

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Regulation von Prozessen der DNA-Methylierung durch synthetisches
Stresshormon und Antidepressiva in Zellen des zentralen Nervensystems**

Stephanie Nicole Zimmermann
aus

Erlangen

2011

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Herrn Prof. F. Holsboer betreut und von Herrn Prof. H. Zorbass von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,

.....

(Unterschrift des Autors / der Autorin)

Dissertation eingereicht am 17. November 2011

1. Gutachter: Prof. F. Holsboer

2. Gutachter: Prof. H. Zorbass

Mündliche Prüfung am 26. März 2011

Publikationen

Teile dieser Doktorarbeit sind Inhalt eines Patentantrages, der gerade bearbeitet wird. Nach Einreichung des Patentantrages ist folgendes, bereits fertiggestelltes Manuskript zur Veröffentlichung vorgesehen:

Zimmermann N, Zschocke J, Perisic T, Yu S, Holsboer F, Rein T. Mechanistic aspects

Veröffentlichungen, die im Laufe der Doktorarbeit entstanden sind:

Laenger A, Lang-Rollin I, Kozany C, Zschocke J, **Zimmermann N**, Rüegg J, Holsboer F, Hausch F, Rein T (2009) XAP2 inhibits glucocorticoid receptor activity in mammalian cells. *FEBS Lett* 583:1493-1498.

Perisic T, **Zimmermann N**, Kirmeier T, Asmus M, Tuorto F, Uhr M, Holsboer F, Rein T, Zschocke J (2010) Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary astrocytes. *Neuropsychopharmacology* 35:792-805.

Schmidt MV, Schülke J-P, Liebl C, Stuess M, Avrabos C, Bock J, Wochnik GM, Davies HA, **Zimmermann N**, Scharf SH, Trümbach D, Wurst W, Zieglgänsberger W, Turck C, Holsboer F, Stewart MG, Bradke F, Eder M, Müller MB, Rein T (2011). Tumor suppressor down-regulated in renal cell carcinoma 1 (DRR1) is a stress-induced actin bundling factor that modulates synaptic efficacy and cognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108(41):17213-17218.

Zschocke J, **Zimmermann N**, Berning B, Ganai V, Holsboer F, Rein T (2011) Antidepressant drugs diversely affect autophagy pathways in astrocytes and neurons--dissociation from cholesterol homeostasis. *Neuropsychopharmacology* 36:1754-1768.

Danksagung

Ich möchte mich zunächst sehr herzlich bei Herrn **Prof. Florian Holsboer** dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat in einem sehr interessanten wissenschaftlichen Umfeld meine Doktorarbeit anzufertigen. Des Weiteren möchte ich ihm für das Interesse an meiner Arbeit und wissenschaftliche Diskussionen danken.

Herrn **Prof. Haralabos Zorbos** danke ich sehr herzlich für die Fachvertretung dieser Doktorarbeit an der Fakultät der Chemie und Pharmazie der LMU.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Theo Rein** und Herrn **Dr. Jürgen Zschocke** für die außerordentlich gute Betreuung dieser Arbeit, die fachliche und persönliche Unterstützung und die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit und zu meiner Ausbildung beigetragen haben.

Bei **Dr. Shuang Yu** und **Dr. Osborne Almeida** möchte ich mich für wissenschaftliche Diskussionen und für die Bereitstellung primärer neuraler Stammzellen bedanken. Ich danke Herrn **Dr. Benno Pütz** sehr herzlich für die Hilfe bei der Auswertung der Daten des MeDIP-Arrays. Herrn **Prof. Chris Turck**, **Dr. Giuseppina Maccarrone** und **Christiane Rewerts** möchte herzlich für Massenspektrometrie-Analysen danken. **Kathrin Hafner**, **Anna Werner** und **Barbara Berning** danke ich sehr für den steten Einsatz für unser Labor. Kathrin Hafner danke ich außerdem für ihre Hilfe bei diversen Experimenten. **Tatjana Perisic** danke ich sehr herzlich für wissenschaftliche Diskussionen und die Durchführung der LUMA-Experimente.

An alle schon erwähnten Mitglieder der AG Rein sowie an die restlichen gegenwärtigen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe, **Nils**, **Vanessa**, **Thomas**, **Jan**, **Regina**, **Andrea**, **Lorenz**, **Lisa**, **Isabelle** und **Anja** möchte ich einen besonders herzlichen Dank für die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche und das hervorragende Arbeitsklima aussprechen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Inhalt

1	Einleitung	12
1.1	Die molekularen Grundlagen der Stressantwort.....	12
1.1.1	Die HPA-Achse.....	12
1.1.2	Funktionsweise der Glukokortikoide und ihrer Rezeptoren	13
1.2	Epigenetik.....	14
1.2.1	Der Aufbau des Chromatins.....	14
1.2.2	Histonmodifikationen	15
1.2.3	DNA-Methylierung	16
1.2.4	Chromatin-modifizierende Enzyme	18
1.2.5	Epigenetik im adulten Nervensystem.....	22
1.3	Zielsetzung.....	26
2	Material	28
2.1	Chemikalien und Lösungen	28
2.2	Enzyme	30
2.3	Marker	31
2.4	Kits und gebrauchsfertige Materialien	31
2.5	Antikörper.....	32
2.6	Oligonukleotide.....	33
2.7	Verbrauchsmaterial	35
2.8	Geräte	35
2.9	Software	36
3	Methoden.....	37
3.1	Zellbiologische Methoden	37
3.1.1	Kultivierung primärer Zellen	37
3.1.2	Beschichten von Plastikplatten und Deckgläschen für die Primärzellkultur.....	37
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl	38
3.1.4	Messung des Zellüberlebens	40
3.1.5	Immunfluoreszenzfärbungen.....	41
3.1.6	PI/FACS-Analyse.....	42
3.2	Protein-Analytik	42
3.2.1	Herstellung von Proteinextrakten	42
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	44

3.2.3	Dialyse	44
3.2.4	Ö ^ ~ ã c æ c ã [î] % Á u l e ã . c . Á . s . Ó . ã . [. Á . Û .] . ã . } . Á	45
3.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.2.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot.....	46
3.2.7	Messung der enzymatischen Aktivität von DNA-Methyltransferasen.....	47
3.3	DNA- und RNA-Analytik	48
3.3.1	Aufreinigung genomischer DNA.....	48
3.3.2	Aufreinigung von DNA mit Glasmilch	48
3.3.3	Aufreinigung von biotinylierten Oligonukleotiden mit Streptavidin-gekoppelten <i>Beads</i>	49
3.3.4	Aufreinigung von RNA	50
3.3.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	51
3.3.6	Agarosegelelektrophorese	51
3.3.7	Enzymatische Spaltung von DNA	52
3.3.8	Sonifizierung von DNA.....	52
3.3.9	Herstellung von doppelsträngigen hemi- und unmethylierten Oligonukleotiden.....	53
3.3.10	Standard-PCR	53
3.3.11	Reverse Transkription	53
3.3.12	Relative Quantifizierung von DNA und cDNA mittels Real-Time PCR.....	54
3.3.13	Analyse der DNA-Methylierung.....	56
3.3.14	Amplifizierung des gesamten Genoms unter Verwendung des WGA2-Kits	58
3.4	Auswertungen und statistische Tests	58
3.4.1	Western-Blots.....	58
3.4.2	DNMT-Aktivitätsmessungen	59
3.4.3	MeDIP-Array.....	59
4	Ergebnisse	60
4.1	Einfluss des Stresshormons Dexamethason auf das Methylom primärer Astrozyten	60
4.1.1	Zellmodell und Behandlungszeitraum	60
4.1.2	Etablierung der MeDIP-Methode	63
4.1.3	Herstellung der DNA-Proben	68
4.1.4	Validierung der Arraydaten	71
4.1.5	Kandidatengene	75
4.2	Mechanistische Aspekte der Regulation von DNMT1 durch Antidepressiva	81

4.2.1	Einfluss von psychoaktiven Substanzen auf die DNMT-Aktivität	81
4.2.2	Eigenschaften der DNMT-Inhibition	82
4.2.3	Bestimmung des auf Antidepressiva reagierenden DNMT-Subtyps	85
4.2.4	Mechanistische Aspekte der DNMT1-Inhibition.....	87
5	Diskussion.....	95
5.1	Methylierungsprofil von primären Astrozyten nach Behandlung mit einem Stresshormon	95
5.2	DNMT-Inhibition durch Antidepressiva.....	99
6	Zusammenfassung	104
7	Literaturverzeichnis.....	106
8	Abkürzungsverzeichnis	119
9	Tabellenverzeichnis.....	123
10	Abbildungsverzeichnis	124
11	Anhang	126

1 Einleitung

Die Depression gehört mit einer Lebenszeitprävalenz von 10% zu den weltweit häufigsten Krankheiten. Sie ist durch verschiedene Symptome, wie Antriebshemmung, Anhedonie, Minderwertigkeitsgefühle, Schlafstörungen, Appetitlosigkeit, kognitive Defizite und Suizidgedanken charakterisiert (Laux u. a., 2008). Die pathophysiologischen Grundlagen der Depression sind bis heute ungeklärt. Es gibt jedoch verschiedene Theorien, die bestimmte Teilaspekte der Erkrankung erfassen. Eine der anerkanntesten Theorien ist die Monoamin-Hypothese. Sie bildet die Grundlage für den vermuteten Wirkmechanismus heutiger Antidepressiva. Es wird angenommen, dass diese im Wesentlichen über eine Erhöhung der Monoaminkonzentration im synaptischen Spalt wirken und somit einer verminderten Signaltransduktion durch Monoamine entgegensteuern (Feighner, 1999). Weitere Theorien besagen, dass der Depression eine gestörte synaptische Plastizität, eine Hyperaktivität der Stressachse und eine veränderte Immunfunktion zugrunde liegen (Krishnan und Nestler, 2008). In den letzten Jahren wurde auch der Einfluss von epigenetischen Prozessen an der Entstehung und Manifestation der Depression diskutiert. Da epigenetische Prozesse ein wichtiges Bindeglied zwischen Umweltreizen und Genexpression darstellen, werden sie als vielversprechender Kandidat für eine Erkrankung angesehen, welche bei einem großen Anteil der Patienten durch belastende Umwelteinflüsse, insbesondere übermäßigen Stress, begünstigt wird (Mill und Petronis, 2007).

1.1 Die molekularen Grundlagen der Stressantwort

1.1.1 Die HPA-Achse

Als Stress bezeichnet man einen Zustand körperlicher oder mentaler Anspannung, der von Faktoren ausgelöst wird, welche die physiologische Homöostase beeinflussen. Das Erleben von stressreichen Lebenssituationen in Form von psychologischen Belastungen ist ein wesentlicher Risikofaktor der depressiven Störung (Kendler u. a., 1999).

Die Stressantwort wird durch ein fein abgestimmtes, hormonell gesteuertes Regulationssystem vermittelt, welche den Hypothalamus, die Hypophyse und die Nebennierenrinde umfasst und daher auch als hypothalamo-hypophysäre-adrenokortikale- (*hypothalamic-pituitary-adrenal*) oder HPA-Achse bezeichnet wird. Auf molekularer Ebene werden bei Stresssituationen sensorische Informationen in Gehirnstrukturen des limbischen Systems, wie dem präfrontalen Kortex, der Amygdala

und dem Hippokampus, verarbeitet. Dies führt zur Synthese und Sezernierung des Kortikoliberins (*Corticotropin-releasing hormone*, CRH) und des Vasopressins aus parvozellulären Neuronen des hypothalamischen Nucleus Paraventricularis. Diese Hormone bewirken die Ausschüttung des adrenocorticotropinen Hormons (ACTH) aus endokrinen Zellen der Hypophyse. ACTH gelangt über die Blutbahn zur Nebennierenrinde. Dort wird die Synthese und Freisetzung von den zur Klasse der Steroidhormone gehörenden Glukokortikoiden (hauptsächlich Kortisol beim Menschen und Kortikosteron bei der Maus) veranlasst. Die Glukokortikoide induzieren im Organismus eine Reihe von Anpassungsprozessen. Beispielsweise begünstigen sie den Glykogenabbau und die Lipolyse und fördern somit die Energiebereitstellung. Zudem schränken sie durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Aktivität der HPA-Achse ein, indem sie die Sezernierung von CRH und ACTH und dadurch ihre eigene Freisetzung verringern (Rey u. a., 2008). Bei depressiven Patienten werden häufig dauerhaft erhöhte Konzentrationen des Glukokortikoids Kortisol im Blut festgestellt. Dieser Hyperkortisolismus basiert oft auf einer erhöhten Aktivität der HPA-Achse (de Kloet u. a., 2005).

1.1.2 Funktionsweise der Glukokortikoide und ihrer Rezeptoren

Die Signale der Glukokortikoide werden durch zwei Typen von Kortikosteroidrezeptoren vermittelt, dem Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) und dem Glukokortikoid-Rezeptor (GR). Beide Rezeptoren gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren und sind Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren (Mangelsdorf u. a., 1995). Die Funktionen der Glukokortikoide werden zum Teil durch gewebespezifische Expressionsunterschiede von GR und MR reguliert (de Kloet u. a., 1993). Zudem besitzt der MR eine höhere Bindungsaffinität für Glukokortikoide als der GR, wodurch im basalen Zustand hauptsächlich der MR und erst unter Stressbedingungen der GR aktiviert wird (Rupprecht u. a., 1993). Der GR wird deshalb als wichtiger Mediator der Stressantwort betrachtet.

Nach Hormonbindung werden die Rezeptoren in den Zellkern transportiert. Dort binden sie an positive oder negative GREs (*GR response elements*) und rekrutieren Coaktivator- bzw. Corepressorkomplexe. An negative GREs binden die Rezeptoren zumeist als Monomere, wohingegen die Bindung an positive GREs in der Regel die Dimerisierung der Rezeptoren voraussetzt (Schoneveld u. a., 2004). Je nach Zusammensetzung der Dimerkomplexe (GR-GR / MR-MR / GR-MR) wird die Transkriptionsrate des Zielgens unterschiedlich beeinflusst.

Zusammenfassend führt Stress zu einer Aktivierung der HPA-Achse, wodurch es zur Ausschüttung von Glukokortikoiden aus der Nebenniere kommt. Die Glukokortikoide binden durch Liganden gesteuerte Transkriptionsfaktoren und passen so die Genexpression an die Stresssituation an.

1.2 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik wurde in den 1940er Jahren von Conrad Waddington geprägt und ist aus dem Wort Genetik und Epigenese zusammengesetzt (Bonasio u. a., 2010). Letztere bezeichnet die Theorie, dass sich das erwachsene Lebewesen in einem stufenweisen Prozess aus dem Embryo entwickelt. Dies setzt Mechanismen voraus, welche es einem Genotyp ermöglichen, während seiner Entwicklung verschiedene Phänotypen zu erzeugen. Heute weiß man, dass ähnliche Mechanismen ein Lebewesen befähigen, verschiedene Phänotypen als Antwort auf Umweltreize hervorzubringen. Eine neuere Definition der Epigenetik wurde daher 2007 von Adrian Bird aufgestellt. Er beschreibt epigenetische Prozesse als strukturelle Anpassung chromosomaler Regionen, die dazu dienen veränderte Aktivitätszustände zu registrieren, anzuzeigen oder aufrechtzuerhalten (Bird, 2007).

1.2.1 Der Aufbau des Chromatins

Eukaryotische Zellen besitzen die Möglichkeit, den Zugang zur genetischen Information (DNA) durch Kondensation des Chromatins zu kontrollieren. Als Chromatin bezeichnet man den Komplex aus DNA, Histonen und nicht-Histon-Proteinen. Ungefähr 147 bp DNA sind im Zellkern um ein Histonoktamer aus jeweils zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gewunden. Die Histonoktamere sind durch *Linker*-DNA miteinander verbunden. Die Einheit aus Histonoktamer und DNA wird als Nukleosom bezeichnet. Unter physiologischen Bedingungen falten sich die Nukleosomen zu sekundären und tertiären Strukturen höherer Ordnung (Li und Reinberg, 2011). Die Stabilität dieser Strukturen beruht im Wesentlichen auf der Interaktion einzelner *Linker*-Histone (typischerweise H1 oder H5) mit dem Nukleosom und der *Linker*-DNA. Sowohl durch die Assoziation der DNA mit Histonen als auch durch die höhere Chromatinstruktur wird den für die Transkription notwendigen Faktoren der Zugang zur DNA erschwert (Liu u. a., 2011; Szerlong und Hansen, 2011). Die Folge ist ein repressiver Effekt auf die Genexpression. Sogenannte *Chromatin Remodeling*-Komplexe erhöhen die Zugänglichkeit der DNA, indem sie in durch ATP getriebenen Prozessen die Bindung von Histonen an DNA schwächen, Nukleosomen mobilisieren oder die höhere Ordnung der Chromatinstruktur verändern (Liu u. a., 2011). Des Weiteren können Histonmodifikationen sowie

Histonvarianten über elektrostatische Wechselwirkungen zu einer Dekondensierung der Chromatinstruktur führen. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Chromatinstruktur indirekt, indem sie *Chromatin Remodeling*-Komplexe oder Histon-modifizierende Enzyme rekrutieren oder deren Bindung verhindern. Zu diesen Faktoren gehören die DNA-Methylierung, Histonmodifikationen, diverse mit der DNA assoziierte Proteine und nicht-codierende RNAs (Bird, 2007).

Zusammenfassend versteht man unter epigenetischen Prozessen Mechanismen, welche die Packungsdichte der DNA steuern und dadurch Einfluss auf die Transkription nehmen.

