universität wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Bestimmung des Methylierungsgrads von *GluR1*, *GluR2*, *GluR3* und *GluR4* in *Rattus norvegicus* mittels methylierungssensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) und Pyrosequenzierung (PSQ)“

verfasst von

Maximilian Klingler BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 066 862
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Masterstudium Chemie
Betreut von:	Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen, die mich während meines Studiums unterstützt haben, bedanken.

Als erstes möchte ich mich bei Ao. Univ. Prof. Dr. Margit Cichna-Markl für die interessante Themenstellung und die stetige Unterstützung während meiner Zeit in ihrer Arbeitsgruppe bedanken.

Außerdem danke ich Dipl.-Ing. Melanie Spitzwieser, die mir während meiner Tätigkeit im Labor und auch bei der Korrektur dieser Arbeit mit Rat und Tat beiseite gestanden ist, sowie der restlichen Arbeitsgruppe für die nette Atmosphäre und die gemeinsame Zeit.

Weiters möchte ich der Arbeitsgruppe am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. Doris Marko, für die Bereitstellung ihrer Arbeitsräume danken.

Meiner Freundin Gudrun, ohne die ich sicher nie so weit gekommen wäre, bin ich zu besonders großem Dank verpflichtet. Dank deiner Hilfe und Unterstützung konnte jedes noch so unlösbar scheinende Problem mit Leichtigkeit gelöst werden.

Ich danke all meinen Freunden für die Zeit, die wir auch abseits des Studiums gemeinsam verbracht haben.

Zuletzt geht ein großes DANKE an meine Familie, die mir immer unterstützend beiseite steht.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Synaptische Übertragung 1

1.2 Glutamatrezeptoren 2

1.2.1 Entstehung einer LTP 3

1.2.2 AMPA-Rezeptor 3

1.3 Epigenetik 4

1.3.1 DNA-Methylierung 4

2 Zielsetzung 6

3 Theoretischer Hintergrund 8

3.1 Polymerase Kettenreaktion 8

3.1.1 Prinzip der PCR 8

3.1.2 Zyklischer Ablauf der PCR 9

3.1.3 Real-time-PCR 11

3.2 Bisulfit-Konvertierung 11

3.3 Methylierungssensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse 13

3.3.1 Prinzip der MS-HRM Analyse 13

3.3.2 Datenanalyse 14

3.3.3 Primer-Design 16

3.4 Pyrosequenzierung 17

3.4.1 Enzymkaskade 17

3.4.2 Methylierungsanalyse 19

3.4.3 Primer-Design 19

4 Ergebnisse und Diskussion 21

4.1 Entwicklung der MS-HRM und PSQ-Methoden 21

4.1.1 Glutamatrezeptor 1 (*GluR1*) 22

4.1.2 Glutamatrezeptor 2 (*GluR2*) 28

4.1.3 Glutamatrezeptor 3 (*GluR3*) 33

4.1.4 Glutamatrezeptor 4 (*GluR4*) 39

4.2 Bestimmung des DNA-Methylierungsstatus von *GluR1* - *GluR4* in Rattenhippocampi 45
4.2.1 Lernerfolge im Morris Wasserlabyrinth 46
4.2.2 Glutamatrezeptor 1 (*GluR1*) 47
4.2.3 Glutamatrezeptor 2 (*GluR2*) 53
4.2.4 Glutamatrezeptor 3 (*GluR3*) 57
4.2.5 Glutamatrezeptor 4 (*GluR4*) 61
4.2.6 Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse 69
5 Experimentelles 71
5.1 Training der Ratten im Morris Wasserlabyrinth 71
5.2 DNA-Isolierung 72
5.3 Konzentrationsbestimmung der DNA 73
5.4 Bisulfit-Konvertierung 73
5.5 Entwicklung und Optimierung der MS-HRM und PSQ-Methoden 75
5.5.1 Suche der Zielsequenz 75
5.5.2 Primer-Design 75
5.5.3 Optimierung der PCR-Methode 76
5.6 PCR Amplifikation und HRM Messung 77
5.6.1 Vorbereitung der PCR 77
5.6.2 Einstellungen der PCR 78
5.7 Pyrosequenzierung 79
5.7.1 Vorbereitungen für die Sequenzierung 79
5.8 Datenauswertung 80
5.8.1 HRM 80
5.8.2 Pyrosequenzierung 81
5.8.3 Umgang mit Messwerten unter LOD bzw. LOQ 81
5.8.4 Ausreißer-Test nach Nalimov 81
5.9 Chemikalien und Kits 82
5.10 Verbrauchswaren 82
5.11 Arbeitsgeräte 82

5.12 Webserver und Datenbanken 83
5.13 Software 83
6 Anhang 84
A Kurzbeschreibung 84
B Abstract 85
C Abkürzungsverzeichnis 86
D Tabellenverzeichnis 88
E Abbildungsverzeichnis 91
F Quellenverzeichnis 94
G Lebenslauf 98

1 Einleitung

Innerhalb des Gehirns sind unterschiedlichen Bereichen bestimmte Aufgaben zugeteilt. So wird unter anderem schon lange davon ausgegangen, dass der Hippocampus für die Bildung des Gedächtnisses und die Möglichkeit des räumlichen Lernens bei Nagern verantwortlich ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Lernprozess im Zusammenhang mit einer langandauernden Verstärkung der synaptischen Übertragung, einer sogenannten Langzeit-Potenzierung (engl.: long-term potentiation, LTP) steht. [1,2] Daher besteht großes Interesse, mehr über die Zusammenhänge zwischen der Entstehung dieser LTP und der Lernfähigkeit von Nagern herauszufinden.

1.1 Synaptische Übertragung

Bei der Aufnahme von Information und dem Erlernen neuer Fähigkeiten kommt es im Gehirn zur Formation struktureller Wechselwirkungen zwischen Neuronen. Dieses so gebildete Netzwerk besteht aus Dendriten und Axonen, welche die Nervenzellen nutzen, um untereinander zu kommunizieren. Jedes Neuron verfügt über mehrere Dendriten, durch die Informationen in Form von elektrischen Signalen zum Zellkörper des Neurons geleitet werden, sowie über ein Axon, mit dem die Zelle ihrerseits Informationen auf Dendriten anderer Neuronen oder direkt auf deren Zellkörper leiten kann. Den Ort, an dem Information von einem Neuron auf ein anderes übertragen wird, nennt man Synapse. Es gibt zwei unterschiedliche Typen von Synapsen: chemische und elektrische Synapsen. Im Falle der elektrischen Synapsen wird ein Signal direkt über Ionenkanäle mittels Ionen übertragen. Diese Synapsen bilden jedoch eher die Ausnahme. Die große Mehrheit der Synapsen überträgt die Information in Form von chemischen Botenstoffen, sogenannten Neurotransmittern. Diese Art der Informationsweiterleitung wird als synaptische Übertragung bezeichnet. [3] In Abbildung 1 ist dieser Prozess schematisch dargestellt.

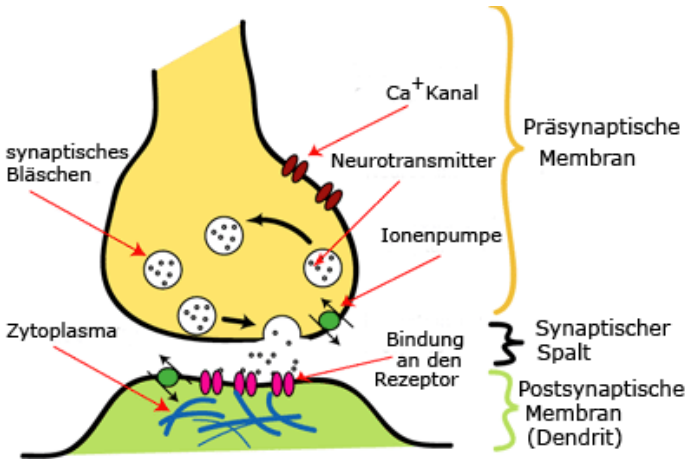


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer chemischen Synapse; nach [4]

Chemische Synapsen bestehen aus der präsynaptischen Endigung bzw. Membran, der postsynaptischen Membran und dem dazwischen liegenden synaptischen Spalt. In der präsynaptischen Endigung sind Botenstoffe, welche zur Informationsübertragung genutzt werden, in Vesikeln bzw. synaptischen Bläschen gespeichert. Von da aus werden diese Botenstoffe in den synaptischen Spalt freigesetzt, diffundieren zur postsynaptischen Membran und binden dort an spezifische Rezeptoren. Um diesen Vorgang zu aktivieren, sendet ein Neuron ein elektrisches Signal, ein sogenanntes Aktionspotenzial, über sein Axon in Richtung der präsynaptischen Membran. Kommt dieses Signal an der Membran an, führt dies zur Öffnung von spannungsgesteuerten Ca^{2+}-Kanälen, wodurch Ca^{2+}-Ionen einströmen. Dadurch wird eine Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinase aktiviert, welche Synapsin phosphoryliert. Dies ermöglicht es nun wiederum, dem Vesikel mit der Zellmembran zu verschmelzen und so die Neurotransmitter freizusetzen. [5] Diese Art des Stofftransports wird als Exocytose bezeichnet. Die freigesetzten Neurotransmitter diffundieren nun durch den synaptischen Spalt zu spezifischen Rezeptoren, wodurch es zur Öffnung von Ionenkanälen oder zur Aktivierung eines Second Messenger Systems kommt. Dadurch wird das Signal von der postsynaptischen Membran in Richtung des Zellkörpers der Zielzelle geleitet. So wird Information vom Axon zur Zielzelle übertragen. [3]

1.2 Glutamatrezeptoren

Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte Transmembranrezeptoren, welche spezifisch durch den Neurotransmitter Glutamat aktiviert werden. Eine erste grobe Einteilung dieser Rezeptorfamilie wird getroffen, indem zwischen ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren unterschieden wird. Beide Untereinheiten werden in Zusammenhang mit der Gedächtnisbildung gebracht, da sie eine wichtige Funktion innerhalb der Veränderungen der synaptischen Plastizität haben, denn beim Lernen kommt es zu einer Veränderung des Musters und der Erregbarkeit unzähliger synaptischer Verbindungen. [3,6]

Metabotrope Rezeptoren beeinflussen die synaptische Plastizität, indem sie die postsynaptische Proteinsynthese über Second Messenger Systeme regulieren. [7]

Kommt es zu einer Veränderung der Konzentration an ionotropen Glutamatrezeptoren, so wird die synaptische Übertragung innerhalb der Nervenzellen beeinflusst, indem es zu einer aktivierenden LTP oder einer inhibierenden Langzeit-Depression (engl.: long-term depression, LTD) kommt. [8] Für diese beiden Möglichkeiten der Einflussnahme auf die synaptische Übertragung sind zwei ionotrope Glutamatrezeptoren, welche nach den für sie spezifischen Agonisten benannt sind, verantwortlich. Der N-Methyl-D-aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) und der α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure-Rezeptor (AMPA-Rezeptor). [2,9]

1.2.1 Entstehung einer LTP

Wenn durch Exocytose Glutamat in den synaptischen Spalt entlassen wird, bindet dieses sowohl an den AMPA- als auch an den NMDA-Rezeptoren. Der dadurch aktivierte AMPA-Rezeptor öffnet sich, wodurch Natrium-Ionen durch die postsynaptische Membran gelangen. Dies führt zu einer Depolarisierung dieser Membran. Durch den NMDA-Rezeptor können noch keine Ionen durch die postsynaptische Membran gelangen, da dieser von einem Magnesium-Ion blockiert wird. Kommt es zu einem vermehrten Eintreffen von Aktionspotentialen über das Axon und dadurch zu einer verstärkten Exocytose von Glutamat innerhalb eines kurzen Zeitraums, so wird die postsynaptische Membran verstärkt depolarisiert. Dies führt dazu, dass sich die NMDA-Rezeptoren öffnen, da sich die zuvor blockierenden Magnesium-Ionen von den Rezeptoren lösen. Durch diese NMDA-Rezeptoren können nun zusätzlich zu den Natrium-Ionen auch Calcium-Ionen in die postsynaptische Membran gelangen, wodurch es unter anderem zu einer Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren kommt, welche ihre Leitfähigkeit weiter beeinflusst. Zusätzlich wird vermutet, dass es dadurch zu einer erhöhten Konzentration an AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran kommt. [10-12]

1.2.2 AMPA-Rezeptor

Alle Rezeptoren vom AMPA-Typ weisen einen extrazellulären N-Terminus, einen intrazellulären C-Terminus und vier hydrophobe membranassoziierte Domänen auf. Die einzelnen Rezeptoren werden aus unterschiedlichen Kombinationen der vier Untereinheiten GluR1, GluR2, GluR3 und GluR4 aufgebaut. Jeder Untereinheit ist ein eigenes Gen zugeschrieben, das für die jeweilige Untereinheit codiert. Durch diesen variablen Aufbau können physiologische Eigenschaften wie Kinetik, Leitfähigkeit oder Durchlässigkeit für Ionen von Rezeptor zu Rezeptor variieren. Zusätzlich kann die Aktivität jeder Untereinheit durch Phosphorylierung reguliert werden. [13]

Bei Nagetieren konnte eine Änderung des Expressionsmusters der vier für den AMPA-Rezeptor codierenden Gene im Hippocampus mit dem Training in Labyrinth-Systemen in Zusammenhang gebracht werden. So kam es bei trainierten Mäusen zu einer erhöhten Konzentration an GluR1 und GluR4 Untereinheiten verglichen zu untrainierten Mäusen. Zusätzlich verringerte sich die Konzentration an GluR2 und GluR3 Untereinheiten bei diesen Tieren. [14,15]

Über die genaue Regulation dieser Expressionsmuster im Zusammenhang mit räumlichem Lernen ist erst wenig bekannt, es wird jedoch vermutet, dass epigenetische Faktoren wie die DNA-Methylierung dabei eine entscheidende Rolle spielen. [16,17]

1.3 Epigenetik

In einem vielzelligen Organismus liegt in jeder Zelle dieselbe genetische Information vor. Die Funktion der Zellen und die in ihr vorkommenden Proteine können jedoch sehr unterschiedlich sein. Dies lässt sich auf epigenetische Ereignisse, wie zum Beispiel die Stilllegung einzelner Gene während der Entwicklung des Organismus, zurückführen. [18]

Der Begriff Epigenetik wurde erstmals 1942 von Conrad Hal Waddington verwendet und von ihm als jener Teil der Biologie definiert, welcher die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und deren Produkten, welche den Phänotyp hervorbringen, beschreibt. [19]

Die Bedeutung des Worts Epigenetik hat sich im Laufe der Jahre erweitert. Es gibt heute mehrere Definitionen. Allen liegt zugrunde, dass es sich um Veränderungen von Genfunktionen, welche mitotisch und/oder meiotisch vererbt werden, handelt, die wiederum zu keinen Änderungen der DNA-Sequenz führen. [20]

Wie bereits erwähnt versteht man unter epigenetischen Prozessen Änderungen, die einen Einfluss auf das Expressionsmuster von Proteinen innerhalb einer Zelle haben, ohne direkt die DNA-Sequenz zu verändern. Ein möglicher epigenetischer Prozess ist die Modifikation der Seitenketten von den Aminosäuren, welche die Histone bilden. Hierbei kommt es unter anderem zur Methylierung und Acetylierung an Lysin, Histidin oder Arginin, sowie zur Phosphorylierung der freien Hydroxylgruppen von Serin, Threonin und Tyrosin. [21] Auch kann die Translation der mRNA durch die Anlagerung einer sogenannten microRNA reguliert werden. [22]

Eine weitere mögliche epigenetische Veränderung ist die kovalente Modifikation der DNA. Solche Veränderungen in Form von methylierten Cytosin-Basen wurden erstmals 1969 in Zusammenhang mit der Genexpression gebracht und gehören heute zu den am besten untersuchten epigenetischen Modifikationen. [23,24]

1.3.1 DNA-Methylierung

Die Methylierung der DNA ist eine weitverbreitete Modifikation, welche sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten stattfindet. In Prokaryonten wird die DNA in einem speziellen Muster methyliert. Dieses Muster ermöglicht es den Endonukleasen, zwischen der fremden und der eigenen DNA zu unterscheiden und diese unschädlich zu machen. Außerdem können dadurch die DNA-Reparatursysteme bei der Korrektur von Fehlern, welche während der Replikation entstehen, zwischen dem neu synthetisierten Strang und der Vorlage unterscheiden. [25]

In Säugern kommt es bei der DNA-Methylierung zur Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf die C5 Position eines Cytosins, auf das ein Guanidin folgt. Diese Reaktion wird von sogenannten DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. Bei Cytosinen, auf die kein Guanin folgt, konnte bisher keine Methylierung beobachtet werden. [26]

Diese sogenannten Cytosin-phosphatidyl-Guanin Dinukleotide, kurz CpGs, kommen im Genom im Verhältnis zu den anderen möglichen Paaren an Dinukleotiden wesentlich seltener vor. Dies liegt daran, dass es bei der Desaminierung eines methylierten Cytosins zur Bildung eines Thymins kommt, wohingegen die Desaminierung eines nicht methylierten Cytosins zur Bildung eines Uracils führt. Dieses Uracil kann im Gegensatz zu Thymin vom DNA-Reparatursystem erkannt und repariert werden. [27]

CpG-Dinukleotide treten vor allem in der Promotorregion und im ersten Exon eines Gens in Form von CpG-reichen Clustern, sogenannten CpG-Inseln, auf und sind dort für die Regulation der Expression mitverantwortlich. In den meisten Fällen kann anhand des Methylierungsgrads dieser CpG-Inseln auf die Aktivität des Gens geschlossen werden, wobei ein hoher Methylierungsgrad auf eine geringe Aktivität und ein niedriger Methylierungsgrad auf eine erhöhte Genaktivität hinweist. Daher spielt die DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung bei der genomischen Prägung und der X-Chromosom-Inaktivierung. [26]

2 Zielsetzung

Es wird seit längerem davon ausgegangen, dass die Gehirne von Menschen und Nagetieren ein vergleichbares System zur Orientierung nutzen. Daher wurde das räumliche Lernen von Ratten und Mäusen in den letzten Jahren stark beforscht. Man hat bereits herausgefunden, dass unter anderem der Hippocampus, und hier besonders die Verknüpfung zwischen der CA3 Region und der CA1 Region, eine wichtige Rolle im Bereich des räumlichen Lernens und der Gedächtnisbildung spielt.

