

Altersabhängige Level von 5-Methyl-, 5-Hydroxymethyl- und 5-Formylcytosin in Hirngewebe des Menschen und der Maus**

Mirko Wagner, Jessica Steinbacher, Theo F. J. Kraus, Stylianos Michalakis, Benjamin Hackner, Toni Pfaffeneder, Arshan Perera, Markus Müller, Armin Giese, Hans A. Kretzschmar[†] und Thomas Carell*

Abstract: Die absoluten Level von 5-Hydroxymethyl- (hmC) und 5-Methylcytosin (mC) in humanen Hirngeweben wurden in Abhängigkeit vom Lebensalter bestimmt. Zusätzlich wurden die absoluten 5-Formylcytosin-Level (fC) in adulten Individuen und die Level dieser modifizierten Cytosinbasen in menschlichen Neuronen quantifiziert. Wir vergleichen diese Daten mit den altersabhängigen Mengen von fC, hmC und mC in Hirngewebe der Maus. Bei hmC wird mit zunehmendem Alter zunächst ein Anstieg der Modifikationsdichte beobachtet. Im voll entwickelten Gehirn steigt das hmC-Level nicht weiter an, sondern bleibt auf einem konstant hohen Niveau von ca. 1.2 % beim Menschen. Dieser Wert ist etwa doppelt so hoch wie das hmC-Level im zerebralen Cortex der adulten Maus. Im Unterschied dazu sinkt das fC-Level in den frühen Entwicklungsstadien mit zunehmendem Alter stark ab. Bei hmC könnte es sich dementsprechend um eine stabile epigenetische Modifikation handeln, während fC in den frühen Gehirnentwicklungsphasen vermutlich eher als Intermediat der aktiven DNA-Demethylierung auftritt.

Vor kurzem wurde entdeckt, dass die DNA von Säugetieren außer den kanonischen Watson- und Crick-Basen und 5-Methylcytosin auch die Cytosinmodifikationen 5-Hydroxymethylcytosin,^[1] 5-Formylcytosin^[2] und 5-Carboxycytosin^[2b,3] enthält. Die biologische Rolle dieser neu entdeckten Basen wird derzeit intensiv untersucht. Eine genaue Kenntnis des Vorkommens und der Verteilung der Basen in den Organen und Geweben ist für diese Untersuchungen von großem Vorteil. Besonders hohe Level der Base hmC treten in den Hirngeweben der Maus auf.^[1,4] So hat man z. B. in der DNA, die aus dem zerebralen Cortex der Maus isoliert wurde, ein hmC-Level von bis zu 0.8 % gefunden,^[4,5] bezogen auf die Gesamtheit aller Cytosinbasen. Es wurde außerdem von

mehreren Gruppen ein Anstieg des hmC-Levels während der postnatalen Entwicklung der Maus beobachtet.^[4,6] Diese Befunde führen direkt zu der Frage, wie sich die hmC- und fC-Level im Laufe des Lebens in menschlichen Geweben verändern, da aufbauend auf diesem Wissen ein besseres Verständnis der biologischen Rolle der neu entdeckten Basen möglich ist.^[7] Bis jetzt gibt es jedoch nur wenige Daten zum Vorkommen dieser Cytosinmodifikationen in menschlichen Geweben. Wir haben deshalb in dieser Studie die absoluten Level der Cytosinmodifikationen in menschlichen Hirngeweben im fetalen Stadium und zu verschiedenen postnatalen Zeitpunkten bestimmt. Wir vergleichen diese Daten mit bereits von uns publizierten Daten zum Vorkommen dieser Basen in adulten Individuen.^[8] Die Quantifizierung der Basen erfolgte mithilfe unserer bereits beschriebenen, LC-MS-basierten Isotopenverdünnungsmethode, bei der von uns synthetisierte, stabil isotopenmarkierte mC-, hmC- und fC-Nukleoside als interne Standards verwendet werden (Abbildung 1).^[5c,8,9]

Die menschlichen Hirngewebe von Individuen unterschiedlichen Alters wurden uns von der BrainBank Munich zur Verfügung gestellt. Es wurden Gewebe von einem fünf-