1.2.2 Histonmodifikationen

Histone besitzen am N-Terminus basische Seitenketten, die aus dem Nukleosom herausragen und Kontakte mit Nachbarnukleosomen und DNA eingehen. Die N-terminalen Seitenketten können mit unterschiedlichen chemischen Gruppen versehen werden. Diese Modifikationen nehmen Einfluss auf die inter-nukleosomalen Wechselwirkungen und/oder die elektrostatische Interaktion zwischen Histonen und DNA. Beispielsweise können Modifikationen, die eine negative Ladung mitbringen, die Anziehung zwischen Histon und DNA schwächen und so die Chromatinstruktur lockern. Zu diesen Modifikationen gehören die Acetylierung, die Phosphorylierung und die ADP-Ribosylierung (Bannister und Kouzarides, 2011). Die Histon-Acetylierung kommt an den -Aminogruppen konservierter Lysine des N-Terminus von Kernhistonen, beispielsweise dem Lysin 9 und 14 des Histons H3 und dem Lysin 5, 8, 12 und 16 des Histons H4 vor (de Ruijter u. a., 2003). Die Acetylgruppen werden von Histonacetyltransferasen (HAT) auf die Seitenketten übertragen und von Histondeacetylasen (HDAC) entfernt. Histonmodifikationen können nicht nur selbst Einfluss auf die Chromatinstruktur nehmen, sie können diese auch indirekt durch die Rekrutierung von *Chromatin Remodeling*-Komplexen verändern (Bannister und Kouzarides, 2011). Die Histonmethylierung fungiert beispielsweise als Bindungsstelle für Effektorproteine. Sie wird von Histonmethyltransferasen (HMT) katalysiert und tritt an Lysinen und Argininen in der Histonseitenkette und manchmal auch im globulären Anteil der Histone auf. Die H3K4-, K36- und K79-Methylierungen werden gewöhnlich in der Nähe von aktiven oder sich entwickelnden Genen gefunden, während die H3K9- und die H4K20-Methylierungen mit stillgelegten oder heterochromatischen Regionen assoziiert sind (Berger, 2007; Ng u. a., 2008). Weitere Histonmodifikationen sind die Deiminierung, Ubiquitylierung, Sumoylierung, Prolin-Isomerisierung und das Entfernen der ersten 21 Aminosäuren des Histons H3 (Bannister und Kouzarides, 2011).

Histonmodifikationen können also die Chromatinstruktur direkt durch das Zusammenspiel elektrostatischer Wechselwirkungen oder indirekt durch Rekrutierung von Effektorproteinen regulieren. Neben Histonen ist auch die DNA selbst Ziel epigenetischer Modifikationen.

1.2.3 DNA-Methylierung

Bei Vertebraten kann die C5-Position von Cytosinresten methyliert werden. Diese DNA-Modifikation tritt zum Großteil innerhalb von CpG-Dinukleotiden auf und ist in den meisten Fällen mit der Repression der Genexpression verbunden. Die Repression kann durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden (Jaenisch und Bird, 2003). Erstens werden methylierte CpG-Stellen (5MeCs) von Proteinen, welche mit *Chromatin Remodeling*-Komplexen und Histon-modifizierenden Enzymen interagieren, gebunden. Zu den an 5MeC bindenden Proteinen gehören die *Methyl-CpG binding domain*-Proteine (MeCp2 und MBD1, 2, 4), die *Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain*-Proteine (UHRF) und die Kaiso-Proteinfamilie (Rottach u. a., 2009). Das MeCp2-Protein rekrutiert beispielsweise den Komplex SIN3a, der eine Histondeacetylase-Aktivität aufweist (Abbildung 1.1). Die Assoziation von an 5MeC bindenden Proteinen mit Histondeacetylasen spiegelt sich in der Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Hypoacetylierung von Histonen wider (Cedar und Bergman, 2009). Zweitens kann sich die DNA-Methylierung auf die Genexpression auswirken, indem sie direkt die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungssequenz verhindert (Campanero u. a., 2000). Dies erscheint plausibel, wenn man bedenkt, dass die Methylgruppe des 5-Methylcytosins in die große Furche der DNA-Doppelhelix, welche die Hauptkontakte mit DNA-bindenden Proteinen eingeht, hineinragt (Hermann u. a., 2004).

Während die DNA-Methylierung lange Zeit als äußerst stabile epigenetische Modifikation galt, die sich nur im Laufe von Differenzierungsvorgängen verändert, ist heute aus einer Vielzahl von Studien bekannt, dass die DNA-Methylierung dynamisch auf Umweltreize reagiert. Schnelle Methylierungs- und Demethylierungsprozesse spielen beispielsweise bei der Gedächtnisbildung eine Rolle (Miller und Sweatt, 2007). Dies wird durch Befunde an primären Zellkulturen unterstützt. So führt die Depolarisation von Neuronenkulturen durch KCl zur Demethylierung des Gens *Brain-derived neurotrophic factor (Bdnf)* (Martinowich u. a., 2003). Auch andere biologische Prozesse, wie die Aktivierung des Gens Tyrosin-Aminotransferase (*Tat*) durch den GR oder des Gens *Trefoil factor 1* durch Östrogene, gehen mit Veränderungen der DNA-Methylierung einher (Thomassin u. a., 2001; Metivier u. a., 2008).

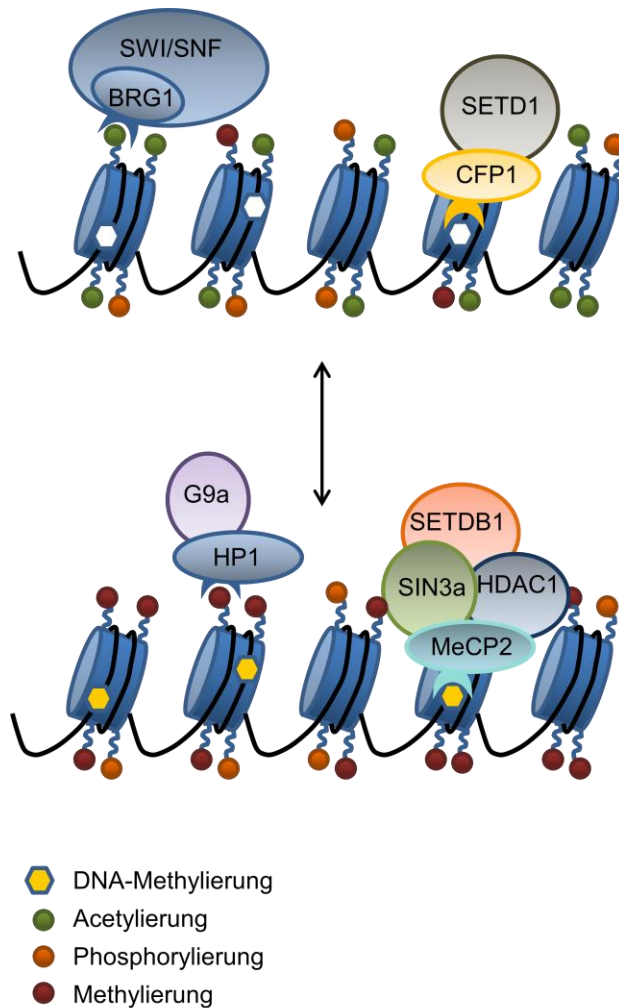


Abbildung 1.1 Chromatin liegt in unterschiedlichen funktionellen Zuständen vor. In eukaryotischen Zellen liegt die DNA in einem Komplex mit Histonen und chromosomalen nicht-Histon-Proteinen vor. Histonmodifikationen und DNA-Methylierung dienen als Bindestelle für Effektorproteine, *Chromatin Remodeling*-Komplexe sowie Histon-/DNA-modifizierende Enzyme. Der obere Teil der Abbildung zeigt Chromatin, welches für die Transkription bereit ist. Es zeichnet sich durch eine Hyperacetylierung der Histone und durch Hypomethylierung der DNA aus. Im unteren Teil der Abbildung ist der repressive Zustand des Chromatins dargestellt. Dieser zeichnet sich durch Hypoacetylierung der Histone und Hypermethylierung der DNA aus. Die Chromatinstruktur verhält sich dynamisch; Differenzierungssignale oder Umweltreize können die Chromatinstruktur beeinflussen. Die Proteinennamen sind im Abkürzungsverzeichnis angegeben.

Im humanen Genom existieren 56 Millionen CpG-Stellen, von denen etwa 60-80% methyliert sind. CpG-Dinukleotide sind im Säuger-genom um einen Faktor von 10 unterrepräsentiert (Weber und Schübeler, 2007). Allerdings treten im Genom Regionen auf, für die dies nicht zutrifft. Dazu gehören repetitive DNA-Sequenzen, wie Transposons und Retroviren, sowie CpG-Inseln. Nach der Definition von Takai und Jones ist eine CpG-Insel ein DNA-Abschnitt mit einer Länge von mindestens 500 bp und einem GC-Gehalt von mindestens 55%. Des Weiteren muss das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Stellen grösser als 0,65 sein. (Takai und Jones, 2002). CpG-Inseln kommen in den Promotoren von etwa 60% aller Säuger-gene vor. Sie sind zumeist Bestandteil von Haushaltsgenen oder von Entwicklungsgenen und liegen größtenteils unmethyliert vor. Im Gegensatz dazu sind Promotoren mit geringer CpG-Dichte mit gewebsspezifischen Genen assoziiert und oft methyliert (Meissner u. a., 2008). Gewöhnlich weisen die Regionen um den Transkriptionsstart eine inverse Korrelation zwischen Methylierung und transkriptioneller Aktivität auf. Die DNA-Methylierung dient also als spezifisches Erkennungsmerkmal für Faktoren, die Einfluss auf die Genexpression nehmen. An 5MeC bindende Proteine rekrutieren

Chromatin Remodeling-Komplexe oder histonmodifizierende Enzyme wie HDACs. Die Repression der Genexpression ist im Allgemeinen mit einer Hypermethylierung der DNA und Hypoacetylierung der Histone verbunden, wohingegen transkriptionelle Aktivität mit Hypomethylierung der DNA und Hyperacetylierung der Histone verbunden ist (Abbildung 1.1).

1.2.4 Chromatin-modifizierende Enzyme

1.2.4.1 DNA-Methyltransferasen

Die DNA-Methylierung wird von Enzymen katalysiert, welche entsprechend DNA-Methyltransferasen (DNMTs) genannt werden. Diese verwenden S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor. Säugetiere besitzen drei aktive DNMTs: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. Die zwei letzteren Enzyme sind äußerst nah verwandt und bilden die DNMT3-Familie, zu der auch noch das katalytisch inaktive Protein DNMT3L gehört (Hermann u. a., 2004). Die Bindung von DNMT3L an DNMT3a/3b wirkt sich aktivierend auf die katalytische Aktivität der DNMT3a/3b-Enzyme aus (Suetake u. a., 2004; Gowher u. a., 2005). DNMT1, DNMT3a und DNMT3b spielen eine essentielle Rolle in der Entwicklung. Sowohl Gendelektionen von *Dnmt1*- als auch *Dnmt3b* sind embryonal lethal. Mäuse, die defizient für *Dnmt3a* sind, sterben etwa vier Wochen nach der Geburt (Okano u. a., 1999).

DNA-Methyltransferase 1

Die Hauptaufgabe von DNMT1 besteht in der Erhaltung der Methylierung während der DNA-Replikation. Demgemäß methyliert das Enzym hemimethylierte DNA *in vitro* 15-40 mal effizienter als unmethylierte DNA (Hermann u. a., 2004). Die Präferenz für hemimethylierte DNA kann jedoch durch das Vorhandensein bereits methylierter DNA gesenkt werden. Eine allosterische Aktivierung führt in diesem Fall zur Erhöhung der Aktivität gegenüber unmethylierter DNA (Bacolla u. a., 1999; Fatemi u. a., 2002). Es wird daher angenommen, dass die DNMT1 auch an der Ausbreitung der *de novo* Methylierung beteiligt ist.

Die DNMT1 besteht aus einer großen N-terminalen Domäne, die eine regulatorische Funktion hat, und einer C-terminalen, katalytischen Domäne (Abbildung 1.2). Die N-terminale Domäne ist essentiell für die katalytische Aktivität der DNMT1. Es wird davon ausgegangen, dass eine intramolekulare Interaktion zwischen beiden Domänen zu einer aktiven Konformation führt (Fatemi u. a., 2001). Die N-terminale Domäne enthält eine ladungsreiche Region, ein nukleäres Lokalisationssignal, eine mit Replikationsfoci und dem für den Replikationsvorgang essentiellen Protein *Proliferating cell nuclear antigen*

(PCNA) interagierende Region, eine Cystein-reiche Zn^{2+} -bindende CXXC- und eine BAH-Domäne (*Bromo adjacent homology domain*). Die letzteren zwei Domänen werden in vielen an Chromatin assoziierten Proteinen gefunden. Die CXXC-Domäne (C steht für Cystein, X für eine beliebige Aminosäure) bindet *in vitro* an unmethylierte CpG-Stellen (Pradhan u. a., 2008). Die BAH-Domäne ist an Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt (Hermann u. a., 2004).

DNMT1 interagiert mit vielen Komponenten der epigenetischen Maschinerie, wie HDAC1 und HDAC2, DNMT3a/3b, den Histonmethyltransferasen G9a und G9a-like protein (GLP), sowie den Effektorproteinen Heterochromatin Protein 1 (HP1) und MeCP2 (Jurkowska u. a., 2011).

Die DNA-Methyltransferase 3-Familie

DNMT3a und DNMT3b sind hauptsächlich an der *de novo* Methylierung der DNA beteiligt, tragen aber auch zur Erhaltungsmethylierung von repetitiven Sequenzen und LINE-Elementen (*Long interspersed nuclear elements*) in embryonalen Stammzellen bei (Liang u. a., 2002; Chen u. a., 2003). LINE-Elemente sind zur Transposition befähigte DNA-Abschnitte von 6-8 kbp Länge, welche sich über eine RNA-Zwischenstufe vermehren. DNMT3a zeigt *in vitro* eine schwache Präferenz für unmethylierte DNA, wohingegen DNMT3b hemi- und unmethylierte DNA mit gleicher Effizienz methyliert. Neben der Substratspezifität unterscheiden sich DNMT3a und DNMT3b auch hinsichtlich der Prozessivität der Methylierungsreaktion (Gowher und Jeltsch, 2002). Die unterschiedliche Funktion der DNMT3-Enzyme wird durch Gendelektionsstudien in Mäusen belegt. Dessen zufolge ist DNMT3b für die Methylierung von *Minor satellite repeats* verantwortlich, während DNMT3a zusammen mit seinem Interaktionspartner DNMT3L für die Methylierung geprägter Gene essentiell ist (Jurkowska u. a., 2011). Zusätzlich sind sowohl DNMT3a als auch DNMT3b an der Methylierung verschiedener repetitiver Elemente beteiligt.

DNMT3a, DNMT3b und DNMT3L besitzen in ihrer N-terminalen Region eine Cystein-reiche, Zn^{2+} -bindende ADD-Domäne (ATRX-DNMT3-DNMT3L), welche an Wechselwirkungen mit Proteinen und an der Interaktion mit der H3-Seitenkette beteiligt ist (Abbildung 1.2). Die Interaktion zwischen der ADD-Domäne und der H3-Seitenkette findet nur statt, wenn diese keine die Transkription aktivierende Methylierung am Lysin 4 trägt (Ooi u. a., 2007; Otani u. a., 2009). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die DNA- und die H3K4-Methylierung invers korrelieren (Cheng und Blumenthal, 2010).

Im Gegensatz zu DNMT3L enthalten DNMT3a und DNMT3b noch eine PWWP-Domäne in ihrer N-terminalen Region. Diese Domäne weist ein positives elektrostatisches

Potential auf und ist an der DNA-Bindung beteiligt (Hermann u. a., 2004). Die PWWP-Domäne von DNMT3a bindet außerdem spezifisch trimethyliertes H3K36 (H3K36me3), was zu einer Erhöhung der katalytischen Aktivität von DNMT3a gegenüber nukleosomaler DNA führt (Dhayalan u. a., 2010).

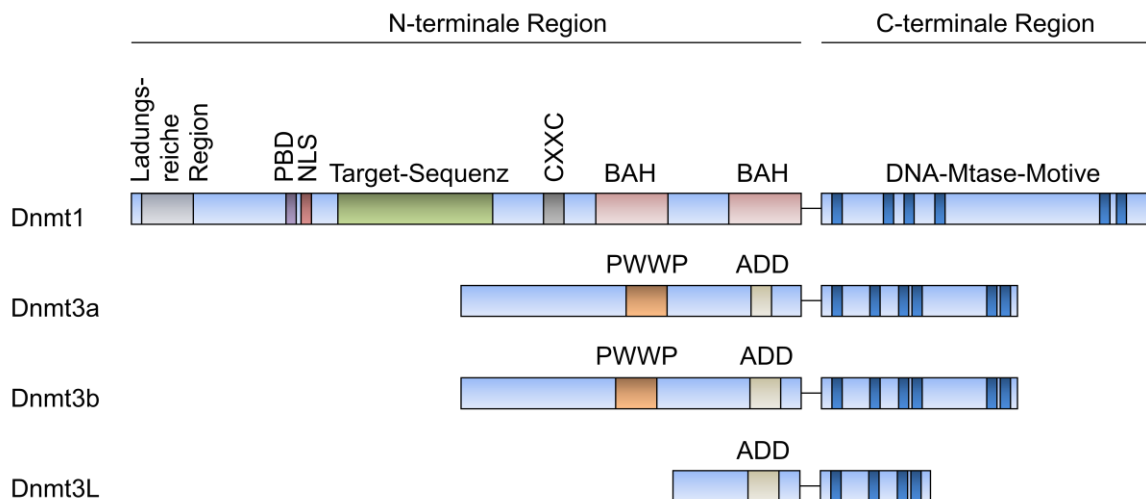


Abbildung 1.2 Domänenstruktur der DNA-Methyltransferasen von Säugetieren. Abgebildet sind konservierte Motive der C-terminalen, katalytischen Domäne (dunkelblau markiert) sowie funktionelle Domänen der N-terminalen Region (differenziert dargestellt). Die mit Replikationsfoci interagierende Region wird Target-Sequenz genannt. PBD, an PCNA bindende Domäne; NLS, nukleäres Lokalisationssignal; CXXC, Zn²⁺-bindende Domäne des Typs CXXC (C steht für Cystein, X für eine beliebige Aminosäure); BAH, Bromo adjacent homology-Domäne; PWWP, Domäne mit konserviertem Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin-Motiv; ADD, ATRX-DNMT3-DNMT3L-Domäne; DNA-Mtase-Motive, DNA-Methyltransferase-Motive. (Verändert nach Jurkowska u. a. 2011)

Zusammenfassend wird die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in Säugetieren von drei aktiven DNA-Methyltransferase-Subtypen katalysiert. DNMT1 ist hierbei vor allem für die Erhaltungsmethylierung, die DNMT3-Familie vornehmlich für die *de novo* Methylierung zuständig. Die biochemischen Eigenschaften der DNMTs weisen darauf hin, dass die DNA-Methylierung und die Modifikation von Histonen eng miteinander verknüpfte Prozesse darstellen.

