Aus dem Institut für Neuropathologie (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, ZNP) Ludwig-Maximilians-Universität München Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Armin Giese

Bedeutung von Umwelteinflüssen auf das murine Epigenom des Hippocampus und Cerebellums

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität



vorgelegt von

Ann-Katrin Krauß geboren in Heidelberg

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Armin Giese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. med. Johanna Scheuermann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Phillip Korber

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Theo Kraus

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2017

"Wir können die Windrichtung

nicht bestimmen,

aber wir können die Segel richtig setzen!"

(Aristoteles)

Inhaltsverzeichnis

Zusa	mme	nfassung	6
1	Einle 1.1 1.2	eitung Epigenetik DNA Methylierung	10 10 12
	1.3	DNA Hydroxymethylierung	13
	1.4	Effekte des Enriched Environment auf die Hirnfunktion	19
	1.5	Ernährung	21
	1.6.	"immediate early genes"	22
	1.7	Zielsetzung der Arbeit	24
2	Mate	erial und Methoden	26
	2.1	Tierhaltung	26
		2.1.1 Standardhaltung	26
		2.1.2 Enriched Environment	26
		2.1.3 Zuchtfutter/Haltungsfutter	27
	2.2	Molekularbiologische Methoden	28
		2.2.1 DNA-/RNA- und Proteinisolation	28
		2.2.2 Bestimmung der RNA Integrität	29
		2.2.3 cDNA Synthese	29
		2.2.4 Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR	30
		2.2.5 5mC/5hmC Quantifizierung	34
	2.3	Histologische Methoden	35
		2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
		2.3.2 Immunhistochemische Färbung	36
	2.4	Statistische Auswertungen	37
3	Erge	bnisse	38
	3.1 F	RNA Integrität und Primereffizienz	38
	3.2 (Genexpression der <i>immediate early genes</i> in EE/SC- Mäusen	42
	3.3 E	DNA Methylierung	46
		3.3.1 Quantitative Bestimmung von 5mC in EE/SC-Mäusen	46
		3.3.2 Histologische Untersuchungen von 5mC	47
		3.3.3 Immunfluoreszenzkofärbungen 5mC/Ki67	52
		3.3.4 Genexpression von Dnmt1, Dnmt3a und Dnmt3b	54
		3.3.5 Histologische Färbungen von Dnmt3a	59
		3.3.6 Immunfluoreszenzkofärbung von Dnmt3a/NeuN	62
	3.4 E	DNA Hydroxymethylierung	65
		3.4.1 Quantitative Bestimmung von 5hmC in EE- und SC- Mäusen	65
		3.4.2 Histologische Färbungen von 5hmC	67
		3.4.3 Genexpression von Tet1-3	71
		3.4.4 Histologische Färbungen von Tet1	75

3.4.5 Immunfluoreszenzkofärbung von Tet1 und NeuN	78
3.5 Basenreparatur: Umwandlung in Cytosin	81
3.5.1 Genexpression von Mbd4, Smug1 und Tdg	81
3.5.2 Histologische Färbungen von Tdg	86
3.5.3 Immunfluoreszenzkofärbung von Tdg und NeuN	90
4 Diskussion	93
Abbildungsverzeichnis	106
Tabellenverzeichnis	107
Literaturverzeichnis	108
Danksagung	125
Eidesstattliche Erklärung	127

Zusammenfassung

Epigenetik ist ein schnell wachsendes Wissenschaftsfeld, welches sich mit den Mechanismen der Genregulation ohne Veränderungen am Genotyp beschäftigt. Die Epigenetik hat eine immer höher werdende Relevanz vor allem in den Neurowissenschaften, da epigenetische Mechanismen sowohl in der Gehirnentwicklung als auch in der neuronalen Differenzierung und außerdem im dynamischen Prozess der Gedächtnisformierung involviert sind. Epigenetische Regulierung findet auf verschiedenen Ebenen der Genexpression statt. Angefangen bei der direkten Modifikation von DNA und Histonenden, über die Regulierung des Transkriptionslevels, zu Interaktionen mit der mRNA, bis hin zur Regulierung der Translation. Epigenetische Regulierung scheint außerdem eine wichtige Rolle im Prozess des Alterns und in altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer Erkrankung, M. Parkinson oder Huntington zu spielen, wo sie Interaktionen von genetischen und umweltabhängigen Faktoren vermittelt, aber auch direkt mit krankheitsspezifischen pathologischen Faktoren interagiert. Ziel der Arbeit ist es, die beiden Hauptmechanismen der Epigenetik, nämlich die Methylierung und die Demethylierung im Prozess des Alterns unter verschiedenen Umwelteinflüssen auf verschiedenen Ebenen zu analysieren und eventuelle Unterschiede nachzuvollziehen. Mäuse wurden im Alter von 3 Wochen von Ihrer Mutter getrennt und dann entweder durchgehend im "Enriched" Käfig oder in einem Einzelkäfig bis zu 129 Tage gehalten. Nach unterschiedlich langen Beobachtungsphasen wurden Hippocampus und Kleinhirn von jeweils 5 Tieren analysiert. Des Weiteren wurde untersucht, ob eine moderate Veränderung des Futters sich auf den 5mC- und 5hmC-Gehalt auswirkt. Hierzu wurden Mäuse im Alter von 3 Wochen von ihrer Mutter getrennt, in 3er Käfigen für bis zu 273 Tage gehalten und entweder mit normalen Haltungsfutter ernährt, wie es auch in der hauseigenen Tierhaltung verwendet wird, oder mit Zuchtfutter ernährt, welches sonst nur bei trächtigen Weibchen eingesetzt wird und einen höheren Energiegehalt aufweist. Auch hier wurden nach unterschiedlich langen Beobachtungsphasen von jeweils 3 Tieren der Hippocampus und das Kleinhirn untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden,

dass sich Umwelteinflüsse, vor allem Enriched Environment, in Teilen auf den Methylierungs- und Demethylierungsprozess in Hippocampus und Cerebellum auswirken. Es wurde gezeigt, dass sich Methylcytosin und Hydroxymethylcytosin im Hippocampus unter Enriched Environment global erhöhen, ebenso wie die Genexpression von Tet1-3 und Tdg. Dass die Epigenetik abhängig von der Hirnregion reguliert wird, zeigt sich durch Reduktion von Methylcytosin und Hydroxymethylcytosin im Cerebellum unter Enriched Environment und eine Änderung der Genexpression in Dnmt1 und Dnmt3b, sowie Tet2. Obwohl der Unterschied zwischen den beiden Futterarten nur ~10% umsetzbarer Energie betrug, zeigten sich über einen Zeitraum von 273 Tagen Unterschiede, welche die Vermutung zulassen, dass die Ernährung sich auf epigenetische Prozesse auswirkt. So sind sowohl im Hippocampus als auch im Cerebellum fast alle gemessenen relativen Genexpressionswerte der Mäuse, welche mit Zuchtfutter ernährt wurden geringer als jene der mit Haltungsfutter ernährten Mäuse. Ebenso ist die Anzahl Methylcytosin- als auch Hydroxymethylcytosin-positiver Zellen im Gyrus Dentatus des Hippocampus und in der Körnerzellschicht des Cerebellum in Zuchtfutter ernährten Mäusen verringert. Diese Ergebnisse lassen auf eine mögliche Beeinflussung der epigenetischen Regulation im Gehirn durch Umweltfaktoren schließen. Durch gezielte Einflussnahme auf epigenetische Mechanismen könnten neue Strategien zur Prävention von neurodegenerativen Krankheiten erarbeitet werden.

Summary

Epigenetics is a rapidly developing field, which deals with mechanisms of gene regulation without changing the genotype. Because epigenetic mechanisms are involved in neurodevelopment, neuronal differentiation and learning and memory, epigenetics show increasing importance in neuroscience. Epigenetic regulation works on different stages of gene expression. This ranges from direct modification of DNA and histones, regulation of transcription levels and interactions with mRNA, to regulation of translation. Epigenetic dysregulation seems to play an important role in ageing and age-related neurodegenerative diseases like Alzheimer, Parkinson or Huntington, where it can trigger interactions between genetic and environmental factors or interacts directly with pathological factors. The aim of this study is to explore the two main mechanisms, namely methylation and demethylation in the process of ageing with different environmental factors. At an age of 3 weeks, after weaning, C57/BI6 female mice were transferred either to an enriched cage or as a control, singly housed for a maximum of 129 days. After different periods of treatment the hippocampus and the cerebellum of 5 mice were analysed. In addition it was tested if a moderate difference in energy uptake influences the global levels of methylcytosine or hydroxymethylcytosine. C57/BI6 female mice were kept after weaning with at the age of 3 weeks in standard cages with 3 animals each up to 273 days. They were fed either with a maintenance diet or with breeding food. After different periods of treatment the hippocampi and cerebella of 3 animals per group were analysed. The present study shows that environmental factors, especially enriched environment, influence partially the methylation and demethylation machinery in hippocampus and cerebellum. Methylcytosine and hydroxymethylcytosine are globally increased in the enriched mice, as well as gene expression of *Tet1-3* and *Tdg*. Epigenetics are regulated variable in different brain regions. In the cerebellum of enriched mice methylcytosine and hydroxymethylcytosine are reduced and the expression of Dnmt1, Dnmt3b and Tet2 are upregulated. Although the difference in convertible energy of the different food was only 10%, alterations in gene expressions of enzymes involved in the methylation and demethylation process increased after a time span of 273 days, suggesting the role of nutrition in epigenetic mechanisms. Nearly all

levels of gene expression in breeding fed mice are reduced compared to the maintenance diet fed mice and the number of mC- and 5hmC-positive cells are reduced in hippocampus and cerebellum of breeding fed mice. These results show a possible influence of environmental factors in epigenetic regulation. Directed control of epigenetic mechanisms could help to develop new strategies for prevention of neurodegenerative diseases.

1 Einleitung

1.1 Epigenetik

Seit im Jahr 1869 die ersten Entdeckungen durch den schweizer Arzt Friedrich Miescher zur DNA gemacht wurden und die Struktur im Jahre 1953 durch Watson und Crick beschrieben wurde, sind mehr als 1 Millionen Arbeiten zum Thema DNA publiziert worden. Durch die komplette Sequenzierung des humanen Genoms im Jahr 2003 durch das "Human Genome Project" wurde die DNA zu einer Art "Bedienungsanleitung" des Lebens. Jedoch werden Gene nicht immer exprimiert, DNA nicht immer in RNA umgeschrieben und RNA nicht immer in Proteine transkribiert. Dieses komplizierte Netzwerk der Genregulation wird in Teilen durch die Epigenetik erklärt, vergleichbar mit der Software eines Computers die angibt, welche Funktionen die Hardware ausführt und welche nicht.

Epigenetik wurde erstmals 1942 durch Conrad Waddington benannt, der sie als "Wechselwirkung von Genen und ihren Produkten, welche zum Phänotyp eines Organismus führen" beschrieb (Abbildung1). Es wird angenommen, dass der Entwicklungsverlauf zwar durch die Gene grundsätzlich vorgegeben ist, jedoch Faktoren wie Stress, Toxine oder Ernährung die phänotypische Ausprägung sehr stark beeinflussen können. Mittlerweile versteht man unter dem Begriff Epigenetik die Definition von Arthur Riggs "vererbbare Veränderungen der Genaktivität, ohne Veränderung der Abfolge der DNA Bausteine" (Riggs, 1989; Saxena et al., 2011). Epigenetische Prozesse sind für die Entwicklung eines Organismus sowie für die Spezialisierung von Zelltypen unerlässlich. Sie umfasst dabei verschiedene Bereiche: DNA Methylierung, Histonmodifikationen, nichtkodierende RNA und Nukleosompositionierung an der DNA Seguenz. Die DNA Methylierung wird aufgrund ihrer Transkriptionshemmung als Schlüsselprinzip angenommen. Mechanismen welche die Initiation, die Aufrechterhaltung ebenso wie die Löschung der DNA Methylierung regulieren, spielen eine zentrale Rolle im erfahrungsabhängigen Gedächtnis der DNA. Die Forschung hat in den letzten Jahren gezeigt, dass epigenetische Mechanismen oft als Mediator

der Genregulation die Entstehung verschiedenster Krankheiten wie Krebs oder neurodegenerative Erkrankungen beeinflussen.

Epigenetische Veränderungen in postmitotischen Zellen, wie beispielsweise Neuronen, führen zu strukturellen, physiologischen und metabolischen Abweichungen, die wiederum zu verschiedenen Phänotypen ausgeprägt werden können, wie in eineiigen Zwillingen gezeigt wurde (Fraga et al., 2005).

Eine der beststudierten epigenetischen Veränderungen ist die Methylierung an der 5-Position der Cytosinbase (5mC), welche auch fünfte Base genannt wird. Zusammen mit den Histonmodifikationen, moduliert 5mC epigenetische Prozesse wie die Stilllegung eines Gens über CpG Inseln und ist auch in die genetische Prägung involviert (Bartolomei and Ferguson-Smith, 2011; Bird, 2002; Yasukochi et al., 2010). Des Weiteren wurde die "sechste Base", eine Hydroxymethylierung an der 5-Position des Cytosins (5hmC) in hohem Maß im zentralen Nervensystem gefunden, wobei dessen Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist.



Abbildung 1: veränderte Grafik Waddingtons "The Strategy of the Genes" (1957). Der Ball repräsentiert den Verlauf der Entwicklung. Auf dem gedanklich höchsten Punkt des Tals ist die befruchtete Eizelle anzunehmen. Der Ball folgt den vorhandenen Entwicklungspfaden, zwischen den einzelnen Pfaden kann der Verlauf nicht ohne weiteres geändert werden. Jedoch kann eine Induktion von außen stark genug sein, um eine Talwand in der epigenetischen Landschaft zu überwinden und die Entwicklung wird anders kanalisiert.

1.2 DNA Methylierung

DNA Methylierung wird in zwei Formen der Methylierung aufgeteilt: tatsächliche Schäden und Modifikationen. Methylierungsschäden, wie N¹-Methyladenosin (m¹A) und N-Methylcytosin (m³C), welche durch endogene oder exogene Methylierungsagenzien entstehen, wirken cytotoxisch und/oder mutagen durch Blockierung und Veränderung der Watson-Crick Basenpaarung. Methylierungsmodifikationen, vor allem in Form von 5-Methylcytosin (5mC) in der DNA und N⁶-Methyladenosin in der messenger RNA (mRNA), werden durch S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Methyltransferasen generiert und verändern die Watson-Crick Basenpaarung nicht, sondern haben wichtige regulatorische Aufgaben in der Entwicklung von Säugetieren und ihre Fehlregulierung kann zu verschiedensten Krankheiten, unter anderem Krebs führen (Fu and He, 2012; Klose and Bird, 2006; Smith and Meissner, 2013). DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei genomischen imprinting, Reprogrammierung und Stabilität, zellulärer Differenzierung, X-Chromosom Inaktivierung, Transposon Stillegung, RNA Splicing und DNA Reparatur (Guo et al., 2011b; Ndlovu et al., 2011; Laurent et al., 2010). In adulten Säugerzellen sind ungefähr 70% der Cytosin-phosphat-Guanin Inseln (CpGs) des Genoms methyliert. Die Enzymfamilie, welche für die Addition der Methylgruppe an das fünfte C-Atom des Cytosins verantwortlich ist, sind die DNA Methyltransferasen (DNMTs), mit dem Methylgruppendonor SAM.



Abbildung 2: **DNA-Methylierungsreaktion der Base Cytosin** zu 5-Methylcytosin über DNA-Methyltransferasen (DNMTs) mit S-Adenosylmethionin (SAM) als Cofaktor. Z= Zuckerrest

DNMT1, welches in undifferenzierten, sowie differenzierten Zellen exprimiert wird, ist für die Aufrechterhaltung der DNA Methylierung während der zellulären Replikation zuständig wenn die Stränge der DNA separiert und kopiert werden. DNMT1 bindet bevorzugt an hemimethylierte DNA und kopiert das DNA Methylierungsmuster des parentalen DNA-Stranges auf den neu replizierten DNA-Strang (Auclair and Weber, 2012); (Bormann et al., 2011); (Alikhani et al., 2011).

Die *de Novo* DNMTs sind DNMT3a und DNMT3b mit dem Cofaktor DNMT3L (DNA methyltransferase-like protein), welche sowohl unmethylierte als auch hemimethylierte DNA während der Embryogenese und in differenzierten Zellen methylieren und die in embryonalen Stammzellen hoch exprimiert sind. DNMT3b ist essentiell in der frühen Embryogenese, während DNMT3a in der späten Embryogenese benötigt wird und in postmitotischen Neuronen, welche nicht länger der aktiven DNA Synthese während der Zellteilung unterliegen, wichtig ist. Im Gegensatz zu DNMT3b spielt DNMT3a vermutlich eine wichtige Rolle bei der Regulierung von DNA Methylierungsmustern und Stilllegung neuronaler Genexpression als Antwort auf Umgebungsreize (Achanta et al., 2005). DNMT3L hat keine katalytische Domäne und verstärkt als Cofaktor die *de Novo* Methylierungsaktivität von DNMT3a und DNMT3b (Auclair and Weber, 2012). Im adulten Hirn findet Methylierung in Vorläuferzellen in den neurogenen Zonen und in postmitotischen Neuronen statt.

Die am stärksten exprimierten DNMTs in postmitotischen Neuronen sind DNMT1 und DNMT3a, während die Expression von DNMT3b relativ niedrig ist (Achanta et al., 2005; Costa et al., 2004; Fujita et al., 2000; Zhubi et al., 2009).

1.3 DNA Hydroxymethylierung

5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), auch sechste Base genannt, ist ein Oxidationsprodukt aus 5-Methylcytosin und wurde 2009 "wiederentdeckt", als Tahiliani et al. herausfanden, dass das Enzym ten-eleven-translocation 1 (TET1), eines der drei Enzyme aus der TET-Familie, 5mC zu 5hmC oxidiert (Tahiliani et al., 2009). TET1, welches vorrangig in der chromosomalen Translokation bei Leukämie involviert ist, katalysiert die Umwandlung von 5mC zu 5hmC über die Kofaktoren Fe(II) und 2-Ketoglutarat. Nachfolgend wurde bei den verwandten Enzymen TET2 und TET3 die gleiche enzymatische Aktivität nachgewiesen (Ito et al., 2010).

TET-Proteine oxidieren nicht nur 5mC zu 5hmC sondern können weiterführend 5hmC zu 5-Formylcytosin (5fC) und weiter zu 5-Carboxylcytosin (5caC) oxidieren (He et al., 2011a; Ito et al., 2011). 5hmC ist ein Zwischenprodukt in der aktiven, replikationsunabhängigen DNA Demethylierung und ist ein starker Inhibitor der DNMT abhängigen Methylierungsreaktion, was zu einer passiven Demethylierung über mehre Replikationszyklen führt (Hashimoto et al., 2012; Valinluck and Sowers, 2007). Die Forschung der letzten Jahre zeigt aber auch, dass diese Base eine sehr wichtige Rolle in der epigenetischen Genkontrolle spielt. So ist 5hmC stark mit Genen und mit regulatorischen Elementen innerhalb des Genoms assoziiert und ist unter anderem vorhanden in embryonalen Stammzellen, Urkeimzellen, befruchteten Oozyten und ist sehr stark vertreten im Gehirn.



Abbildung 3: Gewebeabhängige Unterschiede an globalem 5hmC Gehalt relativ zu Gehirn (Nestor et al., 2012).

Das adulte Säugerhirn weist den höchsten Gehalt an 5hmC von allen Gewebearten auf, die bis jetzt untersucht wurden. Es sind bis zu 1% aller Cytosine im humanen Cortex hydroxymethyliert und im Kleinhirn wurden in Purkinje- und Körnerzellneuronen 0,2 und 0,6% 5hmC an Gesamtnukleotiden gefunden (Kriaucionis and Heintz, 2009). Aufgrund dieser Zahlen lässt sich annehmen, dass 5hmC eine stabile Modifikation ist, denn wäre es eine transiente DNA Modifikation im Gehirn, müsste die Umsatzrate sehr niedrig sein. In der ersten Hälfte des Lebens nimmt 5hmC im humanen und Maushirn zu, bis sich im adulten Hirn das Höchstniveau gebildet hat. Ab diesem Zeitpunkt nimmt 5hmC altersabhängig ab (Kraus et al., 2014). Diese Daten lassen eine Abhängigkeit von 5hmC von der Entwicklung im Hirn als sehr wahrscheinlich erscheinen, da 5hmC positive Zellkerne in Neocortex und subkortikaler weißer Hirnsubstanz von Geburt an bis zum adulten Alter zunehmen.



Abbildung 4: **Dynamische Regulation von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in der DNA.** DNMTs sind verantwortlich für die Umwandlung von Cytosin in 5mC, TET Enzyme für die Oxidation von 5mC in 5hmC und weiter zu 5fC und 5caC. APOBEC/AID wandeln 5hmC in 5hmU und 5mC in Thymin um. TDG, SMUG1 und MBD4 sind über die Basenextinktionsreparation verantwortlich für das Ersetzen durch unmodifiziertes C. (Fu and He, 2012).

TET-Proteine wurden erstmals als Fusionspartner des MLL Gens in akuter myeloischer Leukämie (AML) gefunden. Die Umwandlung von 5mC in 5hmC in Zellkultur wurde zuerst für TET1 entdeckt (Tahiliani et al., 2009). Später wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass TET Proteine auch 5fC und 5caC enzymatisch von 5mC ausgehend generieren können (Pfaffeneder et al., 2011; Ito et al., 2011; He et al., 2011a). TET Proteine besitzen drei konservierte Domänen, eine CXXC-Zinkfinger-Domäne, die eine hohe Affinität zu gebündelten nichtmethylierten CpG Dinukleotiden aufweist, eine Cystein-reiche (Cys-rich) Domäne und eine doppelsträngige β -helix gefaltete Struktur (DSBH), welche typisch ist für Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen (Tahiliani et al., 2009).



Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der TET Proteine. Zink-Finger Domäne (blau), Cystein-reiche Domäne (orange) und DSBH-Domäne (grün). TET2 besitzt keine CXXC-Domäne. (Shen et al., 2014)

Die Oxidation durch die TET-Enzyme kann in 2 Stufen gegliedert werden: Sauerstoffaktivierung und Substratoxidation. Die Sauerstoffaktivierung ist ein Vier-Elektronen Prozess. Fe(II) und α-Ketoglutarat (α-KG) geben jeweils 2 Elektronen um ein Sauerstoffmolekül erst in ein stabilisiertes Peroxointermediat und weiter zu einem Fe(IV)-oxo Intermediat zu aktivieren (Krebs et al., 2007). Im Substrat-Oxidationsschritt oxidiert das hochaktive Fe(IV)-oxo Intermediat die inerte C-H Bindung des Substrates und Fe(IV) wird zu Fe(II) reduziert um den katalytischen Zyklus zu vervollständigen (Shen et al., 2014).

5mC wird über die TET Proteine schrittweise zu 5hmC, 5fC und 5caC oxidiert. Miller et al. fanden heraus, dass die (De-) Methylierung eine große Rolle im Lernprozess sowie bei der Gedächtnisbildung spielen und eine pharmakologische Inhibierung der DNA Methylierung zu Defekten in synaptischer Plastizität und zu Beeinträchtigung des Gedächtnis führt (Miller and Sweatt, 2007; Miller et al., 2008; Miller et al., 2010). Insbesondere TET1 ist in der adulten Neurogenese und der Gedächtnisformierung von Bedeutung, da es für die Demethylierung des Fibroblasten Wachstumsfaktor FGF1 (engl.: fibroblast growth factor) und des aus dem Hirn stammenden neurotrophischen Faktors BDNF (engl.: brainderived neurotrophic factor) verantwortlich scheint (Guo et al., 2011a).

Des Weiteren wurde für TET1-knockout-Mäuse eine veränderte Neurogenese und ein schlechteres räumliches Gedächtnis nachgewiesen (Zhang et al., 2013).



Abbildung 6: **Chemischer Mechanismus der Oxidation von 5mC.** Bei der Sauerstoffaktivierung wird ein hochaktives Fe(IV)-oxo Intermediat gebildet, welches das Sauerstoffatom im Substratoxidationsschritt an die C-H Bindung des Substrates abgibt (Shen et al., 2014).

Das über die TET Enzyme gebildete 5hmC wird entweder weiter über die TET Enzyme zu 5fC und 5caC oxidiert, oder über AID/APOBEC (engl.: activationinduced cytidine deaminase/ apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) Enzyme desaminiert und das Produkt 5hmU (5hydroxymethyluracil) über den Basenextinktionsmechanismus (BER, engl.: base excision repair) durch Cytosin ausgetauscht (Guo et al., 2011b). Ebenso kann 5mC über AID/APOBEC – BER wieder zu Cytosin umgewandelt werden (Zhu, 2009; Rai et al., 2008; Popp et al., 2010). 5fC und 5caC werden über DNA-Glykosylasen, wie die "Single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase" (SMUG1), "Methyl-CpG-binding domain protein 4" (MBD4) und die Thymin DNA Glykosylase (TDG) über BER zu unmethyliertem Cytosin regeneriert. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass der Abbau über TDG der wahrscheinlichste Weg ist, da im Gegensatz zu den anderen beiden Enzymen bei TDG eine signifikante Aktivität für 5fC und 5caC nachgewiesen wurde (He et al., 2011b; Maiti and Drohat, 2011). TDG erkennt und entfernt spezifisch 5fC und 5caC, aber weder Cytosin noch 5mC oder 5hmC in der doppelsträngigen DNA, wenn es mit Guanin gepaart ist (He et al., 2011a; Maiti and Drohat, 2011). TDG generiert abasische Enden, die durch den BER-Mechanismus erkannt und repariert werden.



Abbildung 7: (a) Gezeigt ist das aktive Zentrum von TDG gebunden an DNA, die ein Substratanalogon (Kogelberg et al.) zu 5caC besitzt. Die Heteroatome sind markiert nach Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot) und Phosphor (orange). Die Distanz der Wasserstoffbrückenbindungen ist in Å gemessen. (b) Der BER Reaktionsweg beinhaltet das Entfernen der abasischen Seite, Austauschen des Nukleotids in unmodifiziertes Desoxycytidin-Triphosphat (dCTP) durch die DNA-Polymerase, wobei Pyrophosphat (PPi) ensteht und anschließende Ligation, um die entstandene Lücke zu schließen (Kohli and Zhang, 2013).

1.4 Effekte des Enriched Environment auf die Hirnfunktion

Das Konzept des *Enriched Environment (EE)* wurde zuerst von Donald Hebb entworfen, als er Ratten erlaubte, sich in seinem Haus frei zu bewegen und herausfand, dass diese Ratten besser bei Problemlösungen abschnitten als herkömmliche Laborratten (Hebb, 1947). Seitdem wurden unzählige Studien durchgeführt, um die Effekte des *EE* auf das Verhalten von Tieren besser zu verstehen und die zugrundeliegenden Mechanismen zu identifizieren.

Zu *EE* gibt es viele verschiedene Protokolle, in welchen aber immer ein größerer Käfig und eine größere Gruppe an Tieren vorausgesetzt wird, welche wiederum durch komplexeres Sozialverhalten, Reize über verschiedene Spielmaterialen und die Möglichkeit zur physischen Aktivität verstärkt sensorisch, kognitiv, motorisch und visuell stimuliert werden (Bernstein, 1973). Das *EE* ist somit eine deutlich natürlichere Umgebung als eine konventionelle Laborhaltung für Tiere wie Mäuse und Ratten. Experimente, welche aufzeigen, wie *EE* die Hirnfunktionen beeinflussen kann, sind daher absolut notwendig, um Hirnfunktionen zu verstehen und wie sich diese beeinflussen lassen, um neurologische Erkrankungen zu verstehen und erfolgreich zu behandeln.



Abbildung 8: Foto des Enriched Environment Käfigs. Links mit den Klettermöglichkeiten abgebildet, rechts mit Holzhäuschen, Tunnel und verschiedenen Nestbaumaterialien sowie Laufrädern.

Enriched Environment verbessert das Lernverhalten und das Gedächtnis, kann auch genetisch bedingte Lerndefekte ausgleichen, sowie Symptome verschiedener neurologischer Erkrankungen wie M. Huntington, M. Alzheimer, Epilepsie, fragiles X Syndrom oder M. Parkinson abschwächen und verzögern (Nithianantharajah and Hannan, 2006). Es gibt verschiedene Theorien dazu, wie *EE* das Gehirn beeinflusst, unter anderem die "Erregungshypothese", die sich vor allem auf die Erregungsantwort von Tieren bei freiwilliger Bewegung bezieht (van Praag et al., 1999), im Vergleich zur "Lern-und Gedächtnishypothese", welche die zellulären Mechanismen, die dem Lernprozess unterliegen als Mediator der morphologischen Veränderungen im Gehirn sieht (Rosenzweig and Bennett, 1996).

