

Aus dem Institut für Neuropathologie (Zentrum für
Neuropathologie und Prionforschung, ZNP)
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Jochen Herms



Analyse der Methylierungs- und Demethylierungsregulation während der zerebralen Entwicklung durch Immunhistochemie

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

vorgelegt von
Martina Steinmaurer

aus
Linz (AUT)

2021

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-
Maximilians-Universität-München

Vorstand: Jochen Herms

Thema der Dissertation
**Analyse der Methylierungs- und Demethylierungsregulation
während der zerebralen Entwicklung durch Immunhistochemie**

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

vorgelegt von:

Martina Steinmaurer

aus:

Linz

im:

Jahr 2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Armin Giese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Behrends

Prof. Dr. Kirsten Lauber

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2021

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	9
1.1 Epigenetik	9
1.2 Epigenetische Prozesse.....	10
1.2.1 DNA-Methylierung.....	10
1.2.2 DNA-Demethylierung.....	12
1.2.3 Histon-Modifikation.....	14
1.3 5-Hydroxymethylcytosin.....	14
1.4 DNA Methyltransferase 3a	15
1.5 Thymine-DNA-Glykosylase.....	16
1.6 Proliferationsmarker Ki67.....	17
1.7 Zielregionen: Frontaler Kortex und Zerebellum	17
1.8 Klinische Relevanz der Studie	19
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Material	21
2.1.1 Probenursprung.....	21
2.1.2 Chemikalien	21
2.1.3 Antikörper.....	21
2.1.4 Geräte	22
2.1.5 Software	22
2.2 Details der verwendeten Proben.....	22
2.3 Methoden	23
2.3.1 Immunhistochemie.....	24
2.3.2 Mikroskopie	25
2.3.3 Quantifizierung	26
2.3.4 Binarisierung.....	26
2.3.5 Statistische Analyse	27
2.4 Übereinkommen mit der Ethikkommission.....	28
3 Ergebnisse.....	29
3.1 Bestimmung der Expressionsprofile im frontalen Kortex.....	29
3.1.1 Proteinexpression von DNMT3a.....	29
3.1.1.1 Quantifizierung der Verteilung	29

3.1.1.2 Binarisierung der Verteilung	30
3.1.2 Proteinexpression von TDG	31
3.1.2.1 Quantifizierung der Verteilung	31
3.1.2.2 Binarisierung der Verteilung	32
3.1.3 Proteinexpression von Ki67	33
3.1.3.1 Quantifizierung der Verteilung	33
3.1.3.2 Binarisierung der Verteilung	34
3.2 Bestimmung der Expressionsprofile im Zerebellum	35
3.2.1 Proteinexpression von DNMT 3a	35
3.2.1.1 Quantifizierung der Verteilung in der EGCL.....	35
3.2.1.2 Quantifizierung der Verteilung in der IGCL.....	36
3.2.1.3 Quantifizierung der Verteilung in der MCL.....	36
3.2.1.4 Binarisierung der Verteilung im gesamten zerebellären Kortex.....	37
3.2.2 Proteinexpression von TDG	38
3.2.2.1 Quantifizierung der Verteilung in der EGCL.....	38
3.2.2.2 Quantifizierung der Verteilung in der IGCL.....	39
3.2.2.3 Quantifizierung der Verteilung in der MCL.....	39
3.2.2.4 Binarisierung der Verteilung im gesamten zerebellären Kortex.....	40
3.2.3 Proteinexpression von Ki67	41
3.2.3.1 Quantifizierung der Verteilung in der EGCL.....	41
3.2.3.2 Quantifizierung der Verteilung in der IGCL.....	42
3.2.3.3 Quantifizierung der Verteilung in der MCL.....	43
3.2.3.4 Binarisierung der Verteilung im gesamten zerebellären Kortex.....	43
3.3 Korrelationsanalyse relevanter epigenetischer Parameter während der Entwicklung	45
3.3.1 5hmC - DNMT3a	45
3.3.1.1 Korrelationsanalyse im frontalen Kortex	45
3.3.1.2 Korrelationsanalyse in der EGCL.....	46
3.3.1.3 Korrelationsanalyse in der IGCL.....	46
3.3.1.4 Korrelationsanalyse in der MCL	47
3.3.1.5 Korrelationsanalyse im gesamten zerebellären Kortex	47
3.3.2 5hmC - TDG	48
3.3.2.1 Korrelationsanalyse im frontalen Kortex	48
3.3.2.2 Korrelationsanalyse in der EGCL.....	49
3.3.2.3 Korrelationsanalyse in der IGCL.....	49
3.3.2.4 Korrelationsanalyse in der MCL	50

3.3.2.5 Korrelationsanalyse im gesamten zerebellären Kortex	51
3.3.3 5hmC - Ki67.....	51
3.3.3.1 Korrelationsanalyse im frontalen Kortex.....	51
3.3.3.2 Korrelationsanalyse in der EGCL.....	52
3.3.3.3 Korrelationsanalyse in der IGCL.....	53
3.3.3.4 Korrelationsanalyse in der MCL.....	53
3.3.3.5 Korrelationsanalyse im gesamten zerebellären Kortex	54
3.3.4 Ki67 - DNMT3a.....	56
3.3.5 Ki67 - TDG	57
3.3.6 Binarisierung - Quantifizierung.....	59
3.4 Bestimmung der Expressionsprofile im Regionenvergleich.....	60
3.4.1 Proteinexpression von DNMT3a	60
3.4.1.1 Quantifizierung der Verteilung am Tag 0.....	60
3.4.1.2 Quantifizierung der Verteilung am Tag 7.....	61
3.4.1.3 Quantifizierung der Verteilung am Tag 15.....	62
3.4.1.4 Quantifizierung der Verteilung am Tag 30.....	62
3.4.1.5 Quantifizierung der Verteilung am Tag 120.....	63
3.4.2 Proteinexpression von TDG	64
3.4.2.1 Quantifizierung der Verteilung am Tag 0.....	64
3.4.2.2 Quantifizierung der Verteilung am Tag 7.....	64
3.4.2.3 Quantifizierung der Verteilung am Tag 15.....	65
3.4.2.4 Quantifizierung der Verteilung am Tag 30.....	66
3.4.2.5 Quantifizierung der Verteilung am Tag 120.....	66
3.4.3 Proteinexpression von Ki67	68
3.4.3.1 Quantifizierung der Verteilung am Tag 0.....	68
3.4.3.2 Quantifizierung der Verteilung am Tag 7.....	69
3.4.3.3 Quantifizierung der Verteilung am Tag 15.....	69
3.4.3.4 Quantifizierung der Verteilung am Tag 30.....	70
3.4.3.5 Quantifizierung der Verteilung am Tag 120.....	70
3.5 Verifizierung der mRNA Expressionsdaten	71
3.5.1 Expression von DNMT3a.....	71
3.5.1.1 Quantifizierung der Verteilung im frontalen Kortex.....	71
3.5.1.2 Quantifizierung der Verteilung im Zerebellum	72
3.5.2 Expression von TDG	73
3.5.2.1 Quantifizierung der Verteilung im frontalen Kortex.....	73

3.5.2.2 Quantifizierung der Verteilung im Zerebellum	74
4 Diskussion	75
4.1 Analyse der DNMT3a-Expression.....	75
4.1.1 Zielregion frontaler Kortex	75
4.1.2 Zielregion Zerebellum	76
4.1.3 Expression im Regionenvergleich	78
4.2 Analyse der TDG-Expression	79
4.2.1 Zielregion frontaler Kortex	80
4.2.2 Zielregion Zerebellum	81
4.2.3 Expression im Regionenvergleich	82
4.3 Analyse der Ki67-Expression.....	82
4.3.1 Zielregion frontaler Kortex	82
4.3.2 Zielregion Zerebellum	83
4.3.3 Expression im Regionenvergleich	83
4.4 Bedeutung des Vergleichs mRNA-/Proteinexpression.....	83
4.5 Fazit	84
5 Zusammenfassung.....	84
6 Anhang	88
6.1 Kritische Beurteilung der Studie	88
6.1.1 Die Methode der Immunhistochemie zur Erfassung des Expressionsmusters von Genen..	88
6.1.2 Die Methode der Binarisierung als Alternative zur manuellen Quantifizierung.....	88
6.1.3 Betrachtung der erhobenen Expressionsdaten auch im Regionenvergleich	89
6.1.4 Fehlende Differenzierung der Mäuse nach dem Geschlecht.....	89
6.1.5 Fehlende Differenzierung der Zellen nach dem Zelltyp.....	89
6.1.6 Die Größe des Probenkollektivs.....	90
6.1.7 Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman.....	90
6.1.8 Die Maus als Versuchstier in der Grundlagenforschung.....	90
6.2 Ergänzungstabellen.....	91
6.3 Abkürzungen.....	95
6.4 Quellenverzeichnis.....	96
6.4.1 Literatur	96

Summary

Numerous signal pathways in our cells underlie epigenetic control. This complexity that requires the correct calibration of many reaction cascades is hardly imaginable and the significance barely to catch. The more important it is to understand the fundamental mechanisms behind. DNA methylation and long-time underestimated DNA demethylation are two of these. Further, understanding of how these processes are regulated creates new seminal focus on alternative treating for an immense number of diseases.

The aim of this study was to quantify expression levels of three proteins that are associated with DNA methylation/demethylation in different brain regions and at different age. These are DNA-Methyltransferase 3a (DNMT3a), Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) and Ki67 (proliferation marker). Therefore, the frontal cortex and the cerebellum of 15 mice (strain C57BL/6) were examined. Each three mice were sacrificed at day 0, 7, 15, 30 and 120 after birth. Quantification was done using immunohistochemistry and binarization.

Interestingly, our data show significant expression differences of genes associated with methylation/demethylation as well as a significant decrease of expression during ageing. Especially few days after birth the proteins DNMT3a and TDG are heavily expressed, suggesting highly active methylation/demethylation processes over this period of time. This reassures the assumption that active demethylation is of particular importance in the course of differentiation.

A significant negative correlation between these proteins and 5-hydroxymethylcytosine - the central molecule in the demethylation cascade - support these findings. Because of the known uneven distribution of 5hmC in the brain depending on age and region it is important to detect the mechanisms responsible for generation and loss of 5hmC. Presented data suggest a relation with active demethylation.

Further analysis of immunohistochemical data statistically confirmed differences in the development depending on the investigated region. Particularly DNMT3a and TDG in the internal granular cell layer of the cerebellum show divergent distribution patterns in comparison to the cortex, which brings out the developing differences between these two brain regions.

In conclusion, our data demonstrate that methylation and demethylation pathways are highly controlled and regulated depending on analyzed brain region and age. Intense methylation/demethylation activity during early developmental stages, followed by decreasing activity in the mature brain gives 5hmC an important part in the increasing plasticity of our epigenetic regulation mechanism. Thus, these data can help to better understand the complexity of the brain epigenome and support further important research approaches investigating basic epigenetic processes.

1 Einleitung

1.1 Epigenetik

Der Mensch, der sich durch die Fähigkeit zur Selbstbestimmung bestärkt und definiert fühlt, ist seit der Entdeckung der DNA und der Sequenzierung des Genoms mit dem Fakt konfrontiert, dass sein Maß an Selbstbestimmung wohl genetisch festgelegt ist. „Wie der Vater, so der Sohn“ heißt es im Volksmund, ein Sprichwort, das suggeriert unser Leben sei durch die von unseren Eltern geerbten Gene vorbestimmt.

Obwohl natürlich die Bedeutung unserer Erbsubstanz nicht zu schmälern ist, liegt in dem Begriff "Epigenetik" eine relevante Konkurrenz.

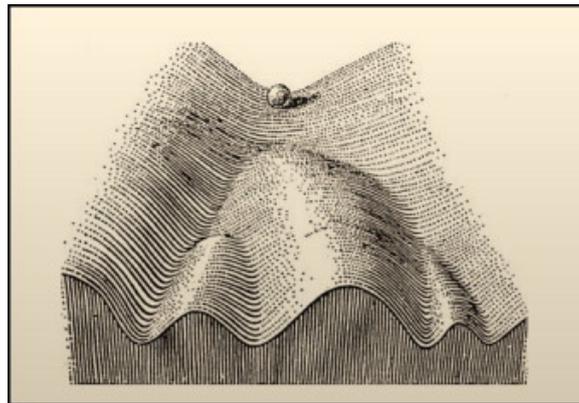


Abb. 1: "*The epigenetic landscape*" von Conrad Waddington - Mit dieser Zeichnung will Conrad Waddington ausdrücken, dass jede Zelle einmal an den Punkt kommt, wo sie sich entscheiden muss, welchen weiteren Weg sie geht. Diese Entscheidungen spiegeln sich in ihrem Epigenom wider. (Quelle: Goldberg et al. [1])

Erstmals verwendet wurde dieser Terminus im Jahre 1942 von Conrad Hal Waddington, welcher Epigenetik definierte als "den Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten, die den Phänotyp hervorbringen, untersucht" (→ Abbildung 1). [2]

Umwelteinflüsse, also extrinsische Faktoren, haben nicht zu verachtende Auswirkungen auf unser Erbgut. Diese Auswirkungen lassen sich besonders gut in Zwillingsstudien untersuchen. Dabei werden die Phänotypen von eineiigen Zwillingen, welche während ihres Lebens unterschiedlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt waren, verglichen. Ein Thema, das auch die breite Öffentlichkeit anspricht (→ Abbildung 2).



"Die Epigenetik liefert uns die Hoffnung, dass wir mehr sind als nur die Abfolge unserer Gene", sagt Edith Heard, eine anerkannte Forscherin auf dem Gebiet der Epigenetik, „Sie erklärt unsere inter- und intraindividuelle Vielfalt und versorgt uns mit zusätzlicher versteckter Information, die sich durch intrinsische wie extrinsische Faktoren beeinflussen lässt.“ [3]

Abb.2: Cover des TIME- Magazins vom Januar 2010 - ein Artikel für die breite Öffentlichkeit darüber, wie unsere Umwelt und unsere Entscheidungen unseren genetischen Code beeinflussen (Quelle: time.com/photograph by Kevin van Aelst)

Mit der Epigenetik einher geht die Zelldifferenzierung, und somit die Entwicklung. Hauptaugenmerk dieser Studie ist die Erkenntnis der Relation dieser drei Begriffe.

Die Epigenetik führt uns an einige seit langem unbeantwortete Fragen näher heran: "Wie kann die Weitergabe des spezifischen Gedächtnisses einer differenzierten Zelle gewährleistet sein? Und wie kann dieses Gedächtnis vergessen oder unter bestimmten Umständen gelöscht werden (zum Beispiel in der Keimzelle oder durch Zufall bei Krebsentstehung)? [3]

1.2 Epigenetische Prozesse

Viele Prozesse von der Konzeption bis zum Tod, allen voran das Gen-Silencing, aber auch das genomische Imprinting, die X-Inaktivierung, die Reprogrammierung, der Prozess der Karzinogenese, die Paramutation und wahrscheinlich viele noch unbekannte Vorgänge stehen unter epigenetischer Regulation.

Hauptmechanismen sind hierbei die DNA-Methylierung und die post-translationale Histonmodifikation, welche beide mit Hilfe regulatorischer Proteine und nicht kodierenden RNAs interagieren. Durch die daraus folgende Remodelierung des Chromatins lässt sich der Zellkern in Euchromatin und Heterochromatin kompartieren. [4]

1.2.1 DNA-Methylierung

Insbesondere für den Prozess des Gen-Silencing ist dieser biochemische Schritt unverzichtbar. Unter DNA-Methylierung versteht man die Verbindung einer CH₃-Gruppe mit einem Cytosin (C), meist Teil einer CpG-Insel (→ Abbildung 3). Diese Cytosin- und Guanin-reichen Genabschnitte befinden sich bevorzugt im Bereich von Promotoren, also vor dem jeweiligen Gen, das stillgelegt werden soll. CpG-Inseln, welche keine lokale Beziehung zu einem Promoter aufweisen (rund die Hälfte aller identifizierten CpG-Inseln) könnten an der Regulation der Transkription von nicht-kodierenden RNAs beteiligt sein. [5]

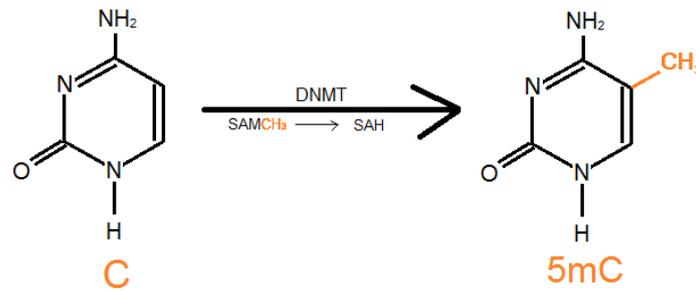


Abb. 3: Methylierung der Base Cytosin – Die DNA-Methyltransferase (DNMT) katalysiert die Reaktion von Cytosin (C) zu 5-Methylcytosin (5mC). Die Methylgruppe stammt dabei von dem Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM), welches dadurch zu S-Adenosylhomocystein (SAH). (Quelle: eigene Abbildung)

Diese Veränderung der chemischen Struktur verhindert ein Andocken von Transkriptionsfaktoren an den Promoter und somit die Transkription. Hierdurch bestimmt die Zelle ihre Genaktivität und kann, wenn nötig, auch ein ganzes Chromosom stilllegen (X-Inaktivierung). Des Weiteren trägt die DNA-Methylierung zur Stabilität des Genoms bei, indem die Translokation von repetitiven Sequenzen verhindert wird. [4]

In Anbetracht dieser Studie ist aber wohl die dynamische Arbeitsweise der für die DNA-Methylierung zuständigen Enzyme von größerer Bedeutung. Denn nur so kann die Zelle ihre Proteinexpression den sich ändernden Bedingungen ihrer Umgebung anpassen und es wird eine kontrollierte Entwicklung möglich.

Anschaulich darstellen lässt sich diese Funktion angesichts des sich im Zuge des Lernens ständig entwickelnden Gedächtnisses. Eine Studie von Miller et al. 2007 zeigt, dass eine Inhibition der während der Gedächtnisbildung sich rapide vollziehenden Methylierung des PP1-Gens, eine Speicherung von neuen Informationen verhindert (→ Abbildung 4). [6]

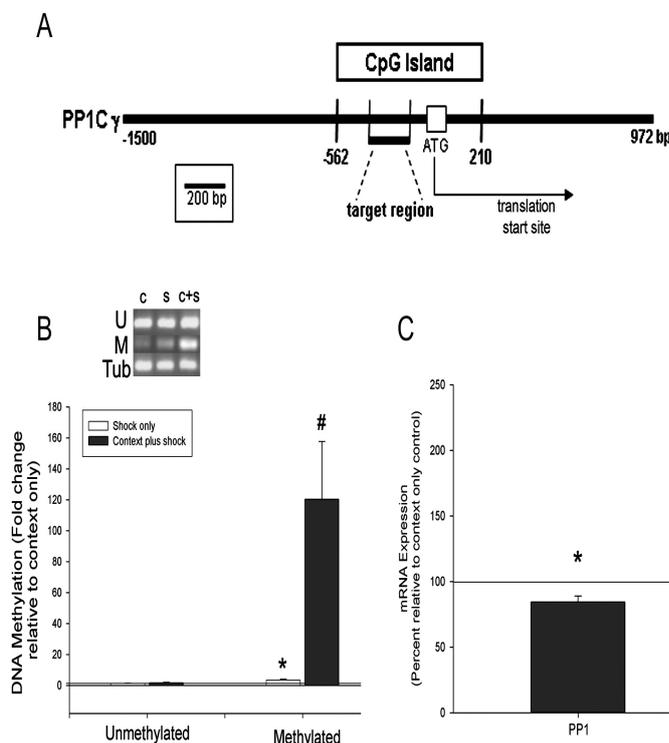


Abb. 4: Einfluss der Methylierung auf die Gedächtnisbildung (Quelle: Miller et al. 2007)

- Teilabbildung A zeigt die schematische Lokalisation der CpG Insel, an der die Methylierung stattfindet, und das dadurch beeinflusste Gen PP1 (Protein-Phosphatase1). PP1 vermindert die Fähigkeit der Gedächtniskonsolidierung.

- Teilabbildung B zeigt, dass nach einer Konditionierung die methylierten PP1-Level angestiegen sind und die unmethylierten PP1-Level gesunken sind.

(Konditionierung mittels elektrischem Schock)

- Teilabbildung C bestätigt ein weiteres Mal die Richtigkeit des Schlusses: DNA-Methylierung → verminderte Genexpression, und zeigt, dass mit dem Erlernen neuer Informationen neben der verstärkten Methylierung von PP1 auch eine verminderte Expression der PP1-mRNA einhergeht.

Diese Studie unterstreicht die Bedeutung der epigenetischen Genregulation im Gehirn!

Die für diese Methylierung verantwortlichen Enzyme sind die DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Man unterscheidet zwischen De-novo DNA-Methyltransferasen (De-novo DNMT) und Maintenance DNA-Methyltransferasen (Maintenance DNMT). Alle DNMTs arbeiten mit S-Adenosylmethionin (SAM) als Kofaktor und methylieren das Cytosin am C5 Atom.

Die Maintenance DNMT kann ein Cytosin nur in Gegenwart eines bereits methylierten komplementären Stranges methylieren. Sie ist also dafür verantwortlich, dass das Methylierungsmuster bei der Zellteilung nicht verloren geht.

Die De-novo DNMT hingegen kann (mit Hilfe eines unbekanntes Erkennungsmechanismus) aktiv "neue" Cytosine methylieren und wird deswegen hauptsächlich während der Embryonalentwicklung exprimiert. [7]

1.2.2 DNA-Demethylierung

2009 wurde entdeckt, dass das Enzym Ten-Eleven-Translokase 1 (TET1) das durch Methylierung entstandene 5-Methylcytosine (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) oxidiert. Diese Modifikation ist hochverdächtig am Beginn einer Kaskade von Prozessen zu stehen, welche die Methylierung von CpG-Inseln und die damit verbundene Expressionsinhibierung rückgängig macht. 5mC war lange Zeit das einzig bekannte epigenetische Kennzeichen und galt als dauerhaftes, erbliches Merkmal. Diese Anschauung wird durch das neu entdeckte 5hmC in Frage gestellt. [8]

Noch unklar ist allerdings die von 5hmC ausgehende Signalkette. Möglich ist sowohl ein "oxidativer" Signalweg, als auch ein "desaminierender" Signalweg.

Diese aktive Demethylierung steht im Kontrast zu der lange einzig akzeptierten Vorstellung der passiven Demethylierung bei der Replikation. Grund zur Annahme dieser neuen Sichtweise gibt es genügend: zum einen geht 5mC größtenteils verloren im paternalen Genom nach der Fertilisation, bevor die Replikation gestartet wird [9, 10], zum anderen wurde Demethylierung auch in nicht-replizierenden Geweben wie Neuronen beobachtet. [8]

Oxidativer Signalweg: Nach der Oxidation von 5mC zu 5hmC durch TET, wird 5hmC, ebenfalls durch ein Enzym der TET-Familie, zu 5-Formylcytosine (5fC) und weiter zu 5-Carboxylcytosine (5caC) oxidiert. Möglich wäre eine anschließende Deformylierung oder Decarboxylierung der Intermediate 5fC bzw. 5caC zu Cytosin. Allerdings konnten für diese Schritte noch keine enzymatischen Aktivitäten nachgewiesen werden. (→ Abbildung 5) [11]

Desaminierender Signalweg: Dieser Mechanismus stützt sich auf das Prinzip der Basenexzisionsreparatur (BER). Voraussetzung hierfür ist die Umwandlung von 5mC bzw. 5hmC in Thymin (T) bzw. 5-Hydroxymethyluracil (5mU) durch die AID/APOBEC (Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase/ ApolipoproteinB-mRNA-Editing-Enzym). Dadurch entsteht eine andere Base, die nun mit der

komplementären Base fehlgepaart ist. Diese Fehlpaarung wird von den Enzymen der BER erkannt und die modifizierte Base wird durch ein (unmethyliertes) Cytosin ausgetauscht. Zu diesen Enzymen zählen vor allem die Thymine-DNA-Glykosylase (TDG) und SMUG1 (Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glykosylase 1). (→ Abbildung 5) [11]

Obwohl diesem Prinzip zu Folge auch eine Demethylierung von 5mC ohne den Zwischenschritt zu 5hmC möglich wäre, deutet der hohe Gehalt an 5hmC in Geweben mit vermuteter aktiver Demethylierung auf die Notwendigkeit dieser Modifikation hin.

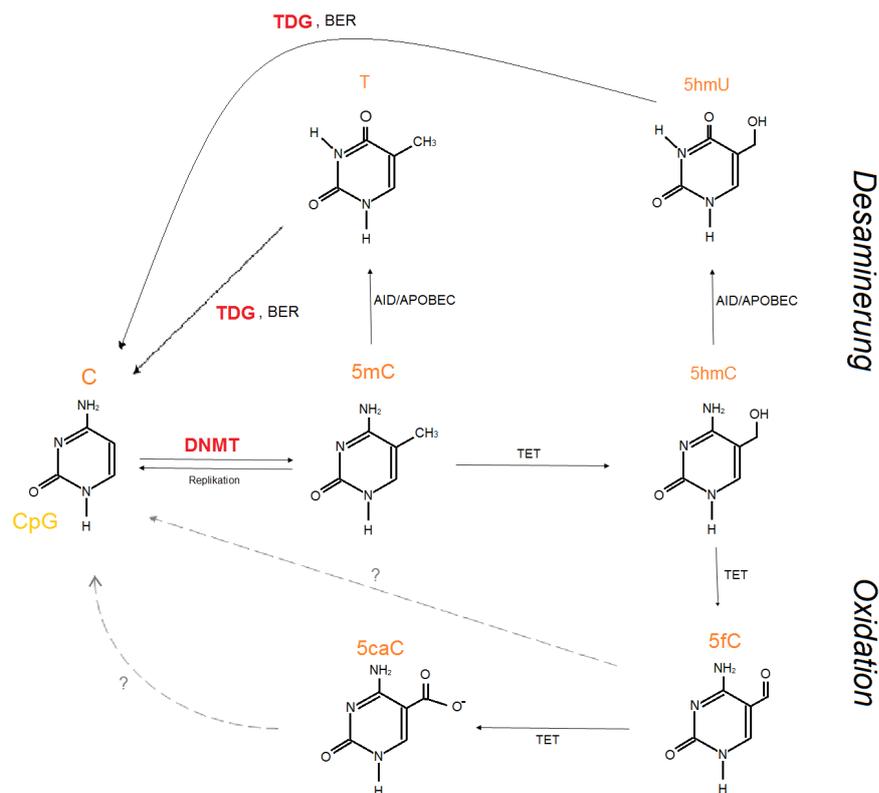


Abb. 5: Aktive Demethylierung – das durch Methylierung entstandene 5mC wird von den TET-Enzymen zu 5hmC oxidiert. Im Zuge des oxidativen Signalweges (→ Oxidation) wird dieses 5hmC weiter oxidiert zu 5fC und 5caC. Eine andere Möglichkeit wäre die Desaminierung von 5hmC zu 5hmU und ein anschließender Austausch der Base durch ein Enzym der BER (Quelle: eigene Abbildung)

Ein alternativer Weg der Demethylierung wurde 1999 beschrieben. Demzufolge ist das Enzym *Methy-CpG-binding-domain* Protein 2b (MBD2b) für eine direkte Umwandlung von 5mC in Cytosin verantwortlich. Dieser Mechanismus wird aber seit jeher angezweifelt. [12]

1.2.3 Histon-Modifikation

Die mit der DNA Methylierung assoziierten MeCBPs sind gleichzeitig Teil eines Repressorkomplexes zusammen mit Histon-Deacetylasen (HDACs). HDACs sind Enzyme, die Acetyl-Gruppen von Histonen entfernen. Histon-Hyperacetylierung führt zu Chromatindekondensation und ermöglicht somit eine bessere Zugänglichkeit der DNA für Bindeproteine mit darauffolgender verstärkter Transkription. Histon-Hypoacetylierung hingegen fördert die Kondensation des Chromatins und vermindert die Transkriptionsaktivität. [13, 14]

Abgesehen von der Acetylierung sind Histone einer Reihe weiterer reversibler post-translationaler Modifikationen (PTM) ausgesetzt. Dazu zählen Methylierung, Ubiquitinierung, ADP-Ribosylierung und Phosphorylierung. Histonmodifikationen nehmen vor allem Einfluss auf die Struktur des Chromatins und regeln dadurch die Zugänglichkeit der DNA. Abgesehen davon scheint diese Modifikation aber auch indirekten Einfluss auf biologische Prozesse zu haben. Sogenannte "Histon-Reader" erkennen die Modifikationen, welche ihnen als Bindestelle dienen. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die die Information der Modifikation in nachfolgende Prozesse übersetzt. Ein einzelnes Nukleosom kann somit eine enorme Anzahl an Mustern besitzen. Man spricht hier auch von der "Histon-Code-Hypothese": je nach Art der vorhandenen Histonmodifikation, docken spezifische Proteine an den Histonkomplex an. Diese wiederum starten unterschiedliche Signaltransduktionsketten. Die Histonmodifikation ist ebenfalls ein Teilgebiet der Epigenetik und kann, ähnlich der DNA-Methylierung, die Transkription einzelner Gene, aber auch ganzer Gengruppen beeinflussen. [15, 16]

1.3 5-Hydroxymethylcytosin

5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) hat vor nicht allzu langer Zeit das Interesse der Epigenetiker geweckt. Bereits im letzten Jahrhundert entdeckt, konnte man erst im Jahr 2009 5hmC auch im humanen Genom feststellen [17] und damit einen Bezug zur Demethylierung vermuten. Das Molekül ist ein Reaktionsprodukt des Methylcytosins und kann weiter reagieren zu 5fC und 5caC. Jede dieser Reaktionen wird von einem TET-Enzym ausgeführt.

Praktisch jede Säugetierzelle enthält 5hmC, wobei die größten Mengen im Zentralnervensystem vorkommen. Im ZNS sind ungefähr 1% aller Cytosine hydroxymethyliert. Das sind immerhin 10x so viele wie in den meisten anderen Zellgruppen unseres Organismus. [18, 19] Grundsätzlich nimmt 5hmC während der Entwicklung zu und bleibt im Erwachsenenalter stabil. Sowohl in embryonalen als auch in neuronalen Stammzellen kommen nur sehr geringe Mengen an 5hmC vor. [20]

Alle Aktivitätsbereiche von 5hmC sind noch nicht geklärt. Neben der bereits erwähnten Möglichkeit, dass 5hmC ein Intermediat der Demethylierung ist, könnte es zusätzlich auch regulatorische Eigenschaften besitzen. Spruijt et al. [21] beschreibt mehrere Epigenom-modifizierende Enzyme, welche mit 5hmC interagieren und somit für eine Wechselbeziehung in Frage kommen (→ Abbildung 6). Unter diesen Enzymen befindet sich unter anderem Mbd4 (Methyl-CpG-binding-domain-protein), welchem eine Interaktion mit TDG nachgesagt wird.

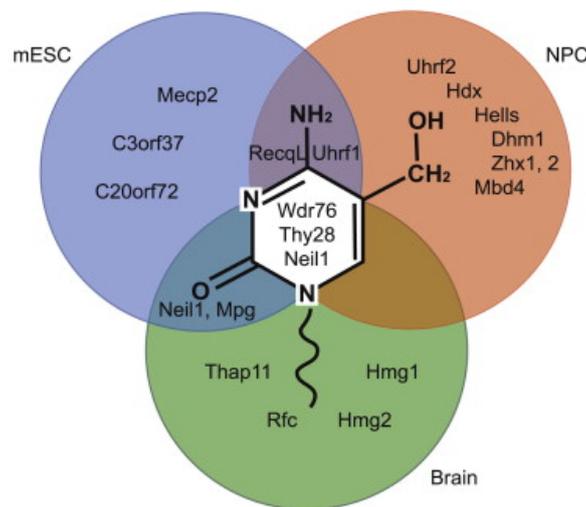


Abb. 6: Darstellung von zelltypspezifischen 5hmC-erkennenden Proteinen – Das Mengendiagramm zeigt eine Anzahl an unterschiedlichen Enzymen, welche in der Lage sind, 5hmC zu erkennen. Dabei wurde zum Beispiel Mbd4 in neuronalen Progenitorzellen identifiziert. (Quelle: Spruijt et al.)
 blau (mESC = murine embryonale Stammzellen); rot (NPC = neuronale Progenitorzellen); grün (Brain = murines adultes Gehirn)

Wieso ist überhaupt die Anzahl 5hmC-positiver Zellen im Zentralnervensystem so viel höher als im restlichen Körper? Obwohl, oder gerade, weil die proliferative Entwicklung im Gehirn rund um den 15. Tag postnatal abgeschlossen ist und sich die Nervenzellen ja bekanntlich, im Gegensatz zu vielen anderen Zelltypen (dazu zählen auch Glia-Zellen), ab diesem Zeitpunkt nicht mehr teilen, ist ein flexibles Epigenom von größter Wichtigkeit. Nervenzellen wären nutzlos ohne ihre Synapsen. Die Synapsenbildung ist ein dynamischer Prozess, welcher vielen Einflüssen unterlegen ist. Wie bereits in Abbildung 4 dargestellt, funktioniert "Lernen" an sich nur unter bestimmten Voraussetzungen, unter anderem, wenn die Fähigkeit zur Synapsenbildung vorhanden ist. Auch dieser Prozess beruht auf Netzwerken aus Proteinen, welche von den jeweiligen prä- und postsynaptischen Partnern präsentiert werden und in deren Genom datiert sind. [22] Die komplexe Bildung eines neuronalen Netzwerks, sei es "nur" bei einem Denkvorgang, ist somit auf eine flexible Nervenzelle angewiesen, welche in der Lage ist auf einen adäquaten Reiz mit der Synapsenbildung zu reagieren.

Ein hoher 5hmC-Gehalt könnte nützlich sein um diese Reaktion beschleunigen. Wie genau ist ungewiss. Vielleicht ermöglicht ein durch eine Hydroxymethylgruppe markiertes Cytosin eine bessere Bindung der für die Demethylierung des gewünschten Genpromoters verantwortlichen Proteine. Oder es ist einfach die Tatsache, dass mit 5hmC, im Gegensatz zu 5mC, der erste Schritt der Demethylierung schon getan ist? Eine Analyse hippocampaler Neurone könnte hier interessant sein.

1.4 DNA Methyltransferase 3a

Wie in 1.2.1 bereits geschildert, sind die DNMTs Hauptakteure der Methylierung und nehmen somit einen sehr wichtigen Platz in der Epigenetik ein. Im menschlichen Genom finden sich

drei etwas unterschiedliche DNMT-Gene: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. Eine DNMT2 wurde früher fälschlicherweise zu den Methyltransferasen gezählt.

Die DNMT1 ist die häufigste DNMT und arbeitet hauptsächlich als Maintenance DNMT. Die Wichtigkeit des Prozesses der Methylierung wird dadurch deutlich, dass Mausembryonen mit einem Nullallel für DNMT1 nicht bis zur Geburt überleben. [23]

DNMT3a/b sind größtenteils De-novo DNMTs und, ähnlich der DNMT1, aus einer regulatorischen und einer katalytischen Einheit aufgebaut. DNMT3a arbeitet eng mit Heterochromatin Protein 1 (HP1, ein Protein des Heterochromatinkomplexes im Zellkern mit epigentischer Regulationsfunktion) und Methyl-CpG-binding-Protein (MeCPB) zusammen. Die Mechanismen die den DNMTs den Kurs auf die CpG-Inseln vorgeben sind allerdings weithin unbekannt. [5]

All diese Faktoren haben uns dazu veranlasst, DNMT3a für diese Studie heranzuziehen.