Bei der Gedächtnisbildung und beim Lernen kommt es zu einer Langzeit-Potenzierung (LTP) der Synapsen, welche diese zwei Regionen des Hippocampus miteinander verbinden. Für die Entstehung dieser LTP ist unter anderem der ionotrope Glutamatrezeptor AMPA von Bedeutung. In Säugetieren kommt dieser Rezeptor als tetramerer Komplex, welcher aus unterschiedlichen Kombinationen der folgenden vier Untereinheiten gebildet wird, vor: GluR1, GluR2, GluR3 und GluR4. Die Anzahl und Art der Untereinheiten bestimmen die physiologischen Eigenschaften des Rezeptors. Daher ist die Regulation der Expression dieser Rezeptoruntereinheiten von besonderem Interesse.

In dieser Masterarbeit sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad der Gene, welche für die vier Untereinheiten des AMPA-Rezeptors codieren, und dem räumlichen Gedächtnis von Ratten besteht. Hierfür sollte für jedes Gen, *GluR1*, *GluR2*, *GluR3* und *GluR4*, sowohl eine methylierungssensitive hochauflösende Schmelzkurven-Methode (MS-HRM), mit der der mittlere Methylierungsgrad aller im untersuchten Bereich enthaltenen CpGs bestimmt werden kann, als auch eine Pyrosequenzier-Methode (PSQ), die Auskunft über den Methylierungsgrad jedes einzelnen CpGs der selben DNA-Sequenz liefert, entwickelt werden.

Um den Einfluss des räumlichen Lernens auf den Methylierungsgrad in der Promotorregion dieser Gene bestimmen zu können, sollten in Kooperation mit Univ.-Prof. Dr. Gert Lubec vom Institut für Kinderheilkunde an der Medizinischen Universität Wien zehn Dawley Sprague Ratten im Morris Wasserlabyrinth (einem weit verbreiteten Paradigma, um räumliches Lernen und die Gedächtnisbildung zu beurteilen) trainiert und anschließend diesen zehn Ratten und zehn untrainierten Ratten die Hippocampi entnommen werden.

Im Zuge dieser Arbeit sollte in einem ersten Schritt die DNA aus den Hippocampi isoliert werden. Bevor jene DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden konnte, sollte diese bisulfit-konvertiert werden, um so die Information über den Methylierungsgrad zu konservieren. Im Anschluss daran sollte der Methylierungsgrad mittels

MS-HRM und PSQ bestimmt werden. Zum Schluss sollten die für trainierte und untrainierte Ratten erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen werden.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR), welche 1983 von Kary Mullis erfunden wurde und wofür er 1993 den Nobelpreis erhielt, ist eine biochemische Methode, mit der spezifische DNA-Fragmente *in vitro* vervielfacht werden können. Aufgrund der Einsetzbarkeit für jeden Organismus und jedes Gen sowie die einfache Handhabung ist die PCR heutzutage eine der am weitesten verbreiteten Methoden, um Untersuchungen an der DNA durchzuführen. [28]

3.1.1 Prinzip der PCR

Das Grundprinzip der PCR beruht darauf, dass ein Enzym, und zwar die DNA-Polymerase, die Synthese von doppelsträngiger DNA (dsDNA) an einer DNA-Matrix katalysiert. Als Bausteine dienen ihr dabei die Desoxyribonukleotide Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP). Die Polymerase kopiert den Teil des Genoms, welcher von zwei synthetisch hergestellten DNA-Sequenzen, den sogenannten Primern, flankiert wird. Durch eine zyklische Wiederholung dieses Vorganges kommt es theoretisch jedes Mal zu einer Verdopplung des gewünschten DNA-Fragments. Der Ablauf der Verdopplung wird in drei Teilbereiche eingeteilt: die sogenannte Denaturierung des Doppelstranges, die Anlagerung (Annealing) der Primer an den komplementären Teil der einzelsträngigen DNA (ssDNA) und die Synthese der neuen doppelsträngigen DNA (dsDNA) (Elongation) durch die Polymerase. [29] Dieser Ablauf ist in Abbildung 2 dargestellt.

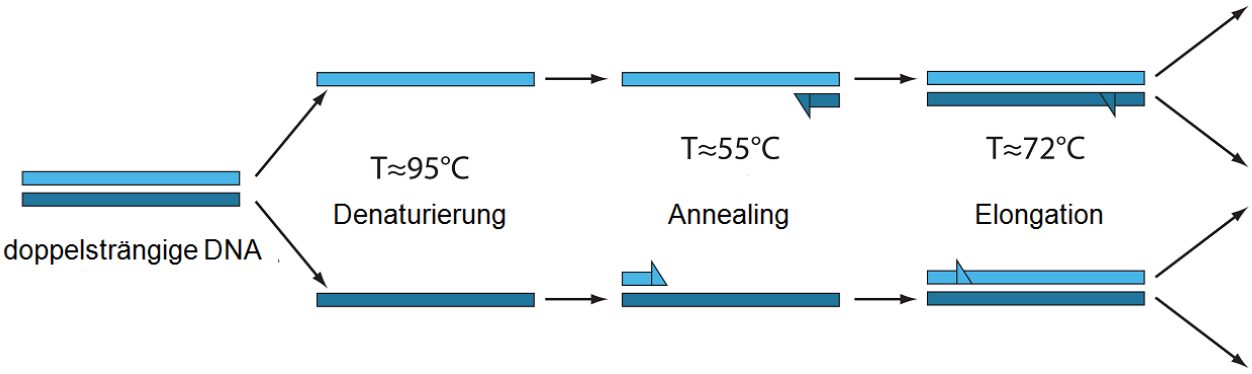


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus; verändert nach [30]

Bei der Denaturierung wird die dsDNA „aufgeschmolzen“, was bedeutet, dass die Wasserstoffbrückenbindungen, welche sich zwischen den Nukleobasen der komplementären DNA-Stränge ausbilden, durch Erhitzen auf 95°C gebrochen werden. Dadurch liegt die DNA in ihrer einzelsträngigen Form vor. Es ist erforderlich, eine thermostabile DNA-Polymerase

einzusetzen, welche trotz der hohen Temperaturen einsatzfähig bleibt. [31] Die bekannteste thermostabile DNA-Polymerase wurde erstmals 1980 aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und wird Taq Polymerase genannt. [32]

Im Annealing-Schritt wird die Temperatur soweit verringert, dass sich die beiden Primer an die jeweilige komplementäre Position anlagern können. Dies ist möglich, da die Primer selbst Oligonukleotide sind. Primer werden paarweise eingesetzt. Ihre Sequenz wird so designt, dass je ein Primer komplementär zur flankierenden Sequenz des parallelen bzw. des antiparallelen Stranges des Templates ist und es so zu einer Anlagerung an beide Einzelstränge kommt. Primer sollten eine Länge von 18 bis 35 Basen haben. Die Temperatur für das Annealing hängt von der Sequenz und der Länge der Primer ab. Die optimale Annealing-Temperatur (Ta) wird im Zuge der Assay-Optimierung bestimmt, wobei man üblicherweise 5°C unter jener Temperatur, bei der 50% der Oligonukleotide angelagert sind (T_m-Wert), startet. Dadurch ergeben sich Werte, die zwischen 40°C und 70°C liegen. Um Primer designen zu können, muss ein Teil der terminalen Sequenz des Zielfragmentes bekannt sein. Da die Primer-Konzentration mit jedem Zyklus sinkt, werden die Primer zu Beginn im Überschuss eingesetzt. Bei der Elongation wird der DNA-Doppelstrang am 3‘-OH-Ende der Primer durch die Polymerase um die zur Matrix komplementären Basen, also ein Adenin gegenüber einem Thymin bzw. ein Cytosin gegenüber einem Guanin, verlängert. Die Synthese findet beim Temperaturoptimum der Polymerase statt. Das Substrat für die Synthese bildet einen löslichen Komplex aus Nukleotiden und Mg^{2+}-Ionen. Die Mg^{2+}-Konzentration beeinflusst die Aktivität der Polymerase und die Schmelztemperatur der dsDNA. [28-29]

3.1.2 Zyklischer Ablauf der PCR

Wie unter Kapitel 3.1.1 beschrieben, wird ein PCR-Zyklus in drei Teilbereiche eingeteilt. In Abbildung 3 ist das Temperaturprofil der Denaturierung, des Annealings und der Elongation einer typischen PCR-Reaktion dargestellt.

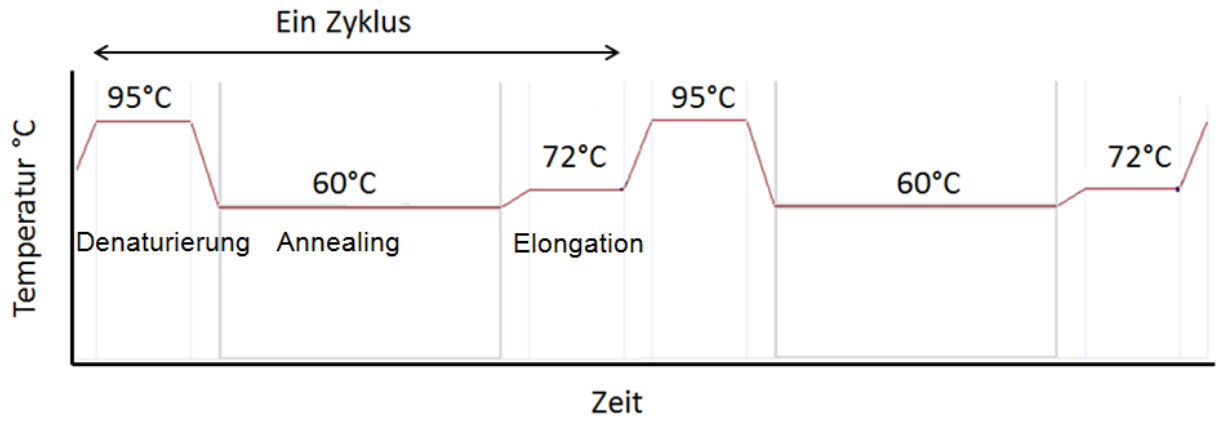


Abbildung 3: Repräsentatives Temperaturprofil einer PCR-Reaktion

Nach dem ersten Zyklus hat sich die Zahl der DNA-Stränge verdoppelt. Von den Muttersträngen wurden Tochterstränge kopiert. Die neu synthetisierten Tochterstränge reichen jedoch an ihren 3‘-Enden über die zu amplifizierende Sequenz hinaus. Im nächsten Zyklus kommt es wieder zur Primeranlagerung. Die nun aus den Tochtersträngen entstehenden Kopien sind durch die Primer auch an ihrem 3‘-Ende begrenzt. In jedem weiteren Zyklus kommt es zu einer linearen Vermehrung der langen Stränge, denen immer die Mutterstränge als Vorlage dienen. Die kurzen, gewünschten Tochterstränge verdoppeln sich mit jedem Zyklus, da ihnen die neu synthetisierte DNA als Vorlage dient. Es kommt zu einem exponentiellen Anstieg der Konzentration der Tochterstränge. Diese Wachstumsrate setzt jedoch eine PCR-Effizienz von 100% voraus und ist daher nur als ein theoretischer Wert anzusehen. Tatsächlich liegt die Effizienz unter diesem Wert. Dies liegt vor allem an der sinkenden Konzentration von Primern und Nukleotiden als auch an der sich durch die wiederholte Erhitzung denaturierenden Polymerase. Durch Optimierungsschritte und eine entsprechend hohe Zyklenzahl ist es möglich, eine Vervielfachung um den Faktor 10^6 zu erzielen. [31]

Abbildung 4 zeigt die drei Phasen des realen Anstiegs der Konzentration der amplifizierten DNA. In Phase 1 kommt es zu einem leichten Anstieg, da die Konzentration des Templates noch gering ist und daher die Wahrscheinlichkeit für ein richtiges Anlagern der Primer gering ist. In der zweiten Phase liegt eine ausreichende Menge an Templat vor, die Konzentration steigt exponentiell. In der dritten Phase kommt es aufgrund der bereits beschriebenen limitierenden Faktoren bei hohen Zyklenzahlen zu einem geringen Konzentrationsanstieg bzw. zur Ausbildung eines Plateaus. [31]

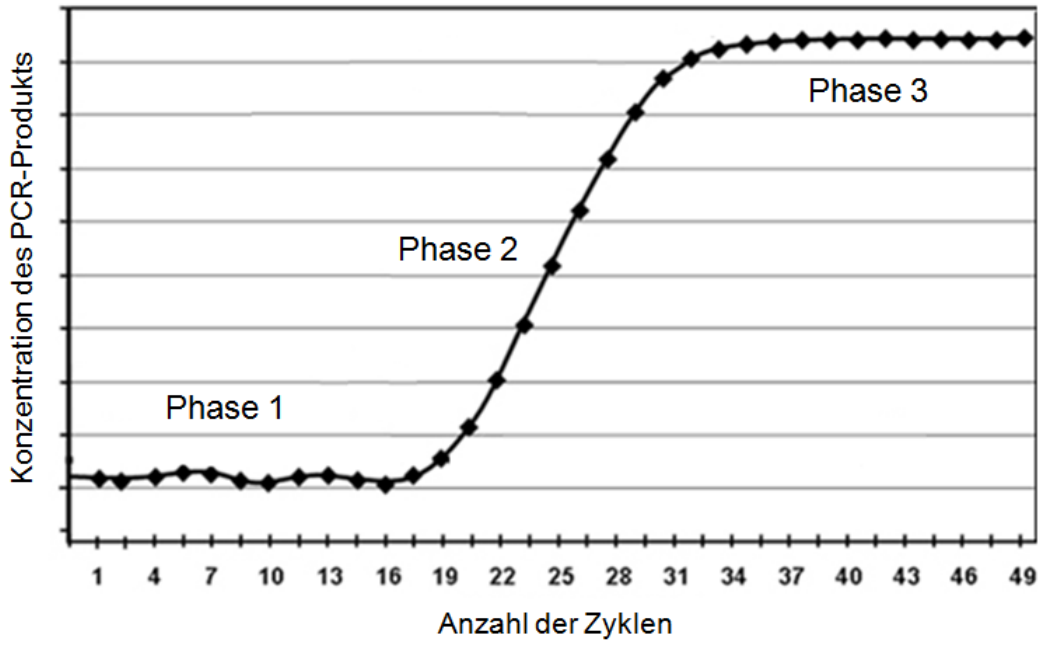


Abbildung 4: Amplifikationskurve einer PCR; verändert nach [33]

3.1.3 Real-time-PCR

Bei herkömmlichen PCR-Methoden können die entstandenen Produkte erst im Nachhinein, zum Beispiel über die Trennung mittels Gelelektrophorese und die Verwendung von Ethidiumbromid als interkalierender Farbstoff, detektiert werden. [28] Die real-time-PCR ist eine Methode, bei der die Amplifikation der DNA über ein Fluoreszenzsignal in Echtzeit detektiert werden kann. Das entstehende Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur Konzentration der DNA. Die am weitesten verbreiteten Methoden, ein Fluoreszenzsignal zu erhalten, sind einerseits der Einsatz von interkalierenden Farbstoffen (z.B. SYBR Green I, EvaGreen) oder andererseits das Zugeben einer Sonde, die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher markiert ist (TaqMan-Sonde). Interkalierende Farbstoffe binden unspezifisch an die DNA. Dies hat den Vorteil, dass sie für jede DNA-Sequenz verwendet werden können, jedoch liefern auch unspezifisch gebildete Produkte und Primer-Dimere ein Fluoreszenzsignal. Das Prinzip dieser Detektion beruht darauf, dass der Farbstoff einen fluoreszierenden Komplex mit dsDNA bildet. Liegt der Farbstoff jedoch frei vor oder bindet an ssDNA, kommt es nur zu einer schwachen Fluoreszenz. [34] Abbildung 5 zeigt, wie es zur Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes an die dsDNA kommt.