Im hippocampalen Gyrus Dentatus (GD) findet Neurogenese das ganze Leben lang statt (Kempermann et al., 1998; Eriksson et al., 1998; Ming and Song, 2005; Spalding et al., 2013). GD Neurogenese ist ein mehrstufiger Prozess in welchem sternförmige, glia-ähnliche Vorläuferzellen proliferierende Vorläufer und Neuroblasten generieren, die zu granulären Neuronen im Gyrus Dentatus reifen und in Lernprozesse, Gedächtnisformierung und Gefühlsregulation eingebunden sind (Deng et al., 2009; Kitamura et al., 2009; Saxe et al., 2006; Snyder et al., 2005; Kempermann, 2002). Dass das *Enriched Environment* die hippocampale Neurogenese positiv beeinflusst, ist heute gut erforscht (Kempermann et al., 1997; Kempermann et al., 2002), obwohl noch nicht ausreichend geklärt ist, welche Stimuli (Bewegung, sozialer Kontakt, Komplexität der Umgebung, Stress) genau die hippocampale Neurogenese steigern (Fabel et al., 2009; Bednarczyk et al., 2011; Kronenberg et al., 2003; Leasure and Decker, 2009; Kannangara et al., 2009).

Das Kleinhirn ist, ebenso wie der Hippocampus, stark in den erfahrungsabhängigen Lernprozess eingebunden (Gelfo et al., 2011). Im Falle von Veränderungen in den Aktivitätsstrukturen kann es neue Verknüpfungen erstellen und sogar signifikante Veränderungen der Architektur vollziehen, um eine synaptische Reorganisation sicher zu stellen (Cesa et al., 2007). Umgebungsreize erhöhen die Anzahl an präsynaptischen Enden und erhöhen die Dichte an Moosfasern, sowie Kletterfasern in den tiefen Kernneuronen (Foscarin et al., 2012). Auch wird die Anzahl an glutaminergen, parallelen Faser Purkinje Synapsen und gabaergen, sternförmigen Purkinje Synapsen unter *EE* erhöht (Lonetti et al., 2010).

Enriched Environment bewirkt sowohl im Hippocampus als auch im Kleinhirn und anderen Hirnregionen veränderte Plastizität, wie erhöhte Neurogenese und Zellüberleben, Änderungen der glialen Morphologie und eine Hochregulierung von Wachstumsfaktoren, wie den Wachstumsfaktor Bdnf (engl.: brain derivedneurotrophic factor) (Ickes et al., 2000; Rossi et al., 2006) und unmittelbaren frühen Genen (engl.: immediate early genes) wie Fos (engl.: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog), Arc (engl.: activity-regulated cytoskeletonassociated protein) und Egr1 (engl.: early growth response protein 1).

1.5 Ernährung

Nicht nur die Kalorienaufnahme und die Zusammensetzung der Nahrung, sondern ebenso die zeitlichen Intervalle der Nahrungsaufnahme und auch der Aggregatzustand der Nahrung (flüssig, fest) beeinflussen die Proliferation und Differenzierung der neuralen Stamm-/Progenitorzellen. Restriktion der Kalorien erhöht die Anzahl an neu gebildeten Zellen im Gyrus Dentatus des Hippocampus und erhöht das Überleben von Zellen (Lee et al., 2002). Größere, zeitliche Abstände zwischen den Mahlzeiten, bei gleicher Kalorienanzahl, erhöhen ebenfalls die adulte hippocampale Neurogenese (Stangl and Thuret, 2009). Außerdem wird die Zellproliferation in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus durch Flüssignahrung in Form von angerührtem Pulver runter reguliert im Vergleich zu fester Nahrung (Aoki et al., 2005). Diese Parameter können den Charakter von neuralen Stamm-/Progenitorzellen beeinflussen, ebenso weitere Parameter wie Geruch und Geschmack, da sie wiederum auch die Nahrungsaufnahme beeinflussen. Fette sind die Hauptquelle für Lipide aus der Nahrung und haben direkten Einfluss auf Stamm-/Progenitorzellen. Einfache und gebundene Lipide werden metabolisiert oder hydrolysiert und in derivatisierte Lipide umgewandelt, wie Fettsäuren, Steroide und fett-lösliche Vitamine, welche hohe Bioreaktivität haben und verschiedenste biologische Funktionen besitzen. Nahrungsfette, auch Triglyceride genannt, werden durch die Pankreaslipase hydrolysiert und Fettsäuren werden vom Glycerin abgespalten. Diese Derivate können absorbiert werden und finden Verwendung in diversen Organen. Im Gehirn

sind Fettsäuren die wichtigste strukturelle Komponente, ungefähr die Hälfte der neuronalen Membranen bestehen aus Fettsäuren (Zérouga et al., 1991; Rapoport, 2005). Des Weiteren haben Neuronen komplexe Dendriten und lange Axone, welche von einer oligodendrozytischen Zellmembran umhüllt sind. Es gibt viele Belege dafür, dass Lipide eine entscheidende Rolle in neuronaler Entwicklung und Hirnfunktion haben und als extrinsischer Faktor im Gehirn wirken (Ryan et al., 2010). Ob und inwiefern die Ernährung sich auf epigenetische Faktoren im Gehirn auswirkt, ist bislang noch nicht erforscht.

1.6. "immediate early genes"

Altersabhängige neurodegenerative Erkrankungen nehmen in der immer älter werdenden Gesellschaft deutlich zu. Forschungen haben gezeigt, dass nur wenige neurodegenerative Erkrankungen den Mendelschen Regeln folgen und zum Beispiel beim M. Alzheimer und M. Parkinson ein Zusammenhang mit Umgebungsfaktoren, Ernährung und genetischen Risikofaktoren besteht (Lill and Bertram, 2011; Saxena and Caroni, 2011). Modifikationen in 5hmC wurden bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen bereits gefunden, wie zum Beispiel bei M. Alzheimer, Rett Syndrom, Schizophrenie und Autismus (Cheng et al., 2015; Szulwach et al., 2011; Tahiliani et al., 2009). Um neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, muss aber erst einmal der Zusammenhang zwischen äußeren Faktoren wie Ernährung und Lebensweise und epigenetischen Faktoren verstanden werden. Dass sich Enriched Environment morphologisch auf das Hirn auswirkt, zeigt sich an Modifikationen wie z.B. vergrößerte synaptische Endknöpfe, erhöhte synaptische Verzweigung und vermehrte dendritische Dornfortsätze und auch ein erhöhtes Neuron zu Glia Verhältnis (Globus et al., 1973; Rosenzweig and Bennett, 1972; van Praag et al., 2000; Volkmar and Greenough, 1972). Darauf basierend wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen auch neurochemische Veränderungen bei Tieren, die im Enriched Environment gehalten wurden, gefunden. Solche Veränderungen sind unter anderem erhöhte Genexpression von immediate early genes (IEGs) wie Arc, Bdnf, c-Fos und Egr1. IEGs generieren die Erstantwort auf Zellaktivierung, da ihre Induktion schnell sowie transient ist und nicht von der de novo Proteinsynthese abhängig ist (Herdegen and Leah, 1998; Kaczmarek and Chaudhuri, 1997).

Das *IEG* und Wachstumsfaktor *Arc* ist aktivitätsabhängig und die durch *Arc* enkodierte mRNA wird schnell zu den Dendriten des aktivierten Neurons transloziert. Die Translation passiert lokal am polyribosomalen Komplex der postsynaptischen Seite (Steward et al., 1998), wodurch es anatomisch gut positioniert ist, um Veränderungen in der dendritischen Struktur zu beeinflussen, wie Neuanordnung synaptischer Verzweigungen oder Aussprossen der Dendriten.

Bdnf ist ein Neurotrophin, welches die Fähigkeit besitzt, Signale in den Zellkern weiterzuleiten, um dort die Genexpression zu beeinflussen (Ehrlich and Josselyn, 2015). Die Expression des Bdnf ist aktivitätsabhängig und findet in Axonen oder Dendriten statt (Kohara et al., 2001; Kolarow et al., 2007; Matsuda et al., 2009), um dann entweder parakrin oder autokrin zu wirken (Cheng et al., 2011). Bdnf Dimere binden die extrazelluläre Domäne des Tropomyosinverwandten Kinase B Rezeptor (TrkB), was zu Rezeptordimerisierung und Autophosphorylierung führt. Anschließendes Binden von intrazellulären Adapterproteinen aktiviert drei Hauptsignalwege: ERK, Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und Phospholipase C- γ (PLC γ) (R. A. Segal and Greenberg, 1996).

Der induzierbare Transkriptionsfaktor *c-Fos* wurde bereits 1987 als Mitglied der AP-1 Familie beschrieben (Curran and Morgan, 1987), dessen Expression schnell und transient durch Stimuli wie Wachstumsfaktoren, sensorische Stimulation und Neurotransmitter induziert wird (Caputto and Guido, 2000; Hughes and Dragunow, 1995; Kovary and Bravo, 1992). c-Fos ist in die Formation einer Reihe von aktiven Heterodimeren mit anderen Proteinen involviert, die zur Familie der induzierbaren Transkriptionsfaktoren gehören. Der wichtigste Bindepartner ist c-Jun. Die gebildeten Dimere sind stark geladene, basische DNAbindende Transkriptionsfaktoren, die Aktivator Protein (AP-1) genannt werden. Die Aktivität von AP-1 wandelt wiederum kurzzeitige Signale in länger anhaltende Veränderungen durch Expressionsregulierung der Zielgene um, wie zum Beispiel Collagenase (Angel et al., 1987; Kovary and Bravo, 1992), Stromelysin (Kerr et al., 1990) oder Metallothionein IIA (Lee et al., 1987). Hört die Stimulation auf, wird c-Fos degradiert. Abhängig vom Zelltyp beträgt die Halbwertszeit Minuten bis zu wenigen Stunden (Basbous et al., 2008). 1990 wurde gezeigt, dass die Induktion von Langzeitpotenzierung im Gyrus Dentatus des Hippocampus einher geht mit robuster und schneller Transkription von *Egr1* in den aktivierten Granularzellen (Cole et al., 1989; Wisden et al., 1990). In Folge wurde weiter entdeckt, dass *Egr1* in Neuronen auch durch natürlich auftretende Umgebungsreize reguliert wird (Brennan et al., 1999; Hall et al., 2000). Die Induktion von *Egr1* mRNA tritt bereits 10 Minuten bis 2 Stunden nach Stimulation ein, abhängig vom NMDA Rezeptor. Da *Egr1* transient und schnell reguliert wird, ebenso wie die anderen IEGs, werden den *immediate early genes* eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Gedächtnisbildung zuge-sprochen und werden als Indikatoren bei Untersuchungen zu verhaltensbasie-render Aktivität in verschiedenen Hirnstrukturen verwendet.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob sich 5mC, 5hmC oder Enzyme die in der Methylierung bzw. Demethylierung involviert sind, durch *Enriched Environment* oder energiereicheres Futter global im Hirn beeinflussen lassen.

Dazu wurden je 10 C57/BI6 Weibchen im Alter von 3 Wochen, direkt nach Absetzen von ihrer Mutter im *Enriched Environment* gehalten oder als Kontrolltiere in Einzelkäfighaltung. Das *Enriched Environment* wurde in einem großen Nagetierkäfig mit verschiedenen Nestbaumaterialien, Tunneln, Nagetierhäuschen, verschiedenartigen Laufrädern durchgeführt, wobei alle 2-3 Tage die komplette Käfigeinrichtung geändert und teilweise getauscht wurde. Im *Enriched Environment* befanden sich zu jedem Zeitpunkt 10 Mäuse gleichzeitig in einem großen Käfig. Die Kontrollmäuse wurden einzeln, in Standard-Käfigen gehalten.

Für die verschiedenen Futtersorten wurden jeweils 3 Mäuse in einem Standard-Käfig gehalten und entweder mit Zucht- oder Haltungsfutter ernährt.

Nach 1, 7, 21 und 129 Tagen wurden die Tiere aus dem *Enriched Environment* und der Einzelkäfighaltung durch zervikale Dislokation getötet. Sowie nach 21, 129 und 273 Tagen die Tiere mit den verschiedenen Futtersorten. Das Gehirn wurde entnommen, die rechte Gehirnhälfte wurde für histologische Färbungen in Formalin fixiert und die linke Gehirnhälfte für DNA/RNA und Proteinisolation

in folgende Hirnregionen unterteilt und in Stickstoff eingefroren: Cortex, Basalganglien, Hippocampus, Thalamus, Mittelhirn, Kleinhirn und Stammhirn.

Von jeder *EE/SC*-Maus sollten nun die Genexpressionen der *"immediate early genes" Arc, Bdnf, c-Fos* und *Egr1* bestimmt werden, die als Indikator für verhaltensbasierte Aktivität dienen, um den Effekt des *Enriched Environment* auf das Gehirn zu bestätigen.

In einem weiteren Schritt sollte der Gesamtgehalt an 5mC und 5hmC in der DNA aus Hippocampus und Cerebellum der *EE*/SC-Mäuse verglichen werden.

Von jeder Maus sollten außerdem die Genexpressionen der DNA Methyltransferasen *Dnmt1*, *Dnmt3a* und *Dnmt3b*, der *ten-eleven-translocation* Proteine *Tet1*, *Tet2* und *Tet3*, sowie der in die Basenreparation involvierte Proteine *Mbd4*, *Smug1* und *Tdg* bestimmt und auf unterschiedliche Genexpressionen zwischen *EE/SC* bzw. F⁺/F⁻ untersucht werden um den Einfluss von Umgebungsfaktoren und Ernährung auf den Mechanismus der Methylierung und Demethylierung festzustellen.

Im letzten Schritt sollten die Mäuse auf histologische Unterschiede zwischen *EE/SC* und F^+/F^- in der Proteinexpression von Dnmt3a, Tet1 und Tdg als auch von 5mC und 5hmC im Gyrus Dentatus des Hippocampus und im Cerebellum untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung

Für die Versuche wurden ausschließlich Weibchen der Wildtypmauslinie C57/BI6 verwendet. Zum Schutz der Tiere wurde nach den Richtlinien des Instituts für Neuropathologie und Prionforschung und der Regierung von Oberbayern gearbeitet. Bei allen Tieren galt der Grundsatz möglichst schonend und mit möglichst wenig Stress für die Tiere zu arbeiten. Alle Tiere wurden täglich auf ihren Gesundheitszustand durch optische Kontrolle überprüft. Alle Tiere wurden mit einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten, sowie Wasser und Futter (Ssniff, V153x R/M-H auto bzw. V124x NM) *ad libitum.* Für die Gehirnentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere in Standardkäfigen wurden in der spezifiziert pathogenfreien (SPF) Tierhaltung im Haus in IVC-Käfigen gehalten.

2.1.1 Standardhaltung

Als Kontrolle für den *EE*-Versuch wurden Mäuse einzeln in Standardkäfigen gehalten.

Für die Kurzzeitversuche (0 Tage, 1 Tag, 7 Tage) wurden die Tiere aus der hausinternen Zucht verwendet, welche im Alter von 3 Wochen von ihrer Mutter getrennt und einzeln in Standardkäfige gesetzt wurden.

Tiere für die Langzeitversuche (21 Tage und 129 Tage) wurden von Janvier, St. Berthevin Cedex im Alter von 3 Wochen bezogen und einzeln in Standardkäfige gesetzt.

2.1.2 Enriched Environment

10 Tiere für die Kurzzeitversuche (1 Tag, 7 Tage) wurden aus der hausinternen Zucht im Alter von 3 Wochen in den *EE*-Käfig gesetzt (siehe Abbildung 9). In einem weiteren EE-Käfig wurden 10 Tiere für die Langzeitversuche (21 Tage, 129 Tage), ebenfalls im Alter von 3 Wochen, bezogen von Janvier, St. Berthe-

vin Cedex, gehalten. Der *EE*-Käfig hatte eine Größe von 82x51x40cm (BxTxH) und wurde alle 2-3 Tage mit verschiedenen Nestbaumaterialen (z.B. Zellulose, Holzwolle), Tunneln aus Plastik oder Holz, Häuschen, Brücken, Laufrädern und anderen Materialien neu gestaltet. Im Käfig waren zu jeder Zeit mindestens 2 Laufräder und 2 Häuschen vorhanden. Auch die Tränke und das Futter wurden alle 2-3 Tage an andere Stellen verbracht. Um die Anzahl von 10 Tieren über den Zeitraum konstant zu halten, wurden ohrlochmarkierte C57/Bl6 Weibchen ähnlichen Alters aus der hausinternen Zucht, zu den Entnahmezeitpunkten als Ersatz für die entnommenen Tiere mit in den *EE*-Käfig gesetzt.





2.1.3 Zuchtfutter/Haltungsfutter

Es wurden Tiere aus der hausinternen Zucht verwendet, welche im Alter von 3 Wochen von ihrer Mutter getrennt und jeweils zu dritt in Standardkäfige gesetzt wurden. Haltungsfuttermäuse (F⁻) wurden als Kontrolle mit Futter Ssniff, V153x R/M-H auto *ad libitum* gefüttert, Zuchtfuttermäuse (F⁺) mit Ssniff, V124x NM *ad libitum*, welches 10.5 % mehr umsetzbare Energie liefert (Abbildung 10).

Nach 21, 129 bzw. 273 Tagen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

Ssniff, V153x R/M-H			
Rohnährstoffe	[%]	Energie	[MJ/kg]
Trockensubstanz	87,7	Bruttoenergie (GE)	16,3
Rohprotein (N x 6,25)	19,0	Umsetzbare Energie (ME) *	12,8
Rohfett	3,3		
Rohfaser	4,9	58 % aus	
Rohasche	6,4	Kohlenhydraten	33 % aus
N-freie Extraktstoffe	54,1		Protein
Stärke	36,5	9 %	
Zucker	4,7	aus Fett	
Ssniff, V124x NM			
Rohnährstoffe	[%]	Energie	[MJ/kg]
Trockensubstanz	89,0	Bruttoenergie (GE)	17,4
Rohprotein (N x 6,25)	26,1	Umsetzbare Energie (ME) *	14,3
Rohfett	5,8		
Rohfaser	3,7	45 % aus	
Rohasche	7,0	Kohlenhydraten	41 % aus
N-freie Extraktstoffe	46,5		Protein
Stärke	26,9	14 %	
Zucker	0.0	aus Eatt	

Abbildung 10: Vergleich der Nährstoffe und der Energie der beiden unterschiedlichen Futtersorten. Das Zuchtfutter enthält 10,5% mehr an umsetzbarer Energie, da die Zusammensetzung aus mehr Protein und Fett im Vergleich zu Kohlenhydraten besteht. (ssniff.de/Katalog/Futtermittel für Ratten und Mäuse).

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-/RNA- und Proteinisolation

Nach Entnahme und mittigem, sagittalem Schnitt des Gehirns wurde die rechte Hirnhälfte nach den verschiedenen Hirnregionen unterteilt (Basalganglien, Cortex, Thalamusregion, Hippocampus, Mittelhirn, Kleinhirn, Hirnstamm) und die Regionen getrennt voneinander in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die Isolation von DNA, RNA und Protein erfolgte mit dem AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit von Qiagen (80004, Qiagen, Hilden). Das Gewebe wurde nach Angaben des Herstellers in RLT Puffer homogenisiert. Alle weiteren Isolationsschritte wurden nach dem Kitprotokoll durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte über die Messung am NanoDrop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt).

2.2.2 Bestimmung der RNA Integrität

Um eine hohe Probenqualität nach der Isolierung der RNA für die nachfolgende cDNA Synthese und qRT-PCR sicher zu stellen, wurde die RNA Integrität mittels Kapillargelelektrophorese überprüft. Hierfür wurde das RNA 6000 Pico Kit (5067-1513, Agilent, Böblingen) verwendet und nach Kitprotokoll gearbeitet. Die RNA-Integritätsnummer (RIN) ist ein der RNA-Qualität zugeordneter Zahlenwert, welcher auf Basis der ribosomalen RNA berechnet wird. Die ribosomalen 28S- zu 18S-rRNA und deren Verhältnis zueinander, sowie degradierte Abbauprodukte werden über eine Software berechnet und daraus ein RIN Wert auf einer Skala von 1 bis 10 ermittelt. Dabei entspricht der Wert 1 einer vollständig degradierten RNA und 10 einer völlig intakten RNA. RNA mit einer Qualität von einem RIN Wert über > 5 können für die qRT-PCR verwendet werden (Fleige et al., 2006). Da alle Proben RIN Werte von mindestens 6 erreichten, wurden alle Proben für die cDNA Synthese und nachfolgende qRT-PCR verwendet.

2.2.3 cDNA Synthese

RNA liegt einzelsträngig vor. Da in der quantitativen real-time PCR die Fluoreszenz eines Farbstoffes gemessen wird, der sich interkalierend in die Doppelstränge einlagert, muss eine Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA) erfolgen. Die Komplementierung der RNA wurde mit dem SuperScript® VILO[™] cDNA Synthesis Kit (11754-050, Invitrogen, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 1.25 µg RNA eingesetzt, mit 2 µl 5xVILO[™] Reaction Mix, 1 µl 10xSuperScript® Enzyme Mix in einem 200 µl Eppendorf-Gefäß gemischt und mit Nuklease-freiem Wasser (129114, Qiagen, Hilden) auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt (siehe Tabelle 1).

5x VILO™ Puffer	2µl	
10x SuperScript®	1µl	
RNA	xµl (2,5µl bei 500ng/µl)	
nukleasefreies Wasser	уµI (4,5µI bei 500ng/µI RNA)	
Gesamtvolumen	10µl	

Tabelle 1: Ansatz der reversen Transkriptionsreaktion

Anschließend wurde die Lösung in einem Thermoschüttler (Mastercycler gradient, Eppendorf) für 10min bei 25°C inkubiert, für 90min bei 42°C inkubiert und bei 85°C für 5min hitzeinaktiviert (siehe Tabelle 2). Die cDNA-Lösung wurde 1:10 in Wasser, nukleasefrei verdünnt und die Konzentration mit dem Nano-Drop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) bestimmt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 2: Reaktionszeiten und Temperaturen der reversen Transkriptionsreaktion			
Inkubation	10min	25°C	
Reverse Transkription	90min	42°C	
Ende der Reaktion	5min	85°C	
Kühlen	∞	4°C	

2.2.4 Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR

Die Sequenzen der Zielgene wurden über den ensemble Genome Browser (ensemble.org) gesucht und exonübergreifend gewählt, um sicher zu stellen, dass die verwendeten Primer nur an cDNA binden können. Entscheidend für die Auswahl der Primer waren neben der Produktgröße, die zwischen 170 und 220bp liegen sollte, die Schmelztemperatur (G/C-Gehalt über 50%), die für alle Primer bei ~60°C festgelegt wurde. Alle Primer wurden mit dem Programm Primer3web (http://primer3.ut.ee/) generiert und über Eurofins MWG GmbH, München bezogen (Sequenzen siehe Tabelle 5). Um die Effizienz jedes einzelnen Primerpaares zu ermitteln, wurde jeweils eine Verdünnungsreihe einer KontrollcDNA für alle Primerpaare (unverdünnt, 1:2, 1:4 und 1:8) vermessen und über die Roche LightCycler 480 Software ein logarithmisches Kurvendiagramm erstellt. Der C_T-Wert (von engl.: cycle threshold) gibt den Zyklus an, bei welchem die detektierte Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Durch diesen Punkt wird die lineare Regressionsgerade gelegt, um die Steigung der Kurve zu berechnen, die sich aus der nachweisbaren dsDNA im Laufe der PCR ergibt. Die Effizienz (E) für die einzelnen Primerpaare wurde über folgende Formel berechnet:

$E = 10^{-Steigung}$

Die Effizienz sollte im optimalen Fall bei 2.00 liegen. Dies würde bedeuten, dass sich die Menge der dsDNA pro Zyklus verdoppelt. Rein theoretisch kann somit kein Wert über E = 2.00 erreicht werden, jedoch kann dies aufgrund von Messungenauigkeiten vorkommen und es werden Werte für die Primereffizienz von 1.8 - 2.2 zugelassen, welche im Rahmen der comparative-C_T Methode keine negativen Auswirkungen auf das Endergebnis haben (Schmittgen and Livak, 2008). Die anschließende Schmelzkurvenanalyse dient zur Überprüfung der Spezifität der Primer. Spezifische Primer zeigen genau einen distinkten Peak. Sind mehrere Peaks zu erkennen, lässt das auf unspezifische Bindungen des Primerpaares, Kontamination der Probe oder Primerdimere schließen.

Die Expression der Zielgene wurde über relative Quantifizierung mit dem LightCycler 480 System (Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt (Programmparameter siehe Tabelle 3).

		5 1		•	
Aktivierung	1 Zyklus	00:03:00	95°C	4,4°C/s	
Quantifizierung	35 Zyklen				
	Denaturierung	00:00:05	95°C	4,4°C/s	
	Annealing	00:00:10	55°C	2,2°C/s	
	Elongation	00:00:30	72°C	4,4°C/s	
Ende	1 Zyklus	00:02:00	72°C	4,4°C/s	
Schmelzkurve	1 Zyklus				5 Werterfassungen/°C
		Start	95°C	0,11°C/s	
		Ende	40°C	2,2°C/s	

Tabelle 3: Programmparameter für die qRT-PCR

Es wurden jeweils 90ng cDNA mit 5µl SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit Mastermix (BIO-98002, Bioline, Luckenwalde) sowie jeweils 10⁻⁵pMol forward und reverse Primer (siehe Tabelle 4) pro Well eingesetzt.

