

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

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

Stephanie Nicole Zimmermann
aus

Erlangen

2011

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,

.....

(Unterschrift des Autors / der Autorin)

Dissertation eingereicht am 17. November 2011

1. Gutachter: Prof. F. Holsboer

2. Gutachter: Prof. H. Zorbass

Mündliche Prüfung am 26. März 2011

Publikationen

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

Zimmermann N, Zschocke J, Perisic T, Yu S, Holsboer F, Rein T. Mechanistic aspects of antidepressants' action on DNA methyltransferases.

Veröffentlichungen, die im Laufe der Doktorarbeit entstanden sind:

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

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

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

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

Danksagung

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

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

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

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

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

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

Inhalt

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

3.2.3	Dialyse	44
3.2.4	Gelfiltration mit „Bio Spin 6“-Säulen	45
3.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.2.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot.....	46
3.2.7	Messung der enzymatischen Aktivität von DNA-Methyltransferasen.....	47
3.3	DNA- und RNA-Analytik	48
3.3.1	Aufreinigung genomischer DNA.....	48
3.3.2	Aufreinigung von DNA mit Glasmilch	48
3.3.3	Aufreinigung von biotinylierten Oligonukleotiden mit Streptavidin-gekoppelten <i>Beads</i>	49
3.3.4	Aufreinigung von RNA	50
3.3.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	51
3.3.6	Agarosegelelektrophorese	51
3.3.7	Enzymatische Spaltung von DNA	52
3.3.8	Sonifizierung von DNA.....	52
3.3.9	Herstellung von doppelsträngigen hemi- und unmethylierten Oligonukleotiden.....	53
3.3.10	Standard-PCR	53
3.3.11	Reverse Transkription	53
3.3.12	Relative Quantifizierung von DNA und cDNA mittels Real-Time PCR.....	54
3.3.13	Analyse der DNA-Methylierung.....	56
3.3.14	Amplifizierung des gesamten Genoms unter Verwendung des WGA2-Kits	58
3.4	Auswertungen und statistische Tests	58
3.4.1	Western-Blots.....	58
3.4.2	DNMT-Aktivitätsmessungen	59
3.4.3	MeDIP-Array.....	59
4	Ergebnisse	60
4.1	Einfluss des Stresshormons Dexamethason auf das Methylom primärer Astrozyten	60
4.1.1	Zellmodell und Behandlungszeitraum	60
4.1.2	Etablierung der MeDIP-Methode	63
4.1.3	Herstellung der DNA-Proben	68
4.1.4	Validierung der Arraydaten	71
4.1.5	Kandidatengene	75
4.2	Mechanistische Aspekte der Regulation von DNMT1 durch Antidepressiva	81

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

1 Einleitung

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

1.1 Die molekularen Grundlagen der Stressantwort

1.1.1 Die HPA-Achse

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

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

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

1.1.2 Funktionsweise der Glukokortikoide und ihrer Rezeptoren

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

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

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

1.2 Epigenetik

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

1.2.1 Der Aufbau des Chromatins

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

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

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

1.2.2 Histonmodifikationen

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

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

1.2.3 DNA-Methylierung

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

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

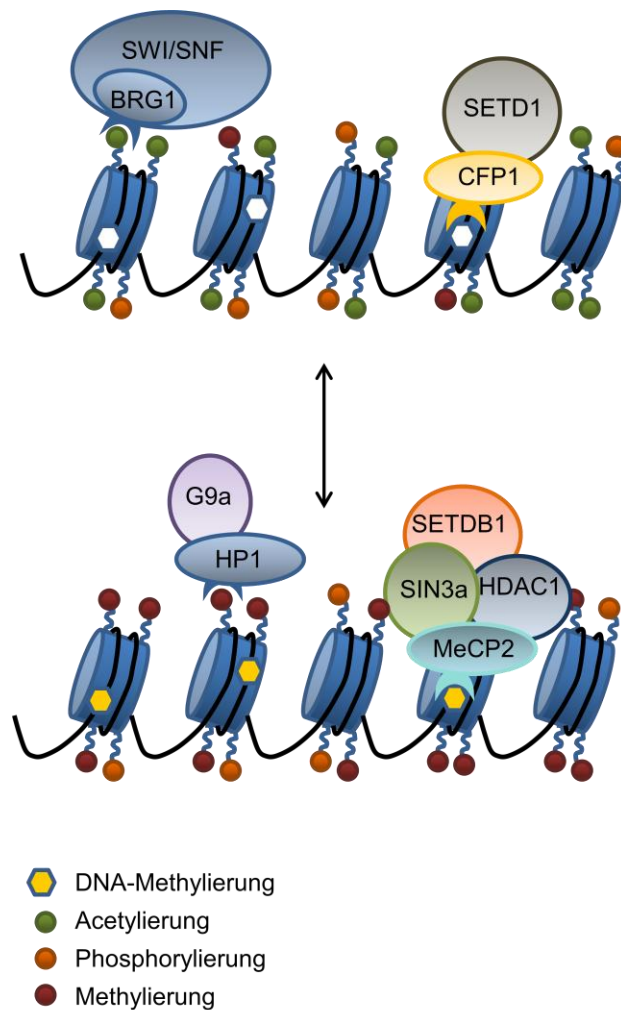


Abbildung 1.1 Chromatin liegt in unterschiedlichen funktionellen Zuständen vor. In eukaryotischen Zellen liegt die DNA in einem Komplex mit Histonen und chromosomalen nicht-Histon-Proteinen vor. Histonmodifikationen und DNA-Methylierung dienen als Bindestelle für Effektorproteine, *Chromatin Remodeling*-Komplexe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

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

Die DNA-Methylierung dient also als spezifisches Erkennungsmerkmal für Faktoren, die Einfluss auf die Genexpression nehmen. An 5MeC bindende Proteine rekrutieren

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

1.2.4 Chromatin-modifizierende Enzyme

1.2.4.1 DNA-Methyltransferasen

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

DNA-Methyltransferase 1

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

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

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

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

Die DNA-Methyltransferase 3-Familie

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

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

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

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

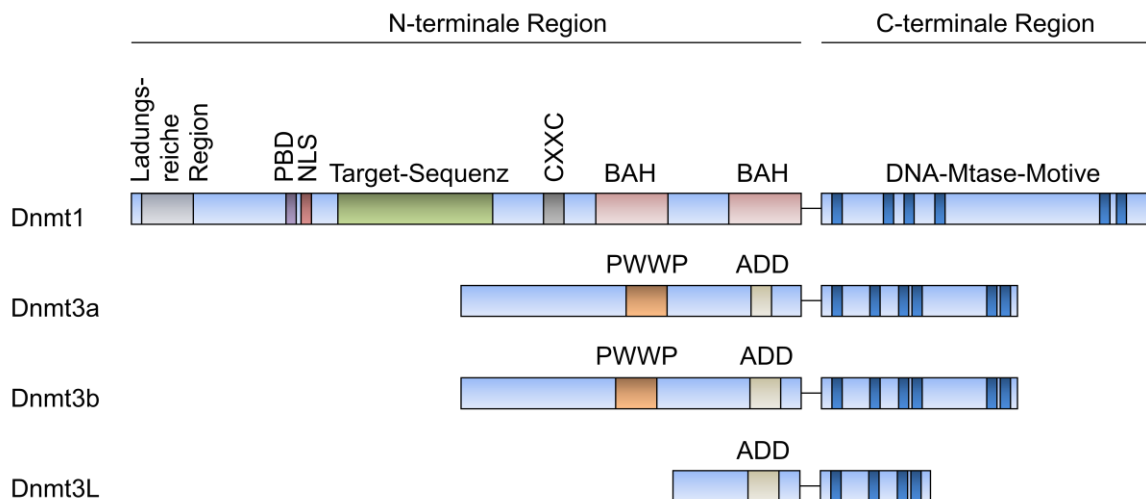


Abbildung 1.2 Domänenstruktur der DNA-Methyltransferasen von Säugetieren. Abgebildet sind konservierte Motive der C-terminalen, katalytischen Domäne (dunkelblau markiert) sowie funktionelle Domänen der N-terminalen Region (differenziert dargestellt). Die mit Replikationsfoci interagierende Region wird Target-Sequenz genannt. PBD, an PCNA bindende Domäne; NLS, nukleäres Lokalisationssignal; CXXC, Zn^{2+} -bindende Domäne des Typs CXXC (C steht für Cystein, X für eine beliebige Aminosäure); BAH, Bromo adjacent homology-Domäne; PWWP, Domäne mit konserviertem Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin-Motiv; ADD, ATRX-DNMT3-DNMT3L-Domäne; DNA-Mtase-Motive, DNA-Methyltransferase-Motive. (Verändert nach Jurkowska u. a. 2011)

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

1.2.4.2 Histonmethyltransferasen

Histone werden an Lysin- und Argininresten methyliert. Lysine können bis zu drei und Arginine bis zu zwei Methylgruppen tragen. Die HMTs werden in verschiedene Klassen eingeteilt: Lysin-Methyltransferasen mit SET-Domäne, Lysin-Methyltransferasen ohne SET-Domäne und Arginin-Methyltransferasen (Shilatifard, 2006). Die an der Histonmethylierung beteiligte SET-Domäne erhielt ihren Namen von den Drosophila-Proteinen *Su(var)3-9*, *Enhancer of zeste [E(z)]* and *trithorax* (SET). Zu den

Histonmethyltransferasen mit SET-Domäne gehören die transkriptionsaktivierenden SETD7- und MLL- (*Mixed lineage leukemia*) Enzyme sowie die transkriptionsreprimierenden SUV39H1/2- (*Suppressor of variegation 3–9 homologue 1/2*), SETDB1- (*SET domain bifurcated 1*), G9a- und GLP-Enzyme. Nur wenige Lysin-Methyltransferasen enthalten keine SET-Domäne, wie beispielsweise das für die transkriptionelle Repression der Telomere essentielle DOT1I (*DOT1-like*) (Bhaumik u. a., 2007).

Die Histonmethyltransferase G9a

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

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

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

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

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

1.2.5 Epigenetik im adulten Nervensystem

1.2.5.1 Histonmodifikationen und DNA-Methylierung im adulten Nervensystem

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

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

1.2.5.2 Epigenetische Aspekte der Depression

Die Auswirkung von Stress auf die DNA Methylierung

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

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

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

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

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

Klinische Studien

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

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

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

Epigenetische Wirkmechanismen von Antidepressiva

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

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

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

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

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

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

1.3 Zielsetzung

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

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

2 Material

2.1 Chemikalien und Lösungen

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

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

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

2.2 Enzyme

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

2.3 Marker

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

2.4 Kits und gebrauchsfertige Materialien

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

2.5 Antikörper

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

2.6 Oligonukleotide

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

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

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

2.7 Verbrauchsmaterial

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

2.8 Geräte

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

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

Zentrifugen

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

2.9 Software

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

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung primärer Zellen

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

3.1.2 Beschichten von Plastikplatten und Deckgläschen für die Primärzellkultur

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

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

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

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

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

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

3.1.3.1 Primäre Neuronen

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

Lösungen:

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

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

3.1.3.2 Primäre Astrozyten

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

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

Lösungen:

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

3.1.3.3 Primäre neurale Stammzellen

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

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

Lösungen:

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

3.1.4 Messung des Zellüberlebens

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

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

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

3.1.4.1 LDH-Test

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

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

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

3.1.4.2 MTT-Test

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

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

Lösungen:

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

3.1.5 Immunfluoreszenzfärbungen

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

Lösungen:

3x Lysispuffer: 60 mM Tris/HCl pH 6,8
 2% SDS
 10% Sacharose

Der 1x Lysispuffer wurde vor Gebrauch mit Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt.

Gesamtzellextrakte, die für DNMT-Aktivitätsmessungen verwendet wurden, wurden mit hypertonem Puffer (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) hergestellt. Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden in hypertonem Puffer resuspendiert (2×10^6 Zellen/30 μ l Puffer) und die Zellsuspension sonifiziert.

3.2.1.2 Nukleäre Extrakte

Adherente Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin-EDTA (37°C, 2-5 Min.) von der Zellkulturflasche abgelöst. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium inhibiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (200 g, 4 Min.) und einmal mit PBS gewaschen. $2-4 \times 10^6$ Zellen wurden in 100 μ l hypotonem Lysispuffer resuspendiert, auf Eis für 10 Min. inkubiert und anschließend kurz gevortext. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (7000 g, 1 Min.) sedimentiert und in hypertonem Lysispuffer resuspendiert. Es folgte eine fünfzehnminütige Inkubation auf Eis, die 5 Vortexschritte (alle 3 Min.) zu je 5 Sek. beinhaltete. Schließlich wurde die Suspension zentrifugiert (12000 g, 15 Min., 4°C) und der Überstand aufbewahrt.

Im Falle der Salzreihe wurde das nukleäre Pellet mit Puffern ansteigender Salzkonzentrationen (100-400 mM NaCl) inkubiert. Nach dem letzten Salzextraktionsschritt wurde das nukleäre Pellet in Zelllysispuffer gelöst, bei 95°C für 5 Min. inkubiert und sonifiziert.

Lösungen:

Hypotoner Puffer: 10 mM HEPES pH 7,4
 10 mM KCl
 0,5 mM EDTA
 0,1% NP40 (Igepal)
 10% Glycerol

Hypertoner Puffer:	20 mM Tris pH7,4
	100-400 mM NaCl
	5 mM EDTA
	0,1% NP40 (Igepal)
	10% Glycerol

Beide Puffer wurden vor Gebrauch mit DTT (Endkonzentration 1 mM) und Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.2.2.1 Absorptionsmessung

Diese Methode basiert auf der Extinktion der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm. Nucleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, absorbieren aber auch bei 280 nm und können die Messung daher stören. Die Proteinkonzentration (c) wurde durch folgende Formel berechnet:

$$c = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260} \quad \frac{mg}{ml}$$

3.2.2.2 BCA-Kit

Cu²⁺ wird in alkalischem Medium durch Proteine zu Cu⁺ reduziert (Biuret-Reaktion). Der BCA-Assay beruht auf der Kombination dieser Reaktion mit der äußerst sensitiven und selektiven colorimetrischen Detektion von Cu⁺ durch das wasserlösliche Natriumsalz der Bicinchoninsäure. Das Absorptionsmaximum des Reaktionsprodukts liegt bei 562 nm. Der BCA-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messungen erfolgten in 96-Well Platten an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät.

3.2.3 Dialyse

Um niedermolekulare Substanzen, insbesondere S-Adenosylhomocystein (SAH) zu entfernen, wurde nukleärer Extrakt (100 μ l) mit 3 Pufferwechseln gegen insgesamt 1,5 l DNMT-Assay-Puffer dialysiert. Es wurde dreimal gegen 0,5 l DNMT-Assay-Puffer für je 30 Min. im Kühlraum dialysiert. Vor Gebrauch wurden die Dialyseschläuche für mindestens 30 Min. in ddH₂O eingeweicht.

3.2.4 Gelfiltration mit „Bio Spin 6“-Säulen

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

3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

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

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

Lösungen:

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

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

3.2.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot

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

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

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

Lösungen:

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

3.2.7 Messung der enzymatischen Aktivität von DNA-Methyltransferasen

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

Lösungen:

DNMT-Assay-Puffer:	20 mM Tris pH 7,8
	10% Glycerol
	5 mM EDTA

Vor Gebrauch wurde der DNMT-Assay-Puffer mit 1 mM DTT und 0,2 mM PMSF versetzt.

3.3 DNA- und RNA-Analytik

3.3.1 Aufreinigung genomischer DNA

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 3 ml pro 5×10^7 Zellen Lysispuffer resuspendiert. Danach wurde 100 μ l 20%-iges SDS hinzugegeben und gemischt. Bei diesem Schritt wurden Zell- und Kernmembran zerstört und die DNA wurde frei. Darauf folgend wurde 150 μ l Proteinase K (4 mg/ml) zugegeben und für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Dies führte zu einem Verdau der Proteine, welche anschließend durch hinzupipettieren von 1 ml 5 M NaCl ausgefällt wurden. Der Ansatz wurde anschließend auf einem Vortexschüttler kräftig gemischt und sodann 30 Min. auf Eis inkubiert. In den zwei folgenden Zentrifugationsschritten (15 Min., 1800 g) wurden die Proteine sedimentiert und entfernt. Der Überstand wurde mit 0,6 Volumenanteilen eiskaltem Isopropanol versetzt und langsam gemischt. Dies führte zum Ausfallen der DNA. Die DNA wurde nun mit einer Pasteurpipette mit Hähchen herausgefischt, zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und über Nacht bei 4°C in 200 μ l TE-Puffer oder H₂O gelöst.

Lösungen

TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,4
	1 mM EDTA

Lysispuffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0
	400 mM NaCl
	10 mM EDTA

3.3.2 Aufreinigung von DNA mit Glasmilch

DNA bindet an Silika unter Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotropen Salzes und eluiert bei niedrigen Salzkonzentrationen. Der Mechanismus dieser Bindung ist ungeklärt. Es wird vermutet, dass chaotropes Salz die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wasser und der Silika Matrix stört und die

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

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

Lösungen:

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

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

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

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

Lösungen:

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

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

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

3.3.4 Aufreinigung von RNA

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

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

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

3.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.3.5.1 Absorptionsmessung

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

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

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

3.3.5.2 Auf Fluoreszenz basierende Konzentrationsmessung mit PicoGreen

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

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

3.3.6 Agarosegelelektrophorese

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

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

Lösungen:

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

3.3.7 Enzymatische Spaltung von DNA

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

Das Restriktionsenzym AluI erkennt die Sequenz 5'AGCT3'; MseI erkennt die Sequenz 5'TTAA3'. Die Reaktionsansätze enthielten 5 µg genomische DNA, 5 µl NEB-Puffer 4 und 10 Units AluI/MseI-Enzym in einem Endvolumen von 50 µl. Im Falle von MseI enthielten die Ansätze außerdem 5 µg BSA. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme durch zwanzigminütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Schließlich wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.3.8 Sonifizierung von DNA

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

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

3.3.9 Herstellung von doppelsträngigen hemi- und unmethylierten Oligonukleotiden

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

3.3.10 Standard-PCR

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

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

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

Die Qualität der amplifizierten DNA wurde anhand einer Gelelektrophorese überprüft.

3.3.11 Reverse Transkription

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Die relativen Mengen zweier Loci wurden analog berechnet:

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

3.3.13 Analyse der DNA-Methylierung

3.3.13.1 Präzipitation von 5-Methylcytosin

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

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

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

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

3.3.13.2 Bisulfitsequenzierung zur Analyse der DNA Methylierung

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

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

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

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

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

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

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

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

Annealing-Temperaturen:

TSPO 3: 59,2°C;

TSPO 5: 61,6°C;

KCNK1_C2: 56,8°C;

Programm der PCR-Reaktion Synj2:

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

Programm der PCR-Reaktion Htr5a:

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

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

3.3.14 Amplifizierung des gesamten Genoms unter Verwendung des WGA2-Kits

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

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

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

3.4 Auswertungen und statistische Tests

3.4.1 Western-Blots

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

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

3.4.2 DNMT-Aktivitätsmessungen

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

3.4.3 MeDIP-Array

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

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss des Stresshormons Dexamethason auf das Methyloprimärer Astrozyten

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

4.1.1 Zellmodell und Behandlungszeitraum

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

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

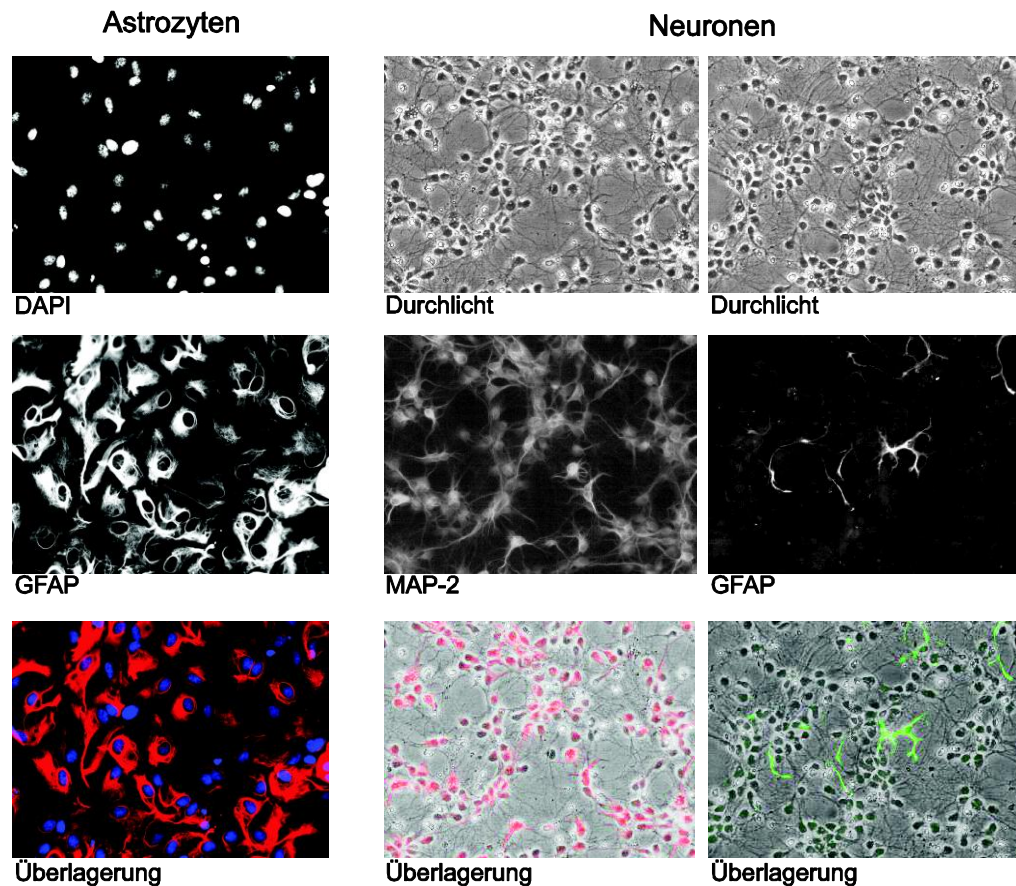


Abbildung 4.1.1 Bestimmung des Reinheitsgrades von hippokampalen Primärkulturen durch Immunfluoreszenzfärbungen von Proteinen, die für Astrozyten oder Neuronen spezifisch sind. Astrozyten und Neuronen wurden mit gegen GFAP (Astrozytenmarker) gerichteten Antikörpern angefärbt und Neuronen zusätzlich mit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

