, Proteine, Kohlenhydrate, etc.. Eine alleinige Synthese von ATP reicht hier also nicht aus.

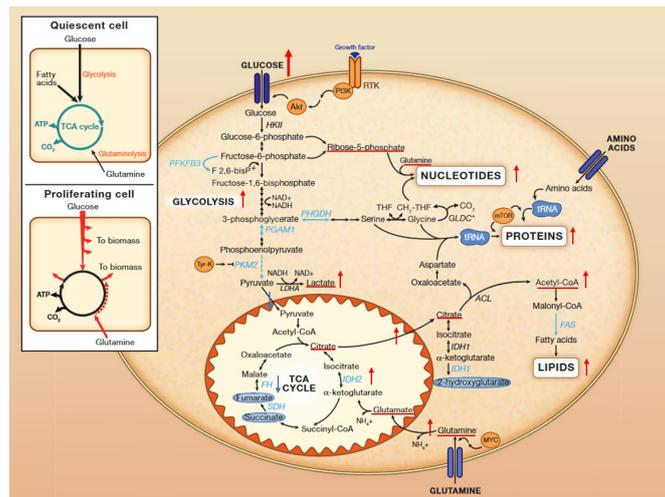


Abbildung 4.7: **Unterschiede in den Stoffwechselwegen zwischen nicht-prolierierenden und proliferierenden Zellen.** Nicht-prolierierende Zellen (hier engl.: Quiescent cells) speisen ihren Energiehaushalt mittels Glukose, Fettsäureabbau und der Gewinnung von ATP mithilfe des Citratzyklus (hier engl.: TCA cycle). Proliferierende Zellen (hier engl.: proliferating cells) müssen auch den vermehrten Bedarf für den Aufbau von Biomasse generieren und nur in geringerem Maße die ATP-Synthese sichern. Dies schaffen sie, indem sie den Abbau der Glukose nicht auf die Einspeisung von Pyruvat in den Citratzyklus ausrichten, sondern vielmehr die Zwischenprodukte z.B. mittels Ribose-5-Phosphat in die Synthese von Nucleotiden oder auch das 3-Phosphoglycerat in die Synthese von Proteinen einschleusen. Der erhöhte Bedarf an Glutamin wird aktiv mit einem Transporter in die Zelle eingebracht und kann hier über die Bildung von Citrat in den Mitochondrien, welches dann im Zytosol durch die ACL in Acetyl-CoA umgewandelt werden kann, auch an der Synthese von Lipiden beteiligt sein. Rote Pfeile: Zunahme. Blaue Pfeile: Abnahme. (nach Finley *et al.* 2013, PMC-Lizenz).

Donohoe *et al.* 2012 konnten in ihrem Paper zeigen, dass die aerobe Glykolyse der Tumorzellen noch weitere Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Zellen und auch auf

die Histon-Acetylierungen haben kann. Um das Pyruvat in den Citratzyklus einspeisen zu können, muss zuerst mittels einer oxidativen Decarboxylierung vom Pyruvat Kohlenstoffdioxid (CO_2) abgespalten werden. Daraufhin kann eine energiereiche Thioesterbildung zwischen dem Coenzym A und dem Acetatrest gebildet werden, sodass ein Acetyl-CoA als Produkt entsteht. Da die Energie für diesen Schritt aus der Decarboxylierung stammt, ist die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA unter physiologischen Bedingungen irreversibel. In den Mitochondrien kann das gebildete Acetyl-CoA zusammen mit Oxalacetat zu Citrat umgewandelt, das $\text{NADH} + \text{H}^+$ wieder in NAD^+ reoxidiert und im Folgenden durch die Atmungskette ATP gewonnen werden.



Wie in 2.4.1 bereits aufgezeigt, hängt die Genaktivierung oder Gendeaktivierung eng mit Histonmodifikationen und damit auch mit der Aktivität der HATs und HDACs zusammen.

Dadurch, dass der notwendige Co-Faktor der HATs, das Acetyl-CoA, in Tumorzellen vermehrt z.B. als Zwischenprodukt für die Lipidsynthese anfallen kann (s. Abb. 4.7), können die Histone vermehrt acetyliert und die Transkription im Folgenden aktiviert werden.

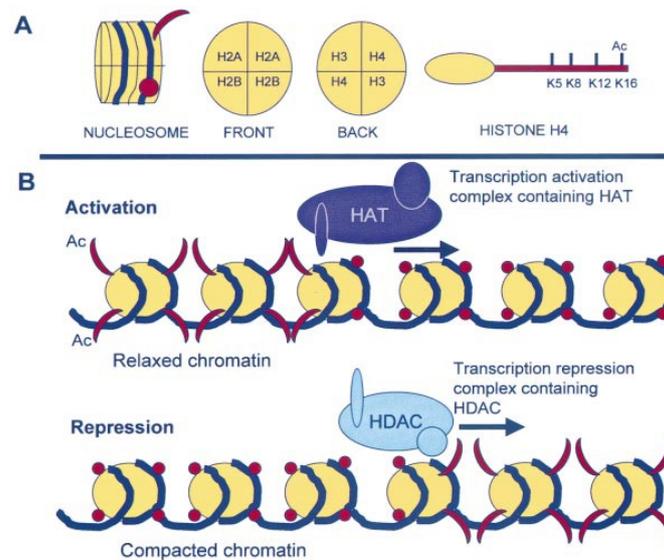


Abbildung 4.8: **Zusammenhang zwischen den HATs, HDACs und der Genaktivierung bzw. -deaktivierung.** **A:** Schemenhafte Darstellung der Nucleosome, Histone und der möglichen Histon-Modifikation - hier: Histon-K16-Monoacetylierung. **B:** Durch die Rekrutierung des Transcription activation complex (Transkriptions-Aktivierungs-Komplex) mit den HATs wird eine Genexpression ermöglicht. Dahingegen wird bei Rekrutierung des Transcription repression complex (Transkriptions-Unterdrückungs-Komplex) mit den HDACs eine Genexpression gehemmt. (nach Ruijter *et al.* 2003, CC-Lizenz).

Überraschenderweise scheint aber besonders die Überexpression von HDACs in Tumorzellen zu einer empfindlichen Störung der gesunden Genexpression und damit schlussendlich auch zu einer bösartigen Entartung zu führen. So konnten Özdağ *et al.* 2006 zeigen, dass die veränderte Expression von HDAC 1, 5 und 7 als molekularer Biomarker zur Differenzierung von gesundem vs. bösartig verändertem Gewebe in menschlichen Tumorzellen genutzt werden kann. Auch korreliert die Überexpression von HDACs mit Schlüsselereignissen der Tumorentstehung, wie z.B. der epigenetischen Repression von Tumorsuppressorgenen wie z.B. *CDKN1A* (Glozak & Seto 2007) oder auch veränderter Ablesung von Genloki zur Codierung von DNA-Reparatur-Enzymen wie z.B. *BRCA1* in Brustkrebszellen oder *ATR* zur Verhinderung von einer überschießenden Angiogenese (Eot-Houllier *et al.* 2009). Vor diesem Gesichtspunkt erscheinen die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1 kohärent mit den derzeitigen Forschungsergebnissen. Insgesamt eröffnete sich in Hinblick auf die Neuentwicklung von medikamentösen Ansätzen in der Krebstherapie ein völlig neues Forschungsfeld.

Derzeit sind drei Klassen von HDAC-Inhibitoren (HDACi) bekannt: Die Klassen I, II und IV, wobei die Einteilung anhand ihrer Ähnlichkeit zu Proteinen aus der Hefe,

ihrer Lokalisation (nukleär, cytoplasmatisch oder hybride) und ihrer enzymatischen Aktivität (West *et al.* 2014) erfolgte. Bestandteil dieser Klassen sind gegenwärtig 11 HDAC-Inhibitoren. Zu Nutzen machen konnte man sich bisher das N-Hydroxy-N'-phenyloctandiamid (Handelsname **Vorinostat** - Zulassung für die Behandlung des fortgeschrittenen und zuvor refraktären, cutanen T-Zelllymphoms) und Romidepsin (Handelsname **Istodax** - Zulassung ebenfalls für die Behandlung des cutanen T-Zell-Lymphoms und auch peripheren T-Zell-Lymphomen). Ob und in wie fern weitere HDAC-Inhibitoren für den therapeutischen Gebrauch entwickelt werden können, ist noch Gegenstand der Forschung. Die in-vitro Studien zu diesem Thema scheinen jedoch vielversprechend (z.B. Thailandepsin A und B in präklinischen Studien für die potentielle Behandlung von Ovarialkarzinomen Wilson *et al.* 2012).

4.5 Kritischer Ausblick

Mit meiner Arbeit konnte ich aufzeigen, dass das Protokoll zur Prozessierung menschlicher, wie muriner Zellen mithilfe der Massenspektrometrie zuverlässig funktioniert und hiermit auch kleinste Veränderungen der Histonacetylierung ($< 1\%$) reliabel als solche identifiziert werden können. Diese Ergebnisse in der Sensitivität und Spezifität sind mit Antikörper-basierten Methoden derzeit nicht reproduzierbar.

Als erfolgversprechendsten für einen möglichen Biomarker für z.B. neuronale oder sogar maligne Erkrankungen im peripheren Blut bzw. in den PBMCs zeigten sich die Modifikationen der H4K12- und H4K16-Monoacetylierung (Vgl. s. 4.2.1 und 4.3.1). Hier müssten jedoch, genau wie zur Überprüfung und weiterer Untermauerung der anderen Ergebnisse dieser Arbeit, weitere Studien an größeren Kohorten durchgeführt werden. Allein schon um einen verlässlichen Normwertbereich mit hoher Sensitivität und Spezifität definieren zu können, muss die Kohorte groß genug sein, um die Gaußsche Normalverteilung anwenden und Ausreißer auch als solche identifizieren zu können. Das Forschungsfeld der Epigenetik bietet sicherlich - auch heute schon in vivo - viele spannende Möglichkeiten Krankheiten, physiologische Vorgänge und auch Stoffwechselwege besser und tiefergehend zu verstehen und ich hoffe, dass diese Arbeit, wenn sie auch auf Grund der kleinen Teilnehmerzahl keine großen Schlüsse zulassen kann, einen wichtigen Teil dazu beitragen wird, diesem Ziel einen Schritt näher zu kommen.