	Tabelle 4: qPCR Ansatz pro well	
2x SYBR® Master Mix		5µl
Primer forward (10pmol/l)		1µl
Primer reverse (10pmol/l)		1µl

cDNA (30ng/µl)	3µl
Gesamtvolumen Jede Probe wurde in Triplikaten	$10 \mu I$ gemessen und mit der comparative C_T – Me-

thode (Schmittgen and Livak, 2008) ausgewertet.

$$\frac{X_{\text{Test}}}{X_{\text{Kontrolle}}} = 2^{\triangle \triangle C_{\text{T}}} = 2^{(C_{\text{T}, X} - C_{\text{T}, R})}_{\text{Kontrolle}} - (C_{\text{T}, X} - C_{\text{T}, R})_{\text{Test}}$$

X_{Test}: Zielgen

X_{Kontrolle}: Referenzgen

C_{T, X}: Zyklusanzahl der Probe bei welcher es zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität kam

CT, R: Mittelwert Zyklusanzahl der Housekeeper bei welcher es zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität kam

Für die Normalisierung des Zielgens wurde der Mittelwert der Housekeeping-Gene Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp verwendet. Außerdem wurde für jedes Zielgen eine Negativkontrolle mitgeführt (non-template-control, NTC), die Nukleasefreies Wasser statt cDNA enthielt. Durch den Einsatz eines Plattenkalibrators, einer konstanten Probe (ACTB, mit humaner, standardisierter cDNA) auf jeder Platte, konnten verschiedene qRT-PCR Läufe miteinander verglichen werden. Um die Spezifität der PCR-Reaktionen zu bestätigen, wurde für jede Probe am Ende des Laufs eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Tet3-for

Name	Sequenz 5'- 3'		
ACTB-for	GAAGATGACCCAGATCATGTTTGAG		
ACTB-rev	CTCGGTGAGGATCTTCATGAG		
Apobec1-for	GAGCCAGGACTGCTAGACAC		
Apobec1-rev	CTCTGAGTCAAGGCAAATCAG		
Apobec2-for	GCCTTCCAGTTTTACCTGCT		
Apobec2-rev	AGTGTCAGATGTCCAACTCCA		
Apobec3-for	TGGGGTCTTTAAGAACAAGGAC		
Apobec3-rev	CCAGGTGATCTTGAACTCTTCT		
Arc-for	CTGACTCACAACTGCCACAC		
Arc-rev	TGAGGAAGCCAGATCGTGTT		
Bdnf- for	ACAAGGCAACTTGGCCTACC		
Bdnf-rev3	TCGTCAGACCTCTCGAACCT		
c-Fos-for	CACAGGACTTTTGCGCAGAT		
c-Fos-rev	CACGGAGGAGACCAGAGTG		
Dnmt-1-for	TTGAGACCACTGTTCCTCCT		
Dnmt-1-rev	GGCTCTCATACAGGGAGACA		
Dnmt-3a-for	GATGGCAAGTTCTCAGTGGT		
Dnmt-3a-rev	TAGATGGCTTTGCGGTACAT		
Dnmt-3b-for	GAATTACACGCAGGACATGA		
Dnmt-3b-rev	GGTCTCACGGGTGAGCT		
Egr1-for	AACCCTATGAGCACCTGACC		
Egr1-rev	GGTTCAGGCCACAAAGTGTT		
Gapdh-for	GAGAAACCTGCCAAGTATGATG		
Gapdh-rev	CTTGACAAAGTTGTCATTGAGAGC		
Hprt-for	TGGACAGGACTGAAAGACTTG		
Hprt-rev	CAGCAGGTCAGCAAAGAACT		
lpo8-for	TCCAGATTTGGTGAGAGTCC		
lpo8-rev	CACTGTTTGGTGACTGCAAG		
Mbd4-for	CAGCTGCTCACAAGCCAAG		
Mbd4-rev	GGGATGCTGTCTTCTTGAAATG		
Smug1-for	CCAAACAGGGGTACCCTTTG		
Smug1-rev	GCAGAGGGTCCGGAAAAAG		
Tbp-for	GTGCCCAGCATCACTATTTC		
Tbp-rev	CCATGATTCTCCCTTTCTTCAG		
Tdg-for	CACCAGAAGCTCCAAAGAGA		
Tdg-rev	TTGTAGACTTGCCGGATTTCTTC		
Tet1-for	GAAGCACCGTGGTGTGTAC		
Tet1-rev	GAACAGGCTCAGTAAAACGTAG		
Tet2-for	GGCAGTACAGTGGTGGTCA		
Tet2-rev	CTTGGCTTTCTTGGGCTCC		

GTGCACTGTGGTCTGCAC

Tabelle 5: Primersequenzen für die qRT-PCR (alphabetisch)

Tet3-rev

CTCTGGGGAATGCTGTGAG

2.2.5 5mC/5hmC Quantifizierung

Um den globalen Gehalt an 5mC und 5hmC in der DNA der einzelnen Hirnregionen zu bestimmen, wurde das ELISA-basierte "MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric)" und das "MethylFlash Hydroxymethylated DNA Quantification Kit (Colorimetric)" (P-1034-96-EP, P-1036-96-EP, BioCat, Heidelberg) verwendet. Die Quantifizierung wurde jeweils in Triplikaten im 96-well Format durchgeführt. Für alle Messungen wurde der Optima Reader von BMG Labtech, Ortenberg verwendet. Nach Herstellerempfehlung wurden 100ng Gesamt-DNA/Well für die 5mC-Quantifizierung und 200ng Gesamt-DNA/Well für die 5hmC-Quantifizierung eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers wurde für jede Platte eine eigene Standardkurve aus den jeweiligen Positivkontrollen in Doppelmessungen generiert. Außerdem wurden pro Platte die im Kit enthaltenen Negativkontrollen in Duplikaten aufgetragen. Die Initiierungsreaktionszeit um die DNA an die beschichtete Platte zu binden betrug 90min bei 37°C in Bindungspuffer. Die Bindung des spezifischen Antikörpers erfolgte bei Raumtemperatur, ebenso wie die Bindung des Detektionsantikörpers. Die Entwicklung der abschließenden Farbreaktion erfolgte für 10min bei Raumtemperatur im Dunkeln und wurde mit Zugabe der Stopplösung abgeschlossen. Zwischen den verschiedenen Antikörperreaktionen sowie der Farbreaktion erfolgten jeweils mehrere Waschschritte. Für die absolute Quantifizierung wurde für jedes Well die Absorption bei 450nm gemessen (Endpunktbestimmung). Die Steigung (OD/ng) der Standardkurve wurde über lineare Regression mit Microsoft Excel errechnet, um den Gehalt an 5hmC bzw. 5mC jeder Probe zu ermitteln.

5hmC-Berechnung:

$$5hmC [ng] = \frac{OD [Probe] - OD [Negativkontrolle]}{Steigung \times 5}$$

Die Steigung muss mit dem Faktor 5 auf 100% normalisiert werden, da die Positivkontrolle nur 20% an 5hmC enthält.

$$5hmC [\%] = \frac{5hmC \ Gehalt \ [ng]}{Einsatz \ DNA \ [ng]Probe} \ x \ 100$$

5mC-Berechung:

$$5mC [ng] = \frac{OD [Probe] - OD [Negativkontrolle]}{Steigung \ x \ 2}$$

Die Steigung muss mit dem Faktor 2 auf 100% normalisiert werden, da die Positivkontrolle nur 50% an 5mC enthält.

$$5mC \ [\%] = \frac{5mC \ Gehalt \ [ng]}{Einsatz \ DNA \ [ng]Probe} \ x \ 100$$

2.3 Histologische Methoden

Nach Entnahme des Gehirns und Trennung der Hemisphären wurde jeweils die linke Gehirnhälfte unverzüglich in 4% gepuffertem Formaldehyd fixiert. Nach 2-3 Tagen, wurden die Maushirnhälften in Paraffinwachs maschinell eingebettet (FFPE – formalin fixed paraffin embedded). Schnitte mit einer Stärke von 4µm wurden am Schlittenmikrotom (SM200R, Leica, Wetzlar) angefertigt und anschließend auf Superfrost Plus Objektträger (631-9483, VWR, Ismaning) aufgebracht. Die Schnitte wurden vor Gebrauch in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Die allgemeine Morphologie des Hippocampus und Kleinhirns wurde mittels Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbungen dargestellt und analysiert.

2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die rehydrierten Paraffinschnitte wurden 10min in Hämalaun nach P. Mayer (2E-038, Chroma Waldeck GmbH, Münster) gefärbt. Anschließend wurde ca.10min in warmem Leitungswasser gewaschen, bis eine Blaufärbung deutlich wurde. 2-3maliges Eintauchen in 70% Alkohol zur Differenzierung wurde gefolgt von der Gegenfärbung in alkoholischer Eosinlösung (HT1101128, Sigma, Taufkirchen). Abschließend wurden die gefärbten Schnitte in aufsteigender Alkohol-reihe dehydriert und mit Eukitt (03989, Sigma, Taufkirchen) eingedeckt.

2.3.2 Immunhistochemische Färbung

Die Paraffinschnitte wurden entparaffiniert und rehydriert. Mehrmaliges Kochen in Citratpuffer führte zur Antigendemaskierung, mit Ausnahme von 5hmC Färbungen, hier wurden die Schnitte für 20min in 2M Salzsäure, bei 35°C inkubiert. Die Inaktivierung der endogenen Peroxidase erfolgte über Inkubation in 5% H₂O₂ in Methanol für 20min. Nach Waschen in PBS wurden die Schnitte in I-Block Blockingreagenz (T2015, Invitrogen, Darmstadt) blockiert und über Nacht mit primären Antikörpern bei 4°C inkubiert. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgeführt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit dem HRP-System DAB 2 Komponenten-Kit (DC137C100, DCS, Hamburg) nach Herstellerangaben entwickelt.

Antigen	Verdünnung	Katalognummer	Firma
5hmC	1:1000	39769	Active motif, Rixensart
5mC	1:3000	C15200081-10	Diagenode, Liège
Dnmt3a	1:400	2850	abcam, Cambridge
Ki67	1:100	16667	abcam, Cambridge
NeuN	1:500	MAB377	Millipore, Eschborn
Tdg	1:200	61438	active motif, Rixensart
Tet1	1:100	PA534906	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Tabelle 6: Liste aller genutzten primären Antikörper (alphabetisch)

Bei Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Schnitte nach dem Waschen mit den entsprechenden spezies-spezifischen, Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (goat-α-rabbit-IgG AlexaFluor®488 (A11034, ThermoFisher, Schwerte) und goat-α-mouse-IgG AlexaFluor®555 (ab150114, abcam)). Die Kerngegenfärbung erfolgte mittels 4´,6-Diamin-2-phenylindol (DAPI, 6335.1, Roth, Karlsruhe). Eingedeckt wurden die Schnitte mit Immunoselect Antifading Mounting Medium (CSR-38447, Dianova, Hamburg). Aufnahmen der Fluoreszenzfärbungen wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalem Lasermikroskop (Software Zen, Zeiss, Göttingen) oder mit einem Olympus IX50 Mikroskop (Software Cell D, Olympus, Hamburg) angefertigt.
2.4 Statistische Auswertungen

Die Prüfung statistischer Signifikanzen wurde mit dem Programm Prism6.07 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test verwendet. Die Daten sind als Mittelwert angegeben und die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittels (standard error of the mean, SEM) dar. Unterschiede wurden als signifikant erachtet, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war (****p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,05).

3 Ergebnisse

3.1 RNA Integrität und Primereffizienz

Zur Qualitätsprüfung der RNA-Proben wurden die RIN-Werte jeder einzelnen extrahierten RNA mit dem Agilent-2100-Bioanalyzer bestimmt. In Abbildung 11 sind 2 RNA-Proben (Sample 4 und 10) mit unterschiedlicher Integrität dargestellt. Abgebildet ist das Schema mit den Regionen des Elektropherogramms, welche für die für die Ermittlung der RIN-Werte über die geräteinterne Agilent Expert-Software herangezogen werden. Sample 4 in Abbildung 11 stammt aus dem Kleinhirn der Maus #22 (21 Tage im Enriched Environment), die einen RIN-Wert von 9,5 ergab und der höchste gemessene Wert war. Sample 10 in Abbildung 11 stammt aus dem Hippocampus der Maus #476 (7 Tage im Einzelkäfig) und ergab den niedrigsten gemessenen RIN-Wert mit 6,3. Der Unterschied der Integrität der beiden Proben ist deutlich an der Höhe der einzelnen Peaks zu erkennen, welche in Sample 10 deutlich kleiner sind. Des Weiteren ist hier auch der 28S-Peak im Verhältnis zum 18S-Peak eindeutig verkleinert, was den niedrigen RIN-Wert hervorruft. Für die anschließende cDNA-Synthese wurden alle RNA-Proben eingesetzt, da für alle ein RIN-Wert von über 6,0 gemessen wurde.



Abbildung 11: Elektropherogramm der RNA Proben mit dem höchsten und dem niedrigsten gemessenen RIN Wert. RNA Sample 4, Kleinhirn der Maus #22 (21 Tage *EE*), RIN: 9,50 (oben) und RNA Sample 10, Hippocampus der Maus #476 (7 Tage *SC*), RIN: 6,3 (unten) gemessen mit dem Total RNA Pico Kit (Agilent).

Um spezifische Primer für die Messung der relativen Genexpressionen zu finden, wurden die jeweiligen Sequenzen des Zielgens über den "ensemble Genome Browser" gesucht und mit Hilfe des Programms Primer3web passende Primer (siehe Material und Methoden 2.2.4) generiert. Die Sequenz für die ACTB-Primer ist in Abbildung 12 stellvertretend für alle Primer abgebildet. Aufeinanderfolgende Exons sind zur besseren Unterscheidung abwechselnd schwarz und blau geschrieben. Wenn es mit den Bedingungen für die Primer vereinbar war, wurden diese exonspannend gewählt wie für den Vorwärts-Primer von ACTB (gelb hinterlegt, unterstrichen). Der Revers-Primer (gelb hinterlegt) konnte nicht exonspannend gewählt werden, da dies ein zu großes Amplifikat hervorgerufen hätte und liegt somit innerhalb des Exons in dem auch der Vorwärts-Primer liegt.

Report for CCDS5341.1

ATGGATGATGATATCGCCGCGCTCGTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGCTTCGCGGGCG ACGATGCCCCCCGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGTGGGGCGCCCCAGGCACCAGGGCGTGATGGTGGGCAT GGGTCAGAAGGATTCCTATGTGGGCGACGAGGGCCCAGAGCAAGAGAGGCATCCTCACCCTGAAGTACCCC ATCGAGCACCGCCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGC TGCGTGTGGCTCCCGAGGAGCACCCCGTGCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGCGA <mark>CAAGATGACCCACATCATGTTTGAG</mark>ACCTTCAACACCCCAGCCATGTACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTA TCCCTGTACGCCTCTGGCCGTACCACTGGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGGTCACCCACACTGTGC CTAC<mark>CTCATGAAGATCCTCACCGAG</mark>CGCGGCTACAGCTTCACCACCACGGCCGAGCGGGAAATCGTGCGT GACATTAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAAGAGATGGCCACGGCTGCTTCCAGCT CCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCTGACGGCCAGGTCATCACCATTGGCAATGAGCGGTTCCGCTG CCCTGAGGCACTCTTCCAGCCTTCCTTGCGGCATGGAGTCCTGTGGCATCCACGAAACTACCTTCAAC TCCATCATGAAGTGTGACGTGGACATCCGCAAAGACCTGTACGCCAACACAGTGCTGTCTGGCGGCACCA CCATGTACCCTGGCATTGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACTGCCCTGGCACCCAGCACAATGAAGAT CAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCC ACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAAT GCTTCTAG

Abbildung 12: Sequenz mit dem verwendeten Primerpaar von ACTB. Die Exons sind zur besseren Differenzierung abwechselnd schwarz und blau geschrieben. Der Vorwärts-Primer von ACTB (gelb markiert, unterstrichen) ist exonspannend, für den Revers-Primer (gelb markiert) konnte exonspannend keine Sequenz mit den entsprechenden Eigenschaften (siehe Material und Methoden 2.2.4) gefunden werden, weshalb dieser nicht exonspannend liegt.

Um die Effizienz eines jeden Primerpaares zu bestimmen, wurden die Primerpaare mit einer Verdünnungsreihe an cDNA wie in 2.2.4 beschrieben ermittelt. Alle verwendeten Primerpaare zeigten eine Effizienz von 1.8 bis 2.2. In Tabelle 7 sind alle Primerpaare mit den ermittelten Effizienzen aufgeführt. Als Beispiel wird hier in Abbildung 13 das Ergebnis für die Effizienzprüfung von ACTB gezeigt.



Abbildung 13: **Messung der Verdünnungsreihe für cDNA** (oben) mit dem Primerpaar von ACTB (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8) und die daraus resultierende Standardkurve (unten), sowie die vom Programm LightCycler 480 (Roche) berechnete Effizienz von 1.953 (roter Kasten).

An diesem Beispiel kann man erkennen, wie der C_T-Wert für die unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen mit abnehmender Menge indirekt proportional zunimmt. Im darunter abgebildeten Diagramm stellt sich dies als Abhängigkeit zwischen C_T-Werten und dem Logarithmus der Konzentrationen dar.

Name	Effizienz
Apobec1	2,097
Apobec2	2,073
Apobec3	2,125
Arc	2,105
Bdnf	1,893
c-Fos	1,8
Dnmt-1	2,127
Dnmt-3a	2,101
Dnmt-3b	2,105
Egr1	2,014
Gapdh	1,884
Hprt	2,057
lpo8	1,935
Mbd4	1,936
Smug1	2,053
Тbp	1,866
Tdg	1,891
Tet1	1,857
Tet2	1,898
Tet3	1,902

Tabelle 7: Effizienzen der Primerpaare (alphabetisch)

3.2 Genexpression der *immediate early genes* in EE/SC- Mäusen

Um den Effekt des *Enriched Environment* im Vergleich zu Einzelkäfighaltung im Hippocampus und Cerebellum von Mäusen nachzuweisen, wurde die Genexpression von 4 *immediate early genes (Arc, Bdnf, c-Fos* und *Egr1*) als Aktivitätsmarker in jeweils 5 Mäusen pro Zeitpunkt über quantitative real time-PCR mit dem Roche LightCycler System 480 gemessen. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus Hippocampi und Cerebelli isoliert und nachfolgend revers transkribiert. Von der erhaltenen cDNA wurden jeweils 90ng pro Probe eingesetzt. Jedes Zielgen wurde in Triplikaten vermessen. Die berechneten relativen C_T- Werte wurden auf den 1 Tag *SC* C_T-Wert des jeweiligen Gens normiert, um relative Genexpressionsänderungen, hervorgerufen durch das Absetzen von der Mutter möglichst gering zu halten. Als Referenz dienten jeweils die Mittelwerte der *housekeeping Gene Gapdh, Hprt, Ipo8* und *Tbp*.

Bei allen 4 *IEGs* ist eine Zunahme der Genexpression über die Zeit zu verzeichnen (Abbildung 14). Bei *Arc* steigt die Genexpression im Hippocampus nach 7 Tagen durchgehend bis zu 129 Tagen *Enriched Environment* von 1,17 (7 Tage) auf 3,15 (129 Tage) an, wodurch sich ein Anstieg um das ~2,7-fache errechnet, im Vergleich zu *SC*, wo die Genexpression mit kleinen Schwankungen konstant bleibt. Lediglich der 129 Tage *EE*-Wert zeigt einen signifikanten Unterschied zu *SC* (p_{129} = 0,044).

Im Cerebellum zeigt sich von Tag 1 an ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen, welcher nahezu konstant während des Anstiegs über den gesamten Zeitraum bleibt. In beiden Gruppen steigt die Genexpression von *Arc* um das ~1,5-fache an.

Die relative Genexpression von *Bdnf* im Hippocampus steigt von 1,74 (1 Tag *EE*) und 1,02 (1 Tag *SC*) auf 3,50 (129 Tage *EE*, Faktor: 2,01) und 1,31 (129 Tage *SC*, Faktor: 1,3).

Im Cerebellum zeigen sich ähnliche Steigungsfaktoren mit Werten von 0,91 (1 Tag *EE*) und 1,01 (1 Tag *SC*) sowie 2,06 (129 Tage *EE*, Faktor: 2,3) und 1,50 (129 Tage *SC*, Faktor: 1,4).

Auch *c-Fos* wird mit zunehmendem Alter im Hippocampus der *EE*-Mäuse höher exprimiert mit relativen Werten von 1,36 (1 Tag *EE*) zu 3,22 (129 Tage *EE*, Anstieg um das ~2,4 fache), wobei ein deutlicher Einschnitt bei 21 Tagen *EE* auffällt. Im Gegensatz dazu bleibt die Genexpression bei *SC*-Mäusen nahezu konstant mit 1,05 bei 1 Tag *SC* zu 1,07 bei 129 Tagen *SC*. Bei 129 Tagen *EE* ist der Unterschied zwischen den beiden unterschiedlichen Haltungen signifikant ($p_{129}=0,002$).

Die Genexpression von *c-Fos* im Kleinhirn läuft zwischen Mäusen im Enriched Environment und Mäusen in Einzelkäfigen, ähnlich wie bei *Arc* sehr parallel und steigt über den gemessenen Zeitraum von 1.93 (1 Tag *EE*), bzw. 1,32 (1 Tag *SC*) auf 3,34 (129 Tage *EE*), bzw. 2,85 (129 Tage *SC*) an, was einen Anstieg um das ~1,7-fache für die Genexpression von *c-Fos* der *EE*-Mäuse bedeutet.

Eine große Differenz ist in der Genexpression von *Egr1* im Hippocampus zwischen *EE*- und *SC*- Mäusen zu sehen. Während die Genexpression bei den *SC*-Mäusen von 1,09 (1 Tag *SC*) auf 0,65 (129 Tage *SC*) abnimmt (Faktor: 1,6), steigt sie von 0,94 (1 Tag *EE*) auf 1,62 (129 Tage *EE*) in den *EE*- Mäusen in fast gleichem Maße an (Faktor: 1,7).

Im Cerebellum ist bei *Egr1* eine parallele Steigung der relativen Genexpression von 1,73 (1 Tag *EE*) und 1,10 (1 Tag *SC*) auf 2,70 (129 Tage *EE*) und 2,09 (129 Tage *SC*) über die Zeit sichtbar, woraus sich ein Anstieg um das ~1,6-fache für die im *Enriched Environment* gehaltenen Mäuse ergibt.

Auffällig ist bei allen IEGs die Zunahme des Standardfehlers bei 129 Tagen *EE* im Hippocampus vor allem im Vergleich zu den 129 Tagen *SC*- Mäusen und den relativen Genexpressionen des Cerebellums derselben Mäuse.



Abbildung 14: **Genexpression der immediate early genes** Arcadlin, brain-derived neurotrophic factor, Proto-oncogene c-Fos und early growth receptor 1 über maximal 129 Tage in EE (blau) bzw. SC (grau). Die C_T-Werte wurden über die comparative C_T-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die housekeeping Gene Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp der jeweiligen Maus als Referenz. Alle C_T- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 1 Tag single caged normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 5 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche LightCycler 480 gemessen.

3.3 DNA Methylierung

3.3.1 Quantitative Bestimmung von 5mC in EE/SC-Mäusen

Die quantitative Messung von 5mC erfolgte mit dem ELISA-basierten Methylflash Methylated DNA Quantification Kit. Es wurden für jede Messung 100ng extrahierte Gesamt-DNA eingesetzt und für jede Probe in Triplikaten die Absorption bei 450 nm gemessen. Anhand der generierten Standardkurve (im Doppelansatz, Abbildung 15), wurden die Mengen an 5mC berechnet.



Abbildung 15: **Standardkurve für die 5mC Messung** (hier für die Hippocampus Proben). Es sind die Absorptionen bei 450nm zu den Standardkonzentrationen mit linearer Regression im Doppelansatz dargestellt.

Die Bestimmung des 5mC Gehalts (Abbildung 16) für den Hippocampus zeigt in den *EE*-Mäusen eine Abnahme von 0,64% 5mC/Gesamt-DNA (0 Tage *EE/SC*) auf 0,53% 5mC/Gesamt-DNA bis zum Zeitpunkt von 21 Tagen *EE* und zum Zeitpunkt von 129 Tagen *EE* einen Anstieg auf 1,04% 5mC/Gesamt-DNA. Bei den *SC*-Mäusen verhält sich die Situation genau entgegen gesetzt, so dass hier

ein Anstieg von 0,64% 5mC/Gesamt-DNA (0 Tage *EE/SC*) auf 1,08% 5mC/Gesamt-DNA bis zum Zeitpunkt von 21 Tagen *SC* zu sehen ist und bei 129 Tagen *SC* eine deutliche Abnahme auf 0,43% 5mC/Gesamt-DNA. Im Kleinhirn steigt 5mC in beiden Haltungsbedingungen von 0,46% 5mC/Gesamt-DNA (0 Tage *EE/SC*) auf 0,93% 5mC/Gesamt-DNA (21 Tage *SC*) und 0,97% 5mC/Gesamt-DNA (21 Tage *EE*) an, fällt jedoch bei den *EE*- Mäusen zum Zeitpunkt von 129 Tagen auf 0,38% 5mC/Gesamt-DNA und für die *SC*- Mäuse auf 0,89% 5mC/Gesamt-DNA.



Abbildung 16: Quantitative Bestimmung von 5mC in Gesamt-DNA des Hippocampus bzw. Cerebellums über einen maximalen Zeitraum von 129 Tagen *EE* (weiß) bzw. SC (dunkelgrau) mit dem Methylflash Quantification Kit, basierend auf dem ELISA-Prinzip. Es wurden jeweils 100ng DNA pro Well aufgetragen und jede Probe in Triplikaten gemessen.

3.3.2 Histologische Untersuchungen von 5mC

Der Nachweis von 5mC auf zellulärer Ebene erfolgte mit einem Antikörper gegen 5mC, der mit einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt wurde. Durch die quantitative Analyse konnte die Menge an 5mC in Hippocampus und Kleinhirn global bestimmt werden, jedoch gibt die histologische Färbung Aufschluss darüber, wo 5mC im Gyrus Dentatus des Hippocampus und in der Körner- sowie Purkinjezellschicht des Kleinhirns unter den verschiedenen Haltungs- und Fütterungsbedingungen entsteht.

In den histologischen Färbungen von 5mC (Abbildung 18) ist aufgrund der hohen Anzahl an 5mC-positiven Zellen kein Unterschied zwischen *EE*- und *SC*-Mäusen erkennbar. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob sich die Anzahl an 5mC-positiven Zellen über die Zeit ändert und ob Unterschiede zwischen *EE* und *SC* bestehen, wurden jeweils in 5 Schnitten pro Zeitpunkt Zellauszählungen durchgeführt.

Nach 1 Tag in den unterschiedlichen Haltungsbedingungen ist die Anzahl der 5mC-positiven Zellen in beiden Mausgruppen nahezu gleich (Abbildung 17). Erst im weiteren Verlauf zeigen sich geringe Unterschiede in der Anzahl an 5mC-positiven Zellen. Im Hippocampus, ebenso wie im Cerebellum von *EE*-Mäusen sind zu den Zeitpunkten von 7, 21 und 129 Tagen mehr 5mC-positive Zellen als in *SC*-Mäusen gezählt worden. Im Cerebellum, wie im Hippocampus, nimmt die Anzahl der 5mC-positiven Zellen im zeitlichen Verlauf zu, wobei die Zunahme im Cerebellum deutlich geringer ausfällt. Auch ist der Unterschied zwischen *Enriched*- und Einzelkäfighaltung im Cerebellum geringer als im Hippocampus.



Abbildung 17: Auszählung der 5mC-positiven Zellen in FFPE-Schnitten von je 5 Mäusen, die in EE (weiß) oder SC (dunkelgrau) gehalten wurden, im Gyrus Dentatus des Hippocampus (links) und der Körnerzellschicht des Cerebellums (rechts). Es ist sowohl im Hippocampus als auch im Cerebellum eine Zunahme an 5mC-positiven Zellen mit fortschreitendem Alter zu sehen und in EE-Mäusen mehr 5mC-positive Zellen.



Abbildung 18: **5mC-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-129 Tagen in SC- bzw. EE-Haltung.** Aufgrund der hohen Anzahl an 5mC-positiven Zellen ist keine Zu- oder Abnahme an 5mC in der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus oder Cerebellums erkennbar. Man sieht im Gyrus Dentatus des Hippocampus eine Abnahme an 5mCpositiven Zellen in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus. Messbalken 500µm.

Wie bei den unterschiedlich gehaltenen Mäusen, ist auch bei den verschieden ernährten Mäusen die Zahl an 5mC-positiven Zellen sehr hoch (Abbildung 20). Um auch geringe Unterschiede in der Anzahl an 5mC-positiven Zellen zu ermitteln, wurden auch hier jeweils die 5mC-positiven Zellen in 3 Schnitten pro Zeitpunkt und Futterart in jeder Hirnregion gezählt. Die Zahl der 5mC-positiven Zellen steigt in beiden unterschiedlich gefütterten Mausgruppen mit zunehmendem Alter (Abbildung 19) im Gyrus Dentatus des Hippocampus und in der Körnerzellschicht des Cerebellums. Sowohl im Gyrus Dentatus des Hippocampus als auch in der Körnerzellschicht des Cerebellums zeigt sich eine höhere Anzahl an 5mC-positiven Zellen in den F⁻-Mäusen.



Abbildung 19: Auszählung der 5mC-positiven Zellen in FFPE-Schnitten von je 3 Mäusen, die mit Zuchtfutter (weiß) oder Haltungsfutter (dunkelgrau) ernährt wurden, im Gyrus Dentatus des Hippocampus (links) und der Körnerzellschicht des Cerebellums (rechts). Es ist sowohl im Hippocampus als auch im Cerebellum eine Zunahme an 5mC-positiven Zellen mit fortschreitendem Alter und mehr 5mC-positive Zellen in beiden Hirnregionen von F⁻-Mäusen zu erkennen.



Abbildung 20: **5mC-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-273 Tagen mit Haltungs-bzw. Zuchtfutter.** In der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus im Hippocampus sowie Cerebellums ist aufgrund der hohen Anzahl an 5mC-positiven Zellen keine Veränderung erkennbar. Im Gyrus Dentatus ist in der subgranulären Zone eine Abnahme mit fortschreitendem Alter der Mäuse zu sehen. Messbalken 500µm.

3.3.3 Immunfluoreszenzkofärbungen 5mC/Ki67

Um festzustellen, ob 5mC auf die Proliferation im Gyrus Dentatus des Hippocampus einen Einfluss hat, wurden Hirnschnitte von Mäusen mit 0 und 129 Tagen in unterschiedlichen Haltungsbedingungen, sowie 0 und 273 Tagen mit unterschiedlicher Ernährung mit Antikörpern gegen 5mC, sowie Ki67 behandelt und über Alexa-Fluor-gekoppelten Sekundärantikörpern (Alexa488 (grün) sowie Alexa546 (rot)) parallel detektiert. Sowohl für die unterschiedlich gehaltenen Mäuse, als auch für die unterschiedlich ernährten Mäuse ist eine Abnahme an Ki67 von 0 Tagen zu 129 bzw. 273 Tagen sichtbar (Abbildung 21 und 22).