Abbildung 5: Anlagerung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes an die dsDNA; verändert nach [35]

3.2 Bisulfit-Konvertierung

Bei der Bisulfit-Konvertierung handelt es sich um eine selektive Methode, welche Cytosin, nicht aber 5-Methylcytosin, zu Uracil konvertiert. Dies ist die Voraussetzung für jede auf der PCR basierenden Methode, welche zur Untersuchung des Methylierungsgrads von Cytosin eingesetzt wird, da die Polymerase nicht zwischen methyliertem und unmethyliertem Cytosin unterscheiden kann. Am komplementären Strang wird immer eine Guanin-Base eingebaut. Durch die Bisulfit-Konvertierung wird die Information über den Methylierungsgrad der Cytosine konserviert. Wenn die Polymerase bei der Amplifikation am Mutterstrang ein Uracil erkennt, wird am neu synthetisierten Tochterstrang ein Adenin eingebaut. [36-38] In Abbildung 6 ist das Prinzip der Bisulfit-Konvertierung dargestellt. Durch die Konvertierung der Cytosine, nicht aber der am anderen Strang gegenüberliegenden Guanine, entstehen

zwei nicht komplementäre Einzelstränge. Daher erhält man bei der PCR zwei unterschiedliche dsDNA-Produkte.

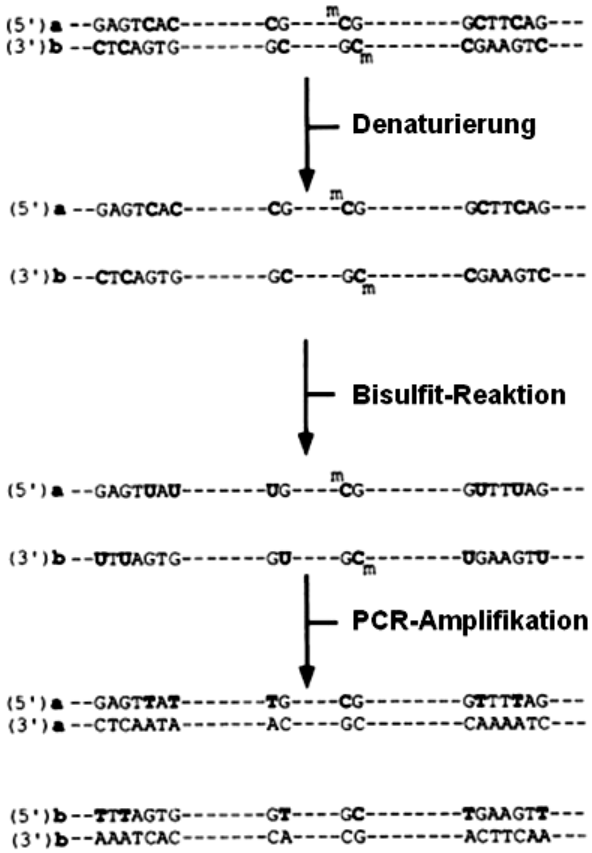


Abbildung 6: Prinzip der Bisulfit-Konvertierung; verändert nach [39]

Abbildung 7 zeigt das Reaktionsschema der Bisulfit-Konvertierung. In einem ersten Schritt kommt es unter sauren Bedingungen zur Bindung eines Sulfit-Ions an das C5-Atom eines Cytosins. Im nächsten Schritt wird dieses Addukt über eine Desaminierung zum Uracilsulphonat überführt. Die Desulphonierung zum Uracil findet anschließend im Alkalischen statt.

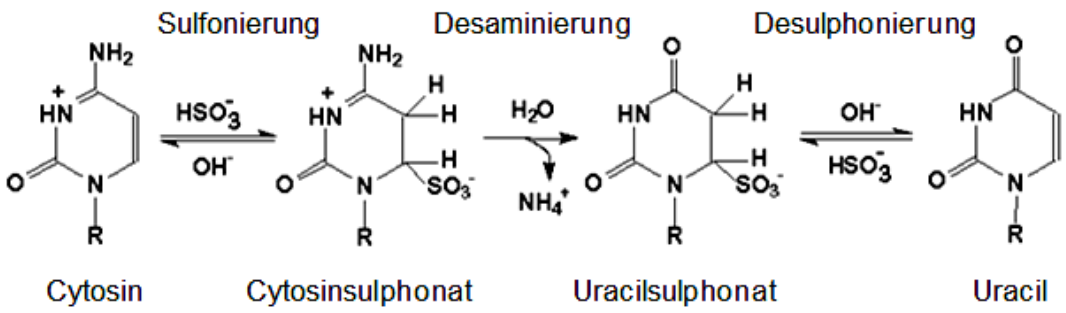


Abbildung 7: Reaktionsschema der Bisulfit-Konvertierung; verändert nach [40]

3.3 Methylierungssensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse

Unter dem Schmelzen von DNA versteht man das Auflösen der helikalen Struktur unter Temperatureinfluss. Über das Schmelzverhalten können Aussagen über die Sequenz bzw. die Länge des PCR-Produkts getroffen werden. Mittels Schmelzkurvenanalysen können so PCR-Nebenprodukte und Primer-Dimere erkannt werden. Bei der methylierungssensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (engl.: methylation sensitive high resolution melting, MS-HRM) handelt es sich um eine Methode, bei der ein Temperaturgradient im Bereich von 0,1°C/s zum Erstellen des Schmelzprofils verwendet wird. Aufgrund der hohen Auflösung ist es möglich, Veränderungen einzelner Basen in der DNA-Sequenz anhand des Schmelzverhaltens zu erkennen. So kann der Anteil an 5-Methylcytosinen über den Vergleich mit Standards, welche einen bekannten Methylierungsgrad aufweisen, bestimmt werden, da die durch die Bisulfit-Konvertierung in Uracil umgewandelten unmethylierten Cytosine bei der PCR als Thymine eingebaut werden (siehe Abbildung 6), wodurch es zu einem früheren Schmelzen dieser Produkte kommt. [36,41]

3.3.1 Prinzip der MS-HRM Analyse

Die Detektion des Schmelzverhaltens erfolgt unter Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (siehe Kapitel 3.1.3). Während die DNA-Lösung langsam und schrittweise erhitzt wird (beispielsweise von 55°C auf 95°C mit einer Steigung von 0,1°C/s), wird die Fluoreszenz des Farbstoffes gemessen. Um die dsDNA in ihre Einzelstränge zu dissoziieren, müssen die Wasserstoffbrückenbindungen und die Stapelwechselwirkung zwischen den Nukleobasen gebrochen werden. Wie schon unter Kapitel 3.1.1 erwähnt, ist die dafür erforderliche Energiemenge bzw. die Schmelztemperatur der DNA (T_m) von der Länge und der Sequenz abhängig. In Abbildung 8 sind das Guanin-Cytosin und das Adenin-Thymin Basenpaar dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Guanin-Cytosin Basenpaar drei Wasserstoffbindungen ausbildet, das Adenin-Thymin Basenpaar jedoch nur zwei. Dies führt zu einer stärkeren Stabilisierung bzw. einem höheren Energieaufwand beim Schmelzen von GC-reichen Sequenzen. [38]

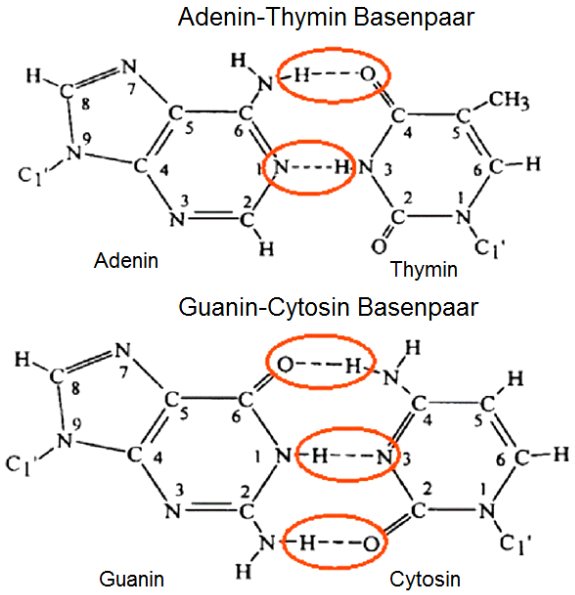


Abbildung 8: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleobasen des Adenin-Thymin und des Guanin-Cytosin Basenpaares; verändert nach [42]

3.3.2 Datenanalyse

Bei einer bestimmten Temperatur, T_m, kommt es zum plötzlichen Zusammenbruch der doppelhelikalen Struktur und daher zu einem starken Abfall des Fluoreszenzsignals. Unmethylierte, bisulfit-konvertierte DNA schmilzt bei einer geringeren Temperatur als methylierte, bisulfit-konvertierte DNA. Um die Änderung der Fluoreszenz während des Schmelzens leichter erkennen zu können, wird die erste negative Ableitung des Fluoreszenzsignals (-dF/dt) gegen die Temperatur aufgetragen. Auch PCR-Nebenprodukte und Primer-Dimere können so erkannt werden, da sie aufgrund ihrer abweichenden Sequenz und Länge ein anderes Schmelzverhalten aufweisen. [41] In Abbildung 9 ist das Schmelzverhalten einer methylierten und einer unmethylierten bisulfit-konvertierten DNA-Sequenz dargestellt, links wurde das Fluoreszenzsignal (F) und rechts die negative Ableitung (-dF/dt) der methylierten und der unmethylierten DNA-Sequenz gegen die Temperatur (T) aufgetragen.

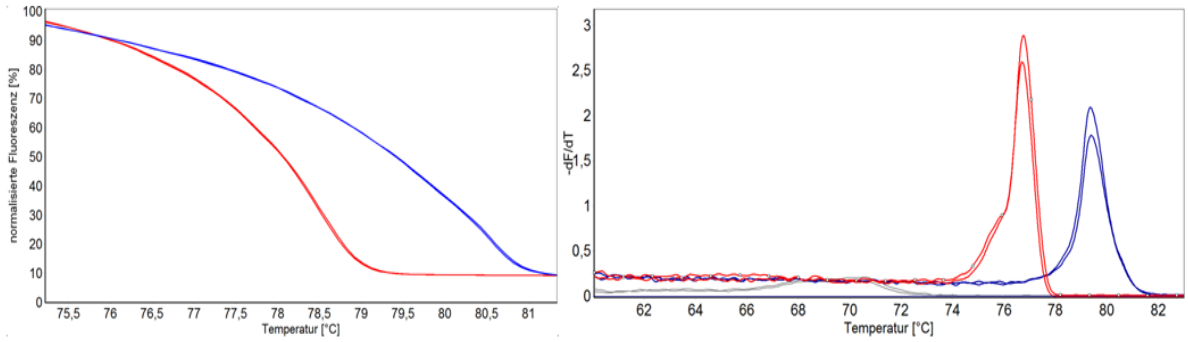


Abbildung 9: Schmelzverhalten einer unmethylierten DNA-Sequenz (rot) und einer methylierten DNA-Sequenz (blau); links Fluoreszenz (F) gegen die Temperatur (T); rechts negative Ableitung der Fluoreszenz (-dF/dt) gegen die Temperatur (T)

Um eine Aussage über den Methylierungsgrad einer unbekannten Probe treffen zu können, muss ihr Schmelzprofil mit dem von unmethylierten und methylierten Standards verglichen werden. Hierfür wird eine Standardreihe mit bekannten Anteilen an methylierten und unmethylierten DNA-Standards amplifiziert und im Anschluss hochauflösend geschmolzen. [36]

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, eine Kalibrierfunktion zu erstellen. Bei der gängigsten Methode wird zuerst eine auf die Anfangs- und Endintensität normalisierte Schmelzkurve erstellt. Dann werden die Peakhöhen der einzelnen Standards der ersten negativen Ableitung dieser Kurve beim Peakmaximum bestimmt und die Differenz zwischen dem unmethylierten Standard und den anderen Standards gebildet. Um die Kalibrierfunktion zu erhalten, werden diese Differenzen gegen den Methylierungsgrad der jeweiligen Standards aufgetragen. [43] Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass es zu Ungenauigkeiten im Fall einer heterogenen Methylierung kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode von Migheli *et al.* verwendet. [44] Auch hier wird zuerst eine auf die Anfangs- und Endintensität normalisierte Schmelzkurve erstellt. Daraus wird das mittlere Fluoreszenzsignal jedes Standards über den gesamten Temperaturbereich bestimmt und gegen den Methylierungsgrad des jeweiligen Standards aufgetragen. In Abbildung 10 sind die normalisierten Schmelzkurven dreier Standards (0%, 50%, 100%) und einer unbekannten Probe dargestellt.

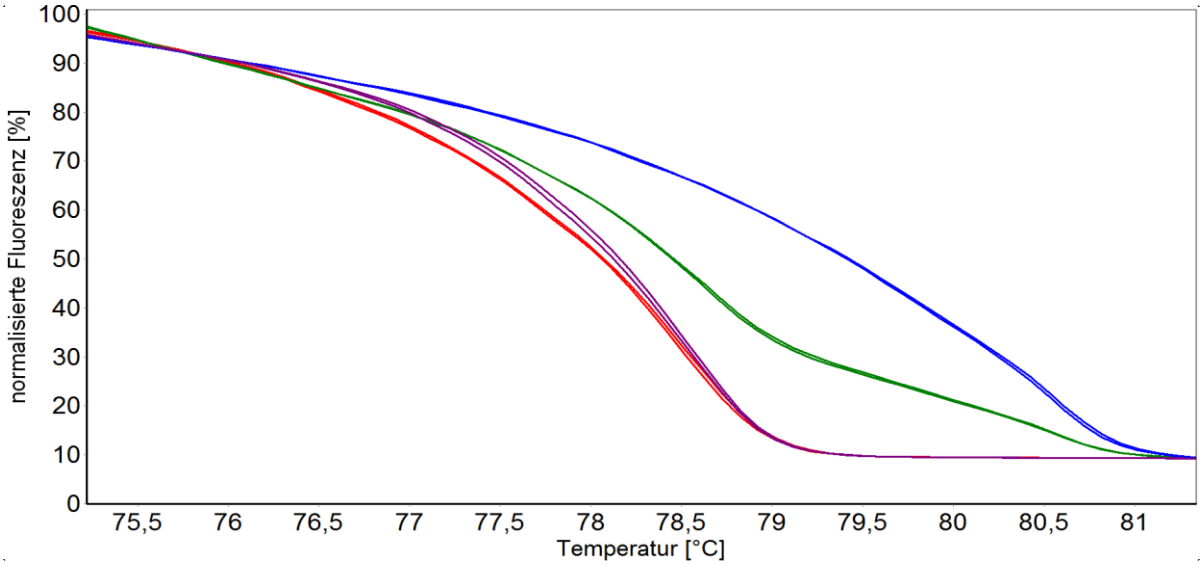


Abbildung 10: Normalisierte Schmelzkurven eines 0% Standards (rot), eines 50% Standards (grün), eines 100% Standards (blau) und einer Probe mit unbekanntem Methylierungsgrad (violett)

3.3.3 Primer-Design

Wie schon im Kapitel 3.1.1 erwähnt, muss für das Design von Primern, die für die Amplifikation eines ausgewählten DNA-Bereiches eingesetzt werden, die DNA-Sequenz bekannt sein. Das Primer-Design wird gewöhnlich mit speziellen Softwares durchgeführt. Anschließend wird überprüft, ob die vom Programm vorgeschlagenen Primer gewisse Regeln erfüllen. Diese Regeln sind hier kurz angeführt: [31]

- Die Primer sollen eine Länge von 18-35 Basen haben. Sind die Primer kürzer, kann es zur unspezifischen Anlagerung kommen. Sind die Primer länger, bilden sie eventuell Sekundärstrukturen aus oder die Primer lagern sich gegenseitig an, wodurch es zur Bildung von Primer-Dimeren kommt.
- Beide Primer sollen in etwa gleich lang sein.
- Ihre Schmelztemperatur soll sich um höchstens 1°C unterscheiden.
- Die Primer sollen spezifisch an das gewünschte Templat binden. Es ist besonders darauf zu achten, dass die Sequenz am 3‘-Ende komplementär zur Zielsequenz ist, da hier die Polymerisation beginnt.
- Innerhalb der Sequenz eines Primers soll die gleiche Base nicht öfter als dreimal wiederholt hintereinander vorkommen, da es sonst zu Verschiebungen bei der Anlagerung an das Templat kommen kann.
- Die Primer sollen keine Homo- oder Heterodimere ausbilden können.