5 Kapitel 5

Material and Methoden

5.1 Ethik

Die Zustimmung der Ethikkommission wurde erteilt. Eine Kopie dieser wurde im Anhang beilegt. Ferner wurde die Einwilligungserklärung aller menschlicher Probanden eingeholt.

5.2 Material

5.2.1 Reagenzien und Chemikalien

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma
2-Propanol p.A.	CLN GmbH
Essigsäureanhydrid-d ₆	Sigma
Acetonitril	Roth
Acrylamid-Mix	Roth
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma
Bromophenolblau	Sigma
Citrat	VWR
CoA	Sigma
Colloid Blue	life technologies
Proteasen Inhibitor Cocktail	Roche
Dichtemedium (OptiPrep)	Axis-Shield
Dithiotreitol	Roth
Methansäure (Formic acid)	Sigma
Glycin	Diagonal
Glycerin	VWR
HEPES (analytical grade)	SERVA
2-Iodoacetamid	VWR
Matrix (HCCA)	Sigma
Methanol	Roth
Protein Marker VI/V	Peqlab
Natriumdodecylsulfat	Sigma
TEMED	Roth
Trifluoressigsäure	VWR
Trichloressigsäure	Sigma
Tris (ultra pure)	Biozym
Triton X-100	Sigma
Wasser für Chromatographie	VWR

5.2.2 Enzyme und Antikörper

Enzyme	Hersteller
Endoproteinase Lys-C	Wako
Trypsin	Promega
CD45 MicroBeads (human)	MACS
CD15 MicroBeads (human)	MACS

5.2.3 Material

Material	Hersteller
2.7ml EDTA Röhrchen	Sarstedt
9.0ml EDTA Röhrchen	Sarstedt
12ml Leucosep™	Greiner
50ml Leucosep™ mit Medium	Greiner
Leere Gel Kassetten	life technologies
„MALDI target plates Voyager 92x2-Pos“, coated	AB Sciex
„Solid phase extraction disc Empore C18“	3M
TG PRiME™ vorgefertigtes Gel 4 - 20 %	SERVAGel™

5.2.4 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
HPCL	Dionex UltiMate3000 RSLCnano System	Thermo
MADLI/TOF MS	Voyager-DE STR System	Applied Biosystems
Massenspektrometer	Finnigan LTQ	Thermo
Ultraschallbad	Bioruptor	Diagenode
SpeedVac	Scanvac with Cool Safe	Labogene
UV/Vis Spektralphotometer	Nanodrop 2000	Peqlab

5.2.5 PBMC-Isolation aus humanem Blut

Das Blut wurde den nüchternen Probanden von 9-9:30Uhr am Morgen abgenommen. Ein 2,7ml-EDTA-Röhrchen wurde an das Medizinische Labor weitergegeben, um ein großes Blutbild anfertigen zu lassen (s. Tab.3.2 auf Seite 42), während für die weiteren Versuche drei 9ml-EDTA-Röhrchen gefüllt wurden. 22ml des so gewonnenen Probandenbluts wurden in ein sogenanntes *Leucosep Röhrchen* (Leucosep Tube, Greiner Bio One, 50ml mit Dichtemedium) gegeben und mit $1000\times g$ bei Raumtemperatur für 20min zentrifugiert. Durch das Dichtemedium und die eingebaute Filtermembran konnte so eine Auftrennung der Blutbestandteile in das Plasma mit dem sogenannten Buffy Coat (mononukleäre Leukozyten) und die polymorphkernigen Zellen, Erythrozyten und Thrombozyten erreicht werden (s. Abb. 3.2 auf Seite 36). Das Plasma samt Leukozytenfilm mit den enthaltenen PBMCs wurde in neue Röhrchen abgefüllt und dort mit 10ml unsteriler PBS bei Raumtemperatur mittels eines erneuten Zentrifugierschrittes bei $250\times g$ für 10min (RT) gewaschen. Das so gewonnene Zellpellet wurde nach Abpipettieren des Überstands erneut mit 5ml PBS resuspendiert und nochmals bei $250\times g$ für 10min (RT) aufgereinigt, gefolgt von einer letzten Resuspension und Waschung mit 1ml PBS wobei die Probenlösungen in diesem Schritt auf zwei 500 μ l Proben aufgeteilt wurde. Diese wurden abermals bei $250\times g$ für 10min (RT) zentrifugiert und die gewonnenen Zellpellets sofort auf Trockeneis schockgefroren und auch so bis zu ihrer Lagerung im $-20^{\circ}C$ Gefrierschrank transportiert.

5.2.6 PBMC-Isolation aus murinem Blut

Das Blut wurde aus der rechten Herzkammer der 3, 8 und 20 Monate alten männlichen Mäuse (C57BL/6J, Janvier) durch Dr. Shahaf Peleg entnommen. Ebenfalls wurde post mortem der Hippocampus entfernt. Um das für die Leucosep Röhrchen benötigte Volumen von 3ml zu erreichen, wurden vier bis fünf Proben der entsprechenden Altersgruppen zusammen gepoolt. Die Isolation der PBMCs erfolgte mithilfe der Leucosep Röhrchen für 3-8ml Probenmaterial und dem zuvor hinzugefügten 3ml des 14,8% Dichtemediums vom 60%igen Dichtemedium OptiPrep (Axis-Shield). Dieses wurde nach Anleitung hergestellt und danach abzentrifugiert. Nach der Vorbereitung der Röhrchen konnte das Probenmaterial hinzugefügt und nach den Schritten, welche in 5.1.5. bereits beschrieben wurden, vorgegangen werden.

5.3 Methoden

5.3.1 Molekularbiologische Methoden

5.3.1.1 Herstellung von Tris-Glycin SDS-Polyacrylamid-Gelen für die Elektrophorese

Für die Vorversuche wurden 18%ige Tris-Glycin SDS-Polyacrylamid-Gele wie folgt hergestellt:

Für 1 Gel	(6ml -18%)
0,80ml	H ₂ O
3,60ml	30% Acrylamid-Mix
1,50ml	1.5M Tris (pH 8.8)
0,06ml	10% SDS
0,06ml	10% APS
2,50µl	TEMED

Die oben tabellarisch aufgeführten Ingredienzien wurden unter der Schutzhaube vorsichtig miteinander vermischt und leere Gelkassetten bis zur Kammlinie damit befüllt. Um Artefakte und Lufteinschlüsse zu vermeiden und eine gerade Trennlinie zu gewährleisten, wurden je 1ml 2-Propanolol hinzugegeben. Nach dem Festwerden des Gels wurde das Propanolol durch Abkippen entfernt und das Sammelgel gefertigt, indem die folgenden Chemikalien miteinander konfundiert wurden:

Für 1 Gel	(2ml)
1,40ml	H ₂ O
0,33ml	30% Acrylamid-Mix
0,25ml	1.0M Tris (pH 6,8)
0,02ml	10% SDS
0,02ml	10% APS
2,00µl	TEMED

2ml der Sammelgelzubereitung wurden zu jeder Gelkassette gegeben und der Kamm (10 Kammern) vorsichtig eingeführt. Nach erfolgter Polymerisation wurden die Gele entweder direkt für die Gelelektrophorese benutzt oder andernfalls im 4°C-Kühlschrank aufbewahrt.

5.3.1.2 Anfärbemethode - Kolloidalblau (Colloidal Blue)

Kolloidalblau (engl. Colloidal Blue), auch bekannt unter dem Namen Coomassie Brilliant Blau G-250, ist in der Lage selbst kleinste Nanogrammlevel von Proteinen detektieren zu können (Neuhoff *et al.* 1988) und benötigt als Entfärbung lediglich reines Wasser. Dies sind zwei große Vorteile, denn so benötigt die kolloidale Version im Gegensatz zu ihrem Verwandten, dem Coomassie R-250, keine saure Entfärbung und somit kann der Gefahr einer chemischen Modifikation der Proben durch diesen Schritt entgangen werden. Kolloidalblau zeichnet sich dabei durch eine Zugabe von 20% Methanol und höheren Konzentrationen an Ammoniumsulfat aus.

Die Färbung wurde jeweils am Tag der Nutzung frisch zubereitet, wobei ein fertiges Kit von life technologies verwendet wurde. Der Farbstoff wurde nach Anleitung aus entionisiertem Wasser, Methanol, Komponente A und Komponente B zusammengemischt. Die Gele wurden für maximal 10 Stunden gefärbt und danach mit deionisiertem Wasser für mindestens 4 Stunden entfärbt bzw. solange gewaschen bis sie entfärbt bzw. nur noch klare Proteinbanden erkennbar waren. Das Kolloidalblau ist ein Farbstoff, der in kleinsten Tröpfchen im Dispersionsmedium gelöst vorliegt und eine erhöhte Bindung zu Proteinen aufweist. Damit können Proben sichtbar gefärbt und Gel-Areale ohne Proteine (und somit ohne Probenmaterial) effizient mit Wasser wieder entfärbt werden.

5.3.1.3 Spektralphotometrie

Spektralphotometrie oder Spektrophotometrie ist die quantitative Messung der Transmission, Absorption oder Reflektion von Licht als eine Funktion der einfallenden Wellenlänge jenes. Durch beispielsweise eine Veränderung des Absorptionsmaximums eines Substrats oder Coenzym (z.B. bei der Reduktion von NAD^+ (Absorptionsmaximum bei 260nm) zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Absorptionsmaximum bei 340nm)) kann das sich ändernde Absorptionsspektrum Aufschluss über die Enzymaktivität in einer Probe geben. Da sich diese Veränderung photometrisch beobachten lässt, kann die Enzymaktivität indirekt mit dem **Lambert-Beerschen Gesetz** bestimmt werden. In einer anderen Anwendung kann das Verfahren auch dazu genutzt werden, Proben auf ihre Proteinkonzentration und Reinheit zu prüfen (Nanodrop).