1.2.4.2 Histonmethyltransferasen

Histone werden an Lysin- und Argininresten methyliert. Lysine können bis zu drei und Arginine bis zu zwei Methylgruppen tragen. Die HMTs werden in verschiedene Klassen eingeteilt: Lysin-Methyltransferasen mit SET-Domäne, Lysin-Methyltransferasen ohne SET-Domäne und Arginin-Methyltransferasen (Shilatifard, 2006). Die an der Histonmethylierung beteiligte SET-Domäne erhielt ihren Namen von den Drosophila-Proteinen *Su(var)3.9*, *Enhancer of zeste [E(z)]* and *trithorax* (SET). Zu den

Histonmethyltransferasen mit SET-Domäne gehören die transkriptionsaktivierenden SETD7- und MLL- (*Mixed lineage leukemia*) Enzyme sowie die transkriptionsreprimierenden SUV39H1/2- (*Suppressor of variegation 3.9 homologue 1/2*), SETDB1- (*SET domain bifurcated 1*), G9a- und GLP-Enzyme. Nur wenige Lysin-Methyltransferasen enthalten keine SET-Domäne, wie beispielsweise das für die transkriptionelle Repression der Telomere essentielle DOT1L (*DOT1-like*) (Bhaumik u. a., 2007).

Die Histonmethyltransferase G9a

G9a ist eine Histonmethyltransferase, die ebenso wie SUV39H1 die Mono-, Di- und Trimethylierung von H3K9 katalysiert. Während SUV39H1/2 für die Trimethylierung von perizentrischem, heterochromatischem H3K9 verantwortlich ist, mono- und dimethyliert G9a im Wesentlichen euchromatisches H3K9 (Tachibana u. a., 2002; Rice u. a., 2003). Außerdem methyliert G9a H1-Varianten (H1.2K187, H1.4K26) und H3K27 (Weiss u. a., 2010; Wu u. a., 2011).

G9a existiert *in vivo* hauptsächlich in einem heteromeren Komplex zusammen mit dem äußerst nah verwandten *G9a-like protein* (GLP). Beide Proteine besitzen eine SET-Domäne, welche das katalytische Zentrum enthält, eine an H3K9me und H3K9me2 bindende Ankyrin-Repeat Domäne, eine Glutamat- bzw. Glutamat/Aspartat-reiche und eine Cystein-reiche Region (Shinkai und Tachibana, 2011). Die Fähigkeit von G9a, seine eigenen Produkte H3K9me1 und H3K9me2 zu binden, gibt Anlass einen selbstverstärkenden Ausbreitungsmechanismus der H3K9-Methylierung anzunehmen (Henkels und Khorasanizadeh, 2007). Man geht davon aus, dass dieser zusätzlich durch eine Interaktion mit HP1 unterstützt wird. HP1 bindet an methyliertes H3K9 und interagiert mit Protein- und DNA-Methyltransferasen sowie transkriptionellen Korepressoren. Da HP1 mit seiner Chromodomäne an eine automethylierte Region des G9a-Enzyms bindet, kann es seine Interaktionspartner zu Aufenthaltsorten von G9a rekrutieren (Kwon und Workman, 2008).

Die Methylierung von H3K9 durch G9a und die DNA-Methylierung sind aufeinander abgestimmte Prozesse. G9a interagiert mit DNMT1 und steigert *in vitro* deren katalytische Aktivität (Estève u. a., 2006). Murine embryonale Stammzellen, die defizient für G9a sind, weisen Hypomethylierung in heterochromatischen und euchromatischen Regionen auf. Die DNA-Methylierung ist dabei unabhängig von der katalytischen Aktivität von G9a, da Zellen mit einer Mutation in der katalytischen Domäne von G9a normale Methylierungsspiegel zeigen (Ikegami u. a., 2007; Dong u. a., 2008; Tachibana u. a., 2008). Dies deutet darauf hin, dass allein die Interaktion zwischen DNMT1 und G9a wichtig für den Erhalt der DNA-Methylierung ist.

G9a ist ubiquitär exprimiert und spielt in den unterschiedlichsten biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Die Bedeutung des Enzyms in der Entwicklung wird durch die frühe Lethalität von Embryonen mit einer G9a-Deletion untermauert (Shinkai und Tachibana, 2011). In postmitotischen Neuronen des Vorderhirns führt das Defizit von G9a zu Beeinträchtigungen der Kognition und des adaptiven Verhaltens (Schaefer u. a., 2009). Weitere Studien an Mäusen mit Deletion von G9a in spezifischen Geweben weisen auf eine Beteiligung an der Immunantwort und der Keimzellentwicklung hin (Shinkai und Tachibana, 2011).

Zusammenfassend ist G9a eine ubiquitär exprimierte Histonmethyltransferase, die durch Katalyse von repressiven Histonmodifikationen und Regulation der DNMT1 entscheidend zur Modulation der transkriptionellen Aktivität beiträgt.

1.2.5 Epigenetik im adulten Nervensystem

1.2.5.1 Histonmodifikationen und DNA-Methylierung im adulten Nervensystem

Epigenetische Mechanismen spielen sowohl während der Entwicklung des Nervensystems, als auch im adulten Gehirn, wo sie an der Regulation der neuronalen Funktionen, der Kognition und des Verhaltens beteiligt sind, eine entscheidende Rolle (Nelson und Monteggia, 2011). So sind die neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Alzheimer und Huntington mit Veränderungen im DNA-Methylierungs- bzw. Histonmodifikationsprofil verbunden (Gräff und Mansuy, 2009). Entwicklungsstörungen des zentralen Nervensystems, wie das Rett-Syndrom oder das Rubinstein-Taybi-Syndrom, werden durch Mutationen im MeCP2-Gen bzw. in der Histonacetyltransferase *CREB-binding protein* (CBP) ausgelöst (Tsankova u. a., 2007). CREB (*cAMP response element binding*) ist ein Transkriptionsfaktor, der nach Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel an CRE-Sequenzen der DNA bindet. CBP wird von CREB rekrutiert und wirkt als Coaktivator der Genexpression. Die bei einem Teil der Patienten beobachtete Ursache des Rubinstein-Taybi Syndroms . die Haploinsuffizienz für CBP . kann in Mausmodellen nachgestellt werden. Diese Mäuse leiden, ähnlich wie die Patienten, unter kognitiven Defiziten. In Mäusen können diese Defizite durch Behandlung mit HDAC-Inhibitoren rückgängig gemacht werden (Alarcón u. a., 2004; Korzus u. a., 2004). Auch die DNA-Methylierung scheint eine wichtige Rolle in Lern- und Gedächtnisprozessen zu spielen. Nach kontextabhängiger Furchtkonditionierung wurden in Mäusen Veränderungen der DNA-Methylierung an verschiedenen Promotoren des an Gedächtnis- und Lernprozessen beteiligten Gens *Bdnf* festgestellt (Lubin u. a., 2008). Außerdem führte die kontextabhängige Furchtkonditionierung zu einer schnellen Demethylierung und gesteigerten Transkription des Plastizitätsgens Reelin. Gleichzeitig kam es zu einer

erhöhten Methylierung und verminderten Transkription des Gens Protein-Phosphatase 1 (*Pp1*), welches sich negativ auf die Gedächtnisleistung auswirkt. Die Infusion von DNMT-Inhibitoren in den Hippokampus der konditionierten Mäuse hatte eine Reduktion der Methylierung des *Pp1*-Gens und verminderte Gedächtniskonsolidierung zur Folge (Miller und Sweatt, 2007). Dementsprechend zeigten Mäuse, denen sowohl DNMT1 als auch DNMT3a in postmitotischen Neuronen des Vorderhirns fehlt, eine herabgesetzte Gedächtniskonsolidierung während der Furchtkonditionierung sowie beeinträchtigtes räumliches Lernen und Gedächtnisvermögen. In hippokampalen Neuronen dieser Mäuse war die Stärke der *Long-term potentiation* (LTP) verringert, ein Effekt der auch durch Behandlung mit DNMT-Inhibitoren hervorgerufen wurde (Levenson u. a., 2006; Feng u. a., 2010).

1.2.5.2 Epigenetische Aspekte der Depression

Die Auswirkung von Stress auf die DNA Methylierung

In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise, dass Stress zu stabilen Veränderungen des Epigenoms führt, welche bei der Entstehung und/oder Manifestation der Depression eine wichtige Rolle spielen könnten. Eine Vielzahl von Studien belegt den Einfluss von Stress auf anhaltende Veränderungen von Histonmodifikationen und DNA-Methylierung (Weaver u. a., 2004a; Tsankova u. a., 2006; Roth u. a., 2009; Wilkinson u. a., 2009). Im Folgenden ist der Fokus auf die DNA-Methylierung gelegt.

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, wird die Stressantwort durch Glukokortikoide vermittelt. Eine Studie an Mäusen, die vier Wochen mit Kortikosteron behandelt wurden, belegt, dass die in bestimmten Hirnregionen sowie im Blut beobachtete Hochregulation der mRNA-Expression des Gens *Fkbp5* (FK506-bindendes Protein 5) mit einer Demethylierung verschiedener CpG-Stellen in einem *Enhancer* assoziiert ist (Lee u. a., 2010b). Auch sieben Tage nach der Behandlung persistierte die Demethylierung im Blut, war allerdings nicht mehr von Expressionsunterschieden des *Fkbp5*-Gens begleitet. Ähnliche Befunde wurden in der gleichen Studie mit einer hippokampalen, neuronalen Zelllinie erhalten. Auch im Falle einer Hepatomzelllinie wurde beobachtet, dass sich die Behandlung mit Glukokortikoiden anhaltend auf die DNA-Methylierung auswirkt. Eine zwei- bis dreitägige Behandlung der Zellen mit dem synthetischen, für GR spezifischen Glukokortikoid Dexamethason (Dex) führte zur Erhöhung der mRNA-Expression des Tyrosin-Aminotransferase-Gens (*Tat*) und zu einer Reduktion der DNA-Methylierung in der *Enhancer*-Region. Die veränderte DNA-Methylierung blieb auch nach Hormonentzug stabil. Interessanterweise resultierte eine zweite Behandlung der Zellen mit Dex in einem stärkeren Anstieg der *Tat*-mRNA-Expression im Vergleich zur ersten Behandlung

(Thomassin u. a., 2001; Kress u. a., 2006). Da die DNA-Methylierung *in vitro* die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Enhancer verhinderte, wird angenommen, dass die Demethylierung ein molekulares Gedächtnis für die erste GR-Aktivierung darstellt.

Epigenetische Parameter wurden auch in Tieren, die während ihrer postnatalen oder adulten Phase chronischem Stress ausgesetzt waren, untersucht. Da diese Tiere neuroendokrinologische Parameter und/oder Verhaltensweisen von depressiven Patienten zeigen, eignen sich diese Modelle besonders gut für die Depressionsforschung. Adulte Ratten, die während ihrer postnatalen Lebensphase chronischem Stress in Form von geringer mütterlicher Fürsorge ausgesetzt sind, weisen erniedrigte GR-Expression und erhöhte Aktivität der HPA-Achse auf. Dies ist mit einer Hypermethylierung des GR-Promotors im Exon 1₇ verbunden, welche die Bindung des Transkriptionsfaktors Nervenwachstumsfaktor 1A verhindert (Weaver u. a., 2004b). Die aberrante Promotormethylierung und Expression des GR sowie die erhöhte Aktivität der HPA-Achse kann durch Behandlung der Ratten mit einem HDAC-Inhibitor revertiert werden. Eine Studie an Mäusen zeigte, dass postnataler Stress zu einer anhaltenden Expressionserhöhung von Vasopressin und persistenter Hypomethylierung des entsprechenden Enhancers führt (Murgatroyd u. a., 2009). Es wurde angenommen, dass die Hypomethylierung durch verringerte Bindung von MeCP2 an den Enhancer hervorgerufen wird. Die Bindung von MeCP2 war durch postnatalen Stress und neuronale Aktivität regulierbar. Ein Einfluss von Stress auf die DNA-Methylierung wurde auch in einer Studie, in der adulte Mäuse chronischem, mildem Stress ausgesetzt waren, gefunden. Hier kam es zu verringerter Expression und verstärkter Methylierung im Promotor des *Glial cell-derived neurotrophic factor (Gdnf)*, ein neurotropher Faktor, der in der Stressresistenz eine Rolle spielt (Uchida u. a., 2011). DNMT-Inhibitoren und das Antidepressivum Imipramin revertieren die Expressions- und Methylierungsunterschiede sowie die depressiven Verhaltensweisen der Tiere.

Die DNA-Methylierung kann demnach als eine Art molekulares Gedächtnis für Stresssituationen betrachtet werden.

Klinische Studien

Auch eine Reihe klinischer Studien gibt Aufschluss über die Bedeutung epigenetischer Mechanismen in der Depression. Ähnlich wie im Tiermodell steigert Stress in der Kindheit das Risiko, im Erwachsenenalter depressive Symptome zu entwickeln (Nemeroff und Vale, 2005) und wurde in der Studie von McGowan u.a. (2009) mit erhöhter DNA-Methylierung und verminderter mRNA-Expression des GR-Gens im Hippokampus in Verbindung gebracht. Außerdem wurde gezeigt, dass Stress in der

Kindheit zu einer Hypermethylierung und verringerten Expression der rRNA-Gene führt (McGowan u. a., 2008).

Studien an Hirngeweben von verstorbenen Patienten, die unter depressiven Störungen litten, ergaben, dass die *Dnmt*-Expression subtyp- und hirnregionenspezifisch im Vergleich zu Kontrollen verändert ist. Des Weiteren lag im präfrontalen Kortex der Promotor des Rezeptors GABA_A (Gamma-Aminobuttersäure A) hypermethyliert vor und die mRNA-Spiegel korrelierten negativ mit der Expression von *Dnmt3b* (Poulter u. a., 2008). In einer Pilotstudie, die periphere epigenetische Depressionsmarker aufdecken sollte, wurde eine Assoziation zwischen depressiven Symptomen und einer erhöhten Methylierung des kurzen Allels des Serotonintransporter-Gens in bukkalen Zellen gefunden (Olsson u. a., 2010).

Epigenetische Wirkmechanismen von Antidepressiva

Antidepressiva wurden lange Zeit hauptsächlich als Modulatoren der monoaminergen Neurotransmission gesehen. Unter diesem Gesichtspunkt erfolgt gewöhnlich auch ihre Einteilung in verschiedene Klassen (Panksepp, 2004). Zu den Monoaminen, deren Transmission durch Antidepressiva beeinflusst werden, gehören vor allem Serotonin (5-HT) und Norepinephrin (NE), aber auch Dopamin (DA). Eine Übersicht über die verschiedenen Antidepressiva-Kategorien ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Mechanismus	Beispiele	Kategorie
Selektive Hemmung der Wiederaufnahme von NE	Maprotilin, Reboxetin	SNRI
Selektive Hemmung der Wiederaufnahme von 5-HT	Citalopram, Fluoxetin, Paroxetin, Sertralin	SSRI
Nicht-selektive Verstärkung der NE- und 5-HT-Transmission	Imipramin, Amitriptylin, Tranylcypromin, Venlafaxin	TZA MAOI SSNRI
Andere	Bupropion, Mirtazapin	DARI TeZA

Tabelle 1.1 Antidepressiva-Kategorien. NE, Norepinephrin; 5-HT, 5-Hydroxytryptamin (Serotonin); DA, Dopamin; SNRI, selektive Norepinephrin-Wiederaufnahmehemmer; SSRI, selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer; TZA, trizyklische Antidepressiva; MAOI, Monoaminoxidase-Inhibitoren; SSNRI, selektive Serotonin/Norepinephrin-Wiederaufnahmehemmer; DARI, Dopamin-Wiederaufnahmehemmer; TeZA, Tetrazyklika. (Verändert nach Lenox u. Fraser, 2002)

Neben der Neurotransmission wirken sich Antidepressiva auf den Lipidmetabolismus, die ATP-Synthese in den Mitochondrien, den transmembranären Ionentransport, die strukturelle Plastizität und die Neurogenese aus (Katyare und Rajan, 1995; Xia u. a., 2000; Santarelli u. a., 2003; Rammes und Rupprecht, 2007; Racagni und Popoli, 2008; Abdel-Razaq u. a., 2010). Eine Reihe von Studien zeigt auch einen Einfluss von

Antidepressiva auf epigenetische Parameter. So reverterte die Behandlung mit dem SSRI Escitalopram die in einem Mausmodell der Depression beobachtete Hypermethylierung des P11-Gens sowie die damit einhergehende verminderte mRNA-Expression (Melas u. a., 2011). Interessanterweise wurden verringerte mRNA-Spiegel von P11 auch in postmortem Hirngewebe von depressiven Patienten gemessen. Wie im ersten Teil des Abschnitts 1.2.5.2 erwähnt, senkte das TZA Imipramin die DNA-Methylierung des *Gdnf*-Promotors im ventralen Striatum von gestressten Mäusen (Uchida u. a., 2011). Zudem führte Imipramin im Hippokampus von Mäusen, die chronischem, sozialen Stress ausgesetzt waren, zu einer verminderten Expression des HDAC5-Subtyps (Tsankova u. a., 2006). Es wurde auch ein Einfluss von Antidepressiva auf die Expression von 5MeC-bindenden Proteinen gezeigt. Eine zehntägige Behandlung von Ratten mit dem selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) Fluoxetin führte zu einer Erhöhung der MeCP2- und MBD1-Expression im Gyrus dentatus, dem Putamen und dem frontalen Kortex (Cassel u. a., 2006). Die Elektrokonvulsionstherapie gehört zu den effektivsten Behandlungen der Depression. Auch sie wirkt sich offenbar auf epigenetische Parameter aus. So führte die elektrokonvulsive Behandlung von Mäusen zu einer Reduktion der DNA-Methylierung und Erhöhung der mRNA-Expression von Genen, die an der Neurogenese beteiligt sind, wie beispielsweise *Bdnf*, einem Kandidatengen, das mit der Depression in Zusammenhang gebracht wird (Ma u. a., 2009; Guo u. a., 2011a, 2011b). Schließlich induzierte der HDAC-Inhibitor Valproinsäure, der gelegentlich zur Augmentationstherapie bei depressiven Patienten eingesetzt wird, genomweite DNA-Demethylierung (Perisic u. a., 2010).