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

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

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

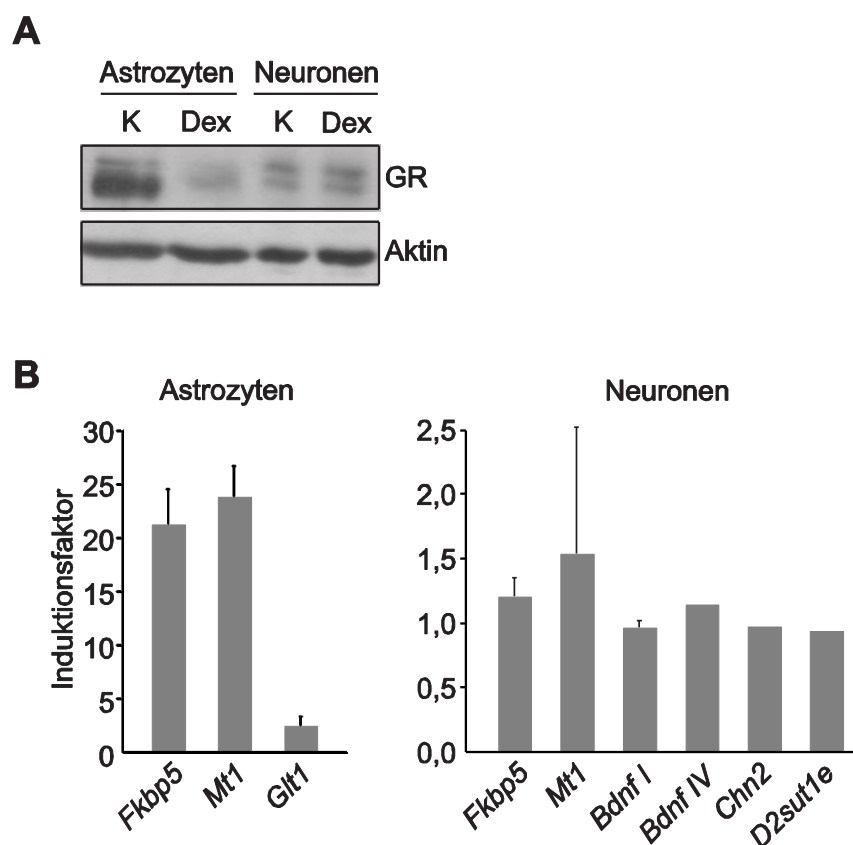


Abbildung 4.1.2 Vergleich von hippokampalen Neuronen- und Astrozytenkulturen bezüglich ihres Ansprechens auf Dex auf Proteinebene mittels Western-Blot (A) und auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR (B). (A) Im Gegensatz zu Neuronen reagieren Astrozyten auf Dex-Behandlung mit einer verringerten Expression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

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

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

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

4.1.2 Etablierung der MeDIP-Methode

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

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

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

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

4.1.2.1 Fragmentierung der DNA

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

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

4.1.2.2 Präzipitationsmethode

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

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

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

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

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

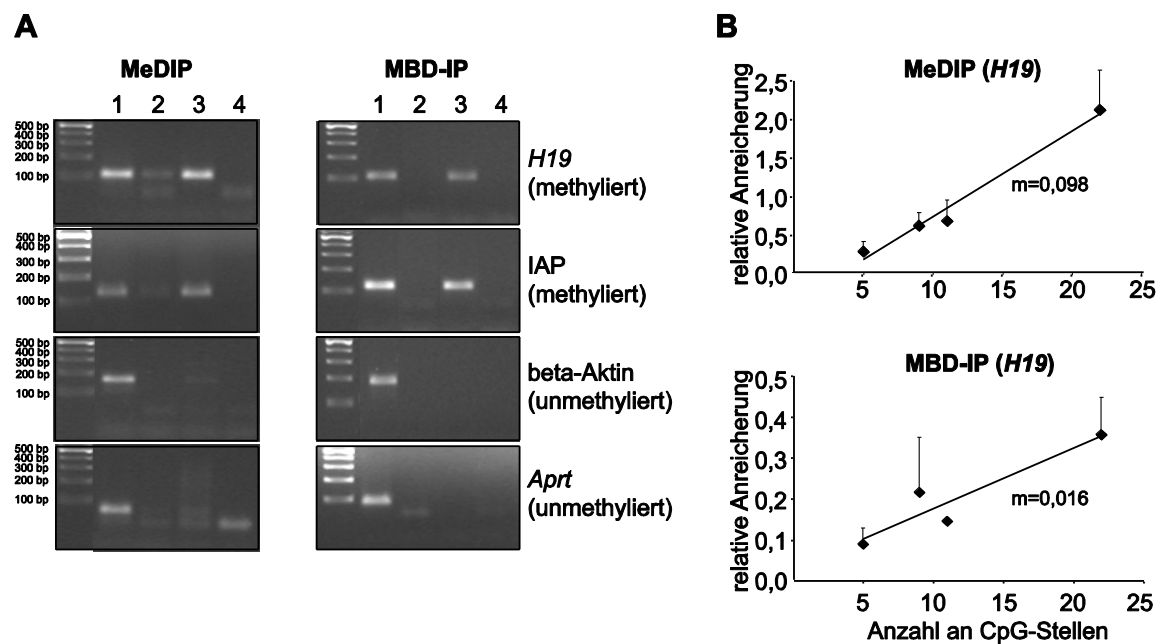


Abbildung 4.1.3 Die MeDIP- und die MBD-IP-Methode unterscheiden sich hinsichtlich ihres Auflösungsvermögens von Methylierungsunterschieden. (A) Beide Methoden zeigen eine Anreicherung methylierter Loci. DNA wurde aus N2a-Zellen isoliert und sonifiziert. In die Präzipitation mit anti-5MeC-Antikörper (0,5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

4.1.2.3 Amplifikation der DNA

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

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

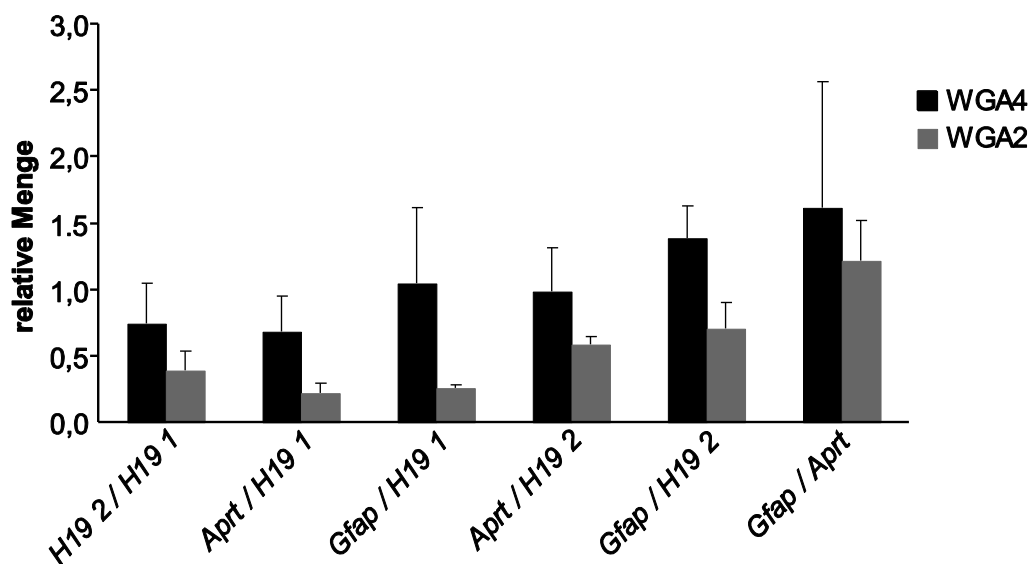


Abbildung 4.1.4 Vergleich des WGA2- und des WGA4-Kits. Hippokampale DNA aus Ratten wurde mit *MseI* gespalten und die DNA in jeweils drei verschiedenen Ansätzen mit Hilfe des WGA2- und WGA4-Kits amplifiziert. In die WGA2-Reaktion (17 Zyklen) wurde 10 ng DNA, in die WGA4-Reaktion (22 Zyklen) 1 ng DNA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

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

unterzogen, in der vier verschiedene Loci (*H19 1*, *H19 2*, *Gfap*, *X (inactive)-specific transcript* [*Xist*]) analysiert wurden. Es wurden die Mengenverhältnisse der Loci, deren Mittelwerte aus drei Experimenten und die relative Standardabweichung berechnet. Vergleicht man die Ergebnisse von amplifizierter und unamplifizierter DNA, so ergibt sich für das WGA2-Kit eine durch die Amplifikation verursachte relative Standardabweichung von durchschnittlich 0,11 (Tabelle 4.1.1).

	<i>H19 2</i>	<i>Gfap</i>	<i>Xist</i>
mit WGA2			
<i>H19 1</i>	0,18	0,09	0,14
<i>Xist</i>	0,05	0,21	
<i>Gfap</i>	0,20		
ohne WGA2			
<i>H19 1</i>	0,03	0,01	0,04
<i>Xist</i>	0,08	0,04	
<i>Gfap</i>	0,03		

Tabelle 4.1.1 Variationskoeffizient der relativen Mengen verschiedener Loci vor und nach WGA2-Amplifikation. DNA wurde aus hippokampalen Astrozyten der Ratte isoliert, mit *MseI* gespalten und in die WGA2-Reaktion eingesetzt. Die in der Tabelle aufgeführten Loci (*H19 1*, *H19 2*, *Gfap*, *Xist*) wurden in einer Real-Time-PCR-Reaktion vervielfältigt. Es wurde jeweils das Mengenverhältnis aus dem Locus in der Spalte und dem Locus in der Zeile berechnet. Dargestellt ist der Variationskoeffizient des Mittelwerts aus drei Experimenten. *Gfap*, Gliales fibrilläres saures Protein; *Xist*, *X (inactive)-specific transcript*.

4.1.3 Herstellung der DNA-Proben

Aus den vorangehenden Experimenten und Überlegungen ergab sich der in Abbildung 4.1.5 dargestellte Versuchsaufbau. Die Untersuchung wurde an einem biologischen Duplikat durchgeführt. Primäre hippokampale Astrozyten wurden für drei Tage mit 100 nM Dex behandelt, die DNA isoliert und anschließend mit der Restriktionsendonuklease *MseI* gespalten. Methylierte DNA-Fragmente wurden mit einem anti-5MeC-Antikörper präzipitiert. Die Ausgangs- und die präzipitierte DNA wurden unter Verwendung des WGA2-Kits amplifiziert.

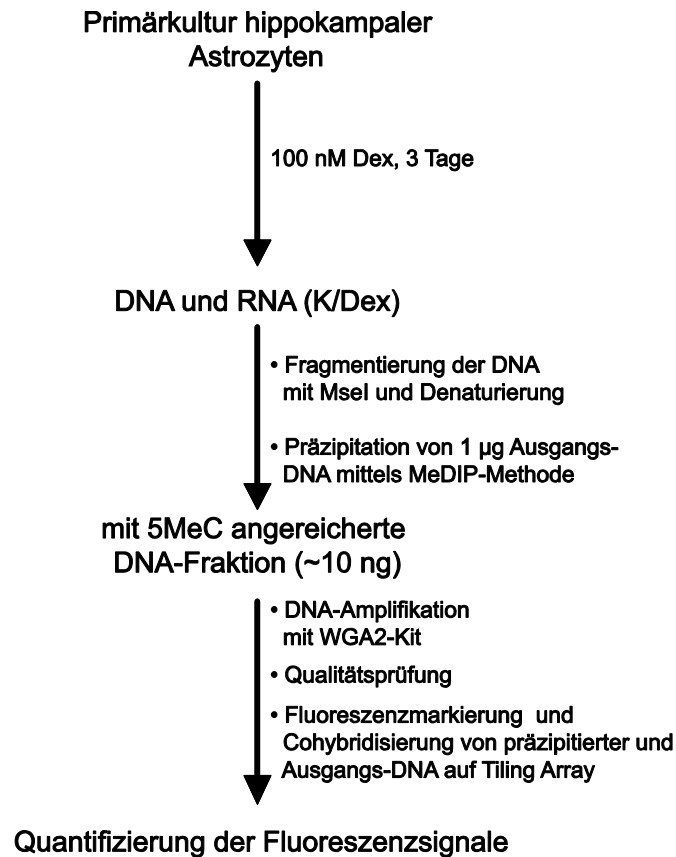


Abbildung 4.1.5 Versuchsaufbau zur Quantifizierung von DNA-Methylierungsunterschieden nach Behandlung von primären, hippokampalen Astrozyten mit Dexamethason.

Bevor DNA-Proben zur Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierung auf dem 385K Promoter plus CpG Island Tiling Array an Nimblegen verschickt wurden, wurde überprüft, ob die Proben den Qualitätsstandard erfüllen. Hierfür wurde die nach der Amplifikation erhaltene Menge an DNA überprüft, die Reinheit sowie Längenverteilung der DNA-Fragmente analysiert und der Anreicherungsfaktor methylierter DNA-Abschnitte bestimmt. Zunächst wurde überprüft, ob nach der WGA2-Amplifikation von 10 ng DNA nach 17 Amplifikationszyklen, welche Herstellerangaben zufolge eine Effizienz von 1,5-1,6 aufweisen sollten, tatsächlich 10 µg DNA vorhanden waren. Die Reinheit und der Salzgehalt der DNA-Lösung wurden über das Verhältnis OD260/OD280 sowie OD260/OD230 abgeschätzt. Anhand eines Agarosegels wurde außerdem die Längenverteilung der DNA-Fragmente vor und nach der Amplifikation kontrolliert. Wie erwartet, war der Großteil der DNA-Fragmente zwischen 150-700 bp lang (Abbildung 4.1.6 A). Schließlich wurde überprüft, ob eine Anreicherung methylierter DNA erreicht wurde. Mittels Real-Time-PCR-Analyse von präzipitierter und Ausgangs-DNA wurde die relative Anreicherung von bekanntermaßen methylierten (*H19 1*, *H19 2*, *Xist*) und unmethylierten (*Aprt*, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase [*Gapdh*], *Gfap*) Loci gemessen. Für die methylierten Loci ergab sich im Vergleich zu den unmethylierten Loci

ein höherer relativer Anreicherungsfaktor (Abbildung 4.1.6 B). Dieser betrug beispielsweise für den stark methylierten *Xist*-Locus durchschnittlich 8,3, für den *Aprt*-Locus hingegen $2,0 \times 10^{-2}$. Die relativen Anreicherungsfaktoren der untersuchten, methylierten Loci variierten zwischen den Ansätzen nur geringfügig. Dies stellt einen Vorteil für die Bestimmung von Methylierungsunterschieden dar. Zusammenfassend erfüllten alle DNA-Proben den Qualitätsstandard.

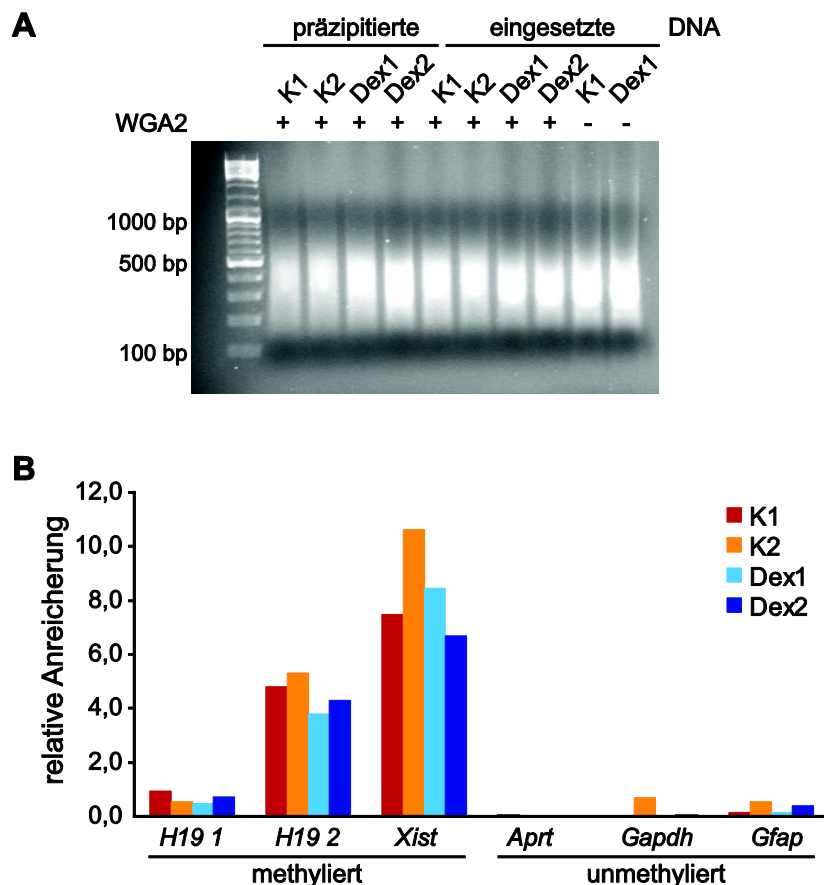


Abbildung 4.1.6 Qualitätsprüfung der DNA-Proben. (A,B) Hippokampale Astrozyten aus der Ratte wurden für drei Tage mit 100 nM Dex behandelt. DNA wurde isoliert und mit Hilfe von *MseI* gespalten. 1 μ g DNA wurde in die Präzipitation mit 1 μ g anti-5MeC-Antikörper eingesetzt. Das Eluat und 10 ng der eingesetzten (Ausgangs-) DNA wurden unter Verwendung des WGA2-Kits amplifiziert (17 Zyklen). (A) Die DNA-Fragmente der Proben zeigen die erwartete Längenverteilung. Die amplifizierten (WGA2+) und unamplifizierten (WGA2-) DNA-Proben der unbehandelten (K1, K2) und behandelten (Dex1, Dex2) Astrozyten wurden auf einem Agarosegel zusammen mit einem DNA-Größenstandard visualisiert. (B) Methylierte DNA-Bereiche sind in den IP-Proben angereichert. Die Berechnung der Mengenverhältnisse aus präzipitierter und Ausgangs-DNA erfolgte mittels Real-Time-PCR-Analyse. *Aprt*, Adenin-Phosphoribosyltransferase; *Gapdh*, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; *Gfap*, Gliales fibrilläres saures Protein; *Xist*, *X (inactive)-specific transcript*.

4.1.4 Validierung der Arraydaten

4.1.4.1 Gesamtbeurteilung der Arraydaten

Die Proben der Ausgangs-DNA wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 und die präzipitierten Proben mit Cy5 markiert. Die markierten Proben der Ausgangs- und präzipitierten DNA jeweils eines Versuchsansatzes wurden auf die Arraysonden hybridisiert und die Signalintensitäten gemessen. Diese lagen zwischen 0 und 65000 und sollten Nimblegen zufolge in diesem Bereich proportional zur Menge hybridisierter DNA sein. Für die Darstellung des Methylierungsgrades der DNA wird aus dem Verhältnis der Signalintensitäten von Proben der präzipitierten und der Ausgangs-DNA der Logarithmus zur Basis 2 berechnet und der *Biweight Mean* abgezogen. Der *Biweight Mean* ist ein robuster Mittelwert, auf den sich Ausreißer nur wenig auswirken. Hohe (normalisierte) \log_2 -Quotienten zeigen Anreicherung, niedrige (normalisierte) \log_2 -Quotienten Abreicherung eines DNA-Abschnitts an.

Zunächst galt es herauszufinden, ob sich die Anreicherung methylierter Loci in den Rohdaten des Arrays sowie den normalisierten \log_2 -Quotienten widerspiegeln. Um ersteres zu untersuchen wurde für eine Reihe von definierten Schwellenwerten die Anzahl der Sonden ermittelt, welche über bzw. unter dem Schwellenwert lagen. Hierbei wurden die Proben von Ausgangs- und präzipitierter DNA (IP-Ansatz) miteinander verglichen. Die Anzahl an Sonden mit geringen Signalintensitäten (<500) war in den IP-Ansätzen 270- bis 61000-fach höher als in den Ansätzen mit Ausgangs-DNA. Gleichzeitig war in den Ansätzen mit Ausgangs- und präzipitierter DNA die Anzahl an Sonden mit sehr hohen Signalintensitäten (>10000) sehr ähnlich (Abbildung 4.1.7 A). Somit war die Verteilung der Signalintensitäten über die einzelnen Sonden hinweg in den IP-Ansätzen ungleichmäßiger als in den Ansätzen mit Ausgangs-DNA. Dies deutet auf eine erfolgreiche Anreicherung methylierter Loci in den IP-Ansätzen hin.

Wie bereits erwähnt zeigen hohe (normalisierte) \log_2 -Quotienten Anreicherung eines DNA-Abschnitts an. Das Diagramm in Abbildung 4.1.7 B, das die Verteilung der Sondenanzahl über den normalisierten \log_2 -Quotienten darstellt, zeigt eine Asymmetrie. Im positiven Bereich zwischen $x \approx 1,5 \dots 2,5$ erkennt man im Vergleich zum entsprechenden negativen Bereich eine deutliche Schulter, die auf eine erhöhte Sondenanzahl hindeutet. Auch die Dichteverteilung der \log_2 -Quotienten deutet somit auf eine erfolgreiche Anreicherung methylierter Loci hin.

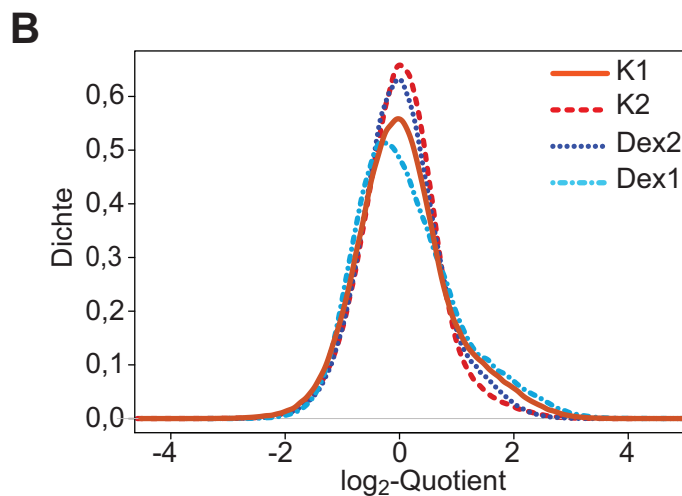
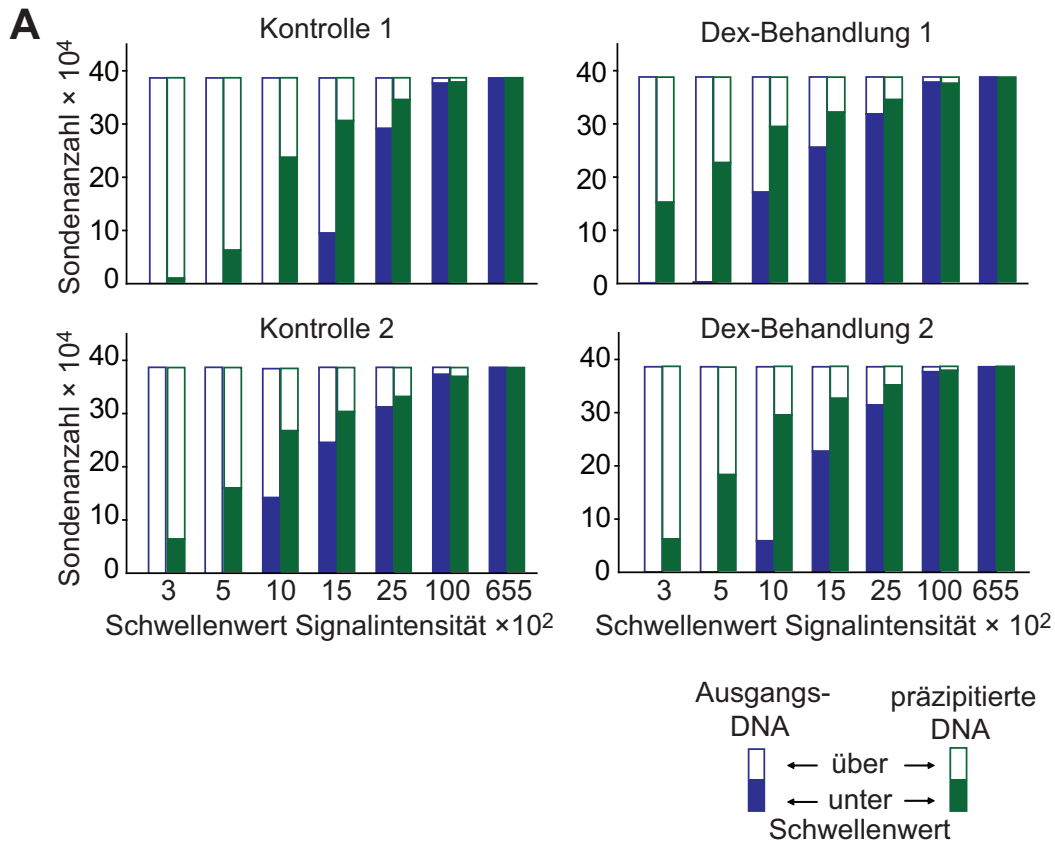


Abbildung 4.1.7 Die Arraydaten spiegeln die Anreicherung methylierter DNA-Fragmente in den IP-Ansätzen wider. (A) Analyse der Arrayrohdaten. Für die Proben der Ausgangs- und präzipitierten DNA eines jeden Arrays ist die Anzahl der Sonden, die eine bestimmte Signalintensität überschreiten (ungefüllte Balken) bzw. unterschreiten (gefüllte Balken) dargestellt. In blau: Ausgangs-DNA, in grün: präzipitierte DNA. (B) Verteilung der Sondenanzahl über den normalisierten \log_2 -Quotienten (präzipitierte DNA/Ausgangs-DNA). Das Verhältnis der Signalintensitäten der Sonden, die mit der präzipitierten und der Ausgangs-DNA hybridisierten, wurde zur Basis 2 logarithmiert und der *Biweight Mean* abgezogen. Die Verteilung der Sondenanzahl wurde über den normalisierten \log_2 -Quotienten aufgetragen. Die Dichteachse ist so gewählt, dass sich unter den Kurven jeweils die Fläche 1 ergibt.