Auch beim Design von Primern für methylierungssensitive HRM-Analysen kommen spezielle Programme zum Einsatz. Hierfür werden zusätzliche Regeln bezüglich der Sequenz der Primer und der Länge der entstehenden Amplikons beachtet. So sollen z.B. die T_m-Werte der

Amplikons des methylierten und des unmethylierten Standards mindestens 5°C auseinander liegen. [45]

3.4 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung (PSQ) ist eine DNA-Sequenziermethode, welche im Jahre 1987 erstmals von Pal Nyren beschrieben wurde. [46] Das Grundprinzip dieser Methode basiert auf der Detektion von anorganischem Pyrophosphat (PPi), welches von der DNA-Polymerase beim Einbau eines Nukleotides freigesetzt wird. Ausgehend von einem Sequenzier-Primer, welcher an die als Einzelstrang vorliegende DNA bindet, erfolgt die Sequenzierung über die Synthese des Gegenstranges der Zielsequenz. Wird die zur aktuellen Stelle komplementäre Base zugegeben, kommt es zur Strangverlängerung und so zur Freisetzung von PPi. Um die Konzentration der zu sequenzierenden DNA bzw. des freigesetzten PPis zu erhöhen, wird diese zuvor mittels PCR amplifiziert. Über eine Enzymkaskade, welche das freigesetzte PPi als Substrat nutzt, wird sichtbares Licht generiert. Die entstehende Lichtmenge ist proportional zur Anzahl an eingebauten Nukleotiden und dient zur Erstellung eines sogenannten Pyrogramms. Die Detektion erfolgt in Echtzeit von einer Photodiode oder einer ladungsgekoppelten Kamera (engl.: charge-coupled device camera). Die Sequenzierung erfolgt über eine zyklische Wiederholung der Zugabe von Nukleotiden mit anschließender Strangverlängerung, man spricht daher von einer sequencing-by-synthesis Methode. [47]

3.4.1 Enzymkaskade

Es gibt zwei verschiedene Methoden beim Pyrosequenzieren: Festphasen-Pyrosequenzieren und Flüssigphasen-Pyrosequenzieren. Bei der Festphasenmethode wird die zu sequenzierende DNA an einem Träger immobilisiert. Dies geschieht, indem ein PCR-Produkt, welches mit einem biotinylierten Primer amplifiziert wurde, an Streptavidin-beschichtete magnetische Kügelchen (engl. magnetic beads) bindet. Die eingesetzte Enzymkaskade besteht aus einer DNA-Polymerase, einer ATP-Sulfurylase und einer Luciferase. Bei dieser Enzymkaskade erfolgt nach jeder Nukleotidzugabe ein Waschschritt. Es ist daher kompliziert, diese Methode zu automatisieren. Bei der Flüssigphasen-Pyrosequenzierung wird die Enzymkaskade um eine Apyrase erweitert. Diese baut die während der Synthese nicht eingebauten Nukleotide ab, daher sind keine Waschschritte mehr erforderlich. Auch ist es möglich, die Reaktionen ohne Trägermaterial durchzuführen. Die Erweiterung der Kaskade um die Apyrase erleichtert die Automatisierung, da alle Reaktionen in einem Gefäß, in dem sowohl Substrate als auch Enzyme enthalten sind, durchgeführt werden können. [48] In Abbildung 11 ist der Ablauf der Enzymreaktionen schematisch dargestellt.

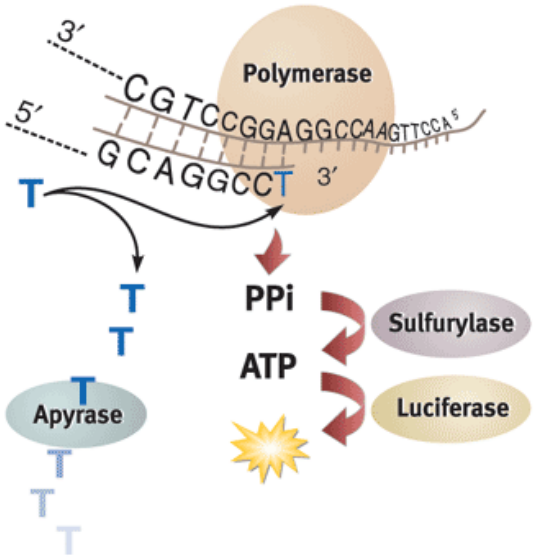


Abbildung 11: Schematische Darstellung der enzymkatalysierten Reaktionen beim Sequenzieren einer Base; verändert nach [49]

Die Enzymkaskade startet mit der Katalyse der Synthese des Gegenstranges durch die Polymerase. Anschließend wird das dabei freigesetzte PPi gemeinsam mit Adenosinphosphosulfat (APS) von der ATP-Sulfurylase zu ATP umgesetzt. Das so gebildete ATP liefert die Energie für die Umsetzung von D-Luciferin (LH_2) und Sauerstoff (O_2) zu Oxyluciferin (oxy-L) durch die Luciferase, wobei Licht emittiert wird. Zwischen den einzelnen Zyklen kommt es zur Hydrolyse der nicht eingebauten Nukleotide und des gebildeten ATPs durch die Apyrase. Die Apyrase muss hierfür bestimmte Eigenschaften aufweisen: erstens muss das Enzym alle Nukleotide mit derselben Geschwindigkeit abbauen. Zweitens muss die Zeit, die für den Abbau benötigt wird, deutlich länger sein, als die Zeit, die für den Einbau über die Polymerase benötigt wird, um eine Ausbeute der einzelnen Zyklen nahe an 100% zu erreichen. Drittens muss die Geschwindigkeit der ATP-Synthese durch die Sulfurylase höher sein als die Rate des Abbaus durch die Apyrase, um ein zur freigesetzten Menge PPi proportionales Lichtsignal zu erhalten. [48] In Abbildung 12 sind die vier Reaktionen mit den entsprechenden Edukten, Produkten und Enzymen nochmals dargestellt.

$$\text{dNTP} + (\text{DNA})_n \xrightarrow{\text{Polymerase}} (\text{DNA})_{n+1} + \text{PPi}$$

$$\text{APS} + \text{PPi} \xrightarrow{\text{ATP-Sulfurylase}} (\text{ATP} + SO_4^{2-})$$

$$LH_2 + O_2 + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Luciferase}} (\text{oxy-L} + CO_2 + \text{AMP} + \text{PPi} + h\nu)$$

$$\text{NTP} \xrightarrow{\text{Apyrase}} (\text{NMP} + 2\text{Pi})$$

Abbildung 12: Reaktionsgleichungen der vier bei der PSQ eingesetzten Enzyme; Abkürzungen: LH2 Luciferin, oxy-L Oxyluciferin, NMP Nucleosidmonophosphate; verändert nach [50]

Um das Signal-Rausch-Verhältnis der Methode zu verbessern, wird anstelle von ATP Desoxyadenosin-α-Thiotriphosphat (dATPαS) (Abbildung 13) verwendet. Der Grund für diesen Austausch ist, dass ATP sowohl von der Polymerase als auch von der Luciferase erkannt wird, dATPαS jedoch nur der Polymerase als Substrat dient und daher zu keinem Lichtsignal führt. Auch dATPαS muss von der Apyrase mit derselben Geschwindigkeit wie die anderen Nukleotide abgebaut werden. [48,51]

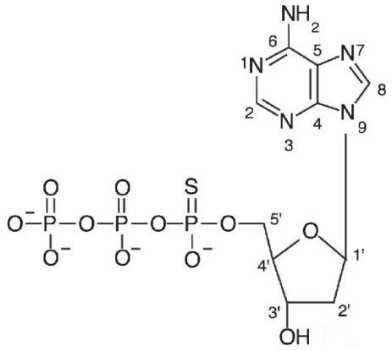


Abbildung 13: Desoxyadenosin-α-Thiotriphosphat (dATPαS); verändert nach [52]

3.4.2 Methylierungsanalyse

Bei der Bestimmung des Methylierungsgrads mittels Pyrosequenzierung soll das Verhältnis von 5-Methylcytosin zu Cytosin bestimmt werden. Hierfür wird bisulfit-konvertierte DNA mit einer bekannten Sequenz amplifiziert (siehe Kapitel 3.2). Im Zuge der Sequenzierung wird für jedes potentiell methylierte Cytosin (wird als Y bzw. im Fall der Sequenzierung des Gegenstranges als R angegeben) ein dCTP sowie ein dTTP bzw. bei der Sequenzierung des Gegenstranges dATPαS sowie ein dGTP hintereinander zugegeben. Aus dem Verhältnis der Lichtintensitäten bei diesen Zugaben kann dann das Verhältnis von C zu T bzw. G zu A ermittelt und dadurch der Methylierungsgrad der einzelnen CpGs angegeben werden.

3.4.3 Primer-Design

Primer-Sets, welche für die PSQ verwendet werden, bestehen aus einem Forward-Primer, einem Reverse-Primer und einem Sequenzier-Primer. Damit das durch die PCR gebildete Amplikon im Zuge der PSQ an Streptavidin modifizierte Oberflächen immobilisiert werden kann, ist einer der beiden PCR-Primer (Forward/ Reverse) an seinem 5‘-Ende biotinyliert. Auch beim Design dieser Primer werden die grundlegenden Regeln, welche schon unter Kapitel 3.3.3 genannt wurden, beachtet. Zusätzlich wird darauf geachtet, dass bei der Amplifikation die beiden nicht komplementären Stränge, welche durch die Bisulfit-Konvertierung entstehen, im gleichen Maße vervielfacht werden. Beim Design des Sequenzier-Primers ist besonders darauf zu achten, dass er nur eine Bindungsstelle am zu sequenzierenden Amplikon hat. Da die Anzahl der sequenzierbaren Basen in einem Lauf

beschränkt ist, muss sich diese Bindungsstelle nahe an dem zu sequenzierenden Bereich befinden. [53]

4 Ergebnisse und Diskussion

Die vorliegende Masterarbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche epigenetischen Zusammenhänge zwischen dem räumlichen Gedächtnis von Ratten und den Genen, welche für die vier Untereinheiten des AMPA-Rezeptors codieren, bestehen. Hierfür wurde der DNA-Methylierungsgrad in der Promotorregion dieser Gene in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten mittels methylierungssensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse und Pyrosequenzierung bestimmt und miteinander verglichen. Die Kombination dieser beiden Methoden ermöglicht ein erstes Screening der Proben direkt nach der Amplifikation durch die MS-HRM, wodurch Unterschiede zwischen den beiden Gruppen schnell erkannt werden können, bevor dann der Methylierungsgrad jedes einzelnen CpGs mittels PSQ bestimmt wird. [54]

4.1 Entwicklung der MS-HRM und PSQ-Methoden

Für die folgenden vier Gene wurden Primer-Sets, bestehend aus einem Forward-, einem Reverse- und einem Sequenzier-Primer, mit der PyroMark Assay Design Software (Version 2.0) entwickelt: *GluR1*, *GluR2*, *GluR3* und *GluR4*.

Diese Primer-Sets wurden unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.3.3 und 3.4.3 beschriebenen Regeln entworfen. Da die designten Primer-Sets in erster Linie der Bestimmung des Methylierungsgrads mittels PSQ dienen, wurden weitere spezielle Kriterien für das Design von HRM-Primern in dieser Arbeit nicht besonders beachtet. Der genauere Ablauf des Primer-Designs ist unter 5.5.1 und 5.5.2 beschrieben.

Da die Amplifikation der Zielsequenz mit den Forward- und Reverse-Primern der PSQ-Primer-Sets und unter Zugabe des EvaGreen Farbstoffes durchgeführt wurde, konnten die synthetisierten Amplikons sowohl für die MS-HRM-Analyse als auch für die PSQ-Analyse verwendet werden. Alle PCR-Methoden wurden mit kommerziell erhältlichen methylierten und unmethylierten DNA-Standards, welche bisulfit-konvertiert wurden, wie unter 5.5.3 beschrieben optimiert.

Die Nachweisgrenze (engl.: limit of detection, LOD) und die Bestimmungsgrenze (engl.: limit of quantification, LOQ) der MS-HRM Methoden wurden durch mehrmaliges Messen eines kommerziell erhältlichen unmethylierten Standards wie unter 5.8.1 beschrieben, abgeschätzt. Der LOQ für PSQ-Methoden liegt laut Hersteller des verwendeten Pyrosequenziergerätes bei 5%.

4.1.1 Glutamatrezeptor 1 (*GluR1*)

Die Promotorregion des Gens (AF302117.1) wurde der *Transcriptional Regulatory Element Database* (*TRED*) [55] entnommen und die Sequenz in die PyroMark Assay Design Software eingefügt. Das Programm schrieb diese Sequenz automatisch in die bisulfit-konvertierte Form um. Für dieses Gen wurden 2 Primer-Sets designt. In Abbildung 14 ist ein Auszug der Sequenz, welche in das Programm geladen wurde, dargestellt. Die zu amplifizierenden *Regions of Interest* für die beiden Primer-Sets sind fett und unterstrichen markiert, die enthaltenen CpGs sind grün hinterlegt.

AATTGGGCCAGTGGAGTGTGGAAGATGTATCCAGCGCAACCCGTGCACTACTA
GAGAAAGTGACCTAGTTCAAGCAGCTGGTGAATCCGGGGCTATTGCGGGGAC
CCCCTGCCACCTACTGACTTGCAACTGAACCCGCATTCCCAATAGCATCTTATC
CCCTGGCAGGGGGAGGGGCTGGGAGAGAAGCAGAGGAAGGTGGGGGACGTG
AGGGGGACAGTGGGTTTCTCCCTTTTGGGGAAAGCACCCTCCACCTTCCATCCT
TCCTCCCTTCCATCCCCTGCACCCACAGGGGGAAAAAAGTGAGGTGAGGATGG
AGAGGCAGGGGTGATGAGTTGGGGAGGCCAATGCAGGAATTCCGAGAGCTGG
CTCCTGGGTATCAGCATAGAGAGCTGGCAGCCTGTGAGAGTGTGAGGGAGAGA
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
GAGAGAAACACGGGAGGGTGAGAGAGGAGAGAGGCTGCCTGCTAGAGAAGAG
GAGGAGAGCAGAGGGAGAGGGGGAGCGAGCTAGCGCTCCAAGCATGAGGAC
GGGCTGCTCCCGGCTCAGTTAATCTGGCTGTCAGTCGGTGTTAACGCTGCAGT
TGAACTGCTCGG¶

Abbildung 14: Auszug der Sequenz der Promotorregion von *GluR1*; *Regions of Interest* sind fett und unterstrichen markiert

Genaue Angaben zu den beiden Primer-Sets sind im Folgenden angeführt.

Primer-Set 1:

In Tabelle 1 und Tabelle 2 sind die Eigenschaften des Primer-Sets und des Amplikons zusammengefasst.

Tabelle 1: Eigenschaften des Primer-Sets 1 für *GluR1*

	Forward-Primer	**Reverse-Primer**	**Sequenzier-Primer**
Sequenz (5'→3')	TGTTAGAGAAGAG GAGGAGAGTA	[Biotin]CTTTTCTTCCTAC AATTCCTTACTTAC	GTAGAGGGAG AGGGG
Sekundärstruktur			
T_m [°C]	60,9	62,1	51,7

Tabelle 2: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 1 für *GluR1*

Amplikon-Länge [bp]	204
Anzahl der CpGs	8
T_m [°C] des aus dem unmethylierten Templat resultierenden Amplikons	82,5
T_m [°C] des aus dem methylierten Templat resultierenden Amplikons	85,5

Die PCR-Methode für das Primer-Set wurde, wie unter 5.5.3 beschrieben, optimiert. Die daraus resultierenden Einstellungen sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Optimierte PCR-Bedingungen

Testparameter	Einstellung
Annealing-Temperatur [°C]	55
Primer-Konzentration [nM]	500
$MgCl_2$ Konzentration [mM]	2

Die Amplifikations-Kurven des methylierten und des unmethylierten DNA-Standards sowie einer *No template control* (NTC) sind in Abbildung 15 dargestellt. Es konnte ein Anstieg des Fluoreszenzsignals bei den DNA enthaltenden *Tubes* ab dem dreißigsten Zyklus beobachtet werden. Im Falle der NTC kam es zu keinem Fluoreszenzanstieg, daher kann die Bildung von Primer-Dimeren für dieses Primer-Set ausgeschlossen werden.