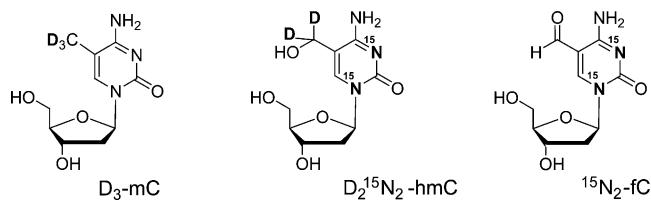


Abbildung 1. Isotopenmarkierte mC-, hmC- und fC-Nukleoside, die von uns bei der Massenspektrometrie-basierten Quantifizierung als interne Standards verwendet wurden (D- und ¹⁵N-Atome sind fett gedruckt).

[*] Dipl.-Chem. M. Wagner,^[+] M. Sc. J. Steinbacher,^[+] Dr. B. Hackner, Dr. T. Pfaffeneder, Dr. M. Müller, Prof. Dr. T. Carell
Center for Integrated Protein Science am Department Chemie Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5-13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: Thomas.Carell@lmu.de

Dr. T. F. J. Kraus,^[+] Prof. Dr. A. Giese, Prof. Dr. H. A. Kretzschmar
Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP)
Ludwig-Maximilians-Universität München (Deutschland)
Priv.-Doz. Dr. S. Michalakis, M. Sc. A. Perera
Center for Integrated Protein Science am Department Pharmazie –
Center for Drug Research
Ludwig-Maximilians-Universität München (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
[†] verstorben

[**] Wir danken der DFG für die finanzielle Unterstützung durch das SFB-Programm (SFBs 749 und 1032). Weitere Unterstützung erfolgte durch den Exzellenzcluster Center for Integrated Protein Science, CiPS^M. T.P. dankt dem FCI für ein Promotionsstipendium.

█ Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502722> zu finden.

© 2015 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

zehn Wochen alten Fetus (15. SSW) und von vier Individuen im Alter zwischen 0.6 und 88 Jahren untersucht. Dabei wurde jeweils die DNA der grauen (zerebraler Cortex) und weißen Substanz des Großhirns (Cerebrum) isoliert und separat analysiert. Die dabei erhaltenen Daten wurden mit bereits von uns publizierten Daten von vier Individuen im Alter von 61 (zwei Personen), 84 und 85 Jahren zusammengefasst.^[8] Daneben konnte von den 22 und 85 Jahre alten Individuen auch DNA aus dem Kleinhirn (Cerebellum) gewonnen werden, auch hier wiederum separat von grauer und weißer Substanz. Da in früheren Arbeiten gezeigt worden war, dass das Kleinhirn der Maus etwa 40% weniger hmC als das Großhirn enthält,^[4] schien uns ein entsprechender Vergleich in menschlichen Geweben wünschenswert. Die Befunde unserer Quantifizierungen bezüglich der absoluten, globalen Level der Base hmC in menschlichen Hirngeweben^[10] sind in Abbildung 2 dargestellt.