4.1.4.2 Validierung einzelner Loci

Die SignalMap-Software von Nimblegen visualisiert Loci eines Chromosoms zusammen mit dem nächstgelegenen Transkript, der Tiling-Region, dem Transkriptionsstart und den \log_2 -Quotienten. In Abbildung 4.1.8 wurde der mit überwiegend negativen \log_2 -Quotienten assoziierte Locus des Gens *Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member* (*Kcnj10*), und der mit überwiegend positiven \log_2 -Quotienten assoziierte Locus des Gens Serotoninrezeptor 5a (*Htr5a*) dargestellt. In beide Abbildungen wurden die MseI-Restriktionsschnittstellen und die CpG-Anzahl der Restriktionsfragmente eingetragen.

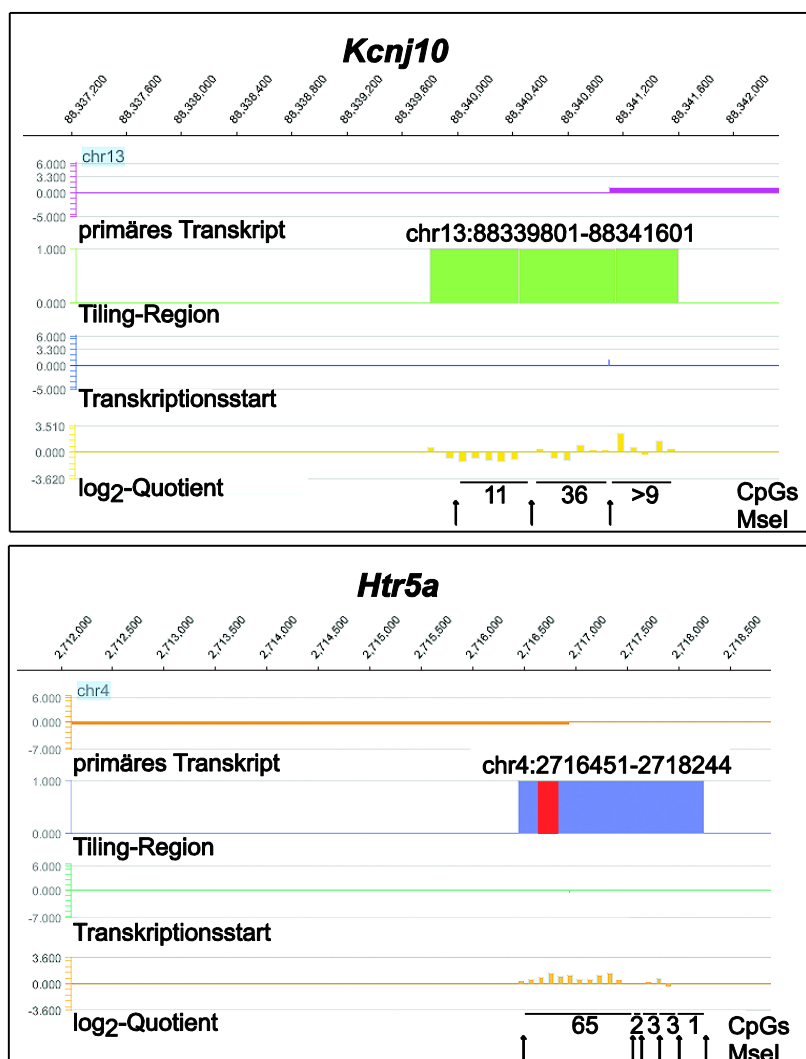


Abbildung 4.1.8 Darstellung der Daten des Methylierungsarrays mit der SignalMap-Software. Die normalisierten \log_2 -Quotienten der Loci *Kcnj10* und *Htr5a* sind zusammen mit dem Transkript und der Tiling-Region dargestellt. Zusätzlich sind die MseI-Schnittstellen und die CpG-Anzahl der Restriktionsfragmente gezeigt. Für den Locus *Htr5a* wurde die bisulfitequenzierte Region (siehe Tabelle 4.1.3) durch einen roten Balken markiert. *Kcnj10*, Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member; *Htr5a* Serotoninrezeptor 5a.

Ein DNA-Abschnitt wurde als hypermethyliert definiert, wenn er >60% Methylierung, als moderat methyliert, wenn er zwischen 15 und 60% Methylierung und als hypomethyliert, wenn er <15 % Methylierung aufwies. Der Locus *Kcnj10* enthielt Restriktionsfragmente von ~600 bp mit 11 bzw. 36 CpG-Stellen. Die Mittelwerte der \log_2 -Quotienten waren in dieser Region für alle Ansätze klein (zwischen -0,26 und +0,03), zeigten also Hypomethylierung an. Diese Daten wurden durch die Ergebnisse einer Methylierungsstudie an kortikalen, primären Astrozyten bestätigt (Hatada u. a., 2008). Gleiches galt für den hypermethylierten Promotor des Gens Peptidylarginin-Deiminase 2 (*Padi2*) und den hypomethylierten Promotor des Gens *SRY-box containing gene 8* (*Sox8*) (Tabelle 4.1.2). Beide Promotoren enthalten eine CpG-Insel und wurden durch die Restriktionsspaltung in Fragmente zerlegt, die länger als 300 bp waren und mehr als 14 CpG-Stellen enthielten.

Locus	Methylierungsstatus	MW \log_2 -Quotient
<i>Kcnj10</i> Chr.13: 88.339.801-88.341.601	hypomethyliert	K1: -0,26 K2: -0,20 Dex1: -0,12 Dex2: 0,03
<i>Sox8</i> Chr.10: 14.823.443-14.825.243	hypomethyliert	K1: 0,06 K2: -0,09 Dex1: -0,04 Dex2: -0,04
<i>Padi2</i> Chr. 5: 159.761.530-159.762.909	hypermethyliert	K1: 0,68 K2: 0,81 Dex1: 0,83 Dex2: 0,73
<i>Htr5a</i> Chr.4: 2.716.451-2.717.450	moderat methyliert	K1: 0,43 K2: 0,79 Dex1: 0,28 Dex2: 0,35
<i>Synj2</i> Chr.1: 40.762.493-40.764.293	hypermethyliert	K1: 1,41 K2: 1,69 Dex1: 2,06 Dex2: 1,45

Tabelle 4.1.2 Die Arraydaten bilden den Methylierungsstatus der aufgelisteten Genpromotoren ab. Für jeden Locus sind die chromosomalen Koordinaten, der Methylierungsstatus und der normalisierte Mittelwert (MW) der \log_2 -Quotienten (präzipitierte DNA/Ausgangs-DNA) angegeben. Der Methylierungsstatus der Genpromotoren ließ sich durch Literaturangaben (*Kcnj10*, *Sox8*, *Padi2*) oder Bisulfitsequenzierung (*Htr5a*, *Synj2*, siehe Tabelle 4.1.3) ermitteln. *Kcnj10*, *Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member*; *Sox8*, *SRY-box containing gene 8*; *Padi2*, Peptidylarginin-Deiminase 2; *Htr5a*, Serotoninrezeptor 5a; *Synj2*, Synaptojanin 2.

Um die Arraydaten zu validieren wurden auch Bisulfitsequenzierungen durchgeführt. Die Mittelwerte der \log_2 -Quotienten des *Htr5a*-Promotors lagen für das an 11 Sonden hybridisierende Restriktionsfragment mit 65 CpG-Stellen (~6 CpG-Stellen pro Sonde)

zwischen 0,28 und 0,79. Bisulfitequenzierung von 9 CpG-Stellen in dieser Region ergab im Kontroll- und Dex-Ansatz einen Methylierungsgrad der einzelnen CpG-Stellen zwischen 40% und 71% bzw. zwischen 36% und 75% (Tabelle 4.1.3). Auch die Ergebnisse für den mit hohen \log_2 -Quotienten (>1.41) assoziierten Synaptojanin-2-Promotors konnten mittels Bisulfitequenzierung, welche einen Methylierungsgrad zwischen 99% und 100% ergab, bestätigt werden (Tabelle 4.1.3).

CpG-Stelle		Methylierungsgrad [% 5MeC]										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Htr5a</i>	K1	n.a.	n.a.	42	65	64	74	58	62	35	48	40
	Dex1	n.a.	n.a.	42	65	65	75	56	63	33	48	36
<i>Synj2</i>	K1	n.a.	100	99	100	n.a.	n.a.					

Tabelle 4.1.3 Ergebnisse der Bisulfitequenzierung des *Htr5a*- und *Synj2*-Promotors. Die DNA von unbehandelten und Dex-behandelten (drei Tage, 100 nM) Astrozyten wurde einer Bisulfitkonvertierung unterworfen. In einer PCR-Reaktion wurden Abschnitte der Gene *Htr5a* und *Synj2* amplifiziert. Der DNA-Methylierungsgrad wurde mittels Pyrosequenzierung des PCR-Produkts bestimmt. n.a. nicht analysiert; *Htr5a*, Serotoninrezeptor 5a; *Synj2*, Synaptojanin 2.

4.1.5 Kandidatengene

4.1.5.1 *t*-Test

Um methylierte Regionen vorherzusagen, wurde um jede Sonde ein Fenster von 750 bp gelegt, und ein einseitiger Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt. Es wurde festgelegt, dass methylierte Loci einen p -Wert von $\leq 0,05$ aufweisen. Diese Loci sind aufgrund der Datenmenge nicht im Anhang des vorliegenden Dokuments angegeben, können aber auf Anfrage in elektronischer Form übermittelt werden.

Um herauszufinden, welche Loci differentiell methyliert sind, wurde die Schnittmenge aus den methylierten Loci der unbehandelten Ansätze (K1 und K2) und der mit Dex behandelten Ansätze (Dex1 und Dex2) gebildet, und mit den Dex1- und Dex2-Ansätzen verglichen. 307 Loci waren in der Schnittmenge aus K1 und K2, aber nicht in der Schnittmenge aus Dex1 und Dex2 enthalten. Umgekehrt waren 86 Loci in der Schnittmenge aus Dex1 und Dex2, aber nicht in der Schnittmenge aus K1 und K2 enthalten. Von diesen 393 Loci wurde angenommen, dass sie differentiell methyliert sein könnten. Ein Vergleich der K- und Dex-Ansätze ergab jedoch, dass die normalisierten \log_2 -Quotienten dieser Loci nur kleine Unterschiede aufwiesen, die auch aus zufälligen Schwankungen resultieren könnten (Daten nicht gezeigt).

Daher wurden für jede Tiling Region die normalisierten \log_2 -Quotienten der beiden Kontrollansätze mit denen der Dex-Behandlung unter Anwendung eines zweiseitigen *t*-Tests (R-Software) verglichen. Die sich daraus ergebenden p -Werte wurden bezüglich

multiplen Testens korrigiert, indem sie einer *false discovery rate correction* (FDR-Korrektur) unterzogen wurden. Für die zehn Loci mit den niedrigsten p -Werten ($p \leq 0,25$) wurden das nächstgelegene Gen und dessen Funktion ermittelt. Es wurde zudem recherchiert, ob das Gen in neuronalen Zellen exprimiert ist und ob Hinweise auf eine Regulation durch Stress vorhanden sind (Tabelle 4.1.4).

Um die Unterschiede der normalisierten \log_2 -Quotienten zwischen unbehandelten Kontrollen und Dex-Behandlung zu visualisieren, wurden diese in einem Diagramm dargestellt. Abbildung 4.1.9 zeigt die fünf Loci mit p -Werten $\leq 0,05$ (*DMD*, *Ggt6*, *Srrm2*, *Cabp1*, *Tspo*) sowie den Locus des Kaliumkanals *Kcnk1* (Kaliumkanal der Subfamilie K, Typ 1), dessen Genaktivität in Epithelzellen durch Dex reguliert werden kann (Kim u. a., 2009). Aus der visuellen Inspektion der \log_2 -Quotienten von Kontroll- und Dex-Ansätzen ließen sich keine vielversprechenden Kandidatengene ableiten. Die analysierten Loci beinhalteten zum Teil einen stark abweichenden Ansatz. Für weiterführende Analysen wurden daher nicht alle der sechs abgebildeten Gene gewählt, sondern nur die Gene, die aufgrund von Literaturangaben relevant erschienen. So wurde z.B. berichtet, dass neben *Kcnk1* auch die Expression der Gamma-Glutamyltransferase 6 (*Ggt6*) durch Dex reguliert werden kann (Cotariu u. a., 1988). Das Translokator-Protein (TSPO) fördert die Neurosteroidsynthese, also auch die von Kortisol/Kortikosteron, und könnte daher die negative Rückkopplung der Stressantwort fördern. Das Protein erschien außerdem interessant, weil es als Zielstruktur angstlösender Substanzen beschrieben wurde (Rupprecht u. a., 2009).

Weitere Analysen wurden also mit *Ggt6*, *Kcnk1* und *Tspo* durchgeführt. Die als differentiell methyliert angezeigten DNA-Abschnitte des *Ggt6*- und *Tspo*-Gens lagen im Bereich des Transkriptionsstarts ($\sim \pm 800$ bp), die des *Kcnk1*-Gens im Bereich des *gene body*.

Sondenregion	Genname	Symbol	p-Wert	Biologischer Prozess	Relevanz
chrX:69902456-69906031 CpG-Insel 500bp aufwärts von ChrX.436 bzw. CpG-Insel in Intron von Dystrophin	vorhergesagtes Gen ChrX.436 Dystrophin	<i>DMD</i>	10 ⁻⁶	Unbekannt Verankert die extrazelluläre Matrix an das Zytoskelett über F-Aktin. Akumuliert an der neuromuskulären Verbindung und einer Vielzahl von Synapsen im ZNS und PNS.	Keine konservierte Region innerhalb der Sondenregion. Exprimiert im Gehirn.
chr10:59319154-59320954 Promotor	Gamma-Glutamyltransferase 6	<i>Ggt6</i>	0,02	An die Membran gebundenes extrazelluläres Enzym. Spaltet Glutathion-Konjugate und transferiert die Gamma-Glutamyl-Reste an Akzeptoren. Marker für oxidativen Stress.	Exprimiert im Gehirn. Dexamethason reguliert <i>Ggt1</i> in Hepatozytenkulturen hoch (Cotariu u. a., 1988).
chr10:13079294-13080232 CpG-Insel in Exon	Serin/Arginin repetitives Matrix Protein 2	<i>Srrm2</i>	0,05	Komponente des aktiven Spleißosoms.	Ubiquitär exprimiert.
chr12:42717317-42718016 CpG-Insel in Exon/Intron	Kalzium-bindendes Protein 1	<i>Cabp1</i>	0,05	Inhibiert intrazelluläre Kalziumsignaltransduktion.	Exprimiert im Gehirn.
chr7:121595783-121597583 Promotor	Translokator-Protein	<i>Tspo</i>	0,05	Mitochondriales Protein, hoch exprimiert in Steroid synthetisierenden Geweben. Bindet Cholesterin und ist Teil der mitochondrialen Cholesterin Importmaschine. Fördert dadurch die Neurosteroidsynthese.	Exprimiert im Gehirn, überwiegend in Astrozyten. TSPO wurde als Target für Angst lösende Substanzen gezeigt (Rupprecht u. a., 2009).
chr9:110481540-110482240 CpG-Insel in Exon/Intron	Elastin microfibril interfacer 2	<i>Emil2</i>	0,11	Extrazelluläres Matrixprotein an der Grenze zwischen amorphen Elastin und Mikrofilamenten.	Exprimiert im Gehirn im Embryonalstadium.
chr7:137344062-137344761 CpG-Insel in Exon/Intron	Adenylat-Zyklase Typ 6	<i>Adcy6</i>	0,12	Membran assoziiertes Enzym, synthetisiert den <i>second messenger</i> cAMP.	Exprimiert im Gehirn
chr1:154158811-154159510 CpG-Insel in Exon	Odd Oz Homolog 4	<i>Odz4</i>	0,24	Homolog zum <i>Drosophila pair-rule patterning</i> Gen. Transmembranrezeptor, der an der Neurogenese beteiligt ist.	Expression überwiegend im ZNS sowohl im Entwicklungs- als auch im Erwachsenenstadium.
chr15:27051741-27053541 Promotor	Olfaktorischer Rezeptor 1637	<i>Olr 1637</i>	0,24	Interagiert mit Geruchsmolekülen	Nicht exprimiert in Astrozyten
chr19:56249049-56249748 CpG-Insel in Exon/Intron	Kaliumkanal Subfamilie K Typ 1	<i>Kcnk1</i>	0,25	Trägt zur passiven Leitfähigkeit der Astrozyten bei.	Exprimiert im Gehirn. Dexamethason reguliert <i>Kcnk1</i> mRNA im Reissner's Membranepithellum hoch (Kim u. a., 2009).

Tabelle 4.1.4 Auflistung der Kandidatengene für veränderte Methylierung nach Gabe von Dex. In einem *t*-Test wurden für jede Tiling Region die normalisierten log₂-Quotienten der Kontrollansätze mit denen der Dex-Behandlung verglichen. Die *p*-Werte wurden bezüglich multiplen Testens mittels *false discovery rate correction* (FDR-Korrektur) korrigiert. Die nächstgelegenen Gene der zehn Loci mit den niedrigsten *p*-Werten (*p* < 0,25) wurden ermittelt und sind zusammen mit ihrer biologischen Funktion aufgelistet.

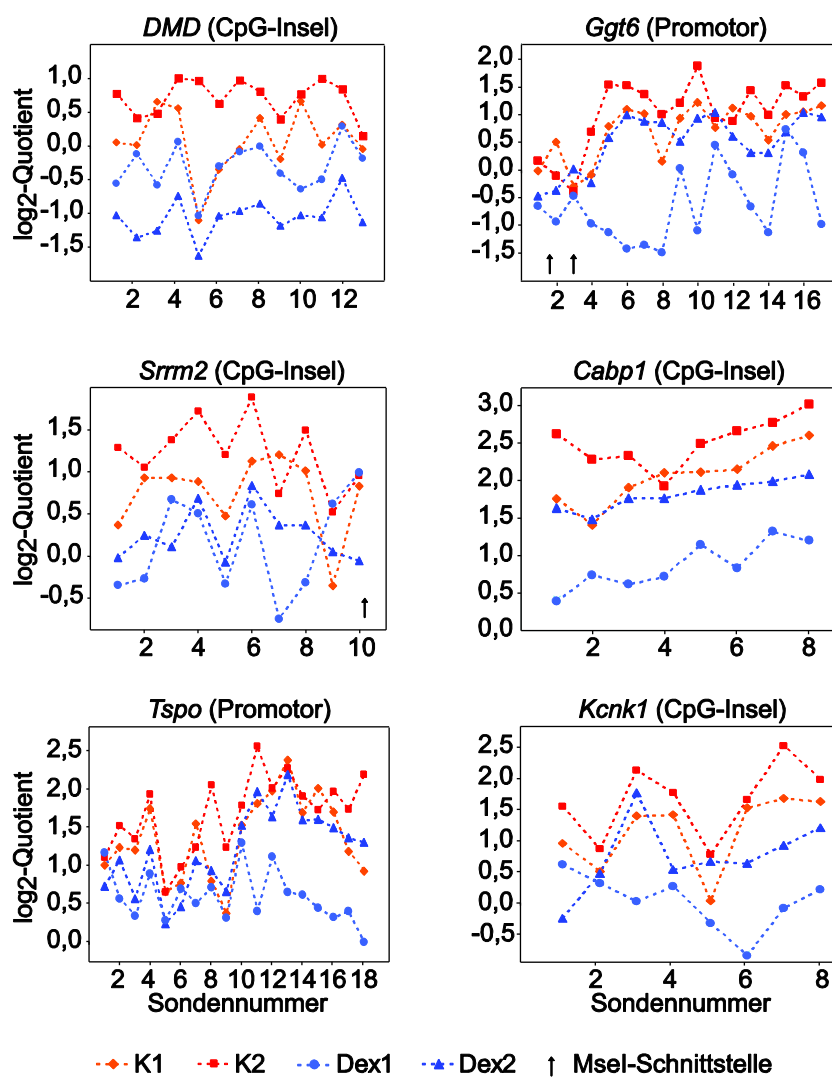


Abbildung 4.1.9 Im Methylierungsarray angezeigte Effekte von Dex auf die DNA-Methylierung von sechs ausgewählten Kandidatengenen. Dargestellt sind normalisierte log₂-Quotienten der Sonden von fünf Loci mit p -Werten $\leq 0,05$ und von einem Locus (*Kcnk1*, $p=0,25$), dessen Genaktivität nach Kim (2009) durch Dex in Epithelzellen reguliert wird.

4.1.5.2 mRNA-Expressionsanalyse

Zunächst wurde in einer Real-Time-PCR-Analyse untersucht, ob die drei ausgewählten Kandidatengene *Ggt6*, *Kcnk1* und *Tspo* in hippokampalen Astrozyten exprimiert wurden und ob ihre Expression durch Dex (drei Tage, 100 nM) beeinflusst wurde. *Ggt6* wurde weder in unbehandelten noch in Dex-behandelten Astrozyten exprimiert (Daten nicht gezeigt). Die mRNA-Expression von *Tspo* zeigte nach Behandlung mit Dex eine leichte Reduktion (Abbildung 4.1.10 A). Die mRNA-Expression von *Kcnk1* blieb unverändert (Abbildung 4.1.10 B).