Methode der Methylierung → siehe 1.2.1

1.5 Thymin-DNA-Glykosylase

Die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) ist eine Glykosylase, welcher eine Vielzahl an Funktionen zugeschrieben werden. Das Protein ist Teil der TDG/mug-DNA-Glykosylase Familie und hat seine Hauptaufgabe in der Entfernung eines falsch-gepaarten Thymins in der DNA. Das Enzym löst die Verbindung zwischen der Base und dem Ribose-Phosphat-Rückgrat und ist somit ein wichtiger Operateur des Basenexzisionsreparaturmechanismus.

Neben der DNA-Reparatur vermutet man, dass TDG vor allem im Hinblick auf 5mC zum Einsatz kommt. Nach einer Desaminierung entsteht aus dem mit Guanin (G) gepaartem 5mC ein Thymin und somit eine falsche T/G-Basenpaarung. TDG erkennt diese Fehlpaarung, entfernt das Thymin und macht somit Platz für ein Cytosin (C) (→ Abbildung 7 und 8).

Da durch diesen Mechanismus aus einem 5mC ein unmethyliertes C entsteht, liegt die Annahme nahe, dass TDG diese Reaktion nicht nur in der Rolle eines Enzyms der BER katalysiert, sondern auch im Zuge des Demethylierungsprozesses. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass TDG mit geringerer Aktivität auch in der Lage ist 5fC bzw. 5caC aus der DNA zu entfernen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass TDG auch Uracil aus einer U/G-Verbindung lösen kann, welches bei einer Desaminierung von 5hmC entsteht. [24]

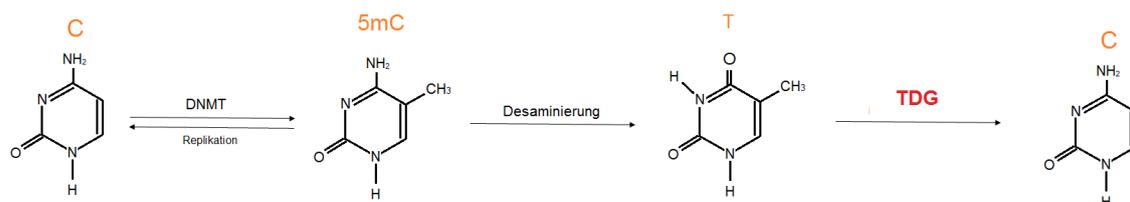


Abb. 7: Demethylierung mit TDG als Hauptakteur – das durch Desaminierung von 5mC entstandene Thymin wird von TDG entfernt und gegen ein unmethyliertes Cytosin ausgetauscht. (Quelle: eigene Abbildung)

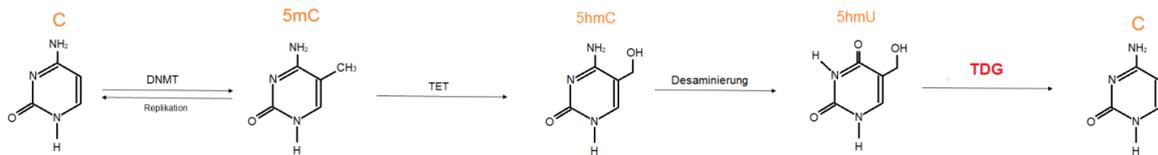


Abb. 8: Demethylierung mit TDG als Hauptakteur – auch das durch Desaminierung von 5hmC entstandene Uracil wird von TDG erkannt und gegen ein unmethyliertes Cytosin ausgetauscht. (Quelle: eigene Abbildung)

Die Funktion von TDG im Zuge der BER ist zwar naheliegend, leistet aber wegen katalytischer Ineffizienz nur einen sehr kleinen Beitrag zur DNA Reparatur. TDG könnte seine Aufgabe daher eher in der Demethylierung haben. Studien von Protein-Protein-Interaktionen mit TDG haben weitere potentielle Funktionen dieses interessanten Enzyms aufgezeigt. Zum einen steht das Protein Small-Ubiquitin-like-Modifier (SUMO) in engem Zusammenhang mit TDG. TDG interagiert nicht nur mit SUMO, sondern modifiziert es auch. Das räumt TDG eine Rolle bei der Regulierung der Proteinlokalisierung und -stabilität ein. Zum anderen wird TDG eine Interaktion mit zahlreichen die Transkription regulierenden Proteinen (u.a. c-Jun, RAR und RXR, ER α ,...) zugeschrieben, weshalb TDG vermutlich auch an der Regulierung der Gentranskription beteiligt ist. Folglich übt TDG allem Anschein nach einen sehr wichtigen Einfluss auf den Entwicklungsprozess aus. Das bestätigt auch eine Studie mit homozygoten TDG-Null Mutanten, welche nicht überlebensfähig waren. [25]

1.6 Proliferationsmarker Ki67

Ki67 ist ein Protein, das in den Vorgang der Proliferation und in die ribosomale Transkription mit eingebunden ist, weswegen es als Wachstumsfaktor fungiert. Eine Inaktivierung führt somit zu einer Inhibierung der ribosomalen RNA Synthese. Dieser Mangel an Ribosomen minimiert den Zellstoffwechsel und inhibiert die Zellteilung. Seine Rolle als Wachstumsmarker hat Ki67, weil es nur in sich proliferierenden Zellen und nicht in ruhenden G0-Zellen exprimiert wird. In der Interphase (G1, S, G2) befindet sich Ki67 im Zellkern, während der Mitose wandert es an die Oberfläche der Chromosomen. Ki67 kommt auch in Krebszellen vor und dient dabei als Prognosefaktor. Der Ki67 Labelling-Index (also der Anteil an Ki67 positiven Zellen) korreliert mit dem klinischen Verlauf von Krebserkrankungen. [26]

Dank dieser Funktion lassen sich durch Gegenüberstellungen von Ki67 und DNMT3a/TDG auf die Zellteilung zurückzuführende Veränderungen in der Proteinexpression erahnen.

1.7 Zielregionen: Frontaler Kortex und Zerebellum

Sowohl der zerebrale Kortex, als auch das Zerebellum entwickeln sich aus dem ektodermalen Keimblatt, genauer gesagt aus dem Neuroektoderm. Die folgende Migration der Glia und Neurone in die korrekten Zellschichten kann in zwei Phasen eingeteilt werden, die

Verlängerung der Zellausläufer und die Migration des Zellkörpers und -kerns (Nukleokinese). Für die sind Nukleokinese scheinen viele essentielle Proteine der Mitose wie zytoplasmatisches Dynein, Zellpolarisationsproteine und Mikrotubuli-assoziierte Proteine von Relevanz zu sein. [27]

Das Zerebellum zeigt dabei einen von der 6-schichtigen Gliederung des zerebralen Kortex abweichenden Aufbau. Kurz nach der Geburt lässt sich die Kleinhirnrinde in vier Schichten einteilen. Subpial befinden sich die Zellen der externen Granularzellschicht (EGCL), welche im Laufe der anschließenden 15 Tage durch die darunterliegende Molekularzellschicht (MCL) und die Purkinjezellen (PL) in die interne Granularzellschicht (IGCL) wandern. Die zellarme MCL setzt sich im entwickelten Stadium aus Nervenzellfortsätzen der Purkinjezellen und der Körnerzellen der IGCL, sowie aus Korb- und Sternzellen (die Purkinje-Zellen-modulierenden Interneurone) zusammen.

Die PL besteht ausschließlich aus einer schmalen Schicht von relativ großen Zellkörper, welche mit ihren Fortsätzen die einzige Efferenz aus der Kleinhirnrinde bilden. Diese Efferenzen beeinflussen die im Mark liegenden Kerngebiete inhibitorisch.

In der zellreichen IGCL enden Afferenzen, welche dem Kleinhirn Informationen von peripher und zentral zuführen, an den Körnerzellen. Abgesehen davon haben auch die Golgi-Zellen hier ihren Platz. Golgi Zellen sind von den Körnerzellen gesteuerte rückkoppelnde inhibierende Interneurone.

All diese Neurone schließen sich zusammen zu einem Regelkreis, der die aus der Peripherie

und aus dem ZNS stammenden Informationen verarbeitet. Dieser Regelkreis repräsentiert das erste komplett verstandene neurale Netzwerk eines Vertebraten. [28]

Die Migration der Körnerzellen von der EGCL in die IGCL ist mit dem 15. Lebenstag vollendet. Während dieser Durchwanderung (→ Abbildung 9) verändern die Zellen ihre Form kontinuierlich. Im frühen postnatalen Stadium proliferieren die Körnerzellen in der äußeren Schicht der EGCL. Nach ihrer letzten mitotischen Teilung verbleiben sie in der EGCL für weitere ein bis zwei Tage (Abb.9-1). Während dieser Zeit ordnen sich die meisten der postmitotischen Zellen transversal an und bilden zwei horizontale Fortsätze aus (Abb.9-2).

Bereits in der EGCL verändern sich während dieser Entwicklung Zellform, Zellstatus und die Migrationsgeschwindigkeit immer wieder. Am Übergang EGCL/MCL verlangsamt sich die Migrationsgeschwindigkeit und die Zellkörper runden sich ab, bevor sie einen dritten vertikalen Zellfortsatz bilden (Abb.9-2), welcher in die MCL hinunterreicht. Auf dem weiteren Weg in die IGCL werden sie von den Zellfortsätzen der Bergmann- Gliazellen geleitet (Abb.9-3 bis 9-6). [29]

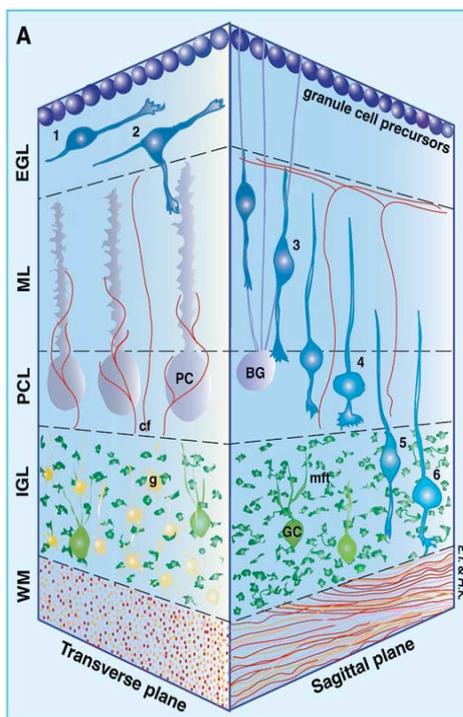


Abb. 9: Aufbau der Kleinhirnrinde und Migration der Zellen aus der EGCL in die IGCL - EGL: externe Granularzellschicht, ML: Molekularzellschicht, PCL: Purkinjezellschicht, IGL: interne Granularzellschicht, WM: weiße Substanz, PC: Purkinjezelle, BG: Bergmann Glia, GC: Golgi Cell, migrierte Granularzelle, cf: Migrationsfaser, mft: Zielschicht der Migrationsfasern 1-6: siehe Text (Quelle: Komuro et al. 2002)

1.8 Klinische Relevanz der Studie

Epigenetische Dysregulierung ist verantwortlich für eine Reihe von Krankheiten: Fragiles-X-Syndrom, Prader-Willi-Syndrom, Angelman-Syndrom, Rett-Syndrom und viele mehr. [30] Auch weitverbreitete Krankheiten wie Diabetes Mellitus Typ 2 und Kardiovaskuläre Erkrankungen entwickeln sich vermutlich als Folge langjähriger Einwirkung mehrerer Umweltfaktoren, welche unsere Epigenetik entscheidend beeinflussen. Zu den mitwirkenden Faktoren zählen hierbei Malnutrition (vor allem eine Natriumchlorid-lastige Diät) und Rauchen. [31]

Krebszellen nutzen den Methylierungsprozess zu ihren Gunsten, inhibieren dadurch die Expression von Tumorsuppressorgenen und aktivieren wachstumsfördernde Gene, was insgesamt zu einer Hypomethylierung des Genoms und genetischen Instabilität führt. [32, 33] Zudem scheint ein Verlust an 5hmC das Wachstum eines Tumors zu beschleunigen. Auch hier bietet die Epigenetik Ansätze für neue Behandlungsalternativen. Eine Überexpression der TET Enzyme in Tumorzellen kann in den von der Zelle modifizierten Methylierungs-/Demethylierungskreislauf eingreifen und so das Wachstum hemmen (→ Abbildung 10) [34]

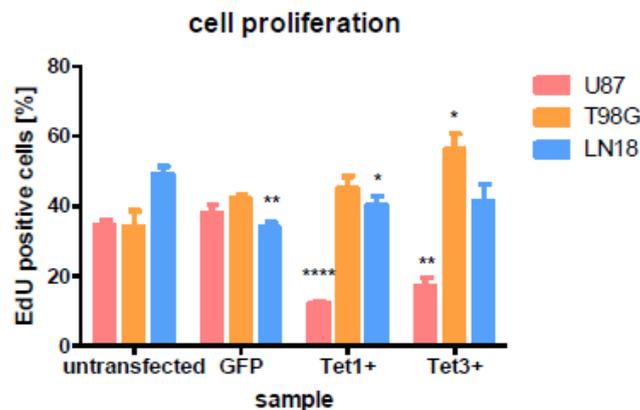


Abb. 10: Proliferation von Glioma-Zellen unter verschiedenen Bedingungen - Die Abbildung zeigt, dass das Wachstum (gemessen anhand der 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine Konzentration, welche ein Marker der DNA Synthese ist) der humanen Glioblastom Zelllinie U87 (rosa) bei Überexpression der Enzyme TET1 bzw. TET3 signifikant abnimmt. Nicht beobachtet werden konnte dieser Effekt für die Glioblastom Zelllinien T98G und LN18. GFP: Positivkontrolle, untransfected: Negativkontrolle, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 [34]

Bis jetzt hat sich die klinische und wissenschaftliche Forschung auf die Entwicklung von Medikamenten spezialisiert, die Tumorsuppressorgene in Krebszellen reaktivieren. *Vidaza* und *Dacogen* sind zwei in den USA zugelassene Inhibitoren der DNMT. Die Histon-Deacetylierung und die DNA-Demethylierung sind weitere epigenetische Prozesse, die ins Blicklicht der Behandlungsmöglichkeiten für maligne und andere Erkrankungen (zum Beispiel Alzheimer) rücken. [35]

Fakt ist jedoch, dass diese Behandlungsmethoden Zukunftsmusik sind und eine umfangreiche Grundlagenforschung voraussetzen. Ganz im Sinne Anton Bruckners: "Wer hohe Türme bauen will muss lange beim Fundament verweilen", soll auch diese Arbeit das epigenetische Wissensfundament ein klein wenig stärken.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Pragmatisch gesehen besteht das Ziel dieser Studie in der Bestimmung der Expressionsprofile von DNMT3a, TDG und Ki67 auf Proteinebene im Laufe der zerebralen Entwicklung der Maus.

Wir erhoffen uns daraus weitere Informationen die zum Verständnis der epigenetischen Regulation, insbesondere der Demethylierung, beitragen sollen. Dazu werden die Expressionsdaten mit den Expressionsdaten von 5hmC verglichen. Dieser Vergleich, sowie die Rolle von TDG im Zuge der Demethylierung bieten interessante Diskussionsansätze.

Im engeren Sinn soll die Frage angegangen werden, welche Rolle der Demethylierung während der Entwicklung zusteht und was der Grund für den in der Literatur beschriebenen 5hmC-Anstieg im Laufe der Zeit ist. Branco et al. 2012 hat für Letzteres drei Theorien aufgestellt: 5hmC-Anstieg als Reaktion auf 1) einen aktiven Methylierungs-/Demethylierungsprozess, 2) passive Akkumulation oder 3) Generation von 5hmC unabhängig von jedem Methylierungs/Demethylierungsvorgang. [11]

Weiters soll auf eventuelle Unterschiede in der epigenetischen Entwicklung zwischen verschiedenen Gehirnregionen hingewiesen werden. Zu guter Letzt werden die Proteinexpressionsdaten mit mRNA-Expressionsdaten aus einer Vorgängerstudie verglichen, um zu beurteilen, ob sich die durch Immunhistochemie gewonnenen Daten mit den mRNA-Expressionsmustern überschneiden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probenursprung

Maus C57BL/6

In dieser Studie wurden Hirngewebsproben von 40 Mäusen des Stammes C57BL/6 untersucht. Sowohl männliche als auch weibliche Mäuse wurden verwendet. Jeweils acht Mäuse wurden an den Tagen 0, 7, 15, 30 und 120 nach der Geburt geopfert. Während der ersten drei Wochen wurden die Mäuse bei ihrer Mutter belassen. Die entnommenen Gehirne wurden schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.2 Chemikalien

Formalin

Paraffin

Ethanol

Xylol

Hämatoxylin

2.1.3 Antikörper

Anti-5hmC Antibody

Active Motif

Rixensart, Belgium

Anti-5mC Antibody

Diagenode

Seraign, Belgium

Anti-5hmC Antibody

Active Motif

Rixensart, Belgium

Anti-DNMT3a Antibody

Abcam

Cambridge, UK

Anti-TDG Antibody

Active Motif

Rixensart, Belgium

Anti-Ki67 Antibody
Abcam
Cambridge, UK
sekundärer Antikörper, Standardantikörper bei automatischer Färbung/Roche

2.1.4 Geräte

<i>Sliding Microtome</i> , Leica Biosystems
Ventana Benchmark System (Roche, Basel Schweiz)
OlympusBX50 Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan)
Color View III Kamera System (Soft Imaging System, Münster, Deutschland)
Objektiv Olympus (Tokyo, Japan)

2.1.5 Software

ImageJ Software
Cell^D Software (Olympus, Europa)
Microsoft Office Word 2007
Microsoft Office Excel 2007
Paint
Prism Graph Pad 7.0

2.2 Details der verwendeten Proben

Für diese Studie wurden die Gehirne von 15 Mäusen des Stammes C57BL/6 verwendet. Unter den Versuchstieren waren sowohl weibliche als auch männliche Individuen. Je drei Mäuse wurden an den Tagen 0, 7, 15, 30 und 120 postnatal geopfert (→ Tabelle 1).

Die erhobenen Daten können in den, dem Anhang beigefügten Ergänzungstabellen (→ 6.2) eingesehen werden.

Maus	Alter	Stamm
1-3	P0	C57BL/6
4-6	P7	C57BL/6
7-9	P15	C57BL/6
10-12	P30	C57BL/6
13-15	P120	C57BL/6

Tab. 1: Übersicht über die in dieser Studie verwendeten Versuchstiere – Alle Mäuse entstammen dem Stamm C57BL/6

P = postnatal

Um auf die Frage der Auswirkung des Geschlechtsunterschiedes einzugehen wurde eine Analyse von Kraus et al. 2012 [36] übernommen, welche 22 gesunden Gehirnproben untersuchte. Bei den Proben dieser Studie handelte es sich um gesunde, humane Proben aus dem Frontalkortex, der frontalen weißen Masse, dem Okzipitalkortex und der okzipitalen weißen Masse mit einem Durchschnittsalter von 59 Jahren. Es wurde mittels Immunhistochemie die Verteilung von 5hmC in den genannten Regionen untersucht. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Probanden (→ Abbildung 11). Diese Analyse gibt Grund zu der Annahme, dass das globale Epigenom im Gehirn geschlechterneutral funktioniert und reguliert wird. Da in dieser Studie die Geschlechtinformation der untersuchten Mäuse nicht vorlag, wurde diese Analyse nicht wiederholt durchgeführt, sondern es wurde davon ausgegangen, dass diese Annahme auch für die hier untersuchten Proben zutrifft.

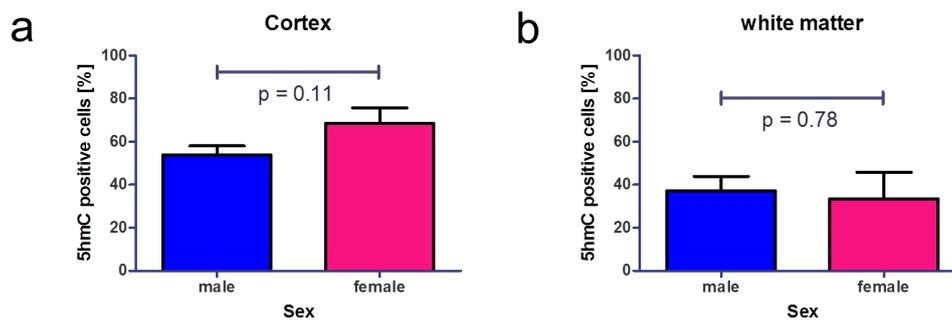


Abb. 11: Geschlechtsspezifische Analyse der 5hmC-Verteilung im Kortex (a) und in der weißen Masse (b) – Es lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung von 5hmC im Kortex sowie in der weißen Masse zwischen weiblichen und männlichen Proben feststellen. [36]

2.3 Methoden

2.3.1 Präparation der Proben

Die Mäuse wurden zur Verfügung gestellt vom Tierlabor des Instituts. Je drei Gehirne wurden für 24 Stunden in Formalin fixiert und daraufhin in Paraffin eingebettet. Dazu wurde das Gewebe für 5 Minuten in 70%igem Ethanol inkubiert, gefolgt von drei weiteren Inkubationsschritten: Inkubation für je 5 Minuten in 96%igem Ethanol, Inkubation für 10 Minuten in 100%igem Ethanol, Inkubation für 30 Minuten in Xylene (→ Tabelle 2). Paraffin löst sich gut in Xylene und sorgt nach Aushärtung für eine lange Haltbarkeit der Gewebeblöcke, die bei Raumtemperatur gelagert werden.

Inkubation der Schnitte	
in...	für..
70% Ethanol	5min
96% Ethanol	5min
100% Ethanol	10min
Xylene	30min

Tab. 2: Arbeitsschema für die Entwässerung der formalinfixierten Proben

2.3.2 Immunhistochemie

Die Gewinnung der Proben und die immunhistochemischen Färbungen wurden in zusammen mit dem Team der Diagnostik und Histologie des Instituts durchgeführt. Dazu wurden 4µm dicke Schnitte der paraffinierten Blöcke verwendet. Diese wurden zuerst entparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte inkubiert in Xylene für 30 Minuten, dann in 100%igen Alkohol für 10 Minuten, in 96%igen Alkohol für 5 Minuten und zum Schluss noch einmal 70%igem Alkohol für weitere 5 Minuten (→ Tabelle 3).

Inkubation der Schnitte	
in...	für..
Xylene	30min
100% Ethanol	10min
96% Ethanol	5min
70% Ethanol	5min

Tab. 3: Arbeitsschema für die Entparaffinierung der FFPE-Proben

Daraufhin wurde je ein Schnitt nach 5hmC/5mC/DNMT3a/TDG/Ki67 mit einem Ventana Benchmark System gefärbt. Folgende Antikörper wurden dabei verwendet und entsprechend verdünnt:

primärer Antikörper gegen 5hmC

Anti-5hmC Antibody, polyklonal
Active Motif, Rixensart, Belgium
1:1000

primärer Antikörper gegen 5mC

Anti-5mC Antibody, monoklonal, Clone 33D3
Diagenode, Seraign, Belgium
1:3000

primärer Antikörper gegen DNMT3a

Anti-DNMT3a Antibody, polyklonal
Abcam, Cambridge, UK
1:400

primärer Antikörper gegen TDG

Anti-TDG Antibody, polyklonal
Active Motif, Rixensart, Belgium
1:200

primärer Antikörper gegen Ki67

Anti-Ki67 Antibody, monoklonal
Abcam, Cambridge, UK
1:100

sekundärer Antikörper

Standard-Antikörper bei automatischer Färbung mit einem Ventana
Benchmark System/Roche, Basel, Schweiz

Sämtliche Schnitte wurden daraufhin mit Hämatoxylin gegengefärbt.

2.3.3 Mikroskopie

In dieser Studie wurden der Frontalkortex sowie der zerebellare Kortex untersucht (→ Abbildung 12). Der Frontalkortex wurde repräsentativ für die graue Masse, welche sich in 6 Schichten aufgliedert, ausgewählt. Entwicklungsgeschichtlich bedingt zeigt die Kleinhirnrinde einen anderen Aufbau als die Großhirnrinde. Das lässt vermuten, dass hier auch die Regulation und der Ablauf der Entwicklung eventuell feine Unterschiede aufzeigen.

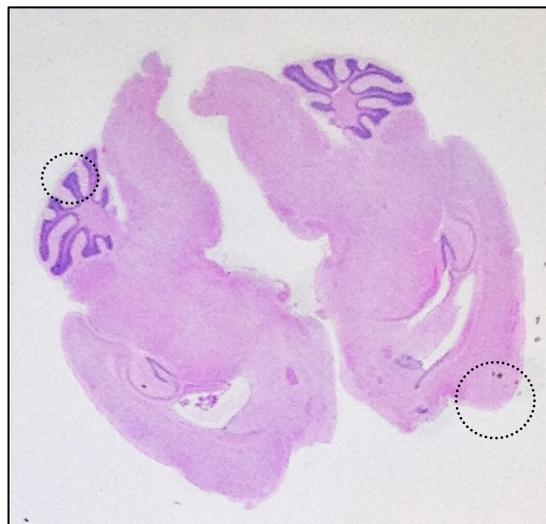


Abb. 12: Darstellung der untersuchten Gehirnregionen – von jedem Präparat wurde ein repräsentativer Bereich, sowohl im frontalen Kortex, als auch im Zerebellum ausgewählt → Kreise

Die Schnitte wurden mit einem Olympus BX50 Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) begutachtet, ein repräsentatives Gebiet ohne technische Artefakte wurde ausgewählt und mit

einem Color View III Kamera System (Soft Imaging System, Münster, Deutschland) abgelichtet. Dazu wurde je ein Objektiv (Olympus, Tokyo, Japan) mit einer 10fachen, sowie einer 20fachen Vergrößerung von ausgewählt.

2.3.4 Quantifizierung

Quantifiziert wurden die Mengen 5hmC- / 5mC- / DNMT3a- / TDG- und Ki67- positiver Zellen im Frontalkortex und im zerebellaren Kortex. Im Zerebellum wurden die Schichten EGCL, IGCL und MCL zusätzlich separat ausgezählt. Die Quantifizierung von 5hmC und 5mC werden in dieser Arbeit im Rahmen der Korrelationsanalysen präsentiert und können in Ergänzungstabelle 2 eingesehen werden (→ 6.2 Ergänzungstabellen)

Die Zellzahlbestimmung wurde mit der Software ImageJ durchgeführt. Dabei wurde eine Zelle als positiv betrachtet, sobald ein immunhistochemisches Signal erkennbar war, selbst wenn dieses schwach war (→ Abbildung 13).

Nur die 20fachen Vergrößerungen wurden für die Analyse herangezogen. Prinzipiell wurden alle auf einem Bild vorhandenen Zellen in die Auswertung mit einbezogen, höchstens aber 600 pro definierter Zellschicht.

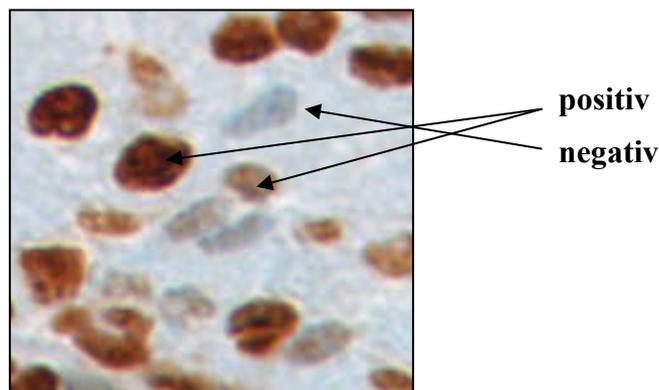


Abb. 13: Immunhistochemisch gefärbter Gewebeausschnitt – Der Ausschnitt zeigt eine Ansammlung von Zellen, die immunhistochemisch gefärbt wurden. Die braune Farbe bedeutet ein positives Signal. Auch wenn die Braunfärbung nur von geringer Intensität war, wurde die Zelle als positiv betrachtet.

2.3.5 Binarisierung

Um das manuell ausgezählte Ergebnis zu überprüfen wurde jedes Bild zusätzlich digital mit der Software Cell[^]D (Olympus, Europa) bewertet. Dies geschah mit Hilfe der Binarisierungstechnik. Dabei wird nach einem zuvor festgelegten Grenzwert (Rot: 40-255, Grün: 0-180, Blau: 0-150) jedem Pixel des Bildes entweder die Farbe schwarz oder weiß zugeordnet. Das Verhältnis dieser Farbverteilung wird in Form einer Excel-Tabelle wiedergegeben (→ Abbildung 14).

Stimmt die Relation der schwarzen zur weißen Fläche mit der Relation der positiven Zellzahl zur Gesamtzellanzahl überein, wird das Quantifizierungsergebnis dadurch bekräftigt.

Bei der Binarisierung ist zu beachten, dass dabei das Verhältnis von zwei Flächen dargestellt wird. Wohingegen das manuell ausgezählte Ergebnis der immunhistochemischen Färbung einen Prozentsatz absoluter Zahlen widerspiegelt. Das führt dazu, dass bei der Binarisierung auch die extrazelluläre Matrix als negative Fläche mit einbezogen wird.

Diese Prozentsätze dürfen also nicht direkt miteinander verglichen werden. Der Verlauf über die Zeit und die Tendenz beherbergen aber relevante Informationen.

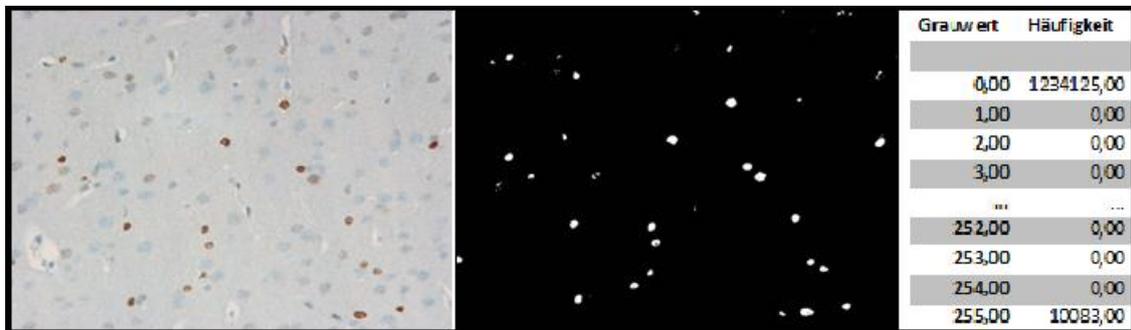


Abb. 14: Beispiel Binarisierungstechnik – Das linke Bild zeigt einen immunhistochemisch gefärbten Schnitt, das Mittlere die binarisierte Version dieses Bildes. Die Tabelle rechts zeigt das Ergebnis der Binarisierung in Excel mit den beiden Grauwerten.

2.3.6 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurden die Programme Microsoft Office Excel und Prism Graph Pad 7.0 verwendet

Aufgrund einer Normalverteilungsannahme der untersuchten Moleküle im Laufe der Entwicklung, wie sie auch in diversen hochwertigen Publikationen in diesem Zusammenhang angenommen wurde [18, 36-40], wurde mit Hilfe eines t-Tests die Signifikanz der Unterschiede zwischen den definierten Gruppen bestimmt. Des weiteren wurde mit Prism Graph Pad 7.0 ein ANOVA Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Um festzustellen ob eine lineare Beziehung zwischen den erhobenen Expressionsdaten vorliegt, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet, sowie das zugehörige Bestimmtheitsmaß und die lineare Regression. Da auch eine monotone Beziehung ohne Linearität vorstellbar wäre, wurde zudem der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Dazu wurden die Entwicklungen der Expressionsdaten zweier Parameter über die in 2.2 erwähnten Zeitpunkten miteinander korreliert.

Die HeatMap (→Abbildung 90) wurde mit Hilfe <https://software.broadinstitute.org/morpheus/> erstellt.

2.4 Übereinkommen mit der Ethikkommission

Alle Verfahren, bei denen in dieser Studie Mäuse involviert waren, wurden unter Beachtung der ethischen Standards des Instituts ausgeführt, entsprechend den Richtlinien der lokalen Ethikkommission.

Die Mäuse wurden bis zu einem Alter von 3 Wochen bei der Mutter belassen und daraufhin jeweils zu dritt in einem Standardkäfig der Größe 30 x 15 x 20 cm untergebracht.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Expressionsprofile im frontalen Kortex

3.1.1 Proteinexpression von DNMT3a

3.1.1.1 Quantifizierung der Verteilung

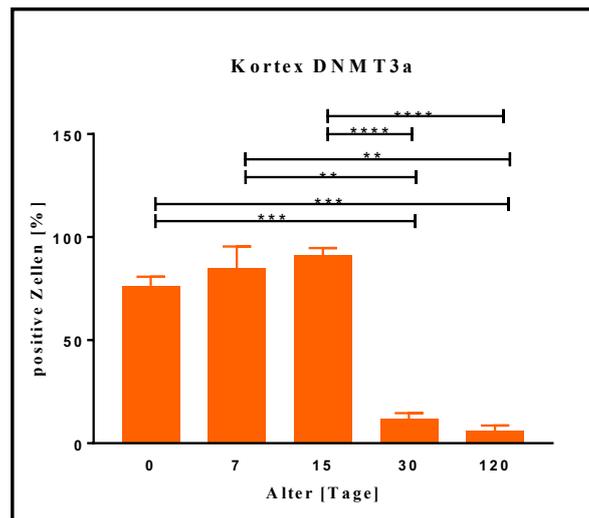


Abb. 15: Quantifizierung der DNMT3a-positiven Zellen während der Entwicklung des frontalen Kortex – Die Zahl der DNMT3a-positiven Zellen nimmt während des Alterungsprozesses signifikant ab.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Wie in → 2.3 Methoden erläutert, wurde die Anzahl der DNMT3a positiven Zellen des frontalen Kortex ermittelt und mit der Gesamtzahl der vorhandenen Zellen ins Verhältnis gesetzt.

Bei Testung der Verteilung mit einem *one-way* ANOVA Test ergab sich hierbei ein signifikanter Unterschied in der Verteilung mit einem p -Wert $< 0,0001$. Mit Hilfe des *t*-Tests konnte eine signifikante Abnahme der Proteinlevel auf Tag 30 und 120 festgestellt werden. Die Level blieben stabil bis zum Tag 15 und gingen dann rasant zurück (→ Abbildung 15+16).

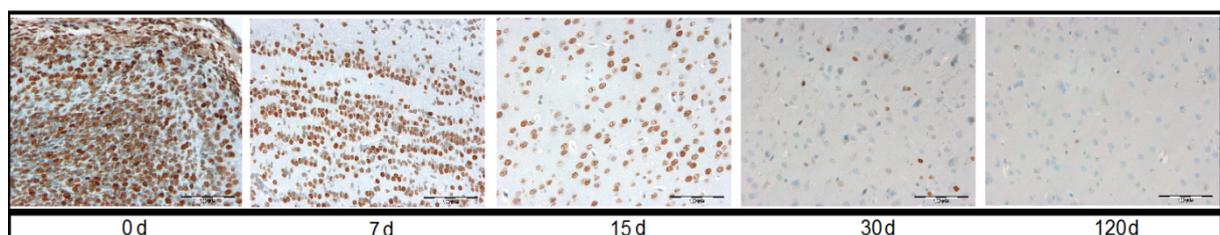


Abb. 16: Immunhistochemische Detektion von DNMT3a im frontalen Kortex - Im frontalen Kortex von Mäusen, geopfert an den Tagen 0, 7, 15, 30 und 120 nach der Geburt, ist eine altersabhängige Expression von DNMT3a zu erkennen 20x Vergrößerung; *d*=Tage

Abbildung 16 zeigt die immunhistochemische Quantifizierung von DNMT3a im frontalen Kortex. Hier ist eindeutig zu erkennen, dass die Menge an positiv-gefärbten Zellen altersabhängig ist. Dabei ist zu beachten, dass nicht nur die Zellzahl in Abbildung 16/120d geringer ist als in Abbildung 16/0d, sondern vor allem das Verhältnis braune/blau (negativ für DNMT3a) Zellen in Abbildung 16/120d nun deutlich zu Gunsten der blauen Zellen ausfällt.