Abbildung 21: Kofärbung von Ki67 und 5mC im Gyrus Dentatus des Hippocampus von 0 Tagen sowie 129 Tagen SC und EE Mäusen. Ki67 nimmt im Alterungsprozess ab. Zu allen

Zeitpunkten ist eine Kolokalisation von Ki67 mit 5mC zu sehen, aber kein Unterschied zwischen den beiden Haltungsbedingungen.

Zellen, die als Ki67 positiv identifiziert wurden, sind zu allen Zeitpunkten und unabhängig von Haltung oder Futter gleichzeitig 5mC-positiv, jedoch sind deutlich weniger Ki67-positive Zellen zu sehen, als 5mC-positive Zellen. Vor allem bei den 0 Tage *EE/SC*- und F⁻/F+ -Mäusen ist eine Häufung an Ki67-positiven Zellen in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus zu sehen.



Abbildung 22: Kofärbung von Ki67 und 5mC im Gyrus Dentatus des Hippocampus von 0 Tagen sowie 129 Tagen F⁻- und F⁺- Mäusen. Ki67 nimmt im Alterungsprozess ab. Zu allen Zeitpunkten ist eine Kolokalisation von Ki67 mit 5mC zu sehen, jedoch kein Unterschied zwischen den verschiedenen Futterarten.

3.3.4 Genexpression von Dnmt1, Dnmt3a und Dnmt3b

Um die globale Expression der DNA-Methylasen *Dnmt1, Dnmt3a* und *Dnm3b* zu analysieren, wurden die cDNAs der verschiedenen Mäuse in Triplikaten über den Roche LightCycler480 gemessen und über die comparative C_T -Methode ausgewertet (Abbildung 23, 24).

Für *Dnmt1* ist eine Zunahme der relativen Genexpression von 0,69 (1 Tag *EE*) und 0,67 (1 Tag *SC*) auf 0,98 (129 Tage *EE*, Faktor: 1,4) und 0,83 (129 Tage *SC*, Faktor: 1,2) im Hippocampus zu sehen, die sich nicht signifikant zwischen *EE*- und *SC*-Mäusen unterscheidet.

Im Cerebellum ist bei 7 Tagen und 129 Tagen eine signifikant höhere Genexpression von *Dnmt1* in *EE*-Mäusen zu verzeichnen ($p_7=0,040$; $p_{129}=0,007$), wobei sich die relativen Genexpressionswerte für die im *Enriched-Environment* gehaltenen Mäuse von 0,81 (1 Tag *EE*) auf 2,02 (129 Tage *EE*, Faktor: 2,49) erhöhen und für die im Einzelkäfig gehaltenen Mäuse von 0,73 (1 Tag *SC*) auf 1,32 (129 Tage *SC*, Faktor: 1,8) erhöhen.

Die relative Genexpression von *Dnmt3a* sinkt sowohl im Hippocampus als auch im Cerebellum in *EE*- wie *SC*-Mäusen mit zunehmendem Alter. Im Hippocampus sinken die relativen Werte von 1,11 (1 Tag *EE*) und 1,21 (1 Tag *SC*) auf 0,81 (129 Tage *EE*, Faktor: 1,37) und 0,67 (129 Tage *SC*, Faktor: 1,8) und wird in *SC*-Mäusen stärker runter reguliert als in *EE*-Mäusen.

Interessant ist die Angleichung der Genexpression von *Dnmt3a* im Cerebellum der *SC*- und *EE*-Mäuse nach 21 Tagen, trotz signifikantem Unterschied nach 1 Tag *EE* bzw. *SC* (p_1 =0,04) mit Werten von 0,99 (1 Tag *EE*) und 1,39 (1 Tag *SC*) über 0,79 (21 Tage *EE*) und 0,83 (21 Tage *SC*) bis zu 0,80 (129 Tage *EE*, Faktor: 1,24) und 0,71 (129 Tage *SC*, Faktor: 1,96).

Die relative Genexpression von *Dnmt3a* nimmt wie bei *Dnmt1* für die *SC*- Mäuse stärker ab. Die Genexpression von *Dnmt3b* zeigt sich sehr unregelmäßig, so ist sie zwischen *SC*- und *EE*-Mäusen im Hippocampus, wie auch im Cerebellum nach 1 Tag noch annähernd gleich, entwickelt sich jedoch dynamisch weiter.



Abbildung 23: Darstellung der relativen Genexpression der *Dnmts 1, 3a* und *3b* in *EE*-(blau) und *SC*-Mäusen (grau) über einen Zeitraum von maximal 129 Tagen. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression, die X-Achse die jeweiligen Zeitpunkte. Die C_T-Werte wurden über die comparative C_T-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die housekeeping Gene *Gapdh, Hprt, Ipo8* und *Tbp* der jeweiligen Maus als Referenz. Alle C_T-Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen *Enriched Environment*/Einzelkäfig normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 5 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche LightCycler 480 gemessen.

Im Hippocampus hat die Genexpression von *Dnmt3b* nach 7 Tagen in *EE*– Mäusen einen signifikant höheren relativen Wert von 1,67 als in *SC*- Mäusen mit einem relativen Wert von 0,82 ($p_7=0,03$) und nimmt nachfolgend zu 21 Tagen hin aber wieder ab (EE: 0,81; SC: 0,62). Bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen steigt die relative Genexpression von *Dnmt3b* sowohl in *EE*- Mäusen (1,39) als auch *SC*-Mäusen (1,51) an. Im Cerebellum zeigt sich ein signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt von 7 Tagen (p₇=0,02), wo die Genexpression von *Dnmt3b* in den *Enriched Environment* gehaltenen Mäusen deutlich erhöht ist mit einem relativen Wert von 4,57 und nachfolgend bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen deutlich abnimmt mit einem relativen Wert von 2,70, während die Genexpression von *Dnmt3b* in den *SC*-Mäusen bis zu 21 Tagen hin zunimmt und sich mit einem relativen Wert von 2,15 dem Level der *EE*-Mäuse annähert. Bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen nimmt die relative Genexpression von *Dnmt3a* in *SC*-Mäusen auf 1,71 ab.

In den Mäusen, die unterschiedliche Futtersorten erhielten, steigt die Genexpression von *Dnmt1* mit zunehmendem Alter an (Abbildung 24), wobei die Zunahme im Cerebellum gering ist. Im Hippocampus der F⁻-Mäuse ist die relative Genexpression zu allen Zeitpunkten höher (21 Tage: 0,87; 129 Tage: 1,44; 273 Tage: 2,11) als in den F⁺-Mäusen (21 Tage: 0,14; 129 Tage: 0,51; 273 Tage: 1,12), die Unterschiede sind aber nicht signifikant. Im Vergleich von 273 Tagen zu 21 Tagen zeigt sich eine Erhöhung für die F⁻-Mäuse um das 2,4-fache und für die F⁺-Mäuse um das 8-fache.

Die relative Genexpression von *Dnmt1* im Cerebellum zeigt für die F⁻-Mäuse eine konstante Zunahme von 21 Tagen mit einem relativen Wert von 0,89 zu 273 Tagen mit einem relativen Wert von 0,98, was einer Zunahme der relativen Genexpression um das 1,1-fache entspricht. Bei den F⁺-Mäusen erhöht sich die relative Genexpression von 21 Tagen mit einem relativen Wert von 0,91 bis zum Zeitpunkt von 273 Tagen mit einem relativen Wert von 1,01 ebenfalls um das 1,1-fache, jedoch ist die relative Genexpression von *Dnmt1* zum Zeitpunkt von 129 Tagen in den F⁺-Mäusen deutlich auf einen relativen Wert von 0,66 verringert.



Abbildung 24: Darstellung der relativen Genexpression der Dnmts 1, 3a und 3b in F+ (blau) und F- Mäusen (grau) über einen Zeitraum von maximal 273 Tagen. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression, die X-Achse zeigt die jeweiligen Zeitpunkte. Die C_T-Werte wurden über die comparative C_T-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die housekeeper Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp der jeweiligen Maus als Referenz. Alle C_T- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen F⁻/F⁺ normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 3 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche LightCycler 480 gemessen.

Im Hippocampus der Mäuse die mit Zuchtfutter ernährt wurden findet eine Zunahme der relativen Genexpression von *Dnmt3a* statt (21 Tage: 0,32; 129 Tage: 0,50; 273 Tage: 0,64), in den mit Haltungsfutter ernährten Mäusen nimmt die Genexpression zwischen 21 Tagen (0,49) und 129 Tagen (0,99) deutlich zu, sinkt aber bis zum Zeitpunkt von 273 Tagen ab auf einen relativen Wert von 0,65. Im Cerebellum ist die Genexpression von Dnmt3a nach 21 Tagen bereits auf 0,64 (F-) und 0,24 (F+) gefallen, was einen signifikanten Unterschied zeigt (p_{21} =0,0002). Interessanterweise sinkt die relative Genexpression im Fall der mit Haltungsfutter ernährten Mäuse weiter ab mit einem relativen Wert von 0,54 zum Zeitpunkt von 129 Tagen und einem signifikantem Unterschied zu den mit Zuchtfutter ernährten Mäusen, die einen Anstieg auf den Wert von 0,25 zum Zeitpunkt von 129 Tagen zeigen (p_{129} =0,004). Zum Zeitpunkt von 273 Tagen gleichen sich die relativen Genexpressionen an, mit einem relativen Wert für die F⁻-Mäuse von 0,54.

In den unterschiedlich ernährten Mäusen zeigt sich für Hippocampus und Cerebellum ein sehr ähnliches Muster der Genexpression von *Dnmt3b*.

Nach 21 Tagen unterschiedlicher Ernährung ist im Hippocampus die relative Genexpression in F⁺-Mäusen signifikant erhöht (4,86; p_{21} =0,000026) im Vergleich zu F⁻-Mäusen (0,41), jedoch sinkt diese bis zu 129 Tagen unterschiedlichen Futters unter das Niveau der haltungsfutterernährten Mäuse ab und nähert sich erst nachfolgend wieder an die steigende Genexpression der F⁻-Mäuse an, bleibt jedoch unterhalb des Genexpressionsniveau der haltungsfutterernährten Mäuse.

Für das Cerebellum zeigt sich die relative Genexpression von *Dnmt3b* nach 21 Tagen Zuchtfutter ebenfalls deutlich erhöht (5,36) im Vergleich zu 21 Tagen Haltungsfutter (1,17; p₂₁=0,0004). Für die mit Zuchtfutter ernährten Mäuse sinkt die relative Genexpression von *Dnmt3b* zum Zeitpunkt von 129 Tagen stark ab auf einen relativen Wert von 0,86 und steigt zum Zeitpunkt von 273 Tagen nur noch gering auf einen relative Genexpression von 1,1. Für die mit Haltungsfutter ernährten Mäuse sinkt die relative Genexpression von *Dnmt3b* kontinuierlich ab (129 Tage: 1,17, 273 Tage: 1,07). Nach 273 Tagen unterschiedlichen Futters zeigt sich kein nennenswerter Unterschied in der relativen Genexpression zwischen den beiden Gruppen.

3.3.5 Histologische Färbungen von Dnmt3a

Um Dnmt3a auf Proteinebene und zelltypspezifisch nachzuweisen, wurden die sagittalen FFPE-Schnitte mit einem Antikörper gegen Dnmt3a gefärbt. Wie in der Genexpressionsanalyse sieht man auch bei den histologischen Schnitten der EE-und SC-Mäuse eine deutliche Abnahme mit zunehmendem Alter (Abbildung 25). Bei 1 Tag und 7 Tagen ist kein Unterschied zwischen den Enriched Environment gehaltenen Mäusen und den im Einzelkäfig gehaltenen Mäusen zu sehen, nach 21 Tagen sowie 129 Tagen, im Gyrus Dentatus, sowie im Cerebellum sind mehr Dnmt3a-positive Zellen, die auch eine intensivere Färbung aufweisen in den EE-Mäusen lokalisiert. Im Gyrus Dentatus sind fast ausschließlich Zellen der subgranulären Zone Dnmt3a-positiv. Interessant ist die Färbung von Dnmt3a im Kleinhirn. Ist bei dem Ausgangswert von 0 Tagen die gesamte Körnerzellschicht deutlich Dnmt3a-positiv und die Purkinjezellschicht Dnmt3anegativ, so nimmt die Intensität und die Anzahl der Dnmt3a-positiven Zellen mit zunehmendem Alter ab, jedoch sind bei 129 Tagen die Purkinjezellen positiv, wobei die Anzahl der Dnmt3a-positiven Zellen und deren Intensität bei den im Enriched Environment gehaltenen Mäusen höher ist. Zwischen den mit Zuchtund Haltungsfutter ernährten Mäusen ist bezüglich der Futterart kein Unterschied in Anzahl oder Intensität der Dnmt3a-positiven Zellen zu sehen (Abbildung 26), jedoch wie bei den Enriched- und Einzelkäfig gehaltenen Tieren, verringert sich die Anzahl Dnmt3a-positiver Zellen mit zunehmendem Alter. Im Cerebellum findet auch hier die Verschiebung der Dnmt3a Proteinexpression von der Körnerzellschicht in die Purkinjezellschicht ab 21 Tagen statt.



Abbildung 25: Dnmt3a-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-129 Tagen in SC- bzw. *EE*-Haltung. In der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus im Hippocampus, ebenso wie in der Körnerzellschicht des Cerebellums nimmt die Anzahl an Dnmt3a-positiven Zellen mit fortschreitendem Alter ab. In *EE*- Mäusen sind mehr Dnmt3a-positive Zellen als in *SC*-Mäusen sichtbar.

Messbalken Gyrus Dentatus: 200µm, Cerebellum: 100µm.



Abbildung 26: Dnmt3a-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-273 Tagen mit Haltungs- bzw. Zuchtfutter. In der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus im Hippocampus, ebenso wie in der Körnerzellschicht des Cerebellums nimmt die Anzahl an Dnmt3a-positiven Zellen mit fortschreitendem Alter ab. Es ist kein Unterschied zwischen den beiden Futterarten in der Proteinexpression von Dnmt3a zu erkennen. Messbalken: Gyrus Dentatus: 200µm, Cerebellum: 100µm.

3.3.6 Immunfluoreszenzkofärbung von Dnmt3a/NeuN

Der Antikörper NeuN färbt nicht-proliferierende, postmitotische Neuronen mit Ausnahme von Purkinjezellen. Um festzustellen, ob die de novo Methyltransferase Dnmt3a in postmitotischen Zellen noch exprimiert wird, wurden Schnitte der Ausgangswerte mit 0 Tagen EE/SC bzw. F+/F- und der letzte Zeitpunkt von Enrichedbzw. Einzelkäfig-gehaltenen und Zuchtfutter-/Haltungsfutterernährten Mäusen mit DAPI/Dnmt3a/NeuN gefärbt. In allen 4 Versuchsgruppen nimmt die Anzahl an Dnmt3a-positiven Zellen alterungsbedingt ab. NeuN wird über alle Zeitpunkte und Haltungs- bzw. Fütterungsbedingungen in der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus des Hippocampus, wie auch im Cerebellum gleichmäßig angefärbt. Eine Kofärbung für Dnmt3a und NeuN konnte bei keinem Bild gefunden werden. Bei dem Ausgangswert von 0 Tagen (Abbildung 27, 28) im Gyrus Dentatus des Hippocampus ist deutlich zu erkennen, dass die subgranuläre Zone Dnmt3a-positive Zellen beinhaltet, die alle NeuN-negativ sind. Bei den späteren Zeitpunkten sind die wenigen Dnmt3a-positiven Zellen ebenfalls NeuN-negativ. Im Cerebellum erscheinen Dnmt3a-positive Zellen der Körnerzellschicht ebenfalls NeuN-negativ, die Purkinjezellschicht ist NeuNnegativ aufgrund der fehlenden Immunreaktivität mit dem Antikörper gegen NeuN.



Abbildung 27: Kofärbung von Dnmt3a und NeuN im Gyrus Dentatus des Hippocampus (oben) und des Cerebellums (unten) von 0, 129 Tagen SC- und 129 Tagen EE- Mäusen. Dnmt3a nimmt im Alterungsprozess ab. Es ist keine Kofärbung von Dnmt3a und NeuN bei 0 Tage Mäusen zu sehen. Vereinzelte Dnmt3a-positive Zellen sind in 129 Tagen EE- Mäusen zu sehen, die ebenfalls keine Kolokalisation mit NeuN zeigen.



Abbildung 28: Kofärbung von Dnmt3a und NeuN im Gyrus Dentatus des Hipoocampus (oben) und des Cerebellums (unten) von 0 und 273 Tagen von Haltungs-bzw- Zuchtfutter-Mäusen. Abnahme von Dnmt3a im Alterungsprozess. Keine Kofärbung von Dnmt3a und NeuN bei 0 Tage Mäusen. Vereinzelte Dnmt3a-positive Zellen in 273Tage Zucht- bzw. Haltungsfutter-Mäusen zeigen ebenfalls keine Kolokalisation mit NeuN. In allen drei Altersstufen sind die Purkinjezellen Dnmt3a-positiv.

3.4 DNA Hydroxymethylierung

3.4.1 Quantitative Bestimmung von 5hmC in EE- und SC- Mäusen

Die quantitative Messung von 5hmC erfolgte mit dem ELISA-basierten Methylfash Hydroxymethylated DNA Quantification Kit. Es wurden für jede Messung 200ng extrahierte Gesamt-DNA eingesetzt und für jede Probe in Triplikaten die Absorption bei 450nm gemessen. Anhand der generierten Standardkurve (im Doppelansatz, Abbildung 29), wurden die Mengen an 5hmC berechnet.



Abbildung 29: **Standardkurve für die 5hmC Messung** (hier für die Hippocampus Proben) Es sind die Absorptionen bei 450nm zu den Standardkonzentrationen mit linearer Regression im Dop-pelansatz dargestellt.

Die Bestimmung des 5hmC-Gehalts für den Hippocampus (Abbildung 30, links) zeigt einen kontinuierlichen Anstieg von 0.05% 5hmC/Gesamt-DNA zum Ausgangszeitpunkt vor den unterschiedlichen Haltungsbedingungen bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen *EE* mit 0,22% 5hmC/Gesamt-DNA, wo der Unterschied zum 5hmC Gehalt der *SC*-Mäuse mit 0,07% 5hmC/Gesamt-DNA Signifikanz (p₁₂₉=0,007) zeigt. Der globale 5hmC-Gehalt im Hippocampus der *EE*- Mäuse zeigt einen 3,3-fachen Anstieg vom Ausgangswert (0 Tage *EE/SC*) bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen *EE*. Bei den *SC*-Mäusen zeigt sich keine eindeutige Zu- oder Abnahme im 5hmC Gehalt, sondern lediglich Schwankungen im Bereich von 0,06 – 0,10% 5hmC/Gesamt-DNA.



Abbildung 30: Quantitative Bestimmung von 5hmC in Gesamt- DNA des Hippocampus bzw. Cerebellums über einen maximalen Zeitraum von 129 Tagen *EE* (weiß) bzw. SC (dunkelgrau) mit dem Methylflash Quantification Kit, basierend auf dem ELISA-Prinzip. Es wurden jeweils 200ng DNA pro well aufgetragen und jede Probe in Triplikaten gemessen.

Im Kleinhirn steigt der globale 5hmC-Gehalt in beiden Haltungsbedingungen von 0,02% 5hmC/Gesamt-DNA zum Ausgangszeitpunkt mit 0 Tagen EE/SC bis zum Zeitpunkt von 21 Tagen (21 Tage SC: 0,1 5hmC/Gesamt-DNA; 21 Tage EE: 0,12% 5hmC/Gesamt-DNA) an (Abbildung 30, rechts), wobei der 5hmC Gehalt in den *Enriched Environment*-gehaltenen Mäusen immer etwas höher ist als bei den *SC*-Mäusen. Nach 129 Tagen ist bei den *EE*-Mäusen eine deutliche Abnahme auf 0,05% 5hmC/Gesamt-DNA zu sehen, im Gegensatz zu den *SC*-Mäusen, deren globaler Gehalt an 5hmC weiter auf 0,11% 5hmC/Gesamt-DNA steigt.

3.4.2 Histologische Färbungen von 5hmC

Der Nachweis von 5hmC erfolgte mit einem Antikörper gegen 5hmC, welcher mit einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde. Die globale Menge an 5hmC in Hippocampus und Kleinhirn wurde über die guantitative Analyse mit dem Methylflash Hydroxymethylated DNA Quantification Kit bestimmt, die histologischen Färbungen geben Aufschluss darüber, wo 5hmC im Gyrus Dentatus des Hippocampus und in der Körner- sowie Purkinjezellschicht des Kleinhirns unter den verschiedenen Haltungs- und Fütterungsbedingungen exprimiert wird. Im Hippocampus sind bei den Zeitpunkten von 21 Tagen und 129 Tagen mehr 5hmC-positive Zellen als in den früheren Zeitpunkten (0 Tage, 1 Tag, 7 Tage) vor allem im Bereich der subgranulären Zone zu sehen (Abbildung 32). Ein Unterschied zwischen der Enriched- und der Einzelkäfighaltung wird in der Auszählung von 5hmC-positiven Zellen in den FFPE-Schnitten der jeweils 5 EEbzw. SC-Mäuse deutlich, wo mehr 5hmC-positive Zellen in den EE-Mäusen gezählt wurden (Abbildung 31). Ebenso fällt die Zunahme von 5hmC-positiven Zellen im Cerebellum der frühen Zeitpunkte (0 Tage, 1 Tag, 7 Tage) im Vergleich zu den späteren Zeitpunkten (21 Tage, 129 Tage) auf (Abbildung 32). Im Cerebellum nimmt somit 5hmC ebenfalls mit dem Alterungsprozess zu und es sind wie im Hippocampus, mehr 5hmC-positive Zellen in den EE-Mäusen zu erkennen (Abbildung 31, 32).



Abbildung 31: Auszählung der 5hmC-positiven Zellen in FFPE-Schnitten von jeweils 5 Mäusen welche in SC (dunkelgrau) oder EE (weiß) gehalten wurden. Im Gyrus Dentatus (links) wie im Cerebellum (rechts) sieht man eine Zunahme an 5hmC-positiven Zellen mit fortschreitendem Alter. In beiden Hirnregionen sind mehr 5hmC-positive Zellen in den EE-Mäusen zu verzeichnen.



Abbildung 32: **5hmC-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-129 Tagen in SC- bzw. EE-Haltung**. In der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus im Hippocampus sowie Cerebellums nimmt die Anzahl der 5hmC-positiven Zellen mit fortschreitendem Alter zu. Zwischen *EE/SC* ist kein Unterschied zu erkennen. Messbalken 200µm.

Wie im *Enriched*-Versuch steigt die Zahl der 5hmC-positiven Zellen in beiden unterschiedlich gefütterten Mausgruppen zwar mit zunehmendem Alter (Abbildung 33, 34) bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen, sowohl im Gyrus Dentatus des Hippocampus als auch Cerebellum an, es ist jedoch erst bei 273 Tagen unterschiedlichen Futters eine erhöhte Anzahl an 5hmC-positiven Zellen in den mit Haltungsfutter ernährten Mäusen zu erkennen. Interessant ist die Stagnation von 5hmC-positiven Zellen ab einem Zeitpunkt von 21 Tagen im Gyrus Dentatus des Hippocampus (Abbildung 33), die sich im Cerebellum jedoch nicht zeigt.



Abbildung 33: Auszählung der 5hmC-positiven Zellen in FFPE-Schnitten von jeweils 3 Mäusen welche mit Haltungsfutter (dunkelgrau) oder Zuchtfutter (weiß) ernährt wurden. Im Gyrus Dentatus des Hippocampus (links) wie im Cerebellum (rechts) sieht man eine Zunahme an 5hmC-positiven Zellen mit fortschreitendem Alter. In beiden Hirnregionen sind mehr 5hmC-positive Zellen in den mit Haltungsfutter ernährten Mäusen zu verzeichnen.



Abbildung 34: **5hmC-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-273 Tagen mit Haltungsfutter bzw. Zuchtfutter.** Zunahme an 5hmC-posititven Zellen mit zunehmendem Alter im Gyrus Dentatus, wie auch im Cerebellum. Im Gyrus Dentatus zum Zeitpunkt von 129 Tagen weniger 5hmC-positive Zellen als zu früheren und späteren Zeitpunkten. Messbalken 200µm.

3.4.3 Genexpression von Tet1-3

Die *"ten-eleven-translocation-proteins"* sind verantwortlich für die Umwandlung von Methylcytosin in Hydroxymethylcytosin und tragen somit aktiv zur Demethylierung im Genom bei.

Für *Tet1* ist im Hippocampus eine Abnahme der relativen Genexpression mit zunehmendem Alter auf einen relativen Wert von 0,53 zum Zeitpunkt von 129 Tagen *EE* und 0,28 zum Zeitpunkt von 129 Tagen *SC* zu sehen (Abbildung 35), die über die Zeitpunkte 7-129 Tage tendenziell höhere Werte der im *Enriched Environment* gehaltenen Mäuse im Vergleich zu den Einzelkäfig gehaltenen Tieren aufweist.

Im Cerebellum liegen die Werte der relativen Genexpression von *Tet1* einzeln gehaltener Mäusen bei 1 Tag und 7 Tagen etwas höher, jedoch gleichen sich die Werte zu den späteren Zeitpunkten (21 Tage, 129 Tage) an. Wie im Hippocampus ist auch hier eine Abnahme mit zunehmendem Alter der Mäuse zu sehen (129 Tage *EE*: 0,64; 129 Tage *SC*: 0,60).

Die relative Genexpression von *Tet2* nimmt im Hippocampus mit zunehmendem Alter ab (129 Tage *EE*: 0,45; 129 Tage *SC*: 0,28), wobei die Werte der *EE*-Mäuse wieder höher liegen, bei 7 Tagen signifikant (7 Tage *EE*: 1,1; 7 Tage *SC*: 0,67; p₇=0,005).

Im Gegensatz dazu erhöht sich die Genexpression von *Tet2* im Cerebellum von im *Enriched Environment* gehaltenen Mäusen, bis sie bei 129 Tagen einen signifikanten Unterschied der *EE*-Mäuse im Vergleich zu den *SC*-Mäusen zeigt (129 Tage *EE*: 1,87; 129 Tage *SC*: 0,84, p₁₂₉=0,002).

Die Genexpression von *Tet3* zeigt im Hippocampus einen erhöhten Wert bei 7 Tagen, sowohl für Mäuse die im *Enriched Environment* gehalten wurden (7 Tage *EE*: 1,22), als auch für die im Einzelkäfig gehaltenen Mäuse (7 Tage *SC*: 0,86). Nach einer Abnahme bis zum Zeitpunkt von 21 Tagen (21 Tage *EE*: 0,50; 21 Tage *SC*: 0,32), steigt die Genexpression von *Tet3* im Hippocampus wieder an, weiterhin für *EE*-Mäuse erhöht, erreicht jedoch nicht mehr den gleichen Wert wie zum Zeitpunkt von 7 Tagen (129 Tage *EE*: 0,81; 129 Tage *SC*: 0,37).



Abbildung 35: Darstellung der relativen Genexpression der "Ten-eleven-translocation" Enzyme Tet1-3 in EE- (blau) und SC-Mäusen (grau) über einen Zeitraum von maximal 129 Tagen. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression, die X-Achse zeigt die verschiedenen Behausungen bis zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Ct-Werte wurden über die comparative Ct-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die housekeeper Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp der jeweiligen Maus als Referenz. Alle CT- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen Enriched Environment/Single caged normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 5 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche LightCycler 480 gemessen.

Im Cerebellum steigt die relative Genexpression von *Tet3* für die EE-Mäuse bis zu 129 Tagen an (129 Tage *EE*: 2,02), für die einzeln gehaltenen Mäuse sinkt sie bis zum Zeitpunkt von 21 Tagen auf einen relativen Wert von 0,73 und steigt erst danach bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen, wo die relative Genexpression von Tet3 mit 1,84 sich dem Wert der im *Enriched Environment* gehaltenen Mäuse annähert, der mehr als doppelt so hoch wie der Ausgangswert liegt.