Somit scheinen epigenetische Mechanismen sowohl in der Pathophysiologie der Depression als auch in der Depressionstherapie eine wichtige Bedeutung zu haben.

1.3 Zielsetzung

Die pathophysiologischen Grundlagen der Depression sind bislang weitgehend ungeklärt. Stress stellt einen wesentlichen Risikofaktor für die Depression dar. Auf molekularer Ebene führt er zu langfristigen Veränderungen epigenetischer Parameter, welche sich in aberranten Genexpressionsmustern niederschlagen können. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte an einem neuronalen Zellmodell untersucht werden, inwieweit sich Stress auf das DNA-Methylierungsprofil auswirkt. Hierfür sollten primäre, hippocampale Astrozyten mit dem für GR-spezifischen Stresshormon Dexamethason (Dex) behandelt und die Auswirkung auf die DNA-Methylierung genomweit evaluiert werden.

Ein Therapieansatz der depressiven Störung könnte darin bestehen, die durch schädliche Umweltfaktoren hervorgerufenen, epigenetischen Muster zu revertieren. Tatsächlich deutet eine Vielzahl von Studien darauf hin, dass sich eine Behandlung mit Antidepressiva auf epigenetische Prozesse auswirkt. Im Labor von Theo Rein (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) wurde kürzlich entdeckt, dass das Antidepressivum Amitriptylin die globale CCGG-Methylierung in primären kortikalen Astrozyten senkt. Es sollte daher analysiert werden, ob Ami und eventuell weitere Antidepressiva die enzymatische Aktivität von DNA-Methyltransferasen inhibieren. Nachdem ein Test verschiedener Substanzen zeigte, dass bestimmte Antidepressiva die DNA-Methyltransferase-Aktivität tatsächlich reduzieren, sollte der Mechanismus dieser Inhibition untersucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Lösungen

Name	Bezugsquelle
[³ H-Methyl]-S-Adenosylmethionin	Perkin Elmer (Jügesheim)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Acrylamid-Bisacrylamid 30%	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Agarose	PEQLAB (Erlangen)
Amitriptylin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
B27-Supplement	Invitrogen (Karlsruhe)
basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	Peptotech (Hamburg)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Carbamazepin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Citalopram-Hydrobromid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dimethylformamid	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
dNTPs	PEQLAB (Erlangen)
Epidermal Growth Factor (EGF)	Peptotech (Hamburg)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
F12-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Gentamicin (10 mg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
Glukose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glutamax (200 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
Glycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
HBSS (10x)	Invitrogen (Karlsruhe)
HEPES (1M, pH 7,4)	Invitrogen (Karlsruhe)

Horse Serum	Invitrogen (Karlsruhe)
Imipramin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis,USA)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Insulin-Transferrin-Natriumselenit	Invitrogen (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kodak GBX Developer	Sigma-Aldrich (St. Louis,USA)
Kodak GBX Fixer	Sigma-Aldrich (St. Louis,USA)
Laminin (1mg/ml)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
MEM-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Methanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Milchpulver	Coop (Schweiz)
MTT	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
N2-Supplement	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Natriumhydroxid 1N	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid-Pellets	Merck (Darmstadt)
Natriumiodid	Merck (Darmstadt)
Natriumpyruvat (100 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumsulfit	Merck (Darmstadt)
NEB-Puffer 4	NEB (Frankfurt am Main)
Neurobasal	Invitrogen (Karlsruhe)
NP40	Sigma-Aldrich (St. Louis,USA)
Oligonukleotide	MWG (Ebersberg)
Omniscrypt RT-Puffer	Qiagen (Hilden)
ortho-Phosphorsäure	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Paroxetin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis,USA)
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)	Calbiochem (Frankfurt)
Phosphate Buffered Saline (PBS, 10x)	Invitrogen (Karlsruhe)
PicoGreen	Invitrogen (Karlsruhe)
Poly(dl-dC)·Poly(dl-dC)	Sigma-Aldrich (St. Louis,USA)
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Ponceau S Lösung	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
ProLong Gold Antifade	Invitrogen (Karlsruhe)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
QuantiFast SYBR Green PCR Mix	Qiagen (Hilden)
Random Primer	Promega (Wisconsin, USA)
RNase freies H ₂ O	Qiagen (Hilden)
RNase Inhibitor	Promega (Wisconsin, USA)
RNaseA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sacharose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
S-Adenosylmethionin (SAM)	NEB (Frankfurt am Main)
Salzsäure 1N	Merck (Darmstadt)
Salzsäure 37%	Merck (Darmstadt)
Saponin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer (Jügesheim)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trizol	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Valproinsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Venlafaxin	Wyeth Pharma GmbH (Münster)
Xylencyanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.2 Enzyme

Name	Bezugsquelle
AluI	NEB (Frankfurt am Main)
Dnase I	Roche (Basel, Schweiz)
MseI	NEB (Frankfurt am Main)
Omniscript Reverse Transkriptase	Qiagen (Hilden)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RNase A	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Taq-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)

2.3 Marker

Name	Bezugsquelle
Benchmark TM Protein Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
Peq-Gold DNA Leiter-Mix	PEQLAB (Erlangen)
Peq-Gold Proteinmarker IV	PEQLAB (Erlangen)
Peq-Gold Proteinmarker V	PEQLAB (Erlangen)

2.4 Kits und gebrauchsfertige Materialien

Name	Bezugsquelle
BCA-Kit	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Cytotoxicity LDH Detection Kit	Clontech (Mountain View, USA)
Dynabeads M-280 Streptavidin	Invitrogen (St. Louis, USA)
Dynabeads ProteinG	Invitrogen (St. Louis, USA)
EpiTect Bisulfit-Kit	Qiagen (Hilden)
Glasmilch	MPBio (Santa Ana, USA)
Methylamp	Epigentek (Farmingdale, New York, USA)
MethylCollector	Active Motif (Rixensart, Belgien)
QIAquick PCR Purification Kits	Qiagen (Hilden)
Total RNA Isolation Kit	Macherey-Nagel (Düren)
WGA2-Kit	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
WGA4-Kit	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.5 Antikörper

Name	Verdünnung	Verwendung	Isotyp	Bezugsquelle
Anti-Aktin	1:5000 in TBST	WB	Ziege	Santa Cruz (Kalifornien, USA)
Anti-DNMT1	1:2000 in TBST	WB	Maus	Imgenex (San Diego, USA)
Anti-DNMT3a	1:1000 in TBST	WB	Maus	Imgenex (San Diego, USA)
Anti-G9a	1:1000 in TBST	WB	Hase	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
Anti-GFAP	1:500 in PBS/Tx	IF	Hase	Dako (Glostrup, Dänemark)
Anti-GR	1:2000 in TBST	WB	Hase	Santa Cruz (Kalifornien, USA)
Anti-Hsc70	1:5000 in TBST	WB	Maus	Santa Cruz (Kalifornien, USA)
Anti-MAP2	1:2000 in PBS/Tx	IF	Maus	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti-NAA10	1:2000 in TBST	WB	Hase	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Name	Verdünnung	Verwendung	Isotyp	Bezugsquelle
Anti-Hase Alexa 488	1:500 in Ak-Puffer	IF		Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-Hase Alexa 546	1:200 in Ak-Puffer	IF		Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-Hase HRP	1:20000 in TBST, 5% Milch	WB		Cell Signaling (Frankfurt am Main)
Anti-Hase HRP	1:20000 in TBST, 5% Milch	WB		Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti-Maus Alexa 488	1:500 in Ak-Puffer	IF		Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-Maus Cy3	1:200 in Ak-Puffer	IF		Dianova (Hamburg)
Anti-Maus HRP	1:20000 in TBST, 5% Milch	WB		Cell Signaling (Frankfurt am Main)
Anti-Maus HRP	1:20000 in TBST, 5% Milch	WB		Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti-Ziege HRP	1:20000 in TBST, 5% Milch	WB		Santa Cruz (Kalifornien, USA)

2.6 Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle sind die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Sie wurden zur mRNA-Expressionsanalyse (mRNA), zur Bisulfitsequenzierung (Bisulfit), als DNA-Substrat in den DNMT-Aktivitätsmessungen (DNMT) und zur Amplifikation von DNA-Fragmenten im Zuge der MeDIP-Methode (MeDIP) verwendet. Z steht für methyliertes Cytosin (siehe Oligonukleotid Bio_Mcg fwd).

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
Aprt fwd	CGAGATATCCCTGGGAACAA	MeDIP
Aprt rev	TGTCCGAATCTGAGTTGCAG	MeDIP
Bdnf I fwd	GCGTTGAGAAAGCTGCTTCAG	mRNA
Bdnf I rev	AGGTTACCAATGACTGTCCAATTG	mRNA
Bdnf IV fwd	ACCGAGGAGAGGACTGCTC	mRNA
Bdnf IV rev	AGCTCCATTTGATCTAGGCAG	mRNA
Cdkl5 fwd	AGCCACAATGATGTCCTGAA	mRNA
Cdkl5 rev	AATACAGCCCACTGACCACA	mRNA
Chn2 fwd	CACACACACAGACACACACGTA	mRNA
Chn2 rev	ATCTGAAAACACGTCTCGCTTC	mRNA
D2Sut1e fwd	TAGAGTCGCATGCAAAGGA	mRNA
D2Sut1e rev	GCGCCAGTGAAGAAAG	mRNA
Dnmt1 fwd	GAGTGGGATGGCTTCTTCAG	mRNA
Dnmt1 rev	GTGTCTGTCCAGGATGTTGC	mRNA
Dnmt3a fwd	GCCGAATTGTGTCTTGGTG	mRNA
Dnmt3a rev	CTTGTTGTAGGTGGCCTGGT	mRNA
Dnmt3b fwd	TGCCCCCTGAAGGACTACT	mRNA
Dnmt3b rev	TCCCACTGAGCAGGAGAAAG	mRNA
Fkbp5 fwd	GGGAGATGGACACCAAAGAA	mRNA
Fkbp5 rev	CATCTCCAGCCAGGACACTA	mRNA
Gapdh fwd	CGTCCTCTACCATCCTCTGC	MeDIP
Gapdh rev	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	MeDIP
Gfap fwd	GAGTGCCTCCTGGTAACTCG	MeDIP
Gfap rev	ATAGGCGAACACGGAAGAGA	MeDIP
Ggt6 fwd	GGGCTGTGCTCTACCAGAAG	mRNA
Ggt6 rev	CTCCTCCTCTGACTCCATGC	mRNA
Glt1 fwd	CCGAGCTGGACACCATTGA	mRNA

Glt1 rev	CGGACTGCGTCTTGGTCAT	mRNA
H19 1 fwd	AAAAATCACTTGCGCCAAAC	MeDIP
H19 1 rev	TCGTTGATTTTCGGTGTCTGA	MeDIP
H19 2 fwd	GGCTGACGTGGCATAGATTT	MeDIP
H19 2 rev	TGTATTGCGCTTGGACTGAG	MeDIP
H19 ICR.1 fwd	ACATTCACACGAGCATCCAGG	MeDIP
H19 ICR.1 rev	GCTCTTTAGGTTTGGCGCAAT	MeDIP
H19 ICR.2 fwd	GCATGGTCCTCAAATTCTGCA	MeDIP
H19 ICR.2 rev	GCATCTGAACGCCCAATTA	MeDIP
H19 ICR.3 fwd	TGCCAGAAAGCACAAAAGCC	MeDIP
H19 ICR.3 rev	TGGCCCTTGGACATTGTCAT	MeDIP
H19 ICR.4 fwd	GCCCAAATGCTGCCAACTT	MeDIP
H19 ICR.4 rev	ACCATTCCAGAGGTGCACACA	MeDIP
Hprt fwd	AACGGGGGACATAAAAGTTA	mRNA
Hprt rev	CCTGTATCCAACACTTCGAG	mRNA
Htr5a1 fwd	ATGGATGTTATTAGGTTGTGTG	Bisulfit
Htr5a1 rev	TCTTAACAAAATCCTCTCCACT	Bisulfit
Kcnk1 fwd	CCGTGTCCTGCTTCTTCTTC	mRNA
Kcnk1 rev	CGGAACTTCTGGTTGTAGCC	mRNA
Kcnk1_C2 fwd	TAGGGGAAGGTTATAATTAGAAGTTT	Bisulfit
Kcnk1_C2 rev	CAAAACATTA AAAACCTAACTAAACAAT	Bisulfit
Mt1 fwd	CACCAGATCTCGGAATGGAC	mRNA
Mt1 rev	AGGAGCAGCAGCTCTTCTTG	mRNA
Pkb fwd	CTTTGGTGGACCTCATGCTT	mRNA
Pkb rev	TTCCTGATGGCTAGGTGTCC	mRNA
Synj2 fwd	TAGGAAGAGGTTAAGGAAGAGG	Bisulfit
Synj2 rev	ACTCTCCATACCATAACCACAAC	Bisulfit
Tspo_3 fwd	GTAGGTTGGGATTTAGTTTTGATTA	Bisulfit
Tspo_3 rev	ACTATCACTCACTCATTCCCTTAATA	Bisulfit
Tspo_5 fwd	AATAGAGAGGTAAGGAGTAGAGGT	Bisulfit
Tspo_5 rev	ATCAACCAACCCACTTATTCTATAA	Bisulfit
Xist fwd	GACAGGCACACAAAGCACAC	MeDIP
Xist rev	TTGTTACCCTCCTCCTGGTG	MeDIP
Bio_Mcg fwd	GATCZGAZGAZGAZGZGZGZGAZGAZGAGATC	DNMT
Bio_UMcg fwd	GATCCGACGACGACGCGCGCGCGACGACGAGATC	DNMT
UMcg rev	GATCTCGTCGTCGCGCGCGTCGTCGTCGGATC	DNMT

2.7 Verbrauchsmaterial

Name	Bezugsquelle
Bio Spin 6 Columns	BioRad (München)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Dialyseschlauch	BioMol (Hamburg)
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Kryoröhrchen	Peske (Aindlingen-Arnhofen)
Light Cycler Kapillaren	Roche (Penzberg)
Mikrotiterplatte 96-Well	Peske (Aindlingen-Arnhofen)
Objektträger	Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen	Corning (Wiesbaden)
PVDF Transfer Membran	Schleicher und Schüll (Dassel)
Röntgenfilme	Fuji Medical (Stamford, USA)
Serologische Pipetten	Peske (Aindlingen-Arnhofen)
Sterilfilter Top Bottle Filter	Nalgene Nunc International (Wiesbaden)
Szintillationsröhrchen	Perkin Elmer (Jügesheim)
Whatman Papier 3 mm	Roth (Karlsruhe)
Zellkulturflaschen T75, T150	Peske (Aindlingen-Arnhofen)
Zellkulturschalen	Peske (Aindlingen-Arnhofen)
Zellschaber	Peske (Aindlingen-Arnhofen)
Zentrifugenröhrchen (Falcon)	Peske (Aindlingen-Arnhofen)

2.8 Geräte

Gerät	Hersteller
Bioruptor	Diagenode (Liège, Belgien)
Brutschränke	Heraeus (Mannheim)
Densitometer GS-800	BioRad (München)
Elektrophoresekammern für Agarosegele	BioRad (München)
Elektrophoresekammern für SDS-Gele	
Mini-Protean 3	BioRad (München)
Feinwaage Voyager 50228	Ohaus (Giessen)
Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss (Jena)
Fluorometer GENios Pro	Tecan (Crailsheim)
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)

Light Cycler 2.0	Roche (Penzberg)
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikroskop CK30	Olympus (Hamburg)
Mikrotiterplatten-Lesegerät MR700	Dynatech (Denkendorf)
Nanophotometer	Implen (München)
PCR-Maschine DNA-Engine PTC-200	Biozym (Oldendorf)
PCR-Maschine Primus 25 advanced	PeqLab (Erlangen)
PCR-Maschine T-Gradient	Biometra (Göttingen)
pH-Meter	WTW (Weilheim)
Reinstwasseranlage PureLab ultra	Labtech (Wohlen)
Schüttler DuoMax 1030	Heidolph (Schwabach)
Schüttler Polymax 1040	Heidolph (Schwabach)
Szintillationszähler LS 6500	Beckman Coulter (Krefeld)
Thermomixer Compact	Eppendorf (Hamburg)
Überkopfschüttler Rotamix	ELMI (Lativa)
UV-Transilluminator GelDoc	BioRad (München)
Vortexer MS2	IKA Labortechnik (Staufen)
Waage Voyager 50187	Ohaus (Giessen)
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)

Zentrifugen

Allegra 21	Beckman (Krefeld)
Allegra X-22R	Beckman (Krefeld)
Biofuge pico	Heraeus (Mannheim)
Kühlzentrifuge (5417 R)	Eppendorf (Wessling-Berzdorf)
Kühlzentrifuge (5804 R)	Eppendorf (Wessling-Berzdorf)
Vakuumzentrifuge Speedvac	Eppendorf (Wessling-Berzdorf)

2.9 Software

Software	Verwendung
Frodo Primer 3	Primer-Design
Image J	Western-Blot-Analyse
LightCycler 4.05 Software	Real-Time-PCR-Analyse
Methyl Primer Express	Primer-Design für Bisulfit-PCR
R	Auswertung des MeDIP-Arrays
SignalMap	Visualisierung der MeDIP-Daten

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung primärer Zellen

Die Primärzellen wurden in sterilen Zellkulturflaschen oder Schalen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ unter humidifizierter Atmosphäre kultiviert. Alle Arbeiten wurden an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

3.1.2 Beschichten von Plastikplatten und Deckgläschen für die Primärzellkultur

Primäre Neuronen wurden auf Plastikplatten kultiviert, die mit Poly-D-Lysin beschichtet wurden. Die Platten wurden über Nacht mit 75 µl/cm² Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml in ddH₂O) bei 37°C inkubiert. Vor Aussaat der Neuronen wurde das Poly-D-Lysin entfernt und die Platten einmal mit ddH₂O gewaschen.