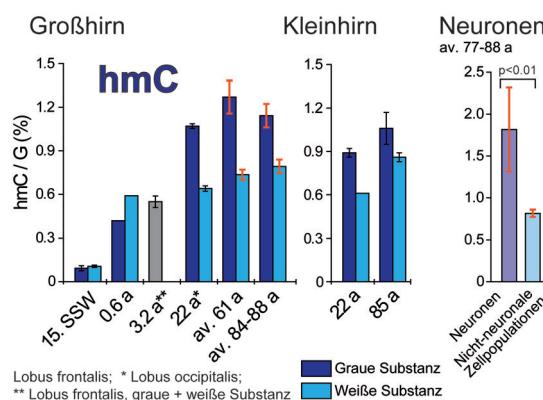


Abbildung 2. hmC-Level im menschlichen Groß- und Kleinhirn sowie in Hirnzellpopulationen in Abhängigkeit vom Alter. Die Daten zu den Proben 61a (zwei Individuen), 84a und 85a stammen aus einer Studie von Kraus et al.^[8] Alle Werte sind als Modifikationen pro hundert Guaninbasen angegeben. Guanin (G) wurde als Referenz gewählt, weil die Zahl der Guaninbasen der Summe aus Cytosin (C) und den Cytosinderivaten mC, hmC und fC entspricht. Im Groß- und Kleinhirn wurden graue und weiße Substanz jeweils separat analysiert. Gewebeproben des zerebralen okzipitalen Cortex von fünf Menschen im Alter zwischen 77 und 88 Jahren wurden in neuronale und nicht-neuronale Zellkerne sortiert, die anschließend separat analysiert wurden. Schwarze Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei bis vier technischen Replikaten, während die roten, dicken Fehlerbalken die Standardabweichung von zwei bis vier biologischen Replikaten angeben (die Anzahl der Replikate war jeweils von der Probenmenge abhängig). Wegen der geringen Probenmenge konnte im Falle des 0.6 Jahre alten Individuums nur eine Messung durchgeführt werden. Für statistische Analysen wurde Students ungepaarter, zweiseitiger t-Test verwendet. SSW = Schwangerschaftswoche, a = anno (Jahr), av. = average (Durchschnitt).

Unsere Daten zeigen, dass das hmC-Level in grauer und weißer Substanz des menschlichen Großhirns mit zunehmendem Alter stark ansteigt: Das Großhirn eines 15 Wochen alten Fetus enthält sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz nur 0.1% hmC. Dagegen findet man im voll entwickelten menschlichen Großhirn in der grauen Substanz, die reich an neuronalen Zellkörpern ist, ein konstantes hmC-Level von 1.2%.^[8] Dieses Level ist beinahe doppelt so hoch

wie im zerebralen Cortex der adulten Maus.^[4] In der weißen Substanz adulter menschlicher Individuen, die hauptsächlich von Gliazellen umgebene myelinisierte Axone enthält, findet man nur 0.75% hmC.^[8] Dies ist immer noch höher als in den meisten Hirngeweben der Maus.^[4] Daneben steigt das hmC-Level in der weißen Substanz des menschlichen Großhirns schon ab einem Alter von ungefähr einem Jahr nicht weiter an. In der grauen Substanz endet der Anstieg des hmC-Levels dagegen erst im Alter von etwa 22 Jahren. Weiterhin enthält die weiße Substanz zunächst mehr hmC als die graue Substanz; dieses Verhältnis kehrt sich jedoch im Laufe der Adoleszenz um. Ähnlich wie im Großhirn findet man auch im Kleinhirn einen altersabhängigen Anstieg des hmC-Levels, allerdings bei niedrigeren absoluten Werten. Unsere Befunde passen sehr gut zu Beobachtungen, die von anderen Gruppen^[6] und von uns^[4] in Mäusegeweben gemacht worden sind.

Wir haben uns gefragt, ob die unterschiedlichen hmC-Level in grauer und weißer Substanz des menschlichen Hirns möglicherweise durch einen großen Unterschied im hmC-Gehalt von Neuronen und Gliazellen erklärt werden können. Um diese Frage zu beantworten, wurden Gewebeproben aus dem zerebralen okzipitalen Cortex von fünf Individuen im Alter von 77 bis 88 Jahren in neuronale und nicht-neuronale Zellkerne sortiert. Anschließend wurden die Cytosinmodifikationen in beiden Zellkernpopulationen separat quantifiziert. Tatsächlich ergab dieses Experiment, dass das hmC-Level in Neuronen deutlich höher als in den nicht-neuronalen Hirnzellen ist (1.82% gegenüber 0.82%; Abbildung 2).^[10d]

Um unsere hmC-Daten in Relation zur DNA-Cytosinmethylierung zu setzen, wurden im menschlichen Groß- und Kleinhirn auch die mC-Level während früher Entwicklungsstadien und der Adoleszenz quantifiziert.^[6a, 10b-f, 11] Auch in diesem Fall wurden graue und weiße Substanz jeweils separat analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen, einschließlich bereits publizierter Daten von vier älteren Individuen,^[8] sind in Abbildung 3 dargestellt.