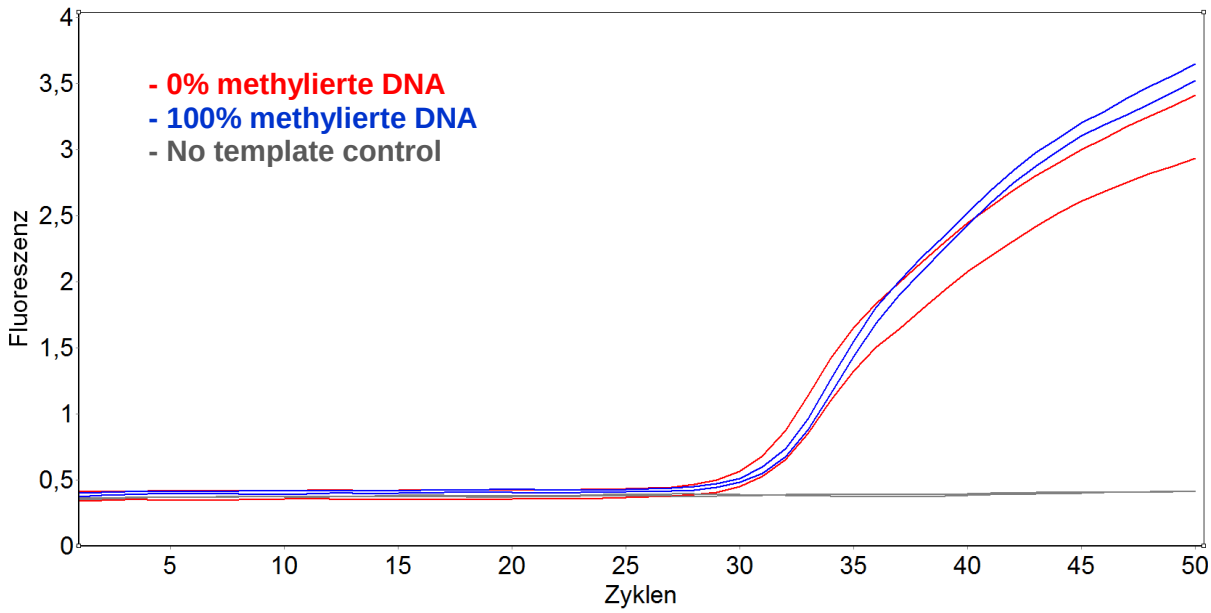


Abbildung 15: Amplifikationskurven für *GluR1*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Die ersten negativen Ableitungen der Schmelzprofile der methylierten und unmethylierten Standard-DNA, welche in Abbildung 16 dargestellt sind, zeigen beide einen scharfen Peak, daher kann von einem homogenen Schmelzverhalten der Amplikons gesprochen werden. Da der breite Peak in der Negativkontrolle nicht mit den Standardpeaks überlappt, hat er keinen Einfluss auf die Auswertung.

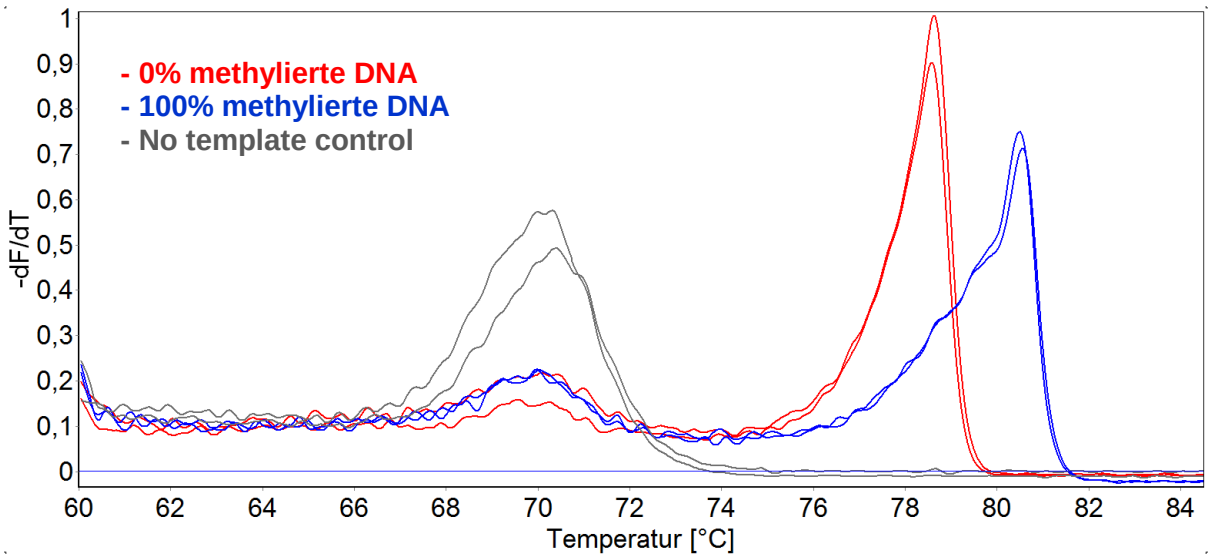


Abbildung 16: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR1*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

In Abbildung 17 sind die normalisierten HRM-Kurven, die wie unter 5.8.1 erklärt erstellt wurden, dargestellt. Die für den 50% methylierten Standard erhaltene Kurve liegt genau zwischen dem methylierten und dem unmethylierten Standard, was bedeutet, dass bei der PCR mit diesem Primer-Set der methylierte und der unmethylierte Standard in gleichem Maße amplifiziert werden. Man spricht daher von einer PCR-Methode ohne Bias. Dies ist eine Voraussetzung für den darauffolgenden PSQ-Schritt.

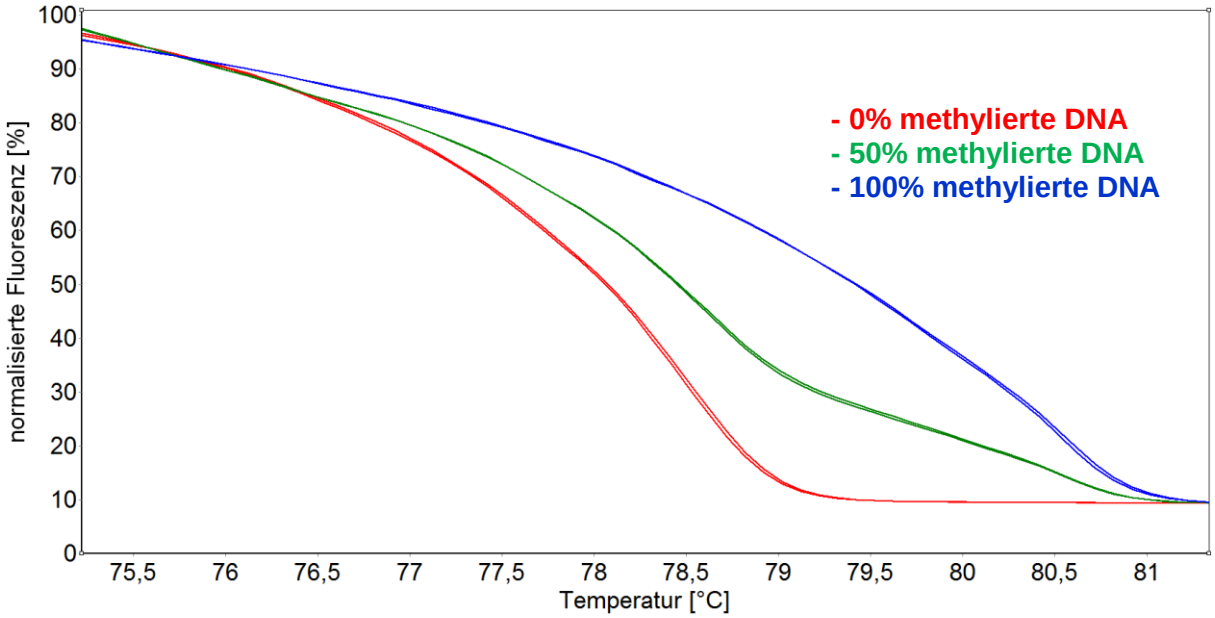


Abbildung 17: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR1*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün,100% methylierte DNA in Blau

Der LOD dieser Methode wurde auf 7% und der LOQ auf 13% geschätzt.

Primer-Set 2:

In Tabelle 4 und Tabelle 5 sind die Eigenschaften des Primer-Sets und des Amplikons zusammengefasst.

Tabelle 4: Eigenschaften des Primer-Sets 2 für *GluR1*

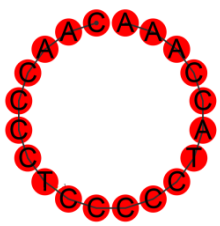
	Forward-Primer	**Reverse-Primer**	**Sequenzier-Primer**
Sequenz (5'→3')	ATTGGGTTAGTGG AGTGTGGAA	[Biotin]CAACCCCTCCCCC TACCAAA	GTGGAGTGTG GAAGA
Sekundärstruktur			
T_m [°C]	60,1	62,5	46,0

Tabelle 5: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 2 für *GluR1*

Amplikon-Länge [bp]	179
Anzahl der CpGs	5
T_m [°C] des aus dem unmethylierten Templat resultierenden Amplikons	79,5
T_m [°C] des aus dem methylierten Templat resultierenden Amplikons	81,0

Die optimierten Einstellungen der PCR-Methode sind in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: Optimierte PCR-Bedingungen

Testparameter	Einstellung
Annealing-Temperatur [°C]	55
Primer-Konzentration [nM]	250
$MgCl_2$ Konzentration [mM]	0

Die Amplifikations-Kurven sind in Abbildung 18 zu sehen. Für die Optimierung wurden methylierte und unmethylierte Standard-DNA, sowie eine Negativkontrolle eingesetzt.

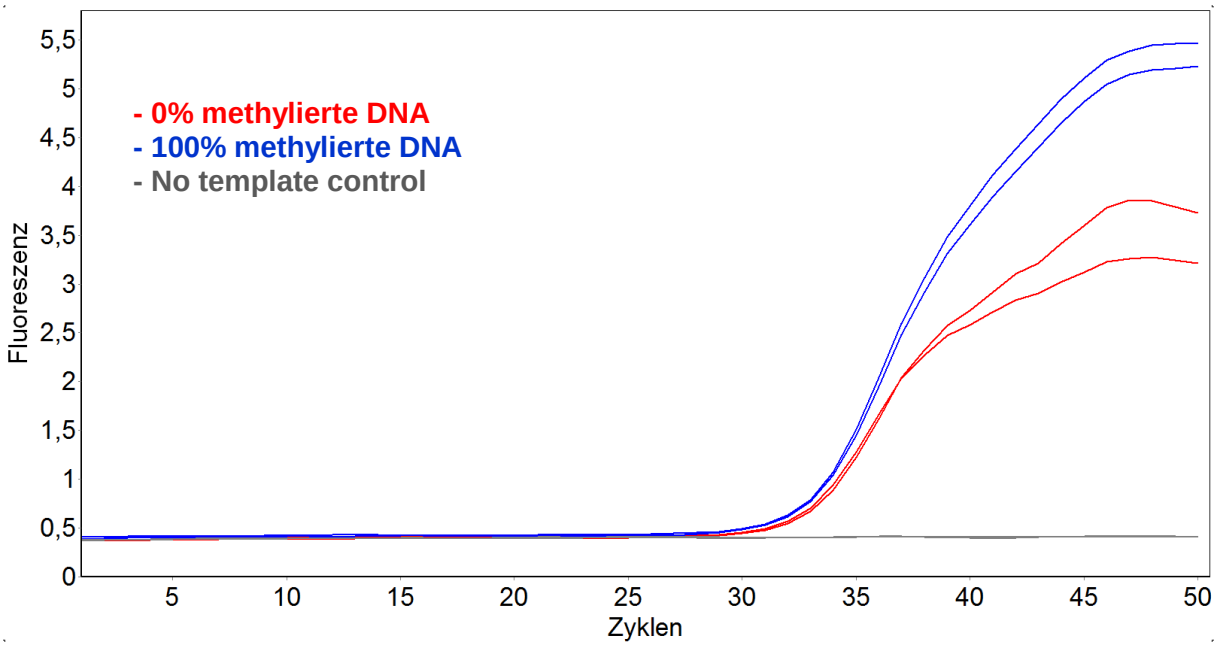


Abbildung 18: Amplifikationskurven für *GluR1*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Die erste negative Ableitung der Schmelzprofile der Standard-DNA und der Negativkontrollen sind in Abbildung 19 dargestellt.

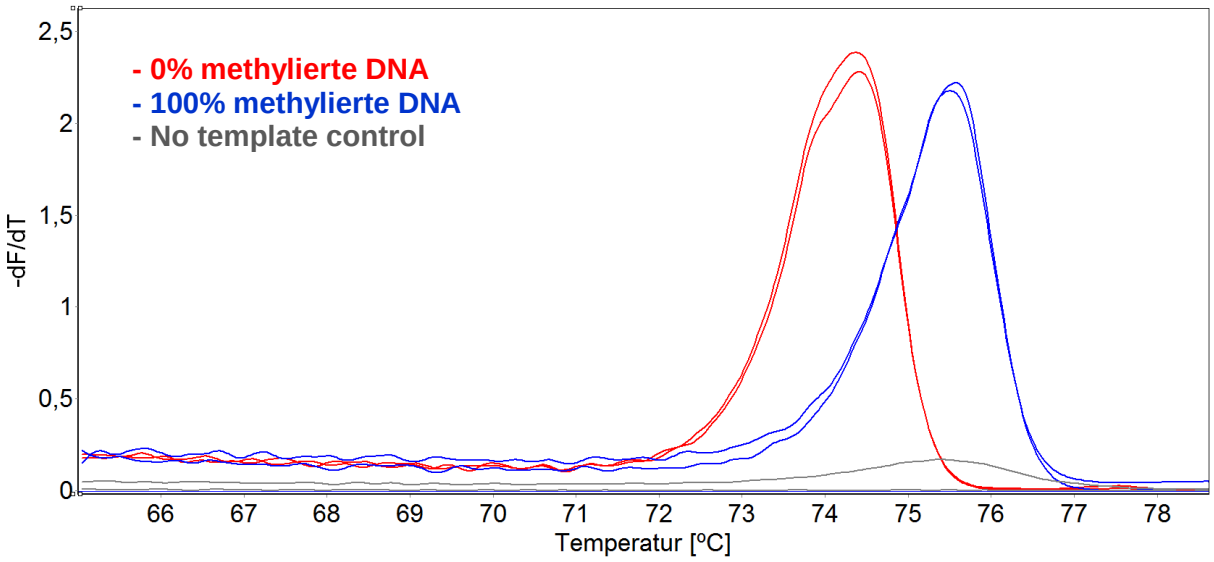


Abbildung 19: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR1*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Abbildung 20 zeigt die normalisierten HRM-Kurven. Auch bei dieser PCR-Methode ist kein Bias zu beobachten.

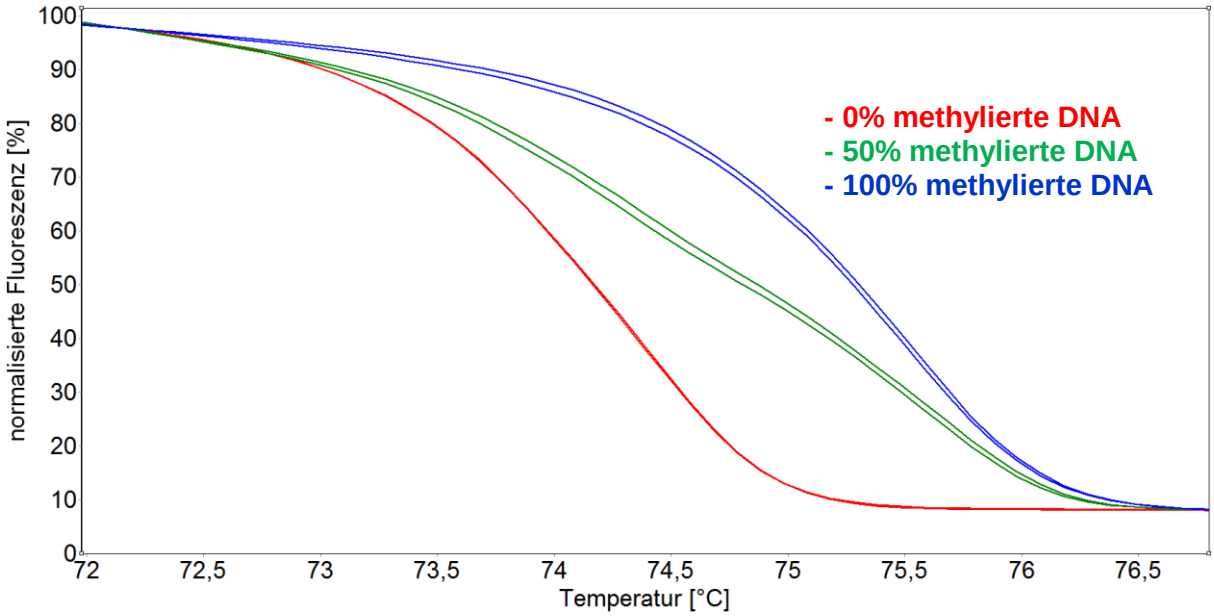


Abbildung 20: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR1*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau

Der LOD dieser Methode wurde auf 10%, der LOQ auf 28% geschätzt. Diese relativ hohen Werte werden damit begründet, dass die Differenz der T_m-Werte der Amplikons der methylierten und unmethylierten Standards nur 1,5°C beträgt.