Die Kultur von primären Astrozyten erfolgte auf Plastikplatten, die mit Poly-L-Ornithin beschichtet wurden. Die Platten wurden mit 75 µl/cm² Poly-L-Ornithin (0,1 mg/ml in ddH₂O) für mindestens 30 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend mit ddH₂O gewaschen.

Deckgläschen wurden für mindestens 5 Min. in Ethanol inkubiert, getrocknet und in Zellkulturplatten überführt. Die Deckgläschen wurden für 12 Std. mit Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml in ddH₂O) bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde Laminin (0,01 mg/ml in PBS) in die Schälchen überführt und für 24 Std. bei 37°C inkubiert. Vor der Aussaat wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Deckgläschen nicht austrockneten.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 80 µl einer gut durchmischten Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau versetzt. Die Suspension wurde unter das Deckgläschen der Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen aus 1-4 Großquadraten gezählt. Tote Zellen sind blau angefärbt, da sie Trypanblau aufnehmen. Die Zellzahl wurde unter Verwendung der folgenden Formel berechnet, wobei a die Gesamtzellzahl, b die Anzahl der Zellen pro Großquadrat und v das Gesamtvolumen der Zellsuspension [ml] ist:

$$a = b \times v \times 10^4 \frac{1}{ml}$$

3.1.3.1 Primäre Neuronen

Das Kortex- bzw. Hippokampusgewebe wurde aus Rattenhirnen (Sprague Dawley) von 19 Tage alten Embryonen isoliert. Die Hirnareale wurden in eiskaltem HBSS-Puffer präpariert und aufbewahrt. Um eine Dissoziation des Gewebes zu erreichen, wurden die Hirnareale zunächst 10 Min. in 0,25% Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, wobei das Kortexgewebe zuvor in vier Teile geschnitten wurde. Nach der Inkubationszeit wurde die Trypsinlösung entfernt und deren enzymatische Aktivität durch dreimaliges Waschen mit Stopp-Medium inhibiert. Anschließend wurde das Gewebe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml und einer 1 ml Pipette dissoziiert. Um Reste undissoziierten Gewebes zu entfernen, ließ man die Suspension für 2 Min. ruhen und nahm anschließend den Überstand ab. Die Zellen wurden gezählt und in *Horse serum*-Medium (HS-Medium) zu einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm² auf Poly-D-Lysin beschichtete Platten ausplattiert. Nach 24 Std. wurde zu Kultivierungsmedium I (B27-Medium) gewechselt.

Lösungen:

Präparationsmedium:	1x HBSS ohne Mg ²⁺ oder Ca ²⁺ 7 mM HEPES, pH 7,2-7,5
Stopp-Medium:	MEM 10% HS
HS-Medium:	MEM 10% HS 1 mM Natriumpyruvat 25 µg/ml Gentamicin

Kultivierungsmedium I:	Neurobasal
	2% B27
	0,5 mM Glutamax
	25 µg/ml Gentamicin

3.1.3.2 Primäre Astrozyten

Ratten wurden einen Tag nach der Geburt dekapitiert. Die Vorgehensweise wich in den nachfolgend aufgeführten Schritten von der Präparation primärer Neuronen ab. Um die Dissoziation des Gewebes zu erreichen, wurde 10 Min. mit 0,1% Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte auf gleiche Weise wie bei der Präparation primärer Neuronen. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 10 ml und 5 ml Pipette führte zur Vereinzelung der Zellen. Die Zellen von vier Kortexhälften bzw. sechs Hippokampi wurden auf eine mit Poly-L-Ornithin beschichtete T75-Flasche in HS-Medium ausplattiert. Die Astrozyten wurden vor der Verwendung für Experimente zweimal passagiert. Die konfluenten Zellen wurde bei jeder Passage 1:4-1:6 gesplittet. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen von der Platte lösten. Das Trypsin/EDTA wurde durch Zugabe von HS-Medium gestoppt und der gewünschte Zellanteil auf neue Zellkulturflaschen bzw. Platten verteilt.

Nachdem Astrozytenkulturen der 3. Passage eine Konfluenz von 80% erreicht hatten, wurden diese zweimal mit MEM/F12 (1:1) gewaschen und in Kultivierungsmedium II überführt. Die Behandlungen wurden 24 Std. nach dem Mediumswechsel gestartet.

Lösungen:

Kultivierungsmedium II:	MEM/F12 (1:1)
	1% N2-Supplement
	1 mM Natriumpyruvat
	50 µg/ml Gentamicin

3.1.3.3 Primäre neurale Stammzellen

Für die Kultur von neuronalen Stammzellen (NSZ) wurden Ratten vier Tage nach der Geburt dekapitiert, das Gehirn entnommen und die subventrikuläre Zone isoliert. Die Isolation und Aufbewahrung des Gewebes erfolgte unter Verwendung von eiskaltem Präparationsmedium. Das Gewebe wurde zerteilt und in 0,05% Trypsin/EDTA bei 37°C für 20-30 Min. inkubiert. Das Trypsin wurde durch einen Waschschrift mit Stoppmedium inaktiviert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren dissoziiert und in Kulturmedium zu einer Dichte von 200 Zellen/mm² auf Zellkulturplatten ausgesät. Die NSZ bilden nach wenigen Tagen sogenannte Neurosphenen. Das Kulturmedium wurde zur Hälfte alle drei bis fünf Tage erneuert. Die NSZ wurden alle zwei Wochen passagiert.

Hierfür wurde die Zellsuspension zentrifugiert (250 g, 4 Min.), das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und mit einer 200 µl Pipette fünfzig- bis sechzigmal auf- und abpipettiert. Die vereinzelt Zellen wurden 1:2-1:3 gesplittet und auf neue Zellkulturplatten ausgesät.

Lösungen:

Kultivierungsmedium:	MEM/F12 (1:1)
	30% Glukose
	2% B27-Supplement
	5 mM HEPES
	1x Insulin-Transferrin-Natriumselenit-Supplement
	10 ng/ml bFGF
	10 ng/ml EGF

3.1.4 Messung des Zellüberlebens

Für die Messung der Zellviabilität wurden unterschiedliche Methoden angewandt. Der Laktat-Dehydrogenase-Test (LDH-Test) ist zwar ein recht zuverlässiger Test für Zellüberleben, jedoch eignet er sich nicht für alle Zelltypen.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten, primären Neuronenkulturen war der Unterschied der LDH-Spiegel zwischen Kontrollen und 100% Zytotoxizität nicht hoch genug. Der MTT-Test eignete sich hingegen zur Messung des Zellüberlebens von Neuronenkulturen. Dies wurde durch Zellzahlbestimmungen bestätigt.

Der MTT-Test produzierte in Astrozyten artifizielle Resultate. Daher wurde im Falle von Astrozytenkulturen das Zellüberleben mit Hilfe des LDH-Tests bestimmt.

3.1.4.1 LDH-Test

Die Laktat-Dehydrogenase ist ein sehr stabiles zytoplasmatisches Enzym, das bei Beschädigung der Plasmamembran in das Kulturmedium gelangt. Beim LDH-Test wird die aus dem Kulturmedium stammende Aktivität dieses Enzyms colorimetrisch nachgewiesen. Im ersten Schritt wird durch die von LDH katalysierte Umwandlung von Laktat zu Pyruvat NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Im zweiten Schritt transferiert der Katalysator Diaphorase H/H^+ von NADH/H^+ auf ein Tetrazoliumsalz, das zum Formazan-Farbstoff reduziert wird.

Der Test wurde mit dem LDH-Cytotoxicity-Kit nach Angaben des Herstellers mit geringfügigen Änderungen durchgeführt. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte bei 200 g statt 250 g. Als Positiv-Kontrolle (100% Zelltod) dienten *Wells*, die vor Zentrifugation mit 1% Triton X-100 versetzt wurden.

Die Messungen erfolgten in 96-Well Platten bei 495 nm und 620 nm (Referenzwellenlänge) am GENios Pro Fluorometer.

3.1.4.2 MTT-Test

Der MTT-Assay misst die Aktivität von metabolisch aktiven Zellen, deren zelluläre Reduktasen den Farbstoff MTT (tetrazole 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) zum violetten, wasserunlöslichen Formazansalz reduzieren. Zellschäden führen meist zum Verlust der metabolischen Aktivität und somit zu einer verminderten Reduktion des MTT-Farbstoffs.

Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät (100 µl Zellsuspension pro Well), wobei drei Wells nur mit Medium beladen wurden (Blank). Nach der Behandlung wurde 10 µl MTT-Reagenz (5 mg/ml in PBS) hinzugefügt und für 4-8 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 100 µl Solubilisierungslösung zugegeben und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 630 nm Wellenlänge mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts bestimmt.

Lösungen:

Solubilisierungslösung:	5% SDS
	50% Dimethylformamid
	mit Essigsäure auf pH 4,1 einstellen

3.1.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Durch Immunfluoreszenzfärbungen kann die Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle sichtbar gemacht werden. Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 4%-igem Paraformaldehyd in PBS für 20 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese durch zwanzigminütige Inkubation mit 0,05% Saponin in PBS permeabilisiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 1 Std. bei Raumtemperatur mit Blocking-Puffer inkubiert. Die Bindung des in Blocking-Puffer verdünnten ersten Antikörpers erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 Std. bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen dreimal für jeweils 10 Min. mit PBS gewaschen. Die Bindung des zweiten Antikörpers erfolgte in Blocking-Puffer für 1 Std. bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden dreimal je 10 Min. mit PBS gewaschen. Wurde eine Kernfärbung durchgeführt, wurde der letzte Waschschrift durch eine Inkubation (10 Min., Raumtemperatur) mit DAPI-Lösung (5 µg/ml in PBS) ersetzt. Nach dem Waschen mit PBS wurde das Deckgläschen in ddH₂O getaucht, getrocknet und unter Zugabe von Einbettmedium (ProLong Gold Antifade) auf einen Objektträger platziert. Vor dem

3.2.4 ; Y` Z] ` h f U h Spin6-Säulen P 6] c `

Die Bio Spin 6 Säulen wurden verwendet, um niedermolekulare Substanzen aus Proteingemischen zu entfernen. Die Ausschlussgröße dieser Säulen beträgt 6 kDa. Das Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE trennt Proteine gemäß ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel auf. Hierfür wird das Proteingemisch mit einem Auftragspuffer versetzt, der das stark negativ geladene Detergens SDS enthält, welches sich an die hydrophoben Bereiche der Proteine anlagert und die von den Aminosäuren herrührende Eigenladung der Proteine überdeckt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Proteine, wobei deren Wandergeschwindigkeit nur von der Größe des Proteins, nicht aber von dessen Eigenladung abhängt.

Die Polyacrylamidgele bestehen aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Beim Übergang der beiden Gele werden die Proteine zu einer scharfen Lauffront konzentriert und anschließend im Trenngel der Größe nach aufgetrennt.

Für die Gelelektrophorese wurde das System Miniprotean 3 (Biorad) verwendet. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten, die durch einen 1 mm breiten Spacer getrennt waren, gegossen und anschließend sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels und Entfernung des Isopropanols wurde das ca. 2 cm breite Sammelgel gegossen, in welches zur Bildung der Probenaschen ein Kamm geschoben wurde. Das Gel wurde nach beendeter Polymerisation in der Elektrophoresekammer befestigt und die Kammer mit Lämmli-Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben wurden mit Lämmli-Auftragspuffer versetzt, 5 Min. bei 95°C aufgekocht und in die Probenaschen des Gels gefüllt. Ein Proteinstandard diente zum Größenabgleich. Die Elektrophorese erfolgte anfangs, während sich die Proben noch im Sammelgel befanden, bei 80 V, später bei 120-160 V. Die Proteine können nach der Elektrophorese entweder im Gel angefärbt werden (z.B. Coomassie- oder Silberfärbung) oder auf eine Membran übertragen werden.

Lösungen:

Sammelgel:	130 mM Tris pH 6,8
	0,1% SDS
	5% Acrylamid
	0,1% APS
	0,1% TEMED

Trenngel:	390 mM Tris pH 8,8 0,1% SDS 10-15% Acrylamid 0,1% APS
Laemmli-Auftragspuffer:	32 mM Tris pH 6,8 1% SDS 8% Glycerol 0,005% Bromphenolblau 5% Bromphenolblau
Laemmli-Laufpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,5% SDS

3.2.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot

Proteine können nach der SDS-PAGE durch Anlegen einer Spannung vom Gel auf eine Membran übertragen werden. Die transferierten Proteine können nun mit Antikörpern detektiert werden. Die Membran wird mit einem ersten Antikörper inkubiert, der ein Epitop des zu analysierenden Proteins spezifisch erkennt. Danach wird mit einem zweiten Antikörper inkubiert, an den ein Enzym gekoppelt ist. Dessen Lokalisation kann über eine Lichtreaktion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde ein Zweitantikörper verwendet, der an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Dieses katalysiert die Oxidation des Farbstoffes Luminol und bringt es dadurch in einen angeregten Zustand. Beim Abfall in den Grundzustand wird Licht emittiert. Diese Erscheinung wird Chemielumineszenz genannt.

Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde das System Mini-Trans-Blot-Cell (Biorad) verwendet. SDS-PAGE Gele, Schwämmchen, Filterpapiere und Polyvinylidenfluorid -Membranen wurden in Transferpuffer äquilibriert und anschließend Luftblasen vorhanden waren. Das Transfersandwich bestand aus einem Gel und einer Membran, welche zwischen je drei Filterpapieren und je einem Schwamm zu liegen kamen. Der Transfer erfolgte unter Verwendung von Transferpuffer und Kühlelementen bei 4°C. Es wurde eine Spannung von 100 V für 120-180 Min. (je nach Größe des Proteins) angelegt. Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-Lösung visualisiert, um den Erfolg des Transfers zu überprüfen. Die Ponceau-Lösung wurde anschließend mit TBS-T entfernt und die Membran mit 5% Milchpulver in TBS-T für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mit Erstantikörper, der in

TBS-T verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 Min. mit TBS-T wurde die Membran mit Zweitantikörper, welcher in 2,5% Milchpulver in TBS-T verdünnt war, inkubiert und danach dreimal für jeweils 10 Min. mit TBS-T gewaschen. Abschließend wurde Luminol-Reagenz (Millipore) auf der Membran verteilt, für 3 Min. inkubiert, die Membran mit Klarsichtfolie abgedeckt und ein Röntgenfilm für 10 Sek. bis 10 Min. aufgelegt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ.

Lösungen:

Transferpuffer für Proteine <160kDa:	125 mM Tris 190 mM Glycin 20% Methanol
Transferpuffer für Proteine >160kDa:	125 mM Tris 190 mM Glycin 15% Methanol 0,05% SDS
TBS-T:	10 mM Tris pH 7,6 150 mM NaCl 0,1% Tween

3.2.7 Messung der enzymatischen Aktivität von DNA-Methyltransferasen

Zur Bestimmung der DNMT-Aktivität wurden nukleäre Extrakte bzw. Gesamtzellextrakte in einem Gesamtvolumen von 25 µl DNMT-Assay-Puffer, der 0,5 µg Poly (Deoxyinosin-Deoxyzytidin-) Säure (Poly[dl-dC]·Poly[dl-dC]) oder 1,25 µM hemi-/unmethyliertes DNA-Substrat und 3 µM [³H-Methyl]-S-Adenosylmethionin (³H-SAM, spezifische Aktivität: 10,0 Ci/mmol; PerkinElmer) enthielt, für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Im Falle von Poly(dl-dC)·Poly(dl-dC) wurde 4 µg Proteinextrakt verwendet, im Falle von hemi-/unmethyliertem DNA-Substrat wurde 10 µg Proteinextrakt verwendet. Die DNMT-Reaktion wurde durch fünfzehnminütige Inkubation bei 65°C gestoppt. Anschließend wurde das DNA-Substrat aufgereinigt und die Inkorporation von Tritium durch Szintillationsmessung an einem Beckman LS 6500 bestimmt. Extrakte (0,7 µg/µl Gesamtprotein in 90 µl), die mit rekombinantem G9a versetzt wurden, wurden mit Vehikel oder G9a und 160 µM unmarkiertem SAM für 30 Min. bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das kalte SAM unter Verwendung von Bio-Spin-6-Säulen entfernt und der DNMT-Assay wie beschrieben durchgeführt. Vor Aufreinigung des DNA-Substrats wurden die Proteine mit Hilfe von Proteinase K verdaut.

Bildung einer Kation-Brücke zwischen der Silika-Matrix und dem negativ-geladenem Phosphatrückgrat der DNA erlaubt.

Bei dem unter 3.2.7 beschriebenen DNMT-Assay wird nach der DNA-Methylierungsreaktion das DNA-Substrat aufgereinigt, um es von ^3H -markierten Proteinen zu trennen. Während in die Methylierungsreaktion eingesetzte, biotinylierte Oligonukleotide mit Streptavidin-gekoppelten *Beads* aufgereinigt wurden, wurde das DNA-Substrat Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC) mit Hilfe von Glasmilch aufgereinigt. Zu den Reaktionsansätzen (0,5 µg Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC) in 25 µl Dnmt-Assay-Puffer) wurde je 90 µl Bindungspuffer hinzugefügt. Danach wurde die Glasmilch für 1 Min. gevortext. Je 5 µl Glasmilch wurde zu den Reaktionsansätzen hinzupipettiert und die Suspension für mindestens 5 Min. bei Raumtemperatur unter ständigem Mischen inkubiert. Nach der Bindungsreaktion wurde der Ansatz zentrifugiert (11000 g, 20 Sek.) und der Überstand verworfen. Die Glasmilch wurde viermal mit 750 µl Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurde die Glasmilch in 50 µl ddH₂O aufgenommen und mit 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt.