In der weißen Substanz des Großhirns ist fast keine altersabhängige Änderung des mC-Levels zu beobachten. Hier findet man während der gesamten menschlichen Lebensspanne ein mC-Level von ungefähr 4.3%. Eine leichte al-

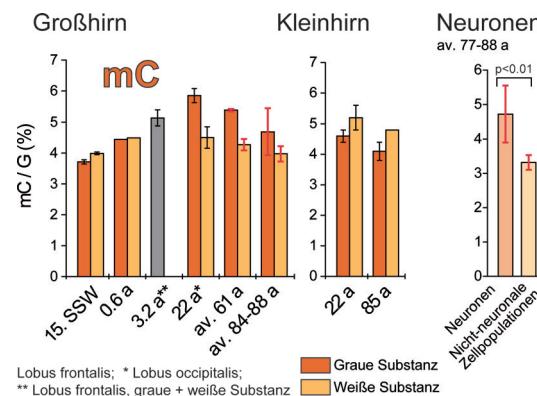


Abbildung 3. mC-Level im menschlichen Groß- und Kleinhirn sowie in Hirnzellpopulationen in Abhängigkeit vom Alter. Die Daten zu den Proben 61a (zwei Individuen), 84a und 85a stammen aus einer Studie von Kraus et al.^[8] Weitere Details siehe Legende von Abbildung 2.

tersabhängige Änderung des mC-Levels tritt dagegen in der grauen Substanz auf. Hier ist die Dichte an neuronalen Zellkörpern besonders hoch, und man beobachtet einen Anstieg des mC-Levels von 4.4% (0.6a) bis zu einem Maximum von fast 6% im Alter von 22 Jahren. Unsere Beobachtungen stimmen sehr gut mit den Befunden einer Studie von Lister et al. überein, in der De-novo-Methylierungen im Frontallappen des Menschen und der Maus gemessen wurden.^[6a]

Im Kleinhirn konnte von uns keine Altersabhängigkeit des mC-Levels festgestellt werden. Bei der Quantifizierung von Cytosinmodifikationen in sortierten Hirnzellpopulationen wurde in Neuronen ein höheres mC-Level als in der nicht-neuronalen Zellpopulation detektiert (siehe Abbildung 3 und Hintergrundinformationen).^[6a,10d,11a] Insgesamt zeigen unsere Daten, dass die globalen mC-Level im Menschen nur leicht mit dem Alter variieren.

Als nächstes untersuchten wir das Vorkommen der Base fC^[2a] in menschlichen Hirngeweben. Es wird vermutet, dass diese Base^[2b] in die aktive DNA-Demethylierung^[1b,2,3,5a,12] involviert ist. Wegen der begrenzten Verfügbarkeit menschlicher Gewebeproben und der Tatsache, dass für eine Detektion der geringen fC-Level^[5c] mehr Probenmaterial erforderlich ist, konnten die fC-Level nur für die 61 (Probe 61*) und 85 Jahre alten Individuen ermittelt werden (Abbildung 4).

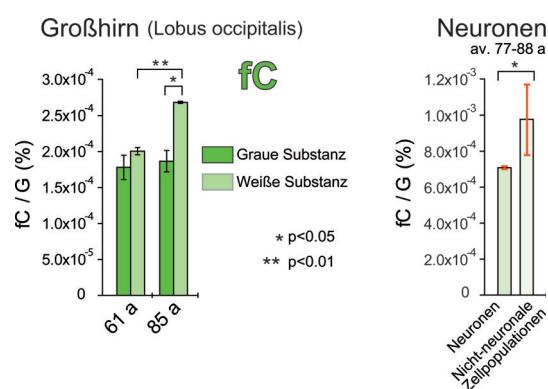


Abbildung 4. Globale fC-Level im Großhirn zweier erwachsener Menschen und in Hirnzellpopulationen. Weitere Details siehe Legende von Abbildung 2.