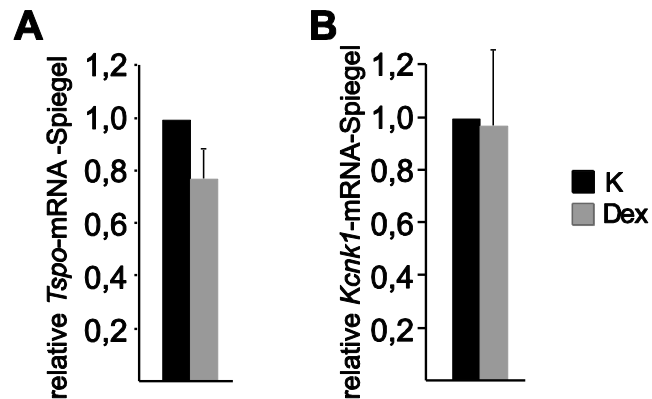


Abbildung 4.1.10 mRNA-Expression von *Tspo* und *Kcnk1* ist nicht durch Dex reguliert. (A,B) RNA wurde aus unbehandelten und mit Dex behandelten Astrozyten (drei Tage, 100 nM) isoliert und die relative mRNA-Expression von *Kcnk1* (A) und *Tspo* (B) durch Real-Time-PCR bestimmt. *Gapdh*-mRNA diente zur Normalisierung. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei Experimenten. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt.

4.1.5.3 Methylierungsanalyse mittels Bisulfitsequenzierung

Der Methylierungsgrad des *Tspo*- und *Kcnk1*-Locus wurde mittels Bisulfitsequenzierung untersucht. Es wurde darauf geachtet, dass bei der Methylierungsanalyse konservierte DNA-Abschnitte einbezogen wurden. Hippokampale Astrozyten wurden drei Tage mit 100 nM Dex behandelt, die DNA isoliert und einer Bisulfitkonvertierung unterworfen. Wie in Abbildung 4.1.11 A und B dargestellt, ergab die Sequenzierung weder für den *Tspo*- noch für den *Kcnk1*-Locus Methylierungsunterschiede.

Zusammenfassend wurden hippokampale Astrozyten mit Dex inkubiert und die DNA-Methylierung von Promotoren und CpG-Inseln mit Hilfe eines MeDIP-Arrays untersucht. Die Ergebnisse von Bisulfitsequenzierungen sowie die Kongruenz mit Literaturangaben bestätigten, dass mit Hilfe des MeDIP-Arrays hypermethylierte von hypomethylierten DNA-Abschnitten unterschieden werden können. Es konnten jedoch keine Methylierungsunterschiede zwischen unbehandelten und mit Dex behandelten Astrozyten festgestellt werden.

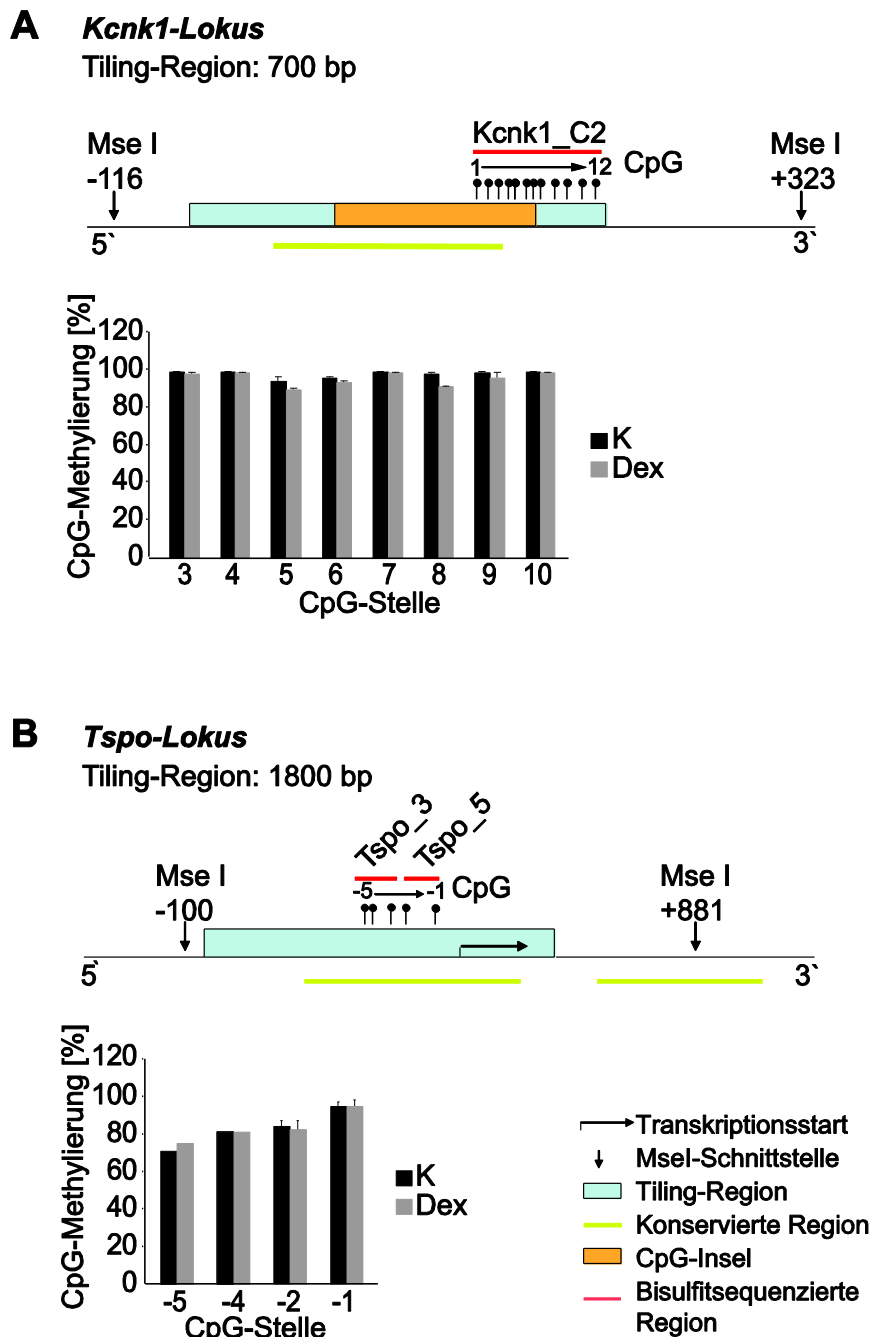


Abbildung 4.1.11 Die Behandlung von Astrozyten mit Dex hat keinen Einfluss auf die DNA-Methylierung von *Tspo* und *Kcnk1*. Die Analyse des Methylierungsgrades von DNA aus unbehandelten und Dex-behandelten Astrozyten (drei Tage, 100 nM) erfolgte mittels Bisulfitesequenzierung. Die sequenzierte Region (rot) des *Kcnk1*- (A) und *Tspo*- (B) Locus ist in einer Übersicht mit Tiling-Region, Transkriptionsstart, konservierten Regionen, CpG-Insel und MseI-Schnittstellen dargestellt. Der Abstand der Schnittstellen zur Tiling-Region ist angegeben. Gezeigt ist der Mittelwert der CpG-Methylierung in Prozent \pm Standardfehler von zwei Experimenten.

4.2 Mechanistische Aspekte der Regulation von DNMT1 durch Antidepressiva

Es ist bekannt, dass Antidepressiva neben dem monoaminergen System eine Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse, darunter auch epigenetische Mechanismen beeinflussen. Beispielsweise führte die Behandlung von Mäusen mit dem trizyklischen Antidepressivum Imipramin zu einer Veränderung der Methylierung des *Gdnf*-Gens im ventralen Striatum (Uchida u. a., 2011). Im Labor von Theo Rein (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) wurde vor kurzem gezeigt, dass die Behandlung von primären, kortikalen Astrozyten mit Amitriptylin in einer Reduktion der genomweiten DNA-Methylierung resultiert (Perisic u. a., 2010). Zudem ist bekannt, dass DNMT-Inhibitoren eine antidepressive Wirkung entfalten (LaPlant u. a., 2010; Uchida u. a., 2011; Sales u. a., 2011). Daher ergab sich die Fragestellung, ob Antidepressiva eine Auswirkung auf die DNMT-Aktivität neuronaler Zellen haben könnten.

4.2.1 Einfluss von psychoaktiven Substanzen auf die DNMT-Aktivität

In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise, dass nicht nur Neuronen, sondern auch Astrozyten eine wichtige Rolle bei der Entstehung und/oder Manifestation der Depression spielen. So zeigten postmortem Studien, dass die Kortizes von Patienten mit depressiver Störung eine verminderte Anzahl von glialen Zellen aufweisen (Cotter u. a., 2001). Zudem wurde herausgefunden, dass bei Mäusen das Ausschalten glialer Zellen im präfrontalen Kortex zu depressionsähnlichen Symptomen führt (Banar und Duman, 2008).

Um die Auswirkung von Antidepressiva auf die DNMT-Aktivität zu untersuchen, wurden Astrozyten aus den Kortizes von ein bis zwei Tage alten Ratten isoliert, kultiviert und anschließend drei Tage mit den Antidepressiva Amitriptylin (Ami), Imipramin (Imi), Citalopram (Cit), Paroxetin (Par) und Venlafaxin (Ven) behandelt. Des Weiteren wurden die Stimmungsstabilisatoren (*Mood stabilizer*; Abk. MS) Carbamazepin (Cbz) und Valproat (Vpa) in die Studie aufgenommen. Diese werden manchmal als Augmentationstherapie in der Behandlung depressiver Störungen eingesetzt. Die Konzentrationen der Antidepressiva entsprachen den in einer Studie an Rattenhirnen gefundenen Konzentrationen (Glitzbach und Preskorn, 1982).

Die DNMT-Aktivität wurde in nukleären Extrakten unter Verwendung des DNA-Substrats Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC) gemessen, das effizient von DNMTs methyliert wird. Wie erwartet verringerte der DNMT-Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza) die Enzymaktivität der Extrakte, und zwar um ~50% nach drei Tagen und um ~90% nach 6-11 Tagen. Von

den getesteten Substanzen verminderten die trizyklischen Antidepressiva (TZA) Ami und Imi sowie der selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) Par die DNMT-Aktivität um ~50%; die Behandlung mit Cit führte zu einer leichten, nicht signifikanten Reduktion der DNMT-Aktivität. Im Gegensatz dazu hatte der selektive Serotonin/Norepinephrin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI) Ven und die Stimmungsstabilisatoren Cbz und Vpa keinen Einfluss auf die DNMT-Aktivität (Abbildung 4.2.1). Folglich wirken sich psychoaktive Substanzen unterschiedlich auf die DNMT-Aktivität aus.

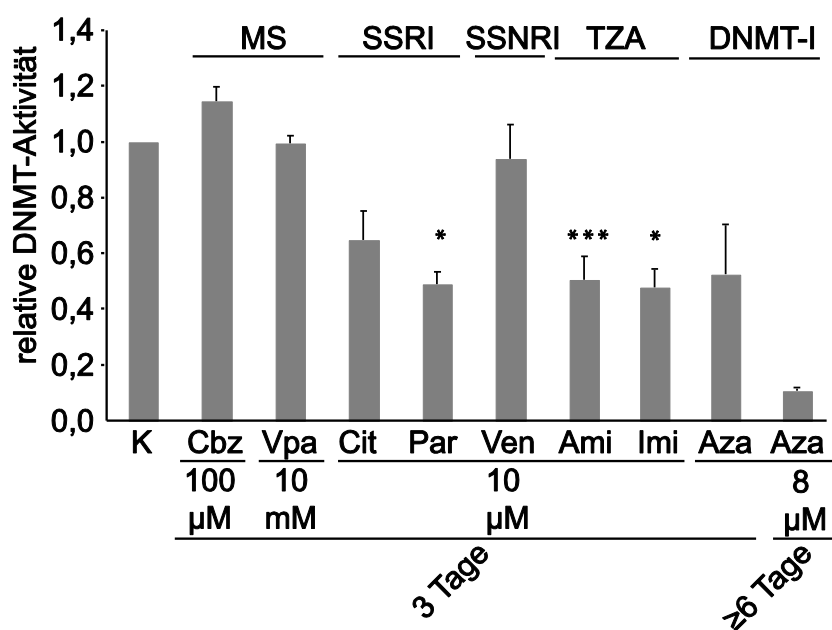


Abbildung 4.2.1 Unterschiedliche Auswirkungen von psychoaktiven Substanzen auf die DNMT-Aktivität. Kortikale Astrozyten wurden für drei Tage mit den aufgeführten Stimmungsstabilisatoren (MS) und Antidepressiva behandelt. Die Behandlung mit dem DNMT-Inhibitor 5-Aza erfolgte für drei und 6–11 Tage (≥6 Tage). Nukleäre Extrakte wurden isoliert und mit dem DNA-Substrat Poly(dI-dC)-Poly(dI-dC) und dem Methylgruppendonor [³H-Methyl]-S-Adenosylmethionin (³H-SAM) inkubiert. In die DNA inkorporiertes ³H-SAM wurde mit einem Szintillationszähler gemessen. Die DNMT-Aktivität ist relativ zum Mittelwert ± Standardfehler des Signals von Kontrolleextrakten dargestellt (n ≥ 3, ausser für Aza 3 Tage und Aza 6 Tage n = 2; *p ≤ 0,05, *** p ≤ 0,0005 versus Kontrolle). MS, Stimmungsstabilisator; SSRI, selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer; SSNRI, selektiver Serotonin/Norepinephrin-Wiederaufnahmehemmer; TZA, trizyklisches Antidepressivum; DNMT-I, DNMT-Inhibitor.

4.2.2 Eigenschaften der DNMT-Inhibition

Um zu untersuchen, ob Ami die enzymatische Aktivität der DNMTs direkt inhibiert, wurden nukleäre Extrakte von primären kortikalen Astrozyten mit 10 µM Ami für 30 Min. inkubiert und anschließend die DNMT-Aktivität gemessen. Da die DNMT-Aktivität in diesen Extrakten unverändert war (Abbildung 4.2.2 A), beruhte der Effekt von Ami nicht auf einer direkten Inhibition des Enzyms. Dementsprechend führte die Behandlung mit

Ami erst nach 72 und nicht nach 24 oder 48 Std. zu einer verringerten DNMT-Aktivität (Abbildung 4.2.2 B).

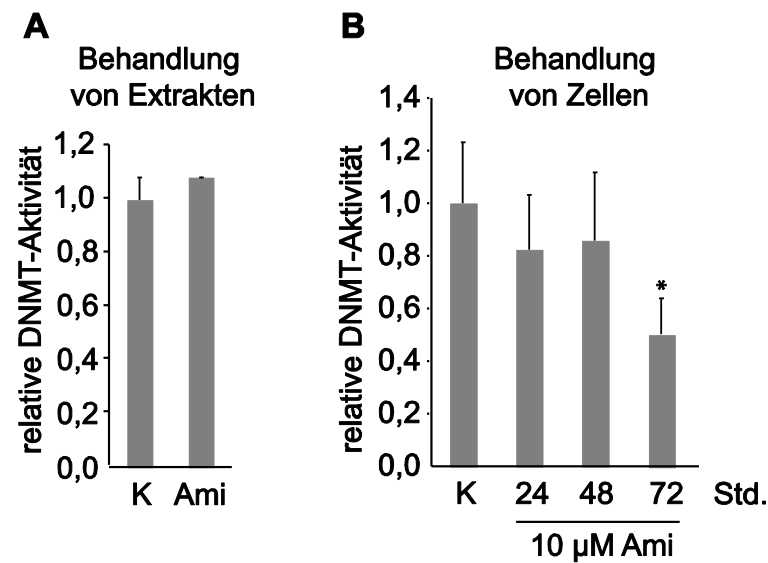


Abbildung 4.2.2 Ami inhibiert die DNMT-Aktivität indirekt. (A) Nukleäre Extrakte von unbehandelten kortikalen Astrozyten wurden mit 10 µM Ami versetzt und die DNMT-Aktivität gemessen. (B) Kortikale Astrozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. mit 10 µM Ami behandelt und die DNMT-Aktivität in nukleären Extrakten bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei Experimenten (* $p \leq 0,05$ versus Kontrolle).

Um ein Dosis-Wirkungs-Verhältnis zu erhalten, wurden Astrozyten mit 1, 5 und 10 µM Ami behandelt und die DNMT-Aktivität gemessen. Bei Behandlung mit 1 µM Ami zeigte sich kein Effekt. Die Inkubation mit 5 µM Ami verursachte eine tendenzielle, und die Exposition mit 10 µM Ami eine signifikante Reduktion der DNMT-Aktivität (Abbildung 4.2.3).

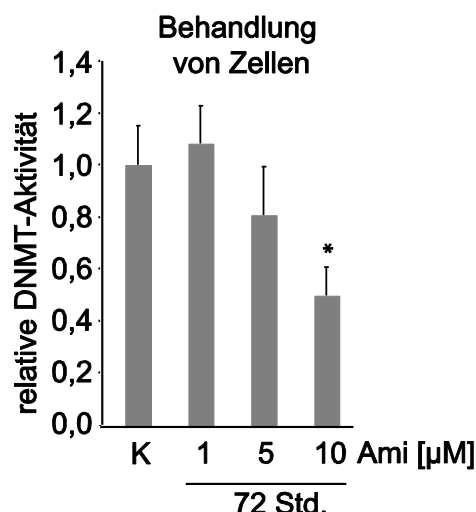


Abbildung 4.2.3 Die Reduktion der DNMT-Aktivität hängt von der Konzentration von Ami ab. Kortikale Astrozyten wurden für drei Tage mit 1, 5 und 10 μM Ami behandelt. Nukleäre Extrakte wurden hergestellt und die DNMT-Aktivität bestimmt. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler der DNMT-Aktivität aus drei Experimenten (* $p \leq 0,05$ versus Kontrolle).

Neben Astrozyten wurde die DNMT-Aktivität in Neuronen und neuralen Stammzellen (NSZ) nach dreitägiger Behandlung mit Ami oder Par gemessen. Die Behandlung von NSZ erfolgte mit einer Konzentration von 10 μM Ami/Par, wohingegen Neuronen mit 5 μM Ami/Par inkubiert wurden. Für Neuronen wurde die niedrigere Konzentration gewählt, da 10 μM Ami/Par zytotoxisch wirken (MTT-Assays, Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu Astrozyten zeigten weder NSZ noch Neuronen eine verringerte DNMT-Aktivität nach Inkubation mit Antidepressiva (Abbildung 4.2.4).

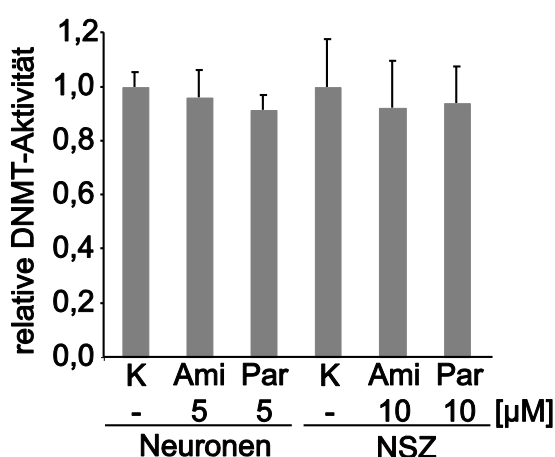


Abbildung 4.2.4 Die Inhibition der DNMT-Aktivität ist abhängig vom Zelltyp. Kortikale Neuronen und subventrikuläre NSZ wurden mit den angegebenen Ami-Konzentrationen für drei Tage behandelt. Die DNMT-Aktivität wurde in nukleären Extrakten gemessen und ist als Mittelwert \pm Standardfehler aus drei Experimenten dargestellt.

Zusammenfassend ist die Inhibition der DNMT-Aktivität durch Ami indirekt und abhängig vom Zelltyp.

4.2.3 Bestimmung des auf Antidepressiva reagierenden DNMT-Subtyps

Im nächsten Schritt sollte der DNMT-Subtyp, auf den die Antidepressiva wirken, näher eingengt werden. Da zelltypspezifische Unterschiede im Ansprechen auf Antidepressiva festgestellt wurden, könnte das Expressionsprofil von *Dnmt1*, *3a* und *3b* Aufschluss über den betroffenen DNMT-Subtyp geben. Daher wurde die relative mRNA-Expression mittels Real-Time-PCR untersucht. Zur Normalisierung diente *Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (Hprt)*. Da der Einsatz gleicher Mengen RNA und cDNA zu ähnlichen Werten des Schwellenwertzyklus der *Hprt*-PCR für die untersuchten Zelltypen führte, war *Hprt* zu etwa gleichen Mengen vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass die gemessenen relativen Mengen an *Dnmt* in etwa den absoluten Mengen entsprachen. Während Neuronen und Astrozyten ähnliche Mengen an *Dnmt1* und *Dnmt3a*-exprimierten, waren die Spiegel in NSZ etwa 2,5-mal höher. Die *Dnmt3b*-Spiegel in Neuronen und NSZ lagen 10–20-fach unter denen von *Dnmt1/3a*. Dieser Unterschied zeigte sich in Astrozyten noch ausgeprägter; hier lagen die *Dnmt3b*-Spiegel 400-fach unter denen von *Dnmt1/3a* (Abbildung 4.2.5). Folglich stellte die DNMT3b-Aktivität nur einen kleinen Anteil der in den DNMT-Assays gemessenen Gesamtaktivität dar. Daher ist davon auszugehen, dass die Inhibition anderer DNMTs für die beobachteten Effekte der Antidepressiva verantwortlich ist.

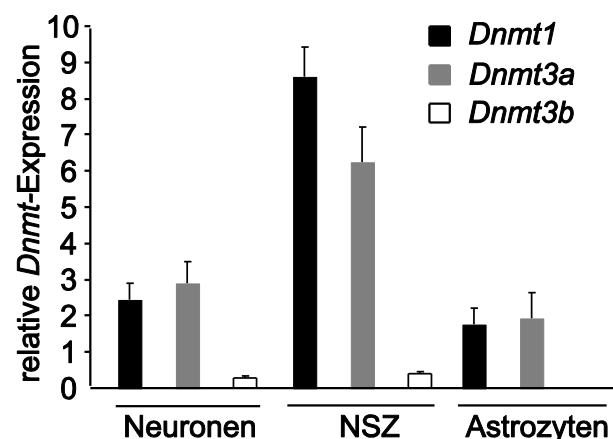


Abbildung 4.2.5 Relative mRNA-Expression der *Dnmt*-Subtypen in neuronalen Zellen. Die relativen Mengen von *Dnmt1*-, *Dnmt3a*- und *Dnmt3b*-mRNA wurden in kortikalen Neuronen, subventrikulären NSZ und kortikalen Astrozyten mittels Real-Time-PCR bestimmt. Die mRNA-Expression von *Hprt* diente zur Normalisierung. Es wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Experimenten berechnet.