Lösungen:

Bindungspuffer:	6 M NaI 120 mM Na ₂ SO ₃ 1,5 mM SAM 0,01 mg/ml genomische DNA
Waschpuffer:	10 mM Tris pH 7,6-8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA 50% Ethanol

3.3.3 Aufreinigung von biotinylierten Oligonukleotiden mit Streptavidin-gekoppelten *Beads*

Die Aufreinigung von biotinylierten Oligonukleotiden erfolgte im Zuge des DNMT-Assays. Nach der DNA-Methylierungsreaktion wurde die biotinylierte, hemi-/unmethylierte DNA unter Verwendung von magnetischen Streptavidin-*Beads* (Dynabeads M-280 Streptavidin, 10 mg/ml) isoliert. Die magnetischen *Beads* wurden dreimal gewaschen und eine Suspension hergestellt, die 2,5 mg/ml *Beads*, 3,2 mM kaltes SAM und Bindungspuffer enthielt. Jeder Ansatz wurde mit 50 µl Bead-Suspension versetzt und bei Raumtemperatur und unter sanfter Rotation 15 Min. inkubiert. Die *Beads* wurden mit Hilfe eines Magneten isoliert und siebenmal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die *Beads* mit 10 Units DNaseI in DNase-Puffer bei 37°C und unter sanfter

Rotation für 20 Min. inkubiert. Schließlich wurden die *Beads* mit Hilfe eines Magneten isoliert und der Überstand wurde einer Szintillationsmessung unterzogen.

Lösungen:

Bindungspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0
0,2 mM EDTA
0,01% TritonX-100
1,5 M NaCl

Waschpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0
0,1 mM EDTA
0,005% Triton X-100
1 M NaCl

DNase-Puffer: 40 mM Tris/HCl pH 7,9
10 mM NaCl
6 mM MgCl₂
1 mM CaCl₂

3.3.4 Aufreinigung von RNA

RNA wurde entweder unter Verwendung des Trizol-Reagenz (Invitrogen) oder mit dem *Total RNA Isolation Kit* (Macherey Nagel) aufgereinigt.

Das Total RNA Isolation Kit beruht auf der Bindung von RNA an eine Silika-Matrix in Anwesenheit einer Lösung, die hohe Mengen chaotropes Salz enthält. Die Vorgehensweise erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Adherente Zellen einer 21 cm² Schale wurden in 1 ml Trizol lysiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 200 µl Chloroform hinzugefügt und gemischt. Nach 2-3 Min. Inkubation wurde die Lösung zentrifugiert (12000 g, 15 Min., 4°C). Die Zentrifugation hatte die Bildung einer organischen, Phenol-Chloroformphase, einer Interphase und einer wässrigen Phase zur Folge. Die RNA befindet sich in der wässrigen Phase und wird aus dieser mittels Isopropanol gefällt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt und gemischt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 10 Min. bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Präzipitat mit 75%-igen Ethanol gewaschen (12000 g, 5 Min., 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das RNA-Präzipitat luftgetrocknet und in RNase-freiem ddH₂O gelöst.

3.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.3.5.1 Absorptionsmessung

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt werden, indem man die Extinktion der Lösung bei 260 nm misst. Diese ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional zur Konzentration der Lösung. Die Konzentration kann mit folgender Formel berechnet werden, wobei E die Extinktion, ε der Extinktionskoeffizient, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Lösung ist.

$$E = \varepsilon \times c \times d$$

Die Extinktion bei 260 nm wurde an einem Nanophotometer gemessen. Zusätzlich wurde bei jeder Messung auch die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Der Quotient OD260/OD280 gibt Aufschluss über Proteinkontaminationen und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.3.5.2 Auf Fluoreszenz basierende Konzentrationsmessung mit PicoGreen

Beim MeDIP-Assay ist die Ausbeute an DNA sehr gering. Das Eluat weist folglich eine sehr niedrige DNA-Konzentration auf, welche mit Hilfe des Farbstoffs PicoGreen gemessen wurde. Nach Einlagerung in doppelsträngige DNA und Anregung bei 480 nm emittiert dieser Farbstoff ein Fluoreszenzsignal, dessen Intensität bei 520 nm gemessen wird.

Die Intensitätsmessungen wurden im 96-Well-Format am GeniosPro-Gerät durchgeführt. Der Farbstoff Quant-IT PicoGreen wurde 1:200 in DNA- und Dnase-freiem TE-Puffer verdünnt, lichtgeschützt aufbewahrt und innerhalb der darauffolgenden Std. für die Konzentrationsmessungen herangezogen. Das DNA-Eluat des MeDIP-Assays wurde 1:25 in TE-Puffer verdünnt. Die Standardkurve beinhaltete Messpunkte bei 100 pg/μl, 10 pg/μl, 5 pg/μl, 2,50 pg/μl, 1,25 pg/μl. Es wurde jeweils 50 μl Quant-IT PicoGreen-Verdünnung zu 50 μl in TE-Puffer verdünnter DNA-Probe hinzugefügt und zwei bis fünf Min. unter Lichtverschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung wurde bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm durchgeführt.

3.3.6 Agarosegelelektrophorese

DNA wird durch die Agarosegelelektrophorese gemäß ihrer Größe aufgetrennt. Für die Pufferlösung wird 2% (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und nach ca. fünfminütigem Abkühlen in eine Gelform gegossen. Vor dem

Beladen der DNA-Proben wurden diese mit 5x Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer, dem 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt wurde. Der Gellauf erfolgte bei 80-160 V für 30-60 Min. Die DNA wurde mittels eines UV-Transiluminators visualisiert und fotografiert.

Lösungen:

5x Ladepuffer:	25% Glycerin 2,5% SDS 50 mM EDTA 0,125% Bromphenolblau 0,125% Xylencyanol
TBE-Puffer:	90 mM Tris-HCl pH 8,3 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA

3.3.7 Enzymatische Spaltung von DNA

Genomische DNA, welche in die MeDIP- oder MBD-IP-Methode eingesetzt wurde, wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (AluI oder MseI) gespalten. Diese bewirken die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen eines DNA-Doppelstranges an bestimmten Erkennungssequenzen.

Das Restriktionsenzyme AluI erkennt die Sequenz $5'-AAGCTT-3'$. Die Reaktionsansätze enthielten 5 µg genomische DNA, 5 µl NEB-Puffer 4 und 10 Units AluI/MseI-Enzym in einem Endvolumen von 50 µl. Im Falle von MseI enthielten die Ansätze außerdem 5 µg BSA. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme durch zwanzigminütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Schließlich wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.3.8 Sonifizierung von DNA

Die MeDIP- und MBD-IP-Methode setzt eine Fragmentierung der DNA voraus.

Die Sonifizierung der DNA (2 µg in 100 µl MeDIP-/MBD-IP-Bindungspuffer) wurde an einem Biorupter Sonifiziergerät durchgeführt. Die DNA wurde für 7,5 Minuten sonifiziert, wobei nach jeweils 0,5 Min. Sonifizierung eine Pause von 0,5 Min. erfolgte. Die Intensität

3.3.9 Herstellung von doppelsträngigen hemi- und unmethylierten Oligonukleotiden

Die Sequenz der biotinylierten Oligonukleotide ist unter 2.6 angegeben. Gleiche Mengen komplementärer, einzelsträngiger, Oligonukleotide (20 μ M) wurden gemischt, bei 95°C für 5 Min. inkubiert und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (1 Std.), um ein *Annealing* der Oligonukleotide zu erreichen. Zur Herstellung von biotinylierten, hemimethylierten Oligonukleotiden wurden die Oligonukleotide sBio_Mcg fwd% und sJMcg rev% gemischt und zur Herstellung von biotinylierten, unmethylierten Oligonukleotiden wurden die Oligonukleotide sBio_UMcg fwd% und sJMcg rev% (Abschnitt 2.6) gemischt.

3.3.10 Standard-PCR

Mit Hilfe einer PCR-Reaktion kann ein bestimmtes DNA-Fragment amplifiziert werden. Hierfür werden eine thermostabile Polymerase und Oligonukleotide, welche die zu amplifizierende Region flankieren und spezifisch an diese binden, benötigt. Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 25 μ l in 1x PCR-Puffer durchgeführt. Die Ansätze enthielten 7,5 pmol jedes Primers, 0,5 μ l dNTP-Mix (10 mM), 0,75 μ l MgCl₂ (50 mM) 2,5 Units Taq-Polymerase und 10-200 ng DNA.

Die Reaktion wurde in einer PCR-Maschine nach folgendem Schema durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	95°C, 5 Min.
Amplifikation	25-30 Zyklen
Denaturierung:	95°C, 30 Sek.
Annealing:	30 Sek., 45-62°C (in Abhängigkeit der Primer-Sequenz)
Elongation:	30 Sek., 72°C
Abschließende Elongation:	72°C, 5 Min.

Die Qualität der amplifizierten DNA wurde anhand einer Gelelektrophorese überprüft.

3.3.11 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA in cDNA umgeschrieben. Das hierfür benötigte Enzym, die Reverse Transkriptase stammt ursprünglich aus Retroviren. Diese speichern ihre Erbinformation in zwei identischen, einzelsträngigen RNA-Molekülen, welche vor dem Einbau in das Wirtsgenom in DNA umgeschrieben werden. Die reverse Transkriptase besitzt drei verschiedene enzymatische Aktivitäten: eine Polymerase, die

RNA in DNA umschreibt, eine Exoribonuklease (RNase H) und eine DNA-Polymerase. *In vitro* werden bei der reversen Transkription die ersten beiden Aktivitäten genutzt.

In dieser Arbeit wurde die Reverse Transkriptase Omniscript genutzt. In die Reaktion wurde 500 ng RNA eingesetzt, welche zunächst für 5 Min. bei 65°C denaturiert und anschließend 3 Min. auf Eis inkubiert wurde. Die Reaktionsansätze enthielten 2 µl 10x Omniscript RT-Puffer, 2 mM dNTP-Mix, 10 µM Random Primer, 10 Units RNase Inhibitor, 4 Units Omniscript Reverse Transkriptase und 100-500 ng RNA in einem Endvolumen von 20 µl. Die Ansätze wurden sanft für 3-5 Sek. gevortext und zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Ansätze für 60 Min. bei 37°C inkubiert.

3.3.12 Relative Quantifizierung von DNA und cDNA mittels Real-Time PCR

Die Real-Time-PCR erlaubt die relative Quantifizierung von DNA oder cDNA. Hierbei wird das Verhältnis der in die PCR eingesetzten Ausgangsmenge einer Zielnukleinsäure und einer Referenznukleinsäure bestimmt. In der vorliegenden Arbeit enthielt der PCR-Ansatz den Farbstoff SYBR-Green, welcher doppelsträngige DNA bindet und nur in diesem Zustand nach Anregung mit Licht ein Fluoreszenzsignal emittiert. Das Anregungsmaximum von SYBR Green liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 521 nm. Das Fluoreszenzsignal wird kontinuierlich während der PCR-Reaktion gemessen. Zur Auswertung der Daten wird eine Fluoreszenzintensität ermittelt, die innerhalb der frühen exponentiellen Phase liegt. Verschiedene Ansätze können nun bezüglich ihrer zu dieser Intensität gehörigen Zyklenzahl (auch Schwellenwertzyklus genannt) verglichen werden.

Die PCR-Ansätze setzten sich aus 5 µl 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix, 10 pmol eines jeden Primers, 10-20 ng genomischer DNA bzw. 2 µl einer 1:10 Verdünnung der cDNA und RNase freiem ddH₂O zusammen. Das Endvolumen betrug 10 µl. Die fertigen Ansätze wurden in Glaskapillaren überführt, zentrifugiert und mit Hilfe des Roche LightCycler 2.0 analysiert. Es wurde jeweils ein technisches Duplikat pipettiert und gemessen. Das PCR-Programm begann mit einer fünfminütigen Inkubation bei 95°C, bei der die DNA denaturiert und die HotStar-DNA-Polymerase aktiviert wurde. Es folgten 40 Amplifikationszyklen. Diese beinhalteten einen Denaturierungsschritt (95°C, 10 Sek.) und einen Schritt, bei dem das Primer-Annealing und die Elongation (60°C, 20 Sek.) stattfand. Abschließend wurde eine Schmelzkurve erstellt, um die Spezifität der PCR-Reaktion zu überprüfen. Des Weiteren wurde die Größe des PCR-Produkts in einem Agarosegel kontrolliert.

Für jedes Primerpaar wurde die Effizienz der Amplifikation berechnet indem die Schwellenwertzyklen einer DNA/cDNA Verdünnungsreihe (z.B. 1:10, 1:100, 1:1000)

bestimmt wurden. Bei einer Effizienz von 1 (100%) wird die Menge der DNA pro Zyklus verdoppelt. Primer, die eine Effizienz von $\hat{A},8$ erreichten, wurden verworfen. Die Verhältnisse von DNA bzw. cDNA Ausgangsmengen wurden mit untenstehenden Formeln berechnet, wobei $N_{0 \text{ Ziel}}$ die Ausgangsmenge des Zielgens, $N_{0 \text{ Referenz}}$ die Ausgangsmenge des Referenzgens, x die Effizienz der Zielgenamplifikation, y die Effizienz der Referenzgenamplifikation, T_{Ziel} der Schwellenwertzyklus des Zielgens, T_{Referenz} der Schwellenwertzyklus des Referenzgens ist.

$$\frac{N_{0 \text{ Ziel}}}{N_{0 \text{ Referenz}}} = \frac{1 + y^{T_{\text{Referenz}}}}{1 + x^{T_{\text{Ziel}}}}$$

Um die relative mRNA Expression nach pharmakologischer Behandlung zu ermitteln, wurde folgende Formel angewandt:

$$\frac{N_{0 \text{ Ziel}}^{\text{Behandlung}}}{N_{0 \text{ Ziel}}^{\text{Kontrolle}}} = \frac{1 + y^{T_{\text{Referenz}}^{\text{Behandlung}}} \times 1 + x^{T_{\text{Ziel}}^{\text{Kontrolle}}}}{1 + x^{T_{\text{Ziel}}^{\text{Behandlung}}} \times 1 + y^{T_{\text{Referenz}}^{\text{Kontrolle}}}}$$

Um die relative Anreicherung eines methylierten DNA-Fragments nach MeDIP bzw. MBD-IP zu berechnen (siehe Abschnitt 3.3.13.1.) wurde untenstehende Formel angewandt, wobei $N_{0 \text{ präzipitierte DNA}}$ die Menge des DNA-Fragments in der Probe mit präzipitierter DNA, $N_{0 \text{ Ausgangs-DNA}}$ die Menge des DNA-Fragments in der Probe mit Ausgangs-DNA, x die Effizienz der PCR-Reaktion, $T_{\text{Ausgangs-DNA}}$ der Schwellenwertzyklus der Probe mit Ausgangs-DNA und $T_{\text{präzipitierte DNA}}$ der Schwellenwertzyklus der Probe mit präzipitierter DNA ist:

$$\frac{N_{0 \text{ präzipitierte DNA}}}{N_{0 \text{ Ausgangs-DNA}}} = \frac{1 + x^{T_{\text{Ausgangs-DNA}}}}{1 + x^{T_{\text{präzipitierte DNA}}}}$$

Die relativen Mengen zweier Loci wurden analog berechnet:

$$\frac{N_{0 \text{ Locus 1}}}{N_{0 \text{ Locus 2}}} = \frac{1 + x^{T_{\text{Locus 2}}}}{1 + x^{T_{\text{Locus 1}}}}$$

3.3.13 Analyse der DNA-Methylierung

3.3.13.1 Präzipitation von 5-Methylcytosin

Für die Präzipitation von 5MeC wurden zwei verschiedenen Methoden verglichen, die sich in der Verwendung des an 5MeC bindenden Proteins (anti-5MeC Antikörper/ MBD2b-Protein) und der Immobilisierungsmethode dieses Proteins unterscheiden.

Vor der Präzipitation wurde die DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen oder Sonifizierung fragmentiert.

Die MeDIP-Methode beruht auf der Anreicherung methylierter DNA unter Verwendung eines anti-5MeC-Antikörpers. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür das Methylamp-Immunpräzipitations-Kit von Epigentek nach Angaben des Herstellers verwendet. Im ersten Schritt wurde jeweils 0,5 bzw. 1 µg anti-5MeC-Antikörper bzw. IgG Antikörper (Negativ-Kontrolle) an Plastik-Wells gebunden. Die fragmentierte DNA wurde für 2-5 Min. bei 95°C inkubiert und danach sofort für 10 Min. auf Eis inkubiert. Zu den Wells wurde jeweils 0,5 bzw. 1 µg fragmentierte DNA hinzugefügt und für 90 Min. inkubiert. Die Wells wurden gewaschen und die DNA-Fragmente durch einen Proteinase K-Verdau eluiert. Schließlich wurde die DNA aufgereinigt.

Die MBD-IP-Methode beruht auf der Präzipitation von 5MeC mittels MBD-Protein. In dieser Arbeit wurde hierfür das MethylCollector Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Kit enthält rekombinantes MBD2b-Protein, welches mit einem His-Tag versehen ist. 200 ng fragmentierte DNA wurden mit 1 µg His-MBD2b-Protein und magnetischen Nickel-*Beads* bzw. magnetischen ProteinG-*Beads* (Negativ-Kontrolle) bei 4°C für eine Std. inkubiert. Es folgten Waschschrte und schließlich die Elution der DNA mittels Proteinase K-Verdau. Die Zugabe einer Stopp-Lösung führte zur Inaktivierung der Proteinase K.

3.3.13.2 Bisulfitsequenzierung zur Analyse der DNA Methylierung

Mit Hilfe der Bisulfitsequenzierung wird das Methylierungsmuster einzelner CpG-Stellen individueller DNA Moleküle bestimmt. Die Bisulfitsequenzierung basiert auf der durch Inkubation mit Natriumbisulfit bei niedrigem pH und hoher Temperatur hervorgerufenen Deaminierung von Cytosin-Resten in einzelsträngiger DNA (doppelsträngige DNA ist vor Deaminierung geschützt). Es entsteht Uracilsulphonat, das anschließend zu Uracil desulfonyliert wird. Da Methylcytosin und auch Hydroxymethylcytosin unter diesen Bedingungen nicht konvertiert werden, kann der Methylierungsstatus der DNA durch Sequenzierung der konvertierten DNA analysiert werden. Die DNA-Sequenz wird mit Primern, die für einen Strang der Bisulfit-konvertierten DNA spezifisch sind, in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Das PCR-Produkt kann direkt sequenziert und die Sequenz

anschließend mit einer speziellen Software analysiert werden, welche den Methylierungsgrad mit einem relativen Fehler von 5% bestimmt.