Die fC-Level im adulten menschlichen Großhirn liegen etwa bei $2-3 \times 10^{-4}\%$ fC/G; dies entspricht $4-8 \times 10^{-7}$ fC-Modifikationen pro Nukleosid (N). In der grauen Substanz ist das fC-Level bei beiden untersuchten Individuen gleich hoch. Dagegen unterscheidet sich der fC-Gehalt der weißen Substanz. Hier findet man bei der 85 Jahre alten Person in der weißen Substanz mehr fC als in der grauen Substanz, während bei der 61-jährigen Person in beiden Geweben in etwa gleichviel fC enthalten ist. In Übereinstimmung damit ergab die Analyse von sortierten Hirnzellen, dass die nicht-neuronale Zellpopulation mit $9.8 \times 10^{-5}\%$ mehr fC als die Neuronen enthält, in denen man ein fC-Level von nur $7.1 \times 10^{-5}\%$ findet (siehe Abbildung 4 und Hintergrundinformationen). Interessanterweise ist das fC-Level im adulten menschlichen

Großhirn genauso hoch wie im Großhirn der adulten Maus (siehe auch Abbildung 5).^[5c] Ein Vergleich der in dieser Studie bestimmten fC- und hmC-Level mit zuvor publizierten Daten über die Level dieser Basen in embryonalen Stammzellen und den Organen der Maus drei Monate nach der Geburt (p90) findet sich in den Abbildungen S1 und S2 der Hintergrundinformationen.

Um die altersabhängigen Änderungen der Cytosinmodifikationen fC, hmC und mC im Säugetiergehirn weiter studieren zu können und um die begrenzte Verfügbarkeit von menschlichen Gewebeproben zu umgehen, weiteten wir unsere Untersuchungen auf Mäusegewebe aus. Quantifiziert wurden die Level von fC, hmC^[4,6,13] und mC^[6a,g,11c] im Großhirn (zerebraler Cortex) von jungen Mäusen im Alter von einem Tag und von 14 Tagen. Außerdem wurden adulte Tiere im Alter von 90 Tagen, 12 Monaten und 18 Monaten untersucht. Die Ergebnisse unserer Analysen sind in Abbildung 5 zusammengefasst. Außer dem erwarteten Anstieg des hmC-Levels mit zunehmendem Alter beobachteten wir überraschenderweise auch einen starken Rückgang des fC-Levels während der frühen Entwicklungsstadien der Maus.^[9b] Da die Base fC durch Tet-vermittelte Oxidation aus hmC gebildet wird,^[2b] passt die Abnahme des fC-Levels während der postnatalen Gehirnentwicklung eigentlich nicht zum gleichzeitigen Anstieg des hmC-Levels. Eine mögliche Erklärung für diese unerwartete Beobachtung ist, dass fC im Gehirn hauptsächlich als Intermediat der aktiven DNA-Demethy-

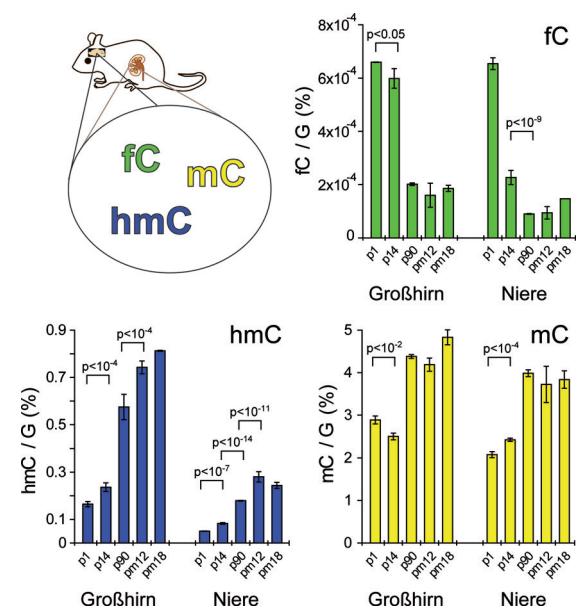


Abbildung 5. Globale fC-, hmC- und mC-Level im Großhirn (zerebraler Cortex) und in der Niere der Maus am ersten (p1) und vierzehnten Tag (p14) nach der Geburt sowie von adulten Tieren im Alter von 90 Tagen (p90), zwölf Monaten (pm12) und achtzehn Monaten (pm18). Alle Werte sind als Modifikationen pro hundert Guaninbasen angegeben. Guanin (G) wurde als Referenz gewählt, weil die Zahl der Guaninbasen der Summe aus Cytosin (C) und den Cytosinderivaten mC, hmC und fC entspricht. Die analysierten Proben wurden Wildtyp-Mäusen (C57-BL6) entnommen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei (p1) oder drei (p14-pm18) biologischen Replikaten. Für statistische Analysen wurde Students ungepaarter, zweitseitiger t-Test verwendet. pm = postnataler Monat.