4.1.2 Glutamatrezeptor 2 (*GluR2*)

Die Promotorregion des Gens (AF025917.1) wurde der Literatur entnommen, [56] die Sequenz in die PyroMark Assay Design Software eingefügt und für das Gen zwei Primer-Sets designt. In Abbildung 21 ist ein Auszug der Sequenz, welche in das Programm kopiert wurde, dargestellt. Da die zu amplifizierenden *Regions of Interest* der beiden Primer-Sets überlappen, wird die *Region of Interest* des ersten Sets **fett** und die des zweiten unterstrichen markiert, die enthaltenen CpGs sind grün hinterlegt.

CCATAAACCCTGCAACCTCAGCCCAGAGCTCCGACTAAAGCGCTGTCCTCGGTGCTAAAATCGG
ATGCGCAAGACTGGAGGTCTCTAAGAGGCACCAGGCTGCCCGGCTCTGAGCTGAGCTTTCT**CGG**
CACCG**TGCAGAAGCTGCCAGGGCTGTGCAGGGTGCAGGGCGCTGTGCGGGGGAGGGGTAGG**
TGCGCGAGCTCCCTGCCTGCCTTGAGTCGCGCACGCGCGCCCGAGACTGCCTGCCCCTCTCTG
TGACTTTCCTGTGTGTGTGCGTGTGTGTGTATGTGTGTGTATGTGTGTGCGCGCTCGTGTGAGAG
AGGAGAGAGGGAGAAGAGAGCTCGAGAGAGGGTGATTGTGTGAGTGCATGGGAGGGTGCTGAT

Abbildung 21: Auszug der Sequenz der Promotorregion von *GluR2*; *Regions of Interest* sind fett bzw. unterstrichen markiert

Genaue Angaben zu den beiden Primer-Sets sind im Folgenden angegeben:

Primer-Set 1:

In Tabelle 7 und Tabelle 8 sind die Eigenschaften des Primer-Sets und des Amplikons zusammengefasst.

Tabelle 7: Eigenschaften des Primer-Sets 1 für *GluR2*

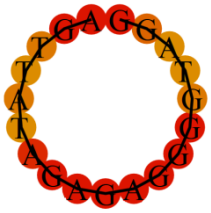
	Forward-Primer	**Reverse-Primer**	**Sequenzier-Primer**
Sequenz (5'→3')	[Biotin]AGTTATAGAGAGGGGTAGG	AACCCTACAACCTCAACC	ACCCCACTCTAAACTAAACTT
Sekundärstruktur			
T_m [°C]	55,0	53,8	55,4

Tabelle 8: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 1 für *GluR2*

Amplikon-Länge [bp]	252
Anzahl der CpGs	18
T_m [°C] des aus dem unmethylierten Templat resultierenden Amplikons	81,5
T_m [°C] des aus dem methylierten Templat resultierenden Amplikons	84,5

Die optimierten Einstellungen der PCR-Methode sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Optimierte PCR-Bedingungen

Testparameter	Einstellung
Annealing-Temperatur [°C]	60
Primer-Konzentration [nM]	250
$MgCl_2$ Konzentration [mM]	0

Der Anstieg des Fluoreszenzsignals mit zunehmender Zykluszahl ist in Abbildung 22 zu sehen. Für die Optimierung wurden methylierte und unmethylierte bisulfit-konvertierte DNA und eine Negativkontrolle eingesetzt.

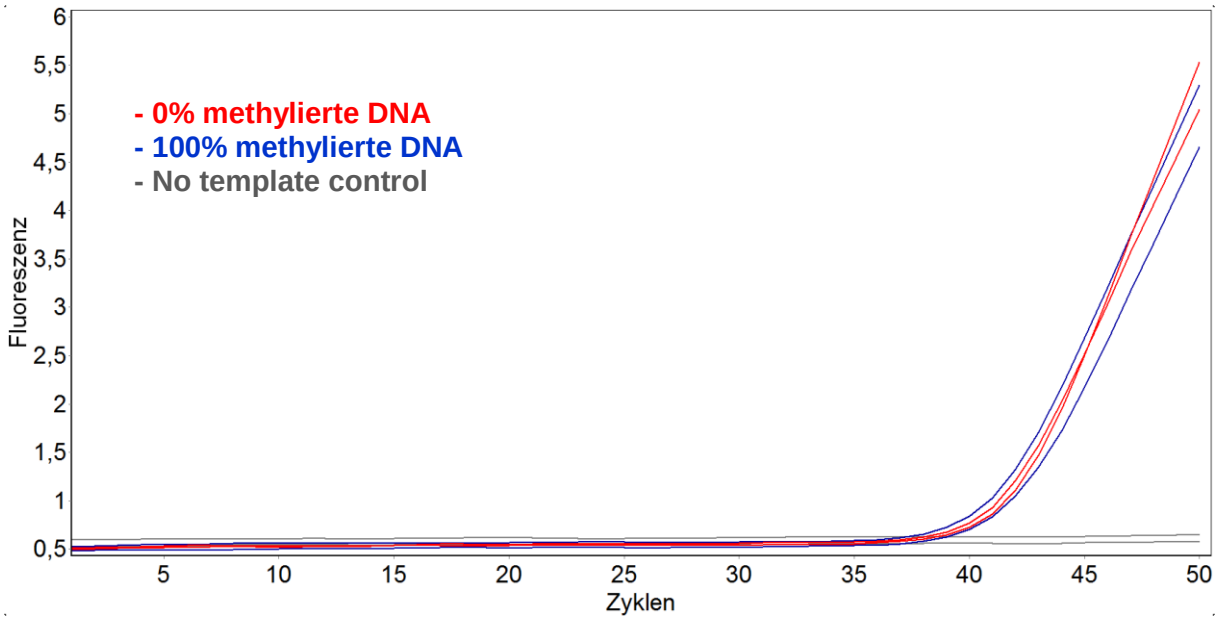


Abbildung 22: Amplifikationskurven für *GluR2*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Die erste negative Ableitung der Schmelzprofile der Standard-DNA und der Negativkontrolle sind in Abbildung 23 dargestellt.

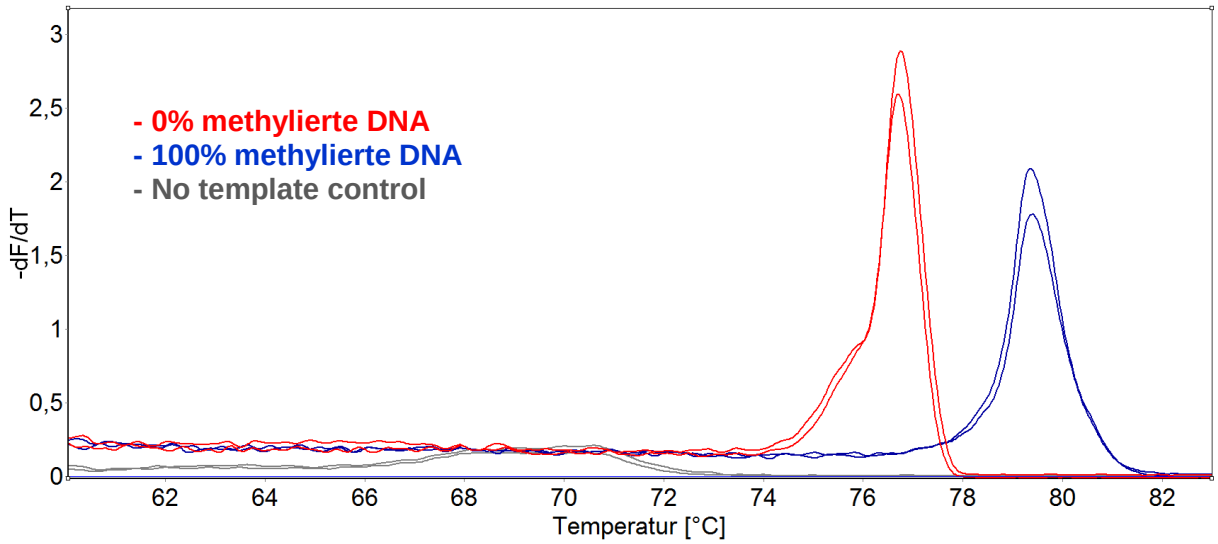


Abbildung 23: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR2*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Abbildung 24 zeigt die normalisierten HRM-Kurven. Auch bei dieser PCR-Methode ist kein Bias zu beobachten.

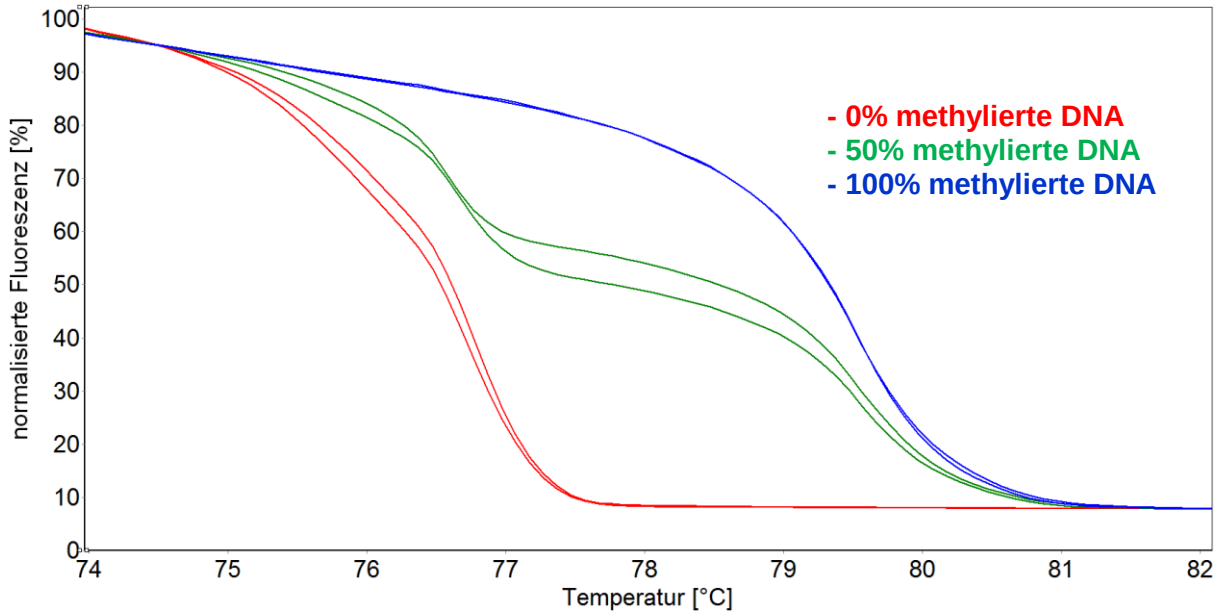


Abbildung 24: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR2*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau

Der LOD dieser Methode lag bei 4% und der LOQ bei 19%.

Primer-Set 2:

In Tabelle 10 und Tabelle 11 sind die Eigenschaften des Primer-Sets und des Amplikons zusammengefasst.

Tabelle 10: Eigenschaften des Primer-Sets 2 für *GluR2*

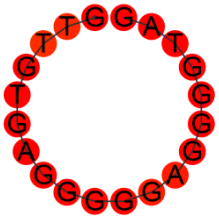
	Forward-Primer	**Reverse-Primer**	**Sequenzier-Primer**
Sequenz (5'→3')	GTTGTGAGGGGG AGGGGTAG	[Biotin] CCCTCTCTCCAACTCTCT TCTCC	TTTGTTTGTTT TGAGT
Sekundärstruktur			
T_m [°C]	64,6	66,6	37,9

Tabelle 11: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 2 für *GluR2*

Amplikon-Länge [bp]	181
Anzahl der CpGs	14
T_m [°C] des aus dem unmethylierten Templat resultierenden Amplikons	84,5
T_m [°C] des aus dem methylierten Templat resultierenden Amplikons	88,5

Die optimierten Einstellungen der PCR-Methode sind in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Optimierte PCR-Bedingungen

Testparameter	**Einstellung**
Annealing-Temperatur [°C]	64
Primer-Konzentration [nM]	250
$MgCl_2$ Konzentration [mM]	2

Abbildung 25 zeigt die unter optimierten Einstellungen erhaltenen Amplifikations-Kurven für die methylierte und unmethylierte Standard-DNA und die Negativkontrolle.

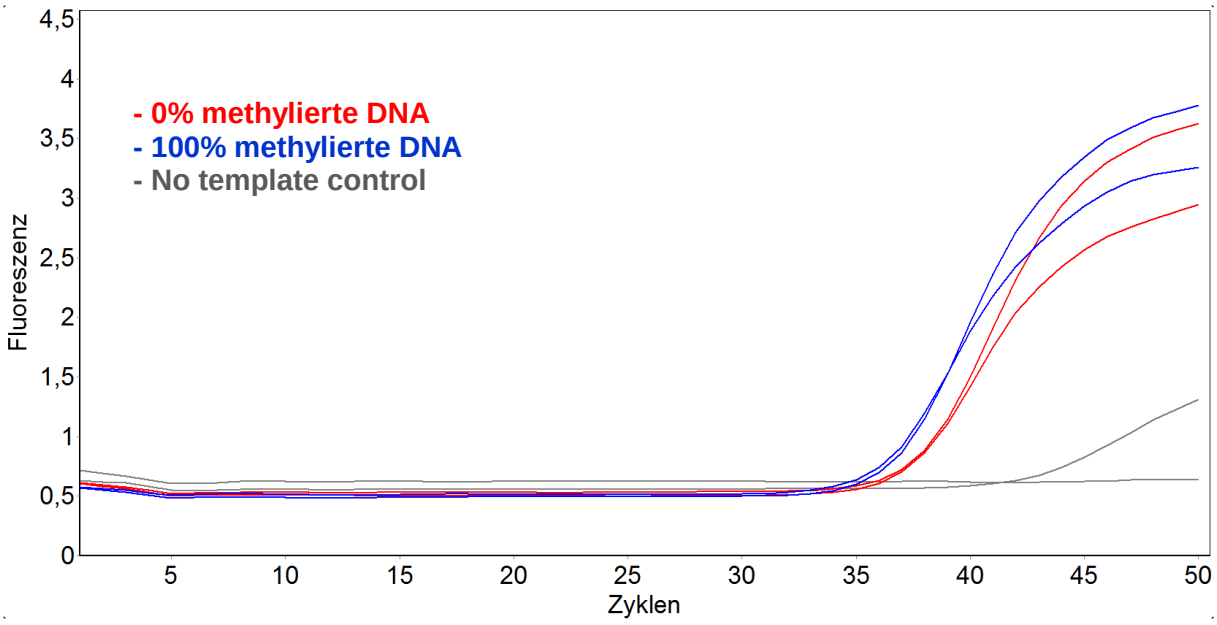


Abbildung 25: Amplifikationskurven für *GluR2*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Die erste negative Ableitung der Schmelzprofile der Standard-DNA und der Negativkontrollen sind in Abbildung 26 dargestellt.