Abbildung 36: Darstellung der relativen Genexpression der "Ten-eleven-translocation" Enzyme Tet1-3 in F+ - (blau) und F- -Mäusen (grau) über einen Zeitraum von maximal 273 Tagen. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression, die X-Achse zeigt die verschiedenen Futtermittel bis zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Ct-Werte wurden über die comparative Ct-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die housekeeper Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp der jeweiligen Maus als Referenz. Alle CT- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen F+/F- normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 3 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche LightCycler 480 gemessen.

Im Hippocampus der unterschiedlich ernährten Mäuse zeigen die Genexpressionen von *Tet1-3* bei 273 Tagen nur geringe Unterschiede (Abbildung 36), wobei die Genexpressionen der mit Haltungsfutter ernährten Mäuse immer leicht erhöht sind, gegenüber den mit Zuchtfutter ernährten Mäusen. Im vorherigen Verlauf sinkt die relative Genexpression von *Tet1* im Hippocampus nach 21 Tagen in den F⁻-Mäusen auf 0,57 und in den F⁺-Mäusen auf 0,06 (p21=0,00000058). Für die F⁻-Mäuse sinkt die relative Genexpression nach 129 Tagen auf 0,39 und ändert sich zu 273 Tagen auch nicht mehr. Für die F⁺-Mäuse steigt die relative Genexpression von *Tet1* bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen wieder auf einen Wert von 0,33, welcher sich ebenfalls bis zum Zeitpunkt von 273 Tagen nicht ändert.

Im Cerebellum fällt wie im Hippocampus der erhebliche Unterschied zum Zeitpunkt von 21 Tagen zwischen den F⁻-Mäusen (0,72) und den F⁺-Mäusen (0,02) auf (p_{21} =0,007). Während die relative Genexpression der F⁻-Mäuse zum Zeitpunkt von 129 Tagen sinkt (0,23), steigt sie für die F⁺-Mäuse an (0,03). Zum Zeitpunkt von 273 Tagen ist die relative Genexpression von *Tet1* der F⁻-Mäuse auf 0,80 und die relative Genexpression von *Tet1* der F⁺-Mäuse auf 0,46 gestiegen.

Auch die relative Genexpression von *Tet2* im Hippocampus zeigt zum Zeitpunkt von 21 Tagen deutlich verringerte Werte (21 Tage F^- : 0,42; 21 Tage F^+ : 0,05) die wiederum für die mit Haltungsfutter ernährten Mäuse höher liegen, verglichen mit den mit Zuchtfutter ernährten Tieren und die nachfolgend in beiden Gruppen steigen (129 Tage F^- : 0,71; 129 Tage F^+ : 0,35 und 273 Tage F^- : 0,76; 273 Tage F^+ : 0,72).

Im Cerebellum fällt ebenfalls die geringe relative Genexpression von *Tet2* mit dem signifikanten Unterschied zum Zeitpunkt von 21 Tagen auf (21 Tage F⁻: 0,45; 21 Tage F⁺: 0,14; p_{21} =0,010), die sich zum Zeitpunkt von 129 Tagen nochmals verringert (129 Tage F⁻: 0,26; 129 Tage F⁺: 0,07) und erst bei 273 Tagen wieder höhere relative Werte zeigt (273 Tage F⁻: 0,57; 273 Tage F⁺: 0,52).

Die relative Genexpression von *Tet3* im Hippocampus zeigt, wie die Genexpressionen von *Tet1* und *Tet2* auch, wiederum bei 21 Tagen deutlich verringerte Werte (21 Tage F^- : 0,32; 21 Tage F^+ : 0,08) die zu den weiteren Zeitpunkten in beiden Futtergruppen ansteigen (129 Tage F^- : 0,63; 129 Tage F^+ : 0,23) und bei 273 Tagen leicht oberhalb des Ausgangwertes von 0 Tagen F^-/F^+ liegen (273 Tage F^- : 1,18; 273 Tage F^+ : 1,07).

Im Cerebellum sinkt die Genexpression von *Tet3* zum Zeitpunkt von 21 Tagen auf relative Werte von 0,63 für die mit Haltungsfutter ernährten Mäuse und 0,53 für die mit Zuchtfutter ernährten Mäuse und sinkt im weiteren Verlauf bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen weiter ab (129 Tage F⁻: 0,44; 129 Tage F⁺: 0,27). Nach 273 Tagen zeigt sich ein signifikanter Unterschied der gestiegenen relativen Genexpressionen (p_{273} =0,04) zwischen den F⁻-Mäusen (273 Tage F⁻: 0,96) und den F⁺-Mäusen (273 Tage F⁺: 0,51).

3.4.4 Histologische Färbungen von Tet1

Um Tet1 auf Proteinebene und zelltypspezifisch nachzuweisen, wurden die sagittalen FFPE-Schnitte mit einem Antikörper gegen Tet1 gefärbt (Abbildung 37 und 38). Im Hippocampus der *Enriched Environment*- und Einzelkäfig-gehaltenen Mäuse sieht man bei 0 Tagen eine starke Färbung des Gyrus Dentatus, mit Ausnahme der subgranulären Zone, die deutlich negativ auffällt. Auch im weiteren zeitlichen Verlauf sind in der subgranulären Zone keine Tet1-positiven Zellen zu sehen. Die Anzahl an Tet1-positiven Zellen in der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus nimmt ab, was vor allem ab 21 Tagen auffällt (Abbildung 37). Histologisch fällt zwischen den beiden Haltungsbedingungen kein Unterschied im Gyrus Dentatus auf.

Im Kleinhirn nimmt die Anzahl an Tet1-positiven Zellen in der Körnerzellschicht der *EE*-gehaltenen Mäuse deutlich ab, bereits nach 1 und 7 Tagen *EE* sieht man einen deutlichen Unterschied im Vergleich zum Zeitpunkt 0. Nach 21 Tagen im *EE* sind nur noch Zellen der Purkinjezellschicht Tet1-positiv. Auffällig ist, dass sowohl nach 21 Tagen, als auch nach 129 Tagen in Einzelkäfighaltung viele Tet1-positive Zellen in der Körnerzellschicht vorhanden sind.



Abbildung 37: **Tet1-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-129 Tagen in SC- bzw. EE-Haltung.** In der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus im Hippocampus sind keine Tet1-positiven Zellen vorhanden. In der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus Abnahme an Tet1-positiven Zellen im zeitlichen Verlauf. Im Cerebellum der SC-Mäuse bei sind nach 21 und 129 Tagen Tet1-positive Zellen in der Körnerzellschicht zu sehen, im Gegensatz zu den Cerebelli der EE-Mäuse, wo ausschließlich Purkinjezellen Tet1-positiv gefärbt wurden. Messbalken: 200µm. Bei den unterschiedlichen Fütterungsvarianten ist histologisch kein Unterschied ersichtlich (Abbildung 38). Im Hippocampus sieht man wie bei den EE/SC-gehaltenen Mäusen eine deutlich Tet1-negative subgranuläre Zone und im restlichen Gyrus Dentatus eine Abnahme an Tet1-positiven Zellen im zeitlichen Verlauf. Im Kleinhirn sieht man für beide Futterarten nach 21 Tagen ausschließlich in der Purkinjezellschicht Tet1-positive Zellen.



Abbildung 38: **Tet1-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-273 Tagen mit Haltungs- bzw. Zuchtfutter.** In der molekularen Zellschicht des Gyrus Dentatus im Hippocampus Abnahme an Tet1-positiven Zellen, und keine Tet1-positiven Zellen in der subgranulären Zone. Im Cerebellum sind ab 21 Tagen ausschließlich Purkinje Zellen Tet1positiv. Messbalken: 200µm

3.4.5 Immunfluoreszenzkofärbung von Tet1 und NeuN

Die histologischen Färbungen von Tet1 legen den Schluss nahe, dass ausschließlich postmitotische Zellen Tet1 exprimieren, da die subgranuläre Zone des Gyrus Dentatus durchweg Tet1-negativ ist. Um diese These zu überprüfen, wurden sagittale Hirnschnitte von 0 Tagen Ausgangswert, sowie den spätesten Zeitpunkten des EE/SC und des F-/F+ -Versuches mit Tet1 und NeuN kogefärbt. In den Abbildungen 39 und 40 sieht man im Hippocampus eine deutlich negative subgranuläre Zone des Gyrus Dentatus, die weder Signale für Tet1 noch für NeuN aufweist. Bei allen Zeitpunkten sind Tet1-positive Zellen auch NeuN-positiv, wobei nicht alle NeuN-positiven Zellen auch gleichzeitig Tet1 exprimieren. Interessant ist die Tatsache, dass das Tet1-Signal bei nahezu allen Zellen im Cytoplasma detektiert wird. Im Kleinhirn ist ein schwaches Signal im Cytoplasma von Zellen der Körnerzellschicht zu sehen, die wie im Hippocampus auch NeuN-positiv sind. Außerdem erscheinen sämtliche Purkinjezellen des Kleinhirns Tet1-positiv. Wegen der fehlenden Immunreaktivität von Purkinjezellen und dem Antikörper gegen NeuN wird hier aber kein positives Signal für postmitotische Neuronen detektiert.



Abbildung 39: Immunfluoreszenzkofärbung des Gyrus Dentatus und Cerebellums mit Tet1 und NeuN von Mäusen vor Beginn des EE-Versuchs, sowie Mäusen mit 129 Tagen in Enriched Environment bzw. Einzelkäfighaltung. Tet1 ist in der Körnerzellschicht des Hippocampus ausschließlich im Cytoplasma von NeuN positiven Zellen exprimiert und nicht in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus, wo auch keine NeuN-positiven Zellen vorhanden sind. In der Körnerzellschicht des Cerebellums nimmt die Anzahl der Tet1 positiven Zellen altersabhängig ab. In der Purkinjezellschicht des Cerebellums wird Tet1 stabil über den gesamten Zeitraum exprimiert, sowohl in Mäusen der Enriched Environment-Haltung als auch in Mäusen der SC-Haltung. Messbalken: 100µm



Abbildung 40: Immunfluoreszenzkofärbung des Gyrus Dentatus und Cerebellums mit Tet1 und NeuN von Mäusen vor Beginn des Futterversuchs und Mäusen mit 273 Tagen Zuchtfutter bzw. Haltungsfutter. Tet1 ist in der Körnerzellschicht des Hippocampus ausschließlich im Cytoplasma von NeuN positiven Zellen exprimiert und nicht in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus, wo auch keine NeuN-positiven Zellen vorhanden sind. In der Körnerzellschicht des Cerebellums nimmt die Anzahl der Tet1 positiven Zellen altersabhängig ab. In der Purkinje Zellschicht des Cerebellums wird Tet1 stabil über den gesamten Zeitraum exprimiert, sowohl in Mäusen mit Zuchtfutter als auch in Mäusen die mit Haltungsfutter ernährt wurden. Messbalken: 100µm

3.5 Basenreparatur: Umwandlung in Cytosin

3.5.1 Genexpression von Mbd4, Smug1 und Tdg

Die Genexpression von *Mbd4* (Abbildung 41) im Hippocampus zeigt eine Reduzierung der relativen Genexpression zu Tag 1 auf 0,66 bei den im *Enriched Environment* gehaltenen Mäusen und auf 0,56 bei den in Einzelkäfig gehaltenen Mäusen. Zwischen 1 Tag und 7 Tagen ist eine Hochregulierung der Genexpression in beiden Haltungsbedingungen zu sehen, wobei die *EE*-Mäuse eine stärkere Zunahme aufweisen (7 Tage *EE*: 1,0; 7 Tage *SC*: 0,68). Zum Zeitpunkt von 21 Tagen fällt die Genexpression in beiden Fällen ab (21 Tage *EE*: 0,44, 21 Tage *SC*: 0,24) und nimmt im parallelen Verlauf bis zu 129 Tagen wieder zu (129 Tage *EE*: 0,68; 129 Tage *SC*: 0,48).

Im Cerebellum nimmt die Genexpression der *Enriched Environment*- gehaltenen Mäuse bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen zu (129 Tage *EE*: 1,91; 129 Tage *SC*: 1,04), jedoch fällt auch hier zum Zeitpunkt von 21 Tagen der verlaufsuntypische niedrige relative Wert (21 Tage *EE*: 0,74) auf. Im Cerebellum der *SC*-Mäuse ist die relative Genexpression von *Mbd4* zum Zeitpunkt von 7 Tagen (7 Tage *SC*: 0,73) niedriger als bei 1 Tag (1 Tag *SC*: 1,04), steigt bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen (129 Tage *SC*: 1,04) jedoch wieder auf denselben Wert wie zu Tag 1.

Die Genexpression von *Smug1* zeigt im Hippocampus der *EE*-Mäuse nach einer geringen Reduzierung zu Tag 1 (1 Tag *EE*: 0,97) im weiteren Verlauf einen Anstieg bis zu 129 Tagen (129 Tage *EE*: 1,22). In den Einzelkäfig-gehaltenen Mäusen sinkt die Genexpression bis zum Zeitpunkt von 21 Tagen (21 Tage *SC*: 0,82) und steigt erst anschließend auf ein ähnliches Level wie bei den *EE*-Mäusen zu 129 Tagen (129 Tage *SC*: 1,40).

Trotz wiederholter cDNA-Synthese und mehrmals wiederholten Messungen, um technische Fehler und Verwechslungen auszuschließen, zeigt die Genexpression von *Smug1* im Cerebellum einen höchst unsteten Zick-Zack-Verlauf. Beachtet man lediglich den Ausgangswert von 1,00 im Vergleich zum 129 Tage Wert für *EE*- und *SC*- Mäuse, zeigt dies einen Anstieg auf 1,40 für die im *Enriched Environment* gehaltenen Mäuse und einen Anstieg auf einen relativen Wert von 1,69 für Einzelkäfig gehaltenen Mäuse.

Die Genexpression von *Tdg* verläuft im Hippocampus von *EE*- und *SC*- Mäusen deutlich unterschiedlich. Für *SC*-Mäuse sinkt sie kontinuierlich bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen auf 0,51, für die *EE*-Mäuse steigt sie bis zu Tag 7 im *Enriched Environment* auf 1,26 und sinkt erst nachfolgend, wobei sie im Vergleich zu den *SC*-Mäusen immer erhöht bleibt und nach 21 Tagen (21 Tage *EE*: 0,99; 21 Tage *SC*: 0,59; p₂₁=0,021) und 129 Tagen 129 Tage *EE*: 0,86; 129 Tage *SC*: 0,51; p₁₂₉=0,041) einen signifikanten Unterschied zeigt.

Im Cerebellum zeigt sich zwischen den beiden verschiedenen Käfighaltungen fast kein Unterschied. In beiden Fällen steigt die Genexpression von *Tdg* bis zum Zeitpunkt von 21 Tagen *EE* bzw. *SC* an (21 Tage EE: 1,63; 21 Tage SC: 1,45) und sinkt bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen wieder ab (129 Tage EE: 1,16; 21 Tage SC: 1,22).



Abbildung 41: Darstellung der relativen Genexpression von Mbd4, Smug1 und Tdg in EE-(blau) und SC-Mäusen (grau) über einen Zeitraum von maximal 129 Tagen. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression, die X-Achse zeigt die verschiedenen Zeitpunkte. Die Ct-Werte wurden über die comparative Ct-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die housekeeper Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp der jeweiligen Maus als Referenz. Alle Ct- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen *single caged/enriched* normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 5 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche LightCycler 480 gemessen. Für die unterschiedlich ernährten Mäuse (Abbildung 42) zeigt die Genexpression von *Mbd4* in beiden Fütterungsvarianten im Hippocampus eine Abnahme zwischen 21 Tagen (21 Tage F⁺: 0,99; 21 Tage F⁻: 0,86) und 129 Tagen (129 Tage F⁺: 0,44; 129 Tage F⁻: 0,22) und anschließend ein Hochregulierung zum Zeitpunkt von 273 Tagen (273 Tage F⁺: 1,38; 273 Tage F⁻: 1,31).

Im Cerebellum steigt die Genexpression von *Mbd4* zwischen 21 Tagen (21 Tage F⁺: 1,84; 21 Tage F⁻: 1,43) und 129 Tagen (129 Tage F⁺: 5,42; 129 Tage F⁻: 2,47) vor allem bei den mit Zuchtfutter ernährten Mäusen stark an, und fällt bis zum Zeitpunkt 273 Tagen (273 Tage F⁺: 0,85; 273 Tage F⁻: 1,83) wieder deutlich ab.

Die Genexpression von Smug1 zeigt in F⁺-Mäusen nach einer Zunahme der relativen Genexpression zum Zeitpunkt von 21 Tagen (21 Tage F⁺: 2,44; 21 Tage F⁻: 1,61) bis zum Zeitpunkt von 273 Tagen (273 Tage F⁺: 0,90) eine kontinuierliche Abnahme, im Gegensatz zu F⁻-Mäusen, wo die Genexpression von *Smug1* zwischen 21 Tagen und 129 Tagen sinkt (129 Tage F⁻: 0,57), jedoch zum Zeitpunkt von 273 Tagen wieder ansteigt (273 Tage F⁻: 1,26).

Im Cerebellum zeigen beide Futtergruppen einen Anstieg der Genexpression von *Smug1* zum Zeitpunkt von 129 Tagen mit einem signifikantem Unterschied (129 Tage F⁺: 2,85; 129 Tage F⁻: 5,41; p_{129} =0,010) und eine nachfolgende Abnahme der relativen Genexpression zum Zeitpunkt von 273 Tagen (273 Tage F⁺: 1,47; 273 Tage F⁻: 1,24), wo die relative Genexpression von *Smug1* in beiden Futtergruppen ungefähr gleich stark ist.

Im Hippocampus der F⁺-Mäuse zeigt sich eine Abnahme der Genexpression von *Tdg* bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen (129 Tage F⁺: 0,48) und eine geringe Zunahme zum Zeitpunkt bis von 273 Tagen (273 Tage F⁺: 0,64), in den F⁻-Mäusen zeigt die Genexpression von *Tdg* ebenfalls einen niedrigeren relativen Wert zum Zeitpunkt von 129 Tagen (129 Tage F⁻: 0,21), jedoch steigt die Genexpression von *Tdg* bis zum Zeitpunkt von 273 Tagen stark an (273 Tage F⁻: 0,85) und hat einen höheren relativen Wert als die Zuchtfutter ernährten Mäuse nach dem gleichen Zeitraum, obwohl diese zu den vorherigen Zeitpunkten eine höhere relative Genexpression von *Tdg* aufwiesen.

Im Cerebellum steigt die Genexpression von *Tdg* bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen (129 Tage F⁺: 2,09; 129 Tage F⁻: 5,2; $p_{129}=0,002$), für die Zuchtfutter er-

nährten Mäuse geringer als für die Haltungsfutter ernährten Mäuse mit einem signifikanten Unterschied, sinken jedoch bis zum Zeitpunkt von 273 Tagen (273 Tage F⁺: 1,49; 273 Tage F⁻: 1,40) auf einen ähnlichen relativen Genexpressionswert.



Abbildung 42: Darstellung der relativen Genexpression von Mbd4, Smug1 und Tdg in F+ (blau) und F- Mäusen (grau) über einen Zeitraum von maximal 273 Tagen. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression, die X-Achse zeigt die verschiedenen Zeitpunkte. Die Ct-Werte wurden über die comparative Ct-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die housekeeper Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp der jeweiligen Maus als Referenz. Alle Ct- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen F+/F- normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 3 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche LightCycler 480 gemessen.

3.5.2 Histologische Färbungen von Tdg

Um die Verteilung von Tdg-positiven Zellen innerhalb des Gyrus Dentatus des Hippocampus und des Cerebellums zu untersuchen, wurden sagittale FFPE-Schnitte von Mäusen zunehmenden Alters verschiedener Haltungs- und Fütterungsbedingungen mit einem Antikörper gegen Tdg DAB-gefärbt (Abbildung 43 und 44).

Sind im Gyrus Dentatus des Hippocampus bei dem Ausgangswert von 0 Tagen *EE/SC* sowie nach 1 Tag und nach 7 Tagen in beiden Haltungsbedingungen noch nahezu alle Zellen Tdg-positiv, so nimmt die Anzahl an Tdg-positiven Zellen nach 21 Tagen in beiden verschiedenen Haltungsbedingungen deutlich ab (Abbildung 43). Auffällig ist die intensivere Färbung bei 0,1 und 7 Tagen der subgranulären Zone.

Im Cerebellum sind bei 0, 1 und 7 Tagen neben den Purkinjezellen zusätzlich einige Zellen der Körnerzellschicht Tdg-positiv, was sich ab 21 Tagen in beiden verschiedenen Haltungsbedingungen nicht mehr zeigt. Ab 21 Tagen unter verschiedenen Haltungsbedingungen, sind ausschließlich die Purkinjezellen des Cerebellums Tdg-positiv.



Abbildung 43: **Tdg-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-129 Tagen in SC- bzw. EE-Haltung.** In der molekularen Zellschicht des Gyrus Dentatus im Hippocampus, ebenso wie in der Körnerzellschicht des Cerebellums nimmt die Anzahl der Tdgpositiven Zellen mit fortschreitendem Alter ab. Im Hippocampus von *EE*- Mäusen ab einem Zeitpunkt von 21 Tagen *EE/SC*-Haltung mehr Tdg-positive Zellen als in *SC*-Mäusen sichtbar. Messbalken: 200µm

Zwischen den verschiedenen Futterarten ist kein Unterschied zu erkennen (Abbildung 44), aber wie bei den *EE/SC*-Mäusen auch, nimmt die Anzahl der Tdg-positiven Zellen im Gyrus Dentatus als auch im Cerebellum ab. Im Gyrus Dentatus des Hippocampus sind deutlich mehr Tdg-positive Zellen in der subgranulären Zone vorhanden, in der Körnerzellschicht nimmt die Anzahl der Tdg-positiven Zellen mit zunehmendem Alter von 0-273 Tage ab.

Im Cerebellum der unterschiedlich ernährten Mäuse sind in allen Alterstufen deutlich die Tdg-positiven Purkinjezellen zu erkennen, in der Körnerzellschicht sind bereits nach 21 Tagen unterschiedlicher Ernährung keine Tdg-positiven Zellen mehr erkennbar.



Abbildung 44: **Tdg-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-273 Tagen mit Haltungs- bzw. Zuchtfutter.** In der molekularen Zellschicht und subgranulären Zone des Gyrus Dentatus im Hippocampus sind mehr Tdg-positive Zellen in Schnitten der F⁻-Mäuse, was sich bei 273 Tagen Haltung unter F⁻/F⁺ aber aufhebt. In der Purkinjezellschicht des Cerebellums sind keine Veränderungen der Tdg- positiven Zellen mit fortschreitendem Alter oder in den verschiedenen Futterarten erkennbar. Messbalken: 200µm

3.5.3 Immunfluoreszenzkofärbung von Tdg und NeuN

Die histologischen Färbungen von Tdg haben gezeigt, dass Tdg-positive Zellen verstärkt in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus im Hippocampus vorhanden sind und in der Purkinjezellschicht des Cerebellums. Da die subgranuläre Zone des Gyrus Dentatus, das "Zellreservoir" des Hirns darstellt, wo neuronale Vorläuferzellen gebildet werden, soll mit der Kofärbung von Tdg und NeuN überprüft werden, inwieweit auch postmitotische Neuronen Tdg exprimieren. In den Abbildungen 45 und 46 sind Kofärbungen der Hippocampi und Cerebelli von Mäusen vor den Versuchsstarts (0 Tage) und jeweils der letzte Wert der Versuchsreihen (EE/SC: 129 Tage, F⁻/F⁺: 273 Tage) gezeigt. Im Hippocampus beider Versuche zeigt sich, unabhängig von Haltungsbedingungen oder Futterarten, dass Tdg vor allem in NeuN-negativen Zellen vorhanden ist, wie in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus und nur sehr vereinzelt in NeuN-positiven Zellen exprimiert wird. Ein ähnliches Bild zeigt sich im Kleinhirn, wo die Purkinjezellschicht deutlich Tdg-positiv erscheint, die wegen fehlender Immunreaktivität des Antikörpers NeuN-negativ ist, aber auch in der Körnerzellschicht zeigen einige Zellen Tdg-Expression. Tdg-Expression findet somit vor allem in unreifen Neuronen statt, aber nicht ausschließlich, da auch postmitotische Zellen im Hippocampus wie auch Cerebellum Tdg-Expression zeigen.



Abbildung 45: Immunfluoreszenzfärbung des Gyrus Dentatus im Hippocampus mit Tdg und NeuN nach 0 und 129 Tagen in SC- bzw. EE-Haltung. Tdg ist nach 0 Tagen vor allem in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus aber auch in der molekularen Zellschicht des Gyrus Dentatus des Hippocampus exprimiert. Nach 129 Tagen vor allem noch in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus und nur vereinzelt in der molekularen Zellschicht. Im Alterungsprozess nimmt die Anzahl der Tdg-positiven Zellen sowohl in der *Enriched Environment*als auch in der Einzelkäfig-Haltung ab. Eine Kofärbung von Tdg und NeuN liegt nur vereinzelt vor. Messbalken: Hippocampus: 100µm, Cerebellum: 200µm



Abbildung 46: Immunfluoreszenzfärbung des Gyrus Dentatus im Hippocampus mit Tdg und NeuN nach 0 und 129 Tagen in SC- bzw. EE-Haltung. Tdg ist nach 0 Tagen vor allem in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus aber auch in der molekularen Zellschicht des Gyrus Dentatus des Hippocampus exprimiert. Nach 129 Tagen ist Tdg vor allem noch in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus und nur vereinzelt in der molekularen Zellschicht zu erkennen. Im Alterungsprozess nimmt die Anzahl der Tdg-positiven Zellen sowohl in den mit Haltungsfutter-ernährten Mäusen als auch in den Zuchtfutter-ernährten Mäusen ab. Eine Kofärbung von Tdg und NeuN liegt nur vereinzelt vor. Messbalken: Hippocampus: 100µm, Cerebellum: 200µm

4 Diskussion

Die Epigenetik beschreibt vererbbare Modifikationen von Chromosomen, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen. In den letzten Jahren wurden hierzu viele Studien durchgeführt, die neue Ansätze für das Verständnis der Regulation von Entwicklungsprozessen und Krankheiten liefern. Epigenetische Modifikationen sind im Mensch, sowie Tieren und Pflanzen gefunden worden und spielen eine wichtige Rolle bei Entwicklungsprozessen. Außerdem vermittelt die Epigenetik zwischen äußeren Reizen wie Umweltfaktoren, Ernährung und Lifestyle und der Genregulation in Zellen, Geweben und Organen. Barrès et al. fanden heraus, dass Muskelübungen die Promotormethylierung in Muskeln verringert (Barrès et al., 2012) und Klengel et al. zeigten, dass traumatische Erlebnisse, die zu psychische Erkrankungen führen, mit veränderten epigenetischen Modifikationen einhergehen (Klengel et al., 2014). Der Hippocampus war die erste Hirnregion, in welcher der Einfluss exogener Stimuli auf Histonmodifikationen und Genexpression nach akutem und chronischen Stress gezeigt werden konnte (Gray et al., 2014; Hunter et al., 2009) und es wurde von Li et al. herausgefunden, dass 5hmC hippocampal für das Gen des Glucocorticoid Rezeptors Nr3c1 nach akutem Stress erhöht ist (Li et al., 2016). Des Weiteren wurden von Lubin et al. Versuche zur DNA-Methylierung im Bdnf-Gen Angst-Konditionierung durchgeführt, die eine veränderte DNAunter Methylierung als Antwort auf verhaltensabhängiges Lernen zeigten (Lubin et al., 2008). Da veränderte Genexpression im Kontext zu erfahrungsabhängigen Lernen auch in psychiatrischen Krankheiten wie Schizophrenie, Depressionen und der bipolaren affektiven Störung von Bedeutung ist, muss die komplexe epigenetische Regulation der Gentranskription im Hinblick auf Gedächtnisformierung im adulten zentralen Nervensystem erst im Allgemeinen verstanden werden. Ob und inwiefern sich der (De-) Methylierungsprozess in Hippocampus und Cerebellum unter Enriched Environment, einem Modell für erhöhte Lern- und Gedächtnisformierung, ändert, ist jedoch nicht bekannt und soll mit dieser Arbeit besser verstanden werden.