5.3.2 Proteinmethoden

5.3.2.1 Histoneextraktion mit dem hypotonen Lysepuffer (A1)

Für die Chromatinanreicherung wurde eine sterile Gewebehomogenisierungspufferlösung hergestellt. Dabei wurden nur gefilterte Chemikalien wie folgt verwendet:

Für 20ml		Finale Konzentration
18,15ml	H ₂ O	
0,4ml	3M KCl	60mM
60µl	5M NaCl	15mM
80µl	1M MgCl ₂	4mM
300µl	1M HEPES pH 7,6	15mM
1,0ml	Triton 10%	0,5%
10µl	1M DTT	0,5mM
1 Tablette	Proteaseninhibitor (Roche)	

Die Herstellung der Pufferlösung erfolgte in der Kältekammer bei 4°C. Die PBMC-Pellets wurden in 500µl der A1-Pufferlösung resuspendiert und dann in einem Ultraschallbad 3 mal für 10 Sekunden, 45 Sekunden Pause, bei hoher Energierate homogenisiert (Bioruptor). Die auf Eis gekühlten Hippocampusproben wurden mit dem Roti Speed-Rührer (Roth) suspendiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 14000rpm für 30min bei 4°C und der Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen überführt, um diesen bei -20°C für weitere Versuche und mögliche Kontrollen aufzubewahren. Das Pellet wurde in 500µl H₂SO₄ resuspendiert, noch einmal im Ultraschallbad homogenisiert und dann zum Rotieren auf die Halterung in der Kältekammer aufgebracht. Dort verblieben die Proben über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Proben bei 13000rpm für 10min abzentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfröhrchen übertragen. 26,5% TCA wurde zu der Lösung hinzugegeben, um die Proteine auszufällen. Die Proben wurden daraufhin kurz gevortext und für 3,5 Stunden in der Kältekammer auf Eis inkubiert. Nach jeder Stunde wurden die Röhrchen etwas geschüttelt, um die Proteinausfällung zu verbessern. Nach der Inkubation wurden die Proteine bei 13000rpm für 10min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die so entstandenen Pellets wurden mit eiskaltem Aceton aus dem Gefrierschrank 3 mal gewaschen. Danach wurden die Proben unter der Haube luftgetrocknet, mit 40µl des Laemmli-Puffers gemischt (Cold Spring Harbor Rezept, Konzentration 2×: Bromophenolblau 0.25%, DTT 0.5M, Glycerin 50%, SDS 10%, Tris 1M pH 6,8) und 5min bei 90°C erhitzt. Proben, welche eine grüne oder gelbe Färbung aufwiesen, wurden mit 1µl of Tris pH 8,0 abgepuffert, um den pH zu adjustieren. Die

2-Mercaptoethanol reduziert die intra- und intermolekularen Disulfidbrücken, während das SDS-Detergens die Proteine und Untereinheiten denaturiert und ihnen eine negative Ladung gibt, sodass die Proteine und Probenbestandteile später auf Grundlage ihrer Größe auf dem Gel separiert werden. Das Bromphenolblau dient dabei als Färbung der Proben, sodass eine visuelle Kontrolle der Laufweite der Proben im Gel und der richtigen Eingebung in die vorgesehenen Startkammern erfolgen kann. Das Glycerin erhöht die Dichte der Proben, damit diese nicht versehentlich aus den Startkammern des Gels auslaufen.

5.3.2.2 Histoneextraktion mithilfe der Säureextraktion

Um zwei verschiedene Ansätze der Histoneextraktion zu vergleichen, wurde auch eine Säureextraktion in einem Vorversuch an Probandenproben durchgeführt, um den besten Arbeitsprozess zu ermitteln. Dafür wurde die Hälfte der Proben wie in 5.3.2.1 beschrieben verarbeitet und die andere Hälfte dem Säureextraktionsprotokoll unterzogen. Hierbei wurde 50% 0.4M H₂SO₄ zu den Proben gegeben und sie wurden über Nacht bei 4°C in der Kältekammer rotiert. Anschließend wurden sie wie die hypotonen Pufferproben am nächsten Tag verarbeitet.

5.3.2.3 SDS-Page

Um die Proteine nach Größe zu unterscheiden und die Histone auftrennen zu können, wurde eine SDS-Page-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden vorgefertigte Gele (SERVA-Gel TM TG PRiME TM 4 - 20%) zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit mit den zuvor vorbereiteten Proben (Laemmli Buffer Cold Spring Harbor Recipe Konzentration 2×: Bromphenolblau 0,25%, DTT 0,5 M, Glycerol 50%, SDS 10%, Tris 1 M, pH 6,8) beladen, die 5 Minuten lang bei 90°C gekocht wurden. Es wurden dafür abwechselnd 8µl and 13µl der Probenlösungen in die Geltaschen gegeben. Um die Proteinbanden nach dem Laufen zu färben, wurden die Gele mit frisch hergestelltem Kolloidalblau (Life-Technologies-Färbekit) versetzt und maximal 10 Stunden lang gefärbt. Sie wurden am nächsten Morgen für mindestens 4 Stunden mit destilliertem Wasser entfärbt (s. auch 5.3.1.2).

5.3.3 Proteom-Analyse

Das Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine in einem festgelegten Raum (z.B. in einem Lebewesen oder in einer Zellpopulation). Um mögliche proteomische Veränderungen zwischen den verschiedenen Altersgruppen zu analysieren und zu messen,

wurde eine Proteom-Analyse der PBMC-Proben durchgeführt. Hierzu wurde ein frischer 8M Harnstoffpuffer (6M Harnstoff + 2M Thioharnstoff) hergestellt. Die zuvor eingefrorenen Überstände der PBMC-Proben (Vgl. 5.2.2.1) wurden aus dem Gefrierschrank entnommen und mit 20% TCA versetzt. Die Proben wurden 2 Stunden bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden sie 30 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert und das Pellet wurde zweimal mit 1ml kaltem Aceton (aus dem -20°C Gefrierschrank) gewaschen. Nach dem Lufttrocknen wurden 150µl des Harnstoffpuffers zugegeben und die Proben wurden über Nacht auf dem Shaker inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben bei 18°C für 5s mit niedriger Geschwindigkeit beschallt (Branson-Sonifikator), um die Zellmembranen zu zerstören. Um Disulfidbrücken zu reduzieren und die Oxidation von Thiolgruppen zu verhindern, wurden 15µl 1mM DTT zugesetzt, und die Proben wurden 45 Minuten bei 4°C auf dem Shaker inkubiert. Nach der Inkubation wurden 3µl von IAA (550mM), einem irreversiblen Inhibitor aller Cysteinpeptidasen, zugegeben und die Proben wurden 30min im Dunkeln inkubiert. Lys-C wurde in 40mM Ambic (20µg of Lys-C + 100µl of 40mM Ambic) gelöst. Lys-C ist eine Endoproteinase, die Proteine auf der Carboxylseite von Lysin-Aminosäuren spaltet. 6µl des 1M Ambic + 10µl der Enzymlösung wurden zu den Proben gegeben und die Proben wurden 3 Stunden bei 25°C inkubiert. Um eine hochwirksame Verdauung durchzuführen, wurde ebenfalls eine Trypsinlösung (850µl of 40mM Ambic + 12mg of Trypsin) zugesetzt, nachdem die Proben mit 42µl 1M Ambic und daraufhin 950µl H₂O gemischt worden waren. Trypsin hydrolysiert nur die Peptidbindungen, in denen die Carbonylgruppe entweder durch einen Arginin- oder Lysinrest eingebracht wird, wodurch es sich sehr gut für die Massspec-Analyse geeignet . Die Proben wurden bei 18°C über Nacht inkubiert.

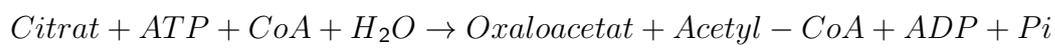
Am nächsten Tag wurden 12µl TFA 100% (bis zu einer Endkonzentration von 1%) zugegeben und die Proben wurden 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Röhrchen überführt und die Trennsäulen mithilfe des Durchlaufs von 100% ACN und dann 0,1% TFA durch Anlegen eines Vakuums aktiviert. Nach der Aktivierung wurden die Säulen zweimal mit den Proben plus dem gleichen Volumen von 0,1% TFA beladen. Sie wurden dann mit 0,1% TFA gewaschen. Zur PeptidAuswaschung wurden die Säulen zweimal mit 300µl ACN 60% + TFA 0.25% beladen. Das finale Volumen der Peptidlösung betrug daher 600µl. Diese 600µl wurden daraufhin in die SpeedVac gegeben, um die Peptide zu konzentrieren und die Lösungsmittel entfernen zu können. Zur Kontrolle des erfolgreichen Verdaus der Peptide wurden 1.5µl jeder Probe mit der gleichen Menge Matrix (HCCA) auf einer MALDI target plate gemischt und ins MALDI-System (Voyager-DE STR System) eingebracht. Nach der Aufkonzentration in der SpeedVac wurden 30µl TFA 0.1% zu den Proben gegeben.

Zur Quantifizierung der Peptidkonzentration und zur Erzielung einer vergleichbaren Menge zwischen den verschiedenen Proben wurde die Proteinkonzentration spektrophotometrisch (Nanodrop) gemessen und die Proben wurden solange verdünnt, bis eine Konzentration von ca. 1.5µg Peptide in 17µl TFA 0.1% erreicht wurde. Die Proben wurden im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

5.3.4 Enzym-Essays

5.3.4.1 ATP-Citrat-Lyase-Aktivitäts-Essay

Um die Tauglichkeit eines Inhibitors an menschlichen PBMCs zu testen, welcher zuvor bei Drosophila-Zellen Verwendung fand, wurde am Friedrich-Baur-Institut ein ATP-Citrat-Lyase-Aktivitäts-Essay durchgeführt. Die ACL ist ein Enzym, welches sich im Cytosol befindet und die Bindungsspaltung von Citrat katalysiert, sodass Acetyl-CoA, Oxalacetat, ADP und Orthophosphat generiert werden können. Es benötigt Mg₂ als Cofaktor. Die ACL-abhängige Synthese von Acetyl-CoA wird nicht nur als wesentlicher Schritt für die De-novo-Synthese von Fettsäuren und Cholesterin angesehen, sondern versorgt auch das HAT mit seinem Substrat und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Histonacetylierung.