Für die Bisulfitkonversion wurde das EpiTect Kit von Qiagen verwendet und die Angaben des Herstellers beachtet. Die Deaminierungsreaktion erfolgte durch Inkubation der DNA mit einem Bisulfit-Puffer in einer PCR-Maschine. Das Programm wechselte zwischen Inkubationsschritten bei 95°C zur Denaturierung der DNA und 60°C zur Deaminierung. Danach wurde die DNA an eine Membran gebunden, mit Ethanol-haltigem Puffer gewaschen, um restliches Natriumbisulfit zu entfernen, und schließlich mit einem natriumhydroxidhaltigen Puffer inkubiert, welcher die DNA desulfonierte. Die DNA wurde vor der Elution mit TE-Puffer gewaschen.

Für das Primer Design wurde die Software Methyl Primer Express (Applied Biosystems; <http://marketing.appliedbiosystems.com/> [Stand 01.11.2011]) verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass die PCR-Produkte nicht länger als 500 bp waren, da längere Fragmente aufgrund der durch Bisulfit-Konversion entstehenden Fragmentierung und Degradierung der DNA schwer amplifiziert werden können. Außerdem wurde sichergestellt, dass die Primer-Region Cytosine enthielt. Cytosine werden durch Thymin ersetzt und dies führt folglich zu einer spezifischen Amplifikation von konvertierter DNA. Schließlich wurde darauf geachtet, dass die Primer keine CpG-Stellen enthielten.

Durch die Bisulfit-Behandlung wird die Komplexität der DNA-Sequenz herabgesetzt, wodurch die Primer oftmals auch an andere als die ursprüngliche Zielsequenz binden. In vielen Fällen musste die PCR-Reaktion daher optimiert werden. Hierfür wurden verschiedene Annealing-Temperaturen, MgCl₂-Konzentrationen (1,5-3,5 mM) und Primer-Konzentrationen (0,4-1,2 µM) getestet. Zudem wurden die Zeiten für Elongation und Primer-Annealing variiert (30-90 Sek.) sowie der Einfluss von DMSO (2,5% bis 10%) untersucht.

Für die Synj2-, Kcnk1_C2-, Tspo3- und Tspo5-PCR wurden Reaktionsansätze hergestellt, die 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 10 pmol eines jeden Primers, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP-Mix, 2,5 Units Taq-Polymerase und 2,0 µl (ca. 20 ng) der bisulfit-konvertierten DNA in einem Endvolumen von 20 µl enthielten. Der Ansatz der *Htr5a*-PCR wurde analog hergestellt, einziger Unterschied lag in der Konzentration von MgCl₂. Diese betrug im Falle der *Htr5a*-PCR 1,0 mM.

Programm der PCR-Reaktionen Kcnk1C_2, Tspo 3 und Tspo_5:

3 Min. 95°C, (30 Sek. 95°C, 30 Sek. Annealing, 90 Sek. 72°C) x42, 5 Min. 72°C

Annealing-Temperaturen:

TSPO 3: 59,2°C;

TSPO 5: 61,6°C;

KCNK1_C2: 56,8°C;

Programm der PCR-Reaktion Synj2:

3 Min. 95°C, (30 Sek. 95°C, 30 Sek. 63,5°C, 90 Sek. 72°C) x5, (30 Sek. 95°C, 30 Sek. 60°C, 90 Sek. 72°C) x5, (30 Sek. 95°C, 30 Sek. 55°C, 90 Sek. 72°C) x35, 5 Min. 72°C

Programm der PCR-Reaktion Htr5a:

3 Min. 95°C, (30 Sek. 95°C, 30 Sek. 61,5°C, 90 Sek. 72°C) x5, (30 Sek. 95°C, 30 Sek. 58,5°C, 90 Sek. 72°C) x5, (30 Sek. 95°C, 30 Sek. 53,6°C, 90 Sek. 72°C) x35

Die PCR-Produkte wurden bei der Firma Qiagen sequenziert und analysiert.

3.3.14 Amplifizierung des gesamten Genoms unter Verwendung des WGA2-Kits

Da die im MeDIP-Versuch erfolgte Präzipitation von 5-Methylcytosin nicht genügend DNA Material für die Hybridisierung auf dem *385K Promoter plus CpG Island Tiling Array* von Nimblegen lieferte, musste die präzipitierte DNA amplifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Kits verglichen, das WGA2- und das WGA4-Kit. Beide Kits amplifizieren die DNA unter Verwendung von universellen Primern, welche an die DNA-Fragmente ligiert werden.

Die Kits unterschieden sich in der Menge an benötigter Ausgangs-DNA. In die WGA2-Reaktion wurde 10 ng DNA, in die WGA4-Reaktion 1 ng DNA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach der Ligation der universellen Primer wurde die DNA einer Amplifikationsreaktion, die aus 17 (WGA2) bzw. 22 (WGA4) Zyklen bestand, unterzogen. Im Anschluss wurde die DNA mit dem Qiagen PCR CleanUp kit aufgereinigt. Die Menge an DNA wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nM bestimmt.

3.4 Auswertungen und statistische Tests

3.4.1 Western-Blots

Western-Blots wurden mit Hilfe der Software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/> [Stand 01.11.2011]) ausgewertet. Die relative Menge des Ziel-Proteins wurde berechnet, indem

das Verhältnis der Signalstärke des Ziel-Proteins und des Haushalt-Proteins gebildet wurde. Um auf signifikante Unterschiede zwischen behandelten Ansätzen und Kontrollansätzen zu prüfen, wurde die relative Menge des Ziel-Proteins eines jeden Ansatzes durch den Mittelwert der relativen Menge der Kontrollansätze dividiert und ein zweiseitiger *t*-Test angewandt.

3.4.2 DNMT-Aktivitätsmessungen

Im Falle der DNMT-Aktivitätsassays wurde das Signal jedes Ansatzes durch den Mittelwert der Signale von Kontrollextrakten dividiert. Mittels zweiseitigem *t*-Test wurde auf Unterschiede zwischen behandelten Ansätzen und Kontrollansätzen geprüft.

3.4.3 MeDIP-Array

Die bioinformatische Analyse der MeDIP-Arraydaten erfolgte bei Nimblegen (Berechnung der normalisierten \log_2 -Quotienten und Kolmogorov-Smirnov-Test) bzw. mit Hilfe der Software R (<http://www.R-project.org/> [Stand 01.11.2011]) durch Benno Pütz (Analyse der Dichteverteilung der \log_2 -Quotienten und Analyse von Methylierungsunterschieden zwischen behandelten und unbehandelten Ansätzen mittels *t*-Test und *false discovery rate correction*). Die Visualisierung der Arraydaten (Tiling-Region, \log_2 -Quotienten, nächstgelegenes Transkript) erfolgte mit Hilfe der SignalMap Software.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss des Stresshormons Dexamethason auf das Methyloprimärer Astrozyten

Lang anhaltender Stress kann zu Veränderungen der DNA-Methylierung führen, welche sich in einer permanenten Veränderung der Genexpression niederschlagen (Roth u. a., 2009; Murgatroyd u. a., 2009; Lee u. a., 2010b). Beispielsweise führt *early life stress* bei Mäusen zu einer erhöhten Methylierung des GR-Promotors im Hippokampus, einer Hirnregion, die eine zentrale Rolle in der Stressverarbeitung spielt (Weaver u. a., 2004b). Bisher wurde die Auswirkung von Stress auf die DNA-Methylierung nicht auf genomweiter Ebene analysiert. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher untersucht, inwieweit sich das Methyloprimärer Astrozyten von primären, neuronalen Zellen aus dem Hippokampus durch eine Langzeitbehandlung mit dem synthetischen Stresshormon Dexamethason verändert.

4.1.1 Zellmodell und Behandlungszeitraum

Neuronen und Astrozyten bilden die zwei zahlenmäßig vorherrschenden Zellpopulationen des Gehirns. Astrozyten besitzen nicht nur . wie lange Zeit angenommen . strukturgebende Funktionen, sie spielen auch eine wichtige Rolle bei der Neurotransmission. Diese basiert auf einem engen funktionellen Zusammenspiel beider Zelltypen. Um zu evaluieren, ob primäre hippokampale Astrozyten- und Neuronenkulturen für das geplante Experiment geeignet waren, wurde einerseits die Responsivität der Zellen auf Behandlung mit Dex getestet und andererseits die Homogenität der Primärzellkulturen bestimmt. Verschiedenartige Zelltypen divergieren in ihrem Methylierungsmuster sowie der Dynamik der DNA-Methylierung. Für eine hohe Sensitivität bei der Untersuchung von zelltypspezifischen Methylierungsunterschieden ist daher die Verwendung von Primärkulturen mit einem nur geringen Anteil unerwünschter Zelltypen notwendig. Um den Reinheitsgrad der Astrozyten- und Neuronenkulturen zu bestimmen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit zelltypspezifischen Markerproteinen durchgeführt. Das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) wurde als Markerprotein für Astrozyten und das Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP-2) als Markerprotein für Neuronen eingesetzt. Neuronenkulturen sind häufig mit Astrozyten kontaminiert und wurden daher zusätzlich auf GFAP-Immunreaktivität getestet. Es

ergab sich sowohl für Astrozyten- als auch für Neuronenkulturen ein Reinheitsgrad von über 90% (Abbildung 4.1.1).

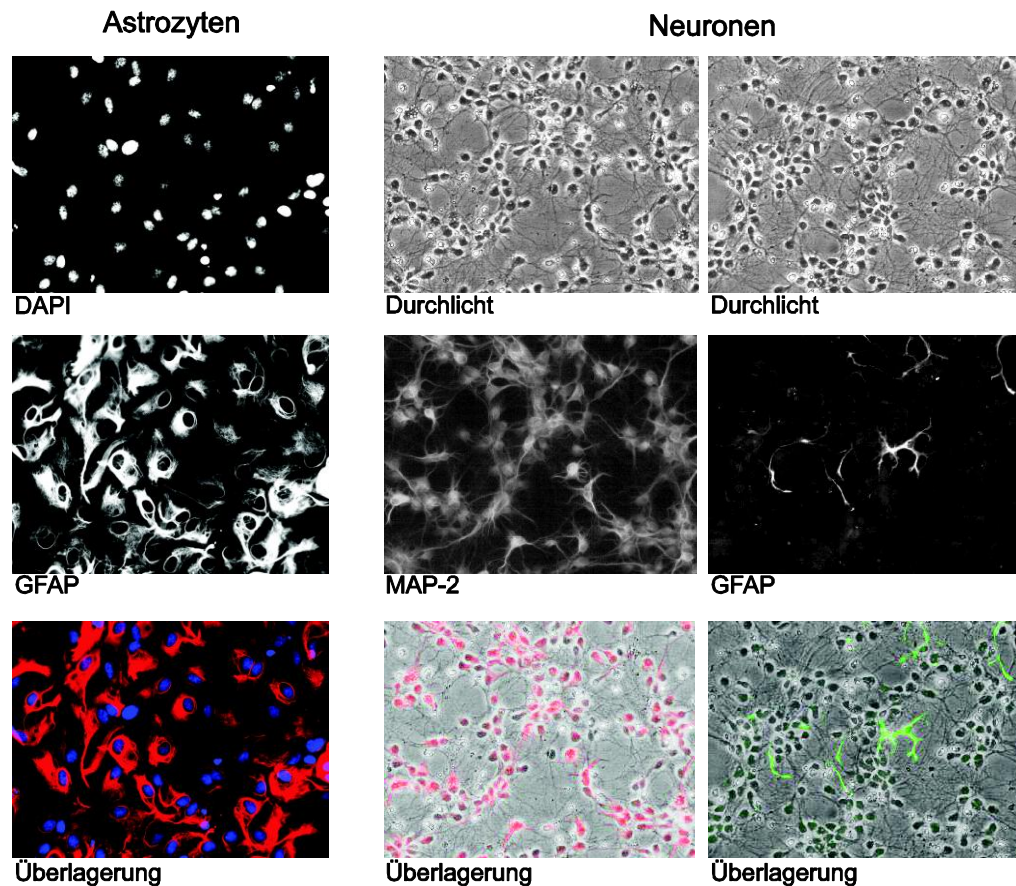


Abbildung 4.1.1 Bestimmung des Reinheitsgrades von hippokampalen Primärkulturen durch Immunfluoreszenzfärbungen von Proteinen, die für Astrozyten oder Neuronen spezifisch sind. Astrozyten und Neuronen wurden mit gegen GFAP (Astrozytenmarker) gerichteten Antikörpern angefärbt und Neuronen zusätzlich mit solchen gegen MAP-2 (Neuronenmarker). Astrozytenkerne wurden mit Hilfe von DAPI visualisiert. GFAP, gliales fibrilläres saures Protein; MAP-2, Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2.

Die Responsivität auf Dex setzt die Expression und die Aktivierbarkeit des GR voraus. Die Proteinexpression des GR wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Astrozyten exprimierten im Vergleich zu Neuronen höhere GR-Spiegel. Die Behandlung mit Dex (drei Tage, 100 nM) rief in Astrozyten den erwarteten negativen Rückkopplungsmechanismus hervor; sie verringerten die GR-Expression (Abbildung 4.1.2 A). Dies deutet auf eine funktionierende Transduktion des Stresshormonsignals in Astrozyten hin.

Die Aktivierbarkeit des GR wurde in Dex-behandelten Astrozyten und Neuronen (drei Tage, 100 nM) anhand einer mRNA-Expressionsanalyse typischer GR-Zielgene untersucht. Wie aus Abbildung 4.1.2 B zu ersehen ist, zeigten Astrozyten eine erhöhte

Transkription der drei untersuchten Zielgene, *Fkbp5*, *Mt1* und *Glt-1*. In Neuronen war die transkriptionelle Aktivität der sechs analysierten Zielgene, *Fkbp5*, *Mt1*, *Bdnf I*, *Bdnf IV*, *Chn2* und *D2sut1e* nicht verändert.

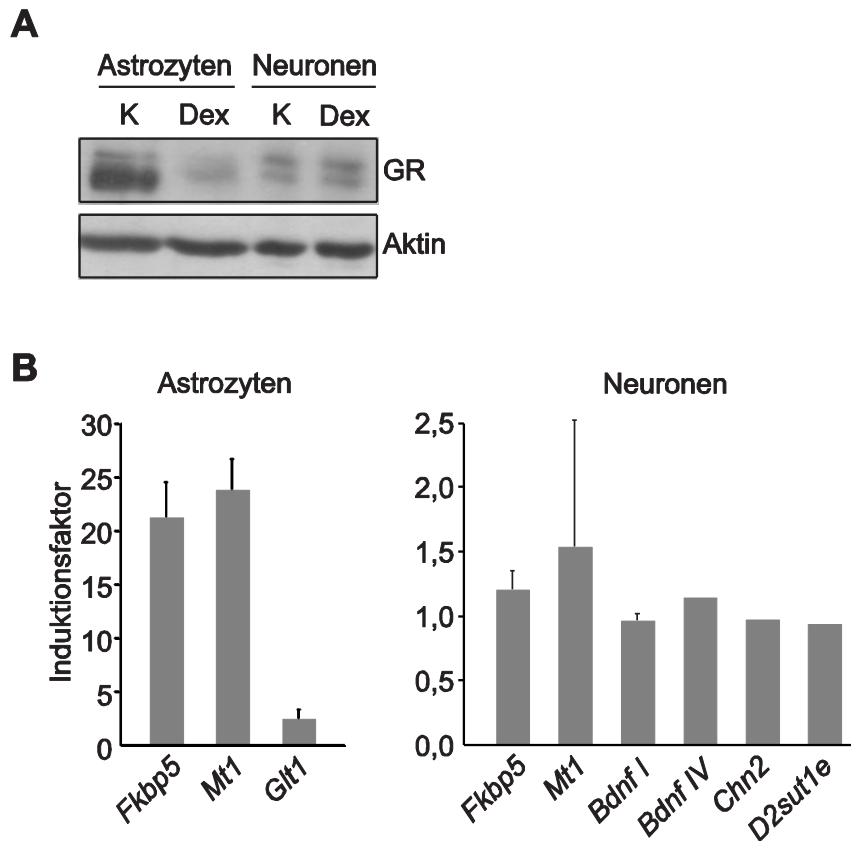


Abbildung 4.1.2 Vergleich von hippokampalen Neuronen- und Astrozytenkulturen bezüglich ihres Ansprechens auf Dex auf Proteinebene mittels Western-Blot (A) und auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR (B). (A) Im Gegensatz zu Neuronen reagieren Astrozyten auf Dex-Behandlung mit einer verringerten Expression des GR. Hippokampale Astrozyten und Neuronen wurden für drei Tage mit 100 nM Dex behandelt und auf GR-Immunreaktivität mittels Western-Blot getestet. Aktin-Immunreaktivität diente zur Kontrolle. (B) Im Unterschied zu Neuronen reagierten Astrozyten auf Dex-Behandlung mit erhöhter Expression typischer GR-Zielgene. Hippokampale Astrozyten und Neuronen wurden drei Tage mit 100 nM Dex behandelt, die RNA isoliert und von verschiedenen Zielgenen die relative mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle mittels Real-Time-PCR analysiert. *Hprt*-mRNA diente zur Normalisierung. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Jedes Experiment wurde im technischen Duplikat durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei Experimenten, bzw. für *Bdnf IV*, *Chn2* und *D2sut1e* der Wert aus einem Experiment. *Fkbp5*, *Fk506 binding protein 5*; *Mt1*, Metallothionein 1; *Glt1*, Glutamat-Transporter 1; *Bdnf I/IV*, *Brain derived neurotrophic factor I/IV*; *Chn2*, *Chimerin 2*; *D2sut1e*, *DNA segment, Chr 2, sutcliffe 1, expressed*.