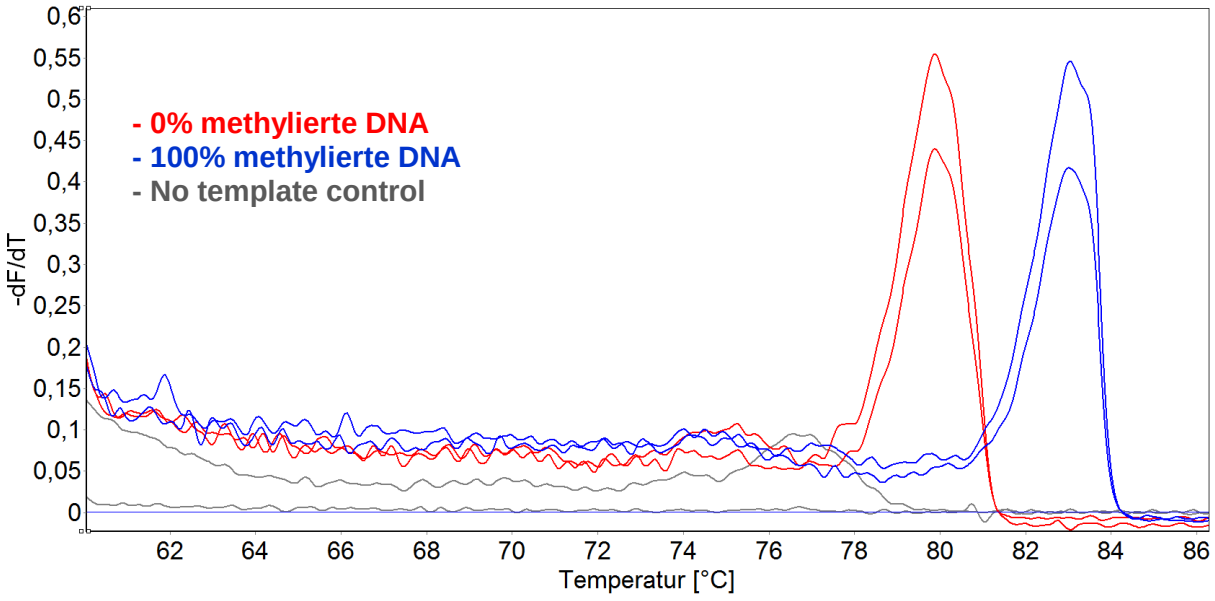


Abbildung 26: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR2*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Abbildung 27 zeigt die normalisierten HRM-Kurven. Diese PCR-Methode weist einen Bias in Richtung des methylierten Standards auf, daher konnte der Methylierungsgrad der Proben, die mit diesem Primer-Set amplifiziert wurden, nicht mittels PSQ bestimmt werden (siehe 3.4.3).

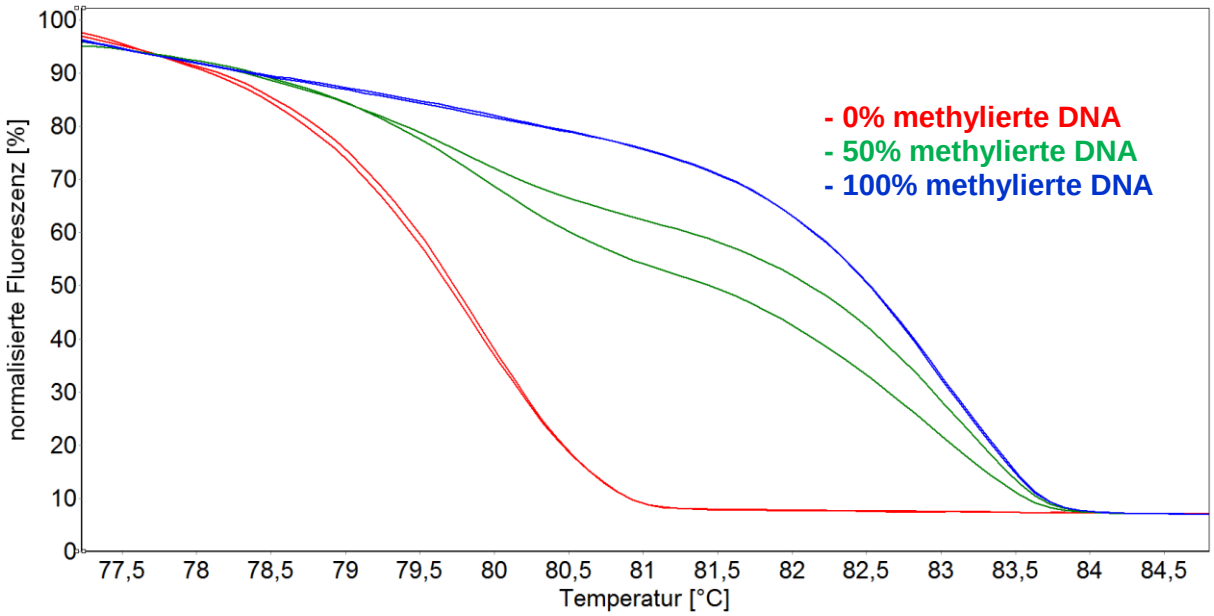


Abbildung 27: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR2*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau

Zusätzlich kam es bei der Anwendung dieser Methode zu einer Kontamination mit den Templaten, daher konnten der LOD und der LOQ dieser HRM-Methode nicht bestimmt werden.

4.1.3 Glutamatrezeptor 3 (*GluR3*)

Die Promotorregion des Gens (NM_032990) wurde der *Transcriptional Regulatory Element Database* (*TRED*) [55] entnommen, die Sequenz in die PyroMark Assay Design Software eingefügt und für das Gen zwei Primer-Sets entworfen. In Abbildung 28 sind Auszüge der Sequenzen, welche in das Programm geladen wurden, dargestellt. Die zu amplifizierenden *Regions of Interest* für die beiden Primer-Sets sind fett und unterstrichen markiert, die enthaltenen CpGs sind grün hinterlegt.

Primer-Set 1:

GGAAGAGTGAG**CG**AG**CG**AGAGCAAGTTGAGGGGAGGGGGTGTAAGAGC**CG**G**CG**AATTCTTTT
TCTTTTTCTATTATTATTTTGACG**ACTCC**CG**AGTTG**CG**CCCATGCTCTTGTCAGCTT**CG**TTTTAGG
CGTAGCACAGCCAGGCAGAAGAAAA

Primer-Set 2:

GTGGAGCTAAG**CG**GTGTG**CG**GCTTTAATTCCA**CG**TCAGATCAACTTTGATCAATATCCCCCTAC
CGGCCCAATTGGAAGAACCCAATTCACCG**GAGCTGAGCCTTTGAGGCTTTTTAGCT

Abbildung 28: Auszug der Sequenzen der Promotorregion von *GluR3*; *Regions of Interest* sind fett und unterstrichen markiert

Genaue Angaben zu den beiden Primer-Sets sind im Folgenden angegeben:

Primer-Set 1:

In Tabelle 13 und Tabelle 14 sind die Eigenschaften des Primer-Sets und des Amplikons zusammengefasst.

Tabelle 13: Eigenschaften des Primer-Sets 1 für *GluR3*

	Forward-Primer	**Reverse-Primer**	**Sequenzier-Primer**
Sequenz (5'→3')	GATTAGTGTGGGGTGGAAAG	[Biotin] CCCCATTTTCTTCTACCTAACTAT	GGTGGAAAGGAAGAG
Sekundärstruktur			
T_m [°C]	58,4	60,3	46,0

Tabelle 14: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 1 für *GluR3*

Amplikon-Länge [bp]	177
Anzahl der CpGs	9
T_m [°C] des aus dem unmethylierten Templat resultierenden Amplikons	79,0 und 84,0
T_m [°C] des aus dem methylierten Templat resultierenden Amplikons	81,5 und 87,0

Die optimierten Einstellungen der PCR-Methode sind in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Optimierte PCR-Bedingungen

Testparameter	**Einstellung**
Annealing-Temperatur [°C]	55
Primer-Konzentration [nM]	250
$MgCl_2$ Konzentration [mM]	0

Unter den optimierten Bedingungen wurden die in Abbildung 29 gezeigten Amplifikations-Kurven erhalten.

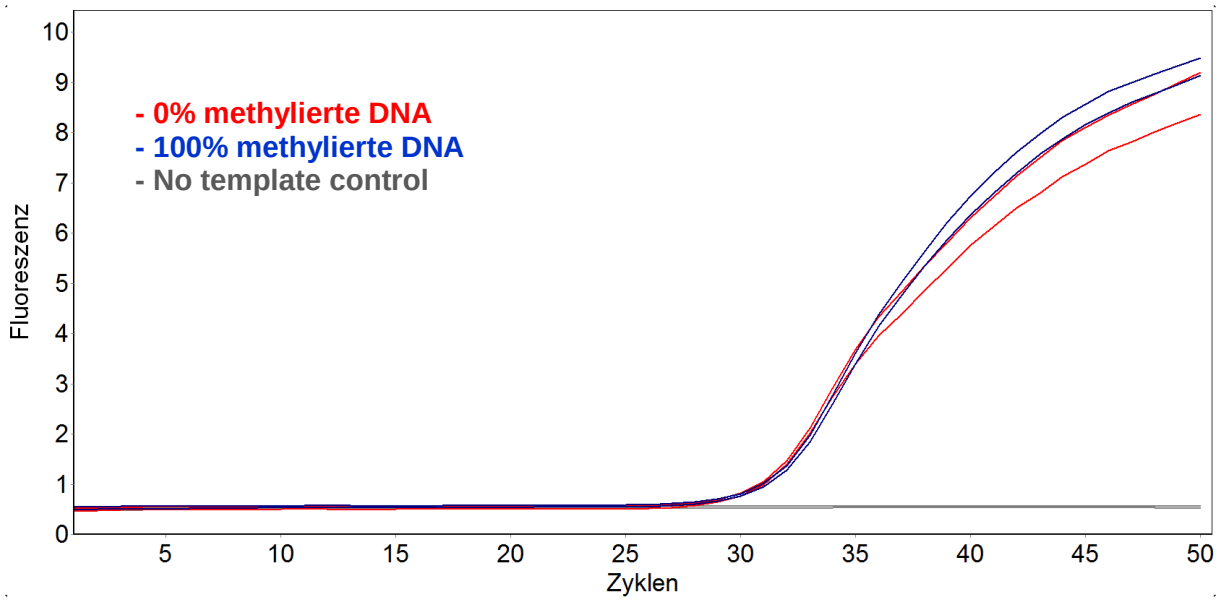


Abbildung 29: Amplifikationskurven für *GluR3*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Die erste negative Ableitung der Schmelzprofile der Standard-DNA und der Negativkontrollen sind in Abbildung 30 dargestellt. Da die Amplikons in den ersten 70 Basen einen deutlich höheren CG-Anteil (unmethylierter Standard: 51%, methylierter Standard: 56%) besitzen als in den nächsten 107 Basen (unmethylierter Standard: 22%, methylierter Standard: 28%), weisen sie zwei Schmelzdomänen auf.

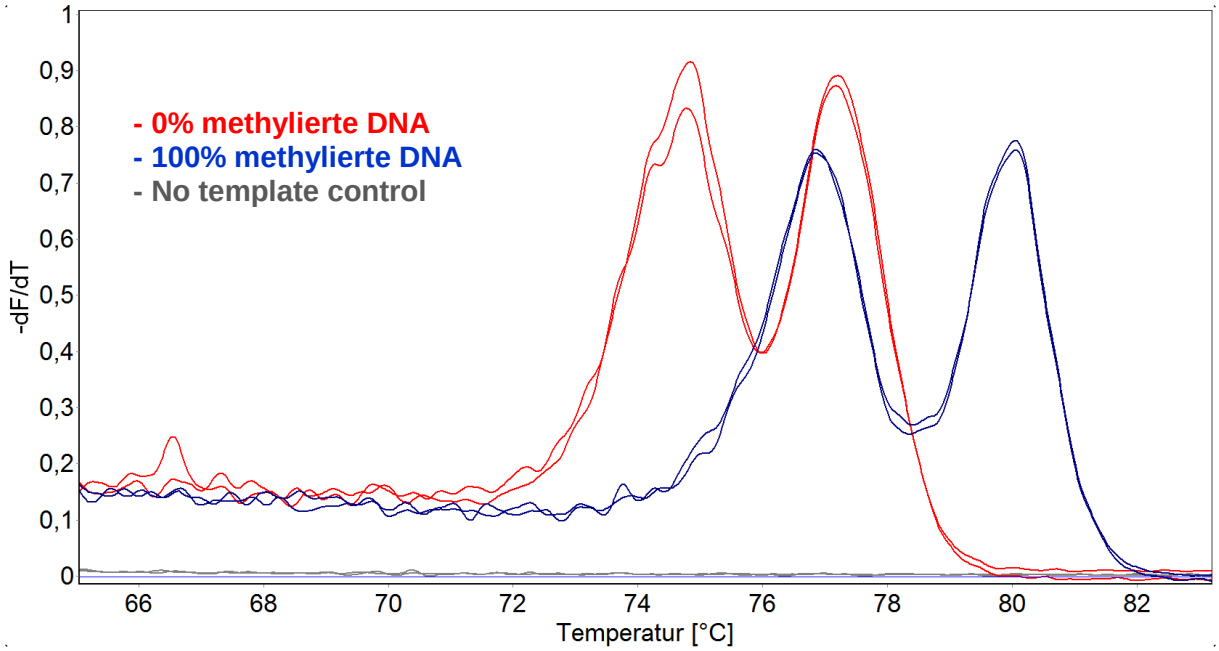


Abbildung 30: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR3*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Abbildung 31 zeigt die normalisierten HRM-Kurven. Auch in dieser Darstellung sind die zwei Schmelzdomänen erkennbar. Die PCR-Methode weist einen leichten Bias in Richtung des methylierten Standards auf.

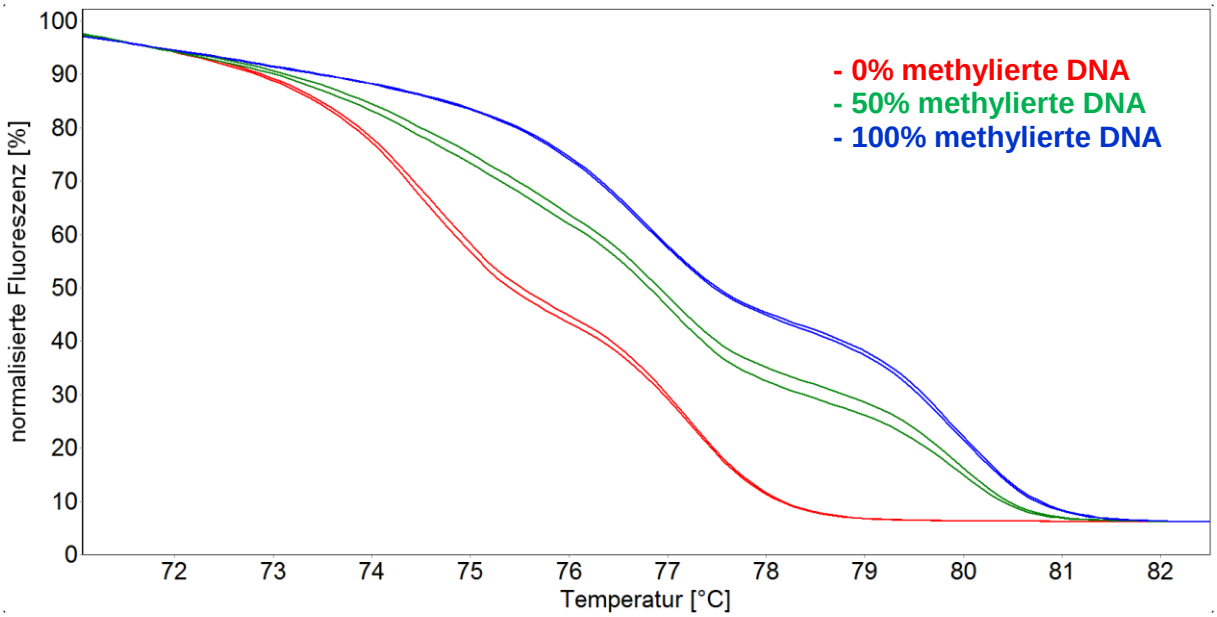


Abbildung 31: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR3*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau

Bei der Abschätzung des LOD und LOQ wurden Werte von 5% (LOD) und 15% (LOQ) erhalten.

Primer-Set 2:

In Tabelle 16 und Tabelle 17 sind die Eigenschaften des Primer-Sets und des Amplikons zusammengefasst.

Tabelle 16: Eigenschaften des Primer-Sets 2 für *GluR3*

	Forward-Primer	**Reverse-Primer**	**Sequenzier-Primer**
Sequenz (5'→3')	GGGGGAAGAAGA AAAGAGTTA	[Biotin] TATTAATCCCATCTCCAA TATTAACAT	AGAGTTAAAA AGTTTTAAAG G
Sekundärstruktur			
T_m [°C]	57,5	59,2	49,7

Tabelle 17: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 2 für *GluR3*

Amplikon-Länge [bp]	205
Anzahl der CpGs	6
T_m [°C] des aus dem unmethylierten Templat resultierenden Amplikons	79,5
T_m [°C] des aus dem methylierten Templat resultierenden Amplikons	81,0

Die optimierten Einstellungen der PCR-Methode sind in Tabelle 18 angegeben, die unter diesen Bedingungen erhaltenen Amplifikations-Kurven sind in Abbildung 32 dargestellt.