Die folgende Pufferlösung wurde vorbereitet:

für 10ml	
333µl	4.0M KCl
100µl	MgCl ₂
500µl	M Tris 7.8 pH
200µl	10mM CoA
200µl	1.0M Citrat
30µl	25mM NADH
7.8µl	Mercaptoethanol
140µl	MDH

Bis zu einem Gesamtvolumen von 10ml wurde H₂O dazugegeben. Darüber hinaus wurden 31 mg ATP in 250µl H₂O gelöst, was zu einer Endkonzentration von ca. 200mM ATP in der Lösung führte. 160µl des Lyase-Inhibitors wurden zu drei PBMC-Pellets gegeben. Die Proben wurden bei 4 ° C und 2700rfc abzentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurden die Küvetten für die Spektrophotometrie vorbereitet, indem sie 10 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. 450µl des Puffers wurden zu jeder Küvette

gegeben und erneut 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Zunächst wurde eine Kontrolle mit 10µl 100 mM DMSO + 30µl PBMC-Probe 1 + 12,5µl ATP durchgeführt. Das ATP wurde nach Erreichen eines stabilen Plateaus zugegeben, um die Reaktion zu starten (s. Reaktionsformel oben). Danach wurde ein Lauf mit 10µl des Inhibitors anstelle von DMSO + 12,5µl ATP durchgeführt. Die Laufzeit der Spektrophotometrie betrug immer ca. 5 Minuten. Nach dem Titrieren von 10µl, 20µl und 30µl Inhibitor/DMSO, um die geeignete Menge des Inhibitors herausfinden zu können, wurde die benötigte Endmenge auf 30µl festgelegt, da dies die besten Ergebnisse lieferte. Somit wurden alle Proben daraufhin mit 30µl Inhibitor/DMSO behandelt. Ein weiterer Titrationsansatz wurde bei Probe 3 angewendet, indem die ersten 15µl, die nächsten 7,5µl und die letzten 45µl des DMSO für weitere Standards zugegeben wurden. Die Ergebnisse wurden ausgedruckt und am Computer im Friedrich-Baur-Institut gespeichert.

5.3.5 Massenspektrometrie

Alle der für das MS verwendete Chemikalien hatten MS/HPLC Qualität.

5.3.5.1 In-Gel Trypsinverdau

Nach dem Auftrennen der Histone durch SDS-PAGE und Färben der Banden mit Colloid Blue, wurden die Histone H4-Banden aus den Gelen ausgeschnitten, wobei die 8µl und 13µl Banden jeder Probe kombiniert und in markierten PCR-Eppendorf-Röhrchen gesammelt wurden. Bei jeder Probe wurde der tryptische In-Gel-Verdau wie folgt durchgeführt:

Die Gelwürfel wurden zweimal mit 200µl H₂O und danach mit 200µl Ambic 100mM gewaschen, um den pH-Wert anzupassen. Da der Farbstoff Colloid Blue die MS-Messungen stören könnte, wurden dreimal je 100µl Ambic 100mM und 100µl ACN zum Entfärben zugegeben und jeweils 10min bei 37°C mit den Proben inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten, der erste mit 200µl Ambic 100mM und der zweite mit 200µl Ambic 20mM, wurden die Gelstücke dreimal mit 200µl ACN dehydratisiert, bis sie komplett weiß erschienen. Um nicht-acetylierte Histone-Lysinreste zu acetylieren, wurden 7.5µl Essigsäureanhydrid-d₆ zu den getrockneten Gelwürfeln gegeben, gefolgt von 15µl Ambic 100mM und 53µl Ambic 1M. Nach 45-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Gelstücke viermal mit 200µl Ambic 100mM gewaschen und erneut durch dreimalige Zugabe von 200µl ACN dehydratisiert. Das Trypsin wurde in 1ml Ambic 100 mM gelöst und ebenso wie die PCR-Eppendorf-Röhrchen mit den Proben kühl auf Eis gelagert. Nachdem die letzten Reste des ACN entfernt worden waren, wurden 40µl des gelösten Trypsins zu den getrockneten Proben gegeben, um sie zu rehydratisieren. Die

Proben wurden dann 40min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Rückstände entfernt und die Proben über Nacht bei 37°C auf dem Shaker mit 70µl Ambic 20 mM inkubiert, um über Nacht einen tryptischen In-Gel-Verdau durchzuführen.

Um die Histone am nächsten Tag aus den Gelstücken zu lösen, wurden die Proben zweimal mit 70µl ACN 70% + TFA 0.25% für je 10min inkubiert. Die entstehende Flüssigkeit wurde jedes Mal in neu markierte PCR-Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Gelstücke wurden dann zweimal mit 70µl ACN 100% für je 20min inkubiert und damit vollständig dehydratisiert. Auch hier wurden die Überstände in die neuen PCR-Eppendorf-Röhrchen gegeben. Die flüssigen Proben wurden für 6 Stunden in der SpeedVac evaporiert. Danach wurden die Pellets mit 25µl TFA 0,1% angesäuert, eine Grundvoraussetzung für die Peptidionisation, und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

5.3.5.2 Entsalzen

Die Entsalzung erfolgte mit eigens dafür präparierten Pipettenspitzen. Dafür wurden aus einer Festphasenextraktionsscheibe (C18) kleine Kreise ausgestanzt, die dann in die Pipettenspitzen eingesetzt wurden. Die so frisch hergestellten Filtermembranspitzen wurden mit Methanol geeicht, indem 70µl Methanol 100% zugegeben und die Flüssigkeit zweimal 2min lang bei 2000 U/min abzentrifugiert wurde. Im nächsten Schritt wurden sie zweimal mit 70µl ACN 100% gewaschen. Danach folgten zwei weitere Waschschrte mit 70µl ACN 70% + FA 0.1% für je 5min und vier Waschschrte mit 70µl TFA 0.2% bei 2000rpm für 5min. Die Flüssigkeiten, die durch die Filter abzentrifugiert wurden, wurden in Eppendorf-Röhrchen gesammelt, welche vorher unter die Spitzen gestellt wurden. Um die Flüssigkeit der gelösten Histonproben aufzufangen, wurden neue, beschriftete Eppendorf-Röhrchen unter die Filterspitzen gesetzt und die vorher kurz aufgetauten Histonproben auf die Filter geladen. Die Proben wurden dann bei 1000rpm für 5min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, indem die gesammelte Flüssigkeiten aus den Eppendorf-Röhrchen entnommen und erneut auf die Filter geladen wurden. Danach wurde die Membran zweimal mit 70µl FA 0,1% gewaschen und die Flüssigkeit für 5min bei 1000U/min abzentrifugiert. Da sich die Peptide nun auf der Filtermembran befanden, mussten sie wieder gelöst werden. Hierfür wurden die Filtermembranspitzen von den Eppendorf-Röhrchen in neu beschriftete Massenspektrometrierröhrchen überführt. Um die Peptide zu eluieren, wurden 70µl ACN 70% + FA 0,1% auf den Filter geladen und zweimal bei 1500 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Damit die Lösungsmittel entfernt und die Peptide konzentriert werden konnten, wurden die Proben für 8 Stunden in die SpeedVac gegeben. Danach wurden die Proben mit 12µl TFA 0,1% resuspendiert und in zwei 6µl Proben aufgeteilt, welche bei -20°C gelagert wurden.

5.3.5.3 Massenspektrometrie-Analyse

5µl der entsalzten Peptidlösung wurden durch das Ultimate 3000 RSLCnano System (Dionex) injiziert und aufgetrennt. Die Peptide wurden mit einem Gradienten von 5-60% Acetonitril in 0.1% Methansäure für 40min bei einer Geschwindigkeit von 300 nl/min auf einer analytischen Säule des Typs C18 (75 µm i.d. ×15 cm, packed in-house with Reprosil Pur C18 AQ 2.4 µm; Dr. Maisch, Ammerbuch, Germany) aufgetrennt. Der Abfluss des HPLC wurde daraufhin als Elektrospray in das LTQ Orbitrap Classic Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gegeben. Die weiteren Vorgänge wurden wie im spezifischen Setup nach Feller *et al.* (2015) gehandhabt. Typische MS-Bedingungen waren hierbei: Sprühspannung 1.5kV, kein Mantel- oder Hilfsgasstrom, beheizte Kapillartemperatur 200°C, eine MS1-Auflösung von 7500 (bei 400m/z), normalisierte kollisionsinduzierte Dissoziationsenergie von 35% (MS2) bzw. 45% (MS3), Aktivierung bei $q = 0.25$, und Aktivierungszeit = 30 ms Vgl. Bux *et al.* (2019).

5.3.5.4 Analyse der Histonmodifikationen

Durch die Analyse der Intensität der einzelnen Peptidfragmente und ihrer Masse pro Ladung kann mithilfe einer Exceltabelle und verschiedenen Formeln auf die Abundanz der einzelnen Histonmodifikationen geschlossen werden (Feller *et al.* 2015). Dies funktioniert entweder im Sinne eines Ausschlussverfahrens oder durch eine indirekte Bestimmung. Sieht man sich die Sequenz des Histons H4 an, so fällt auf, dass es vier mögliche Lysinreste gibt, welche acetyliert sein könnten. Das Histon H4 kann somit maximal tetraacetyliert sein aber auch mono-, di-, oder triacetyliert vorkommen. Die unterschiedlichen Möglichkeiten lassen sich ebenfalls mithilfe von Formeln bestimmen. Wie bereits oben beschrieben, wurde im Rahmen der Messung im Massenspektrometer der Messbereich der Aminosäuren 4-17 gewählt.

Die Datenanalyse wurde mithilfe von Skyline25 (Skyline-daily (64bit) 4.2.1.19004) durchgeführt. Die Peaks wurden per Hand ausgewählt und die integrierten Maximalwerte als csv.-Format Datei für die weitere Bearbeitung exportiert. Nach der Peak-Integration wurde die Datenzusammenfassung und statistische Analyse in Excel durchgeführt, dabei wurde die relative Häufigkeit nach den angegebenen Formeln von Feller *et al.* (2015) berechnet. Die statistische Auswertung der Proben wurden unter Verwendung des nicht-parametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests (auch als Wilcoxon-Rang-Summen-Test bekannt) durchgeführt, wobei die verschiedenen Größenordnungen der Proben berücksichtigt wurden. Statistische Signifikanz wurde durch einen p-Wert von <0.05 gewährleistet. Die Graphen wurden ebenfalls mithilfe von Excel erstellt.