Enriched Environment bewirkte in bisherigen Studien veränderte Plastizität, wie erhöhte Neurogenese und Zellüberleben, Änderungen der glialen Morphologie und eine Hochregulation von Wachstumsfaktoren wie Bdnf und von IEGs wie Arc, c-Fos und Egr1 (Ickes et al., 2000); (Rossi et al., 2006). Obwohl viele Arbeitsgruppen mit Enriched Environment Versuchsaufbauten arbeiten, gibt es kein einheitliches Protokoll. Die gleichbleibenden Aspekte eines Enriched Environment Versuchs sind der größere Käfig, die Bereitstellung von Möglichkeiten für die freiwillige, körperliche Aktivität, wie Laufräder oder Klettermöglichkeiten und die Ermöglichung sozialer Kontakte und Interaktionen ebenso wie der Aspekt des "Neuen" in Form von neuen Umgebungsreizen. Um eine mit Menschen vergleichbare Situation zu schaffen, wurden die Tiere permanent in EE oder SC gehalten und der EE-Käfig alle 2-3 Tage komplett neu eingerichtet, wozu neue Spielzeuge mit variierenden Größen, Strukturen und Materialen gehörten, um sensorische Reize zu erzeugen, wie verschiedenartige Laufräder für die körperliche Aktivität, diverse Nestbaumaterialien und Nagerhäuser, welche in anderen Mauskäfigen eingesetzt worden waren und somit auch den Geruchssinn anregen sollten, ebenso wie die Veränderung der Position des Futters und der Tränke im Käfig, um eine Neuorientierung der Mäuse zu gewährleisten. Um den Effekt des Enriched Environment zu verfolgen und zu bestätigen, wurden die relativen Genexpressionen oben genannter Gene über quantitative Real-time PCR bestimmt. Da alle Tiere permanent und über einen langen Zeitraum von 129 Tagen, im Vergleich zu den meisten anderen EE-Versuchen, im Enriched Environment oder im Einzelkäfig gehalten wurden, konnten auch mögliche "Gewöhnungseffekte" nicht von vornherein ausgeschlossen werden. IEG Expression ist ein Marker für neuronale Aktivität. *IEGs*, wie Arc und Egr1, korrelieren mit neuronaler Aktivität, die von Verhaltens- und sensorischen Reizen hervorgerufen wird. Für alle vier untersuchten Gene lässt sich im Hippocampus, sowie im Cerebellum eine Hochregulation im zeitlichen Verlauf der Enriched Environment Haltung feststellen, im Gegensatz zu den im Einzelkäfig gehaltenen Mäusen, wo die relative Genexpression im Hippocampus nahezu konstant bleibt oder sogar abnimmt. Interessanterweise nimmt die relative Genexpression der IEGs von SC-Mäusen im Cerebellum meist parallel zu der relativen Genexpression der IEGs in EE-Mäusen zu, wenn auch immer mit niedrigeren relativen Werten, was auf eine entweder altersabhängige Zunahme der

IEGs im Kleinhirn schließen lässt oder auf eine ungewollte Stimulation. Studien fanden heraus, dass zum Beispiel Egr1 eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität und der Bildung des Langzeitgedächtnisses hat und essentiell ist für die Informationsübertragung vom Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis (Jones et al., 2001; Renaudineau et al., 2009). Arc wird in Reaktion auf Stress und Neuheitsfaktoren schnell exprimiert (Guzowski et al., 2006), so dass eine gesteigerte Genexpression der IEGs als Antwort auf den Stress vor der zervikalen Translokation durchaus möglich ist oder auch eine Folge der regelmäßigen Käfigumsetzungen sein könnte. Forciertes motorisches Lernen ergab in einer Studie von Wang et al., eine erhöhte Proteinexpression von Arc und Egr1 im Cerebellum (Wang et al., 2014). Eine erhöhte motorische Aktivität der EE-Mäuse ruft hier eine erhöhte Genexpression der IEGs hervor, die nicht, wie im Hippocampus, signifikant ist, da hier die Bewegung der Mäuse nicht erzwungen wurde, sondern freiwillig erfolgen konnte. Im Hippocampus verstärkt sich die relative Genexpression der IEGs drastisch im zeitlichen Verlauf und zeigt bei 129 Tagen einen signifikanten Unterschied der beiden Haltungsbedingungen (Abbildung 14), womit sich die verstärkte neuronale Aktivität im EE-Versuch bestätigt. Die erhöhten Standardfehler, die bei Egr1 zu einem nicht signifikanten Ergebnis führen, sind mit großer Wahrscheinlichkeit zurück zu führen auf das unterschiedlich starke Ansprechen der Mäuse auf eine Umgebung, die alle 2-3 Tage neu eingerichtet wurde und wo sie sich freiwillig mehr oder weniger Reizen durch Bewegung und Erkunden der neuen Umgebung aussetzen konnten. Es fiel auf, dass nicht alle Tiere gleich stark auf die Umgebung ansprachen. Um diesen Unterschied auszugleichen, wäre es denkbar, entweder die Tiere vor dem Beginn des Versuchs ihrem Verhalten nach in Untergruppen aufzuteilen. Dies hätte allerdings den Nachteil, dass die Tiere bei Versuchsstart älter sind als in diesem Versuchsaufbau und dass das Enriched Environment für die Tiere bei Versuchsbeginn nicht neu ist. Eine weitere Möglichkeit, das unterschiedlich starke Ansprechen der Tiere auszugleichen, wären größere Versuchsgruppen.

Die DNA-Methylierung ist ein Hauptfaktor in der epigenetischen Regulierung neuronaler Genexpression, die ständigen Änderungen durch Lern- und Gedächtnisabhängiger synaptischer Plastizität unterliegt (Day and Sweatt, 2010; Day and Sweatt, 2011). Die DNA-Methylierung ist einer der wenigen biochemischen Mechanismen, die sich im molekularen Umsatz selbst aufrechterhalten. Die "Erhaltungs-DNA-Methyltransferase" *Dnmt1*, welche hemimethylierte DNA-Doppelstränge erkennt und entsprechend das Dinukleotid des komplementären Stranges methyliert, zeigt im *Enriched* Versuch für den Hippocampus leicht erhöhte Werte und für das Cerebellum bei 7 und 129 Tagen signifikant erhöhte Werte, was auf eine globale Transkriptionsänderung in Cerebellum und Hippocampus in den *EE*- Mäuse hinweist (Abbildung 23). *Dnmt3a* und *Dnmt3b* sind sogenannte "*de novo*" Methyltransferasen, die für die Methylierung von Einzelstrang-DNA zuständig sind.

Dnmt3a scheint hier für die adulte Neurogenese und die neuronale Differenzierung besonders wichtig (Wu et al., 2010). Ebenso wie in embryonaler Neurogenese, wofür auch die Abnahme der Dnmt3a-positiven Zellen mit zunehmenden Alter sowohl in Hippocampus als auch Cerebellum spricht. Außerdem spricht das vermehrte Vorkommen Dnmt3a-positiver Zellen in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus im Hippocampus und die nicht korrelierende Kofärbung von Dnmt3a mit NeuN dafür.

Die subgranuläre Zone des Gyrus Dentatus im Hippocampus stellt zusammen mit der subventrikulären Zone und dem olfaktorischen Bulbus eine der wichtigsten Zonen für adulte Neurogenese dar. Hier werden neuronale Stammzellen zu Vorläuferzellen proliferiert, differenziert und migrieren anschließend in den Cortex, wo sie reifen. In den histologischen Schnitten sind im Hippocampus bei 7 Tagen und bei 21 Tagen mehr Dnmt3a-positive Zellen in der subgranulären Zone der *Enriched*-Mäuse zu sehen als in den *SC*-Mäusen (Abbildung 25), bei 129 Tagen lässt sich aufgrund der geringen Anzahl an Dnmt3a-positiven Zellen keine Aussage treffen.

Im Cerebellum lässt sich histologisch kein Unterschied zwischen *EE*- und *SC*-Mäusen feststellen, es fällt aber auf, dass die Dnmt3a-positiven Zellen in der Körnerzellschicht deutlich abnehmen, vor allem zwischen 21 und 129 Tagen, jedoch die Purkinjezellschicht in älteren Mäusen bei 129 Tagen Dnmt3apositive Zellen zeigt (Abbildung 25).

Auch wenn die relativen Genexpressionslevel von *Dnmt3a* weder im Cerebellum noch im Hippocampus einen Unterschied zwischen den *Enriched-* und *Single caged-* Mäusen zeigen, regt *Enriched Environment* die Neurogenese im Hippocampus an. Es ist nämlich zu beachten, dass die relativen Genexpressionslevel lediglich global Auskunft über die gesamte Hippocampusregion geben und nicht, wie in den histologischen Untersuchungen, regionale Feinheiten wiedergeben können. Da die subgranuläre Zone einen sehr geringen Teil des Hippocampus ausmacht, ist anzunehmen, dass sich die Zunahme an Dnmt3apositiven Zellen in den *EE*-Mäusen nicht auf die Genexpressionsuntersuchung des gesamten Hippocampusgewebes auswirkt.

Die relative Genexpression von *Dnmt3b* (Abbildung 23) zeigt im Hippocampus interessanterweise einen starken Anstieg bis zu 7 Tagen *EE/SC*-Haltung (was einem Alter von 4 Wochen entspricht), wobei hier die relative Genexpression in *EE*-Mäusen signifikant erhöht ist und nachfolgend geringere Werte. Ebenso wie im Cerebellum (Abbildung 23) wo ebenfalls bei 7 Tagen eine signifikante Erhöhung der relativen Genexpression zu verzeichnen ist, mit nachfolgender Abnahme der Werte, die sich mit zunehmendem Alter aneinander anpassen.

Dnmt3b ist vor allem in der embryonalen und frühen Neurogenese wichtig und es wurde gezeigt, dass die mRNA Level mit zunehmendem Alter sinken (Feng et al., 2005).

Interessant ist die quantitative Bestimmung von 5mC (Abbildung 16), welches durch die Dnmts entsteht. Nimmt im Cerebellum 5mC bis zum Zeitpunkt von 21 Tagen zu und bleibt anschließend für die SC- Mäuse konstant, nimmt 5mC in Mäusen, welche 129 Tage in EE gehalten wurden, ab. Im Hippocampus zeigt sich ein komplett gegensätzliches Bild für EE- und SC- Mäuse: In den SC-Mäusen steigt 5mC bis zum Zeitpunkt von 21 Tagen und verringert sich bis zum Zeitpunkt von 129 Tagen, in den *EE*- Mäusen sinkt 5mC bis zum Zeitpunkt von 21 Tagen und steigt nachfolgend an. Die Diskrepanz zwischen den sinkenden relativen Genexpressionen von Dnmt1/3a/3b und dem steigendem global gemessen 5mC im Hippocampus der SC- Mäuse und dem Cerebellum von EEund SC-Mäusen ist auf den ersten Blick widersprüchlich. Jedoch gibt es mehrere mögliche Faktoren, die dafür Erklärungen liefern. Während Dnmts DNA methylieren, gibt es andere epigenetische Prozesse, wie zum Beispiel Histonacetylasen, welche Methylierungen stabilisieren und erhalten (Fuks, 2005). Des Weiteren wurde herausgefunden, dass nicht-CG betreffende DNA-Methylierungen in der frühen postnatalen Hirnentwicklung akkumulieren und Neuronen, im Vergleich zu Gliazellen, mit nicht-CG betreffenden Methylierungen angereichert sind, die wiederum besonders schnell in der frühen Phase der Synaptogenese

(postnatale Tage 14-28 in Mäusen) akkumulieren können (Lister et al., 2013). Es ist somit durchaus möglich, dass die zunehmende globale DNA-Methylierung trotz abnehmender *Dnmt*-Genexpressionslevel durch solche Akkumulationen zustande kommt. Vergleicht man außerdem die Zellauszählungen der histologischen Schnitte (Abbildung 17) mit der globalen quantitativen Methylierung bezogen auf die Gesamt-DNA der jeweiligen Hirnregion (Abbildung 16), nimmt sowohl die globale Methylierung zu, als auch die Zahl der 5mC-positiven Zellen, wodurch der Methylierungsgrad für die einzelne Zelle unter Umständen gar nicht steigt. Andersherum heißt das aber auch für die sinkende globale Methylierung im Hippocampus von *EE*-Mäusen eine deutlichere Abnahme an 5mC pro Einzelzelle.

Die ten eleven translocation Familie (Lonetti et al.) der Methylcytosin-Dioxygenasen, welche TET1, TET2 und TET3 umfasst, sind vor allem in die DNA-Demethylierung eingebunden. Tet Proteine besitzen 2-Oxoglutarat und Fe(II)-abhängige Oxygenaseaktivität und wandeln 5mC in 5hmC, 5fC und 5caC um (Guo et al., 2011b; He et al., 2011a; Ito et al., 2010; Tahiliani et al., 2009; Zhang et al., 2013). 5hmC agiert zum einen als Intermediat in der passiven Demethylierung durch Störung der Interaktionen mit DNMT1 (Smith and Meissner, 2013) und zum anderen in der aktiven Demethylierung mit dem Basenreparaturmechanismus (Guo et al., 2011b). Die Anwesenheit aller 3 TET Enzyme, wie ein hoher 5hmC-Gehalt im Gehirn, lassen auf eine wichtige Rolle im Epigenom des Gehirns schließen (Kriaucionis and Heintz, 2009; Szulwach et al., 2011). Die regulatorische Rolle der DNA-Demethylierung bei der kognitiven Funktion wurde von Rudenko und Tsai aufgezeigt (Rudenko and Tsai, 2014). Sie zeigten auch, dass fehlendes Tet1 in Tet1/KO-Mäusen zu einer Runterregulierung einer Reihe von neuronal-aktivitäts-regulierten Genen in Cortex und Hippocampus führt, mit negativen Auswirkungen auf die synaptische Plastizität und Beeinträchtigungen in der Gedächtnislöschung. Tet1/KO-Mäuse wiesen eine abnormal verlängerte Langzeitdepression auf, die wichtig ist um das Gedächtnis selektiv für neue Informationen frei zu geben. In einem genomweiten Transkriptionsprofiling konnten sie außerdem zeigen, dass c-Fos, Arc und Egr2 im Hippocampus von Tet1/KO-Mäusen runterreguliert waren im Gegensatz zu

den Kontrolltieren. Im *EE*-Versuch dieser Arbeit kann man ebenfalls einen Effekt von umgebungsabhängigem Lernen auf *Tet1* beobachten. So sieht man im Hippocampus der *EE*-Mäuse zwar wie in den *SC*-Mäusen auch, eine Abnahme von *Tet1* mit zunehmendem Alter (Abbildung 35), jedoch ist die relative Genexpression von *Tet1* in *EE*-Mäusen gegenüber der relativen Genexpression von *Tet1* in *SC*-Mäusen erhöht.

Interessanterweise sieht man in den histologischen Färbungen Tet1 vor allem im Cytoplasma der Zellen und im Gyrus Dentatus des Hippocampus eine Tet1negative subgranuläre Zone (Abbildung 38), sowie in der Kofärbung mit NeuN (Abbildung 39), eine deutliche Korrelation zwischen Tet1 und NeuN, was die Hypothese bestätigt, dass Tet1 vor allem für die embryonale und frühe postnatale Entwicklung zuständig ist (Dawlaty et al., 2011), später abnimmt und nicht in die adulte Neurogenese eingebunden ist.

Die relative Genexpression von *Tet1* im Cerebellum nimmt ebenfalls für *EE*- wie *SC*-Mäuse ab (Abbildung 35), es zeigen sich aber leicht erhöhte Genexpressionswerte für *SC*-Mäuse bis zum Tag 21. Nach 129 Tagen in den unterschiedlichen Haltungsbedingungen sind die Genexpressionslevel gleich. In den histologischen Schnitten sieht man für Tet1 deutlich mehr positive Zellen in der Körnerzellschicht des Cerebellums der Einzelkäfig-gehaltenen Mäuse im Vergleich zu den *Enriched*-gehaltenen Mäusen (Abbildung38), wo hauptsächlich die Purkinjezellen Tet1-positiv sind.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Tet1 eine funktionelle Rolle im Kleinhirn entweder in Bezug auf erfahrungsabhängiges Lernen hat und /oder in Bezug auf motorische Aktivität. Die Ergebnisse von Rudenko et al., 2014, die eine funktionelle Rolle von *Tet1* in der Langzeitdepression in Hippocampus und Cortex zeigen konnten, lassen einen eventuellen Einfluss von *Tet1* auch im Cerebellum vermuten. Bisher sind dazu aber keine Ergebnisse bezüglich des Cerebellums veröffentlicht worden und es sind weitere Analysen und Versuche notwendig, um eine derartige Hypothese zu unterstützen.

Bis heute weiß man über die Rollen von *Tet2* und *Tet3* in neuronaler Differenzierung und Funktion wenig, außer dass diese parallel zu 5hmC in neuronaler Differenzierung ansteigen und eine funktionelle Störung von *Tet2* und *Tet3* zu Defiziten in der neuronalen Differenzierung führen (Hahn et al., 2013). Ende 2015 konnten Mi et al. erste Ergebnisse zu *Tet2* im Hinblick auf neuronales Zellüberleben präsentieren, in welchen eine hohe Expression von *Tet2*-mRNA in Hippocampus und Cortex während des Entwicklungsprozesses des Gehirns gefunden wurde und eine Lokalisation von Tet2 im Nukleus sowie Cytoplasma postmitotischer Neuronen. Runterregulation von *Tet2* in kultivierten kortikalen Neuronen durch RNAi-Technik zeigte, dass *Tet2* für das Zellüberleben wichtig ist. In der vorliegenden Arbeit ist im Hippocampus eine Abnahme der relativen Genexpression von *Tet2* mit zunehmendem Alter zu sehen (Abbildung35), wobei *Tet2* in *EE*-Mäusen eine erhöhte relative Genexpression zeigt. Im Cerebellum zeigt sich jedoch in den *EE*-Mäusen ein deutlicher Anstieg der Genexpression mit zunehmendem Alter, der bei 129 Tagen einen signifikanten Unterschied zu den *SC*-Mäusen zeigt, welche eine relativ konstante Genexpression an *Tet2* aufweisen (Abbildung35). Ein ähnliches Bild, jedoch nicht signifikant, ist für die relative Genexpression von *Tet3* im Hippocampus eine sehr dynamische Genexpression aufweist.

Zusammenfassend lässt sich für *Tet1-3* im Hippocampus eine Abnahme mit zunehmendem Alter feststellen und eine generell erhöhte Genexpression in *EE*-Mäusen im Vergleich zu *SC*-Mäusen. Im Cerebellum nimmt lediglich die Genexpression von *Tet1* in *EE* wie in *SC*, mit zunehmendem Alter ab, die Genexpression von *Tet2* und *Tet3* nimmt jedoch im Alterungsprozess zu und ist für *EE*-Mäuse im Vergleich zu *SC*-Mäusen erhöht.

Interessanterweise korrelieren die Genexpressionen von *Tet1-3* nicht mit dem quantitativ gemessenen 5hmC-Gehalt, der im Hippocampus mit zunehmendem Alter ansteigt und für die *EE*-Mäuse nach 129 Tagen signifikant erhöht ist, im Cerebellum für die *SC*-Mäuse über den gesamten Zeitraum ansteigt und bei 129 Tagen im *Enriched Environment* einen niedrigeren Wert zeigt (Abbildung 30).

Die Zellauszählung in den 5hmC angefärbten histologischen Schnitten zeigt sowohl für den Gyrus Dentatus des Hippocampus als auch für die Körnerzellschicht des Cerebellums eine Zunahme an 5hmC-positiven Zellen, wobei unwesentlich mehr 5hmC-positive Zellen in den beiden Hirnregionen der *EE*-Mäuse gefunden wurden (Abbildung 31). Wie oben bereits diskutiert wurde, können Tet Proteine 5mC zu 5hmC oxidieren. Sie sind aber auch für die Umwandlung in 5fC, sowie 5caC durch weitere Oxidation von 5hmC verantwortlich. Da 5fC und 5caC jedoch in wesentlich geringeren Mengen als 5hmC vorkommen, ist ein Nachweis nur mit massenspektrometrischen Analysen möglich und wurde deswegen in dieser Arbeit nicht geführt. Die Umwandlung von 5hmC in 5fC und 5caC könnte aber eine Erklärung sein, warum im Cerebellum die relative Genexpression von *Tet2* und *Tet3* steigt, der 5hmC Gehalt jedoch vor allem zu 129 Tagen hin stark abnimmt. Auch ist eine Akkumulation von 5hmC, analog zu 5mC, durch weitere Mechanismen, die noch nicht aufgeklärt sind, denkbar. Ein Trend in der Erhöhung der Genexpression von *Tet1-3* und eine Zunahme von 5hmC im *Enriched Environment* kann anhand dieser Ergebnisse jedoch gesehen werden und spricht für eine Rolle der Tet-Proteine sowie 5hmC in Bezug auf Gedächtnis- und Lernvorgänge.

5fC, sowie 5caC, deren Nachweis hier nicht geführt wurde, dienen als Substrate für DNA Glykosylasen. Studien haben gezeigt, dass die Thymin DNA Glykosylase (TDG) gezielt 5fC und 5caC erkennt und ausschneidet, wodurch die Reparatur der abasischen Stelle zu unmethylierten Cytosin erfolgt (He et al., 2011a; Maiti and Drohat, 2011). Tatsächlich führt eine Deletion von *Tdg* in Mäusen zu embryonaler Lethalität und zu erhöhter Methylierung in verschiedensten Genen (Cortazar et al., 2011; Cortellino et al., 2011).

Obwohl angenommen wurde, dass auch andere Glykosylasen 5fC und 5caC erkennen, konnte für die Einzelstrang-sensitive monofunktionelle U-DNA-Glykosylase 1 (*Smug1*) und MBD Protein 4 (*Mbd4*) keine signifikante Aktivität für 5fC und 5caC nachgewiesen werden (He et al., 2011a; Maiti and Drohat, 2011). Dies deckt sich mit den Ergebnissen für die relative Genexpression von *Smug1* in dieser Arbeit. Allerdings steht es den leicht erhöhten Genexpressionswerten von *Mbd4* in den *EE*-Mäusen gegenüber den *SC*-Mäusen in Hippocampus und Cerebellum kontrovers gegenüber.

Für *Mbd4* wird jedoch eine Verbindung mit Histon-Deacetylasen postuliert und darüber eine methylierungsabhängige Transkriptionskontrolle (Riccio et al., 1999), was die Veränderungen in der relativen Genexpression von *Mbd4* in *EE* im Vergleich zu *SC* unter Einbeziehung der Methylierungsveränderungen erklären würde.

Tdg ist für die embryonale Entwicklung unentbehrlich und *Tdg*-null-Embryos sterben ca. an Tag E11 (Cortazar et al., 2011). Während der Schwangerschaft

ist *Tdg* vor allem für die Entwicklung von Nervensystem, Thymus, Lunge, Leber, Niere und Darm zuständig. *Tdg* ist aber auch an der späteren Entwicklung von Gehirn, Thymus und Nasenepithel beteiligt, wo entsprechend hohe *Tdg*-Expressionen vorkommen (Niederreither et al., 1998). *Tdg* interagiert aber auch mit einer stetig wachsenden Zahl an Transkriptionsfaktoren und hat somit auch Regulationsfunktion in der Genexpression (Cortazar et al., 2007; Sjolund et al., 2013; Smet-Nocca et al., 2008), was eine Abnahme an *Tdg* mit fortschreitendem Alter erwarten lässt und sich sowohl in der Genexpressionanalyse (Abbildung 41) als auch in den histologischen Schnitten bestätigt (Abbildung 43). Interessanterweise erhöht sich *Tdg* durch den Einfluss von *Enriched Environment* bereits ab 7 Tagen.

Vor allem nimmt *Tdg* aber sowohl an der passiven, als auch an der aktiven DNA-Demethylierung teil. In der passiven DNA-Demethylierung interagiert *Tdg* mit *Dnmt3a*, inhibiert deren Methylierungsaktivität und trägt so zur passiven DNA-Demethylierung bei (Li et al., 2007; Metivier et al., 2008). In der aktiven DNA-Demethylierung schneidet *Tdg* "fehlgepaarte" 5fC:G und 5caC:G und ersetzt 5fC bzw. 5caC durch Cytosin in der Basenreparatur (Li et al., 2015; Maiti and Drohat, 2011). Tdg ist wie Dnmt3a vor allem in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus im Hippocampus und in den Purkinjezellen des Cerebellums exprimiert, vor allem in NeuN-negativen Zellen (Abbildung 45), was für eine Rolle in der frühen Entwicklung, aber auch für eine Rolle in der adulten Neurogenese spricht, weshalb eine Erhöhung in *EE*-Mäusen folgerichtig ist. Des Weiteren sind zwar hauptsächlich, aber nicht ausschließlich NeuN-negative Zellen auch Tdg-positiv, was für eine Reparaturaktivität von Tdg in postmitotischen Neuronen spricht.

Die Hypothese der entwicklungsabhängigen Entstehung von Krankheiten geht davon aus, dass Einflüsse in der frühen Entwicklung eines Organismus mit über das Risiko entscheiden, ob man im späteren Leben eine Krankheit erleidet oder nicht (Skogen and Overland, 2012). Epidemiologische Studien und Tierversuche demonstrierten, dass Unterernährung ebenso wie Überernährung in der frühen Entwicklung die Anfälligkeit für metabolische Erkrankungen, wie Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes mellitus im Erwachsenenalter beeinflusst (Painter et al., 2005);(Elahi et al., 2009); (Curhan et al., 1996); (Carone et al., 2010). Fettreiche Ernährung in jungen Jahren kann das Risiko erhöhen, als Erwachsener an Adipositas, Glukoseintoleranz oder Insulinresistenz zu erkranken (McKay et al., 2014; Yokomizo et al., 2014; Zheng et al., 2015). Bis jetzt sind die molekularen Mechanismen in der Verbindung zwischen Ernährung und metabolischen Krankheiten unklar. Die Hypothese, dass epigenetische Mechanismen zwischen Ernährung und vorher genannten Krankheiten vermitteln, wurde in den letzten Jahren immer wahrscheinlicher (Jang and Serra, 2014). Auch wurde immer deutlicher, dass das Gehirn im Glukosehaushalt eine zentrale Rolle spielt (Vogt and Bruning, 2013). Des Weiteren wurde in Gehirnen von Mauswelpen, deren Mütter während der Schwangerschaft mit hoch-fetthaltigen Futter ernährt wurden, an Promotoren, wie vom µ-opioid Rezeptor oder Preproenkephalin, eine DNA-Hypomethylierung festgestellt (Vucetic et al., 2010). Nach wie vor ist sehr wenig über epigenetische Modifikationen des zentralen Nervensystems in Bezug auf Ernährung bekannt. In den Mäusen, die bis zu 42 Wochen lang mit unterschiedlichen Futterarten (Zucht- und Haltungsfutter) ernährt wurden, sind in den Analysen keine signifikanten Unterschiede, weder histologisch noch in der Genexpression festgestellt worden. Dies kann daran liegen, dass der Unterschied in der umsetzbaren Energie bei ~10% lag und ein so geringer Unterschied sich weder auf die Genexpression noch auf den Phänotyp signifikant auswirkt. Eventuell würde eine höhere Anzahl an Mäusen geringere Unterschiede deutlicher herausstellen, jedoch sollte trotzdem eine größere Differenz in der Energieaufnahme zwischen den Gruppen hergestellt werden.

Ein Trend kann jedoch für den Methylierungs- und Demethylierungsprozess festgestellt werden. So sind die relativen Genexpressionen der DNA-Methyltransferasen (*Dnmt1*, *Dnmt3a* und *Dnmt3b*) in Hippocampus und Cerebellum bei den Zuchtfutter ernährten Mäusen niedriger als bei den haltungsfutter-ernährten Mäusen (Abbildung 24), was auf eine Reduktion an 5mC in den F+-Mäusen hindeutet, die sich in der Zellauszählung (Abbildung 19) bestätigt. Ebenfalls sind die relativen Genexpressionen der "ten-eleven-translocation" Enzyme (*Tet1*, *Tet2* und *Tet3*) in den mit Zuchtfutter ernährten Mäusen geringer (Abbildung 36) und ebenso die Anzahl an 5hmC-positiven Zellen (Abbildung 33), jedoch sind die relativen Genexpressionen der Enzyme, welche im Basenreparationsmechanismus involviert sind (*Mbd4*, *Smug1* und *Tdg*) erhöht (Abbildung 42). Diese Ergebnisse lassen einen grundsätzlichen Einfluss der Ernäh-

rung auf das Epigenom vermuten. Jedoch muss weiter erforscht werden, welche molekularen und biochemischen Prozesse dafür verantwortlich sind und inwieweit sich Ernährung und epigenetische Veränderungen auch auf neurodegenerative Erkrankungen auswirken und in der Prävention oder Heilung genutzt werden können.