3.1.1.2 Binarisierung der Verteilung

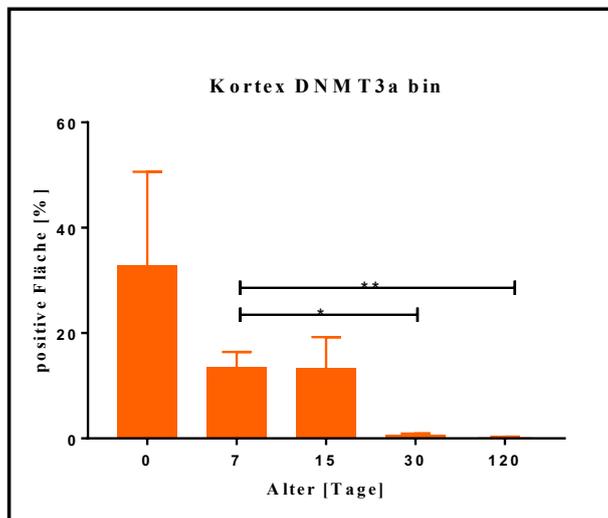


Abb. 17: Binarisierung der DNMT3a-positiven Fläche an den Tagen 0/7/15/30/120pn im frontalen Kortex – Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der DNMT3a-positiven Fläche ab Tag 7.
p<0,05; **p<0,01; *p<0,001; ****p<0,0001; ungepaarter t-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

Die in der 20x-Vergrößerung abgelichteten Gewebeschnitte wurden mit dem Programm Cell^D binarisiert, die Mittelwerte der Ergebnisse in jeder Altersgruppe ermittelt und in einem Diagramm dargestellt. Wie schon in Abbildung 15 zeigt sich auch hier eine Abnahme der braun gefärbten Fläche mit steten Spiegeln bis Tag 7/15, gefolgt von einer signifikanten Abnahme.

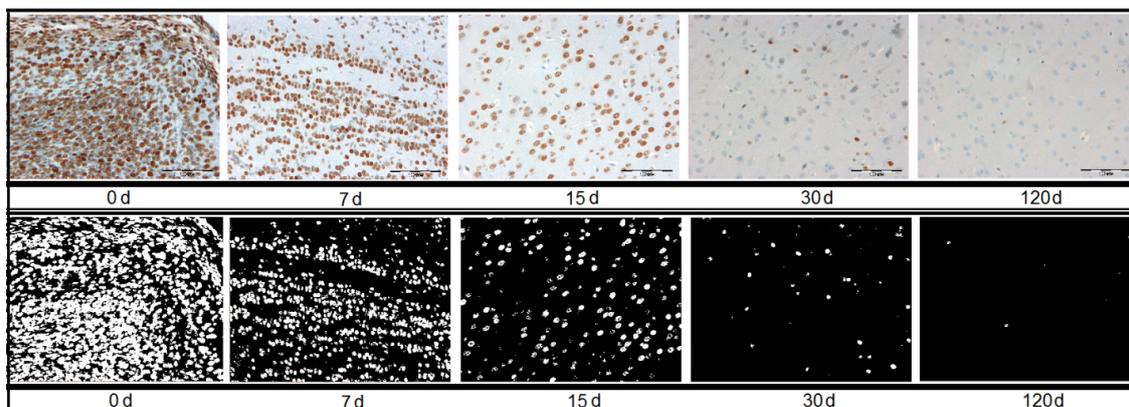


Abb. 18: Vergleich immunhistochemische Färbung/Binarisierung DNMT3a Kortex- Durch die digitale Binarisierung wird eine jede braune positive Zelle weiß dargestellt. Das Verhältnis der schwarzen zur weißen Fläche wird daraufhin in % wiedergegeben (→ Abbildung 17). *20x, Vergrößerung, d= Tage*

Abbildung 18 zeigt ausgewählte Präparate des Kortex und deren binarisierte Versionen. Es ist gut zu erkennen, dass jede braungefärbte Zelle durch die Binarisierung weiß erscheint. Die Bilder sind also ident. Trotzdem zeigt Abbildung 15 zum Beispiel an Tag 0 einen Prozentsatz von weit über 50%, während Abbildung 17 nicht einmal 40% ergibt. Das liegt an der bereits erwähnten Kasuistik, dass bei der Binarisierung ein Flächenverhältnis gemessen wird. Es zählt also die Tendenz. Auch wenn die Binarisierung nicht exakt die gleichen signifikanten Unterschiede aufweist wie das manuell ausgezählte Ergebnis, finden sich die Signifikanzen der Binarisierung in der Quantifizierung wieder.

3.1.2 Proteinexpression von TDG

3.1.2.1 Quantifizierung der Verteilung

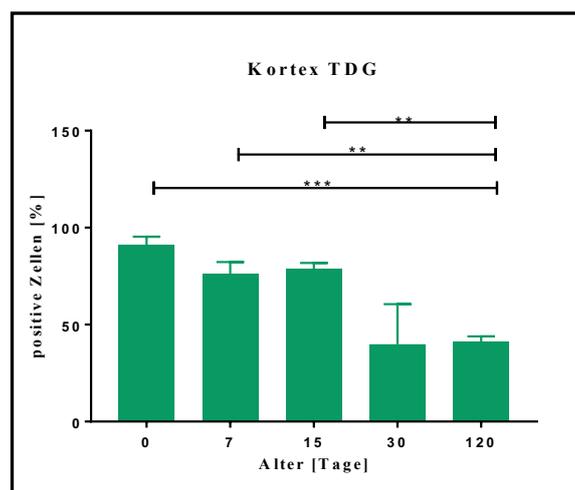


Abb. 19: Quantifizierung der TDG-positiven Zellen während der Entwicklung des frontalen Kortex – Tag 0/7/15 zeigen eine signifikante Abnahme der Proteinexpression auf Tag 120.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Im Falle von TDG lässt sich eine signifikante Abnahme der Proteinlevel im Laufe des Entwicklungsprozesses feststellen. Im Gegensatz zu der markanten Abnahme DNMT3a-positiver Zellen ab Tag 15, bleiben die TDG Proteinlevel an Tag 30 und 120 auf einem konstant höheren Level und sind erst an Tag 120 signifikant gesunken. (→ Abbildung 19)

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den Bildreihen in Abbildung 20 und 22 wieder.

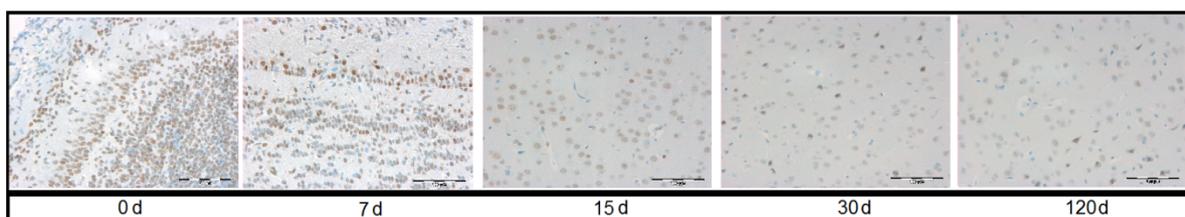


Abb. 20: Immunhistochemische Detektion von TDG im frontalen Kortex - Im frontalen Kortex von Mäusen, geopfert an den Tagen 0, 7, 15, 30 und 120 nach der Geburt, ist eine altersabhängige Expression von TDG zu erkennen. 20x Vergrößerung, *d*=Tage

3.1.2.2 Binarisierung der Verteilung

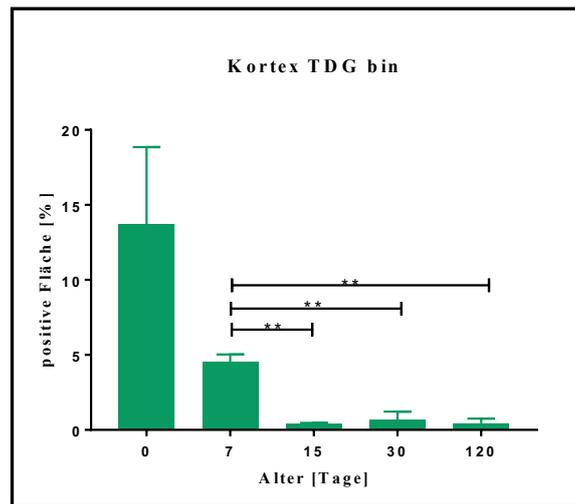


Abb. 21: Binarisierung der TDG-positiven Fläche an den Tagen 0/7/15/30/120pn im frontalen Kortex – Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der TDG-positiven Fläche ab Tag 7.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Abbildung 21 zeigt eine signifikante Abnahme der positiven Fläche binnen der Entwicklung, mit relativ konstanten Level ab Tag 15.

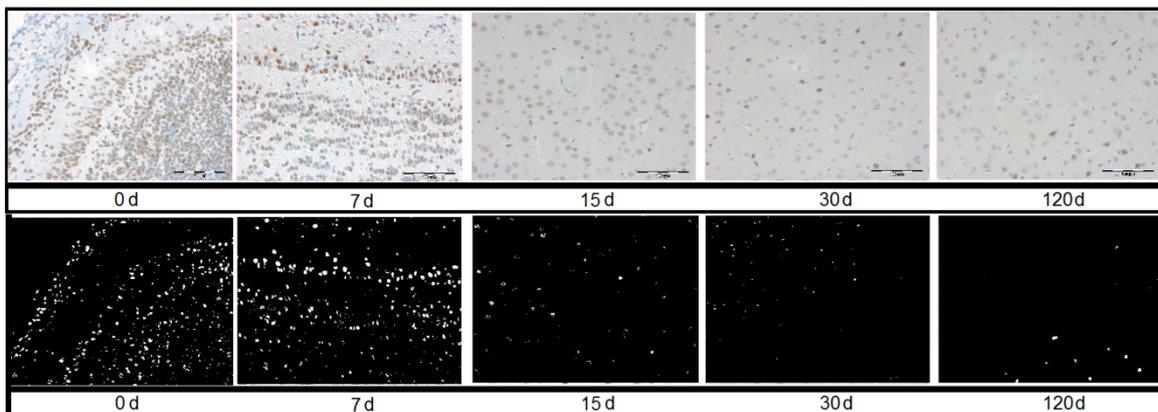


Abb. 22: Vergleich immunhistochemische Färbung/Binarisierung_TDG Kortex - Durch die digitale Binarisierung wird eine jede braune positive Zelle weiß dargestellt. 20x Vergrößerung, d=Tage

Die binarisierte Bildreihe in Abbildung 22 zeigt, wie in der Quantifizierung beschrieben, eine deutliche Abnahme der positiven (weißen) Fläche.

3.1.3 Proteinexpression von Ki67

3.1.3.1 Quantifizierung der Verteilung

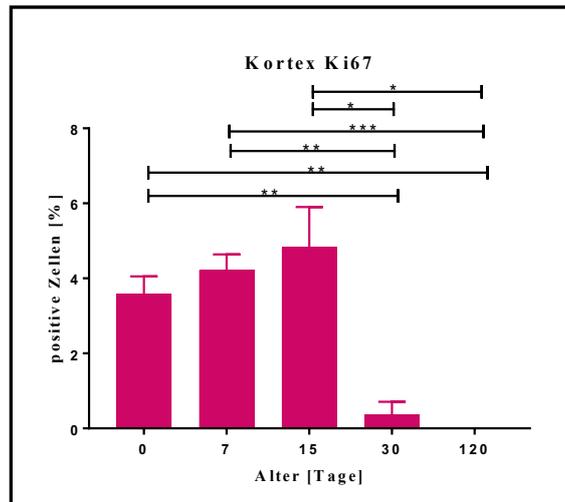


Abb. 23: Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen während der Entwicklung des frontalen Kortex – Die Zahl der Ki67-positiven Zellen nimmt binnen des Alterungsprozesses signifikant ab.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Die Quantifizierung des Wachstumsfaktors Ki67 (\rightarrow Abbildung 23) ergibt ebenfalls eine signifikante Abnahme im Laufe der Entwicklung. Die Proteinlevel fallen ab Tag 15 rasant auf ein kaum zu messendes Level an Tag 30 und 120 ab.

Auch hier spiegelt die Bildreihe die beschriebenen Ergebnisse wieder. (\rightarrow Abbildung 24)

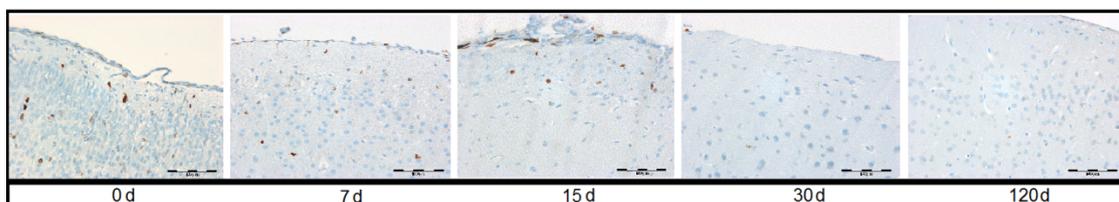


Abb. 24: Immunhistochemische Detektion von Ki67 im frontalen Kortex - Im frontalen Kortex von Mäusen, geopfert an den Tagen 0, 7, 15, 30 und 120 nach der Geburt, ist eine altersabhängige Expression von Ki67 zu erkennen. Die Zahl der braunen Zellen ist bereits an Tag 0 gering und nimmt im Verlauf weiter ab. 20x Vergrößerung, d =Tage

3.1.3.2 Binarisierung der Verteilung

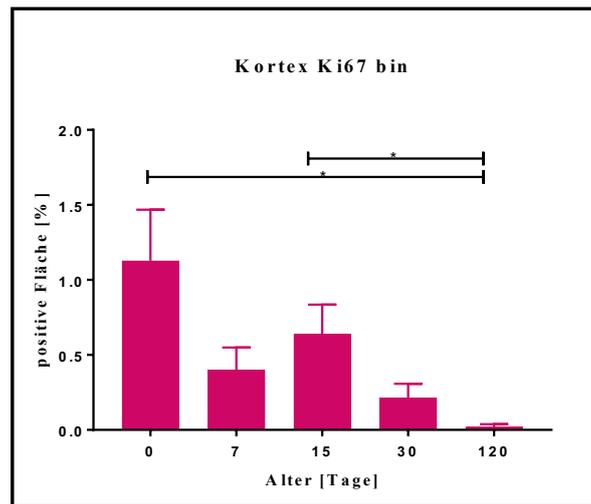


Abb. 25: Binarisierung der Ki67-positiven Fläche an den Tagen 0/7/15/30/120pn im frontalen Kortex – Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Ki67-positiven Fläche zwischen Tag 0/15 und Tag 120.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Mit Ausnahme von Tag 7 stimmt die Tendenz des binarisierten Diagramms (→ Abbildung 25) mit der Quantifizierung (→ Abbildung 23) überein. Es ist eine Abnahme der positiven Fläche ab Tag 15 zu erkennen. An Tag 120 ist kaum noch weiße Fläche auszumachen (→ Abbildung 26).

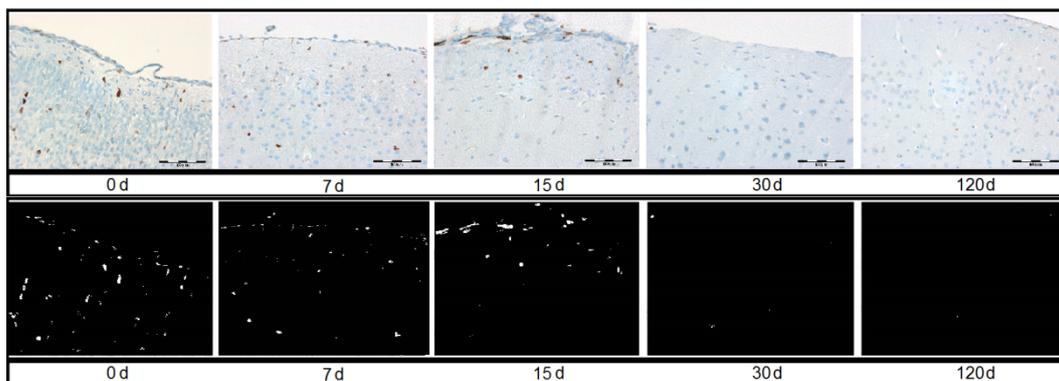


Abb. 26: Vergleich immunhistochemische Färbung/Binarisierung_Ki67 Kortex - Durch die digitale Binarisierung wird eine jede braune positive Zelle weiß dargestellt. 20x Vergrößerung, d=Tage

3.2 Bestimmung der Expressionsprofile im Zerebellum

Im zerebellären Kortex wurde die immunhistochemische Quantifizierung der Proteine DNMT3a, TDG und Ki67 separat für jede der folgenden Zellschichten: EGCL, IGCL und MCL durchgeführt um eine detaillierte Einsicht in die molekularen Mechanismen während der Entwicklung des Kleinhirns zu bekommen.

Da die EGCL aus unreifen Zellen besteht, welche im Laufe der Entwicklung in die IGCL wandern, verschwindet die EGCL mit dem Tag 15.

3.2.1 Proteinexpression von DNMT 3a

3.2.1.1 Quantifizierung der Verteilung in der EGCL

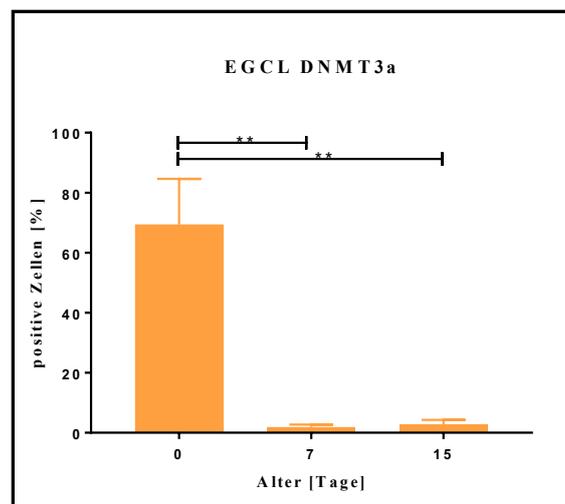


Abb. 27: Quantifizierung der DNMT3a-positiven Zellen während der Entwicklung der EGCL des Zerebellum - Die Zahl der DNMT3a-positiven Zellen nimmt im Laufe der Zeit signifikant ab.

** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

Am Tag der Geburt ist in der EGCL ein Großteil der untersuchten Zellen DNMT3a-positiv. Dieser Anteil vermindert sich extrem. Bereits an Tag 7 sind kaum noch positive Zellen auszumachen. (→ Abbildung 27)

3.2.1.2 Quantifizierung der Verteilung in der IGCL

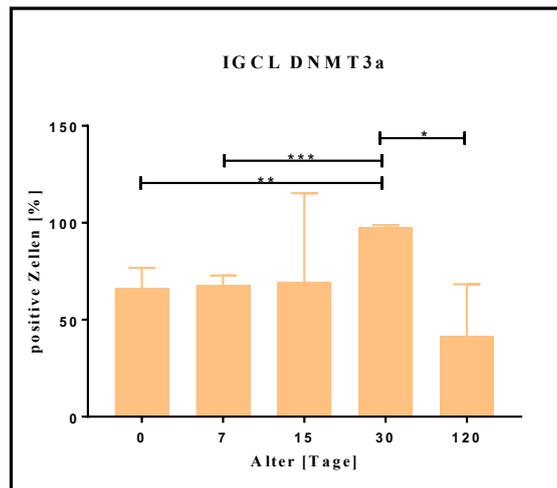


Abb.28: Quantifizierung der DNMT3a-positiven Zellen während der Entwicklung der IGCL des Zerebellum - Die Zahl der DNMT3a-positiven Zellen nimmt bis Tag 30 signifikant zu und fällt darauf hin mit $p < 0,05$ wieder ab.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

In der IGCL konnte ein signifikanter Anstieg der DNMT3a-Proteinlevel am Tag 30 festgestellt werden, gefolgt von einem signifikanten Abfall auf ~40% an Tag 120 (→ Abbildung 28).

3.2.1.3 Quantifizierung der Verteilung in der MCL

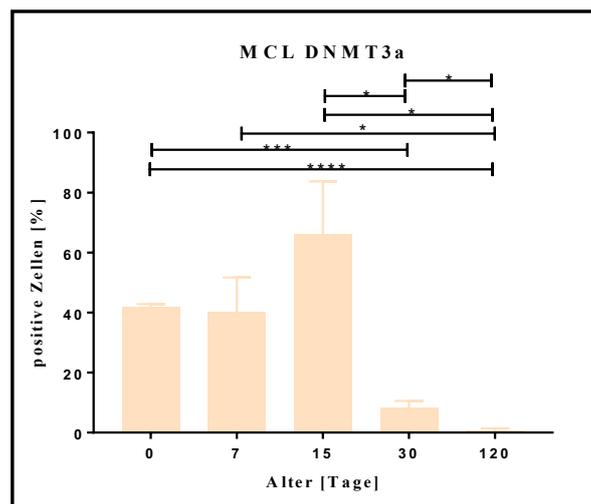


Abb. 29: Quantifizierung der DNMT3a-positiven Zellen während der Entwicklung der MCL des Zerebellum - Die Zahl der DNMT3a-positiven Zellen geht im Laufe der Entwicklung signifikant zurück.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

In der MCL ist eine große Anzahl an DNMT3a-positiven Zellen während der ersten 15 Tage zu erkennen, welche im Laufe der Entwicklung auf Tag 30/120 signifikant abfällt. (→Abbildung 29)

3.2.1.4 Binarisierung der Verteilung im gesamten zerebellären Kortex

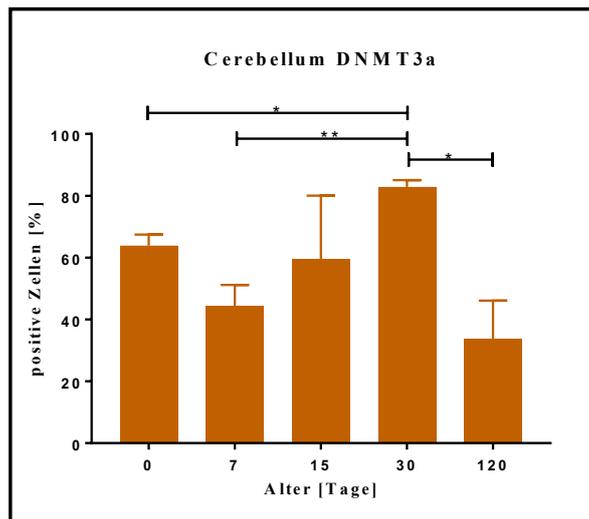


Abb. 30: Quantifizierung der DNMT3a-positiven Zellen während der Entwicklung des zerebellären Kortex (ohne Differenzierung der Kleinhirnschichten) - Die Zahl der DNMT3a-positiven Zellen steigt innerhalb der ersten 30 Tage signifikant an und fällt dann auf Tag 120 signifikant ab.
p<0,05; **p<0,01; *p<0,001; ****p<0,0001; ungepaarter t-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

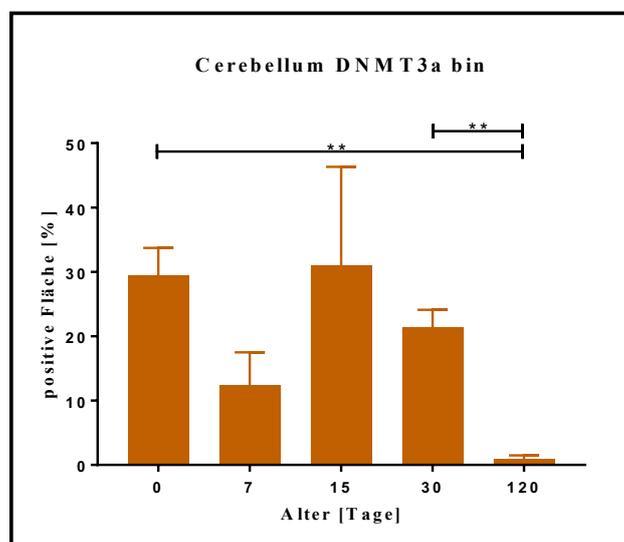


Abb. 31: Binarisierung der DNMT3a-positiven Fläche während der Entwicklung des zerebellären Kortex (ohne Differenzierung der Kleinhirnschichten) - Die Größe der DNMT3a-positiven Fläche erreicht an Tag 120 ein Minimum.
p<0,05; **p<0,01; *p<0,001; ****p<0,000; ungepaarter t-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

Zusätzlich zur Quantifizierung der einzelnen Kleinhirnschichten, wurde eine Quantifizierung, sowie eine Binarisierung der DNMT3a-gefärbten Schnitte ohne Differenzierung der Schichten durchgeführt. Die dabei erhaltenen Verteilungsmustern gleichen sich in der Quantifizierung und Binarisierung annähernd. Wir sehen eine signifikante Zunahme der Werte bis ungefähr Tag 30 (Quantifizierung), gefolgt von einer auffallenden signifikanten Abnahme auf Tag 120 (→ Abbildung 30+31).

Dieser Verlauf lässt sich auch gut in der Bildreihe in Abbildung 32 verfolgen.

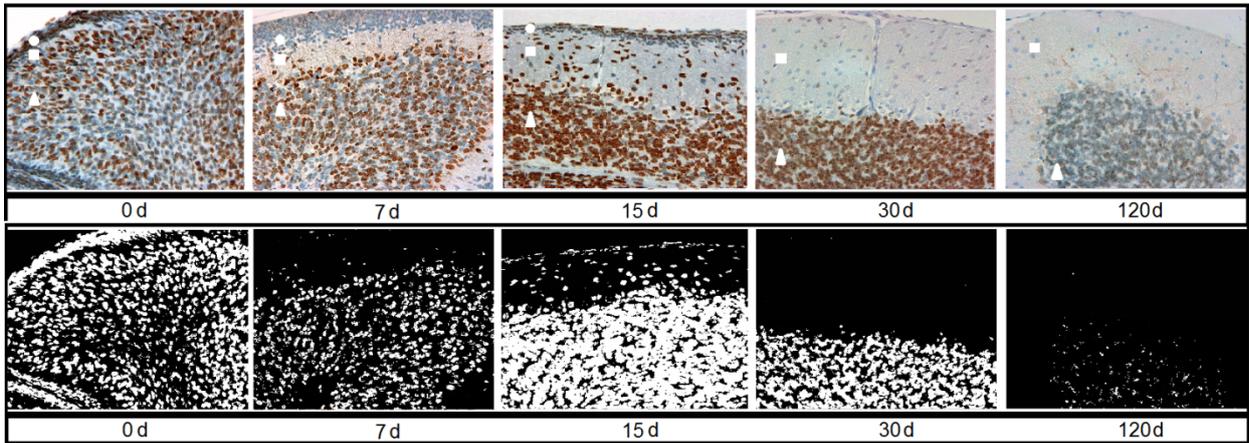


Abb. 32: Vergleich immunhistochemische Färbung/Binarisierung_DNMT3a Zerebellum - Durch die digitale Binarisierung wird eine jede braune positive Zelle weiß dargestellt. An Tag 120 ist in beiden Bildreihe eine deutliche Verminderung der braunen/weißen Farbe zu erkennen.

20x Vergrößerung, d=Tag; ● = EGCL, ■ = MCL, ▲ = IGCL

3.2.2 Proteinexpression von TDG

3.2.2.1 Quantifizierung der Verteilung in der EGCL

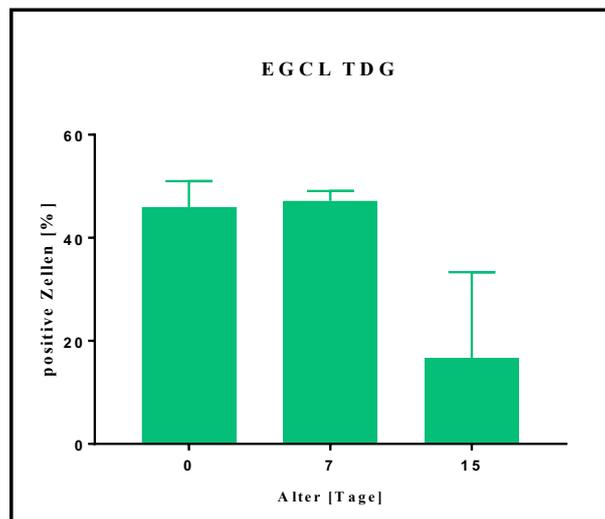


Abb. 33: Quantifizierung der TDG-positiven Zellen während der Entwicklung der EGCL des Zerebellum - Es lassen sich keine signifikanten Veränderungen innerhalb der ersten 15 Tage feststellen.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Bei der Untersuchung der Verteilung der TDG-positiven Zellen in der EGCL konnten keine signifikanten Unterschiede in den ersten 15 Tagen der Entwicklung festgestellt werden. (→ Abbildung 33)

3.2.2.2 Quantifizierung der Verteilung in der IGCL

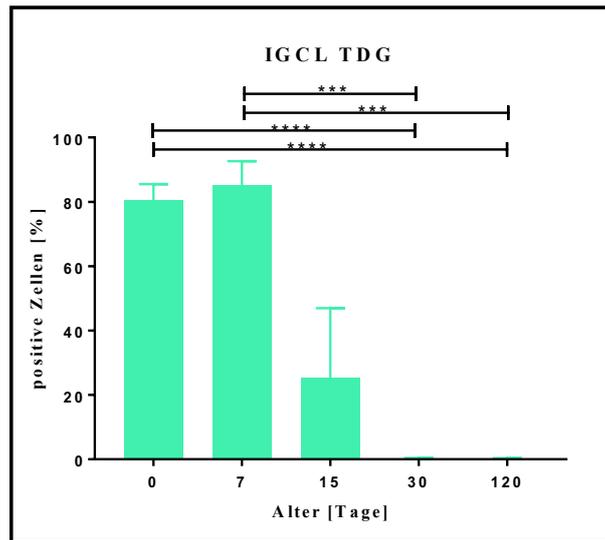


Abb. 34: Quantifizierung der TDG-positiven Zellen während der Entwicklung der IGCL des Zerebellum - Die Anzahl der TDG-positiven Zellen bleibt in den ersten 7 Tagen konstant und sinkt auf Tag 30 und 120 signifikant.

p<0,05; **p<0,01; *p<0,001; ****p<0,0001; ungepaarter t-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

Bei der Untersuchung der Verteilung der TDG-positiven Zellen in der IGCL konnte hingegen eine signifikante Abnahme der Proteinlevel auf Tag 30 und 120 beobachtet werden. In den ersten 15 Tagen gibt es, parallel zur EGCL, keine signifikanten Veränderungen. Nach Tag 15 sind die Proteinlevel allerdings so stark gesunken, dass kaum noch messbare Mengen vorhanden sind. (→ Abbildung 34)

3.2.2.3 Quantifizierung der Verteilung in der MCL

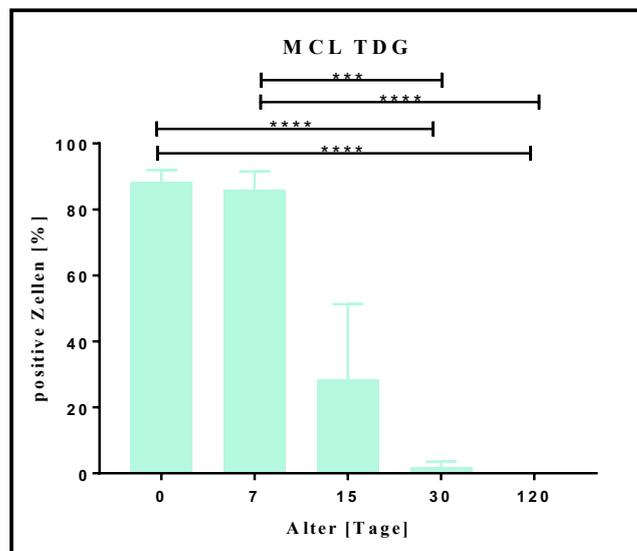


Abb. 35: Quantifizierung der TDG-positiven Zellen während der Entwicklung der MCL des Zerebellum - Die Proteinlevel der TDG-positiven Zellen bleiben in den ersten 7 Tagen konstant und sinken anschließend signifikant.

p<0,05; **p<0,01; *p<0,001; ****p<0,0001; ungepaarter t-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

In der MCL gleichen die Ergebnisse denen der IGCL. In den ersten 15 Tagen, lassen sich keine signifikanten Veränderungen feststellen. An den Tagen 30 und 120 hat die Menge an TDG-positiven Zellen signifikant abgenommen, sodass kaum noch positive Zellen zu identifizieren sind. (→ Abbildung 35)

3.2.2.4 Binarisierung der Verteilung im gesamten zerebellären Kortex

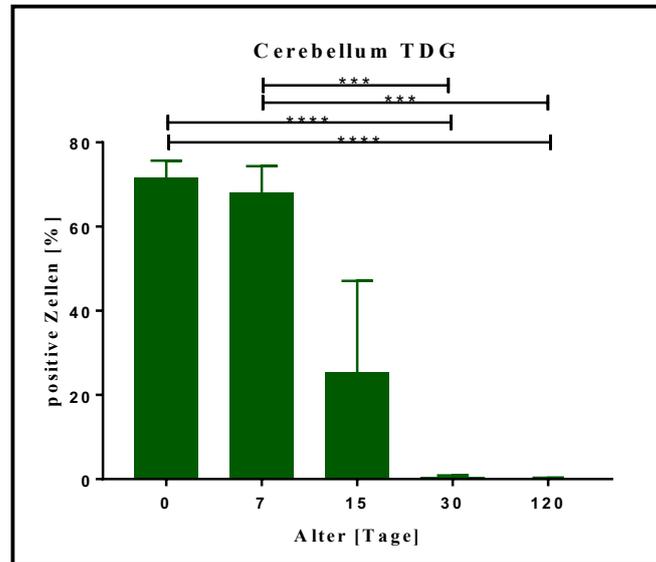


Abb. 36: Quantifizierung der TDG-positiven Zellen während der Entwicklung des zerebellären Kortex (ohne Differenzierung der Kleinhirnschichten) - Die Zahl der TDG-positiven Zellen sinkt im Laufe der Entwicklung signifikant.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

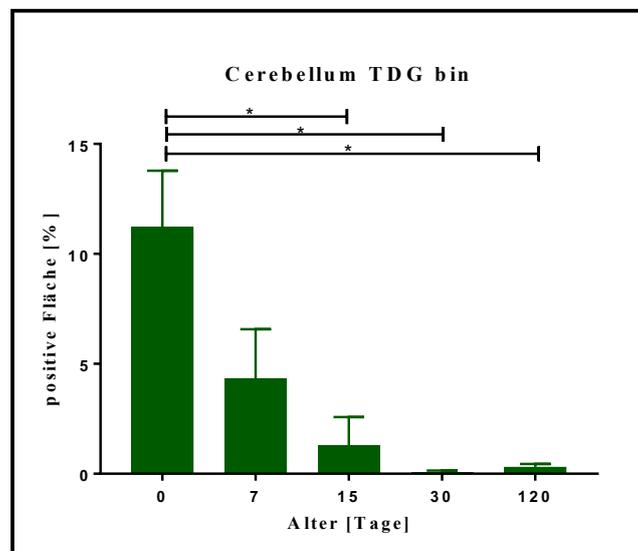


Abb. 37: Binarisierung der TDG-positiven Fläche während der Entwicklung des zerebellären Kortex (ohne Differenzierung der Kleinhirnschichten) Die Zahl der TDG-positiven Zellen fällt im Laufe der Entwicklung signifikant.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Sowohl die Quantifizierung, als auch die Binarisierung der Kleinhirnrinde ergab einen signifikanten Abfall der TDG-Proteinexpression mit einem Minimum an den Tagen 30 und 120 postnatal. (→ Abbildung 36+37)

Die Bildreihe in Abbildung 38 spiegelt diesen Verlauf wieder. Die in Abbildung 38/120d braun/weiß markierten Zellen sind Purkinjezellen in der Purkinjezellschicht, welche in dieser Studie in der Quantifizierung nicht berücksichtigt wurde. Das erklärt den geringen Anstieg der Proteinlevel an Tag 120 in Abbildung 37, da diese Zellen in der Binarisierung sehr wohl berücksichtigt wurden.