Abbildung 5.1: **Die Aminosäuresequenz des Histons H4.** Grün dargestellt ist der gewählte Messbereich (Aminosäure 4-17) der Analyse. Weiterhin dargestellt sind die möglichen Modifikationen der Aminosäurereste: rot die Phosphorylierung des Serins 1, blau die möglichen Acetylierungen an den Lysinen 5, 8, 12 und 16 und orange die Methylierungen an Lysinrest 20.

6 Kapitel 6

Abkürzungsverzeichnis

ACL	ATP-Citrat-Lyase
ACN	Acetonitril
Ambic	Ammoniumbicarbonat
APS	Ammoniumpersulfat
ca.	circa
bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
FA	Ameisensäure
HAT	Histonacetyltransferase
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure (matrix)
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPCL	High performance liquid chromatography
IAA	2-Iodoacetamid
Lys-C	Endoproteinase Lys-C
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MDH	Malatdehydrogenase
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells ¹
PBS	Phosphat buffered saline/Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

¹PBMCs: Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Akronym: Peripheral blood mononuclear cells) umfassen einkernige weiße Blutkörperchen (Leukozyten) des Blutes mit einem runden Zellkern, also die Lymphozyten und die Monozyten. Sie können aus

dem Blut aufgereinigt werden und werden zur Infektionsdiagnostik, zur Erfassung eines Impfschutzes, sowie zu Forschungszwecken verwendet.

7

Kapitel 7

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung und Bearbeitung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Axel Imhof für die ausgezeichnete und geduldige Betreuung der gesamten Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Shahaf, Irene, Andreas, Ignasi, Marc, Pierre und allen anderen, die mich mit ihren Mühen, ihrer Geduld und ihren lieben Worten bei meiner Dissertation unterstützt haben, herzlich bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich zudem Ingmar danken, der in einer Nacht- und Nebelaktion meine Nerven, meinen Lebenswillen und mein Seelenheil mit der teilweisen Datenwiederherstellung von meiner kaputten Festplatte gerettet hat.

Mein besonderer Dank gilt zudem meinen Eltern, meiner lieben Vroni und Manuel, die mich mein Studium und den Schreibprozess hindurch nie aufgegeben haben. Von Herzen Danke!

Literaturverzeichnis

- Acheson, Ann, Conover, Joanne C, Fandl, James P, DeChiara, Thomas M, Russell, Michelle, Thadani, Anu, Squinto, Stephen P, Yancopoulos, George D, & Lindsay, Ronald M. 1995. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*, **374**(6521), 450–453.
- Allende-Vega, Nerea, Saville, MK, & Meek, DW. 2007. Transcription factor TAFII250 promotes Mdm2-dependent turnover of p53. *Oncogene*, **26**(29), 4234–4242.
- Aunan, Jan R, Cho, William C, & Sørreide, Kjetil. 2017. The biology of aging and cancer: a brief overview of shared and divergent molecular hallmarks. *Aging and disease*, **8**(5), 628.
- Baek, Sung Hee, Ohgi, Kenneth A, Rose, David W, Koo, Edward H, Glass, Christopher K, & Rosenfeld, Michael G. 2002. Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF- κ B and β -amyloid precursor protein. *Cell*, **110**(1), 55–67.
- Bannister, Andrew J, & Kouzarides, Tony. 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, **384**(6610), 641.
- Bednar, Jan, Horowitz, Rachel A, Grigoryev, Sergei A, Carruthers, Lenny M, Hansen, Jeffrey C, Koster, Abraham J, & Woodcock, Christopher L. 1998. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(24), 14173–14178.
- Bekinschtein, Pedro, Cammarota, Martín, Katche, Cynthia, Slipczuk, Leandro, Rossato, Janine I, Goldin, Andrea, Izquierdo, Ivan, & Medina, Jorge H. 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(7), 2711–2716.
- Berger, Shelley L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development*, **12**(2), 142–148.
- Borrow, Julian, Stanton, Vincent P, Andresen, J Michael, Becher, Reinhard, Behm, Frederick G, Chaganti, Raju SK, Civin, Curt I, Disteche, Christine, Dubé, Ian, Frischauf, Anna Marie, *et al.* 1996. The translocation t (8; 16)(p11; p13) of acute

- myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nature genetics*, **14**(1), 33–41.
- Brady, Mark E, Ozanne, Daniel M, Gaughan, Luke, Waite, Ian, Cook, Susan, Neal, David E, & Robson, Craig N. 1999. Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(25), 17599–17604.
- Brasacchio, Daniella, Okabe, Jun, Tikellis, Christos, Balcerzyk, Aneta, George, Prince, Baker, Emma K, Calkin, Anna C, Brownlee, Michael, Cooper, Mark E, & El-Osta, Assam. 2009. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. *Diabetes*, **58**(5), 1229–1236.
- Brownell, James E, Zhou, Jianxin, Ranalli, Tamara, Kobayashi, Ryuji, Edmondson, Diane G, Roth, Sharon Y, & Allis, C David. 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, **84**(6), 843–851.
- Bryan, Emma J, Jokubaitis, Venta J, Chamberlain, Narelle L, Baxter, Simon W, Dawson, Elisabeth, Choong, David YH, & Campbell, Ian G. 2002. Mutation analysis of EP300 in colon, breast and ovarian carcinomas. *International journal of cancer*, **102**(2), 137–141.
- Burke, Deborah M, & MacKay, Donald G. 1997. Memory, language, and ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **352**(1363), 1845–1856.
- Bux, Esther Marie, Solis-Mezarino, Victor, Kuhm, Christoph, Northoff, Bernd H, Karin, Ivan, Klopstock, Thomas, Holdt, Lesca M, Völker-Albert, Moritz, Imhof, Axel, & Peleg, Shahaf. 2019. Determining histone H4 acetylation patterns in human peripheral blood mononuclear cells using mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry*.
- Carapeti, Melina, Aguiar, Ricardo CT, Goldman, John M, & Cross, Nicholas CP. 1998. A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia. *Blood*, **91**(9), 3127–3133.
- Cencioni, Chiara, Spallotta, Francesco, Martelli, Fabio, Valente, Sergio, Mai, Antonello, Zeiher, Andreas M, & Gaetano, Carlo. 2013. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *International journal of molecular sciences*, **14**(9), 17643–17663.
- Chalmers, John, & Cooper, Mark E. 2008. UKPDS and the legacy effect. *New England Journal of Medicine*, **359**(15), 1618.
- Champagne, Nathalie, Bertos, Nicholas R, Pelletier, Nadine, Wang, Audrey H, Vezmar, Marko, Yang, Yan, Heng, Henry H, & Yang, Xiang-Jiao. 1999. Identification of a

- human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(40), 28528–28536.
- Champagne, Nathalie, Pelletier, Nadine, & Xiang-Jiao, Yang. 2001. The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase. *Oncogene*, **20**(3), 404.
- Chen, Long, Wei, Tingyi, Si, Xiaoxing, Wang, Qianqian, Li, Yan, Leng, Ye, Deng, Anmei, Chen, Jie, Wang, Guiying, Zhu, Songcheng, *et al.* 2013. Lysine acetyltransferase GCN5 potentiates the growth of non-small cell lung cancer via promotion of E2F1, cyclin D1, and cyclin E1 expression. *Journal of Biological Chemistry*, **288**(20), 14510–14521.
- Chouliaras, Leonidas, LA van den Hove, Daniel, Kenis, Gunter, van Draanen, Michael, R Hof, Patrick, van Os, Jim, WM Steinbusch, Harry, Schmitz, Christoph, & PF Rutten, Bart. 2013. Histone deacetylase 2 in the mouse hippocampus: attenuation of age-related increase by caloric restriction. *Current Alzheimer Research*, **10**(8), 868–876.
- Clapier, Cedric R, & Cairns, Bradley R. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry*, **78**, 273–304.
- Collins, Hilary M, Kindle, Karin B, Matsuda, Sachiko, Ryan, Colm, Troke, Philip JF, Kalkhoven, Eric, & Heery, David M. 2006. MOZ-TIF2 Alters Cofactor Recruitment and Histone Modification at the RAR β 2 Promoter DIFFERENTIAL EFFECTS OF MOZ FUSION PROTEINS ON CBP-AND MOZ-DEPENDENT ACTIVATORS. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(25), 17124–17133.
- Control, Diabetes, Trial, Complications, *et al.* 2005. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*, **2005**(353), 2643–2653.
- Coughlan, Lynda, & Lambe, Teresa. 2015. Measuring cellular immunity to influenza: Methods of detection, applications and challenges. *Vaccines*, **3**(2), 293–319.
- Cutter, Amber R, & Hayes, Jeffrey J. 2015. A brief review of nucleosome structure. *FEBS letters*, **589**(20PartA), 2914–2922.
- Dmitriev, Ruslan I, & Papkovsky, Dmitri B. 2015. In vitro ischemia decreases histone H4K16 acetylation in neural cells. *FEBS letters*, **589**(1), 138–144.
- Donohoe, Dallas R, Collins, Leonard B, Wali, Aminah, Bigler, Rebecca, Sun, Wei, & Bultman, Scott J. 2012. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular cell*, **48**(4), 612–626.
- Dorshkind, Kenneth, Montecino-Rodriguez, Encarnacion, & Signer, Robert AJ. 2009. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nature Reviews Immunology*, **9**(1), 57–62.