In einer Studie an Kolonkarzinomzellen wurde gezeigt, dass DNMT1 und DNMT3a unterschiedliche Affinitäten zu Chromatin besitzen (Jeong u. a., 2009). Daher wurde untersucht, ob DNMT1, 3a oder beide Subtypen in den nukleären Extrakten, die für die Messung der DNMT-Aktivität verwendet wurden, vorlagen. Aus kortikalen Astrozyten wurden Zellkerne isoliert, und nacheinander mit Puffern, die ansteigende Salzkonzentrationen (100-400 mM NaCl) enthielten, inkubiert. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurden die Kerne vollständig aufgeschlossen. Die daraus erhaltenen Lysatfraktionen wurden auf Immunreaktivität von DNMT1 und DNMT3a mittels Western-Blot getestet. Der Großteil an DNMT1 wurde schon mit 250 mM NaCl extrahiert, wohingegen DNMT3a ausschließlich in der letzten Fraktion (>400 mM NaCl) detektiert wurde (Abbildung 4.2.6 A). Dies steht im Einklang mit der Studie von Jeong et al. und zeigt, dass DNMT3a, im Gegensatz zu DNMT1, starke, polare Wechselwirkungen mit Faktoren im Zellkern eingeht. Da die nukleären Extrakte der vorherigen DNMT-Assays mit einem Puffer hergestellt wurden, der 250 mM NaCl enthielt, ist anzunehmen, dass DNMT1 den Hauptteil zur DNMT-Aktivität beitrug. Um dies weiter zu untermauern, wurde die DNMT-Aktivität in Ansätzen mit unterschiedlichen DNA-Substraten verglichen. DNMT1 methyliert *in vitro* hemimethylierte DNA etwa 5–20 mal effizienter als unmethylierte DNA. Im Gegensatz dazu weist DNMT3a eine Präferenz für unmethylierte DNA auf (Flynn u. a., 1996; Yokochi und Robertson, 2002). Wie erwartet methylierten nukleäre Extrakte, die mit 250 mM NaCl hergestellt wurden, hemimethylierte DNA fünfmal effizienter als unmethylierte DNA (Abbildung 4.2.6 B).

Die Behandlung von Astrozyten mit Ami führte nur dann zu einer signifikanten Verringerung der DNMT-Aktivität, wenn hemimethyliertes DNA-Substrat verwendet wurde (Abbildung 4.2.6 C). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der beobachtete Effekt hauptsächlich durch eine Inhibition der Erhaltungsmethylierung durch DNMT1 hervorgerufen wurde.

Um zu untersuchen, ob sich Antidepressiva auf die DNMT3a-Aktivität auswirken, wurde die Methylierung des DNA-Substrats Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC) in Gesamtzellextrakten gemessen. In diesen war die DNMT-Aktivität um $54 \pm 1\%$ reduziert (Abbildung 4.2.6 D). Dies ähnelte der DNMT-Aktivität in nukleären Extrakten (Abbildung 4.2.1; Reduktion um $48 \pm 6\%$). Die DNMT-Aktivität war nicht verändert, wenn unmethylierte DNA eingesetzt wurde, was auf eine intakte *de novo* Methylierung schließen lässt (Abbildung 4.2.6 D). Zusammenfassend inhibierte die Antidepressiva-Behandlung von kortikalen Astrozyten den DNMT-Subtyp 1. Es wurden keine Hinweise für einen Effekt auf DNMT3a gefunden.

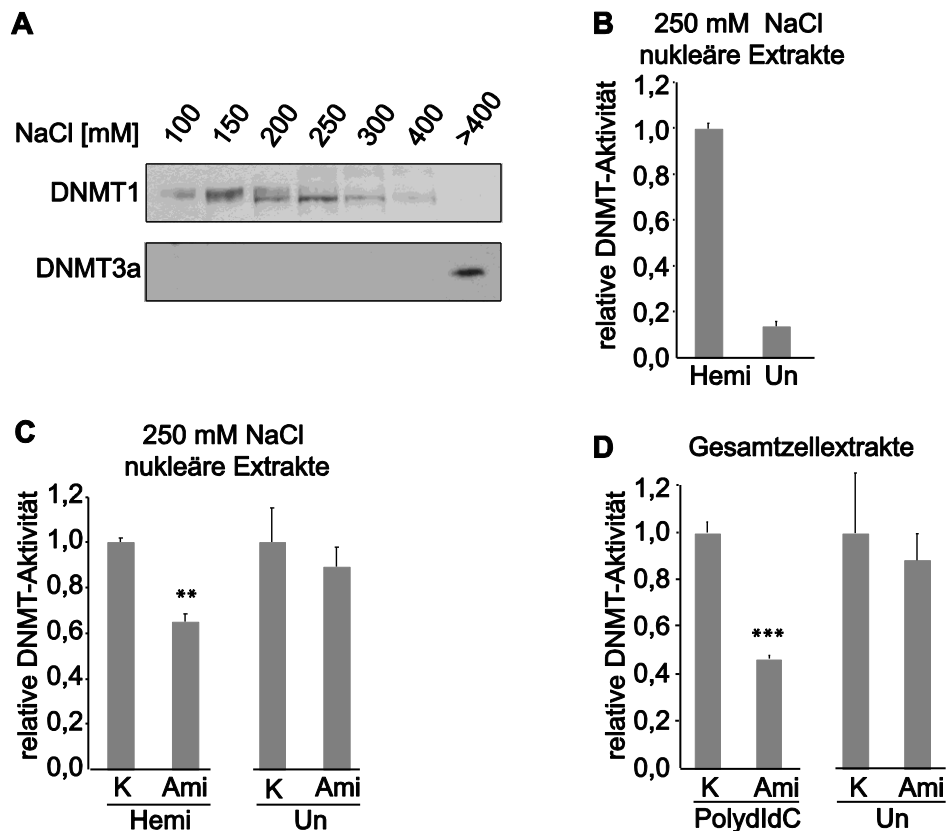


Abbildung 4.2.6 Antidepressiva inhibieren den DNMT-Subtyp 1. (A) Western-Blot nukleärer Extrakte gegen DNMT1 und DNMT3a. Aus Zellkernen von Astrozyten wurden sequentiell Proteine durch Inkubation mit Puffern, die ansteigende Salzkonzentrationen (100-400 mM NaCl) enthielten, extrahiert. Die Fraktion >400 mM NaCl enthielt alle Proteine, die nach dem letzten Extraktionsschritt im Kern verblieben. Die Fraktionen wurden auf DNMT1- und DNMT3a-Immunität mittels Western-Blot getestet. (B-D) *In vitro* DNMT-Aktivitätsassay von glialen Zellextrakten. (B) Nukleäre Extrakte von unbehandelten Astrozyten, die durch Inkubation mit 250 mM NaCl-Puffer erhalten wurden, zeigen fünf- bis sechsfach höhere DNMT-Aktivität bei Verwendung von hemimethyliertem (Hemi) im Vergleich zu unmethyliertem (Un) DNA-Substrat. (C) Korticale Astrozyten wurden mit Ami behandelt (drei Tage, 10 μ M) und die DNMT-Aktivität in nukleären Extrakten (250 mM NaCl) gemessen. Als DNA-Substrat dienten hemi- oder unmethylierte Oligonukleotide. (D) Die DNMT-Aktivität wurde in Gesamtzellextrakten von Astrozyten, die mit Ami behandelt wurden (drei Tage, 10 μ M), bestimmt. Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC) oder unmethylierte Oligonukleotide wurden als DNA-Substrate eingesetzt. Die DNMT-Aktivität ist relativ zum Mittelwert \pm Standardfehler des Signals von Kontrolleextrakten dargestellt ($n = 3$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$ versus Kontrolle).

4.2.4 Mechanistische Aspekte der DNMT1-Inhibition

4.2.4.1 Expressionsanalyse der DNMT1

Die Expressionsstärke der DNMT1 hängt vom Zellzyklus ab. Transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen stellen sicher, dass die Expression in der S-Phase des Zellzyklus am höchsten ist (Jurkowska u. a., 2011). Daher wurde analysiert, ob sich die Behandlung von Astrozyten mit Antidepressiva auf

Zellzyklusparameter auswirkt. Astrozyten wurden mit Ami oder Par (drei Tage, 10 μ M) behandelt und die Zellzyklusstadien (G1/G0, S, G2) wurden anhand einer Propidiumiodid (PI)-Färbung und anschließender FACS-Analyse untersucht. Der Anteil von Zellen in S+G2-Phase war in unbehandelten Kontrollzellen sehr niedrig (~8%) und unterschied sich nicht von Zellen, die mit Antidepressiva behandelt wurden (Abbildung 4.2.7 A).

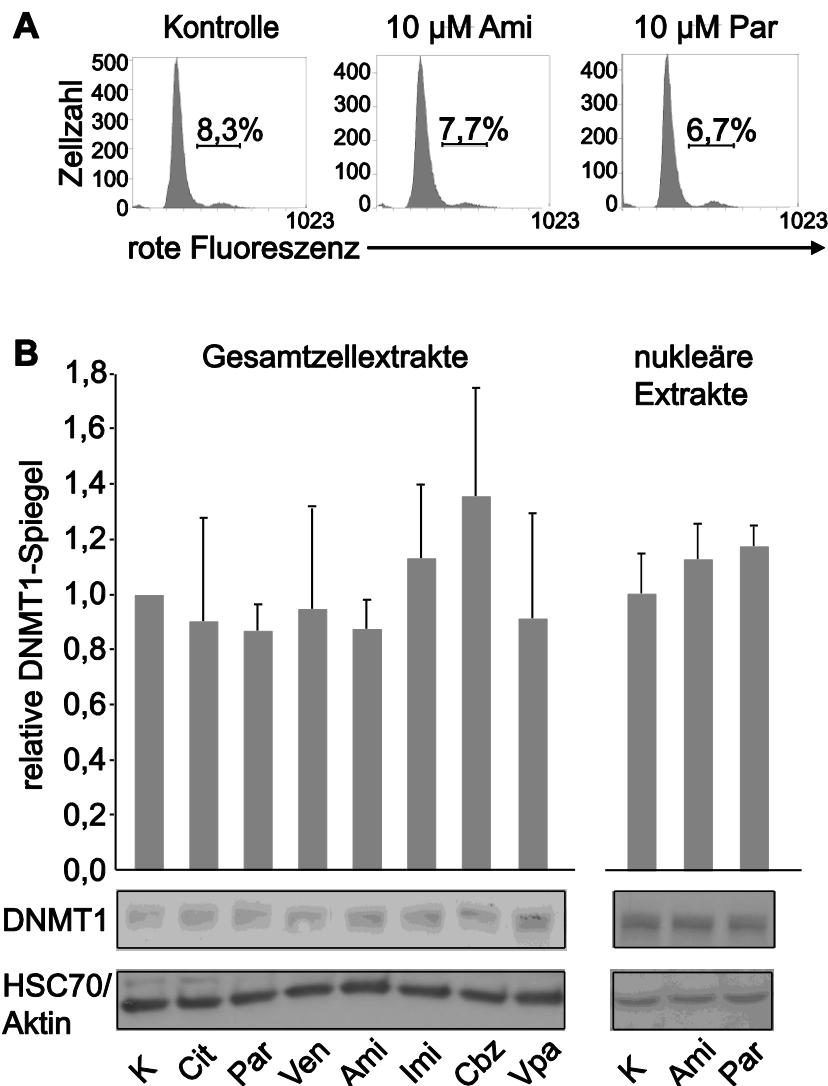


Abbildung 4.2.7 Antidepressiva wirken sich nicht auf den Zellzyklus und auf die Expression der DNMT1 aus. (A) Zellzyklusanalyse mittels FACS. Kerne von mit Ami oder Par behandelten (drei Tage, 10 μ M), kortikalen Astrozyten wurden mit Propidiumiodid gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen. Die Graphen zeigen die Zellzyklusprofile und den prozentualen Anteil der Zellen in der S+G2-Phase (B) DNMT1-Proteinspiegel nach Behandlung mit psychoaktiven Substanzen. Kortikale Astrozyten wurden mit den entsprechenden psychoaktiven Substanzen für drei Tage behandelt und die DNMT1-Proteinspiegel in nukleären (250 mM NaCl) ($n=8$) oder Gesamtzellextrakten ($n\geq 3$) mittels Western-Blot gemessen. Die Immunreaktivität von HSC70/Aktin diente zur Normalisierung. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen DNMT1-Expression \pm Standardfehler.

Da die Inhibition von Antidepressiva in nukleären Extrakten (250 mM NaCl) und in Gesamtextrakten beobachtet wurde, wurde die Expression von DNMT1 in beiden Extraktarten gemessen. Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass Antidepressiva-Behandlung (drei Tage, 10 μ M) die DNMT1-Spiegel weder in nukleären Extrakten noch in Gesamtextrakten veränderte (Abbildung 4.2.7 B).

4.2.4.2 Posttranslationale Modifikationen und Signalwege

Die DNMT1-Aktivität kann durch verschiedene Faktoren moduliert werden. Zu diesen Faktoren gehören posttranslationale Modifikationen, S-Adenosylhomocystein und Interaktionspartner. Posttranslationale Modifikationen, welche die DNMT1-Aktivität modulieren, sind Phosphorylierung und Sumoylierung.

Antidepressiva wirken sich maßgeblich auf die Aktivierung bestimmter Signalwege, wie den MAPK- (Mitogen-aktivierte Proteinkinase), den AKT- sowie den PKC- (Proteinkinase C) Signalweg aus. Bemerkenswerterweise wurde die Phosphorylierung der DNMT1 mit Signalwegen in Zusammenhang gebracht, welche durch Antidepressiva aktiviert werden (Morishita und Aoki, 2002; Hisaoka u. a., 2007; Beaulieu u. a., 2009).

Die Phosphorylierung von DNMT1 durch PKC senkte in einer *in vitro* Studie die DNMT1-Aktivität (Lavoie u. a., 2011). Daher wurden kortikale Astrozyten mit Gö 6983, einem Inhibitor der PKC, (drei Tage, 0,5 μ M) oder gleichzeitig mit Par (drei Tage, 10 μ M) und Gö 6983 (drei Tage, 0,5 μ M; 2 Std. Vorbehandlung mit Gö 6983) behandelt und die DNMT-Aktivität gemessen. Gö 6983 wirkte sich jedoch weder in der Doppel- noch in der Einzelbehandlung auf die DNMT-Aktivität aus (Abbildung 4.2.8 A).

In einer Studie an Gliomzellen inhibierte die gleichzeitige Phosphorylierung der DNMT1 durch AKT und PKC die enzymatische Aktivität. Dementsprechend aktivierte eine Doppelbehandlung mit AKT- und PKC-Inhibitor die DNMT1 (Hervouet u. a., 2010). Daher wurden kortikale Astrozyten gleichzeitig mit Ami (drei Tage, 10 μ M) sowie AKT- und PKC-Inhibitoren behandelt (drei Tage, 0,5 μ M Gö 6983, 0,1 μ M AKT-Inhibitor; 2 Std. Vorbehandlung). Weder die Einzelbehandlung mit den Inhibitoren, noch die Behandlung mit Inhibitoren in Kombination mit Ami führte zu einer Erhöhung der DNMT1-Aktivität (Abbildung 4.2.8 A). Auch andere Inhibitorkonzentrationen zeigten keinen aktivitätssteigernden Effekt (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluss von Antidepressiva auf den MAPK-Signalweg ist durch eine Vielzahl an Studien belegt (Hisaoka u. a., 2007). Daher wurde auch dieser Signalweg in die Untersuchungen einbezogen. Die Behandlung der Astrozyten mit einem Inhibitor des MAPK-Signalwegs, U0126 (drei Tage, 2 μ M), oder mit einer Kombination aus Ami (drei Tage, 10 μ M) und U0126 (drei Tage, 2 μ M; 2 Std. Vorbehandlung) zeigte jedoch keinen Effekt auf die DNMT1-Aktivität (Abbildung 4.2.8 A).

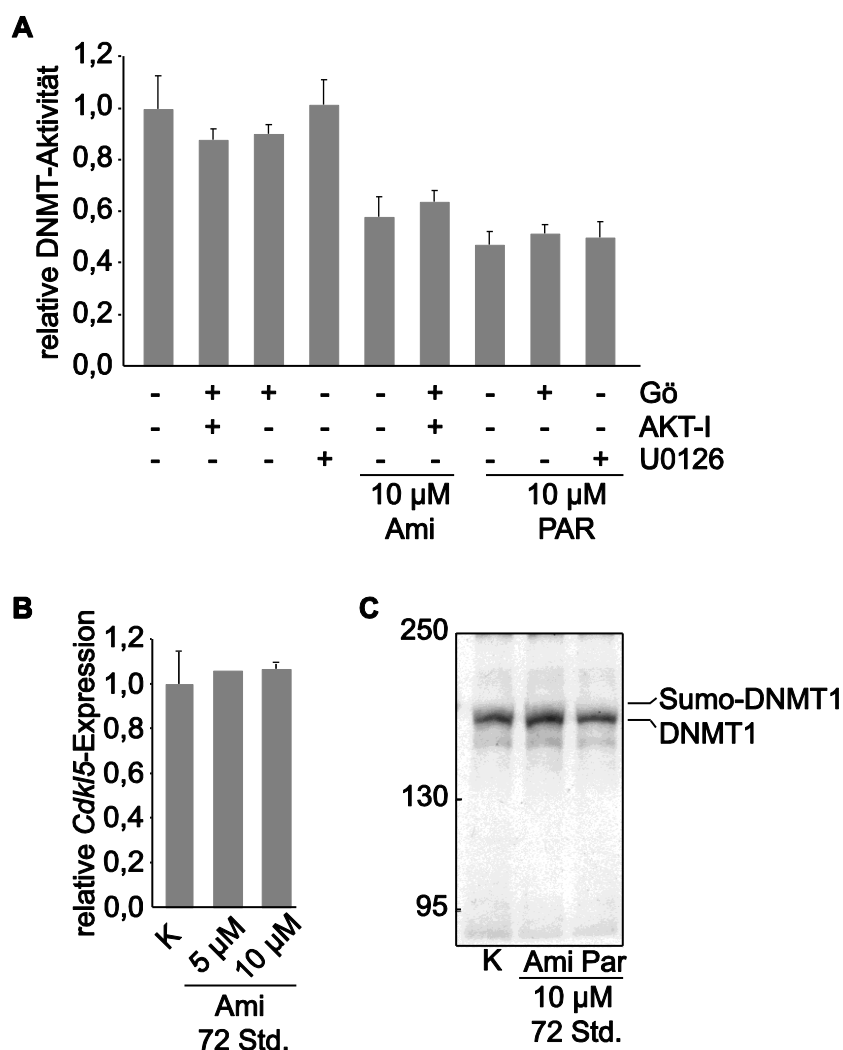


Abbildung 4.2.8 Charakterisierung von an der DNMT-Regulation beteiligten Faktoren. (A) Kortikale Astrozyten wurden mit Antidepressiva und den angegebenen Inhibitoren (0,5 μM Gö 6983, 0,1 μM AKT-Inhibitor [AKT-I], 2 μM U0126) für drei Tage behandelt, wobei eine Vorbehandlung mit Inhibitoren für 2 Std. erfolgte. Die DNMT-Aktivität wurde in nukleären Extrakten (250 mM NaCl) bestimmt und ist als Mittelwert ± Standardfehler von drei Experimenten dargestellt. (B) RNA wurde aus kortikalen Astrozyten, die mit 5 oder 10 μM Ami für 72 Std. behandelt wurden, isoliert und die relative mRNA-Expression von *Cdk15* mittels Real-Time-PCR bestimmt. *Hprt*-mRNA diente zur Normalisierung. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler aus drei Experimenten (10 μM Ami) bzw. der Wert aus einem Experiment (5 μM Ami). (C) Mit Ami/Par behandelte (drei Tage, 10 μM) Gesamtzellextrakte von Astrozyten wurden mit der Western-Blot-Methode auf DNMT1-Immunreaktivität getestet. Die theoretische Position von sumoyliertem DNMT1 ist eingezeichnet.

Immunhistochemische Studien an Rattenhirnen zeigten, dass Antidepressiva die Expression von MeCP2 erhöhen (Cassel u. a., 2006). MeCP2 senkt die mRNA Expression der *Cyclin-dependent kinase-like 5* (*Cdk15*) (Carouge u. a., 2010), welche DNMT1 bindet und *in vitro* phosphoryliert (Kameshita u. a., 2008). Daher wurde die mRNA-Expression von *Cdk15* nach Behandlung von Astrozyten mit Ami (drei Tage,

5/10 μM) untersucht. Ami hatte jedoch keinen Einfluss auf die mittels Real-Time-PCR gemessenen mRNA-Spiegel von *Cdkl5* (Abbildung 4.2.8 B).

Neben der Phosphorylierung kann die Sumoylierung einen Effekt auf die DNMT1-Aktivität ausüben. Es wurde berichtet, dass mit SUMO1 konjugierte DNMT1 eine erhöhte enzymatische Aktivität aufweist (Lee und Muller, 2009). Da SUMO1 eine Größe von 12 kDa hat, sollte der Größenunterschied von sumoylierter und nicht-sumoylierter DNMT1 mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Astrozyten wurden mit 10 μM Ami/Par für drei Tage behandelt und die Lysate im Western-Blot auf DNMT1-Immunreaktivität getestet. Weder die Kontrolleextrakte noch die Extrakte behandelter Zellen enthielten einen nachweisbaren Anteil sumoylierter DNMT1 (Abbildung 4.2.8 C). Es wurde daher davon ausgegangen, dass eine Veränderung der Menge an sumoylierter DNMT1 nicht den Verlust der Enzymaktivität um ~50% hervorrufen kann. Zusammenfassend lieferten die untersuchten Signalwege und posttranslationalen Modifikationen keine weiterführenden Erkenntnisse über den Mechanismus der Inhibition von DNMT1 durch Antidepressiva.

4.2.4.3 Niedermolekulare Substanzen

In der DNA-Methylierungsreaktion wird der Kofaktor der DNMT, SAM, zu S-Adenosylhomocystein (SAH) umgesetzt. SAH bindet an DNMTs und inhibiert deren katalytische Aktivität (Isakovic u. a., 2009). Mit einem Dialyseverfahren können niedermolekulare Substanzen, wie z.B. SAH, aus Stoffgemischen entfernt werden. Um zu untersuchen, ob erhöhte Konzentrationen von SAH für die Inhibition der DNMT1 verantwortlich sind, wurden Extrakte von Ami-behandelten Zellen (drei Tage, 10 μM) einer Dialyse unterzogen und die DNMT1-Aktivität gemessen. Undialysierte und dialysierte Extrakte zeigten keinen Unterschied in der DNMT1-Aktivität (Abbildung 4.2.9). Somit lieferte das Dialyseverfahren keine Hinweise, dass niedermolekulare Substanzen, wie beispielsweise SAH, an der Inhibition der DNMT-Aktivität beteiligt sein könnten.