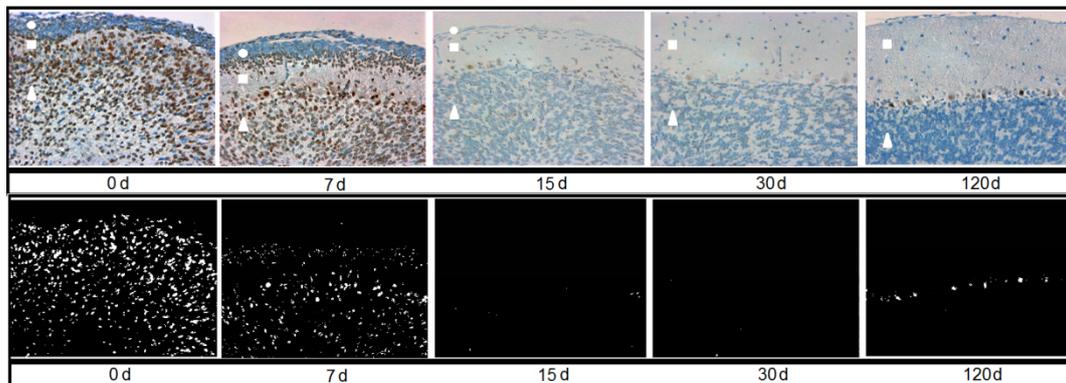


Abb. 38: Vergleich immunhistochemische Färbung/Binarisierung TDG Zerebellum - Durch die digitale Binarisierung wird eine jede braune positive Zelle weiß dargestellt. An den Tagen 15, 30 und 120 sind kaum noch braune/weiße Zellen auszumachen (ausgenommen Purkinjezellen).

20x Vergrößerung, d=Tage-, ● = EGCL, ■ = MCL, ▲ = IGCL

3.2.3 Proteinexpression von Ki67

3.2.3.1 Quantifizierung der Verteilung in der EGCL

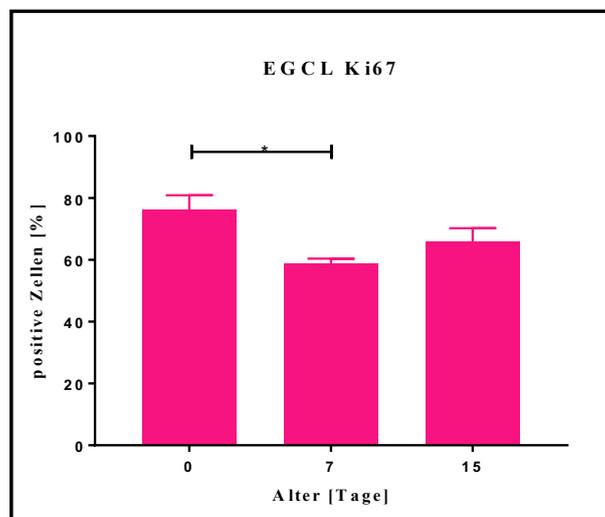


Abb. 39: Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen während der Entwicklung der EGCL des Zerebellum - Die Proteinlevel der Ki67-positiven Zellen sind während der ersten 15 Tage hoch, es konnte nur eine leicht signifikante Minderung an Tag 7 festgestellt werden.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Die Quantifizierung der Ki67- positiven Zellen ergab hohe Proteinlevel während der ersten 15 Tage, mit einer leichten signifikanten Abnahme von Tag 0 auf Tag 7. (→ Abbildung 39)

3.2.3.2 Quantifizierung der Verteilung in der IGCL

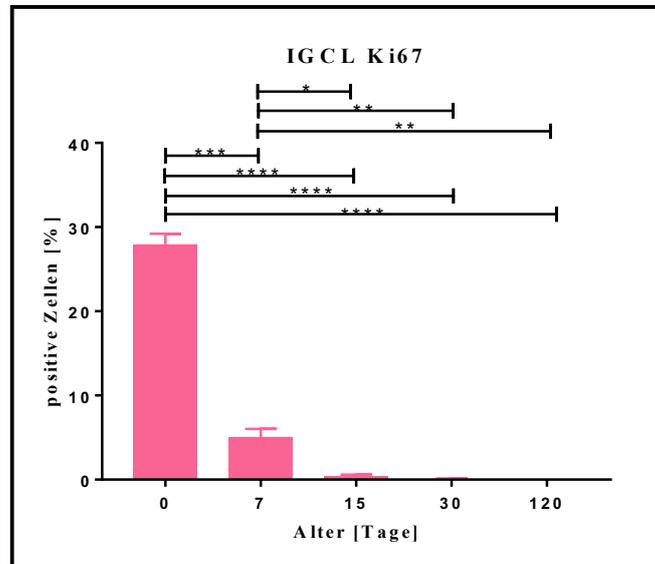


Abb. 40: Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen während der Entwicklung der IGCL des Zerebellum – Obwohl bei der Geburt noch fast 30% der Zellen in der IGCL positiv sind, sind es an Tag 7 kaum noch 5%. Ab Tag 15 sind fast keine positiven Werte mehr zu messen.

** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

Im Laufe der Entwicklung zeigt sich eine bedeutende signifikante Abnahme der Proteinlevel. Die Werte für Ki67-positive Zellen sinken bereits in den ersten 7 Lebenstagen signifikant und bleiben ab Tag 15 auf einem sehr niedrigem Niveau. (→ Abbildung 40)

3.2.3.3 Quantifizierung der Verteilung in der MCL

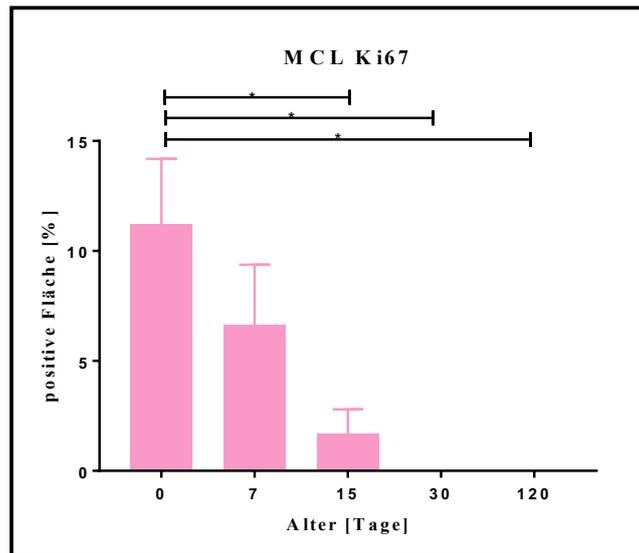


Abb. 41: Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen während der Entwicklung der IGCL des Zerebellum – Die Werte für Ki67 sinken in den ersten 15 Tagen signifikant. Tag 30 und 120 zeigen keine positiven Zellen mehr.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Auch in der MCL zeigt sich eine stetige Abnahme der Werte für Ki67. An Tag 30 und 120 sind keine Ki67-positiven Zellen mehr vorhanden. (→ Abbildung 41)

3.2.3.4 Binarisierung der Verteilung im gesamten zerebellären Kortex

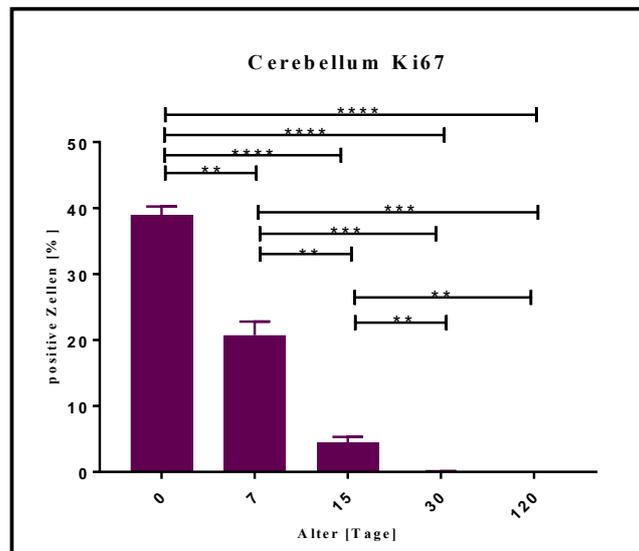


Abb. 42: Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen während der Entwicklung des zerebellären Kortex (ohne Differenzierung der Kleinhirnschichten) - Die Zahl der Ki67-positiven Zellen sinkt stetig im Laufe der Entwicklung.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Betrachtet man die Entwicklung der Zellen im gesamten Kleinhirnkortex, sieht man, parallel zu der Entwicklung in den einzelnen Kleinhirnschichten, eine stetige signifikante Abnahme der Proteinlevel. Mit Tag 30 ist Ki67 kaum noch nachzuweisen. (→ Abbildung 42)

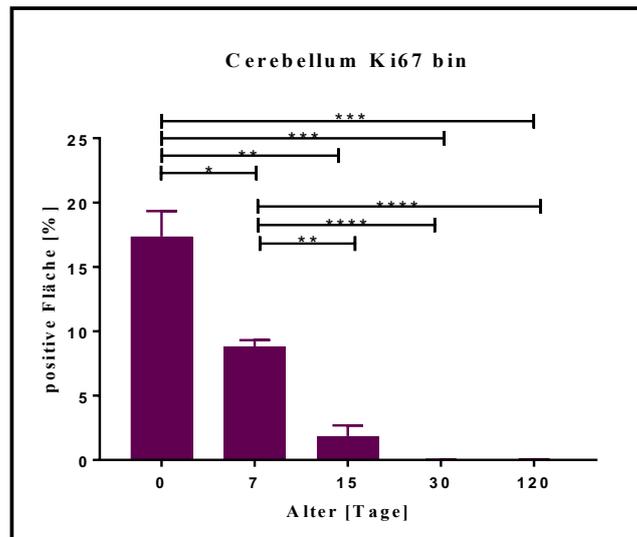


Abb. 43: Binarisierung der Ki67-positiven Fläche während der Entwicklung des zerebellären Kortex (ohne Differenzierung der Kleinhirnschichten) - Die Größe der TDG-positiven Fläche minimiert sich im Laufe der Entwicklung signifikant.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Auch hier überschneiden sich die durch Binarisierung gewonnenen Ergebnisse mit den Quantifizierungsdaten. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Ki67-positiven Fläche im Laufe der Entwicklung mit einem Minimum an den Tagen 30 und 120. (→ Abbildung 43) Sehr schön ist dieser Verlauf außerdem in der Bildreihe in Abbildung 44 zu sehen.

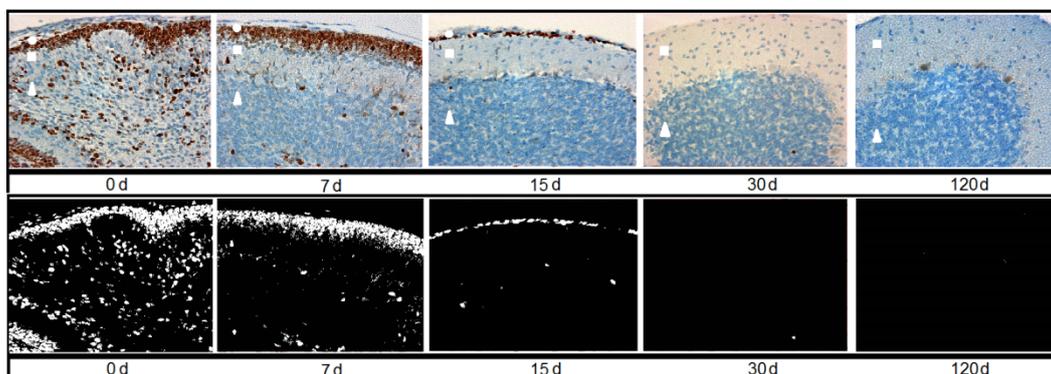


Abb. 44: Vergleich immunhistochemische Färbung/Binarisierung_Ki67 Zerebellum - Durch die digitale Binarisierung wird eine jede braune positive Zelle weiß dargestellt.

20x Vergrößerung, d=Tag-, ● = EGCL, ■ = MCL, ▲ = IGCL

3.3 Korrelationsanalyse relevanter epigenetischer Parameter während der Entwicklung

3.3.1 5hmC - DNMT3a

3.3.1.1 Korrelationsanalyse im frontalen Kortex

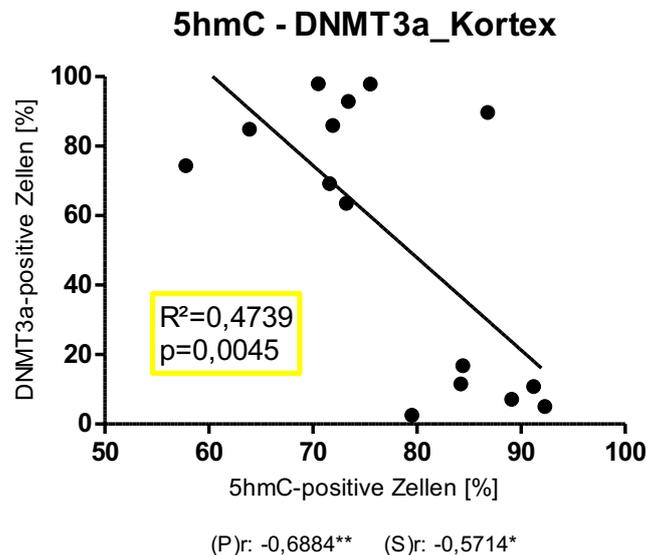


Abb. 45: Korrelationsanalyse 5hmC/DNMT3a im frontalen Kortex - Es konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen der 5hmC-Menge und den DNMT3a-positiven Zellen festgestellt werden.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Die Korrelationsanalyse der durch Immunhistochemie erworbenen Daten über DNMT3a und 5hmC ergibt eine signifikante negative Korrelation der Werte (→ Abbildung 45). Große Mengen an DNMT3a in den frühen Entwicklungstagen gehen mit geringen Mengen an 5hmC einher. Gegen Ende der Entwicklung dreht sich der Spieß um, die DNMT3a-positiven Level sinken und die 5hmC-positiven Level steigen an.

3.3.1.2 Korrelationsanalyse in der EGCL

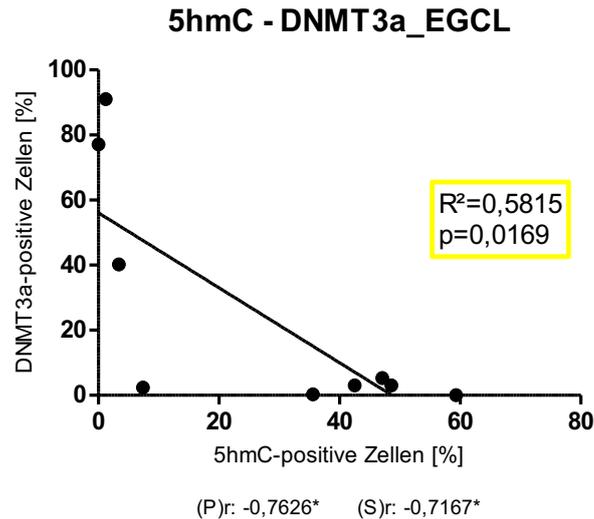


Abb. 46: Korrelationsanalyse 5hmC/DNMT3a in der EGCL des Zerebellum - Es konnte auch hier eine signifikante negative Korrelation zwischen der 5hmC-Menge und den DNMT3a-positiven Zellen festgestellt werden.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001

Die Korrelation von DNMT3a positiven Zellen und 5hmC positiven Zellen über die Zeit zeigt einen negativen signifikanten Wert. (→ Abbildung 46)

3.3.1.3 Korrelationsanalyse in der IGCL

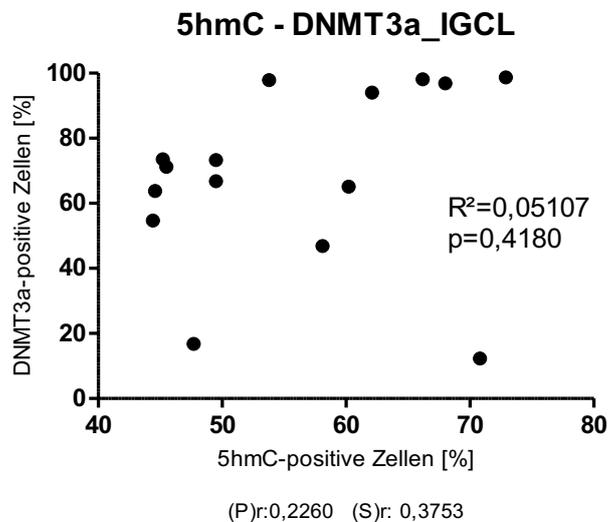


Abb. 47: Korrelationsanalyse 5hmC/DNMT3a in der IGCL des Zerebellum - Es konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001

Im Gegenteil zur EGCL, konnte in der IGCL keine konstante Ab- bzw. Zunahme der Proteinlevel festgestellt werden. Es lässt sich deswegen auch keine signifikante Korrelation in der IGCL beschreiben. (→ Abbildung 47)

3.3.1.4 Korrelationsanalyse in der MCL

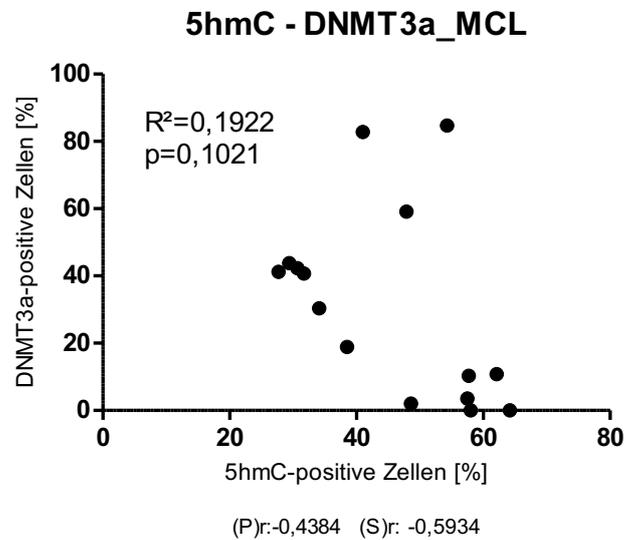


Abb. 48: Korrelationsanalyse 5hmC/DNMT3a in der MCL des Zerebellum - Auch die MCL zeigt keine signifikante Korrelation.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Ein ähnliches Bild wie die IGCL zeigt auch die MCL. Eine negative Korrelation ist zu erahnen, konnte aber nicht statistisch bestätigt werden. (→ Abbildung 48)

3.3.1.5 Korrelationsanalyse im gesamten zerebellären Kortex

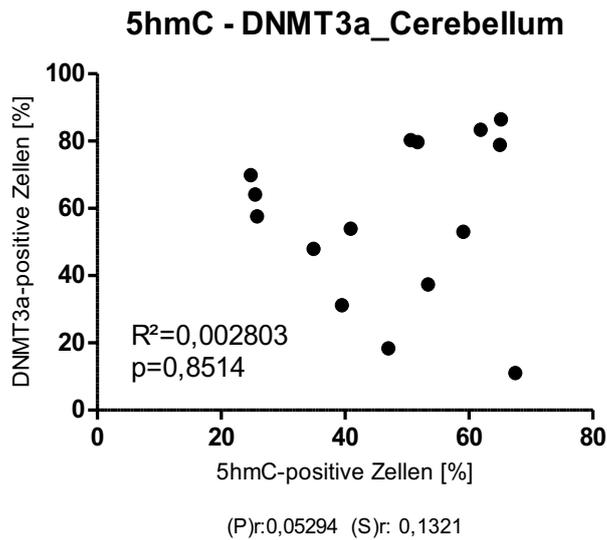


Abb. 49: Korrelationsanalyse 5hmC/DNMT3a im zerebellären Kortex ohne Differenzierung der einzelnen Schichten - Es konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden.
*R*²=Bestimmtheitsmaß;
p=Signifikanzwert (beide bezogen auf (*P*)*r*),
(*P*)*r*=Korrelationskoeffizient nach Pearson,
(*S*)*r*=Korrelationskoeffizient nach Spearman, **p*<0,05;
p*<0,01; *p*<0,001;
*****p*<0,0001

Mit diesen Werten folgt die Analyse der Korrelation zwischen 5hmC und DNMT3a im zerebellären Kortex dem Bild der IGCL. Es lässt sich keine signifikante Korrelation der beiden Parameter feststellen. (→ Abbildung 49)

3.3.2 5hmC - TDG

3.3.2.1 Korrelationsanalyse im frontalen Kortex

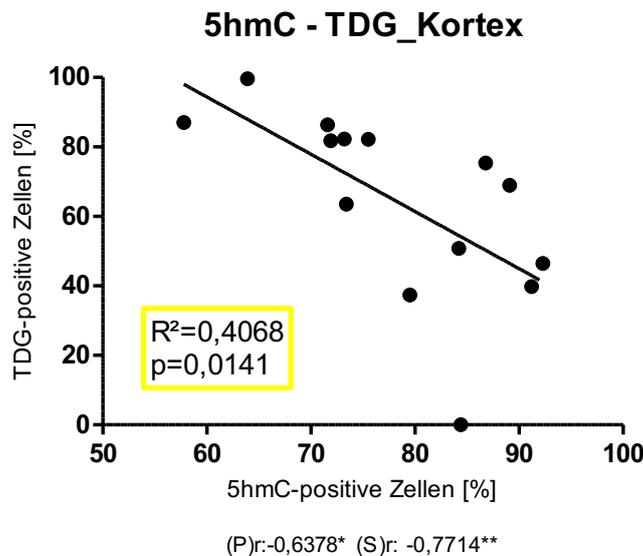


Abb. 50: Korrelationsanalyse 5hmC/TDG im frontalen Kortex - Wie DNMT3a, zeigt auch die Analyse zwischen 5hmC und TDG eine signifikante negative Korrelation

*R*²=Bestimmtheitsmaß; *p*=Signifikanzwert (beide bezogen auf (*P*)*r*), (*P*)*r*=Korrelationskoeffizient nach Pearson,
(*S*)*r*=Korrelationskoeffizient nach Spearman, **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001; *****p*<0,0001

TDG zeigt im Kortex, wie auch DNMT3a, eine signifikante negative Korrelation mit 5hmC. Hohe Werte für TDG gehen mit niedrigen Werten für 5hmC einher und umgekehrt. (→ Abbildung 50)

3.3.2.2 Korrelationsanalyse in der EGCL

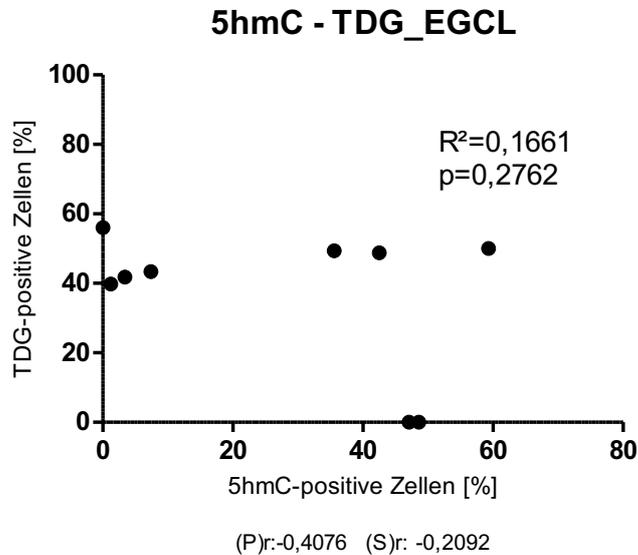


Abb. 51: Korrelationsanalyse 5hmC/TDG in der EGCL des Zerebellum - TDG und 5hmC korrelieren nicht miteinander.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

Die Korrelationsanalyse von TDG und 5hmC ergibt keine signifikante Korrelation. (→ Abbildung 51)

3.3.2.3 Korrelationsanalyse in der IGCL

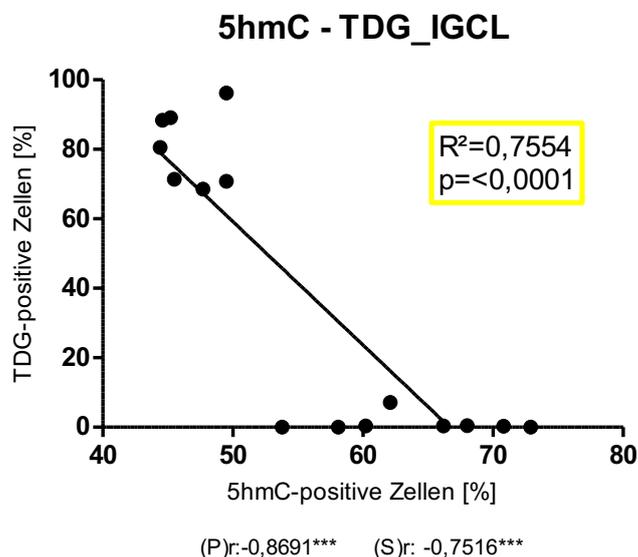


Abb. 52: Korrelationsanalyse 5hmC/TDG in der IGCL des Zerebellum - In der IGCL lässt sich mit $p<0,0001$ eine signifikante negative Korrelation zwischen 5hmC und TDG nachweisen.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

Konträr zu der Analyse von DNMT3a und 5hmC lässt sich in der IGCL eine signifikante negative Korrelation zwischen TDG und 5hmC feststellen. Hohe Werte für TDG in den frühen Entwicklungstagen gehen mit niedrigen 5hmC-Werten einher. Mit Ende der Entwicklung erreicht 5hmC sein Maximum, wohingegen die TDG-positiven Proteinlevel sinken. (→ Abbildung 52)

3.3.2.4 Korrelationsanalyse in der MCL

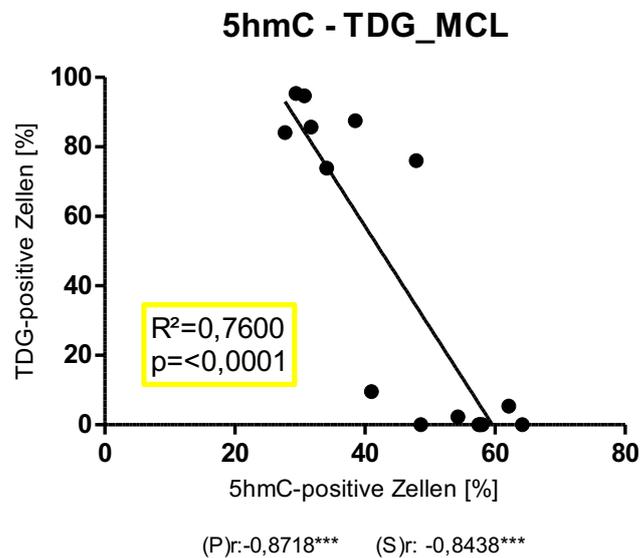


Abb. 53: Korrelationsanalyse 5hmC/TDG in der MCL des Zerebellum - Man sieht eine eindeutige negative Korrelation der beiden untersuchten Moleküle.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001

Die MCL zeigt wie die IGCL eine signifikante negative Korrelation im Vergleich TDG/5hmC. (→ Abbildung 53)

3.3.2.5 Korrelationsanalyse im gesamten zerebellären Kortex

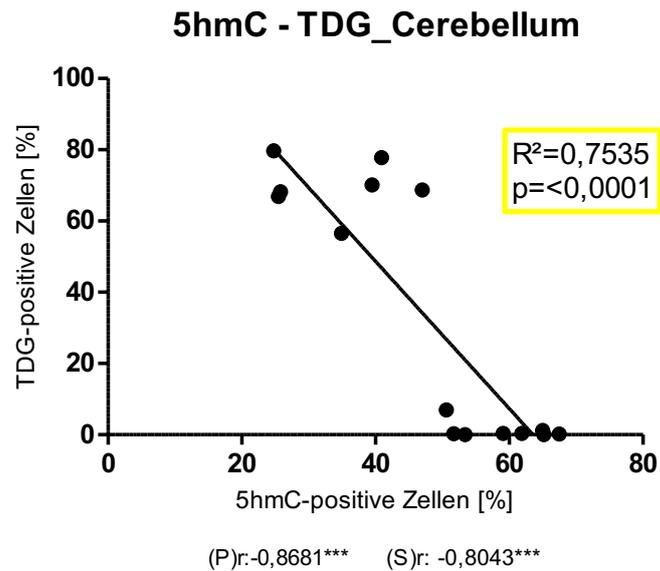


Abb. 54: Korrelationsanalyse 5hmC/TDG im zerebellären Kortex ohne Differenzierung der einzelnen Schichten - 5hmC und TDG korrelieren hier signifikant negative miteinander.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001

Wiederum ähneln sich die Ergebnisse der IGCL und die Analyse des zerebellären Kortex stark. Es konnte auch hier eine signifikante negative Korrelation festgestellt werden. (→ Abbildung 54)

3.3.3 5hmC - Ki67

3.3.3.1 Korrelationsanalyse im frontalen Kortex

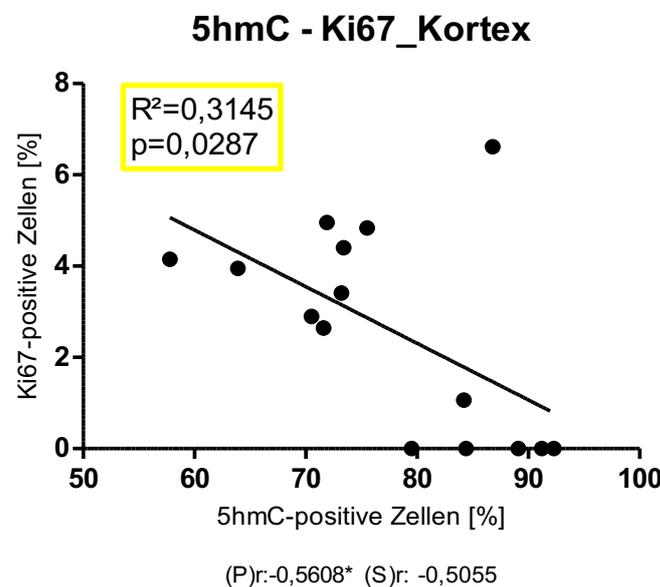


Abb. 55: Korrelationsanalyse 5hmC/Ki67 im frontalen Kortex – Der

Korrelationskoeffizient nach Pearson ergibt mit p <0,05 einen signifikanten Zusammenhang zwischen 5hmC und Ki67. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman bestätigt diese Signifikanz nicht.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert; inkl. linearer Regression, (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001

Wie bereits gezeigt, sinken die Proteinlevel des Proliferationsmarkers Ki67 im Laufe der Entwicklung (→ 3.1.3/3.2.3). Die Werte für 5hmC sind mit vollendeter Entwicklung am höchsten. Deswegen ist hier eine negative Korrelation realistisch. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestätigt diese signifikant mit $p < 0,05$, der Korrelationskoeffizient nach Spearman allerdings nicht. (→ Abbildung 55)

3.3.3.2 Korrelationsanalyse in der EGCL

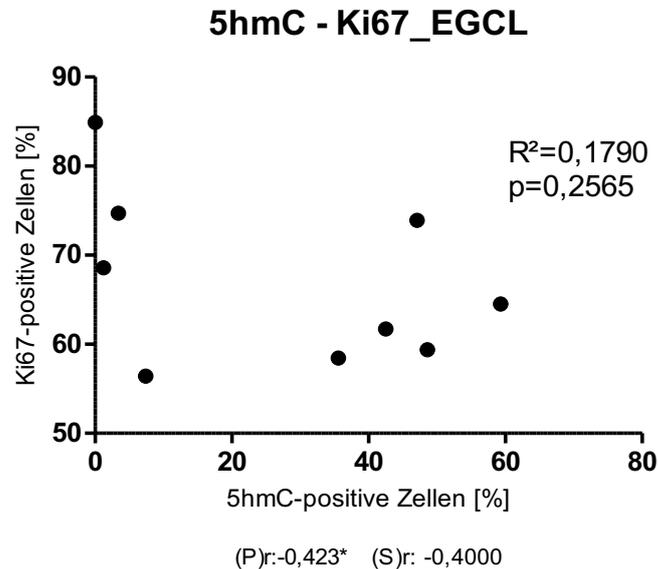


Abb. 56: Korrelationsanalyse 5hmC/Ki67 in der EGCL des Zerebellum - Es konnte keine Korrelation zwischen Ki67 und 5hmC bestätigt werden.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Aufgrund der stets hohen Werte für Ki67 in der EGCL, konnte trotz der signifikanten Zunahme von 5hmC in der EGCL keine signifikante Korrelation der beiden Moleküle festgestellt werden. (→ Abbildung 56)

3.3.3.3 Korrelationsanalyse in der IGCL

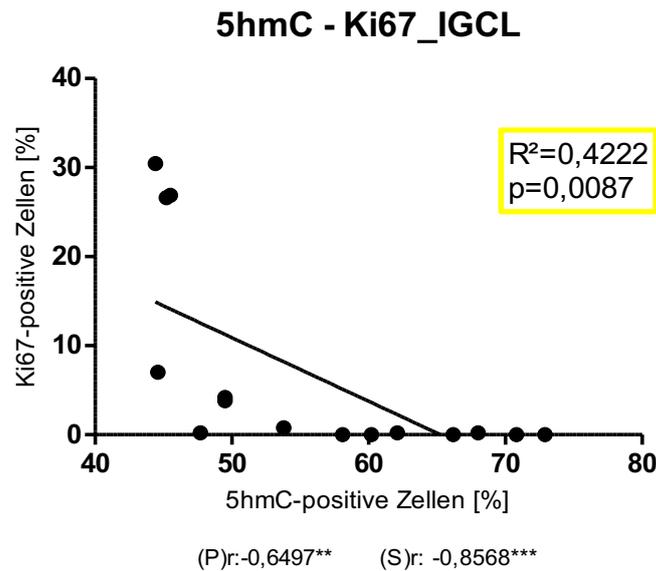


Abb. 57: Korrelationsanalyse 5hmC/Ki67 in der IGCL des Zerebellum - Hier zeigt sich eine eindeutige signifikante negative Korrelation zwischen Ki67 und 5hmC.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001

Analysiert man die Mengen an 5hmC/Ki67-positiven Zellen im Laufe der Entwicklung in der IGCL, erhält man mit p <0,01 eine signifikante negative Korrelation. (→ Abbildung 57)

3.3.3.4 Korrelationsanalyse in der MCL

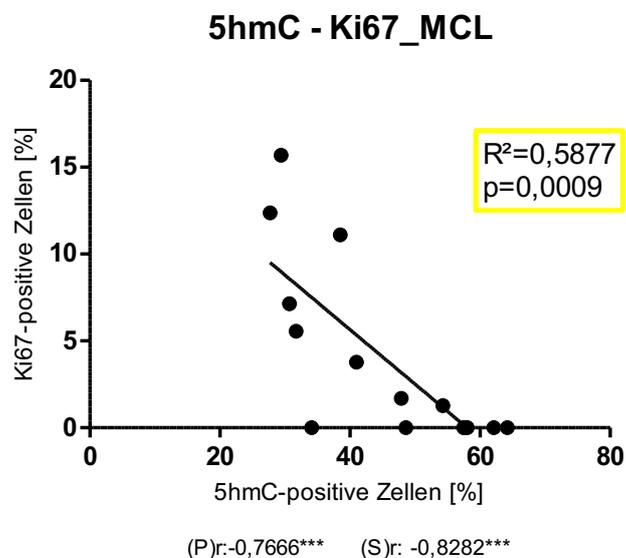


Abb. 58: Korrelationsanalyse 5hmC/Ki67 in der MCL des Zerebellum - Auch hier sieht man eine eindeutige signifikante negative Korrelation zwischen Ki67 und 5hmC.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001

Ebenso in der MCL lässt sich für den Bezug 5hmC/Ki67 eine signifikante negative Korrelation berechnen. (→ Abbildung 58)

3.3.3.5 Korrelationsanalyse im gesamten zerebellären Kortex

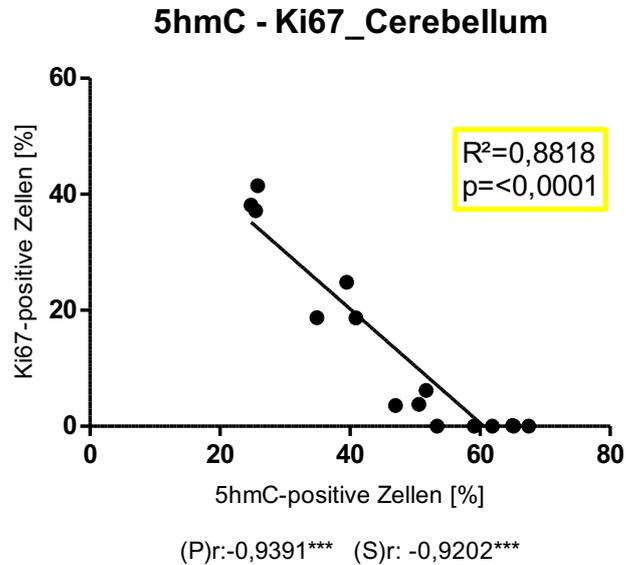


Abb. 59: Korrelationsanalyse 5hmC/Ki67 im zerebellären Kortex ohne Differenzierung der einzelnen Schichten - Eine eindeutige signifikante negative Korrelation zwischen Ki67 und 5hmC konnte nachgewiesen werden.