lierung^[1b,2,3,5a,12] auftritt und dass die DNA-Demethylierungsprozesse im Gehirn mit zunehmendem Alter weniger häufig stattfinden. Die höheren fC-Level während der ersten Lebenstage und -wochen lassen darauf schließen, dass die Oxidation von hmC zu fC^[2b] deren weitere Folge eine aktive Demethylierung der Base sein kann,^[2,3,5a,12d,e] zu dieser Zeit besonders schnell oder häufig erfolgt. Mit zunehmendem Alter nimmt möglicherweise die Geschwindigkeit dieser bisher wenig verstandenen Prozesse ab, was zum beobachteten Anstieg des hmC-Levels führen würde.

Die im Großhirn gefundenen altersabhängigen Trends von fC und hmC wurden von uns auch in der Niere der Maus beobachtet, von der man weiß, dass sie ein mittleres hmC-Level aufweist.^[5a] Auch hier findet man bei jungen Tieren ein niedriges hmC-Level, während das fC-Level gleichzeitig besonders hoch ist. Während das hmC-Level dann mit zunehmendem Alter ansteigt, nimmt das fC-Level im gleichen Zeitraum auch in der Niere stark ab. Diese Beobachtungen stimmen gut mit der Idee überein, dass eine Abnahme von aktiven DNA-Demethylierungsprozessen mit zunehmendem Alter eine der Ursachen für die hmC-Akkumulation im Laufe des Lebens ist.

Bezüglich der Base mC beobachtet man im Großhirn (zerebraler Cortex) der Maus ein annähernd konstantes Level zwischen p1 und p14. Danach steigt das mC-Level bei der Maus deutlich stärker an als beim Menschen.

Insgesamt präsentieren wir hier die ersten Daten über die Änderungen der globalen hmC-Level des Menschen während der gesamten Lebensspanne. Nach einem starken Anstieg im Laufe der Kindheit und Adoleszenz beobachtet man im voll entwickelten Gehirn ein konstantes hmC-Level von 1.2%.^[8] Dieser Wert ist fast doppelt so hoch wie der hmC-Gehalt im zerebralen Cortex der adulten Maus.^[4] Weiterhin wurden die Base fC in menschlichen Hirngeweben und alle Cytosinmodifikationen in den Neuronen des zerebralen okzipitalen Cortex des Menschen quantifiziert. Außerdem präsentieren wir in dieser Studie die altersabhängigen Änderungen der fC-, hmC- und mC-Level in Mäusegeweben zwischen der Geburt und einem Alter von achtzehn Monaten. Unsere Messungen zeigen, dass das fC-Level nach der Geburt und während der darauffolgenden frühen Entwicklungsstadien stark abnimmt. Dagegen beobachtet man bei hmC einen genau entgegengesetzten Trend; hier steigt das Level im gleichen Zeitraum stark an. Unsere Befunde stützen die Idee, dass die Base fC im sich entwickelnden Gehirn hauptsächlich im Zusammenhang mit der aktiven DNA-Demethylierung^[2,3,5a,12d,e] auftritt, während hmC hier eher als stabile epigenetische Modifikation vorkommt.^[14] Die von uns beobachteten Dynamiken der Cytosinmodifikations-Level über die gesamte Lebensspanne eines Organismus hinweg^[15] sind zwischen den Säugetierarten evolutionär konserviert^[16] und weisen ähnliche Trends in unterschiedlichen Organen auf.^[4,6,9b,10a,b,e,11,16,17]

Stichwörter: 5-Formylcytosin · 5-Hydroxymethylcytosin · Alterung · Epigenetik · Zerebraler Cortex

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12511–12514
Angew. Chem. **2015**, *127*, 12691–12695