Bezüglich des Zellmodells lässt sich zusammenfassen, dass primäre, hippokampale Neuronen- und Astrozytenkulturen einen hohen Reinheitsgrad zeigten. Im Gegensatz zu Neuronen konnte für Astrozyten jedoch nachgewiesen werden, dass eine funktionelle

Transduktion des Dex-Signals vorlag. Für die folgenden Analysen wurden daher primäre, hippokampale Astrozyten verwendet.

Als Nächstes galt es zu klären, welcher Behandlungszeitraum gewählt werden sollte. Generell wird zwischen akutem und chronischem Stress unterschieden. Nach akutem Stress wird der Grundzustand der transkriptionellen Aktivität zumeist rasch wieder erreicht. Chronischer Stress führt hingegen zu langanhaltenden Veränderungen epigenetischer Modifikationen und damit einhergehend der Genexpression. Studien an Zellkulturmodellen zeigten, dass eine Langzeitbehandlung von drei Tagen mit Stresshormonen ausreichte, um die DNA-Methylierung und die mRNA-Expression des *Fkbp5*- bzw. des *Tat*-Gens zu modulieren (Thomassin u. a., 2001; Lee u. a., 2010b). Für die Analyse der DNA-Methylierung von mit Stresshormon inkubierten Astrozyten wurde daher ein Behandlungszeitraum von drei Tagen gewählt.

4.1.2 Etablierung der MeDIP-Methode

DNA-Methylierungsmuster können mit Hilfe der Bisulfitkonvertierung, methylierungssensitiver Restriktionsenzyme, methylbindender Proteine oder anti-5MeC-Antikörper charakterisiert werden. Will man die Methylierungsanalyse nicht auf einzelne Kandidatenloci beschränken, sondern auf das gesamte Genom ausweiten, kombiniert man diese Methoden mit Microarrays oder *Next-Generation Sequencing* (Bibikova und Fan, 2010). Die höchstauflösende Methode für genomweite Methylierungsanalysen ist die Bisulfitkonvertierung verbunden mit *Next-Generation Sequencing*. Allerdings ist diese Methode äußerst kostspielig und benötigt hohe bioinformatische Anforderungen. Kombiniert man die Bisulfitkonvertierung mit einem Microarray, wird nur die Methylierung einzelner CpG-Stellen und nicht wie bei der Analyse mit methylbindenden Proteinen oder anti-5MeC-Antikörpern die Methylierung einer ganzen Region bestimmt. Der gleiche Nachteil besteht auch bei der Analyse mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen.

In der vorliegenden Arbeit wurde methylierte DNA präzipitiert und anschließend auf einem Microarray hybridisiert. Bei dem Microarray handelte es sich um den *385K Promoter plus CpG Island Tiling-Array* der Firma Nimblegen, welcher alle bis dato annotierten Promotoren und CpG-Inseln des Rattengenoms enthält. Im Durchschnitt wird jede Region mit 18 Sonden im Abstand von 100 bp abgedeckt, wobei jede Sonde aus einzelsträngigen Oligonukleotiden von 75 bp Länge besteht. Lange Microarraysonden wie die des Nimblegen Arrays bieten im Vergleich zu kurzen Sonden höhere Spezifität und Sensitivität. Ein weiterer Vorteil dieses Arraysystems besteht darin, dass die mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen markierte Ausgangs- und präzipitierte DNA

gleichzeitig auf dem Array hybridisiert wird. Dieses Vorgehen gleicht Variationen zwischen verschiedenen Arrays aus.

Für die angestrebte DNA-Methylierungsanalyse sollten primäre Astrozyten für drei Tage mit 100 nM Dex behandelt und anschließend die methylierte DNA in einem Präzipitationsvorgang angereichert und auf dem Array zusammen mit der Ausgangs-DNA hybridisiert werden. Die Fluoreszenzmarkierung der Ausgangs- und präzipitierten DNA, sowie der Hybridisierungsvorgang wurden bei Nimblegen durchgeführt. Bei den restlichen Versuchsschritten mussten folgende Faktoren berücksichtigt werden: die DNA-Fragmentierung, der Präzipitationsvorgang und die Amplifikation der DNA.

4.1.2.1 Fragmentierung der DNA

Die Bestimmung des Methylierungsgrades einzelner DNA-Abschnitte mit Hilfe der Präzipitationsmethode setzt ein Vorliegen von kleinen DNA-Fragmenten voraus. Die Fragmentierung der DNA kann durch Sonifizierung, einer auf mechanischem Zerkleinern der DNA basierenden Methode, oder durch Restriktionsspaltung erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA unter Verwendung des Restriktionsenzym *MseI* gespalten. Dieses schneidet spezifisch nach dem ersten Thymin-Rest der Erkennungssequenz 5`TTAA3`. CpG-Inseln werden durch eine *MseI*-Restriktionsspaltung in Fragmente von durchschnittlich 0,8 kb und nicht-CpG-Inseln in Fragmente von durchschnittlich 2,8 kb gespalten (Active Motif, 2008).

Potentielle Methylierungsunterschiede von verschiedenen DNA-Proben können unter Verwendung der Präzipitationsmethode nur ungenau bestimmt werden, wenn das untersuchte DNA-Fragment eine sehr geringe oder sehr hohe Anzahl methylierter CpG-Stellen aufweist (Pelizzola u. a., 2008). Idealerweise sollten daher DNA-Abschnitte mit hoher CpG-Dichte in möglichst kurze und DNA-Abschnitte mit sehr geringer CpG-Dichte in möglichst lange Fragmente gespalten werden. Genau dies kann mit einer *MseI*-Restriktionsspaltung erreicht werden und wurde daher als Vorteil gegenüber der Sonifizierung gewertet.

4.1.2.2 Präzipitationsmethode

Die Anreicherung methylierter DNA-Fragmente kann mit Hilfe von anti-5MeC-Antikörpern (MeDIP) oder MBD-Proteinen (MBD-IP) erreicht werden. Im Folgenden werden beide Methoden hinsichtlich ihrer Spezifität und ihres Auflösungsvermögens von Methylierungsunterschieden verglichen.

Um die Spezifität der Anreicherung methylierter DNA zu untersuchen, wurde DNA aus N2a-Zellen isoliert, sonifiziert und mittels anti-5MeC-Antikörper oder MBD2b-Protein präzipitiert. In einer PCR-Reaktion wurden methylierte und unmethylierte Loci amplifiziert

und auf einem Agarosegel visualisiert. Beide Methoden lieferten ein Signal für methylierte Loci (*H19*, *Intracisternal A Particle [IAP]*), aber nicht für unmethylierte Loci (β -Aktin, Adenin-Phosphoribosyltransferase [*Aprt*]) (Abbildung 4.1.3 A). Dies zeigt, dass sowohl die MeDIP- als auch die MBD-IP-Methode zu einer spezifischen Anreicherung methylierter DNA führt.

Nachfolgend wurden beide Methoden hinsichtlich ihrer Sensitivität für Methylierungsunterschiede verglichen. Hierfür wurde DNA aus den Schwänzen von C57/BL6-Mäusen isoliert und unter Verwendung des Restriktionsenzym AluI gespalten. Durch die Restriktionsspaltung wurde die *Imprinting*-Region des *H19*-Locus in Fragmente mit 5, 9, 11 und 22 CpG-Stellen zerlegt, welche väterlicherseits fast vollständig methyliert vorliegen (Banerjee u. a., 2001). Nach der Präzipitation methylierter DNA mit Hilfe des anti-5MeC-Antikörpers oder des MBD2b-Proteins und Amplifikation der Ausgangs- und der präzipitierten DNA mittels Real-Time-PCR, wurde die relative Anreicherung der Fragmente berechnet und in einem Diagramm in Abhängigkeit von der Anzahl der CpG-Stellen aufgetragen (Abbildung 4.1.3 B). Nimmt man eine lineare Korrelation zwischen der relativen Anreicherung und der Anzahl an CpG-Stellen an, so ist die Methode mit der größeren Steigung des Graphen diejenige, mit der Methylierungsunterschiede genauer aufgelöst werden. Wie aus den Graphen in Abbildung 4.1.3.B zu ersehen ist, ergab die MeDIP-Methode für die Steigung einen ca. 6-fach höheren Wert als die MBD-IP-Methode. Für die folgenden Methylierungsanalysen wurde daher die MeDIP-Methode angewandt.

Zusammenfassend ergaben die Analysen, dass beide untersuchten Präzipitationsmethoden methylierte DNA spezifisch anreichern. Die MeDIP-Methode löst Methylierungsunterschiede jedoch genauer auf als die MBD-IP-Methode.

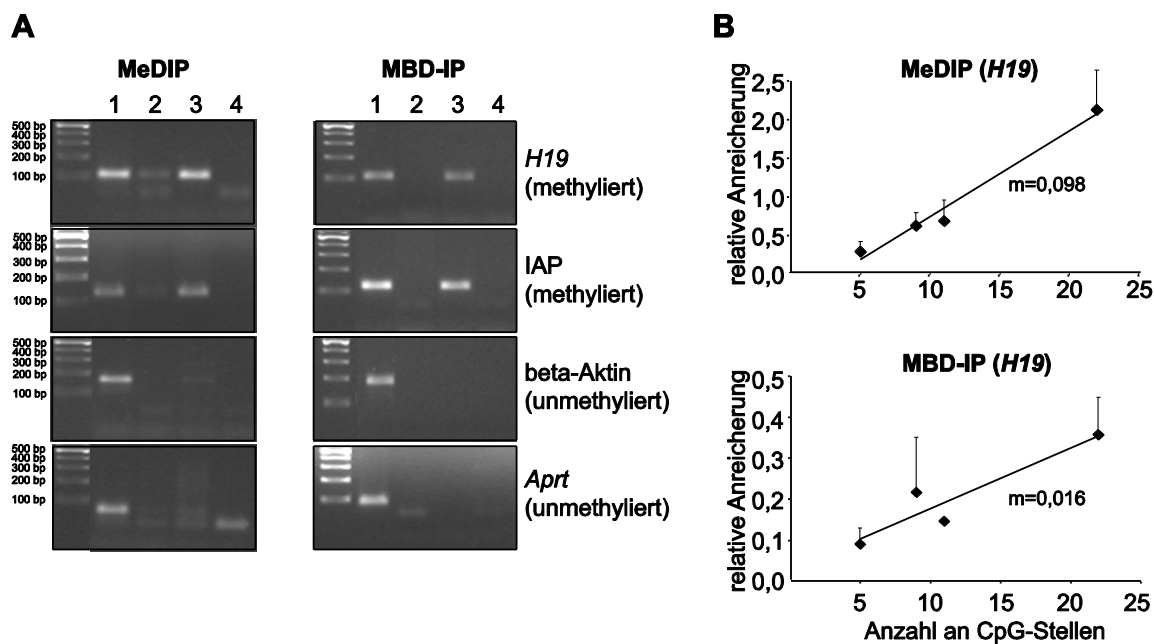


Abbildung 4.1.3 Die MeDIP- und die MBD-IP-Methode unterscheiden sich hinsichtlich ihres Auflösungsvermögens von Methylierungsunterschieden. (A) Beide Methoden zeigen eine Anreicherung methylierter Loci. DNA wurde aus N2a-Zellen isoliert und sonifiziert. In die Präzipitation mit anti-5MeC-Antikörper (0,5 µg) wurde 500 ng, in die Präzipitation mit MBD2b 100 ng DNA eingesetzt. Methylierte (*H19*, *IAP*) und unmethylierte Loci (β -Aktin, *Arp*) von Ausgangs- und präzipitierter DNA-Fraktion wurden mittels PCR-Reaktion amplifiziert. 1: Ausgangs-DNA, 2,3: präzipitierte DNA, 2: Negativ-Kontrolle (IgG/ohne MBD2b) 3: Anti-5MeC-Antikörper bzw. MBD2b, 4: H₂O-Kontrolle. (B) Mit der MeDIP-Methode können Methylierungsunterschiede genauer aufgelöst werden als mit der MBD-IP-Methode. DNA aus C57/BL6-Mäusen wurde mit dem Restriktionsenzym AluI gespalten und methylierte DNA-Abschnitte mit anti-5MeC-Antikörper bzw. MBD2b präzipitiert. Mittels Real-Time-PCR wurden vier AluI-Restriktionsfragmente des *H19*-Locus, welche eine unterschiedliche Anzahl von methylierten CpG-Stellen enthielten, amplifiziert. Die relative Anreicherung ergab sich aus dem Verhältnis von präzipitierter und Ausgangs-DNA, das sich mit Hilfe der Real-Time-PCR ermitteln ließ. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler von drei Experimenten, bzw. für das Fragment mit 11 CpG-Stellen der MBD-IP von zwei Experimenten. *IAP*, Intracisternal A particle; *Aprt*, Adenin-Phosphoribosyltransferase.

4.1.2.3 Amplifikation der DNA

Nach der MeDIP-Anreicherung methylierter DNA verbleibt ca. 1% der ursprünglich eingesetzten DNA. Um eine ausreichende Menge an DNA zu erhalten, die auf einem Array hybridisiert werden kann, muss das präzipitierte Material zunächst amplifiziert werden. Für die genomweite Vervielfältigung der DNA stehen die auf der Ligation von universellen Primern basierenden Whole Genome Amplification (WGA) und WGA4 der Firma Sigma zur Verfügung, welche sich in der benötigten Ausgangsmenge an DNA unterscheiden. Während für das WGA4-Kit nur 5 pg DNA benötigt werden (dies entspricht der Menge an DNA einer einzigen Zelle), wird für das WGA2-Kit mindestens 10 ng benötigt. Für den Erfolg des geplanten Versuchs ist entscheidend, dass die Amplifikationseffizienz eines gegebenen Locus über verschiedene, voneinander

unabhängige Versuchsansätze hinweg stabil bleibt. Um dies zu testen, wurde DNA aus hippokampalen Astrozyten unter Verwendung des Restriktionsenzym *MseI* gespalten und die MeDIP-Methode angewandt. Anschließend wurde die DNA in jeweils drei unterschiedlichen Ansätzen mit Hilfe des WGA2- sowie des WGA4-Kits vervielfältigt und zwei Abschnitte des *H19*-Locus (*H19 1* und *H19 2*) sowie ein Abschnitt des *Aprt*- und des *Gfap*-Locus mittels Real-Time-PCR amplifiziert. Es wurden die in Abbildung 4.1.4 vermerkten relativen Mengen und die zugehörigen Standardabweichungen berechnet. Für das WGA2-Kit ergaben sich für die sechs berechneten Mengenverhältnisse im Vergleich zum WGA4-Kit deutlich geringere relative Standardabweichungen (Variationskoeffizienten), also eine stabilere Amplifikationseffizienz. Die mittlere relative Standardabweichung betrug im Falle des WGA2-Kits 0,24, im Falle des WGA4-Kits hingegen 0,41. Somit wurden nachfolgende Amplifikationen unter Verwendung des WGA2-Kits durchgeführt.

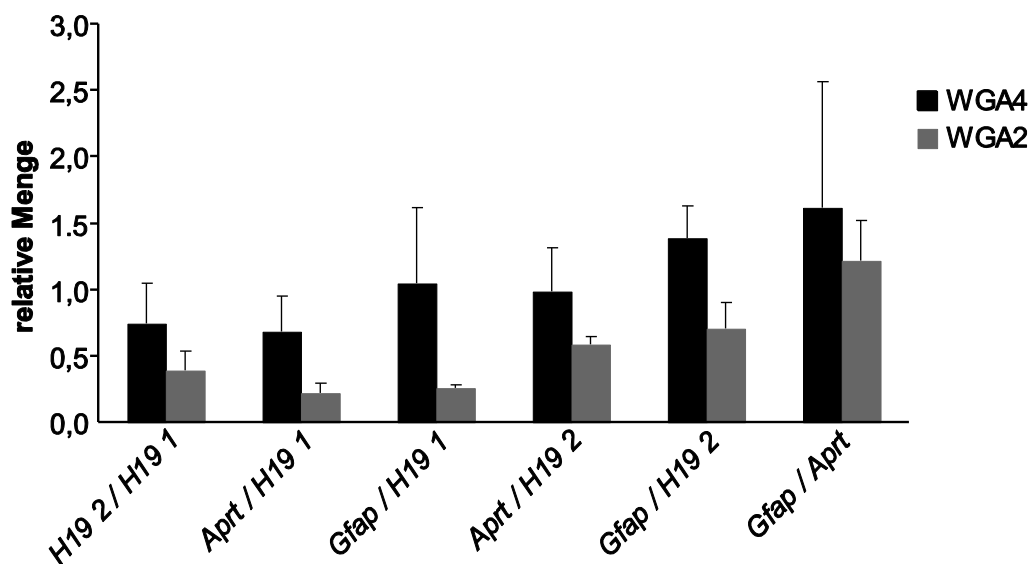


Abbildung 4.1.4 Vergleich des WGA2- und des WGA4-Kits. Hippokampale DNA aus Ratten wurde mit *MseI* gespalten und die DNA in jeweils drei verschiedenen Ansätzen mit Hilfe des WGA2- und WGA4-Kits amplifiziert. In die WGA2-Reaktion (17 Zyklen) wurde 10 ng DNA, in die WGA4-Reaktion (22 Zyklen) 1 ng DNA eingesetzt. Die DNA wurde einer Real-Time-PCR-Reaktion unterzogen, welche zwei Abschnitte des *H19*-Locus (*H19 1* und *H19 2*) und einen Abschnitt des *Aprt*- und des *Gfap*-Locus amplifizierte. Aus den Real-Time-PCR-Daten wurden die in der Abbildung vermerkten relativen Mengen errechnet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei Experimenten. *Aprt*, Adenin-Phosphoribosyltransferase; *Gfap*, Gliales fibrilläres saures Protein.

Die Schwankungen der in Abbildung 4.1.4 berechneten Verhältnisse werden durch Abweichungen bei der WGA-Amplifikation und der Real-Time-PCR-Analyse verursacht. Um herauszufinden, welcher Anteil der Schwankung auf die Anwendung des WGA2-Kits zurückzuführen ist, wurde amplifizierte und unamplifizierte DNA einer Real-Time-PCR