DNA-Methylierungsstudien zeigten in eineiigen Zwillingen eine epigenetische Übereinstimmung in jungen Jahren. In älteren eineiigen Zwillingen jedoch zeigten sich Unterschiede (Fraga et al., 2005), die vor allem dann auffielen, wenn die Personen längere Perioden Ihres Lebens getrennt verbrachten und sich somit unterschiedliche medizinische Hintergründe aneigneten (Feil and Fraga, 2012; Poulsen et al., 2007). Bekannt ist, dass sich Umweltfaktoren positiv oder auch negativ auf die Lebenserwartung auswirken können und Einfluss auf das DNA-Methylierungsmuster haben. Der Einfluss von Umwelteinflüssen auf das Epigenom eines Organismus, insbesondere im Gehirn, ist nach wie vor jedoch nicht ausreichend erforscht. Im Laufe der letzten Jahre wurden dazu von vielen Forschungsgruppen Ergebnisse erarbeitet, die die Vermutung zulassen, dass die Epigenetik vor allem im Gehirn eine große Rolle spielt und sich Umwelteinflüsse wie Enriched Environment oder auch die Ernährung von Individuen auf neurogenerative Vorgänge auswirken können (Kempermann et al., 1997); (Kempermann et al., 2002); (Lee et al., 2002) und somit wahrscheinlich auch Einfluss auf neurodegenerative Erkrankungen nehmen (Nithianantharajah and Hannan, 2006). Obwohl DNA Methylierung seit Jahrzehnten bekannt ist, stellt die Hydroxymethylierung noch ein relativ junges Phänomen dar, das es zu erforschen gilt und welches aufgrund seiner modulatorischen Rolle in biochemischen und molekularen Signalwegen enormes Interesse weckt. Erfolge in unserem Verständnis für Methylierungs- und Demethylierungsveränderungen bilden eine Basis für die Identifizierung neuer Zielgene und Substanzen, die zur pharmakologischen Intervention neurologischer und neurodegenerativer Erkrankungen in einer immer älter werdenden Gesellschaft beitragen können. Trotzdem wurde in keinem Versuch der komplette anzunehmende Kreislauf von Cytosin über 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin und die anschließende Umwandlung zurück zu Cytosin mit den entsprechenden DNA Methyltransferasen (Dnmt1, 3a und 3b) für die Bildung von 5mC, sowie den ten eleven translocation Proteinen (Tet1-3) für die Hydroxymethylierung und den Basenreparaturenzymen (*Mbd4*, *Smug1* und *Tdg*) für die Umwandlung zu nicht-methylierten Cytosin gleichzeitig analysiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Umwelteinflüsse, vor allem Enriched Environment, teilweise auf den Methylierungs- und Demethylierungsprozess in Hippocampus und Cerebellum auswirken. Es wurde gezeigt, dass sich Methylcytosin und Hydroxymethylcytosin im Hippocampus unter Enriched Environment global erhöhen, ebenso wie die Genexpression von den 3 Tets und Tdg. Dass die Epigenetik abhängig von der Hirnregion reguliert wird, zeigt sich hier durch Reduktion an Methylcytosin und Hydroxymethylcytosin im Cerebellum unter *EE* und eine Anderung der Genexpression in *Dnmt1* und *Dnmt3b*, sowie *Tet2*. Obwohl der Unterschied zwischen den beiden Futterarten nur ~10% umsetzbarer Energie betrug, zeigten sich über einen Zeitraum von 273 Tagen Unterschiede, welche die Vermutung zulassen, dass die Ernährung sich auf epigenetische Prozesse auswirkt. So sind sowohl im Hippocampus als auch im Cerebellum fast immer die Genexpressionswerte der Mäuse, welche mit Zuchtfutter ernährt wurden niedriger als jene der mit Haltungsfutter ernährten Mäuse und sowohl die Anzahl Methylcytosinals auch Hydroxymethylcytosin-positiver Zellen im Gyrus Dentatus des Hippocampus und in der Körnerzellschicht des Cerebellum in mit Zuchtfutter ernährten Mäusen verringert.

Ob und inwiefern sich *Enriched Environment* oder eine moderate Erhöhung der Kalorien in der Nahrung über einen langen Zeitraum auf die (De-) Methylierung auswirkt war bisher nicht bekannt und es konnte mit dieser Arbeit auf globaler Ebene ein wichtiger Schritt im Verständnis dafür entwickelt werden. 5hmC ist hierbei von besonderem Interesse für neurodegenerative Erkrankungen, da es vermehrt im Gehirn vorkommt und offenbar dynamisch reguliert werden kann. Es muss hierbei herausgefunden werden, ob 5hmC mit ursächlich für, oder das Ergebnis von neurodegenerativen Erkrankungen ist. Durch neue Methoden, wie dem "Single molecule real time sequencing" (SMRT) oder dem "Nanopore Sequencing" sind Analysen mit wenig Einsatzmaterial, wie es bei Maushirnen der Fall ist, nun möglich und weitere Untersuchungen biochemischer und molekularer Interaktionen zwischen 5hmC, sowie dem (De-) Methylierungsprozess und dem neuronalem Netzwerk sind unerlässlich, um die Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen zu verstehen und neue Ansätze zu finden, die zur Heilung und/oder Prävention beitragen können.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: veranderte Grafik waddingtons "The Strategy of the Genes"
(1957). Der Ball repräsentiert den Verlauf der Entwicklung. Auf dem
gedanklich höchsten Punkt des Tals ist die befruchtete Eizelle
anzunehmen. Der Ball folgt den vorhandenen Entwicklungspfaden,
zwischen den einzelnen Pfaden kann der Verlauf nicht ohne weiteres
geändert werden. Jedoch kann eine Induktion von außen stark genug
sein, um eine Talwand in der epigenetischen Landschaft zu überwinden
und die Entwicklung wird anders kanalisiert
Abbildung 2: DNA-Methylierungsreaktion der Base Cytosin zu 5-
Methylcytosin über DNA-Methyltransferasen (DNMTs) mit S-
Adenosylmethionin (SAM) als Cofaktor. Z= Zuckerrest
Abbildung 3: Gewebeabhängige Unterschiede an globalem 5hmC Gehalt
relativ zu Gehirn (Nestor et al., 2012) 14
Abbildung 4: Dynamische Regulation von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in der
DNA. DNMTs sind verantwortlich für die Umwandlung von Cytosin in 5mC,
TET Enzyme für die Oxidation von 5mC in 5hmC und weiter zu 5fC und
5caC. APOBEC/AID wandeln 5hmC in 5hmU und 5mC in Thymin um.
TDG, SMUG1 und MBD4 sind über die Basenextinktionsreparation
verantwertlich für des Ersetzen durch unmedifiziertes C_{i} (Euland He
verantworther full das Erseizen durch unmodiliziertes C. (Fu and He,
2012)
2012)
2012)
2012)
2012)
2012)
2012)
 Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der TET Proteine. Zink-Finger Domäne (blau), Cystein-reiche Domäne (orange) und DSBH-Domäne (grün). TET2 besitzt keine CXXC-Domäne. (Shen et al., 2014)
2012)
Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der TET Proteine. Zink-Finger Domäne (blau), Cystein-reiche Domäne (orange) und DSBH-Domäne (grün). TET2 besitzt keine CXXC-Domäne. (Shen et al., 2014) 16 Abbildung 6: Chemischer Mechanismus der Oxidation von 5mC. Bei der Sauerstoffaktivierung wird ein hochaktives Fe(IV)-oxo Intermediat gebildet, welches das Sauerstoffatom im Substratoxidationsschritt an die C-H Bindung 7: (a) Gezeigt ist das aktive Zentrum von TDG gebunden an
 Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der TET Proteine. Zink-Finger Domäne (blau), Cystein-reiche Domäne (orange) und DSBH-Domäne (grün). TET2 besitzt keine CXXC-Domäne. (Shen et al., 2014)
Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der TET Proteine. Zink-Finger Domäne (blau), Cystein-reiche Domäne (orange) und DSBH-Domäne (grün). TET2 besitzt keine CXXC-Domäne. (Shen et al., 2014) Methodski (Shen et al., 2014) <td< td=""></td<>
 Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der TET Proteine. Zink-Finger Domäne (blau), Cystein-reiche Domäne (orange) und DSBH-Domäne (grün). TET2 besitzt keine CXXC-Domäne. (Shen et al., 2014)
 Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der TET Proteine. Zink-Finger Domäne (blau), Cystein-reiche Domäne (orange) und DSBH-Domäne (grün). TET2 besitzt keine CXXC-Domäne. (Shen et al., 2014)
 Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der TET Proteine. Zink-Finger Domäne (blau), Cystein-reiche Domäne (orange) und DSBH-Domäne (grün). TET2 besitzt keine CXXC-Domäne. (Shen et al., 2014)
 Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der TET Proteine. Zink-Finger Domäne (blau), Cystein-reiche Domäne (orange) und DSBH-Domäne (grün). TET2 besitzt keine CXXC-Domäne. (Shen et al., 2014) Abbildung 6: Chemischer Mechanismus der Oxidation von 5mC. Bei der Sauerstoffaktivierung wird ein hochaktives Fe(IV)-oxo Intermediat gebildet, welches das Sauerstoffatom im Substratoxidationsschritt an die C-H Bindung des Substrates abgibt (Shen et al., 2014). Abbildung 7: (a) Gezeigt ist das aktive Zentrum von TDG gebunden an DNA, die ein Substratanalogon (Kogelberg et al.) zu 5caC besitzt. Die Heteroatome sind markiert nach Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot) und Phosphor (orange). Die Distanz der Wasserstoffbrückenbindungen ist in Å gemessen. (b) Der BER Reaktionsweg beinhaltet das Entfernen der abasischen Seite, Austauschen des Nukleotids in unmodifiziertes Desoxycytidin-Triphosphat (dCTP) durch die DNA-Polymerase, wobei
 Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der TET Proteine. Zink-Finger Domäne (blau), Cystein-reiche Domäne (orange) und DSBH-Domäne (grün). TET2 besitzt keine CXXC-Domäne. (Shen et al., 2014)

Abbildung 8: Foto des Enriched Environment Käfigs. Links mit den
Klettermöglichkeiten abgebildet, rechts mit Holzhäuschen, Tunnel und
verschiedenen Nestbaumaterialien sowie Laufrädern
Abbildung 9: Zeitskala des Enriched Environment bzw. Einzelkäfighaltung.
Abbildung 10: Vergleich der Nährstoffe und der Energie der beiden
unterschiedlichen Euttersorten. Das Zuchtfutter enthält 10.5% mehr an
umentzbaror Enorgio, da dio Zusammonsotzung aus mohr Protoin und
Eatt im Verdeich zu Kohlenbydraten besteht
(ssniff de/Katalog/Euttermittel für Ratten und Mäuse) 28
Abbildung 11: Elektronberogramm der RNA Proben mit dem höchsten und
dem niedrigsten gemessenen RIN Wert RNA Sample 4. Kleinhirn der
Maus #22 (21 Tage EE) RIN: 9 50 (oben) und RNA Sample 10
Hippocampus der Maus #476 (7 Tage SC) RIN: 6.3 (unten) demessen mit
dem Total RNA Pico Kit (Agilent)
Abbildung 12: Sequenz mit dem verwendeten Primernaar von ACTB Die
Exons sind zur besseren Differenzierung abwechselnd schwarz und blau
deschrieben. Der Vorwärts-Primer von ACTB (gelb markiert unterstrichen)
ist exonspannend für den Revers-Primer (gelb markiert) konnte
exonspannend keine Sequenz mit den entsprechenden Figenschaften
(siehe Material und Methoden 2.2.4) gefunden werden, weshalb dieser
nicht exonspannend liegt 40
Abbildung 13: Messung der Verdünnungsreihe für cDNA (oben) mit dem
Primerpaar von ACTB (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8) und die daraus
resultierende Standardkurve (unten), sowie die vom Programm
LightCvcler 480 (Roche) berechnete Effizienz von 1.953 (roter Kasten). 41
Abbildung 14: Genexpression der immediate early genes Arcadlin. brain-
derived neurotrophic factor. Proto-oncogene c-Fos und early growth
receptor 1 über maximal 129 Tage in EE (blau) bzw. SC (grau). Die C_{T} -
Werte wurden über die comparative C_{τ} -Methode ausgewertet, mit dem
Mittelwert über die housekeeping Gene Gapdh. Hprt. Ipo8 und Tbp der
ieweiligen Maus als Referenz. Alle C⊤- Werte wurden auf den ieweiligen
Wert von 1 Tag single caged normalisiert. Es wurden die cDNAs von
ieweils 5 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem
Roche LightCvcler 480 gemessen
Abbildung 15: Standardkurve für die 5mC Messung (hier für die
Hippocampus Proben). Es sind die Absorptionen bei 450nm zu den
Standardkonzentrationen mit linearer Regression im Doppelansatz
dargestellt
Abbildung 16: Quantitative Bestimmung von 5mC in Gesamt-DNA des
Hippocampus bzw. Cerebellums über einen maximalen Zeitraum von
129 Tagen EE (weiß) bzw. SC (dunkelgrau) mit dem Methylflash
Quantification Kit, basierend auf dem ELISA-Prinzip. Es wurden jeweils

100ng DNA pro Well aufgetragen und jede Probe in Triplikaten gemessen.

Abbildung 17: Auszählung der 5mC-positiven Zellen in FFPE-Schnitten von je 5 Mäusen, die in EE (weiß) oder SC (dunkelgrau) gehalten wurden, im Gyrus Dentatus des Hippocampus (links) und der Körnerzellschicht des Cerebellums (rechts). Es ist sowohl im Hippocampus als auch im Cerebellum eine Zunahme an 5mC-positiven Zellen mit fortschreitendem Abbildung 18: 5mC-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-129 Tagen in SC- bzw. EE-Haltung. Aufgrund der hohen Anzahl an 5mC-positiven Zellen ist keine Zu- oder Abnahme an 5mC in der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus oder Cerebellums erkennbar. Man sieht im Gyrus Dentatus des Hippocampus eine Abnahme an 5mC-positiven Zellen in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus. Abbildung 19: Auszählung der 5mC-positiven Zellen in FFPE-Schnitten von je 3 Mäusen, die mit Zuchtfutter (weiß) oder Haltungsfutter (dunkelgrau) ernährt wurden, im Gyrus Dentatus des Hippocampus (links) und der Körnerzellschicht des Cerebellums (rechts). Es ist sowohl im Hippocampus als auch im Cerebellum eine Zunahme an 5mC-positiven Zellen mit fortschreitendem Alter und mehr 5mC-positive Zellen in beiden Abbildung 20: 5mC-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-273 Tagen mit Haltungs-bzw. Zuchtfutter. In der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus im Hippocampus sowie Cerebellums ist aufgrund der hohen Anzahl an 5mC-positiven Zellen keine Veränderung erkennbar. Im Gyrus Dentatus ist in der subgranulären Zone eine Abnahme mit fortschreitendem Alter der Mäuse zu sehen. Abbildung 21: Kofärbung von Ki67 und 5mC im Gyrus Dentatus des Hippocampus von 0 Tagen sowie 129 Tagen SC und EE Mäusen. Ki67 nimmt im Alterungsprozess ab. Zu allen Zeitpunkten ist eine Kolokalisation von Ki67 mit 5mC zu sehen, aber kein Unterschied zwischen den beiden Abbildung 22: Kofärbung von Ki67 und 5mC im Gyrus Dentatus des Hippocampus von 0 Tagen sowie 129 Tagen F⁻ und F⁺- Mäusen. Ki67 nimmt im Alterungsprozess ab. Zu allen Zeitpunkten ist eine Kolokalisation von Ki67 mit 5mC zu sehen, jedoch kein Unterschied zwischen den Abbildung 23: Darstellung der relativen Genexpression der Dnmts 1, 3a und 3b in EE- (blau) und SC-Mäusen (grau) über einen Zeitraum von maximal 129 Tagen. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression, die X-Achse die jeweiligen Zeitpunkte. Die C_T-Werte wurden über die
Abbildung 24: Darstellung der relativen Genexpression der Dnmts 1, 3a und 3b in F+ (blau) und F- Mäusen (grau) über einen Zeitraum von maximal 273 Tagen. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression, die X-Achse zeigt die jeweiligen Zeitpunkte. Die C_T-Werte wurden über die comparative C_T-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die housekeeper Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp der jeweiligen Maus als Referenz. Alle C_T- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen F⁻/F⁺ normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 3 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche LightCycler 480 gemessen.

Abbildung 26: Dnmt3a-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-273 Tagen mit Haltungs- bzw. Zuchtfutter. In der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus im Hippocampus, ebenso wie in der Körnerzellschicht des Cerebellums nimmt die Anzahl an Dnmt3apositiven Zellen mit fortschreitendem Alter ab. Es ist kein Unterschied zwischen den beiden Futterarten in der Proteinexpression von Dnmt3a zu erkennen. Messbalken: Gyrus Dentatus: 200µm, Cerebellum: 100µm.

61

Abbildung 29: Standardkurve für die 5hmC Messung (hier für die
Hippocampus Proben) Es sind die Absorptionen bei 450nm zu den
Standardkonzentrationen mit linearer Regression im Dop-pelansatz
dargestellt
Abbildung 30: Quantitative Bestimmung von 5hmC in Gesamt- DNA des
Hippocampus bzw. Cerebellums über einen maximalen Zeitraum von
129 Tagen <i>EE</i> (weiß) bzw. SC (dunkelgrau) mit dem Methylflash
Quantification Kit, basierend auf dem ELISA-Prinzip. Es wurden ieweils
200ng DNA pro well aufgetragen und jede Probe in Triplikaten gemessen.
Abbildung 31: Auszählung der 5hmC-positiven Zellen in FFPE-Schnitten
von jeweils 5 Mäusen welche in SC (dunkelgrau) oder EE (weiß)
gehalten wurden. Im Gyrus Dentatus (links) wie im Cerebellum (rechts)
sieht man eine Zunahme an 5hmC-positiven Zellen mit fortschreitendem
Alter. In beiden Hirnregionen sind mehr 5hmC-positive Zellen in den EE-
Mäusen zu verzeichnen.
Abbildung 32: 5hmC-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und
Cerebellum nach 0-129 Tagen in SC- bzw. FE-Haltung. In der
Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus im Hinnocampus sowie
Cerebellums nimmt die Anzahl der 5hmC-positiven Zellen mit
fortschreitendem Alter zu Zwischen EE/SC ist kein Unterschied zu
orkonnon Mosshalkon 200um
Abbildung 22: Auszählung der 5hmC nositiven Zellen in EEBE Schnitten
Abbildung 55. Auszahlung der 5mil-positiven Zenen in FFFE-Schnitten
Zuchtfutter (weiß) ernöhrt wurden im Gurus Deptetus des
Linnagemenus (links) wis im Careballum (reachts) sight man sing Zunghma
Hippocampus (links) wie im Cerebelium (rechts) sieht man eine zunanme
an 5nmC-positiven Zellen mit fortschreitendem Alter. In beiden
Hirnregionen sind mehr 5hmC-positive Zellen in den mit Haltungsfutter
ernahrten Mausen zu verzeichnen
Abbildung 34: 5hmC-DAB-Farbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und
Cerebellum nach 0-273 Tagen mit Haltungsfutter bzw. Zuchtfutter.
Zunahme an 5hmC-posititven Zellen mit zunehmendem Alter im Gyrus
Dentatus, wie auch im Cerebellum. Im Gyrus Dentatus zum Zeitpunkt von
129 Tagen weniger 5hmC-positive Zellen als zu früheren und späteren
Zeitpunkten. Messbalken 200µm70
Abbildung 35: Darstellung der relativen Genexpression der "Ten-eleven-
translocation" Enzyme Tet1-3 in EE- (blau) und SC-Mäusen (grau)
über einen Zeitraum von maximal 129 Tagen. Die Y-Achse zeigt die
relative Genexpression, die X-Achse zeigt die verschiedenen
Behausungen bis zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Ct-Werte wurden
über die comparative Ct-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über
die housekeeper Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp der jeweiligen Maus als
Referenz. Alle CT- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen

Enriched Environment/Single caged normalisiert. Es wurden die cDNAs
von jeweils 5 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit
dem Roche LightCycler 480 gemessen
Abbildung 36: Darstellung der relativen Genexpression der "Ten-eleven-
translocation" Enzyme Tet1-3 in F+ - (blau) und FMäusen (grau)
über einen Zeitraum von maximal 273 Tagen. Die Y-Achse zeigt die
relative Genexpression, die X-Achse zeigt die verschiedenen Futtermittel
bis zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Ct-Werte wurden über die
comparative Ct-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die
housekeeper Gapdh Hort Ipo8 und Tho der jeweiligen Maus als
Referenz, Alle CT- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen
F_{+}/F_{-} normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 3 Mäusen
(Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche LightCycler
480 gemessen
Abbildung 37: Tet1-DAB-Färbung sagittaler Schnitte Hinnocampus und
Cerebellum nach 0-129 Tagen in SC- bzw FE-Haltung In der
subgranulären Zone des Gyrus Dentatus im Hinnocampus sind keine
Tot1-positivon Zollon vorbandon. In der Körnerzellschicht des Gyrus
Dentatus Abnahma an Totil nastivan Zallan im zaitlichan Varlauf. Im
Coroballum dar SC Mäuse bei sind nach 21 und 120 Tagan Tatt positive
Zellen in der Körnerzelleshicht zu sehen im Cogeneetz zu den Cerebelli
der EE Mäuse we eusschließlich Durkinisseller Tett nesitiv sefärkt
der EE-Mause, wo ausschließlich Purkinjezeilen TetT-positiv gefarbt
wurden. Messbalken: 200µm
Abbildung 38: Tet1-DAB-Farbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und
Cerebellum nach 0-2/3 Tagen mit Haltungs- bzw. Zuchtfutter. In der
molekularen Zellschicht des Gyrus Dentatus im Hippocampus Abnahme
an Tet1-positiven Zellen, und keine Tet1-positiven Zellen in der
subgranulären Zone. Im Cerebellum sind ab 21 Tagen ausschließlich
Purkinje Zellen Tet1-positiv. Messbalken: 200µm
Abbildung 39: Immunfluoreszenzkofärbung des Gyrus Dentatus und
Cerebellums mit Tet1 und NeuN von Mäusen vor Beginn des EE-
Versuchs, sowie Mäusen mit 129 Tagen in Enriched Environment
bzw. Einzelkäfighaltung. Tet1 ist in der Körnerzellschicht des
Hippocampus ausschließlich im Cytoplasma von NeuN positiven Zellen
exprimiert und nicht in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus, wo
auch keine NeuN-positiven Zellen vorhanden sind. In der
Körnerzellschicht des Cerebellums nimmt die Anzahl der Tet1 positiven
Zellen altersabhängig ab. In der Purkinjezellschicht des Cerebellums wird
Tet1 stabil über den gesamten Zeitraum exprimiert, sowohl in Mäusen der
Enriched Environment-Haltung als auch in Mäusen der SC-Haltung.
Messbalken: 100µm79
Abbildung 40: Immunfluoreszenzkofärbung des Gyrus Dentatus und
Cerebellums mit Tet1 und NeuN von Mäusen vor Beginn des

Futterversuchs und Mäusen mit 273 Tagen Zuchtfutter bzw. Haltungsfutter. Tet1 ist in der Körnerzellschicht des Hippocampus ausschließlich im Cytoplasma von NeuN positiven Zellen exprimiert und nicht in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus, wo auch keine NeuN-positiven Zellen vorhanden sind. In der Körnerzellschicht des Cerebellums nimmt die Anzahl der Tet1 positiven Zellen altersabhängig ab. In der Purkinje Zellschicht des Cerebellums wird Tet1 stabil über den gesamten Zeitraum exprimiert, sowohl in Mäusen mit Zuchtfutter als auch in Mäusen die mit Haltungsfutter ernährt wurden. Messbalken: 100µm.. 80 Abbildung 41: Darstellung der relativen Genexpression von Mbd4, Smug1 und Tdg in EE- (blau) und SC-Mäusen (grau) über einen Zeitraum von maximal 129 Tagen. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression, die X-Achse zeigt die verschiedenen Zeitpunkte. Die Ct-Werte wurden über die comparative Ct-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die housekeeper Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp der jeweiligen Maus als Referenz. Alle Ct- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen single caged/enriched normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 5 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche

Abbildung 42: Darstellung der relativen Genexpression von Mbd4, Smug1 und Tdg in F+ (blau) und F- Mäusen (grau) über einen Zeitraum von maximal 273 Tagen. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression, die X-Achse zeigt die verschiedenen Zeitpunkte. Die Ct-Werte wurden über die comparative Ct-Methode ausgewertet, mit dem Mittelwert über die housekeeper Gapdh, Hprt, Ipo8 und Tbp der jeweiligen Maus als Referenz. Alle Ct- Werte wurden auf den jeweiligen Wert von 0 Tagen F+/F- normalisiert. Es wurden die cDNAs von jeweils 3 Mäusen (Hippocampus oder Cerebellum) in Triplikaten mit dem Roche LightCycler 480 gemessen. 85

Abbildung 44: **Tdg-DAB-Färbung sagittaler Schnitte, Hippocampus und Cerebellum nach 0-273 Tagen mit Haltungs- bzw. Zuchtfutter.** In der molekularen Zellschicht und subgranulären Zone des Gyrus Dentatus im Hippocampus sind mehr Tdg-positive Zellen in Schnitten der F⁻-Mäuse, was sich bei 273 Tagen Haltung unter F⁻/F⁺ aber aufhebt. In der Purkinjezellschicht des Cerebellums sind keine Veränderungen der Tdg-

positiven Zellen mit fortschreitendem Alter oder in den verschiedenen Futterarten erkennbar, Messbalken: 200um
Abbildung 45: Immunfluoreszenzfärbung des Gyrus Dentatus im
Hippocampus mit Tdg und NeuN nach 0 und 129 Tagen in SC- bzw.
EE-Haltung. Tdg ist nach 0 Tagen vor allem in der subgranulären Zone
des Gyrus Dentatus aber auch in der molekularen Zellschicht des Gyrus
Dentatus des Hippocampus exprimiert. Nach 129 Tagen vor allem noch in
der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus und nur vereinzelt in der
molekularen Zellschicht. Im Alterungsprozess nimmt die Anzahl der Tdg-
positiven Zellen sowohl in der Enriched Environment- als auch in der
Einzelkäfig-Haltung ab. Eine Kofärbung von Tdg und NeuN liegt nur
vereinzelt vor. Messbalken: Hippocampus: 100µm, Cerebellum: 200µm 91
Abbildung 46: Immunfluoreszenzfärbung des Gyrus Dentatus im
Hippocampus mit Tdg und NeuN nach 0 und 129 Tagen in SC- bzw.
EE-Haltung. Tdg ist nach 0 Tagen vor allem in der subgranulären Zone
des Gyrus Dentatus aber auch in der molekularen Zellschicht des Gyrus
Dentatus des Hippocampus exprimiert. Nach 129 Tagen ist Tdg vor allem
noch in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus und nur vereinzelt in
der molekularen Zellschicht zu erkennen. Im Alterungsprozess nimmt die
Anzahl der Tdg-positiven Zellen sowohl in den mit Haltungsfutter-
ernährten Mäusen als auch in den Zuchtfutter-ernährten Mäusen ab. Eine
Kofärbung von Tdg und NeuN liegt nur vereinzelt vor. Messbalken:
Hippocampus: 100µm, Cerebellum: 200µm

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ansatz der reversen Transkriptionsreaktion	29
Tabelle 2: Reaktionszeiten und Temperaturen der reversen	
Transkriptionsreaktion	30
Tabelle 3: Programmparameter für die qRT-PCR	31
Tabelle 4: qPCR Ansatz pro well	31
Tabelle 5: Primersequenzen für die qRT-PCR (alphabetisch)	33
Tabelle 6: Liste aller genutzten primären Antikörper (alphabetisch)	36

Literaturverzeichnis

Achanta, G., Sasaki, R., Feng, L., Carew, J.S., Lu, W., Pelicano, H., Keating, M.J., and Huang, P. (2005). Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. The EMBO journal *24*, 3482-3492.

Agilent (2004). 2100 expert software. Tech. Rep. 5989-0112EN, Agilent Technologies, Software Data Sheet.