- [1] a) S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929–930; b) M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, *324*, 930–935.
- [2] a) T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, M. Münzel, M. Müller, C. A. Deiml, C. Hagemeier, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7008–7012; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7146–7150; b) S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300–1303.
- [3] Y. F. He, B. Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C. X. Song, K. Zhang, C. He, G. L. Xu, *Science* **2011**, *333*, 1303–1307.
- [4] M. Münzel, D. Globisch, T. Brückl, M. Wagner, V. Welzmiller, S. Michalakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5375–5377; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5503–5505.
- [5] a) D. Globisch, M. Münzel, M. Müller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Brückl, M. Biel, T. Carell, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15367; b) A. Szwagierczak, S. Bultmann, C. S. Schmidt, F. Spada, H. Leonhardt, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e181; c) T. Pfaffeneder, F. Spada, M. Wagner, C. Brandmayr, S. K. Laube, D. Eisen, M. Truss, J. Steinbacher, B. Hackner, O. Kotljarova, D. Schürmann, S. Michalakis, O. Kosmatchev, S. Schiesser, B. Steigenberger, N. Raddaoui, G. Kashiwazaki, U. Müller, C. G. Spruijt, M. Vermeulen, H. Leonhardt, P. Schär, M. Müller, T. Carell, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 574–581.
- [6] a) R. Lister, E. A. Mukamel, J. R. Nery, M. Urich, C. A. Puddifoot, N. D. Johnson, J. Lucero, Y. Huang, A. J. Dwork, M. D. Schultz, M. Yu, J. Toni-Filippini, H. Heyn, S. Hu, J. C. Wu, A. Rao, M. Esteller, C. He, F. G. Haghghi, T. J. Sejnowski, M. M. Behrens, J. R. Ecker, *Science* **2013**, *341*, 1237905; b) C.-X. Song, K. E. Szulwach, Y. Fu, Q. Dai, C. Yi, X. Li, Y. Li, C.-H. Chen, W. Zhang, X. Jian, J. Wang, L. Zhang, T. J. Looney, B. Zhang, L. A. Godley, L. M. Hicks, B. T. Lahn, P. Jin, C. He, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 68–72; c) K. E. Szulwach, X. Li, Y. Li, C.-X. Song, H. Wu, Q. Dai, H. Irier, A. K. Upadhyay, M. Gearing, A. I. Levey, A. Vasanthakumar, L. A. Godley, Q. Chang, X. Cheng, C. He, P. Jin, *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 1607–1616; d) L. Chouliaras, D. L. A. van den Hove, G. Kenis, S. Keitel, P. R. Hof, J. van Os, H. W. M. Steinbusch, C. Schmitz, B. P. F. Rutten, *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9*, 536–544; e) H. Chen, S. Dzitoyeva, H. Manev, *Restor. Neurol. Neurosci.* **2012**, *30*, 237–245; f) M. A. Hahn, R. Qiu, X. Wu, A. X. Li, H. Zhang, J. Wang, J. Jui, S. G. Jin, Y. Jiang, G. P. Pfeifer, Q. Lu, *Cell Rep.* **2013**, *3*, 291–300.
- [7] a) W. Sun, L. Zang, Q. Shu, X. Li, *Genomics* **2014**, *104*, 347–351; b) M. Santiago, C. Antunes, M. Guedes, N. Sousa, C. J. Marques, *Genomics* **2014**, *104*, 334–340; c) L. Wen, F. Tang, *Genomics* **2014**, *104*, 341–346; d) D. L. A. van den Hove, L. Chouliaras, B. P. F. Rutten, *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9*, 545–549.
- [8] T. F. J. Kraus, D. Globisch, M. Wagner, S. Eigenbrod, D. Widmann, M. Münzel, M. Müller, T. Pfaffeneder, B. Hackner, W. Feiden, U. Schüller, T. Carell, H. A. Kretzschmar, *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 1577–1590.
- [9] a) S. Schiesser, T. Pfaffeneder, K. Sadeghian, B. Hackner, B. Steigenberger, A. S. Schröder, J. Steinbacher, G. Kashiwazaki, G. Hofner, K. T. Wanner, C. Ochsenfeld, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14593–14599; b) A. Perera, D. Eisen, M. Wagner, S. K. Laube, A. F. Künnel, S. Koch, J. Steinbacher, E. Schulze, V. Splith, N. Mittermeier, M. Müller, M. Biel, T. Carell, S. Michalakis, *Cell Rep.* **2015**, *11*, 283–294.
- [10] a) T. Wang, Q. Pan, L. Lin, K. E. Szulwach, C.-X. Song, C. He, H. Wu, S. T. Warren, P. Jin, R. Duan, X. Li, *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 5500–5510; b) L. Wen, X. Li, L. Yan, Y. Tan, R. Li, Y. Zhao, Y. Wang, J. Xie, Y. Zhang, C. Song, M. Yu, X. Liu, P. Zhu, X. Li, Y. Hou, H. Guo, X. Wu, C. He, R. Li, F. Tang, J. Qiao, *Genome Biol.* **2014**, *15*, R49; c) S.-G. Jin, X. Wu, A. X. Li, G. P. Pfeifer, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 5015–5024; d) N. Coppelters, B. V.