R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001

Wie auch in der IGCL und MCL zeigt der zerebelläre Kortex, ohne Unterscheidung der einzelnen Zellschichten, eine signifikante negative Korrelation zwischen 5hmC und Ki67. (→ Abbildung 59)

Zusammenfassend lässt sich eine regional abhängige Korrelation zwischen 5hmC und den untersuchten Markern im murinen Gehirn erkennen.

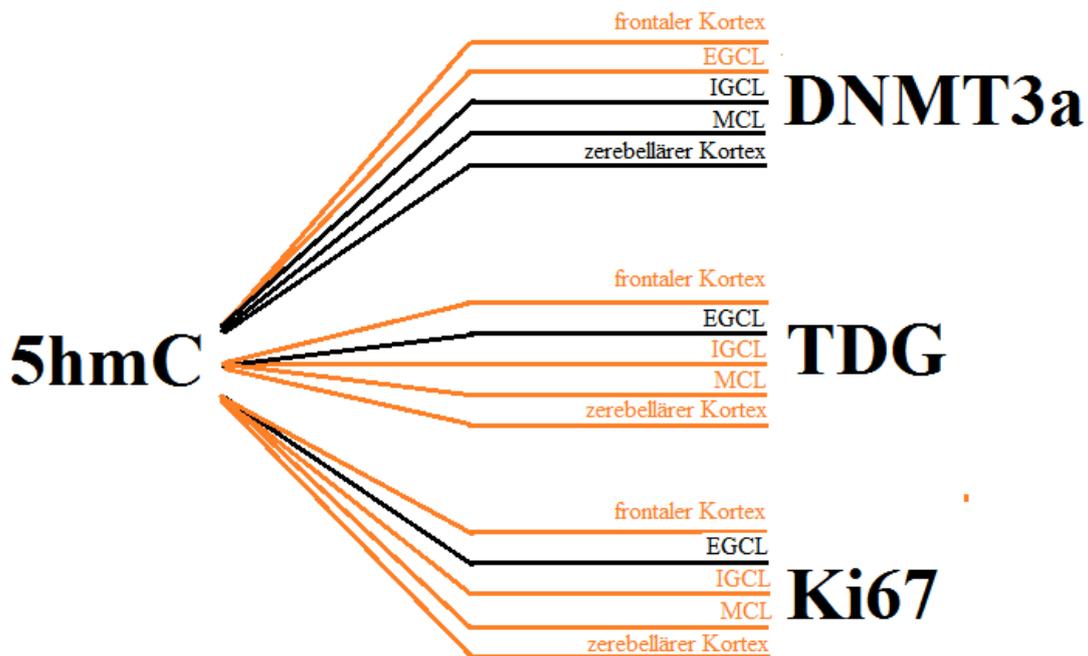


Abb. 60: Farblich gekennzeichnetes Schema der Beziehungen nach Pearson zwischen 5hmC und DNMT3a/TDG/Ki67 - Insgesamt überwiegt die orangene Farbe, was bedeutet, dass ein Großteil der untersuchten Moleküle signifikant korreliert. Besonders auffällig ist dieser Zusammenhang mit TDG und Ki67. 5hmC und DNMT3a korrelieren nur im frontalen Kortex und in der EGCL signifikant miteinander.
orange = signifikante Korrelation; schwarz = es konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden

Obwohl beide Korrelationskoeffizienten keinen kausalen Zusammenhang zweier Untersuchungsobjekte bestätigen, liegt aufgrund der häufigen signifikanten Werte der Koeffizienten zwischen 5hmC und verschiedenen epigenetischen Markern ein Bezug zueinander nahe.

Abbildung 60 gibt diese Häufigkeit der Beziehungen nach Pearson mit Hilfe eines Farbschemas wieder. Eine farbige Verbindung steht für eine signifikante Korrelation der beiden Moleküle. Die Anzahl der farbigen Koppelungen überwiegt.

3.3.4 Ki67 - DNMT3a

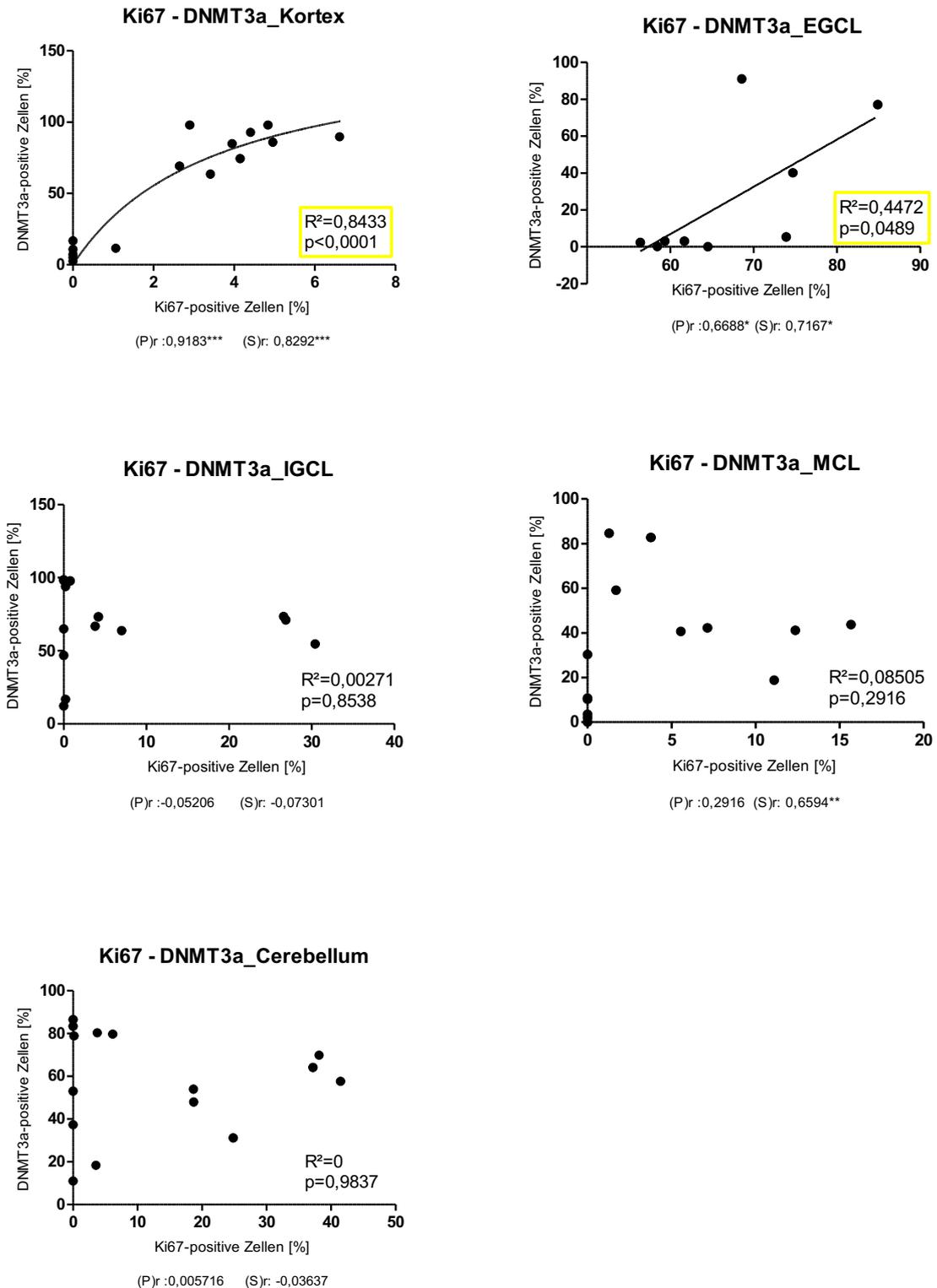


Abb. 61: Übersicht der Beziehung zwischen dem Proliferationsmarker Ki67 und DNMT3a - Nur im frontalen Kortex und in der EGCL lässt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Ki67 und DNMT3a feststellen. Die IGCL und der vereinte zerebellare Kortex zeigen keinen Zusammenhang zwischen den untersuchten Molekülen. Die MCL zeigt einen nicht signifikanten P(r), aber einen signifikanten positiven (P)s. R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

3.3.5 Ki67 - TDG

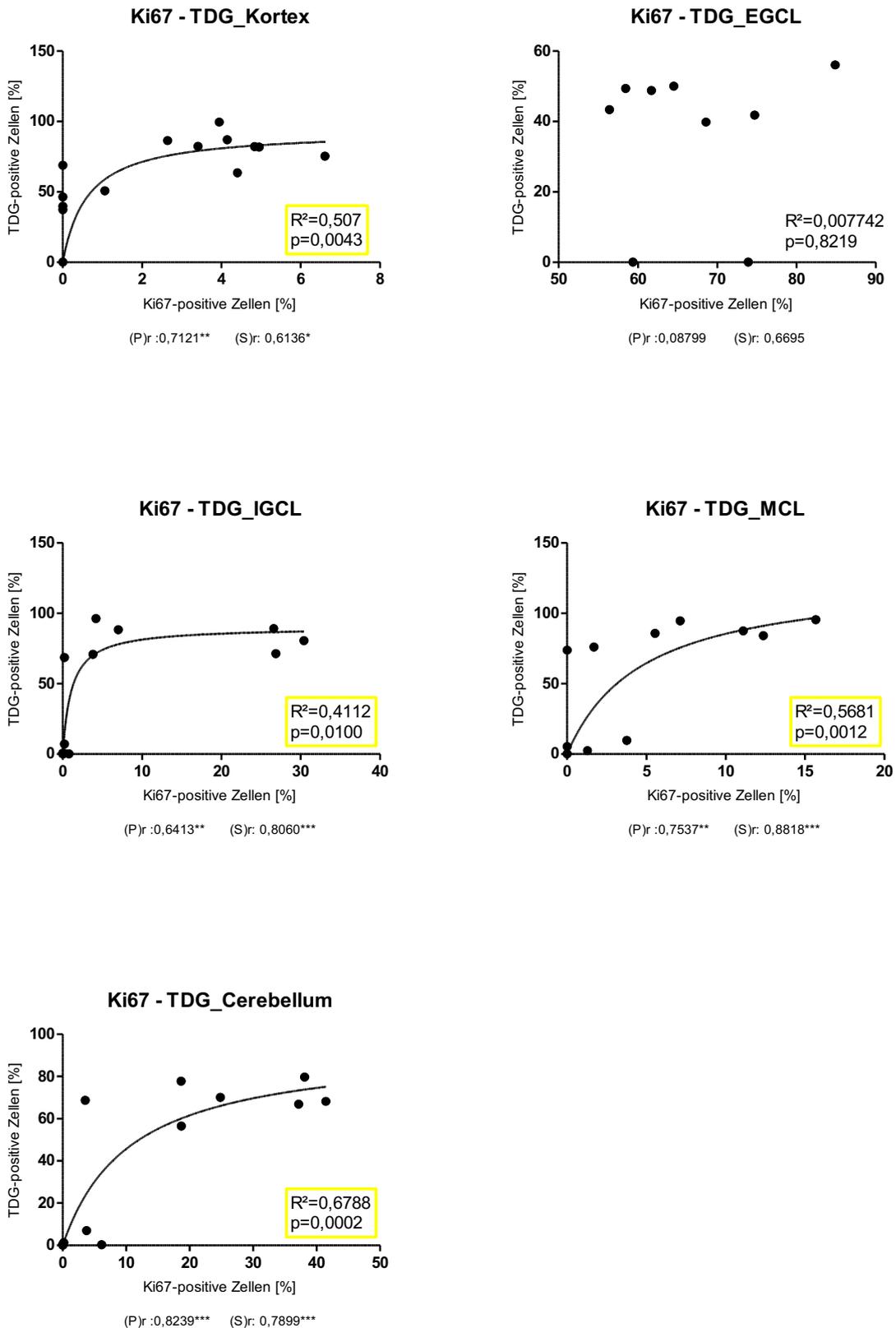


Abb. 62: Übersicht der Beziehung zwischen dem Proliferationsmarker Ki67 und TDG - Alle untersuchten Gehirnregionen, bis auf die EGCL, zeigen eine signifikante Korrelation zwischen Ki67 und TDG. R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

Um die Expression von DNMT3a und TDG mit der Proliferation in Verbindung zu bringen wurde eine Korrelationsanalyse der erwähnten Marker (DNMT3a/TDG und Ki67) in den Regionen frontaler Kortex, EGCL, IGCL, MCL und im vereinten zerebellären Kortex durchgeführt. (→ Abbildung 61+62)

Entgegen einer vermuteten positiven Korrelation für DNMT3a/Ki67 in allen Schichten, konnte diese nach Pearson nur im frontalen Kortex und in der EGCL nachgewiesen werden.

Dabei ist auffällig, dass diese Korrelation im frontalen Kortex mit einem p-Wert kleiner 0,0001 eindeutig signifikant ist. Das Zerebellum zeigt keine Signifikanz, bis auf die EGCL, diese ist mit einem p-Wert von 0,0489 gerade noch signifikant. Außerdem berechnet der Korrelationskoeffizient nach Spearman für die MCL einen signifikant positiven Wert.

Die fehlende Signifikanz im Cerebellum liegt vermutlich an den hohen Level von DNMT3a in der IGCL (→ 3.2.1.2) an Tag 30 und 120, während die Ki67-Level zu diesem Zeitpunkt bereits an die Nachweisbarkeitsgrenze gesunken sind (→ 3.2.3.2). Im Kortex hingegen sinken die Proteinlevel für DNMT3a (→ 3.1.1) zusammen mit Ki67 ab Tag 15. (→ Abbildung 61)

Es konnte eine Verbindung zwischen Ki67 und TDG festgestellt werden. Die Korrelationsanalyse ergab in nahezu jeder Schicht eine eindeutige signifikante positive Korrelation zwischen Ki67 und TDG. Nur in der EGCL war das Ergebnis nicht signifikant. (→ Abbildung 62)

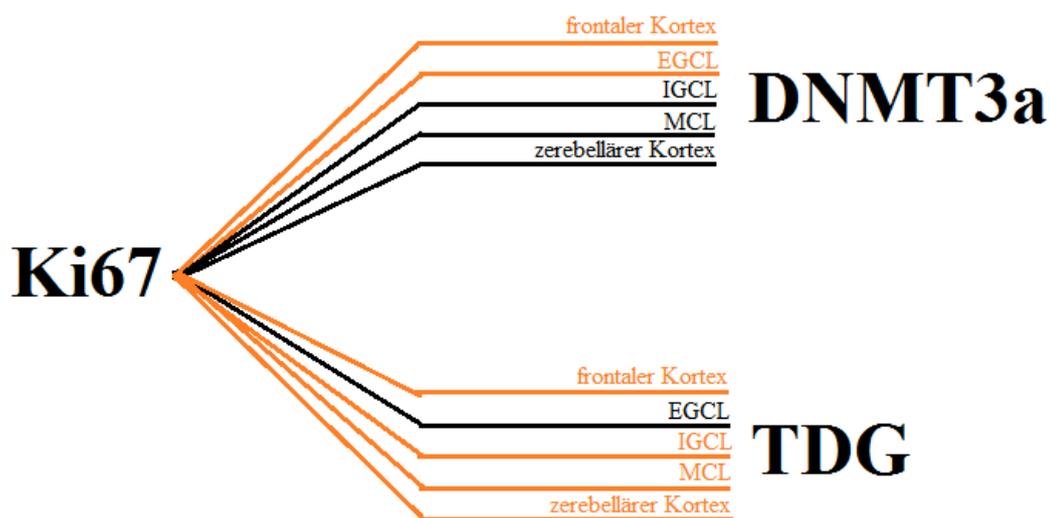


Abb. 63: Farblich gekennzeichnetes Schema der Beziehungen nach Pearson zwischen Ki67 und DNMT3a/TDG - Ki67 zeigt in jeder untersuchten Schicht, außer in der EGCL, eine signifikante Korrelation mit TDG. Mit DNMT3a zeigt sich allerdings nur in der EGCL und im frontalen Kortex ein signifikanter Zusammenhang.

orange = signifikante Korrelation; schwarz = es konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass eindeutig ein positiver (fraglich ist ob ursächlicher) Zusammenhang zwischen Ki67 und TDG besteht. Die TDG-Proteinexpression agiert also parallel zur Zellproliferation. Dieser Zusammenhang lässt sich nicht direkt auf das Verhältnis Ki67/DNMT3a übertragen, was vor allem an der abweichenden Expression von DNMT3a gegen Ende der Entwicklung der IGCL liegt. (→ Abbildung 63)

3.3.6 Binarisierung - Quantifizierung

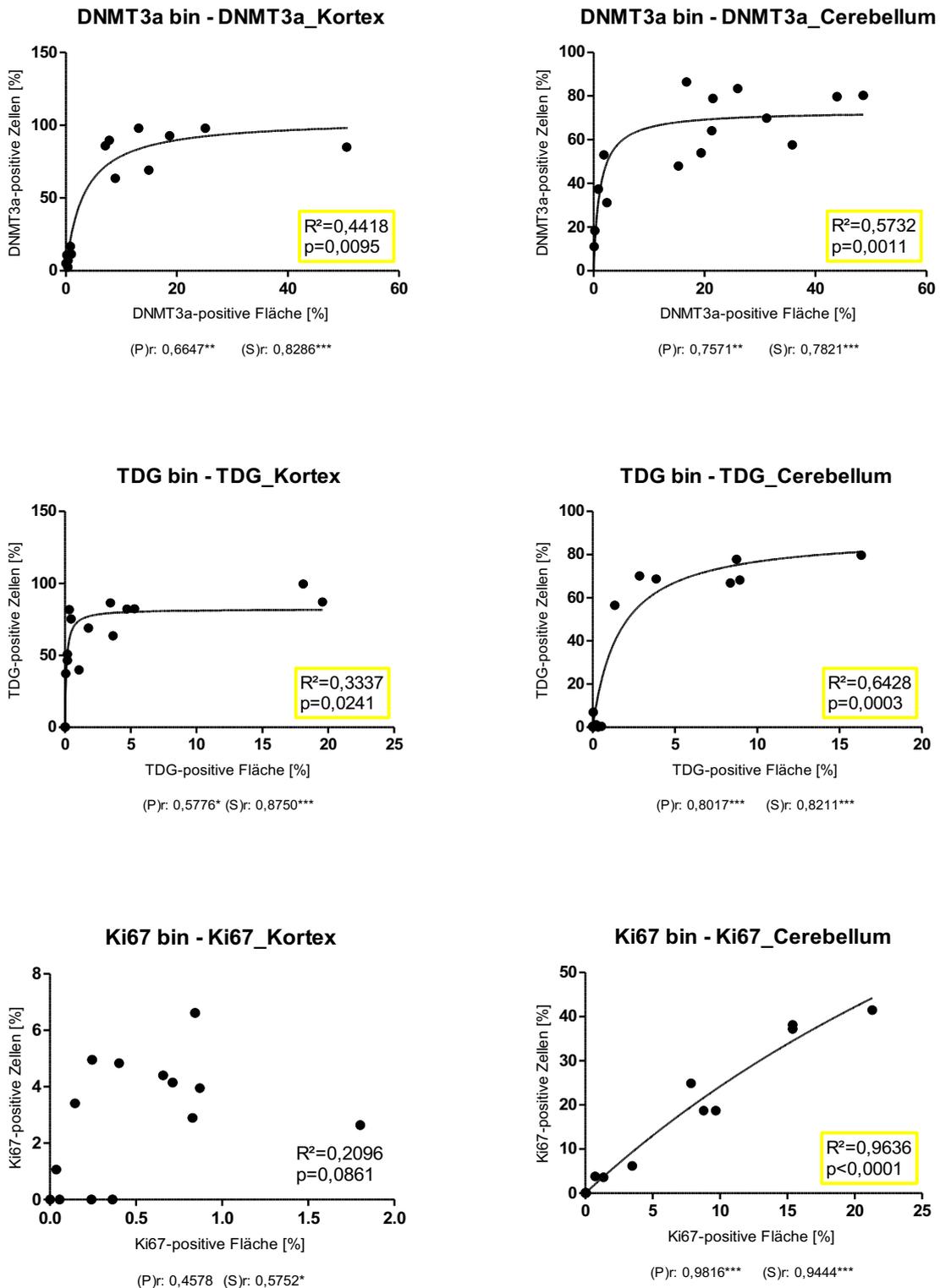


Abb. 64: Übersicht der Beziehung zwischen der Quantifizierung von DNMT3a/TDG/Ki67 und deren Binarisierung - Bis auf Ki67_Kortex zeigen alle anderen Analysen die erwartete deutliche positive Signifikanz. Spearman errechnet auch für Ki67 im Kortex einen signifikanten Zusammenhang
 R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert (beide bezogen auf (P)r), (P)r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, (S)r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

Zur Bestätigung der Binarisierungsmethode wurde eine Korrelationsanalyse der quantifizierten Expressionsergebnisse mit der jeweiligen durch die Binarisierung erhaltenen Verteilung durchgeführt. Hier sollte natürlich eine signifikante positive Korrelation zu beobachten sein. Erwartungsgemäß konnte diese positive Korrelation auch eindeutig nachgewiesen werden. Nur die Analyse von Ki67 im Kortex ergab nach Pearson knapp kein signifikantes Ergebnis. (→ Abbildung 64)

3.4 Bestimmung der Expressionsprofile im Regionenvergleich

Um einen exakteren Einblick in Entwicklungsunterschiede zwischen den Regionen Frontalkortex und Zerebellum (EGCL, IGCL, MCL) zu erhalten, wurden die durch Immunhistochemie gewonnenen Daten ein weiteres Mal herangezogen. Dieses Mal wurden allerdings nicht die Expressionslevel der bestimmten Proteine in unterschiedlichen Entwicklungsstadien miteinander verglichen, sondern die Expressionslevel zu einem bestimmten Punkt während der Reifung in den unterschiedlichen Gehirnregionen.

Der Begriff „Kortex“ beschreibt in den folgenden Abbildungen den frontalen Kortex des Telencephalons.

3.4.1 Proteinexpression von DNMT3a

3.4.1.1 Quantifizierung der Verteilung am Tag 0

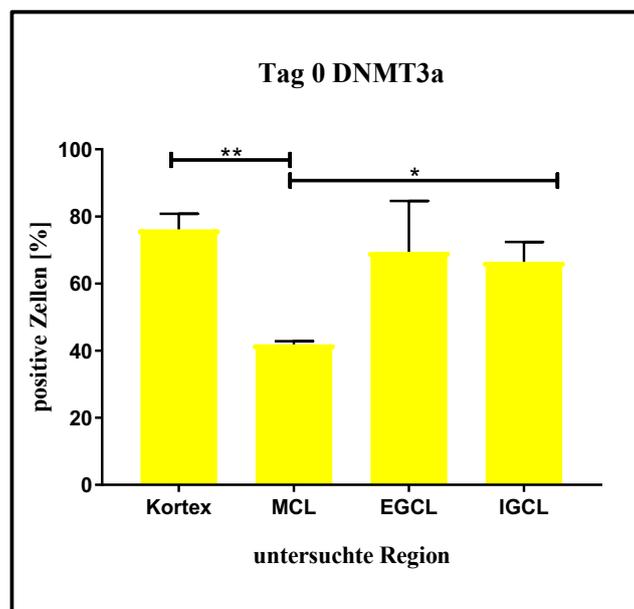


Abb. 65: Vergleich der DNMT3a-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL, EGCL und IGCL am Tag 0 pn - Am Tag 0 pn gleichen sich die Proteinlevel im Kortex, der EGCL und der IGCL. Nur die MCL weist signifikant geringere Mengen DNMT3a auf.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Am Tag der Geburt unterscheiden sich die DNMT3a-positiven Proteinlevel wenig. Nur in der MCL zeigt sich ein signifikant geringeres Niveau. (→ Abbildung 65)

3.4.1.2 Quantifizierung der Verteilung am Tag 7

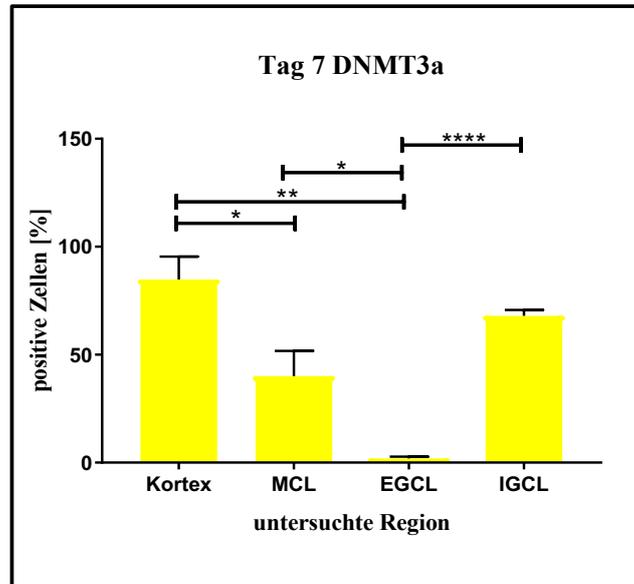


Abb. 66.: Vergleich der DNMT3a-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL, EGCL und IGCL am Tag 7 pn - Am Tag 7 pn gleichen sich die Proteinlevel im Kortex und der IGCL, während die MCL und die EGCL ein signifikant geringeres Niveau zeigen.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Am Tag 7 gleichen sich die Daten von Kortex und IGCL noch weithin. Ein signifikant geringeres Proteinlevel ist hingegen wieder in der MCL auszumachen. Außerdem weist die EGCL ab Tag 7 kaum noch DNMT3a-positive Zellen auf. (→ Abbildung 66)

3.4.1.3 Quantifizierung der Verteilung am Tag 15

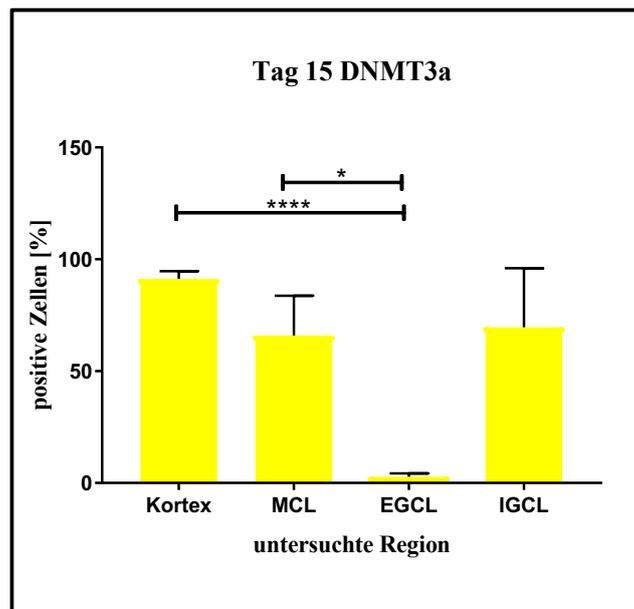


Abb. 67: Vergleich der DNMT3a-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL, EGCL und IGCL am Tag 15 pn - An Tag 15 pn weist nur die EGCL ein signifikant abweichendes Expressionsmuster auf.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Die Quantifizierung der Proteinlevel von Tag 15 ergibt kaum einen Unterschied zu Tag 7. Nach wie vor finden sich hohe Mengen an DNMT3a im Kortex, der MCL und der IGCL. Die EGCL weist kaum positive Zellen auf. Nur der Unterschied zur MCL ist hier nicht mehr signifikant. (→ Abbildung 67)

3.4.1.4 Quantifizierung der Verteilung am Tag 30

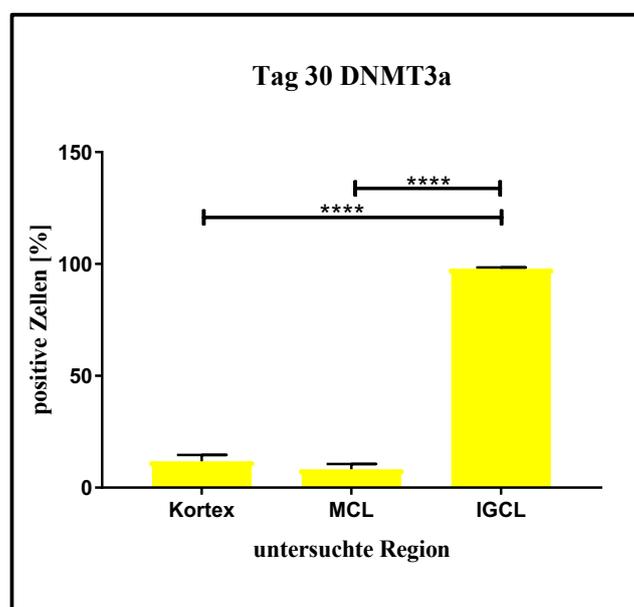


Abb. 68.: Vergleich der DNMT3a-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL und IGCL am Tag 30 pn Die EGCL ist verschwunden, das Niveau in der MCL sowie im Kortex ist stark gesunken und die IGCL präsentiert sich unverändert.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Interessanterweise sinkt die Anzahl DNMT3a-positiver Zellen im Kortex rund um den 30. Tag rasant. Die EGCL ist verschwunden und das Niveau in der MCL ist ebenso stark gesunken wie im Kortex. Nur die IGCL weist nach wie vor hohe DNMT3a-positive Proteinlevel auf. (→ Abbildung 68)

3.4.1.5 Quantifizierung der Verteilung am Tag 120

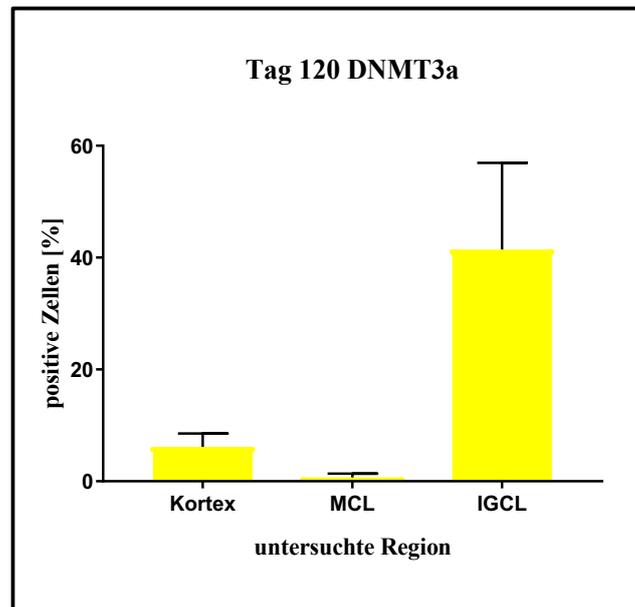


Abb. 69.: Vergleich der DNMT3a-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL und IGCL am Tag 120 pn - Es sind keine Signifikanzen darstellbar. Die IGCL weist nach wie vor viel DNMT3a- positive Zellen auf, der Kortex und die MCL hingegen kaum.

p<0,05; **p<0,01; *p<0,001; ****p<0,0001; ungepaarter t-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

An Tag 120 ist auffallend, dass sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den unterschiedlichen Gehirnregionen feststellen lassen. Deutlich ist aber ein nach wie vor erhöhtes DNMT3a-positives Expressionsniveau in der IGCL und ein sehr niedriges Niveau im Kortex und in der MCL. Aufgrund des großen Standardmessfehlers konnte mit dem t-Test kein einziges Mal ein statistisch bedeutender Unterschied festgestellt werden. (→ Abbildung 69) Der ANOVA-Test ist aber mit $p=0,0375$ signifikant.