- Doyon, Yannick, Selleck, William, Lane, William S, Tan, Song, & Côté, Jacques. 2004. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Molecular and cellular biology*, **24**(5), 1884–1896.
- Doyon, Yannick, Cayrou, Christelle, Ullah, Mukta, Landry, Anne-Julie, Côté, Valérie, Selleck, William, Lane, William S, Tan, Song, Yang, Xiang-Jiao, & Côté, Jacques. 2006. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Molecular cell*, **21**(1), 51–64.
- Emerson, Beverly M. 2002. Specificity of gene regulation. *Cell*, **109**(3), 267–270.
- Eot-Houllier, Grégory, Fulcrand, Géraldine, Magnaghi-Jaulin, Laura, & Jaulin, Christian. 2009. Histone deacetylase inhibitors and genomic instability. *Cancer letters*, **274**(2), 169–176.
- Fang, Yao-Ching, Chan, Lung, Liou, Jing-Ping, Tu, Yong-Kwang, Lai, Mei-Jung, Chen, Chin-I, Vidyanti, Amelia Nur, Lee, Hsueh-Yun, & Hu, Chaur-Jong. 2020. HDAC inhibitor protects chronic cerebral hypoperfusion and oxygen-glucose deprivation injuries via H3K14 and H4K5 acetylation-mediated BDNF expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.
- Feige, Jérôme N, Lagouge, Marie, Canto, Carles, Strehle, Axelle, Houten, Sander M, Milne, Jill C, Lambert, Philip D, Matak, Chikage, Elliott, Peter J, & Auwerx, Johan. 2008. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell metabolism*, **8**(5), 347–358.
- Feller, Christian, Forné, Ignasi, Imhof, Axel, & Becker, Peter B. 2015. Global and specific responses of the histone acetylome to systematic perturbation. *Molecular cell*, **57**(3), 559–571.
- Finley, Lydia WS, Zhang, Ji, Ye, Jiangbin, Ward, Patrick S, & Thompson, Craig B. 2013. SnapShot: cancer metabolism pathways. *Cell metabolism*, **17**(3), 466–466.
- Fischer, Andre, Sananbenesi, Farahnaz, Wang, Xinyu, Dobbin, Matthew, & Tsai, Li-Huei. 2007. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, **447**(7141), 178–182.
- Fischle, Wolfgang, Wang, Yanming, & Allis, C David. 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology*, **15**(2), 172–183.
- for the Diabetes, The Writing Team, Control, of Diabetes Interventions, Complications Trial/Epidemiology, Group, Complications Research, *et al.* 2003. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications

- (EDIC) study. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, **290**(16), 2159.
- Fraga, Mario F, Ballestar, Esteban, Villar-Garea, Ana, Boix-Chornet, Manuel, Espada, Jesus, Schotta, Gunnar, Bonaldi, Tiziana, Haydon, Claire, Roper, Santiago, Petrie, Kevin, *et al.* 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics*, **37**(4), 391–400.
- Francis, Yitshak I, Fà, Mauro, Ashraf, Haider, Zhang, Hong, Staniszewski, Agnieszka, Latchman, David S, & Arancio, Ottavio. 2009. Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, **18**(1), 131–139.
- Frank, Scott R, Parisi, Tiziana, Taubert, Stefan, Fernandez, Paula, Fuchs, Miriam, Chan, Ho-Man, Livingston, David M, & Amati, Bruno. 2003. MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO reports*, **4**(6), 575–580.
- Frasca, Daniela, & Blomberg, Bonnie B. 2016. Inflammaging decreases adaptive and innate immune responses in mice and humans. *Biogerontology*, **17**(1), 7–19.
- Füllgrabe, Jens, Lynch-Day, Melinda A, Heldring, Nina, Li, Wenbo, Struijk, Robert B, Ma, Qi, Hermanson, Ola, Rosenfeld, Michael G, Klionsky, Daniel J, & Joseph, Bertrand. 2013. The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF regulates the outcome of autophagy. *Nature*, **500**(7463), 468–471.
- Gayther, Simon A, Batley, Sarah J, Linger, Lori, Bannister, Andy, Thorpe, Karen, Chin, Suet-Feung, Daigo, Yataro, Russell, Paul, Wilson, Annie, Sowter, Heidi M, *et al.* 2000. Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nature genetics*, **24**(3), 300–303.
- Giordano, Antonio, & Avantaggiati, Maria Laura. 1999. p300 and CBP: partners for life and death. *Journal of cellular physiology*, **181**(2), 218–230.
- Glozak, MA, & Seto, E. 2007. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, **26**(37), 5420–5432.
- Gräff, Johannes, Rei, Damien, Guan, Ji-Song, Wang, Wen-Yuan, Seo, Jinsoo, Hennig, Krista M, Nieland, Thomas JF, Fass, Daniel M, Kao, Patricia F, Kahn, Martin, *et al.* 2012. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*, **483**(7388), 222–226.
- Hansen, Jeffrey C. 2012. Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *The EMBO journal*, **31**(7), 1621–1623.
- Heinzel, Thorsten, Lavinsky, Robert M, Mullen, Tina-Marie, Soderstrom, Mats, *et al.* 1997. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, **387**(6628), 43.

- Heitz, E. 1928. Das heterochromatin der moose. I Jahrb wiss Bot 69: 762–818. *Find this article online.*
- Henikoff, Steven. 2000. Heterochromatin function in complex genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **1470**(1), O1–O8.
- Holtzman, David M, Morris, John C, & Goate, Alison M. 2011. Alzheimers disease: the challenge of the second century. *Science translational medicine*, **3**(77), 77sr1–77sr1.
- Horowitz, RA, Agard, DA, Sedat, JW, & Woodcock, CL. 1994. The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *The Journal of cell biology*, **125**(1), 1–10.
- Horsthemke, B. 2006. Epimutations in human disease. *Pages 45–59 of: DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer.* Springer.
- Hottiger, Michael O. 2011. ADP-ribosylation of histones by ARTD1: An additional module of the histone code? *FEBS letters*, **585**(11), 1595–1599.
- Howe, LeAnn, Auston, Darryl, Grant, Patrick, John, Sam, Cook, Richard G, Workman, Jerry L, & Pillus, Lorraine. 2001. Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Genes & development*, **15**(23), 3144–3154.
- Huang, Eric J, & Reichardt, Louis F. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*, **24**(1), 677–736.
- Huntly, Brian JP, Shigematsu, Hirokazu, Deguchi, Kenji, Lee, Benjamin H, Mizuno, Shinichi, Duclos, Nicky, Rowan, Rebecca, Amaral, Sonia, Curley, David, Williams, Ifor R, *et al.* 2004. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer cell*, **6**(6), 587–596.
- Iizuka, Masayoshi, & Stillman, Bruce. 1999. Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(33), 23027–23034.
- Iizuka, Masayoshi, Matsui, Tomoko, Takisawa, Haruhiko, & Smith, M Mitchell. 2006. Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Molecular and cellular biology*, **26**(3), 1098–1108.
- Ikura, Tsuyoshi, Ogryzko, Vasily V, Grigoriev, Mikhail, Groisman, Regina, Wang, Jin, Horikoshi, Masami, Scully, Ralph, Qin, Jun, & Nakatani, Yoshihiro. 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, **102**(4), 463–473.
- Kapoor-Vazirani, Priya, Kagey, Jacob D, & Vertino, Paula M. 2011. SUV420H2-mediated H4K20 trimethylation enforces RNA polymerase II promoter-proximal

- pausing by blocking hMOF-dependent H4K16 acetylation. *Molecular and cellular biology*, **31**(8), 1594.
- Kegel, Bernhard. 2013. *Epigenetik: wie Erfahrungen vererbt werden*. Dumont Buchverlag.
- Kilgore, Mark, Miller, Courtney A, Fass, Daniel M, Hennig, Krista M, Haggarty, Stephen J, Sweatt, J David, & Rumbaugh, Gavin. 2010. Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, **35**(4), 870–880.
- Kim, Hyeon Ju, Rowe, Michael, Ren, Ming, Hong, Jau-Shyong, Chen, Po-See, & Chuang, De-Maw. 2007. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **321**(3), 892–901.
- Kitabayashi, I, Aikawa, Y, Yokoyama, A, Hosoda, F, Nagai, M, Kakazu, N, Abe, T, & Ohki, M. 2001a. Fusion of MOZ and p300 histone acetyltransferases in acute monocytic leukemia with at (8; 22)(p11; q13) chromosome translocation. *Leukemia (08876924)*, **15**(1).
- Kitabayashi, Issay, Aikawa, Yukiko, Nguyen, Lan Anh, Yokoyama, Akihiko, & Ohki, Misao. 2001b. Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ–CBP fusion protein. *The EMBO journal*, **20**(24), 7184–7196.
- Kline, Kimberly A, & Bowdish, Dawn ME. 2016. Infection in an aging population. *Current opinion in microbiology*, **29**, 63–67.
- Kouskouti, Antigone, & Talianidis, Iannis. 2005. Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *The EMBO journal*, **24**(2), 347–357.
- Krebs, Jocelyn E, Fry, Christopher J, Samuels, Michael L, & Peterson, Craig L. 2000. Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell*, **102**(5), 587–598.
- Krishnan, Vaidehi, Chow, Maggie Zi Ying, Wang, Zimei, Zhang, Le, Liu, Baohua, Liu, Xinguang, & Zhou, Zhongjun. 2011. Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(30), 12325–12330.
- Li, Wei, Nagaraja, Sandhya, Delcuve, Genevieve P, Hendzel, Michael J, & Davie, James R. 1993. Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochemical Journal*, **296**(3), 737–744.

- Li, Xiangzhi, Corsa, Callie Ann Sprunger, Pan, Patricia W, Wu, Lipeng, Ferguson, David, Yu, Xiaochun, Min, Jinrong, & Dou, Yali. 2010. MOF and H4 K16 acetylation play important roles in DNA damage repair by modulating recruitment of DNA damage repair protein Mdc1. *Molecular and cellular biology*, **30**(22), 5335–5347.
- Ling, Charlotte, & Groop, Leif. 2009. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes*, **58**(12), 2718–2725.
- López-Otín, Carlos, Blasco, Maria A, Partridge, Linda, Serrano, Manuel, & Kroemer, Guido. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, **153**(6), 1194–1217.
- Lorch, Yahli, & Kornberg, Roger D. 1994. Isolation of the yeast histone octamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**(23), 11032–11034.
- Love, Seth, & Miners, J Scott. 2016. Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, **131**(5), 645–658.
- Luger, Karolin, Mäder, Armin W, Richmond, Robin K, Sargent, David F, & Richmond, Timothy J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**(6648), 251–260.
- Maleszewska, Monika, Mawer, Julia SP, & Tessarz, Peter. 2016. Histone modifications in ageing and lifespan regulation. *Current Molecular Biology Reports*, **2**(1), 26–35.
- Martínez-Balbás, Marian A, Bauer, Uta-Maria, Nielsen, Søren J, Brehm, Alexander, & Kouzarides, Tony. 2000. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *The EMBO journal*, **19**(4), 662–671.
- Mastroeni, Diego, Grover, Andrew, Delvaux, Elaine, Whiteside, Charisse, Coleman, Paul D, & Rogers, Joseph. 2011. Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, **32**(7), 1161–1180.
- Messner, Simon, & Hottiger, Michael O. 2011. Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in cell biology*, **21**(9), 534–542.
- Metzger, Eric, & Schüle, Roland. 2007. The expanding world of histone lysine demethylases. *Nature structural & molecular biology*, **14**(4), 252–254.
- Miao, Feng, Smith, David D, Zhang, Lingxiao, Min, Andrew, Feng, Wei, & Natarajan, Rama. 2008. Lymphocytes from patients with type 1 diabetes display a distinct profile of chromatin histone H3 lysine 9 dimethylation. *Diabetes*, **57**(12), 3189–3198.
- Miao, Feng, Chen, Zhuo, Genuth, Saul, Paterson, AD, Zhang, Lingxiao, Wu, Xiwei, Li, Sierra Min, Cleary, Patricia, Riggs, AD, Harlan, David M, *et al.* 2014. Evaluating the role of epigenetic histone modifications in the metabolic memory of type 1 diabetes. *Diabetes*, DB_131251.
- Mißfeldt, Martin. www.blutwerte.net.