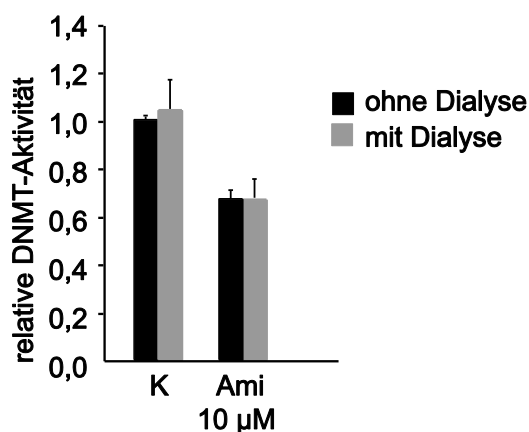


Abbildung 4.2.9 Niedermolekulare Substanzen sind nicht an der Ami-vermittelten Inhibition der DNMT-Aktivität beteiligt. Nukleäre Extrakte von mit Ami behandelten Astrozyten (drei Tage, 10 µM) wurden dialysiert (Ausschlussgröße 12-16 kDa) und die DNMT-Aktivität bestimmt. Die DNMT-Aktivität ist relativ zum Mittelwert \pm Standardfehler des Signals von Kontrolleextrakten aus drei Experimenten dargestellt.

4.2.4.4 Interaktionspartner

Die Histonmethyltransferase G9a und die N(alpha)-Acetyltransferase 10 (NAA10) interagieren mit DNMT1 und steigern deren Aktivität *in vitro* (Estève u. a., 2006; Lee u. a., 2010a). Daher wurde untersucht, ob Antidepressiva die Proteinspiegel von G9a oder NAA10 verändern. Da die DNMT1-Aktivität sowohl in Gesamtextrakten als auch in nukleären Extrakten inhibiert war, wurden die G9a-/NAA10-Proteinspiegel in beiden Extraktarten mittels Western-Blot gemessen. Während sich die Menge von NAA10 nicht veränderte, bewirkte die Behandlung von Astrozyten mit Ami und Par (drei Tage, 10 µM) eine Reduktion der G9a-Expression. Die Behandlung mit Cbz, welche keinen Einfluss auf die DNMT1-Aktivität ausübte, wirkte sich auch nicht auf die Expression von G9a aus (Abbildung 4.2.10 A).

Wenn die Verringerung der Menge an G9a verantwortlich für die Inhibition der DNMT1-Aktivität ist, sollte die Reduktion der G9a-Expression in etwa zeitgleich mit der Inhibition der DNMT1-Aktivität auftreten. In der Tat blieben die Proteinspiegel von G9a nach ein- und zweitägiger Behandlung mit 10 µM Ami unverändert (Abbildung 4.2.10 B). Zu diesen Zeitpunkten war auch die DNMT1-Aktivität noch unverändert (Abbildung 4.2.2 B).

Weiterhin sollte im Falle einer durch G9a vermittelten Inhibition der enzymatischen Aktivität von DNMT1 die Wiederherstellung der G9a-Menge dazu führen, dass die DNMT1-Aktivität das Niveau von Kontrollzellen erreicht. Daher wurden nukleäre Extrakte von behandelten Astrozyten (drei Tage, 10 µM Ami) mit rekombinanten G9a versetzt und die DNMT-Aktivität gemessen. Wenn den Zellextrakten 500 pg rekombinantes G9a zugesetzt wurde, erlangte die DNMT-Aktivität wieder die Spiegel von Kontrolleextrakten.

Die Zugabe der gleichen Menge G9a zu Kontrollextrakten ergab einen leichten, nicht signifikanten Anstieg der DNMT-Aktivität (Abbildung 4.2.10 C).

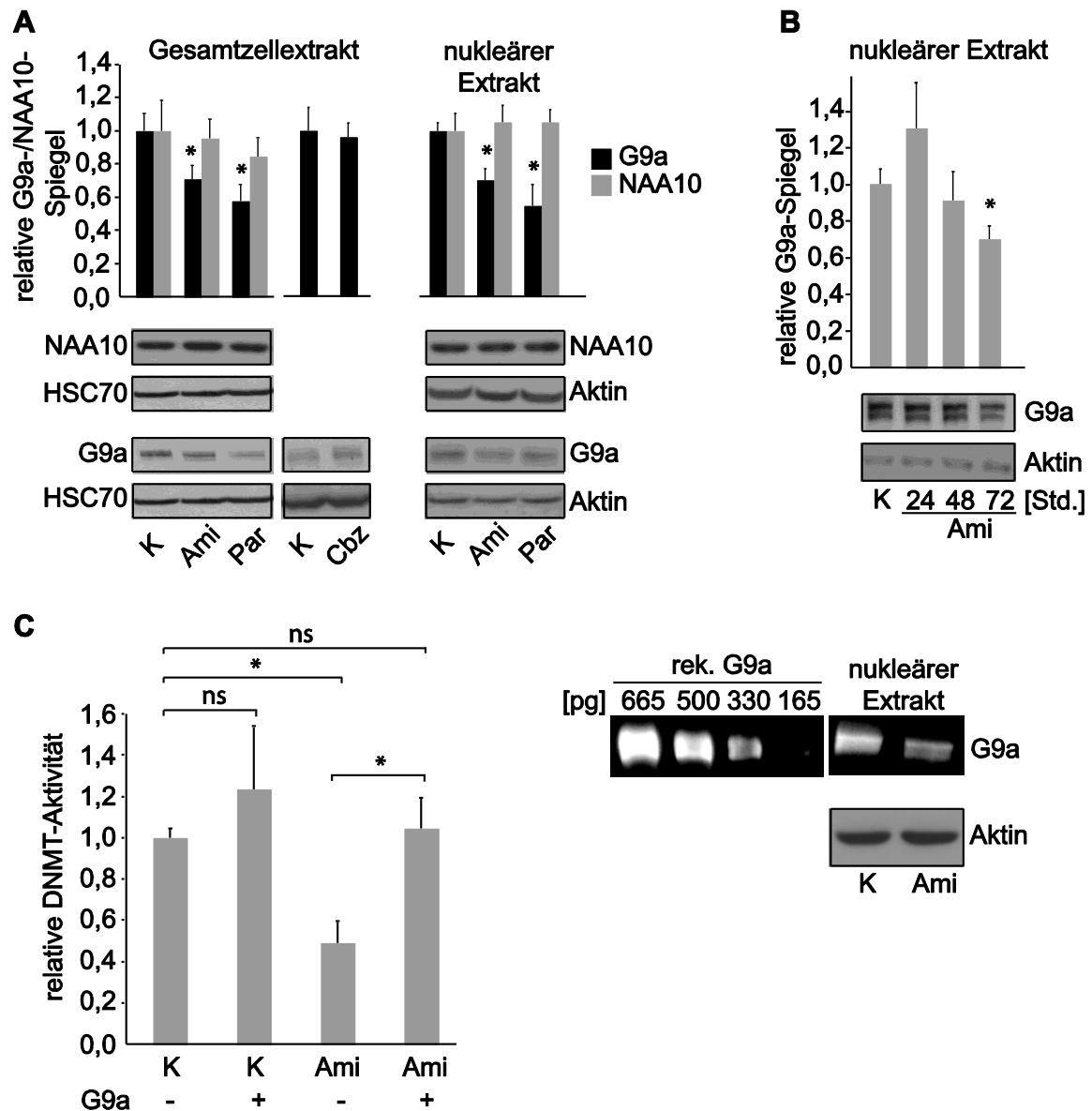


Abbildung 4.2.10 Die Reduktion der G9a-Expression ist verantwortlich für die Inhibition der DNMT1. (A,B) Kortikale Astrozyten wurden mit 10 μ M Ami/Par oder 100 μ M Cbz für drei Tage (A) oder 10 μ M Ami für einen, zwei oder drei Tage (B) behandelt. Die relative Expression von G9a und NAA10 wurde in mindestens vier Experimenten mittels Western-Blot bestimmt. Zur Normalisierung diente die Immunreaktivität von Aktin oder HSC70. (C) Die Western-Blot-Analyse wurde angewandt, um anhand einer Standardreihe mit rekombinantem Protein die G9a-Proteinspiegel in nukleären Extrakten von unbehandelten und mit Ami behandelten Zellen zu bestimmen. Die Immunreaktivität von Aktin diente zur Normalisierung. Nukleäre Extrakte (250 mM NaCl) von mit Ami behandelten (drei Tage, 10 μ M) Astrozyten wurden mit 500 pg rekombinantem G9a versetzt und die DNMT-Aktivität gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei Experimenten (* $p \leq 0,05$ versus Kontrolle).

Um die zwischen Kontroll- und Ami-Extrakten bestehenden Mengenunterschiede von endogenem G9a abschätzen zu können, wurde eine Standardreihe mit definierten Mengen rekombinanten G9a mittels Western-Blot analysiert und mit den Extrakten verglichen. Demnach befand sich im Kontrollextrakt ~75 pg und im Ami-Extrakt ~50 pg G9a-Protein. Folglich enthielten Ami-Extrakte, denen rekombinantes G9a zugesetzt wurde, eine ca. siebenfach höhere Menge G9a-Protein als Kontrollextrakte.

Zusammenfassend lieferten die Untersuchungen keine Hinweise, dass posttranslationale Modifikationen oder niedrigmolekulare Inhibitoren an der durch Antidepressiva vermittelten Reduktion der DNMT1-Aktivität beteiligt waren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Behandlung von Astrozyten mit Antidepressiva zu einer Verringerung der G9a-Expression führt und dass die Zugabe von rekombinanten G9a zu Extrakten von behandelten Zellen die DNMT-Aktivität wiederherstellt.

5 Diskussion

Studien an mono- und dizygotischen Zwillingen zeigen, dass die Depression durch prädisponierende, erbliche Faktoren sowie Umweltfaktoren verursacht wird (Haque u. a., 2009). Epigenetische Prozesse stellen ein Bindeglied zwischen Umweltreizen und Genexpression dar und könnten daher bei der Entstehung der Depression eine wichtige Rolle spielen. Wie sich in epidemiologischen Studien erwies, stellt chronischer Stress einen wesentlichen Risikofaktor für die Depression dar (Laux u. a., 2008). In verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass Stress zu langfristigen Veränderungen der DNA-Methylierung und damit einhergehend zu dauerhaft veränderter Genexpression führt (Weaver u. a., 2004b; Roth u. a., 2009; Murgatroyd u. a., 2009). Es wird daher davon ausgegangen, dass bei einem gewissen Anteil der Patienten die Depression von permanenten, durch Stress ausgelösten Veränderungen des Epigenoms und der damit verbundenen Genexpression mitverursacht wird (Renthal und Nestler, 2009). Eine Reihe von Studien weist darauf hin, dass ein Wirkmechanismus von Antidepressiva darin bestehen könnte, diese Veränderungen des Epigenoms wieder umzukehren (Tsankova u. a., 2006; Melas u. a., 2011; Uchida u. a., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits das DNA-Methylierungsprofil von mit Stresshormon behandelten, neuronalen Primärzellen untersucht, und andererseits ein Wirkmechanismus von Antidepressiva aufgedeckt, der dazu beitragen könnte, epigenetische Fehlregulationen umzukehren.

5.1 Methylierungsprofil von primären Astrozyten nach Behandlung mit einem Stresshormon

In einer Reihe von Studien wurde nachgewiesen, dass Stress die DNA-Methylierung regulatorischer DNA-Abschnitte langfristig verändern kann. So zeigte der präfrontale Kortex von Ratten, die während ihrer postnatalen Lebensphase chronischem Stress ausgesetzt waren, eine erhöhte Methylierung in bestimmten Promotorbereichen des *Bdnf*-Gens und damit einhergehend eine verringerte Expression der entsprechenden mRNA (Roth u. a., 2009). Es wurde ebenso nachgewiesen, dass sich die direkte Aktivierung des GRs auf die DNA-Methylierung auswirkt. Eine Langzeitbehandlung von Ratten mit dem Stresshormon Kortikosteron führte zu einer von Expressionsunterschieden begleiteten, veränderten DNA-Methylierung des Gens *Fkbp5* im Hypothalamus und Hippokampus. Da die Behandlung der HT22-Zelllinie mit Kortikosteron in ähnlichen Veränderungen der DNA-Methylierung des Gens *Fkbp5*

resultierte, wurde angenommen, dass die Methylierungsunterschiede im untersuchten Gewebe nicht auf einer veränderten Zusammensetzung der Zelltypen beruhte, sondern funktionelle Bedeutung haben könnte (Lee u. a., 2010b). In der vorliegenden Arbeit wurde die Methylierungsanalyse an primären, hippokampalen Astrozyten durchgeführt, welche einer Langzeitbehandlung mit einem synthetischen Stresshormon, dem spezifischen GR-Liganden Dexamethason (Dex), unterzogen wurden. Im Gegensatz zu primären, kortikalen Neuronenkulturen konnte in der vorliegenden Arbeit eine funktionierende GR-Aktivierung in kortikalen Astrozytenkulturen mit Hilfe von Expressionsanalysen bekannter GR-Zielgene nachgewiesen werden.

Um die DNA-Methylierung von Dex-behandelten und unbehandelten Astrozyten zu untersuchen, wurde die DNA unter Verwendung des Restriktionsenzym MseI gespalten und methylierte DNA mit Hilfe eines anti-5MeC-Antikörpers angereichert (MeDIP). Anschließend wurde die DNA amplifiziert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und zusammen mit der Ausgangs-DNA auf einem Microarray hybridisiert (MeDIP-Array), welcher Sonden enthielt, die alle annotierten CpG-Inseln und Promotoren des Rattengenoms abdeckten. Das normalisierte, logarithmische Verhältnis aus den Signalintensitäten der fluoreszierenden präzipitierten und Ausgangs-DNA (normalisierter \log_2 -Quotient) gilt als Maß für die absolute DNA-Methylierung (Pelizzola u. a., 2008). Diese hängt sowohl vom Methylierungsgrad einzelner CpG-Stellen als auch von der Anzahl der CpG-Stellen ab. Die normalisierten \log_2 -Quotienten von fünf zufällig gewählten Loci konnten anhand von Literaturangaben und Bisulfitsequenzierung validiert werden. Es zeigte sich, dass eine Unterscheidung zwischen hypermethylierten und hypomethylierten Regionen mittels \log_2 -Quotienten möglich war. Regionen, deren absolute Methylierung signifikant über der durchschnittlichen Methylierung lag, sind zwar aufgrund der Datenmenge nicht im Anhang des vorliegenden Dokuments angegeben, können aber auf Anfrage in elektronischer Form übergeben werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Präzipitation von sonifizierter und mittels Restriktionsenzym gespalten DNA nicht zu denselben Ergebnissen hinsichtlich der Bestimmung der absoluten DNA-Methylierung führen kann. Dies liegt daran, dass im Gegensatz zur Sonifizierung die DNA durch den Restriktionsverdau in Fragmente mit einer definierten Anzahl von CpG-Stellen zerlegt wird.

Die Sensitivität, mit der Methylierungsunterschiede in verschiedenen Ansätzen mit Hilfe der MeDIP-Methode aufgelöst werden können, hängt unter anderem von der Präzipitationsmethode und von der Amplifikation der DNA ab. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die mit Hilfe der MeDIP-Methode erreichte, relative Anreicherung eines 5–22 5MeCs enthaltenden DNA-Fragments annähernd linear mit der Anzahl an methylierten CpG-Stellen ansteigt. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von

Weber u. a. (2005). Der Vergleich von MeDIP- und MBD-IP-Methode zeigte, dass erstere Methylierungsunterschiede genauer auflöste. Im Allgemeinen gilt jedoch, dass mit Hilfe von Präzipitationsmethoden Methylierungsunterschiede nur in bestimmten DNA-Bereichen genau aufgelöst werden können. So fiel für die Präzipitation des DNA-Fragments mit fünf methylierten CpG-Stellen der prozentuale Standardfehler des relativen Anreicherungsfaktors sehr hoch aus (84%). Darüber hinaus wurde in der Studie von Pelizzola (2008) nachgewiesen, dass die relative Anreicherung mit steigender Anzahl methylierter CpG-Stellen eine Sättigung erreicht. In Bereichen sehr hoher oder niedriger CpG-Dichte können Methylierungsunterschiede folglich nicht mehr aufgelöst werden. Des Weiteren kann die Amplifikation der DNA zu einer Verminderung der Sensitivität führen, wenn sich die Amplifikationseffizienz eines bestimmten Locus über verschiedene Ansätze hinweg wenig stabil verhält. Daher wurden nach Amplifikation der DNA die relativen Mengen einzelner Loci gemessen und die relative Standardabweichung berechnet. Es wurden verschiedene Amplifikationskits hinsichtlich der relativen Standardabweichungen verglichen. Für das WGA2-Kit ergaben sich relativ geringe prozentuale Standardabweichungen von durchschnittlich ca. 11%.

Um die DNA-Methylierung von mit Dex behandelten und unbehandelten Astrozyten zu vergleichen, wurden die \log_2 -Quotienten eines jeden DNA-Abschnitts mit Hilfe eines t -Tests auf signifikante Unterschiede geprüft. Nur fünf Loci zeigten nach Korrektur für multiples Testen (FDR-Korrektur) einen p -Wert kleiner als 0,05. Aus der visuellen Inspektion der \log_2 -Quotienten von Kontroll- und Dex-Ansätzen ließen sich keine vielversprechenden Kandidatengene ableiten. Zum Teil beinhalteten diese Loci einen stark abweichenden Ansatz. Zudem ergab die Bisulfitsequenzierung einzelner Kandidatengene keine Unterschiede in der DNA-Methylierung von Dex-behandelten und unbehandelten Astrozyten. Da mit Hilfe der MeDIP-Methode generell hypermethylierte und hypomethylierte DNA-Abschnitte differenziert werden konnten, wurde gefolgert, dass die Behandlung von Astrozyten mit Dex keine starken Veränderungen der DNA-Methylierung hervorrief.

Bislang wurde die Auswirkung von Stress auf die DNA-Methylierung nicht auf genomweiter Ebene untersucht. Die Bisulfitanalyse einzelner Loci ergab, dass die durch Stress ausgelösten Methylierungsunterschiede ein geringes Ausmaß haben oder sich auf wenige, einzelne CpG-Stellen beschränken (Weaver u. a., 2004b; Roth u. a., 2009; Murgatroyd u. a., 2009; Lee u. a., 2010b). Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich die Dex-Behandlung zwar auf die DNA-Methylierung von Astrozyten auswirkte, die Sensitivität des MeDIP-Arrays jedoch nicht ausreichte, um die Methylierungsunterschiede aufzulösen. Die durch postnatalen Stress in Ratten ausgelösten DNA-Methylierungsunterschiede des GR-Promotors traten bei 8 von 17

analysierten CpG-Stellen auf. Bei diesen 8 CpG-Stellen betrug der Methylierungsunterschied im Durchschnitt 50% (Weaver u. a., 2004b). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass postnataler Stress in Mäusen zu einer verringerten Methylierung des Vasopressin-Enhancers führte. Die Unterschiede traten bei 7 von 32 analysierten CpG-Stellen auf. Bei diesen 7 CpG-Stellen wurde ein Methylierungsunterschied von durchschnittlich 15% nachgewiesen (Murgatroyd u. a., 2009). Ein ähnlicher, durchschnittlicher Methylierungsunterschied wurde durch postnatalen Stress bei 8 CpG-Stellen des *Bdnf*-Promotors verursacht (Roth u. a., 2009). Der durch eine vierwöchige Behandlung von Mäusen mit Kortikosteron ausgelöste Methylierungsunterschied des *Fkbp5*-Enhancers betrug im Mittel 5%; in mit Kortikosteron behandelten HT22-Zellen wurde bei denselben CpG-Stellen ein Unterschied von 20% gemessen (Lee u. a., 2010b). Vor kurzem wurde ein MeDIP-Array verwendet, um in Mäusen die Auswirkung von maternalem Kokainkonsum auf die DNA-Methylierung von CpG-Inseln der Nachkommen zu untersuchen. Ein Großteil der CpG-Inseln, deren differentielle Methylierung validiert wurde, war moderat methyliert oder hypomethyliert. Die Methylierungsunterschiede betrugen durchschnittlich etwa 20% (Novikova u.a., 2008). An Mäusen wurde vor kurzem unter Verwendung einer genomweiten und hochauflösenden Methode der Einfluss von elektrokonvulsiver Stimulation auf die DNA-Methylierung von Neuronen des Dentatus Gyrus gemessen (Guo u. a., 2011a). Es zeigte sich, dass die CpG-Stellen, deren Methylierung durch neuronale Aktivität reguliert wurde, im Wesentlichen in Regionen mit geringer CpG-Dichte lagen. Es ist vorstellbar, dass die DNA-Methylierung solcher Regionen auch auf andere exogene Reize flexibler reagieren als die DNA-Methylierung von Regionen mit hoher CpG-Dichte. Die MeDIP-Methode kann jedoch Methylierungsunterschiede in Bereichen geringer CpG-Dichte nur unzureichend auflösen. Ein weiterer Grund, weshalb keine Methylierungsunterschiede festgestellt wurden, könnte an der Verteilung der regulierten CpG-Stellen innerhalb des Genoms liegen. Der in dieser Arbeit eingesetzte Array deckte alle Promotoren und CpG-Inseln des Rattengenoms ab. Die Studie von Guo (2011) zeigte jedoch, dass die Methylierung in intergenischen Regionen häufig, in Promotoren hingegen nur selten reguliert wird.

Die Langzeitbehandlung der Astrozyten mit Dex erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen. In Studien an mit Stresshormon behandelten Zelllinien wurde gezeigt, dass ein solcher Zeitraum ausreicht, um die DNA-Methylierung des *Tat*- bzw. *Fkbp5*-Gens zu modulieren (Thomassin u. a., 2001; Lee u. a., 2010b). In Mäusen wurde die DNA-Methylierung zumeist nach chronischem Stress, der über mehrere Wochen andauerte, gemessen (Weaver u. a., 2004b; Murgatroyd u. a., 2009; Uchida u. a., 2011). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass größere, mit der MeDIP-Methode detektierbare

Methylierungsunterschiede erst nach chronischer Behandlung der Astrozyten mit Dex auftreten.

Zusammenfassend wurde anhand eines astroglialen Zellmodells der Einfluss von Stress, einem wesentlichen Risikofaktor der Depression, auf die genomweite DNA-Methylierung von Promotoren und CpG-Inseln untersucht. Die Analyse der DNA-Methylierung mit Hilfe der MeDIP-Array-Methode zeigte keine Unterschiede zwischen primären, mit Stresshormon behandelten und unbehandelten Astrozyten auf. Daher wurde gefolgert, dass die Behandlung von Astrozyten mit Stresshormon zu keinen starken Veränderungen der DNA-Methylierung führte.

5.2 DNMT-Inhibition durch Antidepressiva

Neben der Modulation der monoaminergen Neurotransmission nehmen Antidepressiva auf eine Reihe weiterer biologischer Prozesse Einfluss, darunter die Regulation epigenetischer Parameter. So wurde festgestellt, dass sie sich auf Histonmodifikationen und DNA-Methylierung von Kandidatengenen der Depression auswirken (Tsankova u. a., 2006; Wilkinson u. a., 2009; Melas u. a., 2011). Zudem wurde gezeigt, dass das trizyklische Antidepressivum Ami die genomweite DNA-Methylierung an CCGG-Stellen in primären, kortikalen Astrozyten senkt (Perisic u. a., 2010). Es stellte sich daher die Frage, ob sich Ami und eventuell andere Antidepressiva auf die DNMT-Aktivität auswirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass verschiedene Antidepressiva, die TZA Ami und Imi, sowie der SSRI Par, die DNMT-Aktivität in primären kortikalen Astrozyten senken. Im Gegensatz dazu hatten der SSNRI Ven und der SSRI Cit keinen Einfluss auf die DNMT-Aktivität. Die Inhibition der DNMT-Aktivität stellt somit keinen allgemeinen Wirkmechanismus von Antidepressiva dar.