3.4.2 Proteinexpression von TDG

3.4.2.1 Quantifizierung der Verteilung am Tag 0

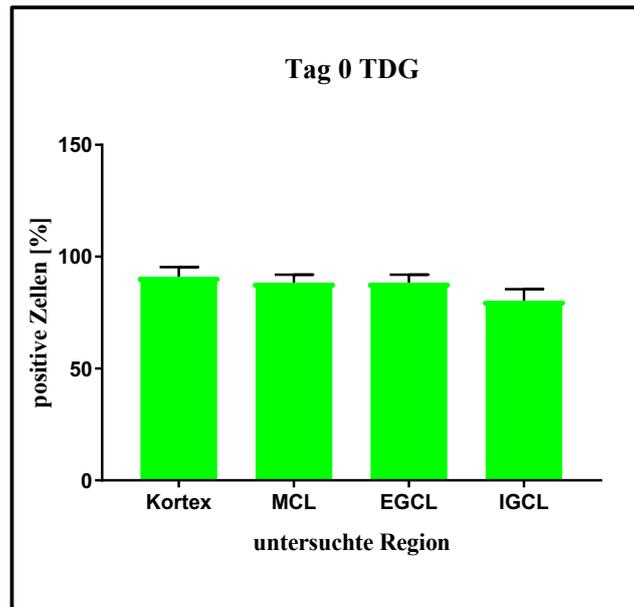


Abb. 70.: Vergleich der TDG-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL, EGCL und IGCL am Tag 0
pn - Es sind keine Signifikanzen darstellbar.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Die Analyse der TDG-positiven Zellen zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gehirnregionen am Tag 0. (→ Abbildung 70)

3.4.2.2 Quantifizierung der Verteilung am Tag 7

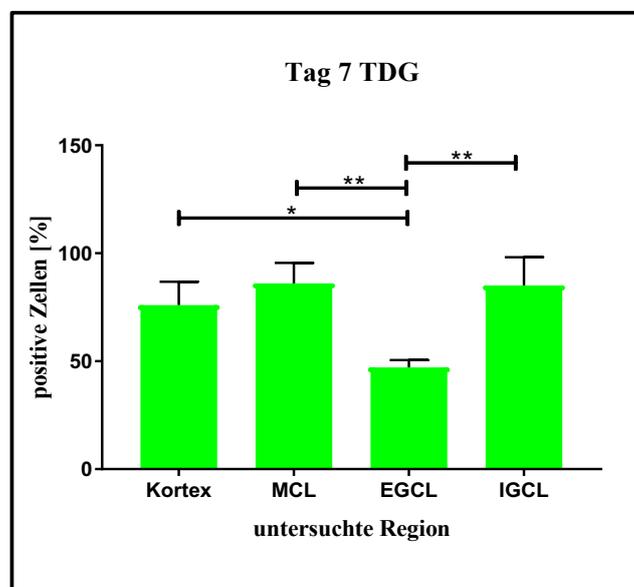


Abb. 71.: Vergleich der TDG-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL, EGCL und IGCL am Tag 7
pn - Einzig die EGCL weist signifikant geringere Mengen an DNMT3a auf, die restlichen Regionen gleichen einander annähernd.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Am Tag 7 weisen fast alle Gehirngebiete noch annähernd gleiche Proteinlevel auf. Nur in der EGCL konnte eine signifikant geringere Menge an TDG festgestellt werden. (→ Abbildung 71)

3.4.2.3 Quantifizierung der Verteilung am Tag 15

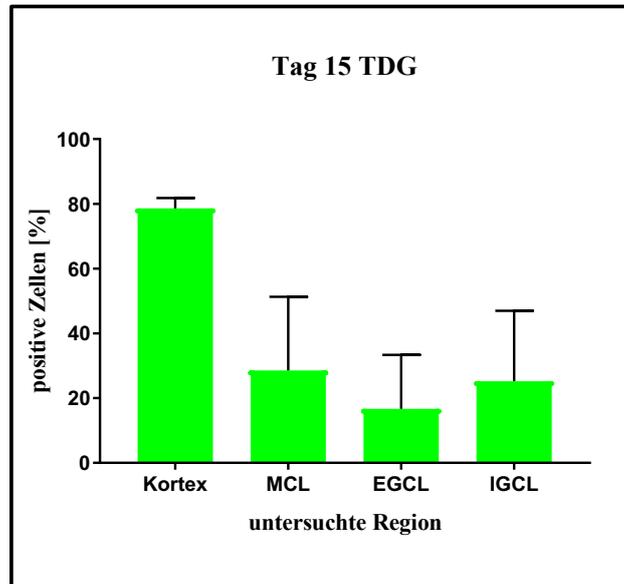


Abb. 72.: Vergleich der TDG- positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL, EGCL und IGCL am Tag 15 pn - Aufgrund der großen SEM in der MCL/EGCL/IGCL lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen.

** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

Am Tag 15 konnten sich keine Signifikanzen feststellen lassen. Nur der Kortex sticht mit einem weiterhin sehr hohen Niveau an TDG-positiven Zellen und geringen SEM heraus. (→ Abbildung 72)

3.4.2.4 Quantifizierung der Verteilung am Tag 30

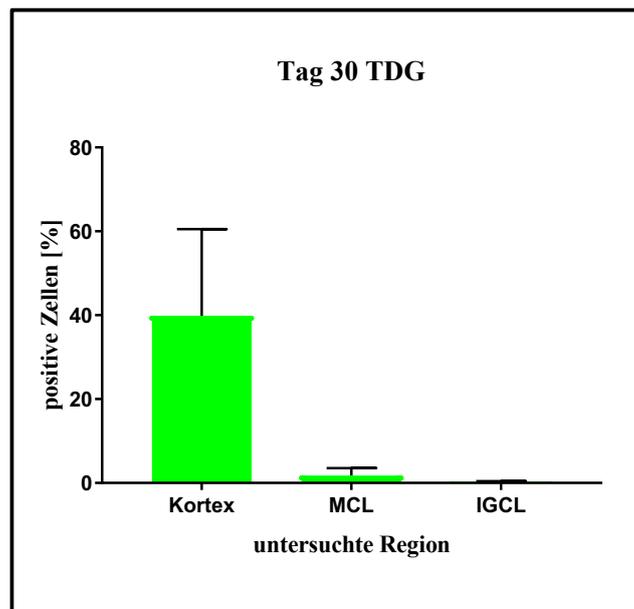


Abb. 73.: Vergleich der TDG-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL und IGCL am Tag 30 pn - Wiederum sticht der Kortex mit fast 40% positiven Zellen heraus. Die Verteilung ist aber nicht signifikant.
** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

Die Analyse der TDG-Level am Tag 30 ergibt ein der DNMT3a-Analyse der gleichen Altersgruppe spiegelverkehrtes Bild mit kaum messbaren Mengen an TDG in der MCL und IGCL und bis zu 40% positiven Zellen im Kortex. Allerdings ist diese Verteilung nicht signifikant, weshalb sie nicht bestätigt werden kann. (→ Abbildung 73)

3.4.2.5 Quantifizierung der Verteilung am Tag 120

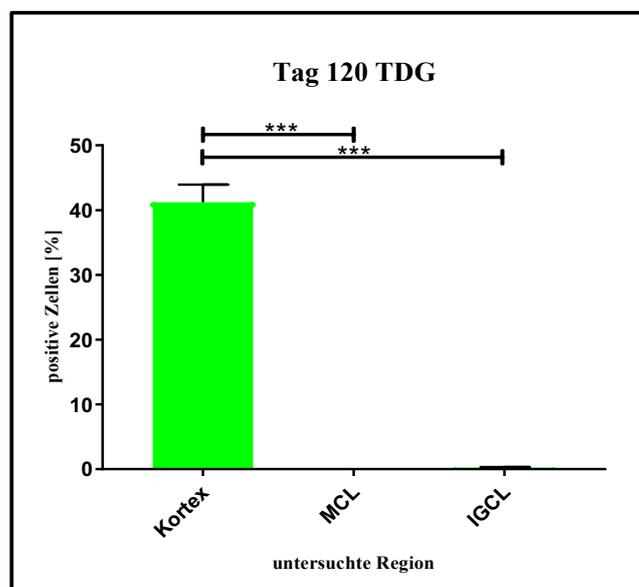


Abb. 74.: Vergleich der TDG-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL und IGCL am Tag 120 pn - Tag 120 zeigt ein klares Bild: TDG wird im Kortex noch stark exprimiert, in der MCL/IGCL dagegen kaum noch.

** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

Ähnlich zu Tag 30, sieht man auch hier eine Verteilung, die darauf schließen lässt, dass TDG im Zerebellum und Kortex nicht immer die gleiche Priorität hat. Während im Kortex noch bis zu 40% der ausgezählten Zellen positiv für TDG sind, sind in der MCL und IGCL kaum noch positive Zellen auszumachen. (→ Abbildung 74)

Im Gegensatz zu Tag 30 ist dieser Unterschied zwischen den Regionen signifikant.

3.4.3 Proteinexpression von Ki67

3.4.3.1 Quantifizierung der Verteilung am Tag 0

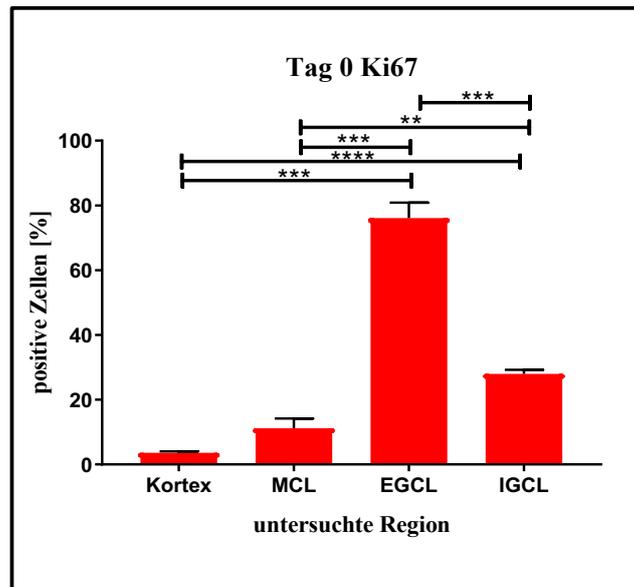


Abb. 75.: Vergleich der Ki67-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL, EGCL und IGCL am Tag 0 - Sowohl die IGCL als auch die EGCL weisen signifikant höhere Ki67-Werte auf als der Kortex bzw. die MCL.

** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

Die Analyse der Ki67-Expression liefert Hinweise auf die Proliferationscharakteristika der unterschiedlichen Gehirnregionen. Am Tag 0 ist ein deutlich erhöhtes Ki67-positives Proteinniveau in der EGCL und der IGCL auszumachen. Im Vergleich zu der MCL und dem Kortex zeigen sich hier signifikant höhere Werte. (→ Abbildung 75)

3.4.3.2 Quantifizierung der Verteilung am Tag 7

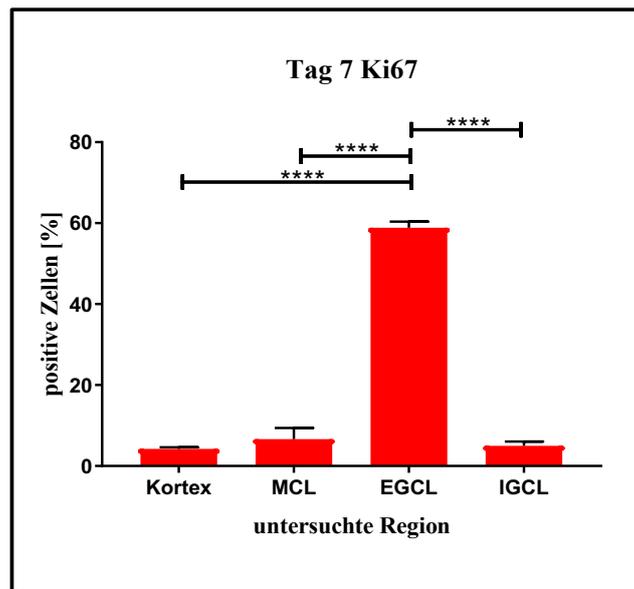


Abb. 76.: Vergleich der Ki67-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL, EGCL und IGCL am Tag 7 pn - Einzig die EGCL weist signifikant höhere Mengen an Ki67 auf, die restlichen Regionen gleichen einander annähernd.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

An Tag 7 sticht die EGCL mit Werten bis zu 60% Ki67-positiver Zellen heraus. Kortex, MCL und IGCL beschreiben annähernd ein gleiches Niveau des Proliferationsmarkers. (→ Abbildung 76)

3.4.3.3 Quantifizierung der Verteilung am Tag 15

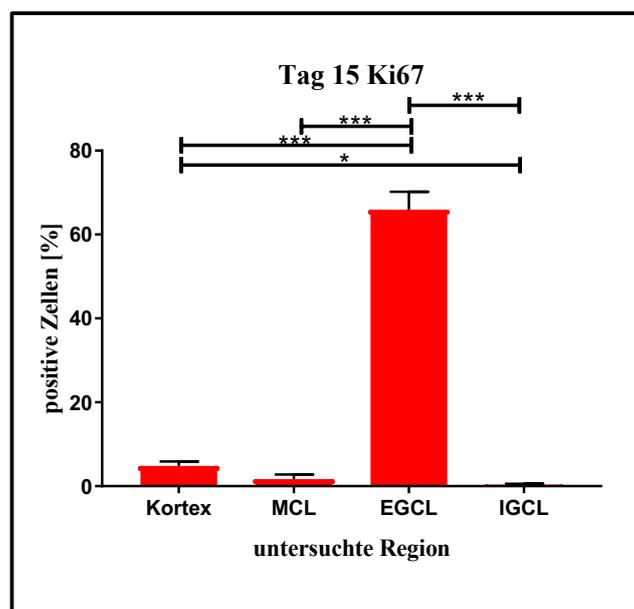


Abb. 77.: Vergleich der Ki67-positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL, EGCL und IGCL am Tag 15 pn - Auch am Tag 15 ist noch ein Großteil der Zellen in der EGCL positiv für Ki67. Kortex und IGCL unterscheiden sich ebenfalls signifikant, im Kortex ist ein höheres Level an Ki67-positiven Zellen auszumachen.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM

Neben der offensichtlichen Dominanz von Ki67 in der EGCL, weist auch der Kortex am Tag 15 signifikant höhere Werte des Proliferationsmarker Ki67 auf als die IGCL. (→ Abbildung 77)

3.4.3.4 Quantifizierung der Verteilung am Tag 30

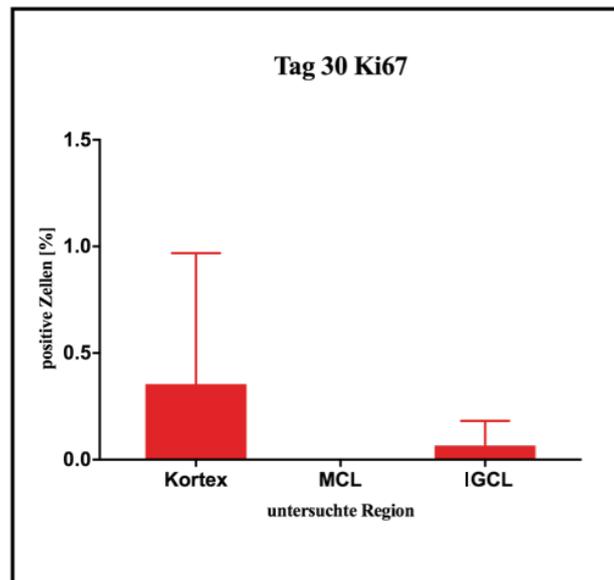


Abb. 78.: Vergleich der Ki67- positiven Proteinlevel zwischen Kortex, MCL und IGCL am Tag 30 pn - Tag 30 zeigt keine signifikanten Unterschiede.

** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM*

Nach Verschwinden der EGCL sinken auch die Ki67-positiven Proteinlevel in den restlichen Gehirnregionen, allerdings bleibt das Gefälle Kortex/IGCL bestehen, wenn auch ohne Signifikanzwert. (→ Abbildung 78)

3.4.3.5 Quantifizierung der Verteilung am Tag 120

An Tag 120pn konnte keine einzige Ki67-positive Zelle mehr in einer der untersuchten Schichten nachgewiesen werden. Die proliferative Entwicklung scheint somit im Kortex, in der IGCL und in der MCL mit Tag 120pn endgültig abgeschlossen zu sein.

3.5 Verifizierung der mRNA Expressionsdaten

Im Rahmen einer Vorgängerstudie wurden die mRNA-Expressionsdaten [P] mehrerer Gene, welche einen Einfluss auf die Methylierung und die Demethylierung während der Entwicklung haben, untersucht. Darunter auch DNMT3a und TDG.

Die dabei erhaltenen Ergebnisse für die mRNA-Produktion sollen hier auf Proteinebene bestätigt werden. Das soll Hinweise auf eventuelle Unterschiede in der mRNA- und Proteinexpression liefern. Die mRNA-Expression sagt nichts über die Anzahl der schlussendlich intakten Proteine des transkribierten Gens aus. Erst die Expressionsanalyse auf Proteinebene gibt Aufschluss über die Anzahl der funktionstüchtigen Moleküle. In beiden Studien wurden die Gehirne der selben Mäuse untersucht.

3.5.1 Expression von DNMT3a

3.5.1.1 Quantifizierung der Verteilung im frontalen Kortex

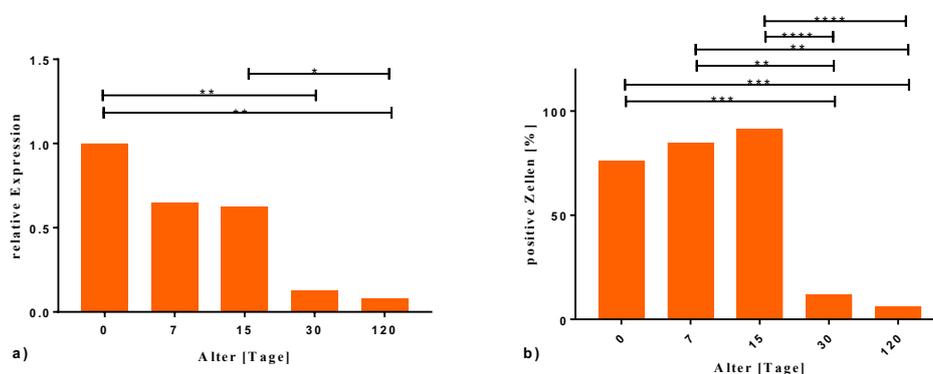


Abb. 79: Gegenüberstellung mRNA-Expression/Proteinexpression_DNMT3a frontaler Kortex – Trotz einiger Ungleichheiten im Verlauf zwischen der mRNA-Expression (a) und der Proteinexpression (b) in den ersten 15 Tagen, lässt sich bei beiden Untersuchungen der charakteristische Abfall der DNMT3a-Level an Tag 30 signifikant nachweisen.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test, dargestellt ist das Mittel

Abbildung 79 zeigt den Verlauf der DNMT3a-Expression während der Entwicklung sowohl auf mRNA-Ebene (→ Abbildung 79a), als auch auf Proteinebene (→ Abbildung 79b). Wie zu erwarten gleichen sich die beiden Ebenen nicht exakt, da vermutlich nicht jede mRNA in ein Protein translatiert wird.

Sowohl die mRNA-Expression, als auch die Proteinexpression fallen auf Tag 30 und auf Tag 120 signifikant. Die beiden Expressionsmuster zeigen ein ähnliches Bild, wenn auch keinen exakt gleichen Verlauf.

Die lineare Regression in Abbildung 80 lässt einen positiven annähernd linearen Zusammenhang vermuten.

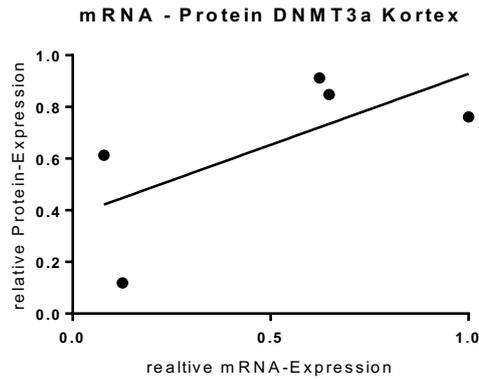


Abb. 80: Lineare Regression der gemittelten Werte der DNMT3a-Expression auf mRNA/Proteinebene im frontalen Kortex - Es lässt sich ein positiver annähernd linearer Zusammenhang vermuten.

3.5.1.2 Quantifizierung der Verteilung im Zerebellum

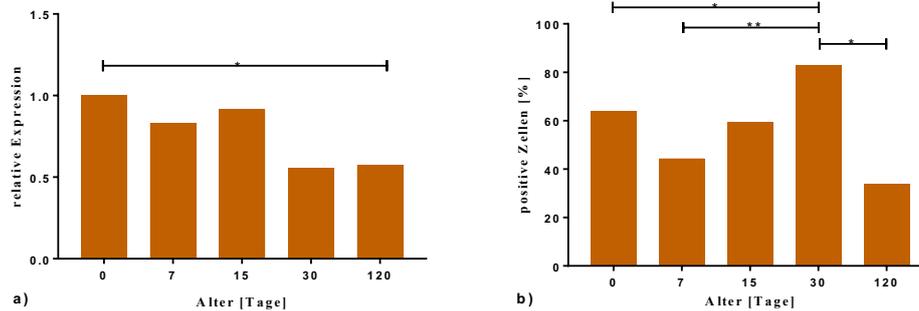


Abb. 81: Gegenüberstellung mRNA-Expression/Proteinexpression_DNMT3a Zerebellum – Beide Verteilungen zeigen mit Tag 120 einen verhältnismäßig niedrigen Stand an DNMT3a-positiven Werten. Auffällig ist die signifikante Zunahme DNMT3a-positiver Zellen in der Proteinanalyse (b) bis Tag 30. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test, dargestellt ist das Mittel

Der Vergleich im Zerebellum zeigt keinen identen Verlauf der beiden Expressionsmuster. Die Proteinexpression nimmt bis Tag 30 im Gegensatz zur mRNA-Expression signifikant zu. Einzig Tag 120 zeigt ein niedriges Expressionsniveau in Abbildung 81a und 81b. Die lineare Regression zeigt daher auch keinen linearen Zusammenhang. (→ Abbildung 82)

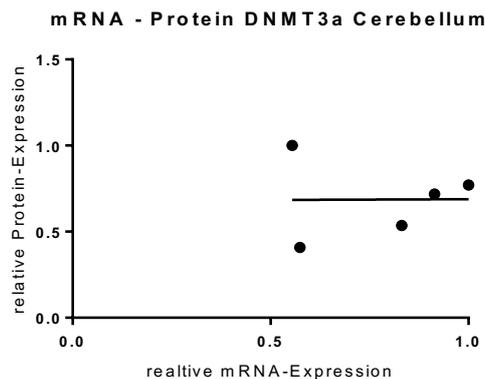


Abb. 82: Lineare Regression der gemittelten Werte der DNMT3a-Expression auf mRNA/Proteinebene im Zerebellum - Es lässt sich kein sinnvoller Zusammenhang erkennen.

3.5.2 Expression von TDG

3.5.2.1 Quantifizierung der Verteilung im frontalen Kortex

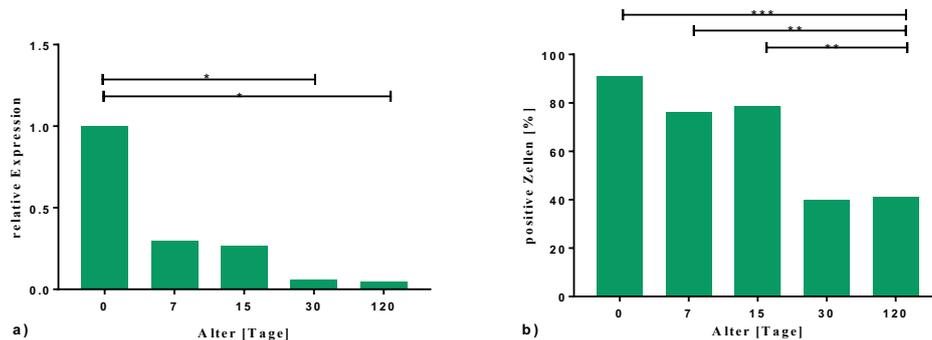


Abb. 83: Gegenüberstellung mRNA-Expression/Proteinexpression_TDG frontaler Kortex – Abbildung 83a zeigt eine signifikante Abnahme der Expressionslevel von Tag 0 auf 30/120. Abbildung 83b zeigt ebenfalls eine signifikante Abnahme der Proteinexpression im Laufe der Entwicklung.

** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test, dargestellt ist das Mittel*

Die Analyse der mRNA-Expressionslevel und auch die der Proteinexpressionslevel zeigen beide eine signifikante Abnahme binnen der Entwicklung. Diese Abnahme ist kontinuierlich, ohne intermittierende signifikante Zunahmen. (→ Abbildung 83)

Auch die lineare Regression lässt hier wieder einen positiven annähernd linearen Zusammenhang vermuten. (→ Abbildung 84)

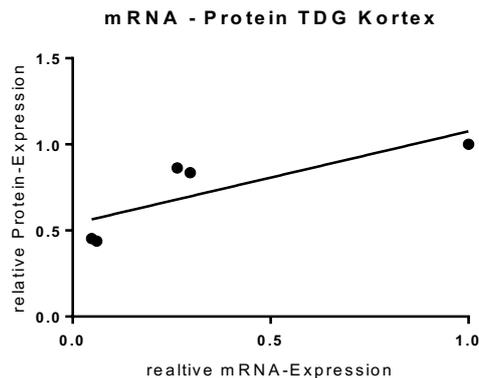


Abb. 84: Lineare Regression der gemittelten Werte der TDG-Expression auf mRNA/Proteinebene im Kortex - Ein positiver annähernd linearer Zusammenhang ist zu vermuten.

3.5.2.2 Quantifizierung der Verteilung im Zerebellum

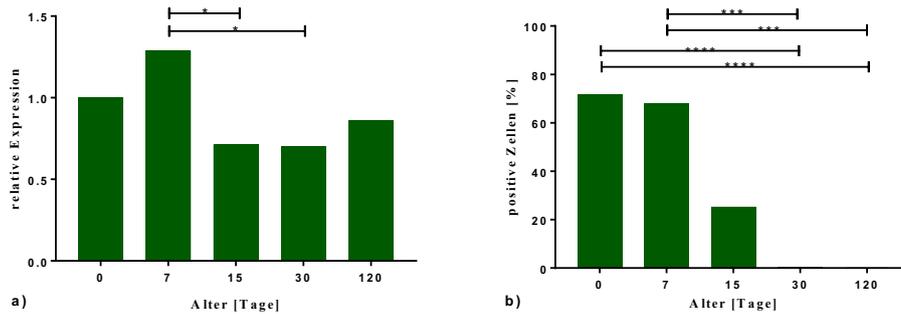


Abb. 85: Gegenüberstellung mRNA-Expression/Proteinexpression_TDG Zerebellum – Abbildung 85a zeigt eine signifikante Abnahme von Tag 7 auf Tag 15 und 30. Abbildung 85b bestätigt eine signifikante Abnahme der Proteinlevel über die Zeit mit Signifikanzen von Tag 0/7 auf 30/120.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter t -Test, dargestellt ist das Mittel

Die mRNA-Expressionsanalyse zeigt keine konstante Abnahme der TDG-mRNA-Level über die Zeit. Die Proteinexpressionsanalyse hingegen ergibt eine fortwährende Verminderung der TDG-Expression mit deutlichen signifikanten Unterschieden in der Expression zwischen Tag 0/7 und 30/120. (→ Abbildung 85)

Die lineare Regression der Mittelwerte der beiden Verteilungen hat ihren Ursprung nicht im Nullpunkt, ist aber annähernd linear. (→ Abbildung 86)

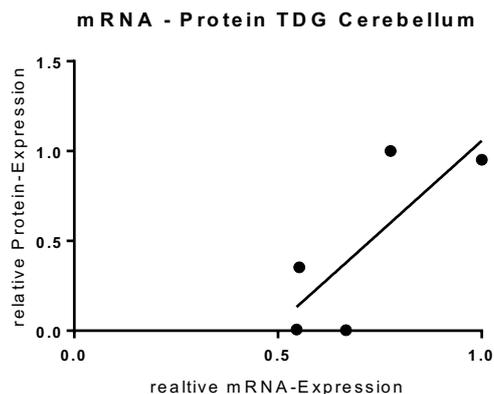


Abb. 86: Lineare Regression der gemittelten Werte der TDG-Expression auf mRNA/Proteinebene im Zerebellum – Zu sehen ist eine annähernd positiv lineare Funktion.

4 Diskussion

4.1 Analyse der DNMT3a-Expression

Die DNA Methyltransferase 3a arbeitet in unseren Zellen als De-novo Methyltransferase, ist also vor allem während der Entwicklung von außerordentlicher Wichtigkeit. Das unterstreicht das Experiment einer DNMT3a-Null-Mutante (→ 1.4).

Eine De-novo DNA Methyltransferase ist in der Lage einen DNA Strang nach freien Stücken zu methylieren. Das bedeutet, sollte eine aus einer Zellteilung hervorgegangene Zelle einer anderen Aufgabe nachgehen, als ihre Mutterzelle, so ist dafür eine andere Proteinausstattung und dafür ein abweichendes Methylierungsmuster von Nöten. Dieses abweichende Methylierungsmuster kann allerdings nur von De-novo Methyltransferasen erstellt werden, da das Prinzip der Arbeitsweise einer Maintenance Methyltransferase auf der Kopie des Methylierungsmusters des komplementären konservativen DNA-Strangs beruht.

Diese Sachlage macht die Bedeutung der DNMT3a in der Entwicklung nachvollziehbar.

Eine durch Mitose entstandene Zelle deren Methylierungsmuster nun von der De-novo Methyltransferase umgestaltet wird, weist aber auf dem konservativen Strang immer noch die ursprüngliche Zeichnung auf. Hier kommt die Demethylierung ins Spiel.

Unter diesem Aspekt wurde in dieser Studie die Verteilung von DNMT3a im Zuge der murinen Gehirnentwicklung untersucht.

4.1.1 Zielregion frontaler Kortex

Auffällig ist der signifikante Abfall DNMT3a-positiver Zellen nach Tag 15 (→ Abbildung 15). Ein Vergleich mit den Ergebnissen für Ki67 (→ Abbildung 23) zeigt ein ähnliches Bild. Auch die Korrelation (→ Abbildung 61) zeigt mit $p < 0,0001$ einen Zusammenhang zwischen der DNMT3a Expression und der proliferativen Entwicklung. Allerdings kann man daraus nicht schließen, dass sich jede DNMT3a-positive Zelle auch im Zellzyklus befindet, denn während bis zu 90% der Zellen an Tag 15 positiv für DNMT3a sind, sind es für Ki67 zu diesem Zeitpunkt nur knapp 5%.

Das hohe DNMT3a-Niveau in den früheren Entwicklungstagen kann also nicht nur auf die Zellteilungsrate zurückzuführen sein. Die positive Korrelation spricht aber definitiv für einen Zusammenhang.

Mit der Verminderung der Zellteilungsrate entfällt die Aufgabe der DNMT als postmitotische Methylierungsmaschine. Das erhöhte Expressionslevel an DNMT3a in den ersten 15 Tagen ist also u.a. eine logische Folge eines erhöhten Bedarfs an Methyltransferasen im Zuge der Proliferation. Ob die DNMT3a hier als Maintenance DNMT aktiv ist und einfach nur die Information kopiert, oder ob sie als De-novo DNMT aktiv die Genexpression steuert und

dadurch die Entwicklung leitet, wurde noch nicht gezeigt. Eine Analyse anderer Methyltransferasen, zum Beispiel der DNMT1, die hauptsächlich als Maintenance DNMT arbeitet, könnte weitere Hinweise liefern.

Die Zusammenarbeit mit HP1 und MeCBP (→ 1.4) deutet aber auf eine fundamentale Rolle von DNMT3a in der epigenetischen Entwicklungsregulation hin.

Die signifikante negative Korrelation zwischen DNMT3a und 5hmC (→ Abbildung 45) spiegelt den Bezug von DNMTs zur Demethylierung wider. Große Mengen an DNMT3a und TDG in den ersten Entwicklungstagen könnten für die Methylierung bzw. Demethylierung, sowie die geringeren Mengen an 5hmC verantwortlich sein. Das würde bedeuten, dass gerade in den ersten Wochen Methylierungs-/Demethylierungsprozesse in vollem Gang sind! Denn eine mögliche Ursache für den niedrigen Gehalt an 5hmC wäre die im Zuge der Demethylierung rasche Weiterbearbeitung desselben.

Durch eben diese Vorgänge ist es möglich das Proteinprofil einer Zelle und damit eine Unzahl regulatorischer Prozesse den Gegebenheiten während der Entwicklung anzupassen

Mit dem Ende der Entwicklung erreichen die 5hmC-Level ein konstant hohes Niveau. In den ersten Wochen nach der Geburt kann dieses Niveau zwar noch nicht erreicht werden, allerdings ist zu erwähnen, dass auch zu diesem Zeitpunkt bereits mindestens 50% der Zellen 5hmC positiv sind [P]. Kraus et al. 2015 zeigt außerdem, dass auch die 5mC- Level nach der Geburt in allen Gehirnregionen bereits bei 100% liegen [P], was darauf hindeutet, dass die molekularen Mechanismen, die die Methylierungsmaschinerie antreiben, bereits während sehr frühen Entwicklungsphasen des Fötus oder Embryos aktiv sind.

Die ständige Präsenz von 5hmC, auch in den ersten Tagen nach der Geburt, aber vor allem ab Tag 30, könnte auf eine permanente Bereitschaft der Zelle zur Demethylierung hindeuten, was eine adäquate Reaktion auf sich rasch ändernde Umgebungsbedingungen ermöglichen würde. Die Signalwege, die den Demethylierungsvorgang ins Rollen bringen, sind allerdings noch unbekannt.

Eine Arbeit von Zhang und Wu 2011 [41] beschreibt die Struktur der für die Entstehung von 5hmC verantwortlichen TET Enzyme, welche für den in dieser Signalkette direkt 5hmC vorgeschalteten enzymatischen Vorgang verantwortlich sind. Demnach besteht das TET Enzym aus mehreren konservierten Domänen, unter anderem aus einer CXXC Domäne, welche eine hohe Affinität zu unmethylierten CG-Segmenten innerhalb einer CpG-Insel aufweist. Das bedeutet, dass die Hydroxylierung von 5mC keine vorangängige Rekrutierung der TET Enzyme verlangt, falls diese bereits vor Ort sind, was wiederum die Geschwindigkeit der Signalkette erhöhen würde. Vorstellbar wäre eine ähnliche Präsenz der weiteren für die Demethylierung nötigen Enzyme (TET, AID/APOBEC, TDG).

4.1.2 Zielregion Zerebellum

Die Ergebnisse der Analyse von DNMT3a im Cerebellum ähneln zu großen Teilen denen im Kortex, sind aber nicht ident. Zwar sinken die DNMT3a-positiven Proteinlevel im Großen und Ganzen sodass am Tag 120 ein Minimum erreicht wird (→ Abbildung 27-30), allerdings tun

sie dies nicht kontinuierlich. Besonders die IGCL (→ Abbildung 28) und die MCL (→ Abbildung 29) zeigen an Tag 30 bzw. 15 einen Ausreißer, der das maximale DNMT3a-positive Proteinlevel im Laufe der Entwicklung widerspiegelt.

Interessanterweise korrelieren diese beiden Schichten nicht mit der 5hmC-Expression (→ Abbildung 47+48). Eine abweichende epigenetische Regulierung der Reifung der Zellen im Kleinhirn aufgrund von 5hmC, also von dem hier untersuchten epigenetischen Kontrollelement, ist somit vermutlich nicht der Grund für diese Veränderung.

Möglich wäre ein Messfehler, der für die beiden Ausreißer verantwortlich ist. Die zusätzliche Kontrolle der Ergebnisse mittels Binarisierung, welche ebenfalls einen diskontinuierlichen Verlauf zeigt (→ Abbildung 31) macht dies eher unwahrscheinlich.

Ein Prozess unabhängig dieser Reaktionskaskade scheint hier wahrscheinlicher. In 4.1.3 wird hierauf noch einmal eingegangen.