- Miyamoto, Naoya, Izumi, Hiroto, Noguchi, Takako, Nakajima, Yoshihiro, Ohmiya, Yoshihiro, Shiota, Masaki, Kidani, Akihiko, Tawara, Akihiko, & Kohno, Kimitoshi. 2008. Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(26), 18218–18226.
- Mulligan, Peter, Yang, Fajun, Di Stefano, Luisa, Ji, Jun-Yuan, Ouyang, Jian, Nishikawa, Joy L, Toiber, Debra, Kulkarni, Madhura, Wang, Qun, Najafi-Shoushtari, S Hani, *et al.* 2011. A SIRT1-LSD1 corepressor complex regulates Notch target gene expression and development. *Molecular cell*, **42**(5), 689–699.
- Narayan, Pritika J, Lill, Claire, Faull, Richard, Curtis, Maurice A, & Dragunow, Mike. 2015. Increased acetyl and total histone levels in post-mortem Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of disease*, **74**, 281–294.
- Narlikar, Geeta J, Fan, Hua-Ying, & Kingston, Robert E. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, **108**(4), 475–487.
- Neuhoff, Volker, Arold, Norbert, Taube, Dieter, & Ehrhardt, Wolfgang. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**(6), 255–262.
- Noh, Hyunjin, Oh, Eun Young, Seo, Ji Yeon, Yu, Mi Ra, Kim, Young Ok, Ha, Hunjoo, & Lee, Hi Bahl. 2009. Histone deacetylase-2 is a key regulator of diabetes-and transforming growth factor- β 1-induced renal injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **297**(3), F729–F739.
- NP-DE-VX-WCNT-200061. <https://www.impfen.de/impfungen/guertelrose-herpes-zoster/>.
- Oey, H, & Whitelaw, E. 2014. On the meaning of the word epimutation. *Trends in Genetics*, **30**(12), 519–520.
- Ogryzko, Vasily V, Schiltz, R Louis, Russanova, Valya, Howard, Bruce H, & Nakatani, Yoshihiro. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**(5), 953–959.
- Olins, Ada L, & Olins, Donald E. 1974. Spheroid chromatin units (ν bodies). *Science*, **183**(4122), 330–332.
- Orpinell, Meritxell, Fournier, Marjorie, Riss, Anne, Nagy, Zita, Krebs, Arnaud R, Frontini, Mattia, & Tora, László. 2010. The ATAC acetyl transferase complex controls mitotic progression by targeting non-histone substrates. *The EMBO journal*, **29**(14), 2381–2394.
- Özdağ, Hilal, Teschendorff, Andrew E, Ahmed, Ahmed Ashour, Hyland, Sarah J, Blenkinsron, Cherie, Bobrow, Linda, Veerakumarasivam, Abhi, Burt, Glynn, Subkhankulova,

- Tanya, Arends, Mark J, *et al.* 2006. Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC genomics*, **7**(1), 1–15.
- Panagopoulos, Ioannis, Fioretos, Thoas, Isaksson, Margareth, Samuelsson, Ulf, Billström, Rolf, Strömbeck, Bodil, Mitelman, Felix, & Johansson, Bertil. 2001. Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t (10; 16)(q22; p13). *Human Molecular Genetics*, **10**(4), 395–404.
- Park, C Sehwan, Rehrauer, Hubert, & Mansuy, Isabelle M. 2013. Genome-wide analysis of H4K5 acetylation associated with fear memory in mice. *BMC genomics*, **14**(1), 1–19.
- Peleg, Shahaf, Sananbenesi, Farahnaz, Zovoilis, Athanasios, Burkhardt, Susanne, Bahari-Javan, Sanaz, Agis-Balboa, Roberto Carlos, Cota, Perla, Wittnam, Jessica Lee, Gogol-Doering, Andreas, Opitz, Lennart, *et al.* 2010. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science*, **328**(5979), 753–756.
- Peleg, Shahaf, Feller, Christian, Forne, Ignasi, Schiller, Evelyn, Sévin, Daniel C, Schauer, Tamas, Regnard, Catherine, Straub, Tobias, Prestel, Matthias, Klima, Caroline, *et al.* 2016a. Life span extension by targeting a link between metabolism and histone acetylation in *Drosophila*. *EMBO reports*, **17**(3), 455–469.
- Peleg, Shahaf, Feller, Christian, Ladurner, Andreas G, & Imhof, Axel. 2016b. The metabolic impact on histone acetylation and transcription in ageing. *Trends in biochemical sciences*, **41**(8), 700–711.
- Pelletier, Nadine, Champagne, Nathalie, Stifani, Stefano, & Xiang-Jiao, Yang. 2002. MOZ and MORF histone acetyltransferases interact with the Runt-domain transcription factor Runx2. *Oncogene*, **21**(17), 2729.
- Perez-Campo, Flor M, Costa, Guilherme, Lie-a Ling, Michael, Kouskoff, Valerie, & Lacaud, Georges. 2013. The MYSTERIOUS MOZ, a histone acetyltransferase with a key role in haematopoiesis. *Immunology*, **139**(2), 161–165.
- Phillips, DMP. 1963. The presence of acetyl groups in histones. *Biochemical Journal*, **87**(2), 258.
- Pinti, Marcello, Appay, Victor, Campisi, Judith, Frasca, Daniela, Fülöp, Tamas, Sauce, Delphine, Larbi, Anis, Weinberger, Birgit, & Cossarizza, Andrea. 2016. Aging of the immune system: focus on inflammation and vaccination. *European journal of immunology*, **46**(10), 2286–2301.
- Plagg, Barbara, Ehrlich, Daniela, M Kniewallner, Kathrin, Marksteiner, Josef, & Humpel, Christian. 2015. Increased acetylation of histone H4 at lysine 12 (H4K12) in monocytes

- of transgenic Alzheimers mice and in human patients. *Current Alzheimer Research*, **12**(8), 752–760.
- Rao, JS, Keleshian, VL, Klein, S, & Rapoport, SI. 2012. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Translational psychiatry*, **2**(7), e132.
- Razin, Aharon, & Riggs, Arthur D. 1980. DNA methylation and gene function. *Science*, **210**(4470), 604–610.
- Richmond, TJ, Finch, JT, Rushton, B, Rhodes, D, & Klug, A. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*, **311**, 532–537.
- Ricobaraza, Ana, Cuadrado-Tejedor, Mar, Pérez-Mediavilla, Alberto, Frechilla, Diana, Del Río, Joaquin, & García-Osta, Ana. 2009. Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology*, **34**(7), 1721–1732.
- Robinson, Philip JJ, Fairall, Louise, Huynh, Van AT, & Rhodes, Daniela. 2006. EM measurements define the dimensions of the 30-nm chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(17), 6506–6511.
- Romero Starke, Karla, Petereit-Haack, Gabriela, Schubert, Melanie, Kämpf, Daniel, Schliebner, Alexandra, Hegewald, Janice, & Seidler, Andreas. 2020. The age-related risk of severe outcomes due to COVID-19 Infection: a rapid review, meta-analysis, and meta-regression. *International journal of environmental research and public health*, **17**(16), 5974.
- Rothbart, Scott B, Lin, Shu, Britton, Laura-Mae, Krajewski, Krzysztof, Keogh, Michael C, Garcia, Benjamin A, & Strahl, Brian D. 2012. Poly-acetylated chromatin signatures are preferred epitopes for site-specific histone H4 acetyl antibodies. *Scientific reports*, **2**, 489.
- Rothbart, Scott B, Dickson, Bradley M, Raab, Jesse R, Grzybowski, Adrian T, Krajewski, Krzysztof, Guo, Angela H, Shanle, Erin K, Josefowicz, Steven Z, Fuchs, Stephen M, Allis, C David, *et al.* 2015. An interactive database for the assessment of histone antibody specificity. *Molecular cell*, **59**(3), 502–511.
- Rousseaux, Sophie, & Khochbin, Saadi. 2015. Histone acylation beyond acetylation: terra incognita in chromatin biology. *Cell Journal (Yakhteh)*, **17**(1), 1.
- Ruijter, Annemieke JM de, GENNIP, Albert H van, Caron, Huib N, Kemp, Stephan, & KUILENBURG, André BP van. 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*, **370**(3), 737–749.