Alikhani, N., Guo, L., Yan, S., Du, H., Pinho, C.M., Chen, J.X., Glaser, E., and Yan, S.S. (2011). Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid-beta degrading enzyme, PreP peptidasome, in Alzheimer's disease brain mitochondria. Journal of Alzheimer's disease : JAD 27, 75-87.

Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H.J., and Herrlich, P. (1987). 12-Otetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. Molecular and cellular biology *7*, 2256-2266.

Aoki, H., Kimoto, K., Hori, N., and Toyoda, M. (2005). Cell Proliferation in the Dentate Gyrus of Rat Hippocampus Is Inhibited by Soft Diet Feeding. Gerontology *51*, 369-374.

Auclair, G., and Weber, M. (2012). Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. Biochimie *94*, 2202-2211.

Barrès, R., Yan, J., Egan, B., Treebak, Jonas T., Rasmussen, M., Fritz, T., Caidahl, K., Krook,
A., O'Gorman, Donal J., and Zierath, Juleen R. (2012). Acute Exercise Remodels Promoter
Methylation in Human Skeletal Muscle. Cell Metabolism *15*, 405-411.

Bartolomei, M.S., and Ferguson-Smith, A.C. (2011). Mammalian genomic imprinting. Cold Spring Harbor perspectives in biology *3*.

Basbous, J., Jariel-Encontre, I., Gomard, T., Bossis, G., and Piechaczyk, M. (2008). Ubiquitinindependent- versus ubiquitin-dependent proteasomal degradation of the c-Fos and Fra-1 transcription factors: Is there a unique answer? Biochimie *90*, 296-305.

Bednarczyk, M.R., Hacker, L.C., Fortin-Nunez, S., Aumont, A., Bergeron, R., and Fernandes, K.J.L. (2011). Distinct stages of adult hippocampal neurogenesis are regulated by running and the running environment. Hippocampus *21*, 1334-1347.

Bernstein, L. (1973). A study of some enriching variables in a free-environment for rats. Journal of psychosomatic research *17*, 85-88.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes & development *16*, 6-21.

Bormann, F., Sers, C., Seliger, B., Handke, D., Bergmann, T., Seibt, S., Lehrach, H., and Dahl, A. (2011). Methylation-specific ligation detection reaction (msLDR): a new approach for multiplex evaluation of methylation patterns. Molecular genetics and genomics : MGG *286*, 279-291.

Brennan, P.A., Schellinck, H.M., and Keverne, E.B. (1999). Patterns of expression of the immediate-early gene egr-1 in the accessory olfactory bulb of female mice exposed to pheromonal constituents of male urine. Neuroscience *90*, 1463-1470.

Caputto, B.L., and Guido, M.E. (2000). Immediate Early Gene Expression Within the Visual System: Light and Circadian Regulation in the Retina and the Suprachiasmatic Nucleus. Neurochem Res *25*, 153-162.

Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H., Zamore, P.D., *et al.* (2010). Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. Cell *143*, 1084-1096.

Cesa, R., Scelfo, B., and Strata, P. (2007). Activity-Dependent Presynaptic and Postsynaptic Structural Plasticity in the Mature Cerebellum. The Journal of Neuroscience *27*, 4603-4611.

Cheng, P.-L., Song, A.-H., Wong, Y.-H., Wang, S., Zhang, X., and Poo, M.-M. (2011). Selfamplifying autocrine actions of BDNF in axon development. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 18430-18435.

Cheng, Y., Bernstein, A., Chen, D., and Jin, P. (2015). 5-Hydroxymethylcytosine: A new player in brain disorders? Exp Neurol *268*, 3-9.

Cole, A.J., Saffen, D.W., Baraban, J.M., and Worley, P.F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. Nature *340*, 474-476.

Cortazar, D., Kunz, C., Saito, Y., Steinacher, R., and Schar, P. (2007). The enigmatic thymine DNA glycosylase. DNA Repair (Amst) *6*, 489-504.

Cortazar, D., Kunz, C., Selfridge, J., Lettieri, T., Saito, Y., MacDougall, E., Wirz, A., Schuermann, D., Jacobs, A.L., Siegrist, F., *et al.* (2011). Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. Nature *470*, 419-423.

Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., *et al.* (2011). Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. Cell *146*, 67-79.

Costa, E., Davis, J.M., Dong, E., Grayson, D.R., Guidotti, A., Tremolizzo, L., and Veldic, M. (2004). A GABAergic cortical deficit dominates schizophrenia pathophysiology. Critical reviews in neurobiology *16*, 1-23.

Curhan, G.C., Willett, W.C., Rimm, E.B., Spiegelman, D., Ascherio, A.L., and Stampfer, M.J. (1996). Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. Circulation *94*, 3246-3250.

Curran, T., and Morgan, J.I. (1987). Memories of fos. BioEssays 7, 255-258.

Dawlaty, M.M., Ganz, K., Powell, B.E., Hu, Y.C., Markoulaki, S., Cheng, A.W., Gao, Q., Kim, J., Choi, S.W., Page, D.C., *et al.* (2011). Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. Cell Stem Cell *9*, 166-175.

Day, J.J., and Sweatt, J.D. (2010). DNA methylation and Memory Formation. Nature neuroscience *13*, 1319-1323.

Day, J.J., and Sweatt, J.D. (2011). Epigenetic modifications in neurons are essential for formation and storage of behavioral memory. Neuropsychopharmacology *36*, 357-358.

Deng, W., Saxe, M.D., Gallina, I.S., and Gage, F.H. (2009). Adult-Born Hippocampal Dentate Granule Cells Undergoing Maturation Modulate Learning and Memory in the Brain. The Journal of Neuroscience *29*, 13532-13542.

Ehrlich, D.E., and Josselyn, S.A. (2015). Plasticity-related genes in brain development and amygdala-dependent learning. Genes, Brain and Behavior, n/a-n/a.

Elahi, M.M., Cagampang, F.R., Mukhtar, D., Anthony, F.W., Ohri, S.K., and Hanson, M.A. (2009). Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. Br J Nutr *102*, 514-519.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med *4*, 1313-1317.

Fabel, K., Wolf, S.A., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., and Kempermann, G. (2009). Additive Effects of Physical Exercise and Environmental Enrichment on Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. Frontiers in neuroscience *3*, 50.

Feil, R., and Fraga, M.F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. Nature reviews. Genetics *13*, 97-109.

Feng, J., Chang, H., Li, E., and Fan, G. (2005). Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. Journal of neuroscience research *79*, 734-746.

Fleige, S., Pfaffl, M.W., (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Molecular Aspects of Medicine 27, 126-139.

Foscarin, S., Rossi, F., and Carulli, D. (2012). Influence of the environment on adult CNS plasticity and repair. Cell and tissue research *349*, 161-167.

Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., *et al.* (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 10604-10609.

Fu, Y., and He, C. (2012). Nucleic acid modifications with epigenetic significance. Current opinion in chemical biology *16*, 516-524.

Fujita, S., Inanobe, A., Chachin, M., Aizawa, Y., and Kurachi, Y. (2000). A regulator of G protein signalling (RGS) protein confers agonist-dependent relaxation gating to a G protein-gated K+ channel. The Journal of physiology *526 Pt 2*, 341-347.

Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. Current opinion in genetics & development *15*, 490-495.

Gelfo, F., Cutuli, D., Foti, F., Laricchiuta, D., De Bartolo, P., Caltagirone, C., Petrosini, L., and Angelucci, F. (2011). Enriched Environment Improves Motor Function and Increases Neurotrophins in Hemicerebellar Lesioned Rats. Neurorehabilitation and Neural Repair *25*, 243-252.

Globus, A., Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., and Diamond, M.C. (1973). Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. Journal of comparative and physiological psychology *82*, 175-181.

Gray, J.D., Rubin, T.G., Hunter, R.G., and McEwen, B.S. (2014). Hippocampal gene expression changes underlying stress sensitization and recovery. Molecular psychiatry *19*, 1171-1178.

Guo, J.U., Ma, D.K., Mo, H., Ball, M.P., Jang, M.H., Bonaguidi, M.A., Balazer, J.A., Eaves, H.L., Xie, B., Ford, E., *et al.* (2011a). Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. Nature neuroscience *14*, 1345-1351.

Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.L., and Song, H. (2011b). Hydroxylation of 5methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. Cell *145*, 423-434.

Guzowski, J.F., Miyashita, T., Chawla, M.K., Sanderson, J., Maes, L.I., Houston, F.P., Lipa, P., McNaughton, B.L., Worley, P.F., and Barnes, C.A. (2006). Recent behavioral history modifies coupling between cell activity and Arc gene transcription in hippocampal CA1 neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 1077-1082.

Hahn, M.A., Qiu, R., Wu, X., Li, A.X., Zhang, H., Wang, J., Jui, J., Jin, S.G., Jiang, Y., Pfeifer,G.P., *et al.* (2013). Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. Cell Rep *3*, 291-300.

Hall, J., Thomas, K.L., and Everitt, B.J. (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. Nature neuroscience *3*, 533-535.

Hashimoto, H., Liu, Y., Upadhyay, A.K., Chang, Y., Howerton, S.B., Vertino, P.M., Zhang, X., and Cheng, X. (2012). Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. Nucleic acids research *40*, 4841-4849.

He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., *et al.* (2011a). Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. Science (New York, N.Y.) *333*, 1303-1307.

He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., *et al.* (2011b). Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. Science *333*, 1303-1307.

Hebb, D. (1947). The effects of early experience on problem solving at maturity. In American Psychologist, pp. 306-307.

Herdegen, T., and Leah, J.D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. Brain research. Brain research reviews *28*, 370-490.

Hughes, P., and Dragunow, M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. Pharmacological Reviews *47*, 133-178.

Hunter, R.G., McCarthy, K.J., Milne, T.A., Pfaff, D.W., and McEwen, B.S. (2009). Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 20912-20917.

Ickes, B.R., Pham, T.M., Sanders, L.A., Albeck, D.S., Mohammed, A.H., and Granholm, A.-C. (2000). Long-Term Environmental Enrichment Leads to Regional Increases in Neurotrophin Levels in Rat Brain. Experimental Neurology *164*, 45-52.

Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C., and Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES cell self-renewal, and ICM specification. Nature *466*, 1129-1133.

Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. Science (New York, N.Y.) *333*, 1300-1303.

Jang, H., and Serra, C. (2014). Nutrition, epigenetics, and diseases. Clin Nutr Res 3, 1-8.

Jones, M.W., Errington, M.L., French, P.J., Fine, A., Bliss, T.V.P., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S., and Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. Nature neuroscience *4*, 289-296.

Kaczmarek, L., and Chaudhuri, A. (1997). Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. Brain research. Brain research reviews *23*, 237-256.

Kannangara, T.S., Webber, A., Gil-Mohapel, J., and Christie, B.R. (2009). Stress differentially regulates the effects of voluntary exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of mice. Hippocampus *19*, 889-897.

Kempermann, G. (2002). Regulation of adult hippocampal neurogenesis – implications for novel theories of major depression1. Bipolar disorders *4*, 17-33.

Kempermann, G., Gast, D., and Gage, F.H. (2002). Neuroplasticity in old age: Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. Annals of neurology *52*, 135-143.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature *386*, 493-495.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1998). Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus. The Journal of Neuroscience *18*, 3206-3212.

Kerr, L.D., Miller, D.B., and Matrisian, L.M. (1990). TGF-β1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a fos binding sequence. Cell *61*, 267-278.

Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H., and Inokuchi, K. (2009). Adult Neurogenesis Modulates the Hippocampus-Dependent Period of Associative Fear Memory. Cell *139*, 814-827.

Klengel, T., Pape, J., Binder, E.B., and Mehta, D. (2014). The role of DNA methylation in stressrelated psychiatric disorders. Neuropharmacology *80*, 115-132.

Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends in biochemical sciences *31*, 89-97.

Kogelberg, H., Frenkiel, T.A., Birdsall, B., Chai, W., and Muskett, F.W. (2002). Binding of sucrose octasulphate to the C-type lectin-like domain of the recombinant natural killer cell receptor NKR-P1A observed by NMR spectroscopy. Chembiochem : a European journal of chemical biology *3*, 1072-1077.

Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M., and Tsumoto, T. (2001). Activity-Dependent Transfer of Brain-Derived Neurotrophic Factor to Postsynaptic Neurons. Science *291*, 2419-2423.

Kohli, R.M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. Nature *502*, 472-479.

Kolarow, R., Brigadski, T., and Lessmann, V. (2007). Postsynaptic Secretion of BDNF and NT-3 from Hippocampal Neurons Depends on Calcium–Calmodulin Kinase II Signaling and Proceeds via Delayed Fusion Pore Opening. The Journal of Neuroscience *27*, 10350-10364.

Kovary, K., and Bravo, R. (1992). Existence of different Fos/Jun complexes during the G0-to-G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts: differential role of Fos proteins. Molecular and cellular biology *12*, 5015-5023.

Kraus, T.J., Guibourt, V., and Kretzschmar, H. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine, the "Sixth Base", during brain development and ageing. J Neural Transm, 1-9.

Krebs, C., Galonić Fujimori, D., Walsh, C.T., and Bollinger, J.M. (2007). Non-Heme Fe(IV)–Oxo Intermediates. Accounts of Chemical Research *40*, 484-492.

Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base, 5-hydroxymethylcytosine is present in brain and enriched in Purkinje neurons. Science (New York, N.y.) *324*, 929-930.

Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M.D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., and Kempermann, G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. The Journal of comparative neurology *467*, 455-463.

Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsirigos, A., Ong, C.T., Low, H.M., Kin Sung, K.W., Rigoutsos, I., Loring, J., *et al.* (2010). Dynamic changes in the human methylome during differentiation. Genome research *20*, 320-331.

Leasure, J.L., and Decker, L. (2009). Social isolation prevents exercise-induced proliferation of hippocampal progenitor cells in female rats. Hippocampus *19*, 907-912.

Lee, J., Seroogy, K.B., and Mattson, M.P. (2002). Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. Journal of neurochemistry *80*, 539-547.

Lee, W., Mitchell, P., and Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPAinducible enhancer elements. Cell *49*, 741-752. Li, S., Papale, L.A., Zhang, Q., Madrid, A., Chen, L., Chopra, P., Keleş, S., Jin, P., and Alisch, R.S. (2016). Genome-wide alterations in hippocampal 5-hydroxymethylcytosine links plasticity genes to acute stress. Neurobiology of disease *86*, 99-108.

Li, Y.Q., Zhou, P.Z., Zheng, X.D., Walsh, C.P., and Xu, G.L. (2007). Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair. Nucleic acids research *35*, 390-400.

Li, Z., Gu, T.P., Weber, A.R., Shen, J.Z., Li, B.Z., Xie, Z.G., Yin, R., Guo, F., Liu, X., Tang, F., *et al.* (2015). Gadd45a promotes DNA demethylation through TDG. Nucleic acids research *43*, 3986-3997.

Lill, C.M., and Bertram, L. (2011). Towards unveiling the genetics of neurodegenerative diseases. Seminars in neurology *31*, 531-541.

Lister, R., Mukamel, E.A., Nery, J.R., Urich, M., Puddifoot, C.A., Johnson, N.D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A.J., Schultz, M.D., *et al.* (2013). Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. Science *341*, 1237905.

Lonetti, G., Angelucci, A., Morando, L., Boggio, E.M., Giustetto, M., and Pizzorusso, T. (2010). Early Environmental Enrichment Moderates the Behavioral and Synaptic Phenotype of MeCP2 Null Mice. Biological Psychiatry *67*, 657-665.

Lubin, F.D., Roth, T.L., and Sweatt, J.D. (2008). EPIGENETIC REGULATION OF BDNF GENE TRANSCRIPTION IN THE CONSOLIDATION OF FEAR MEMORY. The Journal of Neuroscience *28*, 10576-10586.

Maiti, A., and Drohat, A.C. (2011). Thymine DNA Glycosylase Can Rapidly Excise 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR ACTIVE DEMETHYLATION OF CpG SITES. The Journal of biological chemistry *286*, 35334-35338.

Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., and Poo, M.-m. (2009). Differential Activity-Dependent Secretion of Brain-Derived Neurotrophic Factor from Axon and Dendrite. The Journal of Neuroscience *29*, 14185-14198. McKay, J.A., Xie, L., Manus, C., Langie, S.A., Maxwell, R.J., Ford, D., and Mathers, J.C. (2014). Metabolic effects of a high-fat diet post-weaning after low maternal dietary folate during pregnancy and lactation. Mol Nutr Food Res *58*, 1087-1097.

Metivier, R., Gallais, R., Tiffoche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R.Z., Carmouche, R.P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., *et al.* (2008). Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. Nature *452*, 45-50.

Miller, C.A., Campbell, S.L., and Sweatt, J.D. (2008). DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. Neurobiology of Learning and Memory *89*, 599-603.

Miller, C.A., Gavin, C.F., White, J.A., Parrish, R.R., Honasoge, A., Yancey, C.R., Rivera, I.M., Rubio, M.D., Rumbaugh, G., and Sweatt, J.D. (2010). Cortical DNA methylation maintains remote memory. Nature neuroscience *13*, 664-666.

Miller, C.A., and Sweatt, J.D. (2007). Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. Neuron *53*, 857-869.

Ming, G.-I., and Song, H. (2005). ADULT NEUROGENESIS IN THE MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM. Annual Review of Neuroscience 28, 223-250.

Ndlovu, M.N., Denis, H., and Fuks, F. (2011). Exposing the DNA methylome iceberg. Trends in biochemical sciences *36*, 381-387.

Nestor, C.E., Ottaviano, R., Reddington, J., Sproul, D., Reinhardt, D., Dunican, D., Katz, E., Dixon, J.M., Harrison, D.J., and Meehan, R.R. (2012). Tissue type is a major modifier of the 5hydroxymethylcytosine content of human genes. Genome research *22*, 467-477.

Niederreither, K., Harbers, M., Chambon, P., and Dolle, P. (1998). Expression of T:G mismatchspecific thymidine-DNA glycosylase and DNA methyl transferase genes during development and tumorigenesis. Oncogene *17*, 1577-1585.

Nithianantharajah, J., and Hannan, A.J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. Nat Rev Neurosci *7*, 697-709.

Painter, R.C., Roseboom, T.J., and Bleker, O.P. (2005). Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. Reprod Toxicol *20*, 345-352.

Pfaffeneder, T., Hackner, B., Truß, M., Münzel, M., Müller, M., Deiml, C.A., Hagemeier, C., and Carell, T. (2011). The Discovery of 5-Formylcytosine in Embryonic Stem Cell DNA. Angewandte Chemie International Edition *50*, 7008-7012.

Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by Aid deficiency. Nature *463*, 1101-1105.

Poulsen, P., Esteller, M., Vaag, A., and Fraga, M.F. (2007). The Epigenetic Basis of Twin Discordance in Age-Related Diseases. Pediatr Res *61*, 38R-42R.

R A Segal, a., and Greenberg, M.E. (1996). Intracellular Signaling Pathways Activated by Neuropathic Factors. Annual Review of Neuroscience *19*, 463-489.

Rai, K., Huggins, I.J., James, S.R., Karpf, A.R., Jones, D.A., and Cairns, B.R. (2008). DNA Demethylation in Zebrafish Involves the Coupling of a Deaminase, a Glycosylase, and Gadd45. Cell *135*, 1201-1212.

Rapoport, S.I. (2005). In vivo approaches and rationale for quantifying kinetics and imaging brain lipid metabolic pathways. Prostaglandins & Other Lipid Mediators *77*, 185-196.

Renaudineau, S., Poucet, B., Laroche, S., Davis, S., and Save, E. (2009). Impaired long-term stability of CA1 place cell representation in mice lacking the transcription factor zif268/egr1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 11771-11775.

Riccio, A., Aaltonen, L.A., Godwin, A.K., Loukola, A., Percesepe, A., Salovaara, R., Masciullo, V., Genuardi, M., Paravatou-Petsotas, M., Bassi, D.E., *et al.* (1999). The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. Nat Genet *23*, 266-268.

Riggs, A. (1989). DNA methylation and cell memory. Cell Biophysics 15, 1-13.

Rosenzweig, M.R., and Bennett, E.L. (1972). Cerebral changes in rats exposed individually to an enriched environment. Journal of comparative and physiological psychology *80*, 304-313.

Rosenzweig, M.R., and Bennett, E.L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. Behav Brain Res *78*, 57-65.

Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., Fabbri, M.E., Tessarollo, L., Maffei, L., Berardi, N., *et al.* (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. European Journal of Neuroscience *24*, 1850-1856.

Rudenko, A., and Tsai, L.-H. (2014). Epigenetic modifications in the nervous system and their impact upon cognitive impairments. Neuropharmacology *80*, 70-82.

Ryan, A.S., Astwood, J.D., Gautier, S., Kuratko, C.N., Nelson, E.B., and Salem Jr, N. (2010). Effects of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on neurodevelopment in childhood: A review of human studies. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA) *82*, 305-314.

Saxe, M.D., Battaglia, F., Wang, J.-W., Malleret, G., David, D.J., Monckton, J.E., Garcia, A.D.R.,
Sofroniew, M.V., Kandel, E.R., Santarelli, L., *et al.* (2006). Ablation of hippocampal
neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 1750117506.

Saxena, G., Patro, I.K., and Nath, C. (2011). ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. Behav Brain Res *224*, 50-57.

Saxena, S., and Caroni, P. (2011). Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. Neuron *71*, 35-48.

Schmittgen, T., and Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nature Protocols *3*, 1101-1108.

Shen, L., Song, C.-X., He, C., and Zhang, Y. (2014). Mechanism and Function of Oxidative Reversal of DNA and RNA Methylation. Annual review of biochemistry *83*, 585-614.

Sjolund, A., Senejani, A., and Sweasy, J. (2013). MBD4 and TDG: Multifaceted DNA Glycosylases With Ever Expanding Biological Roles. Mutation research *0*, 12-25.

Skogen, J.C., and Overland, S. (2012). The fetal origins of adult disease: a narrative review of the epidemiological literature. JRSM Short Rep *3*, 59.

Smet-Nocca, C., Wieruszeski, J.M., Chaar, V., Leroy, A., and Benecke, A. (2008). The thymine-DNA glycosylase regulatory domain: residual structure and DNA binding. Biochemistry *47*, 6519-6530.

Smith, Z.D., and Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. Nature reviews. Genetics *14*, 204-220.

Snyder, J.S., Hong, N.S., McDonald, R.J., and Wojtowicz, J.M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. Neuroscience *130*, 843-852.

Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., *et al.* (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. Cell *153*, 1219-1227.

Stangl, D., and Thuret, S. (2009). Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. Genes & Nutrition *4*, 271-282.

Steward, O., Wallace, C.S., Lyford, G.L., and Worley, P.F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. Neuron *21*, 741-751.

Szulwach, K.E., Li, X., Li, Y., Song, C.X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., Upadhyay, A.K., Gearing, M., Levey, A.I., *et al.* (2011). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. Nature neuroscience *14*, 1607-1616.

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., *et al.* (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-

Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. Science (New York, N.Y.) 324, 930-935.

Valinluck, V., and Sowers, L.C. (2007). Endogenous Cytosine Damage Products Alter the Site Selectivity of Human DNA Maintenance Methyltransferase DNMT1. Cancer research *67*, 946-950.

van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., and Gage, F.H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 13427-13431.

van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. (2000). Neural consequences of enviromental enrichment. Nat Rev Neurosci *1*, 191-198.

Vogt, M.C., and Bruning, J.C. (2013). CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. Trends Endocrinol Metab 24, 76-84.

Volkmar, F.R., and Greenough, W.T. (1972). Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. Science *176*, 1445-1447.

Vucetic, Z., Kimmel, J., Totoki, K., Hollenbeck, E., and Reyes, T.M. (2010). Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. Endocrinology *151*, 4756-4764.

Wang, J., Song, P., Schrieber, S., Liu, Q., Xu, Q., Blumenthal, G., Amiri Kordestani, L., Cortazar, P., Ibrahim, A., Justice, R., *et al.* (2014). Exposure-response relationship of T-DM1: insight into dose optimization for patients with HER2-positive metastatic breast cancer. Clin Pharmacol Ther *95*, 558-564.

Wisden, W., Errington, M.L., Williams, S., Dunnett, S.B., Waters, C., Hitchcock, D., Evan, G., Bliss, T.V.P., and Hunt, S.P. (1990). Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. Neuron *4*, 603-614.

Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K., Li, E., Zhang, Y., and Sun, Y.E. (2010). Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. Science *329*, 444-448.

Yasukochi, Y., Maruyama, O., Mahajan, M.C., Padden, C., Euskirchen, G.M., Schulz, V., Hirakawa, H., Kuhara, S., Pan, X.H., Newburger, P.E., *et al.* (2010). X chromosome-wide analyses of genomic DNA methylation states and gene expression in male and female neutrophils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 3704-3709.

Yokomizo, H., Inoguchi, T., Sonoda, N., Sakaki, Y., Maeda, Y., Inoue, T., Hirata, E., Takei, R., Ikeda, N., Fujii, M., *et al.* (2014). Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic beta-cell function in adult offspring with sex differences in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab *306*, E1163-1175.

Zérouga, M., Beaugé, F., Niel, E., Durand, G., and Bourre, J.M. (1991). Interactive effects of dietary (n – 3) polyunsaturated fatty acids and chronic ethanol intoxication on synaptic membrane lipid composition and fluidity in rats. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism *1086*, 295-304.

Zhang, R.-R., Cui, Q.-Y., Murai, K., Lim, Yen C., Smith, Zachary D., Jin, S., Ye, P., Rosa, L., Lee, Yew K., Wu, H.-P., *et al.* (2013). Tet1 Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognition. Cell Stem Cell *13*, 237-245.

Zheng, J., Xiao, X., Zhang, Q., Yu, M., Xu, J., Wang, Z., Qi, C., and Wang, T. (2015). Maternal and post-weaning high-fat, high-sucrose diet modulates glucose homeostasis and hypothalamic POMC promoter methylation in mouse offspring. Metabolic brain disease *30*, 1129-1137.

Zhu, J.-K. (2009). Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. Annual Review of Genetics *43*, 143-166.

Zhubi, A., Veldic, M., Puri, N.V., Kadriu, B., Caruncho, H., Loza, I., Sershen, H., Lajtha, A., Smith, R.C., Guidotti, A., *et al.* (2009). An upregulation of DNA-methyltransferase 1 and 3a expressed in telencephalic GABAergic neurons of schizophrenia patients is also detected in

peripheral blood lymphocytes. Schizophrenia research 111, 115-122.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Armin Giese für die Übernahme meines Projekts nach dem Tod von Prof. Dr. Dr. Hans Kretzschmar, für die Möglichkeit diese Arbeit am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung erstellen zu dürfen, für seine Anregungen und seine Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Dr. Theo Kraus für die Möglichkeit an diesem interessanten Projekt arbeiten zu können, seine Betreuung, Ideen und Ratschläge.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der AG Kraus bedanken, für die freundschaftliche Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die Verlässlichkeit, die den Laboralltag um so viel angenehmer machten. Besonders bedanken möchte ich bei: Virginie Guibourt und meinen "Küken" Kristina Lisec, Charel Gieres, Judith Spanner und Melanie Haider.

Ein besonderer Dank auch allen Mitarbeitern des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung, vor allem Janina Mielke und Julia Vlcek, ihr seid im Laufe der Zeit mehr als Kollegen für mich geworden. Michael Ruiter, für viele anregende Gespräche, lustige Mittagspausen und die kleinen "Motivationspausen" mit Veronika Kaltenbrunn und Anna Krieger. Außerdem möchte ich mich bei Michael Schmidt bedanken, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mit dem ich mich während den unendlich vielen Inkubationszeiten vortrefflich, nicht nur über Autos, unterhalten konnte. Ebenso möchte ich mich bei meinen lieben Kollegen im Doktorandenbüro, Severin Filser und Finn Peters bedanken. Eure gute Laune und die netten Späßchen habe ich nach Eurem Umzug ins neue Labor wirklich vermisst. Severin möchte ich außerdem für Unterstützung am konfokalen Mikroskop danken. Felix Schmidt möchte ich ganz herzlich für seine Ratschläge, seine gute Laune und für die Korrektur dieser Arbeit danken.

Meiner Familie möchte ich danken, für ihren beständigen Rückhalt, der Förderung meines Lebenswegs und ihren Glauben an mich.

Zum Schluss, aber nicht zuletzt, ein besonders liebes Dankeschön an meinen Mann Alex, für seine Unterstützung in allen Bereichen, seine Zuversicht und seine

Liebe.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle verwendeten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich habe zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

Ort, Datum

Unterschrift