Die EGCL, welche nur bis zu Tag 15 nachweisbar ist und an Tag 0 durch eine starke proliferative Tätigkeit (→ Abbildung 39), hohe DNMT3a-Level (→ Abbildung 27), hohe TDG-Level (→ Abbildung 33) der Zellen und einen extrem geringen 5hmC-Gehalt (→ Abbildung 87) auffällt, bekräftigt die durch die im Kortex gewonnen Erkenntnisse erarbeitete Annahme, dass die aktive Methylierungs-/Demethylierungsmaschinerie in den ersten 15 Tagen verantwortlich für die erniedrigten Level an 5hmC ist. Diese steigen im Laufe der Entwicklung stetig an, während die Menge an DNMT3a-positiven Zellen sinkt. Auch die signifikante negative Korrelation von DNMT3a und 5hmC in der EGCL (→ Abbildung 46) unterstreicht diesen Zusammenhang.

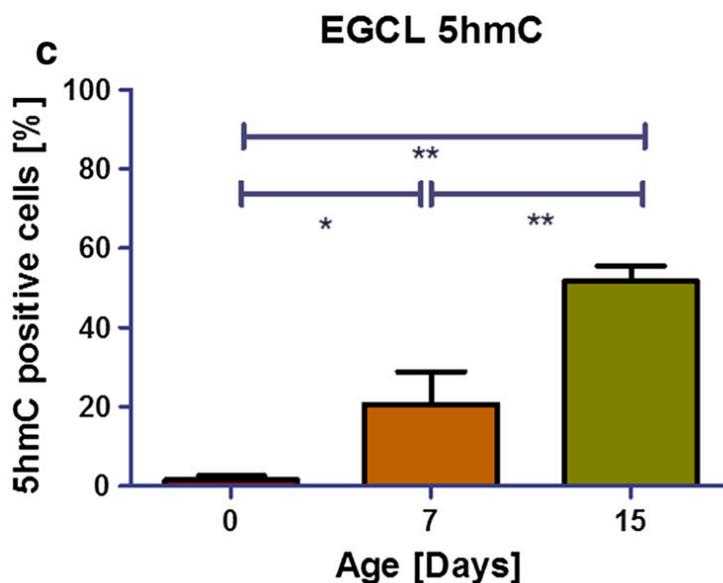


Abb. 87: Quantifizierung der 5hmC-positiven Zellen während der Gehirnentwicklung in der EGCL des Zerebellum - Die Zahl der 5hmC-positiven Zellen steigt im Laufe der Entwicklung kontinuierlich signifikant an. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ungepaarter *t*-Test; gekennzeichnet sind: Mittel, SEM [P] (Quelle: Kraus, T.F., et al., Profiling of methylation and demethylation pathways during brain development and ageing. *J Neural Transm (Vienna)*, 2016. 123(3): p. 189-203.)

Betrachtet man Abbildung 28 und 30 ist auffällig, dass die Analyse der IGCL und die der undifferenzierten Kleinhirnschnitte einander ähneln. Diese Ähnlichkeit ist bei jeder Analyse gegeben. Aufgrund des verhältnismäßig größten Anteils der IGCL am kortikalen Zerebellum, ist dies nicht verwunderlich.

4.1.3 Expression im Regionenvergleich

Untersucht man die Unterschiede der Proteinexpression von DNMT3a zwischen den unterschiedlichen Gehirnregionen, sind mehrere Punkte auffällig:

An Tag 0 gleichen sich die Expressionsmuster im Kortex, der MCL, EGCL und IGCL noch zu großen Teilen (→ Abbildung 65). Nur die MCL weist, wie fast im gesamten Verlauf der Entwicklung, signifikant geringere Werte auf.

Während der folgenden Entwicklungstage (Tag 7 und 15) (→ Abbildung 66+67) ist auffällig, dass die EGCL von den anderen Regionen abweichende Expressionsmuster aufweist. In diesen ersten 15 Tagen wandern die Zellen aus der EGCL fortwährend in die IGCL, bis die EGCL verschwunden ist (→ 1.7). Es ist vorstellbar, dass diese Aufgabe an Priorität gewinnt und die Differenzierung (und damit unter anderem die Expression von DNMT3a) teilweise hintenangestellt wird. Da aber 100% der Zellen 5mC-positiv sind [P] und gleichzeitig Proliferation stattfindet (Ki67 zeigt in der EGCL innerhalb der ersten 15 Tage einen Wert von rund 70% (→ Abbildung 39)), muss die Methylierung der DNA während dieser Zeit von einer anderen DNMT durchgeführt werden (zum Beispiel die Maintenance DNMT1). Ein Hinweis dafür, dass die DNMT1 als Maintenance DNMT arbeitet und die DNMT3a De-novo-Funktion ausübt.

Auffällig an Tag 30 und 120 ist der extreme Unterschied der Werte für DNMT3a zwischen Kortex und IGCL (→ Abbildung 68+69). Während die DNMT3a-positiven Proteinlevel in der IGCL nach wie vor hoch sind, sinkt das Niveau im Kortex rasant. Dieser Verlauf könnte vermuten lassen, dass die proliferative Entwicklung und die primäre Differenzierung im Kortex früher abgeschlossen ist. Ki67 zeigt, dass bereits an Tag 0 im Kortex kaum Zellen im aktiven Zellzyklus sind (→ Abbildung 75).

Vorstellbar wäre dieser Unterschied. Das Kleinhirn, mit seiner Hauptaufgabe in der Koordination von Bewegungen ist eventuell komplexer gestaltet als der Frontalkortex, welcher, zwar trotz der äußerst prekären Aufgabe der Persönlichkeitsentwicklung, eventuell weniger viel verknöpfte Regelkreise aufweist, als es für die Ausführung einer exakten Bewegung notwendig sind. Das ist allerdings nur eine vage Vermutung.

Wenn dem so ist, sollten allerdings die Expressionsdaten von TDG und 5hmC beide diese Vermutung unterstützen. DNMT3a sollte also im besten Fall zu diesem Zeitpunkt im Kortex negativ mit 5hmC und positiv mit TDG korrelieren. Abbildung 88 zu Folge ist dem allerdings nicht so.

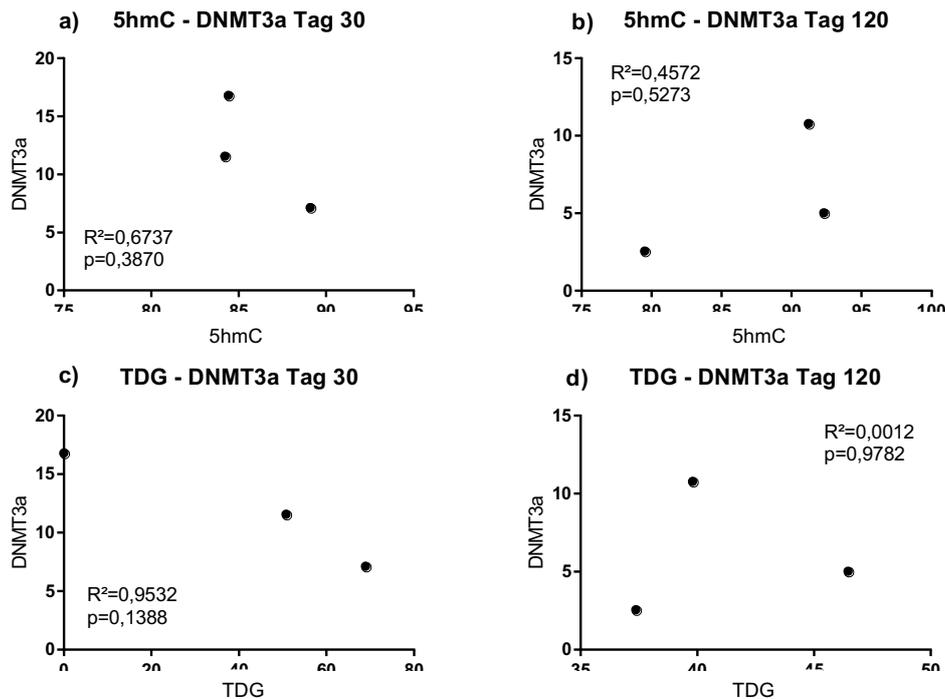


Abb. 88: Korrelationsanalyse der Beziehung 5hmC/DNMT3a bzw. TDG/DNMT3a im frontalen Kortex am Tag 30/120 - Abbildung 88a und 88b zeigen keine signifikante Korrelation zwischen der DNMT3a-Menge und der 5hmC-Menge. Abbildung 88c und 88d zeigen ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang. R^2 =Bestimmtheitsmaß; p =Signifikanzwert; inkl. linearer Regression

Wahrscheinlicher ist, dass es einen anderen Grund für die Notwendigkeit von DNMT3a in der IGCL zu diesem Zeitpunkt gibt. Aber auch die Proliferation, Ki67 ist zu diesem Zeitpunkt bereits nahezu bei 0%, kann nicht verantwortlich sein. Passive Demethylierung wäre wahrscheinlicher. Im Falle der passiven Demethylierung wäre TDG überflüssig, eine DNMT aber natürlich nötig, um die verlorenen Methylgruppen wieder anzuhängen. Passive Demethylierung ist nicht nur während der Zellteilung möglich. Die niedrigen Ki67-Level zu diesem Zeitpunkt sprechen also nicht gegen diese Theorie. Weitere Möglichkeiten der passiven Demethylierung sind Transkription, RNA-Metabolismus und die DNA-Reparatur. [42]

Allerdings dürfte der Kortex von einer spontanen passiven Demethylierung nicht verschont bleiben.

4.2 Analyse der TDG-Expression

Die Thymine-DNA-Glykosylase als mögliches zentrales Enzym im Reaktionsprozess der Demethylierung zeigt im Laufe der Entwicklung charakteristische Veränderungen in der Expression.

Wie auch die DNMT3a hat die TDG eine wichtige Aufgabe während der Entwicklung einer Zelle. Sollte eine aus einer Zellteilung hervorgegangene Zelle einer anderen Aufgabe nachgehen als ihre Mutterzelle, so ist dafür eine andere Proteinausstattung und dafür ein abweichendes Methylierungsmuster nötig. Für dieses ist die DNMT3a zuständig. Dazu muss

allerdings der konservative DNA-Strang zuerst demethyliert werden. Hier kommt die TDG ins Spiel.

Für diese Studie heißt das, dass wenn TDG und DNMT3a tatsächlich parallel bzw. abhängig voneinander arbeiten, dies sich auch in der Expressionsauswertung und den Korrelationen widerspiegeln sollte:

4.2.1 Zielregion frontaler Kortex

TDG zeigt in den Expressionsanalysen einen stetigen Abfall, der sich ab Tag 30 bei ungefähr 40% positiven Zellen einpendelt. Die TDG Level sinken nicht auf 0 (anders als im Kleinhirn), was aufgrund der vielfältigen Aufgabenbereiche von TDG (→ Einleitung 1.4) leicht nachzuvollziehen ist. TDG wird also immer in der Zelle gebraucht. Das ist vor allem auf seine Aktivität im Zuge der BER und der Transkriptionsregulation zurückzuführen, welche auch in sich nicht teilenden Zelle von Bedeutung sind.

Da auch noch im entwickelten murinen Gehirn ca. 40% der kortikalen Zellen TDG-positiv sind, ist es vorstellbar, dass in diesen TDG auch für den durch 5hmC eingeleiteten Demethylierungsprozess zur Verfügung steht.

Die interessante Korrelation mit DNMT3a ist positiv und signifikant (→ Abbildung 89), was die parallele Arbeitsweise von TDG und DNMT3a unterstreicht. Methylierung und Demethylierung könnte im Entwicklungsprozess demnach parallel stattfinden. Eine Abhängigkeit beider Enzyme voneinander kann aber nicht beurteilt werden.

TDG korreliert außerdem genauso wie DNMT3a ebenfalls signifikant negativ mit 5hmC (→ Abbildung 50).

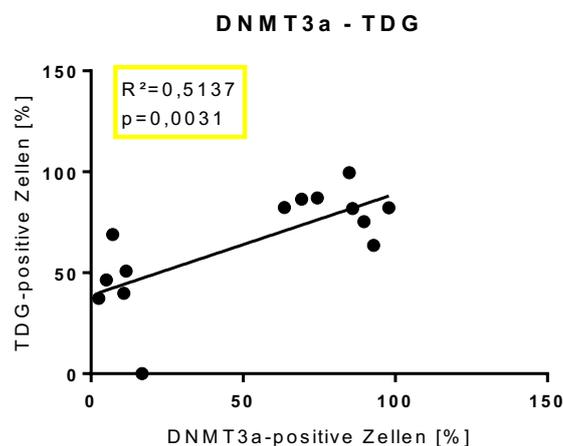


Abb. 89: Korrelationsanalyse DNMT3a/TDG im frontalen Kortex - TDG und DNMT3a korrelieren signifikant positiv miteinander.

R²=Bestimmtheitsmaß; p=Signifikanzwert; inkl. linearer Regression

Abbildung 62 zeigt eine signifikante positive Korrelation für Ki67 und TDG im Kortex. Die im Zuge der Entwicklung statt findende Proliferation geht also mit einem erhöhten TDG-Level einher. Da auch DNMT3a im Kortex positiv mit Ki67 korreliert und demnach beide

untersuchten epigenetischen Operateure diesen Verlauf zeigen ist eine hohe Variabilität des Epigenoms in dieser Zeit eine mögliche/logische Schlussfolgerung.

TDG zeigt, wie DNMT3a, schon an Tag 0 viel mehr positive Zellen als Ki67. Deswegen kann man auch hier trotz der positiven Korrelation nicht davon ausgehen, dass sich jede TDG-positive Zelle auch im Zellzyklus befindet.

4.2.2 Zielregion Zerebellum

Im Zerebellum präsentiert sich in allen drei Schichten eine fast konstante Abnahme der TDG-Proteinlevel, allerdings mit dem Unterschied zum Kortex, dass die Menge an TDG bis an die Nachweisbarkeitsgrenze sinkt und kein höheres Niveau hält (→ Abbildung 33-36). Das wirft die Frage auf, wieso sich Kortex und Zerebellum hier unterscheiden. Trotz des signifikanten Unterschieds der TDG-Expression zwischen Kortex und IGCL an Tag 120 korrelieren die TDG-Expressionen im Kortex und im Zerebellum aufgrund der ähnlichen Tendenz signifikant positiv (→ Abbildung 90).

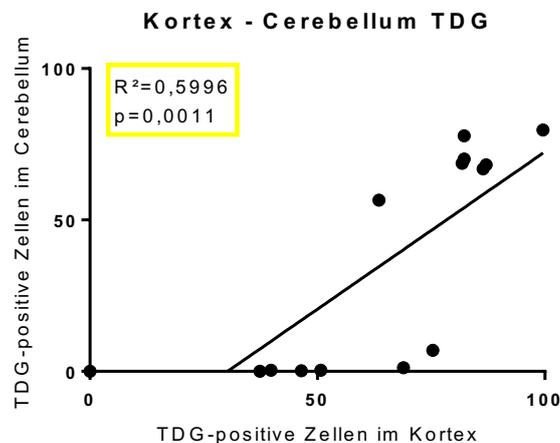


Abb. 90: Korrelationsanalyse nach Pearson TDG-Kortex/TDG-Zerebellum - Die Expression von TDG im Kortex und im Zerebellum gleichen einander insofern, da sie eine ähnliche Tendenz aufweisen. Was die Korrelationsanalyse allerdings nicht preis gibt, ist, dass die TDG-Level im Cerebellum viel stärker sinken als im Kortex.

R²=Bestimmtheitsmaß; p=Signifikanzwert; inkl. linearer Regression

Während die DNMT3a-positiven Proteinlevel zwar in der EGCL, MCL und im Kortex stark sinken, sind sie in der IGCL am Tag 120 noch bei rund 40%. TDG weist diese Entwicklung in der IGCL allerdings nicht auf. Hier sind bereits an Tag 30 die Proteinlevel nur noch knapp über 0%. Korrekterweise ist noch einmal darauf hinzuweisen, dass, wie die Expressionsanalyse im Regionenvergleich zeigt (→ 4.2.3), dieser Unterschied in der TDG-Expression zwischen Kortex und IGCL erst an Tag 120 signifikant ist.

Es muss also einen Grund dafür geben, dass TDG ab Tag 30 im Kleinhirn nicht mehr exprimiert wird, im Kortex aber schon. Eine genauere Betrachtung anderer mit TDG in

Verbindung stehender Enzyme (SUMO, c-JUN, RAR, RXR, ER α ,...) könnte hier weiterhelfen.

Die Korrelation mit 5hmC erscheint sinnvoll (\rightarrow Abbildung 54). Wir sehen eine signifikante negative Korrelation. Ein hohes Level an 5hmC geht mit einem geringeren Level an TDG einher. Dieses Verhalten stimmt mit dem von DNMT3a überein. Die Korrelation ist sowohl im Kortex als auch in der IGCL und MCL signifikant getestet worden.

Man kann also von der Annahme ausgehen, dass DNMT3a, TDG und 5hmC in zusammenhängenden Regelkreisen miteinander interagieren.

4.2.3 Expression im Regionenvergleich

Die altersgruppenzentrierte Analyse der verschiedenen Gehirnregionen zeigt in den ersten 7 Tagen, abgesehen von den in der EGCL ontogenetisch-bedingten Abweichungen, keine signifikanten Unterschiede (\rightarrow Abbildung 70+71).

Danach ist die Dominanz des Kortex sehr deutlich (\rightarrow Abbildung 72-74). Während kaum noch TDG-positive Zellen im Cerebellum nachzuweisen sind, sind im Kortex noch bis zu 40% der Zellen positiv. Zwar sinken auch hier die Werte, bleiben dann aber auf diesem Niveau. Diese Konstellation konnte aber nur an Tag 120 statistisch signifikant nachgewiesen werden.

Sollte die epigenetische Regulation der Entwicklung im Kortex und Zerebellum parallel und in ähnlicher Geschwindigkeit ablaufen, stellt sich die in 4.1.3 und 4.2.2 bereits behandelte Frage, welche Aufgabe TDG im Kortex gegen Ende der Reifung zufällt und wieso DNMT3a im Kortex dann kaum noch exprimiert wird.

4.3 Analyse der Ki67-Expression

Der Wachstumsmarker Ki67 wurde analysiert um einen messbaren Bezug zur Proliferation zu erhalten. Ki67 wird nur in sich teilenden Zellen exprimiert. Dadurch können all jene Zellen ausgemacht werden, die sich noch nicht in der G₀-Phase befinden. Mit Ende der proliferativen Entwicklung folgt die Differenzierung. Die Analyse von Ki67 zeigt ein klares Ergebnis.

4.3.1 Zielregion frontaler Kortex

Die proliferative Entwicklung im Kortex ist etwa mit Tag 15 pn beendet. Während dieser letzten 15 Tage sind höchstens nur noch rund 6% der untersuchten Zellen in Proliferation. Dieses niedrige Niveau fällt nach Tag 15 zudem signifikant ab (\rightarrow Abbildung 25). Tag 30 zeigt kaum noch Ki67-positive Zellen.

Aufgrund dieses Verlaufs und den bereits beschriebenen Veränderungen von 5hmC im Laufe der Entwicklung, ist hier eine signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Parteien nur logisch (\rightarrow Abbildung 55). Proliferation zieht im Zuge der Entwicklung einen hohen Umsatz an DNMTs und für die Demethylierung verantwortliche Enzyme (TDG) mit sich (\rightarrow

Korrelationen 3.3.4; 3.3.5). Wie bereits gezeigt, gehen hohe Werte für DNMT3a und TDG mit geringeren Werten für 5hmC einher.

Ki67 markiert sich teilende Zellen während der Entwicklung, was den erhöhten Bedarf an DNMTs bei höheren Werten für Ki67 erklärt, wenn auch Ki67 nicht allein verantwortlich für den erhöhten Bedarf an DNMTs sein kann (→ 4.1.1; 4.2.1).

4.3.2 Zielregion Zerebellum

Das Zerebellum zeigt ein ähnliches Bild. Die Ki67-positiven Proteinlevel liegen am Tag 0 nur bei durchschnittlich 40% und sinken stetig (→ Abbildung 39-42). Besonders auffällig: in der IGCL sind bereits an Tag 15 fast alle Zellen negativ (→ Abbildung 40).

Auch im Cerebellum lässt sich eine signifikante negative Korrelation zwischen Ki67 und 5hmC zeigen. Alleine die EGCL zeigt aufgrund ihrer stetig hohen Zahl an Ki67-positiven Zellen keine Signifikanz (→ Abbildung 56-59).

Diese Daten sollten helfen die richtigen Schlüsse (→ 4.1; 4.2) über die Funktion der Proteine DNMT3a und TDG zu ziehen und ihren Zusammenhang mit 5hmC zu finden.

4.3.3 Expression im Regionenvergleich

Ki67 im Vergleich der unterschiedlichen Gehirnregionen liefert interessante Hinweise auf Unterschiede in der proliferativen Entwicklung.

Bereits während der fetalen Phase muss es zu einer massiven Proliferation, sowohl im Zerebellum als auch im Kortex kommen, denn an Tag 0 sind bereits mindestens 70% (ausgenommen: EGCL) der Zellen in der G₀-Phase (→ Abbildung 75). Dieser Prozentsatz an Ki67-positiven Zellen schrumpft kontinuierlich bis eine kaum noch nachweisbare Menge an Protein vorhanden ist.

Das einzige Gebiet, in dem 15 Tage lang rund 65% der Zellen positiv sind, ist die EGCL. Die Hauptaufgabe der Zellen in der EGCL scheint somit die Proliferation zu sein bevor sie in die IGCL wandern und dort ihrer weiteren Differenzierung nachgehen.

Eine weitere Auffälligkeit ist der Unterschied an Ki67-positiven Zellen zwischen dem frontalen Kortex und der IGCL. Dieser ist bereits an Tag 15 signifikant (→ Abbildung 77), wobei der Kortex längere Zeit lang Ki67 exprimiert.

4.4 Bedeutung des Vergleichs mRNA-/Proteinexpression

Die Analyse der mRNA-Expressionsdaten der DNMT3a-/TDG-Verteilung liefert uns das Ergebnis, dass mRNA-Expression und Proteinexpression größtenteils einen ähnlichen Verlauf zeigen. (→ Abbildung 79-86)

Gerade im Kortex ist diese Ähnlichkeit auffällig. Unsere Daten liefern allerdings keine Information darüber, ob eine jede mRNA in ein Protein umgesetzt wird. Obwohl der großteils synchrone Verlauf wohl nicht zufällig zustande kommt, ist es möglich, dass immer nur ein

gewisser Prozentsatz an mRNA in Protein übersetzt wird. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die untranslatierte mRNA einer regulatorischen Funktion nachgeht und deswegen vermehrt produziert wird.

Abbildung 91 vereinigt alle erhobenen Daten der Expressionsanalysen in einem Bild. Die rote Farbe steht dabei für eine starke Expression des untersuchten Proteins, die blaue Farbe für eine verminderte Expression. Sehr schön zu erkennen ist die Ansammlung roter Felder für fast alle Marker in den frühen Entwicklungstagen, die Zunahme an DNMT3a in der IGCL gegen Ende der Entwicklung und die konstante kortikale TDG-Expression:

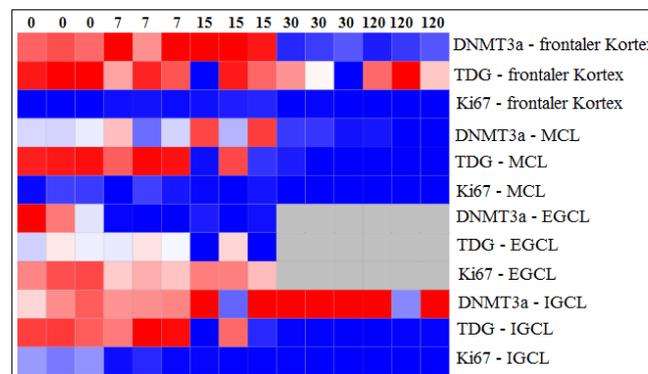


Abb. 91: Visualisierung der immunhistochemisch detektierten Proteinlevel von DNMT3a/TDG/Ki67 im frontalen Kortex, der MCL, EGCL und IGCL an den Tagen 0,7,15,30 und 120 pn - Besonders sticht die rote Farbe während der frühen Entwicklungstage heraus, sowie die DNMT3a Expression in der IGCL
blau=niedrige Proteinlevel, rot=erhöhte Proteinlevel, grau=Zellschicht nicht mehr vorhanden

4.5 Fazit

Die Entdeckung von 5hmC hat zur Komplexität des Epigenoms beigetragen, seine genaue Funktion ist aber bislang unbekannt. Zu den möglichen Aufgaben zählen die aktive Demethylierung [11, 21] wie auch die Genregulierung [43]. Vorliegende Studie zeigt in den frühen Tagen der Entwicklung große Mengen an DNMT3a und TDG. Beide Enzyme führen potentiell essentielle Funktionen in den Prozessen der Methylierung bzw. Demethylierung aus (→ 1.4; 1.5). Konträr hierzu sind die 5hmC - Level während dieser Zeitspanne niedrig. Ein aktiver Methylierungs-/Demethylierungszyklus klingt plausibel. Der geringe 5hmC-Gehalt im Rahmen der Demethylierung sei durch die weitere Reaktion von 5hmC in 5fC und 5caC und schließlich unmethyliertes Cytosin zu erklären. Nicht geklärt werden kann in dieser Studie, ob 5hmC auch besagte regulatorische Funktion zugeschrieben werden kann.

Die Theorie, dass 5hmC ein wichtiger Parameter bei der Demethylierung ist, gewinnt durch diese Beobachtungen an Bedeutung. Um den Methylierungs-/Demethylierungsprozess genauer beschreiben zu können, wäre es nötig die Produkte von 5hmC, sprich 5fC und 5caC, zu quantifizieren. Das könnte beispielsweise mit Hilfe eines Massenspektrometers erfolgen.

Da nach aktuellem Wissenstand eine hohe Rate an Methylierung-/Demethylierungsvorgängen mit einer Produktion von 5fC und 5caC einhergeht, würden wir größere Menge von 5fC und 5caC vor allem in frühen Entwicklungsstadien erwarten und eine verringerte Menge in gealterten Gehirnen mit mehr oder weniger stabilen (Hydroxy)methylomen. Diese Stabilität geht einher mit einer starken Verminderung Ki67-positiver Zellen, also mit einer verminderten Proliferation.

Interessant ist, dass das Hydroxymethylom sowie die Expression der untersuchten Proteine stark abhängig von der beobachteten Hirnregion und vom Alter sind. Eine altersabhängige Verteilung von 5hmC konnte auch in einer Vorgängerstudie gezeigt werden [18]. Bisher ist aber nicht klar, ob der niedrige Gehalt von 5hmC in sich entwickelnden Gehirnen lediglich auf einer geringeren Produktion beruht, oder ob schnelle Methylierungs-/Demethylierungsprozesse bei den niedrigeren Spiegeln eine Rolle spielen. Letzteres würde eine hohe Plastizität der Methylierungs- und Demethylierungsmuster voraussetzen. Die hier gezeigten signifikant negativen Korrelationen der Methylierungs-/Demethylierungsenzyme DNMT3a und TDG mit dem 5hmC Gehalt deutet daraufhin, dass aktive Demethylierung stattfindet.

Hohe Level an Methylierung-/Demethylierungsproteinen gehen außerdem mit großen Mengen des Proliferationsmarkers Ki67 einher. Weniger Proliferationsaktivität ist meiner verringerten Expression dieser Methylierung-/Demethylierungsproteine assoziiert.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Frage gestellt, was der Grund für den Anstieg von 5hmC in Laufe der Zeit ist? Die Theorien nach Branco et al. 2012 [11] waren:

- 1) ein aktiver Methylierungs-/Demethylierungsprozess
- 2) passive Akkumulation von 5hmC aufgrund von Methylierung ohne anschließender Demethylierung
- 3) Generation von 5hmC unabhängig von jedem Methylierungs/Demethylierungsvorgang

Die hier gezeigten Korrelationsanalysen geben Grund zu der Annahme dass Theorie 2 am plausibelsten ist. Die Tatsache, dass die mRNA-Expression der TET-Enzyme TET1/2/3, welche ja für die Produktion von 5hmC unerlässlich sind, mit der Zeit signifikant abnimmt [P] spricht dagegen, dass die erhöhte Anzahl 5hmC-positiver Zellen durch eine gesteigerte Methylierungs-/Demethylierungsfrequenz zu Stande kommt. Theorie 1 kann demnach nicht möglich sein, unter anderem auch, weil die Enzyme der Demethylierung, wie TDG, an Tag 30 und 120 geringere Level aufweisen als noch zuvor (allerdings wäre eine TDG unterstützte Demethylierung wegen der steten Expression im Kortex, es sind noch bis zu 40% positiv, prinzipiell möglich). Für Theorie 3 gibt es keinen Anhalt.

Zu erwähnen ist außerdem, dass TDG zwar vermutlich einen nicht unbeträchtlichen Beitrag zur Demethylierung beisteuert, wohl aber kaum allein verantwortlich für diesen Prozess ist. Denn aufgrund der katalytischen Ineffizienz dieser Reaktion muss es noch einen anderen Mechanismus geben, der diesen entscheidenden Schritt, die Entfernung der Methylgruppe, ausführt. Cortázar et al. beschreibt eine RNA als wesentlichen Bestandteil von TDG, welche bei der Rekrutierung des Enzyms an die zu demethylierende Stelle, unterstützend wirken könnte. Die Tatsache, dass TDG einen Zusammenhang mit der Demethylierung aufweist,

könnte seinen Grund also auch in der Notwendigkeit der Regulationsaufgabe haben. Auch Cortázar et al. hat in seinem Review eine ähnliche Theorie aufgestellt: [25]

"It may be that Tdg, in conjunction with specific targeting factors, contributes to the establishment and/or the maintenance of proper CpG methylation patterns in certain regions of the genome and thereby assures accurate control of gene expression. At this point, however, this is little more than an interesting hypothesis that is worth being tested." (Cortázar et al.2006)

Zusammengefasst, demonstrieren die hier präsentierten Daten eine alters- und regionsabhängige Regulierung von Methylierung-/Demethylierungssignalwegen mit hoher Methylierung-/Demethylierungsaktivität in der frühen Entwicklung, gefolgt von verminderter Aktivität in reifen Gehirnen. Das unterstützt die Annahme, dass es während der Entwicklung nicht nur zu einer Produktion von 5mC und 5hmC kommt, sondern, dass eine hohe Anzahl von Methylierung-/Demethylierungsvorgängen stattfindet. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Plastizität des Gehirns und dessen Regulationsmechanismen.

5 Zusammenfassung

Unzählige Signalwege in unseren Zellen unterliegen epigenetischer Regulation. Diese Komplexität, die die regelrechte Abstimmung aller Reaktionskaskaden verlangt, ist nur schwer vorstellbar und in ihrer Bedeutsamkeit kaum zu erahnen. Umso wichtiger ist es die grundlegenden Mechanismen dahinter zu verstehen. Dazu zählen insbesondere die DNA-Methylierung und die lange Zeit vernachlässigte DNA-Demethylierung. Ein erweitertes Verständnis darüber, wie diese beiden Prozesse reguliert werden, eröffnet neue zukunftssträchtige Forschungsschwerpunkte mit Behandlungsalternativen für eine Unzahl an Krankheiten jeder Art.

Ziel dieser Studie war die Quantifizierung der Expression dreier Proteine in unterschiedlichen Gehirnregionen, zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten, welche in Verbindung mit der DNA-Methylierung/Demethylierung stehen. Diese sind: DNA-Methyltransferase 3a (DNMT3a), Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) und Ki67 (Proliferationsmarker). Untersucht wurden der frontale Kortex, sowie das Zerebellum von 15 Mäusen des Stammes C57BL/6. Je drei Mäuse wurden an den Tagen 0, 7, 15, 30 und 120 nach der Geburt geopfert. Die Quantifizierung wurde mittels Immunhistochemie und Binarisierung durchgeführt.

Interessanterweise zeigen sich alters- und regionsabhängige signifikante Expressionsunterschiede der für die Methylierung/Demethylierung verantwortlichen Proteine, sowie eine signifikante Abnahme der Expression im Laufe der Entwicklung. Besonders während der ersten Tage nach der Geburt werden die Proteine DNMT3a, TDG stark exprimiert, was aktive Methylierungs-/Demethylierungsvorgänge während dieser Zeit vermuten lässt. Die Annahme, dass aktive Demethylierung von großer Bedeutung im Zuge der Differenzierung ist wird dadurch bekräftigt.

Eine signifikante negative Korrelation dieser Proteine mit dem für die Demethylierung als essentiell betrachteten 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) unterstützt diese Beobachtung. Dieser gegenläufige Verlauf liefert Hinweise auf die verantwortlichen Mechanismen für den 5hmC Auf-/Abbau. Die hier präsentierten Ergebnisse legen den Zusammenhang mit aktiver Demethylierung nahe.

Des Weiteren konnten durch die Analyse der immunhistochemischen Daten regionalbedingte Entwicklungsunterschiede statistisch bestätigt werden. Hierbei zeigten vor allem DNMT3a und TDG in der inneren Granularzellschicht (IGCL) des Zerebellums vom frontalen Kortex abweichende Verteilungsmuster, was Unterschiede in der Entwicklung dieser beiden Gehirnregionen unterstreicht.

Alles in allem demonstrieren die hier gewonnenen Daten, dass die Methylierung und Demethylierung in Abhängigkeit von Gehirnregion und Alter streng kontrolliert und reguliert werden. Starke Methylierungs-/Demethylierungsaktivitäten in frühen Phasen der Entwicklung, gefolgt von abnehmenden Aktivitäten im reifen Gehirn, setzen 5hmC nach der Geburt in den Mittelpunkt zunehmender Plastizität unserer epigenetischen Regulationsmechanismen. Diese Daten helfen daher die Komplexität des Epigenoms besser zu verstehen und unterstützen weitere wichtige Forschungsansätze, welche grundlegende epigenetische Prozesse untersuchen.

6 Anhang

6.1 Kritische Beurteilung der Studie

Obwohl natürlich alle in dieser Studie durchgeführten Berechnungen den statistischen Standards entsprechen und alle Methoden korrekt durchgeführt wurden, ist es in meinen Augen wichtig, die Vor- und Nachteile einer Arbeit genauer zu beleuchten, um mögliche Interpretationsfehler der Ergebnisse zu verhindern.

6.1.1 Die Methode der Immunhistochemie zur Erfassung des Expressionsmusters von Genen

Trivial, aber nicht zu vernachlässigen, ist der Begriff "*Genexpression*". Während manche der Auffassung sind, dass dieses Wort allein den Weg vom Gen bis zur mRNA beschreibt, ist in dieser Studie in diesem Wort außerdem der Schritt der Translation und der, eventueller posttranslationaler Modifikationen, bis zum fertigen und funktionstüchtigen Protein inkludiert.

Die Genexpression lässt sich somit auf unterschiedlichen Ebenen untersuchen. Neben den hier angewandten Methoden: die Immunhistochemie auf Proteinebene und die mRNA-Erhebung auf mRNA-Niveau gibt es eine Vielzahl molekularbiologischer Experimente die weiteren Aufschluss geben: qRT-PCR, Northern Blot, In-Situ-Hybridisierung, Western Blot, ELISA, Radioimmunassay,...

Der Vorteil der Immunhistochemie ist, dass sich eine räumliche Verteilung darstellen lässt. So konnten im Zerebellum die EGCL, IGCL und MCL einzeln ausgewertet werden. Zudem kann in manchen Fällen sogar die Verteilung der Proteine innerhalb der Zelle sichtbar gemacht werden (Expression ausschließlich im Zellkern/Zellplasma/diffus/gesprenkelt).