Die Analyse verschiedener Zelltypen zeigte, dass der durch Antidepressiva vermittelte Effekt auf die DNMT-Aktivität zelltypspezifisch war. So wurde die Enzymaktivität zwar in primären kortikalen Astrozyten inhibiert, nicht aber in kortikalen Neuronen oder subventrikulären NSZ. Dennoch könnten Neuronen und NSZ von einer Inhibition der DNMT-Aktivität in Astrozyten betroffen sein, da viele ihrer physiologischen Funktionen von Astrozyten beeinflusst werden. Beispielsweise produzieren Astrozyten wichtige Wachstumsfaktoren, die für die Proliferation und/oder das Überleben von NSZ und Neuronen essentiell sind (Cotter u. a., 2001). Das funktionelle Zusammenspiel von Neuronen und Astrozyten spielt auch in der synaptischen Neurotransmission eine essentielle Rolle. Es wird daher auch von einer dreiteiligen Synapse gesprochen. Vor kurzem wurde gezeigt, dass Astrozyten die Neurotransmission nicht nur nach

anhaltender und intensiver synaptischer Aktivität modulieren, sondern sogar einzelne Aktionspotentiale detektieren und die basale synaptische Transmission regulieren (Panatier u. a., 2011).

Mehrere experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass Antidepressiva den DNMT-Subtyp 1, und nicht die *de novo* Methyltransferasen 3a/b inhibieren. Erstens exprimierten postnatale Astrozyten nur äußerst geringe Mengen an *Dnmt3b*-mRNA im Vergleich zu den Mengen an *Dnmt1*- und *Dnmt3a*-mRNA. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass sich die Expression von *Dnmt3b* im Wesentlichen auf die frühe Gehirnentwicklung beschränkt (Feng u. a., 2005). Daraus wurde geschlossen, dass DNMT3b nicht an der durch Antidepressiva hervorgerufenen Inhibition der DNMT-Aktivität beteiligt ist. Zweitens bewiesen Kernextraktionen, die mit Puffern ansteigender Salzkonzentrationen hergestellt wurden, dass DNMT3a, im Gegensatz zu DNMT1, starke polare Wechselwirkungen mit Faktoren im Zellkern einging. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie an HTC116-Zellen überein, die demonstrierte, dass DNMT1 nur sehr schwach an Chromatin gebunden ist, hauptsächlich an die Linker-DNA oder an nukleosomenfreie Regionen. Im Gegensatz dazu ging DNMT3a sehr starke Wechselwirkungen mit Nukleosomen ein (Jeong u. a., 2009). Daher enthielt der mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration hergestellte Proteinextrakt, der für die Messungen der DNMT-Aktivität herangezogen wurde, kein messbares DNMT3a. Dies spiegelte sich auch darin wider, dass die Verwendung unmethylierter DNA, des bevorzugten Substrats von DNMT3a, eine niedrige DNMT-Aktivität zur Folge hatte. Bei Verwendung von DNA-Substrat, das bevorzugt von DNMT1 methyliert wird, also bei hemimethylierter DNA, wurde hingegen eine hohe Enzymaktivität gemessen (Flynn u. a., 1996; Yokochi und Robertson, 2002). Drittens verringerte die Behandlung von Astrozyten mit Antidepressiva die DNMT-Aktivität in Reaktionsansätzen mit hemimethylierter DNA und Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC), nicht aber die DNMT-Aktivität in Reaktionsansätzen mit unmethylierter DNA. Auch in Gesamtzellextrakten von mit Antidepressiva behandelten Astrozyten war die DNMT-Aktivität bei Verwendung von unmethylierter DNA nicht verändert. Folglich lieferten die experimentellen Befunde keine Hinweise, dass Antidepressiva die Aktivität von DNMT3a modulieren.

Die Behandlung von Astrozyten mit Ami führte zu einer indirekten Inhibition der DNMT-Aktivität. Einerseits wurde die Senkung der DNMT-Aktivität nur durch eine Behandlungsdauer von mindestens drei Tagen hervorgerufen und andererseits wirkte sich die Inkubation von Extrakten unbehandelter Zellen mit Ami nicht auf die Enzymaktivität aus. Mittels Western-Blot-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die durch Antidepressiva induzierte, indirekte Inhibition der enzymatischen Aktivität nicht durch eine verringerte Expression der DNMT1 verursacht wurde. Eine Studie an NT-2

Zellen zeigte, dass eine eintägige Behandlung mit Vpa die DNMT-Aktivität und die DNMT1-Proteinlevel erniedrigt (Kundakovic u. a., 2009). In primären Astrozyten war die DNMT-Aktivität und Expression von DNMT1 nach Behandlung mit Vpa jedoch nicht gesenkt. Dies unterstützt das Konzept, dass die Wirkmechanismen psychoaktiver Substanzen zelltypabhängig sind.

Während sich die DNMT1-Spiegel nicht veränderten, führten Ami und Par zu einer Reduktion der Expression von G9a. Ebenso wie die DNMT1-Aktivität zeigten sich die G9a-Spiegel erst nach einem Behandlungszeitraum von drei Tagen vermindert. Dies deutete auf einen funktionalen Zusammenhang zwischen G9a und der DNMT-Aktivität hin. G9a ist eine euchromatische Histonmethyltransferase, die sich auf die Transkription repressiv auswirkt, indem sie die Methylierung von H3K9 sowie H3K27 katalysiert (Shinkai und Tachibana, 2011). Die durch Antidepressiva hervorgerufene Senkung der Expression von G9a wirkte sich nicht auf die H3K9me2-Gesamtspiegel aus (Perisic u. a., 2010). Da G9a jedoch im Wesentlichen H3K9 in Bereichen des Euchromatins methyliert, könnte die Reduktion der G9-Spiegel zu einer auf Gesamtchromatinebene nicht detektierbaren Verminderung der euchromatischen H3K9-Methylierung führen. Neben der Katalyse von Histonmethylierungen wirkt sich G9a indirekt auf die DNA-Methylierung aus. Embryonale Stammzellen, die defizient für G9a sind, weisen eine Hypomethylierung von Retrotransposons, *major satellite repeats* und bestimmten Genpromotoren auf. Interessanterweise wird die beobachtete Hypomethylierung nicht durch eine Reduktion der H3K9/K27-Methylierung verursacht, da die Mutation der katalytischen Domäne von G9a zu keiner Veränderung der DNA-Methylierung führt (Dong u. a., 2008; Shinkai und Tachibana, 2011). Die Wirkung der Präsenz von G9a auf die DNA-Methylierung wird durch eine Studie untermauert, in der nachgewiesen wurde, dass G9a an DNMT1 bindet und dessen katalytische Aktivität *in vitro* um ein Vielfaches steigert (Estève u. a., 2006). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Zugabe von rekombinantem G9a zu nukleären Zellextrakten aus behandelten Zellen die DNMT-Aktivität wieder auf das Niveau von Kontrollextrakten an hob. Hierfür wurde eine etwa siebenfach höhere Menge an G9a benötigt als in Kontroll-Extrakten exprimiert wurde. Isolierte Proteine verlieren häufig einen Teil ihrer enzymatischen Aktivität. So weisen aus Bakterien aufgereinigte Proteine in der Regel keine, oder keine korrekten posttranslationalen Modifikationen auf. Diese sind jedoch häufig für die physiologische Funktion des Proteins von entscheidender Bedeutung. Dies könnte die für die Wiederherstellung der DNMT-Aktivität benötigten, hohen Mengen an aufgereinigtem G9a erklären. Auch der leichte, nicht signifikante Anstieg der DNMT-Aktivität in mit gereinigtem Protein komplementierten Kontroll-Extrakten deutet darauf hin, dass die physiologische Funktion des aufgereinigten G9a im Vergleich zum endogenen G9a eingeschränkt ist.

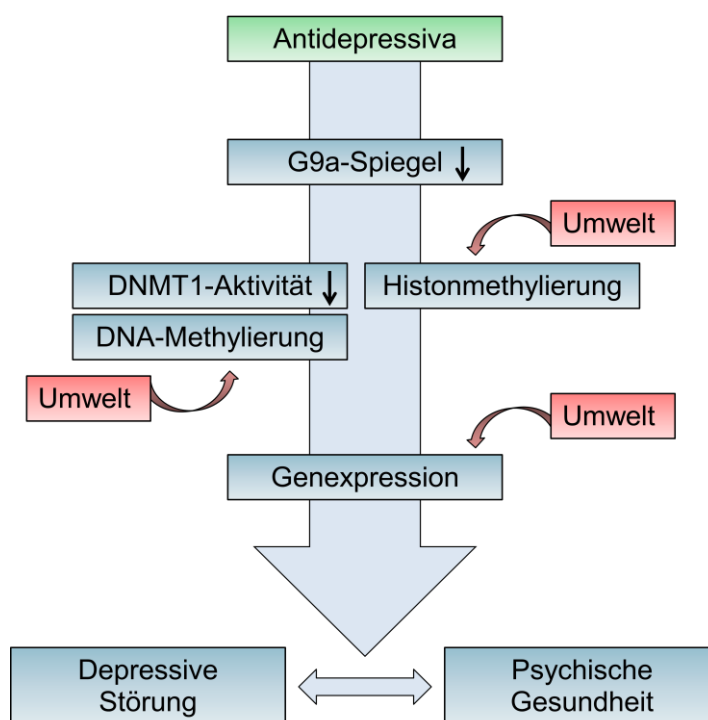


Abbildung 5.1 Modell zu den epigenetischen Wirkmechanismen von Antidepressiva. Stress führt durch Modulation epigenetischer Parameter, wie der Histon- und DNA-Methylierung, zu langfristigen, aberranten Veränderungen der Genexpression, welche die Entstehung einer Depression begünstigen können. Antidepressiva senken die Proteinspiegel der Histonmethyltransferase G9a. Dies resultiert in einer verminderten Aktivität der DNMT1. Somit könnten Antidepressiva dem Effekt von Stress auf die Genexpression entgegenwirken, indem sie aberrante Histon- und DNA-Methylierungen korrigieren.

In einer Reihe präklinischer Studien wurde demonstriert, dass Substanzen, welche die DNMT-Aktivität reduzieren, Antidepressiva-ähnliche Wirkungen aufweisen. So resultierte die Infusion von DNMT-Inhibitoren in Gehirnregionen, die in der Depression eine Rolle spielen, wie dem Hippokampus, dem ventralen Striatum und dem Nucleus Accumbens, zu antidepressivem Verhalten in einer Vielzahl verschiedener Verhaltenstests (LaPlant u. a., 2010; Uchida u. a., 2011; Sales u. a., 2011). Es wurde lange Zeit angenommen, dass die DNA-Methylierung eine sehr stabile Chromatinmodifikation darstellt, die sich nur im Laufe von Differenzierungsvorgängen verändert. Neueste Studien zeigen jedoch, dass sich die DNA-Methylierung auch in terminal differenzierten Zellen dynamisch verhält. Folglich könnten sich DNMT-Inhibitoren auch in nicht-proliferierenden Zellen auf die DNA-Methylierung auswirken. Auch in Zellen des ZNS wurde eine äußerst dynamische und reversible DNA-Methylierung nachgewiesen (Weaver u. a., 2004b, 2005; Miller und Sweatt, 2007; Lubin u. a., 2008; Murgatroyd u. a., 2009; Miller u. a., 2010). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die elektrische Stimulation von Nervenzellen zu raschen Veränderungen der DNA-Methylierung gehirnspezifischer Gene, die in der neuronalen

Plastizität eine Rolle spielen, führt (Ma u. a., 2009; Guo u. a., 2011a, 2011b). Eine Reduktion der DNMT-Aktivität könnte daher in einer langsameren oder unzureichenden Remethylierung resultieren und damit einhergehend die Genexpression modulieren. Dies wurde an mit DNMT-Inhibitoren behandelten Mäusen nachgewiesen. Die Tiere zeigten nicht nur antidepressives Verhalten, sondern auch eine Reduktion der DNA-Methylierung und eine Erhöhung der Expression von Kandidatengenen der Depression, den neurotrophen Faktoren *Gdnf* und *Bdnf* (Uchida u. a., 2011; Sales u. a., 2011). In primären kortikalen Astrozyten ging die durch Behandlung mit Ami hervorgerufene Senkung der DNMT-Aktivität mit einer Verringerung der genomweiten DNA-Methylierung an CCGG-Stellen einher (Perisic u. a., 2010). Dies untermauert die funktionelle Bedeutung der DNMT-Inhibition durch Antidepressiva. In indischen Hutaffen (*Macaca radiata*) waren hohe, genomweite Spiegel von 5-Methylcytosin mit einer erhöhten Stressreaktivität nach *early life stress* assoziiert (Kinnally u. a., 2011). Die durch Ami hervorgerufene Reduktion der DNA-Methylierung könnte somit die Stärke der Stressreaktion vermindern.

Es wird davon ausgegangen, dass die Pathogenese der Depression mit einer dauerhaft veränderten Genexpression einhergeht, die durch aberrante DNA-Methylierungsmuster und Histonmodifikationen verursacht wird. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Antidepressiva die Aktivität bzw. die Expression von DNA- und Histon-methylierenden Enzymen modulieren. Somit wurde ein Wirkmechanismus von Antidepressiva aufgedeckt, der dazu beitragen könnte, die für eine erfolgreiche Depressionstherapie notwendige transkriptionelle Homöostase wiederherzustellen.

Zusammenfassend wurden unter den in dieser Arbeit angewandten experimentellen Bedingungen zwar keine Hinweise gefunden, dass Stress, einer der wesentlichen Risikofaktoren der Depression, eine Auswirkung auf den epigenetischen Parameter der DNA-Methylierung hat. Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Antidepressiva die Aktivität eines DNA-methylierenden Enzyms modulieren. Insgesamt unterstützen somit die Ergebnisse die Hypothese, dass epigenetische Mechanismen eine Rolle in der Pathogenese der Depression spielen könnten.

6 Zusammenfassung

Chronischer Stress stellt einen wesentlichen Risikofaktor für die Entstehung depressiver Störungen dar. Es wird davon ausgegangen, dass chronischer Stress zu langfristigen Veränderungen epigenetischer Parameter und folglich der Genexpression führt, welche die Entstehung und Manifestation dieser Krankheit begünstigen. Interessanterweise deutet eine stetig wachsende Anzahl an Studien darauf hin, dass Antidepressiva Einfluss auf epigenetische Prozesse nehmen.

Histonmodifikationen und DNA-Methylierung spielen eine entscheidende Rolle bei der Festlegung der Chromatinstruktur. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde an einem neuronalen Zellmodell untersucht, inwieweit sich Stress auf die DNA-Methylierung auswirkt. Hierfür wurden primäre, hippokampale Astrozyten aus der Ratte einer Langzeitbehandlung (drei Tage) mit dem für den Glukokortikoid-Rezeptor (GR) spezifischen, synthetischen Stresshormon Dexamethason (Dex) unterzogen. Anhand einer Expressionsanalyse bestimmter GR-Zielgene wurde nachgewiesen, dass eine funktionelle Transduktion des Dex-Signals vorlag. Das DNA-Methylierungsprofil der Astrozyten wurde anhand eines MeDIP-Arrays, welcher alle annotierten Promotoren und CpG-Inseln des Rattengenoms abdeckte, analysiert. Die Ergebnisse von Bisulfitsequenzierungen sowie die Kongruenz mit Literaturangaben bestätigte die Fähigkeit der Methode, hypermethylierte von hypomethylierten DNA-Abschnitten zu unterscheiden. Um Loci zu identifizieren, deren Methylierung durch Dex reguliert sein könnte, wurde ein *t*-Test angewandt, dessen *p*-Werte bezüglich multiplen Testens korrigiert wurden. Für fünf Loci ergab sich ein *p*-Wert von $\leq 0,05$. Bisulfitsequenzierung von Kandidatenloci ergab jedoch keinen Unterschied in der DNA-Methylierung. Daraus wurde geschlossen, dass die Langzeitbehandlung von primären Astrozyten mit Dex zu keinen starken Veränderungen der DNA-Methylierung von Promotoren oder CpG-Inseln führt.

Im Gegensatz zur Stress-Exposition konnte vor kurzem in der Arbeitsgruppe von Theo Rein (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) gezeigt werden, dass das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin die globale CCGG-Methylierung in primären kortikalen Astrozyten reduziert. Daher stellte sich die Frage, ob Amitriptylin auf die DNA-Methyltransferase-Aktivität (DNMT-Aktivität) der Zelle Einfluss nimmt. In der Tat senkte Amitriptylin die DNMT-Aktivität in kortikalen Astrozyten. Ein Test verschiedener Substanzen zeigte, dass die Inhibition der DNMT-Aktivität keinen allgemeinen Wirkmechanismus von in der Depressionstherapie eingesetzten Medikamenten darstellt. Ebenso wie Amitriptylin reduzierten die Antidepressiva Imipramin und Paroxetin die DNMT-Aktivität, wohingegen im Falle von Venlafaxin und den Stimmungsstabilisatoren

Valproinsäure sowie Carbamazepin keine Veränderungen festgestellt wurden. Des Weiteren wurde belegt, dass primäre Neuronen und neurale Stammzellen gegenüber dem durch Antidepressiva vermittelten Effekt auf die DNMT-Aktivität refraktär sind. Ein erster grundlegender Einblick in den Mechanismus der DNMT-Inhibition wurde durch die Beobachtung geliefert, dass Amitriptylin die DNMT-Aktivität indirekt reduzierte. Nachfolgende Untersuchungen identifizierten die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) als den von der Inhibition betroffenen Subtypen. Die Analysen bekannter Regulatoren der DNMT1-Aktivität lieferten Hinweise, dass die DNMT-Inhibition durch verringerte Proteinspiegel der Histonmethyltransferase G9a verursacht wurde. Wurden die verminderten Proteinspiegel durch Hinzufügen von rekombinantem G9a ausgeglichen, erreichte die DNMT-Aktivität wieder das Niveau von Kontrollzellen. Zusammenfassend ergibt sich aus der durch Antidepressiva hervorgerufenen Reduktion des DNMT1-Regulators G9a ein neues Konzept für die Wirkungsweise von Antidepressiva, nämlich die Plastizität von Chromatinmodifikationen über Modulation epigenetischer Enzymaktivitäten zu verändern und dadurch aberrante Genexpressionsmuster zu korrigieren.

7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Razaq W, Kendall DA, Bates TE (2010) The Effects of Antidepressants on Mitochondrial Function in a Model Cell System and Isolated Mitochondria. *Neurochem Res* 36:327-338.
- Alarcón JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A (2004) Chromatin Acetylation, Memory, and LTP Are Impaired in CBP \pm Mice: A Model for the Cognitive Deficit in Rubinstein-Taybi Syndrome and Its Amelioration. *Neuron* 42:947-959.
- Bacolla A, Pradhan S, Roberts RJ, Wells RD (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated dna. *J Biol Chem* 274:33011-33019.
- Banasr M, Duman RS (2008) Glial Loss in the Prefrontal Cortex Is Sufficient to Induce Depressive-like Behaviors. *Biological Psychiatry* 64:863-870.
- Banerjee S, Smallwood A, Lamond S, Campbell S, Nargund G (2001) Igf2/H19 imprinting control region (ICR): an insulator or a position-dependent silencer? *ScientificWorldJournal* 1:218-224.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21:381-395.
- Beaulieu J-M, Gainetdinov RR, Caron MG (2009) Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:327-347.
- Berger SL (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447:407-412.
- Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A (2007) Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 14:1008-1016.
- Bibikova M, Fan J (2010) Genome-wide DNA methylation profiling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2:210-223.
- Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396-398.

- Bonasio R, Tu S, Reinberg D (2010) Molecular Signals of Epigenetic States. *Science* 330:612-616.
- Campanero MR, Armstrong MI, Flemington EK (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6481-6486.
- Carouge D, Host L, Aunis D, Zwiller J, Anglard P (2010) CDKL5 is a brain MeCP2 target gene regulated by DNA methylation. *Neurobiology of Disease* 38:414-424.
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich J-B, Aunis D, Zwiller J (2006) Fluoxetine and Cocaine Induce the Epigenetic Factors MeCP2 and MBD1 in Adult Rat Brain. *Molecular Pharmacology* 70:487-492.
- Cedar H, Bergman Y (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10:295-304.
- Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E (2003) Establishment and Maintenance of Genomic Methylation Patterns in Mouse Embryonic Stem Cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 23:5594-5605.
- Cheng X, Blumenthal RM (2010) Coordinated Chromatin Control: Structural and Functional Linkage of DNA and Histone Methylation. *Biochemistry* 49:2999-3008.
- Cotariu D, Barr-Nea L, Papo N, Zaidman JL (1988) Induction of gamma-glutamyl transferase by dexamethasone in cultured fetal rat hepatocytes. *Enzyme* 40:212-216.
- Cotter DR, Pariante CM, Everall IP (2001) Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Research Bulletin* 55:585-595.
- Dhayalan A, Rajavelu A, Rathert P, Tamas R, Jurkowska RZ, Ragozin S, Jeltsch A (2010) The Dnmt3a PWWP Domain Reads Histone 3 Lysine 36 Trimethylation and Guides DNA Methylation. *J Biol Chem* 285:26114-26120.
- Doi A, Park I-H, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP (2009) Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41:1350-1353.

- Dong KB, Maksakova IA, Mohn F, Leung D, Appanah R, Lee S, Yang HW, Lam LL, Mager DL, Schubeler D, Tachibana M, Shinkai Y, Lorincz MC (2008) DNA methylation in ES cells requires the lysine methyltransferase G9a but not its catalytic activity. *EMBO J* 27:2691-2701.
- Estève P-O, Chin HG, Smallwood A, Feehery GR, Gangisetty O, Karpf AR, Carey MF, Pradhan S (2006) Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev* 20:3089-3103.
- Fatemi M, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2002) Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *European Journal of Biochemistry* 269:4981-4984.
- Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, Jeltsch A (2001) The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *Journal of Molecular Biology* 309:1189-1199.
- Feighner JP (1999) Mechanism of action of antidepressant medications. *J Clin Psychiatry* 60 Suppl 4:4-11; discussion 12-13.
- Feng J, Chang H, Li E, Fan G (2005) Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research* 79:734-746.
- Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G (2010) Dnmt1 and Dnmt3a are required for the maintenance of DNA methylation and synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 13:423-430.
- Flynn J, Glickman JF, Reich NO (1996) Murine DNA Cytosine-C5 Methyltransferase: Pre-Steady- and Steady-State Kinetic Analysis with Regulatory DNA Sequences†. *Biochemistry* 35:7308-7315.
- Glotzbach RK, Preskorn SH (1982) Brain concentrations of tricyclic antidepressants: single-dose kinetics and relationship to plasma concentrations in chronically dosed rats. *Psychopharmacology (Berl)* 78:25-27.