- Dieriks, C. Lill, R. L. Faull, M. A. Curtis, M. Dragunow, *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 1334–1344; e) T. F. Kraus, V. Guibourt, H. A. Kretzschmar, *J. Neural Transm.* **2014**, DOI: 10.1007/s00702-00014-01346-00704; f) S. F. Field, D. Beraldi, M. Bachman, S. K. Stewart, S. Beck, S. Balasubramanian, *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0118202.
- [11] a) K. D. Siegmund, C. M. Connor, M. Campan, T. I. Long, D. J. Weisenberger, D. Biniszkiewicz, R. Jaenisch, P. W. Laird, S. Akbarian, *PLoS ONE* **2007**, *2*, e895; b) D. G. Hernandez, M. A. Nalls, J. R. Gibbs, S. Arepalli, M. van der Brug, S. Chong, M. Moore, D. L. Longo, M. R. Cookson, B. J. Traynor, A. B. Singleton, *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 1164–1172; c) L. Chouliaras, D. L. A. van den Hove, G. Kenis, S. Keitel, P. R. Hof, J. van Os, H. W. M. Steinbusch, C. Schmitz, B. P. F. Rutten, *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 1672–1681.
- [12] a) S. C. Wu, Y. Zhang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 607–620; b) S. Ito, A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers, Y. Zhang, *Nature* **2010**, *466*, 1129–1133; c) J. Guo, Y. Su, C. Zhong, G. Ming, H. Song, *Cell* **2011**, *145*, 423–434; d) A. Maiti, A. C. Drahat, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35334–35338; e) S. Cortellino, J. Xu, M. Sannai, R. Moore, E. Caretti, A. Cigliano, M. Le Coz, K. Devarajan, A. Wessels, D. Soprano, L. K. Abramowitz, M. S. Bartolomei, F. Rambow, M. R. Bassi, T. Bruno, M. Fanciulli, C. Renner, A. J. Klein-Szanto, Y. Matsumoto, D. Kobi, I. Davidson, C. Alberti, L. Larue, A. Bellacosa, *Cell* **2011**, *146*, 67–79.
- [13] S. Dzitoyeva, H. Chen, H. Manev, *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 2881–2891.
- [14] a) M. Bachman, S. Uribe-Lewis, X. Yang, M. Williams, A. Murrell, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 1049–1055; b) M. A. Hahn, P. E. Szabo, G. P. Pfeifer, *Genomics* **2014**, *104*, 314–323.
- [15] R. D. Almeida, V. Sottile, M. Loose, P. A. De Sousa, A. D. Johnson, A. Ruzov, *Epigenetics* **2012**, *7*, 137–140.
- [16] T. Zheng, Q. Lv, X. Lei, X. Yin, B. Zhang, *Neurochem. Res.* **2015**, *40*, 688–697.
- [17] S. A. Tamm, G. G. Dolnikowski, L. M. Ausman, Z. Liu, K.-c. Kim, S. Friso, S.-W. Choi, *J. Cancer Prev.* **2014**, *19*, 301–308.

Eingegangen am 24. März 2015,
veränderte Fassung am 13. Mai 2015
Online veröffentlicht am 3. Juli 2015