Nachteil der immunhistochemischen Methode ist, dass die Auswertung der gefärbten Präparate (ohne Binarisierung) mit einem großen Zeitaufwand verbunden ist.

Sowohl ein Vorteil als auch ein Nachteil kann die Tatsache sein, dass hier abgesehen von der als verlässlich eingestuften Färbung, keine automatischen Geräte zum Einsatz kommen, sondern die Auszählung der fachlichen Beurteilung einer Arbeitskraft unterliegt. Artefakte können somit leichter erkannt und wenn entdeckt, berücksichtigt werden.

6.1.2 Die Methode der Binarisierung als Alternative zur manuellen Quantifizierung

Die in → 2.3.4 beschriebene Methode der Binarisierung wurde in dieser Studie angewendet um zu entscheiden, ob die Binarisierung der visuellen Quantifizierung bei der Auswertung von immunhistochemisch gefärbten Bildern vorzuziehen ist.

Der deutlich geringere Zeitaufwand, sowie die präzise Beurteilung eines jeden Pixels sprechen für diese Methode. Allerdings können Missgeschicke bei der Färbung welche zu

einer fehlerhaften oder intensitätsschwachen Verteilung der sekundären Antikörper führen schlechter erkannt werden. Eine grobe Kontrolle wäre also nötig.

Die hier erhobenen Daten der Binarisierung überschneiden sich in ihrer Tendenz zu großen Teilen mit den Daten der Quantifizierung. Das spricht für die Korrektheit dieser Methode. Eine exakte Kopie der Werte ist durch die Binarisierung allerdings sowieso nicht zu erwarten, da hier ein Flächenverhältnis mit einem Verhältnis ganzer Zahlen verglichen wird.

Des Weiteren ist auf die Zellkomposition der untersuchten Proben zu achten und dies in die Beurteilung mit einzubeziehen. Vorteilhaft ist, dass das Ergebnis dieser Methode benutzerunabhängig ist.

Im Zerebellum wurde die Binarisierung zudem über dem gesamten zerebellären Kortex durchgeführt, also ohne Unterscheidung in EGCL, IGCL und MCL. Das liegt daran, dass für eine isolierte Betrachtung einzelner Schichten deren Abgrenzung nötig gewesen wäre, was methodisch zu vielen Störfaktoren unterliegt, um ein genaues Ergebnis garantieren zu können.

6.1.3 Betrachtung der erhobenen Expressionsdaten auch im Regionenvergleich

Die Verteilung der untersuchten Proteine im Laufe der Entwicklung in den unterschiedlichen Regionen des Gehirns gibt einen guten Überblick über die Zeitachse.

Der zusätzliche Vergleich eben dieser Daten im Hinblick auf die ausgewählten Gehirnregionen liefert ausschließlich Vorteile und versorgt uns ohne zusätzlichen methodischen Aufwand mit weiteren Informationen.

6.1.4 Fehlende Differenzierung der Mäuse nach dem Geschlecht

Wie bereits in → 2.2 erläutert wurde in dieser Studie nicht auf die mögliche Auswirkung des Geschlechts auf die Ergebnisse eingegangen, da eine Analyse von Kraus et al. 2012 keinen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Probanden in der Beschaffenheit des 5hmC-Verteilungsmuster aufdecken konnte. Aus der genannten Studie ergab sich die Annahme, dass die Epigenome im Gehirn geschlechterneutral reguliert werden. Natürlich kann man aber einen derartigen Einfluss nicht komplett ausschließen.

6.1.5 Fehlende Differenzierung der Zellen nach dem Zelltyp

Ein kritischer Punkt dieser Studie ist, dass hier die begutachteten Zellen nicht den verschiedenen Zellgruppen des Gehirns (Neuron/Glia) zugeordnet wurden. Somit ist keine Aussage zu machen über mögliche Unterschiede in der Entwicklung zwischen Neuronen und Glia-Zellen. Zu erwähnen ist, dass ausschließlich kortikale Regionen untersucht wurden. Wichtig war in dieser Studie vor allem der Verlauf der Proteinexpression über die Zeit, welcher hauptsächlich durch eine unwahrscheinliche gegenläufige Entwicklung der Glia-

Zellen und Neurone maßgeblich beeinflusst werden würde. Dennoch könnte dies einen Schwachpunkt der Studie darstellen.

6.1.6 Die Größe des Probenkollektivs

Aufgrund eines erwarteten großen Unterschieds der Proteinexpression im Laufe der Entwicklung hielten wir es für angemessen, die Anzahl der pro Altersgruppe zu tötenden Mäuse auf drei zu reduzieren. Dieser Unterschied hat sich auch als signifikant erwiesen, weshalb ein größeres Probenkollektiv, vor allem da es sich um Versuchstiere handelt, eher nicht recht zu fertigen gewesen wäre.

6.1.7 Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman

Zum größten Teil gleichen sich die Informationen, die die Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman preisgeben. Aufgrund der doppelten Bearbeitung der Messwerte (Auszählung und Binarisierung) ist die Wahrscheinlichkeit von unentdeckten Ausreißern unter den Werten oder sehr ungenauen Messwerten gering, weshalb in erster Linie der Pearson'sche Korrelationskoeffizient für diese Arbeit herangezogen wurde. Somit lässt sich der Informationsverlust, welchen der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman mit sich bringen würde, umgehen.

Der Spearman'sche Koeffizient, welcher gegen Ausreißer robust ist, wurde im Anschluss aber dennoch berechnet. Beide Koeffizienten gleichen sich bei der Frage nach der Signifikanz der Korrelationen, abgesehen von drei Ausnahmen. Das Signifikanzniveau wird des Öfteren unterschiedlich bewertet. Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass sich keine markanten Unterschiede feststellen lassen und die Berechnung des Spearman'schen Korrelationskoeffizienten hier eine weitere Informationsquelle darstellt.

6.1.8 Die Maus als Versuchstier in der Grundlagenforschung

Wie weit ähneln wir der Maus, dem Nagetier wirklich und inwiefern lassen sich Studienergebnisse von der Maus auf den Menschen übertragen?

Mit dieser Frage hat sich im Zuge des "*Mouse ENCODE*" Projekts auch ein internationales Konsortium von Forschern weltweit beschäftigt. Dabei kam heraus, dass sich Mensch und Maus zwar 70% der proteinkodierenden Gene teilen, diese machen allerdings nur 1,5% des Erbguts beider Organismen aus. Der Rest entfällt auf nicht kodierende DNA, welcher eine wichtige Regulationsfunktion zugeschrieben wird.^[44] Die Regulation durch nicht kodierende DNA kann sich deswegen drastisch von der des Menschen unterscheiden, was dazu führt, dass unzählige Wirkstoffe, die bei der Maus vielversprechend erscheinen, beim Menschen wirkungslos bleiben. Nichtsdestotrotz bleibt die Maus aufgrund ihrer proteinkodierenden genetischen Ähnlichkeit ein insbesondere für die Grundlagenforschung adäquater und sowieso unentbehrlicher Versuchsorganismus.

6.2 Ergänzungstabellen

Frontal Cortex										
Mouse	Age	Dnmt3a all	Dnmt3a pos	%	Tdg all	Tdg Pos	%	Ki67 all	Ki67 pos	%
1	0	336	250	74,4047619	510	444	87,0588235	530	22	4,1509434
2	0	516	438	84,8837209	502	500	99,6015936	481	19	3,95010395
3	0	500	346	69,2	471	407	86,4118896	605	16	2,6446281
4	7	517	480	92,8433269	340	216	63,5294118	227	10	4,40528634
5	7	508	323	63,5826772	440	362	82,2727273	176	6	3,40909091
6	7	239	234	97,9079498	214	176	82,2429907	186	9	4,83870968
7	15	529	518	97,9206049	515	1	Auseißer	207	6	2,89855072
8	15	207	178	85,9903382	121	99	81,8181818	121	6	4,95867769
9	15	175	157	89,7142857	146	110	75,3424658	136	9	6,61764706
10	30	168	12	7,14285714	132	91	68,9393939	105	0	0
11	30	121	14	11,5702479	264	134	50,7575758	94	1	1,06382979
12	30	119	20	16,8067227	159	0	0	200	0	0
13	120	195	5	2,56410256	99	37	37,3737374	150	0	0
14	120	159	8	5,03144654	99	46	46,4646465	200	0	0
15	120	139	15	10,7913669	103	41	39,8058252	30	0	0
MCL										
Mouse	Age	Dnmt3a all	Dnmt3a pos	%	Tdg all	Tdg pos	%	Ki67 all	Ki67 Pos	%
1	0	27	11	40,7407407	28	24	85,7142857	36	2	5,55555556
2	0	80	35	43,75	109	104	95,412844	51	8	15,6862745
3	0	34	14	41,1764706	44	37	84,0909091	97	12	12,371134
4	7	22	13	59,0909091	25	19	76	59	1	1,69491525
5	7	53	10	18,8679245	24	21	87,5	63	7	11,11111111
6	7	52	22	42,3076923	38	36	94,7368421	42	3	7,14285714
7	15	98	83	84,6938776	88	2	2,27272727	78	1	1,28205128
8	15	56	17	30,3571429	88	65	73,8636364	60	0	0
9	15	58	48	82,7586207	42	4	9,52380952	53	2	3,77358491
10	30	102	11	10,7843137	75	4	5,33333333	200	0	0
11	30	107	11	10,2803738	76	0	0	30	0	0
12	30	56	2	3,57142857	72	0	0	150	0	0
13	120	96	2	2,08333333	53	0	0	50	0	0
14	120	51	0	0	67	0	0	100	0	0
15	120	74	0	0	46	0	0	40	0	0
EGCL										
Mouse	Age	Dnmt3a all	Dnmt3a pos	%	Tdg all	Tdg pos	%	Ki67 all	Ki67 Pos	%
1	0	56	51	91,0714286	201	80	39,800995	226	155	68,5840708
2	0	105	81	77,1428571	280	157	56,0714286	159	135	84,9056604
3	0	117	47	40,1709402	122	51	41,8032787	182	136	74,7252747
4	7	212	5	2,35849057	212	92	43,3962264	234	132	56,4102564
5	7	334	1	0,2994012	247	122	49,3927126	260	152	58,4615385
6	7	163	5	3,06748466	240	117	48,75	188	116	61,7021277
7	15	132	7	5,3030303	60	0	0	46	34	73,9130435
8	15	14	0	0	18	9	50	31	20	64,516129
9	15	100	3	3	29	0	0	32	19	59,375
10	30	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
11	30	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
12	30	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
13	120	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
14	120	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
15	120	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
IGCL										
Mouse	Age	Dnmt3a all	Dnmt3a pos	%	Tdg all	Tdg pos	%	Ki67 all	Ki67 Pos	%
1	0	490	268	54,6938776	422	340	80,5687204	437	133	30,4347826
2	0	370	272	73,5135135	516	460	89,1472868	545	145	26,6055046
3	0	504	359	71,2301587	520	371	71,3461538	428	115	26,8691589
4	7	500	334	66,8	161	114	70,8074534	525	20	3,80952381
5	7	337	215	63,7982196	258	228	88,372093	442	31	7,01357466
6	7	460	337	73,2608696	344	331	96,2209302	525	22	4,19047619
7	15	515	504	97,8640777	512	0	0	510	4	0,78431373
8	15	256	43	16,796875	537	368	68,5288641	500	1	0,2
9	15	553	520	94,0325497	521	37	7,10172745	500	1	0,2
10	30	385	373	96,8831169	417	2	0,47961631	500	1	0,2
11	30	530	520	98,1132075	518	2	0,38610039	500	0	0
12	30	379	374	98,6807388	443	0	0	500	0	0
13	120	356	167	46,9101124	506	0	0	150	0	0
14	120	455	56	12,3076923	372	1	0,2688172	450	0	0
15	120	324	211	65,1234568	504	2	0,3968254	300	0	0

Ergänzungstabelle 1: Auflistung der im Zuge der Quantifizierung von DNMT3a/TDG/Ki67 erhobenen Daten - Auf jedem immunhistochemischen Gewebeschnitt wurde die Gesamtanzahl der Zellen, sowie die Anzahl der positiv gefärbten Zellen ermittelt und deren prozentueller Anteil berechnet. Die Farbkodierung richtet sich nach den in dieser Arbeit für die untersuchten Proteine verwendeten Farbschemata.

Frontal Cortex							
Mouse	Age	5hmC all	5hmC pos	%	5mC all	5mC pos	%
1	0	294	170	57,8	250	241	96,4
2	0	285	182	63,9	250	250	100,0
3	0	310	222	71,6	250	247	98,8
4	7	312	229	73,4	250	247	98,8
5	7	299	219	73,2	250	190	76,0
6	7	290	219	75,5	250	249	99,6
7	15	224	158	70,5	250	250	100,0
8	15	267	192	71,9	250	250	100,0
9	15	265	230	86,8	250	249	99,6
10	30	285	254	89,1	150	150	100,0
11	30	265	223	84,2	150	150	100,0
12	30	256	216	84,4	250	250	100,0
13	120	273	217	79,5	150	140	93,3
14	120	297	274	92,3	150	145	96,7
15	120	261	238	91,2	150	150	100,0
MCL							
Mouse	Age	5hmC all	5hmC pos	%	5mC all	5mC pos	%
1	0	101	32	31,7	90	90	100,0
2	0	109	32	29,4	50	50	100,0
3	0	112	31	27,7	30	30	100,0
4	7	213	102	47,9	50	49	98,0
5	7	78	30	38,5	50	50	100,0
6	7	137	42	30,7	50	50	100,0
7	15	302	164	54,3	50	50	100,0
8	15	223	76	34,1	100	100	100,0
9	15	288	118	41,0	100	100	100,0
10	30	285	177	62,1	30	30	100,0
11	30	312	180	57,7	100	100	100,0
12	30	320	184	57,5	50	50	100,0
13	120	181	88	48,6	30	30	100,0
14	120	265	170	64,2	40	40	100,0
15	120	245	142	58,0	60	60	100,0
EGCL							
Mouse	Age	5hmC all	5hmC pos	%	5mC all	5mC pos	%
1	0	163	2	1,2	150	150	100,0
2	0	56	0	0,0	120	120	100,0
3	0	177	6	3,4	150	150	100,0
4	7	95	7	7,4	250	250	100,0
5	7	87	31	35,6	250	250	100,0
6	7	120	51	42,5	200	200	100,0
7	15	51	24	47,1	80	80	100,0
8	15	59	35	59,3	20	20	100,0
9	15	74	36	48,6	100	100	100,0
10	30	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
11	30	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
12	30	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
13	120	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
14	120	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
15	120	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
IGCL							
Mouse	Age	5hmC all	5hmC pos	%	5mC all	5mC pos	%
1	0	376	167	44,4	250	250	100,0
2	0	299	135	45,2	250	240	96,0
3	0	341	155	45,5	150	150	100,0
4	7	299	148	49,5	250	250	100,0
5	7	303	135	44,6	250	240	96,0
6	7	289	143	49,5	250	250	100,0
7	15	385	207	53,8	250	250	100,0
8	15	281	134	47,7	250	250	100,0
9	15	261	162	62,1	250	250	100,0
10	30	253	172	68,0	250	250	100,0
11	30	266	176	66,2	250	250	100,0
12	30	299	218	72,9	250	250	100,0
13	120	289	168	58,1	250	250	100,0
14	120	267	189	70,8	250	250	100,0
15	120	269	162	60,2	250	250	100,0

Ergänzungstabelle 2: Auflistung der im Zuge der Quantifizierung von 5hmC/5mC erhobenen Daten - Auf jedem immunhistochemischen Gewebeschnitt wurde die Gesamtanzahl der Zellen, sowie die Anzahl der positiv gefärbten Zellen ermittelt und deren prozentueller Anteil berechnet.

0										
Mouse	Locus	Dnmt3a all	Dnmt3a pos	%	Tdg all	Tdg Pos	%	Ki67 all	Ki67 pos	%
1	1	336	250	74,4047619	510	444	87,1	530	22	4,1509434
2	1	516	438	84,88372093	502	500	99,6	481	19	3,95010395
3	1	500	346	69,2	471	407	86,4	605	16	2,6446281
1	2	27	11	40,74074074	28	24	85,7142857	36	2	5,55555556
2	2	80	35	43,75	109	104	95,412844	51	8	15,6862745
3	2	34	14	41,17647059	44	37	84,0909091	97	12	12,371134
1	3	56	51	91,07142857	201	80	39,800995	226	155	68,5840708
2	3	105	81	77,14285714	280	157	56,0714286	159	135	84,9056604
3	3	117	47	40,17094017	122	51	41,8032787	182	136	74,7252747
1	4	490	268	54,69387755	422	340	80,6	437	133	30,4347826
2	4	370	272	73,51351351	516	460	89,1	545	145	26,6055046
3	4	504	359	71,23015873	520	371	71,3	428	115	26,8691589

7										
Mouse	Locus	Dnmt3a all	Dnmt3a pos	%	Tdg all	Tdg Pos	%	Ki67 all	Ki67 pos	%
1	1	517	480	92,84332689	340	216	63,5	227	10	4,40528634
2	1	508	323	63,58267717	440	362	82,3	176	6	3,40909091
3	1	239	234	97,90794979	214	176	82,2	186	9	4,83870968
1	2	22	13	59,09090909	25	19	76	59	1	1,69491525
2	2	53	10	18,86792453	24	21	87,5	63	7	11,11111111
3	2	52	22	42,30769231	38	36	94,7368421	42	3	7,14285714
1	3	212	5	2,358490566	212	92	43,3962264	234	132	56,4102564
2	3	334	1	0,299401198	247	122	49,3927126	260	152	58,4615385
3	3	163	5	3,067484663	240	117	48,75	188	116	61,7021277
1	4	500	334	66,8	161	114	70,8	525	20	3,80952381
2	4	337	215	63,79821958	258	228	88,4	442	31	7,01357466
3	4	460	337	73,26086957	344	331	96,2	525	22	4,19047619

15										
Mouse	Locus	Dnmt3a all	Dnmt3a pos	%	Tdg all	Tdg Pos	%	Ki67 all	Ki67 pos	%
1	1	529	518	97,92060491	250	250	0,2	515	1	2,89855072
2	1	207	178	85,99033816	250	250	81,8	121	99	4,95867769
3	1	175	157	89,71428571	250	249	75,3	146	110	6,61764706
1	2	98	83	84,69387755	88	2	2,27272727	78	1	1,28205128
2	2	56	17	30,35714286	88	65	73,8636364	60	0	0
3	2	58	48	82,75862069	42	4	9,52380952	53	2	3,77358491
1	3	132	7	5,303030303	60	0	0	46	34	73,9130433
2	3	14	0	0	18	9	50	31	20	64,516129
3	3	100	3	3	29	0	0	32	19	59,375
1	4	515	504	97,86407767	512	0	0,0	510	4	0,78431373
2	4	256	43	16,796875	537	368	68,5	500	1	0,2
3	4	553	520	94,03254973	521	37	7,1	500	1	0,2

30										
Mouse	Locus	Dnmt3a all	Dnmt3a pos	%	Tdg all	Tdg Pos	%	Ki67 all	Ki67 pos	%
1	1	168	12	7,142857143	150	150	68,9	132	91	0
2	1	121	14	11,57024793	150	150	50,8	264	134	1,06382979
3	1	119	20	16,80672269	250	250	0,0	159	0	0
1	2	102	11	10,78431373	75	4	5,33333333	200	0	0
2	2	107	11	10,28037383	76	0	0	30	0	0
3	2	56	2	3,571428571	72	0	0	150	0	0
1	4	385	373	96,88311688	417	2	0,47961631	500	1	0,2
2	4	530	520	98,11320755	518	2	0,38610039	500	0	0
3	4	379	374	98,68073879	443	0	0	500	0	0

120										
Mouse	Locus	Dnmt3a all	Dnmt3a pos	%	Tdg all	Tdg Pos	%	Ki67 all	Ki67 pos	%
1	1	195	5	2,564102564	150	140	37,4	99	37	0
2	1	159	8	5,031446541	150	145	46,5	99	46	0
3	1	139	15	10,79136691	150	150	39,8	103	41	0
1	2	96	2	2,083333333	53	0	0	50	0	0
2	2	51	0	0	67	0	0	100	0	0
3	2	74	0	0	46	0	0	40	0	0
1	4	356	167	46,91011236	506	0	0	150	0	0
2	4	455	56	12,30769231	372	1	0,2688172	450	0	0
3	4	324	211	65,12345679	504	2	0,3968254	300	0	0

Ergänzungstabelle 3: Auflistung der im Zuge der Quantifizierung von DNMT3a/TDG/Ki67 erhobenen Daten zur Bestimmung der Expressionsprofile im Regionenvergleich - Auf jedem immunhistochemischen Gewebeschnitt wurde die Gesamtanzahl der Zellen, sowie die Anzahl der positiv gefärbten Zellen ermittelt und deren prozentueller Anteil berechnet.

Die Farbkodierung richtet sich nach den in dieser Arbeit für die unterschiedlichen Entwicklungsstadien verwendeten Farbschemata. Locus: 1=frontaler Kortex, 2=MCL, 3=EGCL, 4=IGCL

Frontal Cortex							
Mouse	Age	FV Dnmt3a %	AV Dnmt3a %	FV Tdg %	AV Tdg %	FV Ki67 %	AV Ki67 %
1	0	keine Daten	74,404762	19,5714864	87,058824	0,7124613	4,1509434
2	0	50,6263422	84,883721	18,1081459	99,601594	0,8703328	3,950104
3	0	14,9386598	69,2	3,4679089	86,41189	1,8021504	2,6446281
4	7	18,7175295	92,843327	3,6557392	63,529412	0,6576071	4,4052863
5	7	8,9065494	63,582677	5,2916393	82,272727	0,1453937	3,4090909
6	7	13,1048024	97,90795	4,7098234	82,242991	0,4014803	4,8387097
7	15	25,1285155	97,920605	0	0,1941748	0,8283382	2,8985507
8	15	7,12405	85,990338	0,3317773	81,818182	0,2454574	4,9586777
9	15	7,8209592	89,714286	0,4670441	75,342466	0,8425641	6,6176471
10	30	0,4008976	7,1428571	1,7811331	68,939394	0,2403135	0
11	30	0,9920367	11,570248	0,1867051	50,757576	0,0365694	1,0638298
12	30	0,810395	16,806723	0,0332742	0	0,3625801	0
13	120	0,3812867	2,5641026	0,0609223	37,373737	0	0
14	120	0,0499113	5,0314465	0,1834098	46,464646	0	0
15	120	0,2235961	10,791367	1,0820538	39,805825	0,0566023	0
Cerebellum							
Mouse	Age	FV Dnmt3a %	AV Dnmt3a %	FV Tdg %	AV Tdg %	FV Ki67 %	AV Ki67 %
1	0	35,8023739	57,59162304	8,9542906	68,202765	21,3176173	41,4878398
2	0	31,2099745	69,90990991	16,3277362	79,6685083	15,3918597	38,1456954
3	0	21,3310797	64,1221374	8,3730373	66,909621	15,3918597	37,1994342
4	7	15,3238044	47,95640327	1,3485687	56,5326633	8,7851268	18,7041565
5	7	2,4283721	31,21546961	2,8505684	70,1323251	7,8572072	24,8366013
6	7	19,3924167	53,92592593	8,7488587	77,8135048	9,6923103	18,6754967
7	15	43,8915358	79,73154362	0	0,3030303	3,4767499	6,15141956
8	15	0,2478685	18,40490798	3,862216	68,7402799	1,3541948	3,55329949
9	15	48,6155852	80,30942335	0,0348013	6,92567568	0,7271292	3,76068376
10	30	21,5307248	78,85010267	0,2038244	1,2195122	0,0273869	0,14285714
11	30	25,9985469	83,35949765	0	0,33670034	0	0
12	30	16,7549156	86,43678161	0,029577	0	0	0
13	120	0,886347	37,38938053	0,3396538	0	0,0311041	0
14	120	0,131007	11,06719368	0,0646194	0,22779043	0	0
15	120	1,8915648	53,01507538	0,5323869	0,36363636	0,0639363	0

Ergänzungstabelle 4: Auflistung der im Zuge der Binarisierung von DNMT3a/TDG/Ki67 erhobenen Daten - Es wurde der Anteil der positiv gefärbten Fläche und deren Anteil an der Gesamtfläche (→ *FV*, *Flächenverhältnis*) ermittelt. *AV* (*absolutes Verhältnis*) bezeichnet das Verhältnis der Anzahl der positiven gefärbten Zellen zur Gesamtanzahl der Zellen auf einem Schnitt.

Die Farbkodierung richtet sich nach den in dieser Arbeit für die untersuchten Proteine verwendeten Farbschemata.

6.3 Abkürzungen

5caC	5-Carboxylcytosin	[12]
5fC	5-Formylcytosine	[12]
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin	[12]
5hmU	5-Hydroxymethyluracil	[12]
5mC	5-Methylcytosin	[12]
Abb.	Abbildung	[9]
AID/APOBEC	Aktivierungsinduzierte Cytidine Deaminase/ Apolipoprotein B mRNA <i>Editing</i> Enzym	[12]
AV	absolutes Verhältnis	[90]
BER	Basenexzisionsreparatur	[12]
C	Cytosin	[10]
<i>De-novo</i> DNMT	<i>De-novo</i> DNA Methyltransferase	[12]
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure	[9]
DNMT	DNA-Methyltransferase	[12]
EdU	5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine	[19]
EGCL	<i>External granular cell layer</i> = äußere Körnerzellschicht	[18]
FFPE	<i>Formalin-fixed-Paraffin-embedded</i>	[23]
FV	Flächenverhältnis	[90]
G	Guanin	[10]
HDAC	Histon-Deacetylase	[13]
HP1	Heterochromatin Protein 1	[16]
IGCL	<i>Internal granular cell layer</i> = innere Körnerschicht	[18]
<i>Maintenance</i> DNMT	<i>Maintenance</i> DNA Methyltransferase	[12]
MBD2b	Methyl-CpG- <i>binding-domain</i> Protein 2b	[13]
Mbd4	Methyl-CpG- <i>binding-domain</i> -protein 4	[14]
MCL	<i>Molecular cell layer</i> = Molekularschicht	[18]
MeCBP	Methyl-CpG- <i>binding</i> -Protein	[16]
Mittel	arithmetisches Mittel	[28]
pn	postnatal	[29]
PP1	Protein-Phosphatase 1	[11]
PTM	post-translationale Modifikation	[14]
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure	[17]
SAH	S-Adenosylhomocystein	[11]
SAM	S-Adenosylmethionin	[11]
SEM	Standardmessfehler	[28]
SMUG1	<i>Strand-selective monofunctional</i> Uracil-DNA Glykosylase 1	[13]
SUMO	<i>Small-Ubiquitin-like-modifier</i>	[17]
T	Thymin	[13]
Tab.	Tabelle	[22]
TDG	Thymine-DNA-Glykosylase	[13]
TET1	Ten-Eleven-Translokase 1	[12]

6.4 Quellenverzeichnis

Teile der hier präsentierten Arbeit haben zu folgender Publikation beigetragen, welche im Text nicht durch eine Zahl, sondern durch [P] gekennzeichnet ist:

[P] Kraus, T.F., et al., Profiling of methylation and demethylation pathways during brain development and ageing. *J Neural Transm* (Vienna), 2016. **123**(3): p. 189-203.

J Neural Transm (2016) 123:189–203
DOI 10.1007/s00702-015-1469-2



NEUROLOGY AND PRECLINICAL NEUROLOGICAL STUDIES - ORIGINAL ARTICLE

Profiling of methylation and demethylation pathways during brain development and ageing

Theo F. J. Kraus¹ · Selma Kilinc¹ · Martina Steinmaurer¹ · Marc Stieglitz¹ ·
Virginie Guibourt¹ · Hans A. Kretzschmar¹

6.4.1 Literatur

1. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: a landscape takes shape*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 635-8.
2. GRAW, J., *Epigenetik*, in *Genetik*. 2015.
3. Heard, E., et al., *Ten years of genetics and genomics: what have we achieved and where are we heading?* *Nat Rev Genet*, 2010. **11**(10): p. 723-33.
4. Delcuve, G.P., M. Rastegar, and J.R. Davie, *Epigenetic control*. *J Cell Physiol*, 2009. **219**(2): p. 243-50.
5. Illingworth, R., et al., *A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci*. *PLoS Biol*, 2008. **6**(1): p. e22.
6. Miller, C.A. and J.D. Sweatt, *Covalent modification of DNA regulates memory formation*. *Neuron*, 2007. **53**(6): p. 857-69.
7. Phillips, T., *The Role of Methylation in Gene Expression*. *Nature Education*, 2008. **1**(1): p. 1.
8. Guo, J.U., et al., *Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain*. *Cell*, 2011. **145**(3): p. 423-34.
9. Lee, J., et al., *Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells*. *Development*, 2002. **129**(8): p. 1807-17.
10. Mayer, W., et al., *Demethylation of the zygotic paternal genome*. *Nature*, 2000. **403**(6769): p. 501-2.

11. Branco, M.R., G. Ficz, and W. Reik, *Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome*. Nat Rev Genet, 2011. **13**(1): p. 7-13.
12. Bhattacharya, S.K., et al., *A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA*. Nature, 1999. **397**(6720): p. 579-83.
13. Tse, C., et al., *Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4629-38.
14. Wang, X., et al., *Effects of histone acetylation on the solubility and folding of the chromatin fiber*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12764-8.
15. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
16. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
17. Kriaucionis, S. and N. Heintz, *The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain*. Science, 2009. **324**(5929): p. 929-30.
18. Kraus, T.F., V. Guibourt, and H.A. Kretzschmar, *5-Hydroxymethylcytosine, the "Sixth Base", during brain development and ageing*. J Neural Transm (Vienna), 2015. **122**(7): p. 1035-43.
19. Globisch, D., et al., *Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15367.
20. Munzel, M., et al., *Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(31): p. 5375-7.
21. Spruijt, C.G., et al., *Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives*. Cell, 2013. **152**(5): p. 1146-59.
22. Scheiffele, P., *Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS*. Annu Rev Neurosci, 2003. **26**: p. 485-508.
23. Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*. Cell, 1992. **69**(6): p. 915-26.
24. Cortellino, S., et al., *Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair*. Cell, 2011. **146**(1): p. 67-79.
25. Cortazar, D., et al., *The enigmatic thymine DNA glycosylase*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(4): p. 489-504.

26. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
27. Tsai, L.H. and J.G. Gleeson, *Nucleokinesis in neuronal migration*. Neuron, 2005. **46**(3): p. 383-8.
28. Butts, T., M.J. Green, and R.J. Wingate, *Development of the cerebellum: simple steps to make a 'little brain'*. Development, 2014. **141**(21): p. 4031-41.
29. Yacubova, E. and H. Komuro, *Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration*. Cell Biochem Biophys, 2003. **37**(3): p. 213-34.
30. Robertson, K.D., *DNA methylation and human disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 597-610.
31. Tremblay, J. and P. Hamet, *Impact of genetic and epigenetic factors from early life to later disease*. Metabolism, 2008. **57 Suppl 2**: p. S27-31.
32. Gronbaek, K., C. Hother, and P.A. Jones, *Epigenetic changes in cancer*. APMIS, 2007. **115**(10): p. 1039-59.
33. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1148-59.
34. Dietinger, V., *Overexpression of TET-Enzymes in Glioblastoma and its Epigenomic Impact* in Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung 2015, LMU München.
35. Fenaux, P., *Inhibitors of DNA methylation: beyond myelodysplastic syndromes*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2 Suppl 1**: p. S36-44.
36. Kraus, T.F., et al., *Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the "sixth base," are associated with anaplasia in human brain tumors*. Int J Cancer, 2012. **131**(7): p. 1577-90.
37. Kohli, R.M. and Y. Zhang, *TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 472-9.
38. Schomacher, L., et al., *Neil DNA glycosylases promote substrate turnover by Tdg during DNA demethylation*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(2): p. 116-124.
39. Muller, U., et al., *TET-mediated oxidation of methylcytosine causes TDG or NEIL glycosylase dependent gene reactivation*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(13): p. 8592-604.
40. Jia, Y., et al., *Negative regulation of DNMT3A de novo DNA methylation by frequently overexpressed UHRF family proteins as a mechanism for widespread DNA hypomethylation in cancer*. Cell Discov, 2016. **2**: p. 16007.
41. Wu, H. and Y. Zhang, *Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation*. Genes Dev, 2011. **25**(23): p. 2436-52.

42. Franchini, D.M., K.M. Schmitz, and S.K. Petersen-Mahrt, *5-Methylcytosine DNA demethylation: more than losing a methyl group*. *Annu Rev Genet*, 2012. **46**: p. 419-41.
43. Szulwach, K.E., et al., *Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(6): p. e1002154.
44. Pervouchine, D.D., et al., *Enhanced transcriptome maps from multiple mouse tissues reveal evolutionary constraint in gene expression*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 5903.

Danksagung

Eine jede wissenschaftliche Arbeit, mit einem Umfang ähnlich dieser, ist nicht einzig das Ergebnis eines motivierten Doktoranden, sondern eines effizienten Teams und einer Anzahl an unverzichtbaren Unterstützern, denen mein größter Dank und Respekt gebührt. Darum möchte ich die Gelegenheit nutzen, um an dieser Stelle meiner Anerkennung Ausdruck zu verleihen.

Natürlich bedanke ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Armin Giese, für seine Bereitschaft diese Arbeit zu inspizieren, zu prüfen und zu bewerten. Ich bedanke mich für Ihr Vertrauen und besonders für Ihre Ehrlichkeit, sowie natürlich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung anzufertigen und auch abzuschließen.

Besonders großer Dank gebührt Dr. Theo Kraus, dem engagierten Betreuer dieser Arbeit, vertrauenswürdigen Mentor und inzwischen auch Freund. Danke, dass du mir in meinem wissenschaftlichen Eifer in jungen Jahren die Möglichkeit gegeben hast in deiner Arbeitsgruppe am ZNP erste Erfahrung in der Forschung zu sammeln und danke, dass ich schlussendlich auch meine Doktorarbeit unter deiner Obhut verfassen durfte.

Danke für viele geduldige Stunden in deinem Büro. Danke für ein allzeit offenes Ohr. Danke für deinen stets wertgeschätzten Rat und danke für zwei lehrreiche Jahre am ZNP.

Weiters möchte ich mich ganz herzlich bei meiner sympathischen und hilfsbereiten Arbeitsgruppe der AG Kraus bedanken, auf die ich mich während meiner Zeit am ZNP stets verlassen konnte. Danke Virginie, Ani, Luisa, Vanessa und ein besonderes "Danke" an alle Mitarbeiter der Diagnostik und Histologie des ZNPs.

Ich hoffe, mit dieser Arbeit einen weiteren wichtigen Schritt auf dem Weg in meine persönliche Zukunft getan zu haben. Die Gedanken voller Visionen, Eifer und Ehrgeiz, ist es mir umso wichtiger mich selbst daran zu erinnern, dass ein jeder Lebensabschnitt ohne die Menschen, die einem nahe stehen unerfüllt bleiben würde. Deswegen ein aufrichtiges "Dankeschön" an meine Eltern, auf deren Unterstützung ich jederzeit zählen kann, wofür ich ihnen unendlich dankbar bin und an meine liebe Freundin Marlene, die auch diesen Abschnitt zu einem Unvergesslichen und Lebenswerten gemacht haben.

Eidesstattliche Versicherung

Steinmaurer Martina

Name, Vorname

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

„Analyse der Methylierungs- und Demethylierungsregulation während der zerebralen
Entwicklung durch Immunhistochemie“

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

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

München, 02.12.2021
Ort und Datum

Martina Steinmaurer
Unterschrift Doktorandin