- Rumbaugh, Gavin, Sullivan, Stephanie E, Ozkan, Emin D, Rojas, Camilo S, Hubbs, Christopher R, Aceti, Massimiliano, Kilgore, Mark, Kudugunti, Shashi, Puthanveetil, Sathyanarayanan V, Sweatt, J David, *et al.* 2015. Pharmacological selectivity within class I histone deacetylases predicts effects on synaptic function and memory rescue. *Neuropsychopharmacology*, **40**(10), 2307–2316.
- Saxena, Richa, Voight, Benjamin F, Lyssenko, Valeriya, Burt, Noël P, de Bakker, Paul IW, Chen, Hong, Roix, Jeffrey J, Kathiresan, Sekar, Hirschhorn, Joel N, Daly, Mark J, *et al.* 2007. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*, **316**(5829), 1331–1336.
- Schalch, Thomas, Duda, Sylwia, Sargent, David F, & Richmond, Timothy J. 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, **436**(7047), 138–141.
- Schwer, Bjoern, & Verdin, Eric. 2008. Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell metabolism*, **7**(2), 104–112.
- Scott, Laura J, Mohlke, Karen L, Bonnycastle, Lori L, Willer, Cristen J, Li, Yun, Duren, William L, Erdos, Michael R, Stringham, Heather M, Chines, Peter S, Jackson, Anne U, *et al.* 2007. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *science*, **316**(5829), 1341–1345.
- Shiseki, Masayuki, Nagashima, Makoto, Pedeux, Remy M, Kitahama-Shiseki, Mariko, Miura, Koh, Okamura, Shu, Onogi, Hitoshi, Higashimoto, Yuichiro, Appella, Ettore, Yokota, Jun, *et al.* 2003. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer research*, **63**(10), 2373–2378.
- Shogren-Knaak, Michael, Ishii, Haruhiko, Sun, Jian-Min, Pazin, Michael J, Davie, James R, & Peterson, Craig L. 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, **311**(5762), 844–847.
- Sierra, Jose, Yoshida, Tomonori, Joazeiro, Claudio A, & Jones, Katherine A. 2006. The APC tumor suppressor counteracts β -catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes & development*, **20**(5), 586–600.
- Singh, Padmanabh, & Thakur, Mahendra K. 2014. Reduced recognition memory is correlated with decrease in DNA methyltransferase1 and increase in histone deacetylase2 protein expression in old male mice. *Biogerontology*, **15**(4), 339–346.
- Sladek, Robert, Rocheleau, Ghislain, Rung, Johan, Dina, Christian, Shen, Lishuang, Serre, David, Boutin, Philippe, Vincent, Daniel, Belisle, Alexandre, Hadjadj, Samy, *et al.* 2007. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, **445**(7130), 881–885.

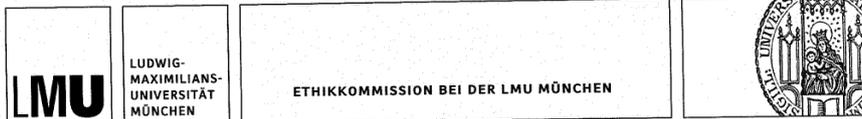
- Smith, AJH, Staden, R, & Young, IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**(5806), 457–465.
- Smith, Christine M, Gafken, Philip R, Zhang, Zhongli, Gottschling, Daniel E, Smith, Jean B, & Smith, David L. 2003. Mass spectrometric quantification of acetylation at specific lysines within the amino-terminal tail of histone H4. *Analytical biochemistry*, **316**(1), 23–33.
- Spork, Peter. 2010. *Der zweite Code: Epigenetik oder wie wir unser Erbgut steuern können*. Rowohlt Verlag GmbH.
- Spotswood, Hugh T, & Turner, Bryan M. 2002. An increasingly complex code. *The Journal of clinical investigation*, **110**(5), 577–582.
- Sterner, David E, & Berger, Shelley L. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**(2), 435–459.
- Subbanna, Shivakumar, Nagre, Nagaraja N, Umapathy, Nagavedi S, Pace, Betty S, & Basavarajappa, Balapal S. 2015. Ethanol exposure induces neonatal neurodegeneration by enhancing CB1R Exon1 histone H4K8 acetylation and up-regulating CB1R function causing neurobehavioral abnormalities in adult mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, **18**(5).
- Sugita, Kenichi, Taki, Tomohiko, Hayashi, Yasuhide, Shimaoka, Hagane, Kumazaki, Hisami, Inoue, Hirokazu, Konno, Yukihiko, Taniwaki, Masafumi, Kurosawa, Hide-mitsu, & Eguchi, Mitsuoki. 2000. MLL-CBP fusion transcript in a therapy-related acute myeloid leukemia with the t (11; 16)(q23; p13) which developed in an acute lymphoblastic leukemia patient with Fanconi anemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **27**(3), 264–269.
- Suzuki, Takeshi, Shen, Haifa, Akagi, Keiko, Morse, Herbert C, Malley, James D, Naiman, Daniel Q, Jenkins, Nancy A, & Copeland, Neal G. 2002. New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nature genetics*, **32**(1), 166–174.
- Taipale, Mikko, Rea, Stephen, Richter, Karsten, Vilar, Ana, Lichter, Peter, Imhof, Axel, & Akhtar, Asifa. 2005. hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, **25**(15), 6798.
- Taki, Tomohiko, Sako, Masahiro, Tsuchida, Masahiro, & Hayashi, Yasuhide. 1997. The t (11; 16)(q23; p13) translocation in myelodysplastic syndrome fuses the MLL gene to the CBP gene. *Blood*, **89**(11), 3945–3950.
- Tateishi, Keisuke, Okada, Yuki, Kallin, Eric M, & Zhang, Yi. 2009. Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. *Nature*, **458**(7239), 757–761.

- Taubert, Stefan, Gorrini, Chiara, Frank, Scott R, Parisi, Tiziana, Fuchs, Miriam, Chan, Ho-Man, Livingston, David M, & Amati, Bruno. 2004. E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Molecular and cellular biology*, **24**(10), 4546–4556.
- Taunton, Jack, Hassig, Christian A, & Schreiber, Stuart L. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, **272**(5260), 408.
- Timmermann, S, Lehrmann, H, Poleskaya, A, & Harel-Bellan, A. 2001. Histone acetylation and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**(5), 728–736.
- Tost, Jörg. 2008. *Epigenetics*. Horizon Scientific Press.
- Tremethick, David J. 2007. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell*, **128**(4), 651–654.
- Trojer, Patrick, & Reinberg, Danny. 2006. Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics. *Cell*, **125**(2), 213–217.
- Vander Heiden, Matthew G, Cantley, Lewis C, & Thompson, Craig B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, **324**(5930), 1029–1033.
- Wang, Feng, Zhang, Ruixue, Wu, Xiaomeng, & Hankinson, Oliver. 2010. Roles of coactivators in hypoxic induction of the erythropoietin gene. *PLoS One*, **5**(4), e10002.
- Wellen, Kathryn E, Hatzivassiliou, Georgia, Sachdeva, Uma M, Bui, Thi V, Cross, Justin R, & Thompson, Craig B. 2009. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*, **324**(5930), 1076–1080.
- West, Alison C, Johnstone, Ricky W, *et al.* 2014. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *The Journal of clinical investigation*, **124**(1), 30–39.
- Wilson, Andrew J, Cheng, Yi-Qiang, & Khabele, Dineo. 2012. Thailandepsins are new small molecule class I HDAC inhibitors with potent cytotoxic activity in ovarian cancer cells: a preclinical study of epigenetic ovarian cancer therapy. *Journal of ovarian research*, **5**(1), 1–7.
- Wright, Diana G, Marchal, Claire, Hoang, Kimson, Ankney, John A, Nguyen, Stephanie T, Rushing, Amanda W, Polakowski, Nicholas, Miotto, Benoit, & Lemasson, Isabelle. 2016. Human T-cell leukemia virus type-1-encoded protein HBZ represses p53 function by inhibiting the acetyltransferase activity of p300/CBP and HBO1. *Oncotarget*, **7**(2), 1687.
- Yang, Xiang-Jiao, Ogryzko, Vasily V, Nishikawa, Jun-ichi, Howard, Bruce H, & Nakatani, Yoshihiro. 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**(6589), 319.

- Yin, Yan-Wei, Jin, Hong-Jian, Zhao, Wenjing, Gao, Beixue, Fang, Jianga, Wei, Junmin, Zhang, Donna D, Zhang, Jianing, & Fang, Deyu. 2015. The histone acetyltransferase GCN5 expression is elevated and regulated by c-Myc and E2F1 transcription factors in human colon cancer. *Gene expression*, **16**(4), 187–196.
- Zhang, Kangling, Schrag, Matthew, Crofton, Andrew, Trivedi, Rishi, Vinters, Harry, & Kirsch, Wolff. 2012. Targeted proteomics for quantification of histone acetylation in Alzheimer's disease. *Proteomics*, **12**(8), 1261–1268.
- Zhang, Runyun, Jin, Jianhua, Shi, Juanjuan, & Hou, Yongzhong. 2016. ING5 are potential drug targets for cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1–9.
- Zhang, Zhi-Yuan, & Schliesener, Hermann J. 2013. Oral administration of histone deacetylase inhibitor MS-275 ameliorates neuroinflammation and cerebral amyloidosis and improves behavior in a mouse model. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **72**(3), 178–185.
- Zhong, Qing, & Kowluru, Renu A. 2010. Role of histone acetylation in the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory phenomenon. *Journal of cellular biochemistry*, **110**(6), 1306–1313.
- Zwernemann, O. *Massenspektrometrie I - Strukturaufklärung von Biomolekülen (Institut für Organische Chemie - Universität Karlsruhe)*.
-

Kapitel 8

8 Anhang - Zustimmung der Ethikkommission



Ethikkommission - Pettenkoferstr. 8 - 80336 München

Herrn
 Prof. Dr. Th. Klopstock
 Friedrich-Baur-Institut an der
 Neurologischen Klinik und Poliklinik
 Ziemssenstr. 1a
 80336 München

Vorsitzender:
 Prof. Dr. W. Eisenmenger
 Telefon+49 (0)89 5160 - 5191
 Telefax+49 (0)89 5160 - 5192
 Ethikkommission@
 med.uni-muenchen.de

www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Postanschrift:
 Pettenkoferstr. 8a
 D-80336 München

Hausanschrift:
 Pettenkoferstr. 8
 D-80336 München
 München, 07.10.2013 Hb /ck

Titel:	Histone acetylation signature and metabolic alterations in human white blood cells in aging
Antragssteller:	Prof. Dr. T. Klopstock, Dr. Imhof
Projekt-Nr:	399-13

Sehr geehrter Herr Professor Dr. Klopstock,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 07.10.2013 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den überarbeiteten Unterlagen (geänderte Versionen von: Antragsformular Nicht-AMG/ Nicht-MPG-Studien; Prüfplan; Probandeninformation und Einwilligungserklärung).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen


 Prof. Dr. W. Eisenmenger
 Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:
 Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender)
 PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Münch, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zach