- Gowher H, Jeltsch A (2002) Molecular Enzymology of the Catalytic Domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA Methyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* 277:20409-20414.
- Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A (2005) Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem* 280:13341-13348.
- Gräff J, Mansuy IM (2009) Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *European Journal of Neuroscience* 30:1-8.
- Guo JU, Ma DK, Mo H, Ball MP, Jang M-H, Bonaguidi MA, Balazer JA, Eaves HL, Xie B, Ford E, Zhang K, Ming G-L, Gao Y, Song H (2011a) Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci* 14:1345-1351.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G-li, Song H (2011b) Hydroxylation of 5-Methylcytosine by TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain. *Cell* 145:423-434.
- Haque FN, Gottesman II, Wong AHC (2009) Not really identical: Epigenetic differences in monozygotic twins and implications for twin studies in psychiatry. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 151C:136-141.
- Hatada I, Namihira M, Morita S, Kimura M, Horii T, Nakashima K (2008) Astrocyte-Specific Genes Are Generally Demethylated in Neural Precursor Cells Prior to Astrocytic Differentiation. *PLoS ONE* 3:e3189.
- Henkels CH, Khorasanizadeh S (2007) Implications of a Histone Code Mimic in Epigenetic Signaling. *Molecular Cell* 27:521-522.
- Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 61:2571-2587.
- Hervouet E, Lalier L, Debien E, Cheray M, Geairon A, Rogniaux H, Loussouarn D, Martin SA, Vallette FM, Cartron P-F (2010) Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 Interactions Promotes Tumorigenesis from Human and Mice Glial Cells. *PLoS ONE* 5:e11333.
- Hisaoka K, Takebayashi M, Tsuchioka M, Maeda N, Nakata Y, Yamawaki S (2007) Antidepressants Increase Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor

- Production through Monoamine-Independent Activation of Protein Tyrosine Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase in Glial Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321:148 -157.
- Ikegami K, Iwatani M, Suzuki M, Tachibana M, Shinkai Y, Tanaka S, Grealley JM, Yagi S, Hattori N, Shiota K (2007) Genome-wide and locus-specific DNA hypomethylation in G9a deficient mouse embryonic stem cells. *Genes to Cells* 12:1-11.
- Isakovic L, Saavedra OM, Llewellyn DB, Claridge S, Zhan L, Bernstein N, Vaisburg A, Elowe N, Petschner AJ, Rahil J, Beaulieu N, Gauthier F, MacLeod AR, Delorme D, Besterman JM, Wahhab A (2009) Constrained (l-)-S-adenosyl-l-homocysteine (SAH) analogues as DNA methyltransferase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19:2742-2746.
- Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl:245-254.
- Jeong S, Liang G, Sharma S, Lin JC, Choi SH, Han H, Yoo CB, Egger G, Yang AS, Jones PA (2009) Selective Anchoring of DNA Methyltransferases 3A and 3B to Nucleosomes Containing Methylated DNA. *Mol Cell Biol* 29:5366-5376.
- Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A (2011) Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. *ChemBioChem* 12:206-222.
- Kameshita I, Sekiguchi M, Hamasaki D, Sugiyama Y, Hatano N, Suetake I, Tajima S, Sueyoshi N (2008) Cyclin-dependent kinase-like 5 binds and phosphorylates DNA methyltransferase 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377:1162-1167.
- Katyare SS, Rajan RR (1995) Effect of long-term in vivo treatment with imipramine on the oxidative energy metabolism in rat brain mitochondria. *Comp Biochem Physiol C, Pharmacol Toxicol Endocrinol* 112:353-357.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression. *Am J Psychiatry* 156:837-841.
- Kim SH, Kim KX, Raveendran NN, Wu T, Pondugula SR, Marcus DC (2009) Regulation of ENaC-mediated sodium transport by glucocorticoids in Reissner's membrane epithelium. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 296:C544 -C557.

- Kinnally EL, Feinberg C, Kim D, Ferguson K, Leibel R, Coplan JD, John Mann J (2011) DNA methylation as a risk factor in the effects of early life stress. *Brain Behav Immun* 25:1548-1553.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M (1993) Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol Neurobiol* 13:433-455.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004) CBP Histone Acetyltransferase Activity Is a Critical Component of Memory Consolidation. *Neuron* 42:961-972.
- Kress C, Thomassin H, Grange T (2006) Active cytosine demethylation triggered by a nuclear receptor involves DNA strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:11112 -11117.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894-902.
- Kundakovic M, Chen Y, Guidotti A, Grayson DR (2009) The Reelin and GAD67 Promoters Are Activated by Epigenetic Drugs That Facilitate the Disruption of Local Repressor Complexes. *Molecular Pharmacology* 75:342 -354.
- Kwon SH, Workman JL (2008) The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1. *Mol Cells* 26:217-227.
- LaPlant Q u. a. (2010) Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 13:1137-1143.
- Laux G, Kapfhammer H-P, Möller H-J (2008) *Psychiatrie und Psychotherapie*. Springer.
- Lavoie G, Esteve P-O, Lalan N, Pradhan S, St-Pierre Y (2011) PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1. *BMC Biology* 9:31.
- Lee B, Muller MT (2009) SUMOylation enhances DNA methyltransferase 1 activity. *Biochem J* 421:449-461.
- Lee C-F, Ou DS-C, Lee S-B, Chang L-H, Lin R-K, Li Y-S, Upadhyay AK, Cheng X, Wang Y-C, Hsu H-S, Hsiao M, Wu C-W, Juan L-J (2010a) hNaa10p contributes to

- tumorigenesis by facilitating DNMT1-mediated tumor suppressor gene silencing. *J Clin Invest* 120:2920-2930.
- Lee RS, Tamashiro KLK, Yang X, Purcell RH, Harvey A, Willour VL, Huo Y, Rongione M, Wand GS, Potash JB (2010b) Chronic Corticosterone Exposure Increases Expression and Decreases Deoxyribonucleic Acid Methylation of Fkbp5 in Mice. *Endocrinology* 151:4332 -4343.
- Lenox RH, Frazer A (2002) *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. American College of Neuropsychopharmacology.
- Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang I-C, Desai P, Malone LM, Sweatt JD (2006) Evidence That DNA (Cytosine-5) Methyltransferase Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *Journal of Biological Chemistry* 281:15763 - 15773.
- Li G, Reinberg D (2011) Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 21:175-186.
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA (2002) Cooperativity between DNA Methyltransferases in the Maintenance Methylation of Repetitive Elements. *Mol Cell Biol* 22:480-491.
- Liu N, Balliano A, Hayes JJ (2011) Mechanism(s) of SWI/SNF-Induced Nucleosome Mobilization. *ChemBioChem* 12:196-204.
- Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2008) Epigenetic Regulation of bdnf Gene Transcription in the Consolidation of Fear Memory. *The Journal of Neuroscience* 28:10576 - 10586.
- Ma DK, Jang M-H, Guo JU, Kitabatake Y, Chang M-lin, Pow-anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming G-li, Song H (2009) Neuronal Activity–Induced Gadd45b Promotes Epigenetic DNA Demethylation and Adult Neurogenesis. *Science* 323:1074 - 1077.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83:835-839.

- Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE (2003) DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity-Dependent Bdnf Gene Regulation. *Science* 302:890-893.
- McGowan PO, Sasaki A, Huang TCT, Unterberger A, Suderman M, Ernst C, Meaney MJ, Turecki G, Szyf M (2008) Promoter-Wide Hypermethylation of the Ribosomal RNA Gene Promoter in the Suicide Brain. *PLoS ONE* 3:e2085.
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES (2008) Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454:766-770.
- Melas PA, Rogdaki M, Lennartsson A, Björk K, Qi H, Witasz A, Werme M, Wegener G, Mathé AA, Svenningsson P, Lavebratt C (2011) Antidepressant Treatment Is Associated with Epigenetic Alterations in the Promoter of P11 in a Genetic Model of Depression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology FirstView*:1-11.
- Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452:45-50.
- Mill J, Petronis A (2007) Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. *Mol Psychiatry* 12:799-814.
- Miller CA, Gavin CF, White JA, Parrish RR, Honasoge A, Yancey CR, Rivera IM, Rubio MD, Rumbaugh G, Sweatt JD (2010) Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat Neurosci* 13:664-666.
- Miller CA, Sweatt JD (2007) Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron* 53:857-869.
- Morishita S, Aoki S (2002) Effects of tricyclic antidepressants on protein kinase C activity in rabbit and human platelets in vivo. *J Affect Disord* 70:329-332.
- Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y, Micale V, Bockmuhl Y, Fischer D, Holsboer F, Wotjak CT, Almeida OFX, Spengler D (2009) Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci* 12:1559-1566.

- Nelson ED, Monteggia LM (2011) Epigenetics in the mature mammalian brain: effects on behavior and synaptic transmission. *Neurobiol Learn Mem* 96:53-60.
- Nemeroff CB, Vale WW (2005) The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. *J Clin Psychiatry* 66 Suppl 7:5-13.
- Ng SS, Yue WW, Oppermann U, Klose RJ (2008) Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci* 66:407-422.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* 99:247-257.
- Olsson CA, Foley DL, Parkinson-Bates M, Byrnes G, McKenzie M, Patton GC, Morley R, Anney RJL, Craig JM, Saffery R (2010) Prospects for epigenetic research within cohort studies of psychological disorder: A pilot investigation of a peripheral cell marker of epigenetic risk for depression. *Biological Psychology* 83:159-165.
- Ooi SKT, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin S-P, Allis CD, Cheng X, Bestor TH (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448:714-717.
- Otani J, Nankumo T, Arita K, Inamoto S, Ariyoshi M, Shirakawa M (2009) Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Rep* 10:1235-1241.
- Panatier A, Vallée J, Haber M, Murai KK, Lacaille J-C, Robitaille R (2011) Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell* 146:785-798.
- Panksepp J (2004) *Textbook of biological psychiatry*. John Wiley & Sons.
- Pelizzola M, Koga Y, Urban AE, Krauthammer M, Weissman S, Halaban R, Molinaro AM (2008) MEDME: An experimental and analytical methodology for the estimation of DNA methylation levels based on microarray derived MeDIP-enrichment. *Genome Research* 18:1652 -1659.
- Perisic T, Zimmermann N, Kirmeier T, Asmus M, Tuorto F, Uhr M, Holsboer F, Rein T, Zschocke J (2010) Valproate and Amitriptyline Exert Common and Divergent

- Influences on Global and Gene Promoter-Specific Chromatin Modifications in Rat Primary Astrocytes. *Neuropsychopharmacology* 35:792-805.
- Poulter MO, Du L, Weaver ICG, Palkovits M, Faludi G, Merali Z, Szyf M, Anisman H (2008) GABAA Receptor Promoter Hypermethylation in Suicide Brain: Implications for the Involvement of Epigenetic Processes. *Biological Psychiatry* 64:645-652.
- Pradhan M, Estève P-O, Chin HG, Samaranayake M, Kim G-D, Pradhan S (2008) CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry* 47:10000-10009.
- Racagni G, Popoli M (2008) Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. *Dialogues Clin Neurosci* 10:385-400.
- Rammes G, Rupprecht R (2007) Modulation of Ligand-gated Ion Channels by Antidepressants and Antipsychotics. *Molecular Neurobiology* 35:160-174.
- Renthal W, Nestler EJ (2009) Chromatin regulation in drug addiction and depression. *Dialogues Clin Neurosci* 11:257-268.
- Rey AD, Chrousos GP, Besedovsky H (2008) *The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis*. Elsevier.
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD (2003) Histone Methyltransferases Direct Different Degrees of Methylation to Define Distinct Chromatin Domains. *Molecular Cell* 12:1591-1598.
- Roth TL, Lubin FD, Funk AJ, Sweatt JD (2009) Lasting Epigenetic Influence of Early-Life Adversity on the BDNF Gene. *Biological Psychiatry* 65:760-769.
- Rottach A, Leonhardt H, Spada F (2009) DNA methylation-mediated epigenetic control. *Journal of Cellular Biochemistry* 108:43-51.
- de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370:737-749.
- Rupprecht R u. a. (2009) Translocator Protein (18 kD) as Target for Anxiolytics Without Benzodiazepine-Like Side Effects. *Science* 325:490 -493.

- Rupprecht R, Reul JM, van Steensel B, Spengler D, Söder M, Berning B, Holsboer F, Damm K (1993) Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 247:145-154.
- Sales AJ, Biojone C, Terceti MS, Guimarães FS, Gomes MV, Joca SR (2011) Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. *Br J Pharmacol* 164:1711-1721.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.
- Schaefer A, Sampath SC, Intrator A, Min A, Gertler TS, Surmeier DJ, Tarakhovsky A, Greengard P (2009) Control of Cognition and Adaptive Behavior by the GLP/G9a Epigenetic Suppressor Complex. *Neuron* 64:678-691.
- Schoneveld OJLM, Gaemers IC, Lamers WH (2004) Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1680:114-128.
- Shilatifard A (2006) Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annual Review of Biochemistry* 75:243-269.
- Shinkai Y, Tachibana M (2011) H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes & Development* 25:781 -788.
- Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* 279:27816-27823.
- Szerlong HJ, Hansen JC (2011) Nucleosome distribution and linker DNA: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure. *Biochem Cell Biol* 89:24-34.
- Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y (2008) G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J* 27:2681-2690.

- Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & Development* 16:1779-1791.
- Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3740-3745.
- Thomassin H, Flavin M, Espinas M-L, Grange T (2001) Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. *EMBO J* 20:1974-1983.
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:355-367.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9:519-525.
- Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Suzuki T, Miyata N, Watanabe Y (2011) Epigenetic Status of Gdnf in the Ventral Striatum Determines Susceptibility and Adaptation to Daily Stressful Events. *Neuron* 69:359-372.
- Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2004a+b) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7:847-854.
- Weaver ICG, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, Szyf M (2005) Reversal of Maternal Programming of Stress Responses in Adult Offspring through Methyl Supplementation: Altering Epigenetic Marking Later in Life. *The Journal of Neuroscience* 25:11045-11054.
- Weber M, Schübeler D (2007) Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Current Opinion in Cell Biology* 19:273-280.
- Weiss T, Hergeth S, Zeissler U, Izzo A, Tropberger P, Zee BM, Dundr M, Garcia BA, Daujat S, Schneider R (2010) Histone H1 variant-specific lysine methylation by G9a/KMT1C and Glp1/KMT1D. *Epigenetics Chromatin* 3:7.

- Wilkinson MB, Xiao G, Kumar A, LaPlant Q, Renthal W, Sikder D, Kodadek TJ, Nestler EJ (2009) Imipramine Treatment and Resiliency Exhibit Similar Chromatin Regulation in the Mouse Nucleus Accumbens in Depression Models. *The Journal of Neuroscience* 29:7820 -7832.
- Wu H, Chen X, Xiong J, Li Y, Li H, Ding X, Liu S, Chen S, Gao S, Zhu B (2011) Histone methyltransferase G9a contributes to H3K27 methylation in vivo. *Cell Res* 21:365-367.
- Xia Z, Ying G, Hansson AL, Karlsson H, Xie Y, Bergstrand A, DePierre JW, Nässberger L (2000) Antidepressant-induced lipidosis with special reference to tricyclic compounds. *Progress in Neurobiology* 60:501-512.
- Yokochi T, Robertson KD (2002) Preferential Methylation of Unmethylated DNA by Mammalian de Novo DNA Methyltransferase Dnmt3a. *Journal of Biological Chemistry* 277:11735 -11745.

8 Abkürzungsverzeichnis

5-HAT	5-Hydroxytryptamin
5MeC	5-Methylcytosin
ACTH	adrenocorticotropines Hormon
ADD	ATRX-Dnmt3-Dnmt3L-Domäne
ADP	Adenosin 5'-Diphosphat
Ami	Amitriptylin
APRT	Adenin-Phosphoribosyltransferase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
BAH	Bromo adjacent homolgy domain
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BRG1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 (auch SMARCA4 genannt)
BSA	Bovine serum albumin
CBP	CREB-bindendes Protein
Cbz	Carbamazepin
CFP1	CXXC finger protein 1
CHN2	Chimerin 2
Cit	Citalopram
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding
CRH	Corticotropin releasing hormone
D2SUT1e	DNA segment, Chr 2, sutcliffe 1, expressed
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
Dex	Dexamethason
DNA	Deoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FACS	Fluorescent activated cell sorting
FDR-Korrektur	False discovery rate correction
FKBP5	FK506-bindendes Protein 5
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GABA _A	Gamma-Aminobuttersäure A
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor
GFAP	Gliales fibrilläres saures Protein
GGT6	Gamma-Glutamyltransferase 6
GLP	G9a-like protein
GLT1	Glutamat-Transporter 1
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GRE	Glucocorticoid receptor response element
HAT	Histonacetyltransferase
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HMT	Histonmethyltransferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
HPA-Achse	Hypothalame-hypophysäre-adrenokortikale-Achse
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HS	Horse Serum
HTR5a	Serotoninrezeptor 5a
<i>IAP</i>	Intracisternal A particle
Imi	Imipramin
IP	Immunpräzipitation/Immunpräzipitiert
K	Kontrolle
KCNJ10	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member
KCNK1	Kaliumkanal, Subfamilie K, Typ 1
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LINE	Long interspersed nuclear element
LTP	Long-term potentiation
MAOI	Monoaminoxidase-Inhibitoren
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MBD1,2,4	Methyl-CpG binding domain protein
MBD-IP	MBD-Immunpräzipitation
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2
MeDIP	Methylated DNA Immunoprecipitation
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
Min.	Minute
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
mRNA	Boten-RNA
MS	Stimmungsstabilisator, <i>engl.</i> Mood stabilizer
MT1	Metallothionein 1
MW	Mittelwert
NAA10	N(alpha)-Acetyltransferase 10
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NE	Norepinephrin
NSZ	Neurale Stammzellen
PADI2	Peptidylarginin-Deiminase 2
Par	Paroxetin
PBD	PCNA-bindende Domäne
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC)	Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid
PP1	Protein-Phosphatase 1
RNA	Ribonukleinsäure, (<i>engl.</i>) ribonucleic acid
rRNA	Ribosomale RNA
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SET	Su(var)3–9, Enhancer of zeste [E(z)] and trithorax
SETDB1	SET domain bifurcated 1
SNRI	Selektive Norepinephrin-Wiederaufnahmehemmer
SOX8	SRY-box containing gene 8
SSNRI	Selektive Serotonin/Norepinephrin-Wiederaufnahmehemmer
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer

Std.	Stunde
SUV39H	Suppressor of variegation 3–9 homologue
SWI/SNF	Switch/sucrose nonfermentable
Synj2	Synaptojanin 2
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSPO	Translokator-Protein (18 kDa)
TZA	Trizyklische Antidepressiva
UHRF	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain
V	Volt
Ven	Venlafaxin
Vpa	Valproat
WGA	Whole genome amplification
<i>Xist</i>	X (inactive)-specific transcript

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Antidepressiva-Kategorien.	25
Tabelle 4.1.1 Variationskoeffizient der relativen Mengen verschiedener Loci vor und nach WGA2-Amplifikation.	68
Tabelle 4.1.2 Die Arraydaten bilden den Methylierungsstatus der aufgelisteten Genpromotoren ab.	74
Tabelle 4.1.3 Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des <i>Htr5a</i> - und des <i>Synj2</i> -Promotors.	75
Tabelle 4.1.4 Auflistung der Kandidatengene für veränderte Methylierung nach Gabe von Dex.	77

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Chromatin liegt in unterschiedlichen funktionellen Zuständen vor.	17
Abbildung 1.2 Domänenstruktur der DNA-Methyltransferasen von Säugetieren.	20
Abbildung 4.1.1 Bestimmung des Reinheitsgrades von hippokampalen Primärkulturen durch Immunfluoreszenzfärbungen von Proteinen, die für Astrozyten oder Neuronen spezifisch sind.	61
Abbildung 4.1.2 Vergleich von hippokampalen Neuronen- und Astrozytenkulturen bezüglich ihres Ansprechens auf Dex auf Proteinebene mittels Western-Blot (A) und auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR (B).	62
Abbildung 4.1.3 Die MeDIP- und die MBD-IP-Methode unterscheiden sich hinsichtlich ihres Auflösungsvermögens von Methylierungsunterschieden.	66
Abbildung 4.1.4 Vergleich des WGA2- und des WGA4-Kits.	67
Abbildung 4.1.5 Versuchsaufbau zur Quantifizierung von DNA Methylierungsunterschieden nach Behandlung von primären, hippokampalen Astrozyten mit Dexamethason.	69
Abbildung 4.1.6 Qualitätsprüfung der DNA-Proben.	70
Abbildung 4.1.7 Die Arraydaten spiegeln die Anreicherung methylierter DNA-Fragmente in den IP-Ansätzen wider.	72
Abbildung 4.1.8 Darstellung der Daten des Methylierungsarrays mit der SignalMap-Software.	73
Abbildung 4.1.9 Im Methylierungsarray angezeigte Effekte von Dex auf die DNA-Methylierung von sechs ausgewählten Kandidatengen.	78
Abbildung 4.1.10 mRNA-Expression von <i>Tspo</i> und <i>Kcnk1</i> ist nicht durch Dex reguliert.	79
Abbildung 4.1.11 Die Behandlung von Astrozyten mit Dex hat keinen Einfluss auf die Methylierung von <i>Tspo</i> und <i>Kcnk1</i> .	80
Abbildung 4.2.1 Unterschiedliche Auswirkungen von psychoaktiven Substanzen auf die DNMT-Aktivität.	82
Abbildung 4.2.2 Ami inhibiert die DNMT-Aktivität indirekt.	83
Abbildung 4.2.3 Die Reduktion der DNMT-Aktivität hängt von der Konzentration von Ami ab.	84
Abbildung 4.2.4 Die Inhibition der DNMT-Aktivität ist abhängig vom Zelltyp.	84
Abbildung 4.2.5 Relative mRNA-Expression der <i>Dnmt</i> -Subtypen in neuronalen Zellen.	85

Abbildung 4.2.6 Antidepressiva inhibieren den DNMT-Subtyp 1.	87
Abbildung 4.2.7 Antidepressiva wirken sich nicht auf den Zellzyklus und auf die Expression der DNMT1 aus.	88
Abbildung 4.2.8 Charakterisierung von an der DNMT-Regulation beteiligten Faktoren.	90
Abbildung 4.2.9 Niedermolekulare Substanzen sind nicht an der Amivermittelten Inhibition der DNMT-Aktivität beteiligt.	92
Abbildung 4.2.10 Die Reduktion der G9a-Expression ist verantwortlich für die Inhibition der DNMT1.	94
Abbildung 5.1 Modell zu den epigenetischen Wirkmechanismen von Antidepressiva.	102

11 Anhang

Lebenslauf

Name: Stephanie Nicole Zimmermann
Geburtsdatum: 9. Dezember 1980
Geburtsort: Erlangen
Nationalität: deutsch

Ausbildung und Berufstätigkeit:

Seit 05/2007 Promotionsstudium am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
Thema: *Regulation von Prozessen der DNA-Methylierung durch synthetisches Stresshormon und Antidepressiva in Zellen des zentralen Nervensystems*

01/2006-04/2007 Research Associate bei Domantis/GSK, Cambridge, UK
Development of a bispecific domain antibody dimer specifically targeting and killing multiple myeloma cells

12/2004-10/2005 Diplomarbeit am Babraham Institut, Cambridge, UK
Thema: *The role of VpreB3 in B-cell development*

10/2000-10/2005 Studium der Biologie an der Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Biochemie, Entwicklungsbiologie, Physik

1991-2000 Emil-von-Behring-Gymnasium, Spardorf
Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife

1987-1991 Grundschule Uttenreuth