Tabelle 18: Optimierte PCR-Bedingungen

Testparameter	Einstellung
Annealing-Temperatur [°C]	55
Primer-Konzentration [nM]	250
$MgCl_2$ Konzentration [mM]	2

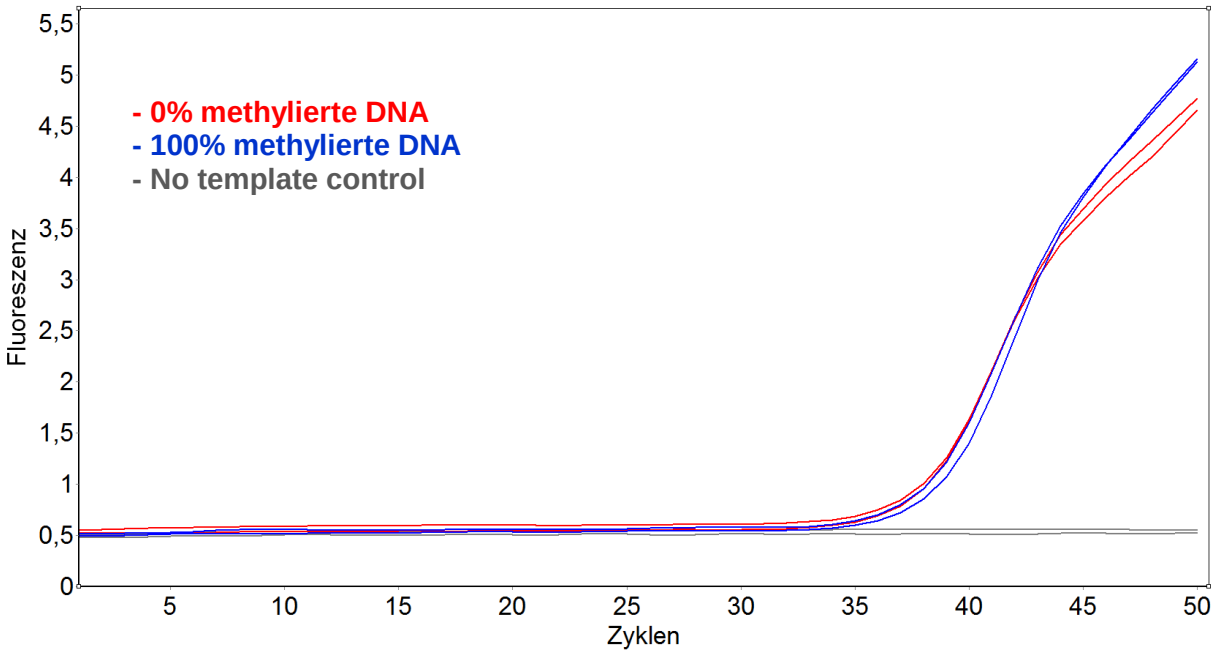


Abbildung 32: Amplifikationskurven für *GluR3*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Die erste negative Ableitung der Schmelzprofile der Standard-DNA und der Negativkontrollen sind in Abbildung 33 dargestellt.

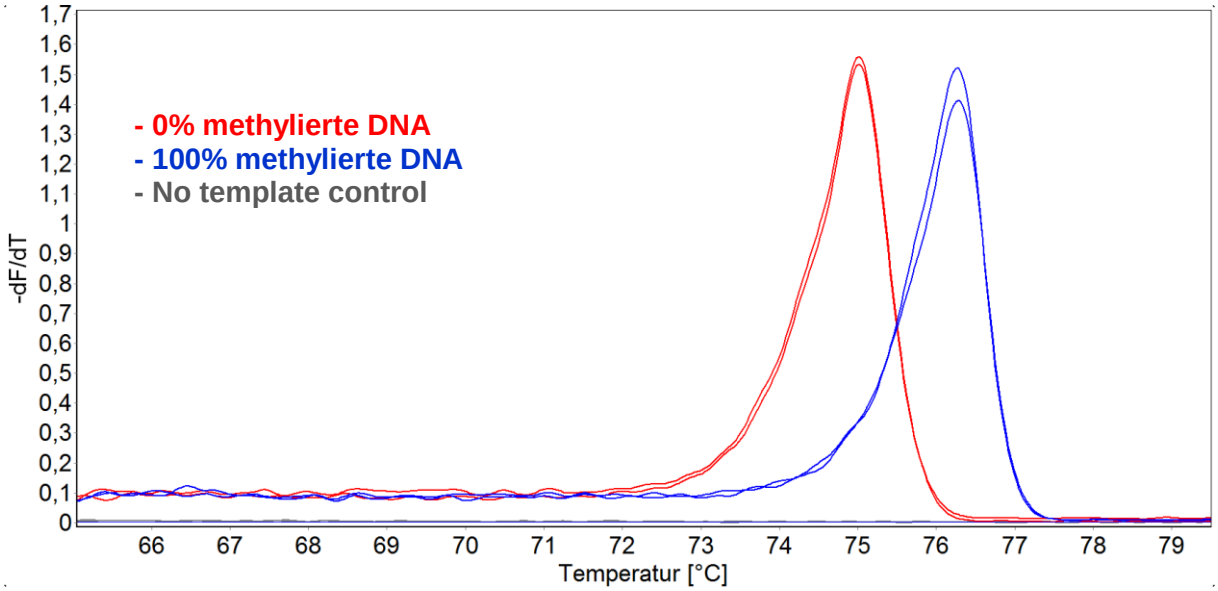


Abbildung 33: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR3*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Abbildung 34 zeigt die normalisierten HRM-Kurven. Auch bei dieser PCR-Methode ist kein Bias zu beobachten.

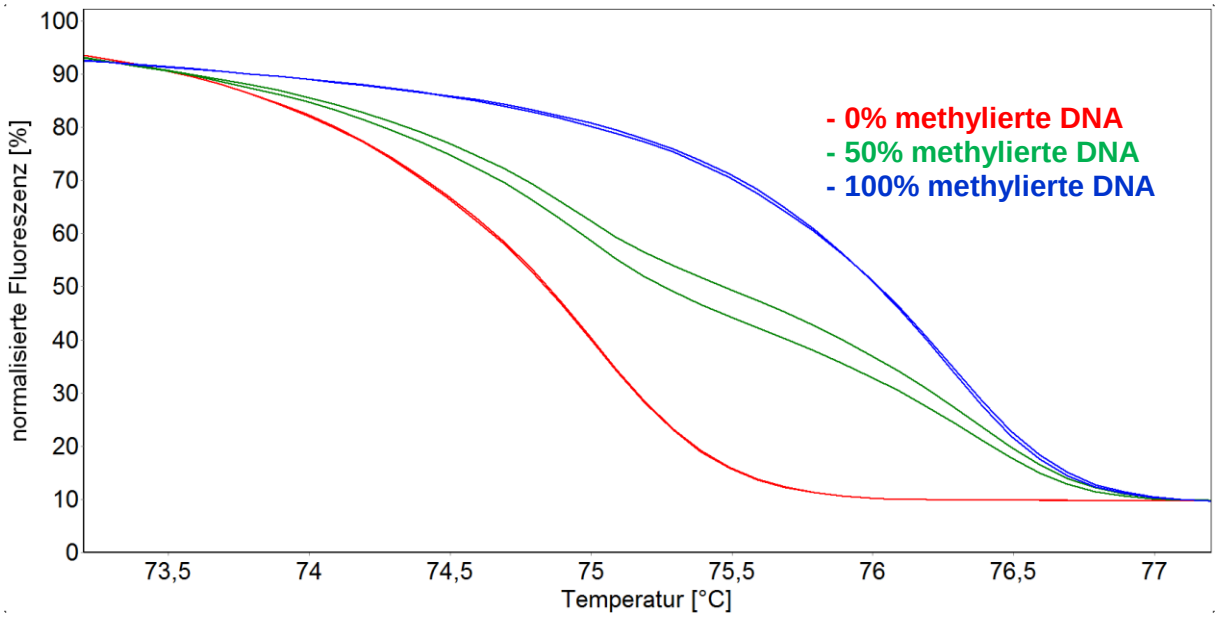


Abbildung 34: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR3*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau

Leider kam es während der Optimierung der Methode zu einer Kontamination mit der Zielsequenz, weshalb keine weiteren Versuche durchgeführt wurden. Aus diesem Grund konnten der LOD und der LOQ nicht bestimmt werden.

4.1.4 Glutamatrezeptor 4 (*GluR4*)

Die Promotorregion des Gens (AY158020.1) wurde der *Transcriptional Regulatory Element Database* (*TRED*) [55] entnommen, die Sequenz in die PyroMark Assay Design Software eingefügt und für das Gen zwei Primer-Sets designt. In Abbildung 35 ist ein Auszug der Sequenz, welche in das Programm geladen wurde, dargestellt. Die zu amplifizierenden *Regions of Interest* für die beiden Primer-Sets sind fett und unterstrichen markiert, die enthaltenen CpGs sind grün hinterlegt.

CCT**CG**TG**CGCG**CT**CGCGCGCGCG**AGGG**CGCG**CAACCCAATGACAGAAG**CG**GGCAAGGCTGG
TCTAGGCTGAGTGGAAAGAGCTAGGAGCCGGGAGGCAGCCTGTCCTCCCTCAAGCCTGCAAGG
ATGCGGCAGGGGACTGAGACCATGGGGAGGTGCTAACTTCCTCTTCAACCCCCCAGCCCGGGA
TCCGGGCTGGCATACCCGGCCCCCCGGGCTAGTTTCCTGCCAAGCGCAACCAAGAAGCCAAAG
GCGATTTGGAGGGCATAAAAAGAAAAAGAGTGGTTCTGGAGAGGGGTGCCCACCTCCAGAGCCG
GTCCCTCTGCAAACAGGCAAAGATAGGAGAAAGGGGATCAGATACTGGAGTGTACGCAAAATCC
TCTGTCTGTGGACTCGCACCAGAGCCTCCCAGAAAACCTGGGCGATCTGGTGAGTACCCGCTTG
GGGAAAGAGGGGGTGGGGTGGGGGGCTGGCGAGGACCAAGGAGCAAAGGACAAGGGG**CG**AG
AGGCGAGGGGCCGGTAGTGGGAGTGCGCGCTCTGGTACCGAGGCTTGGGAGGCGCTCAGGAT
AGTGTAGCTGGGTCGCCGATCGGCTGCCAGCTGCGGAGCGCGTGT

Abbildung 35: Auszug der Sequenz der Promotorregion von *GluR4*; *Regions of Interest* sind fett und unterstrichen markiert

Genaue Angaben zu den beiden Primer-Sets sind im Folgenden angeführt:

Primer-Set 1:

In Tabelle 19 und Tabelle 20 sind die Eigenschaften des Primer-Sets und des Amplikons zusammengefasst.

Tabelle 19: Eigenschaften des Primer-Sets 1 für *GluR4*

	Forward-Primer	**Reverse-Primer**	**Sequenzier-Primer**
Sequenz (5'→3')	GGATTAAGGAGTA AAGGATAAGGG	[Biotin]CTCCCCTACTCAC ATCCAC	TAAGGAGTAA AGGATAAGG
Sekundärstruktur			
T_m [°C]	62,0	59,5	50,9

Tabelle 20: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 1 für *GluR4*

Amplikon-Länge [bp]	170
Anzahl der CpGs	14
T_m [°C] des aus dem unmethylierten Templat resultierenden Amplikons	87
T_m [°C] des aus dem methylierten Templat resultierenden Amplikons	91,5

Die optimierten Einstellungen der PCR-Methode sind in Tabelle 21 angegeben.

Tabelle 21: Optimierte PCR-Bedingungen

Testparameter	Einstellung
Annealing-Temperatur [°C]	58
Primer-Konzentration [nM]	250
$MgCl_2$ Konzentration [mM]	0

Unter den optimierten Bedinnungen wurden die in Abbildung 36 gezeigten Amplifikations-Kurven erhalten.

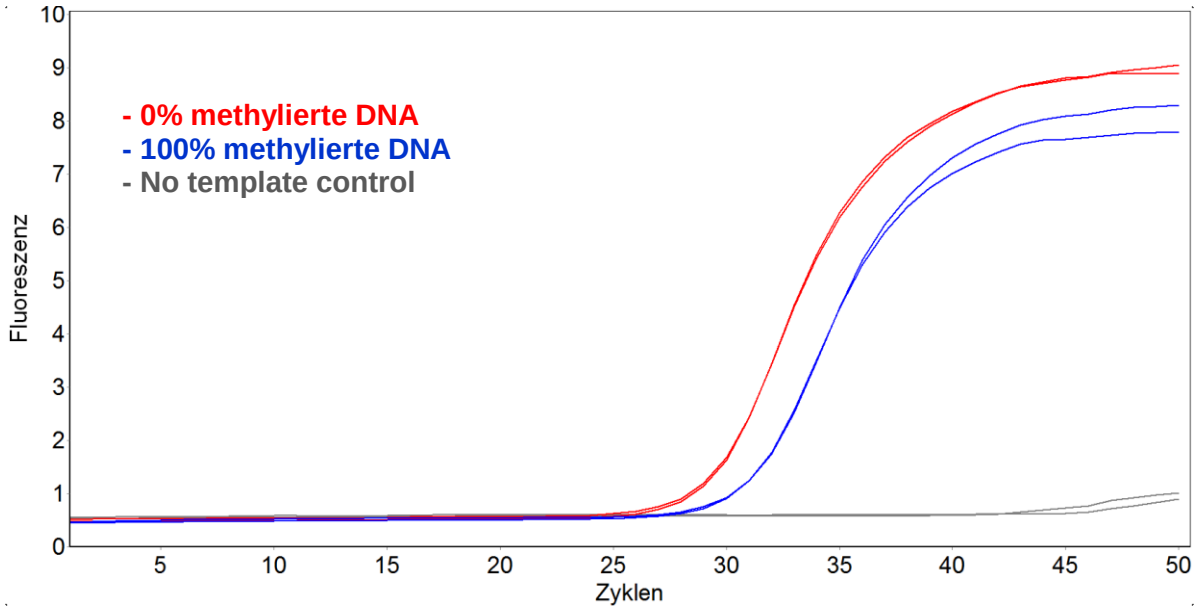


Abbildung 36: Amplifikationskurve für *GluR4*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Die erste negative Ableitung der Schmelzprofile der Standard-DNA und der Negativkontrollen sind in Abbildung 37 dargestellt.

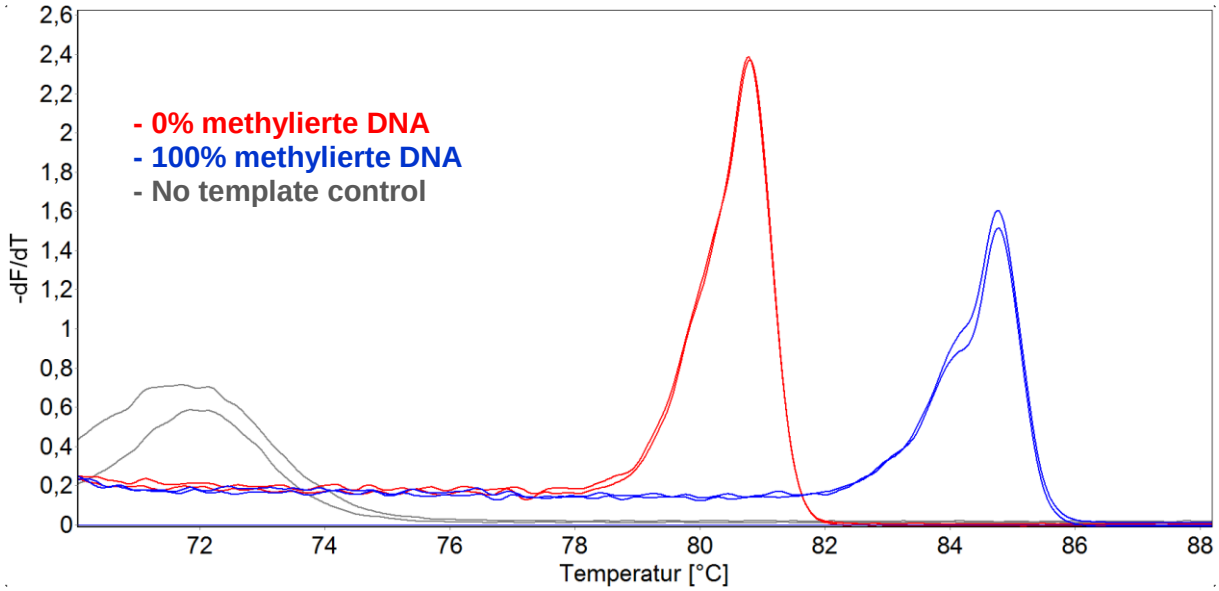


Abbildung 37: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR4*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Abbildung 38 zeigt die normalisierten HRM-Kurven. Diese PCR-Methode weist einen leichten Bias in Richtung des unmethylierten Standards auf.

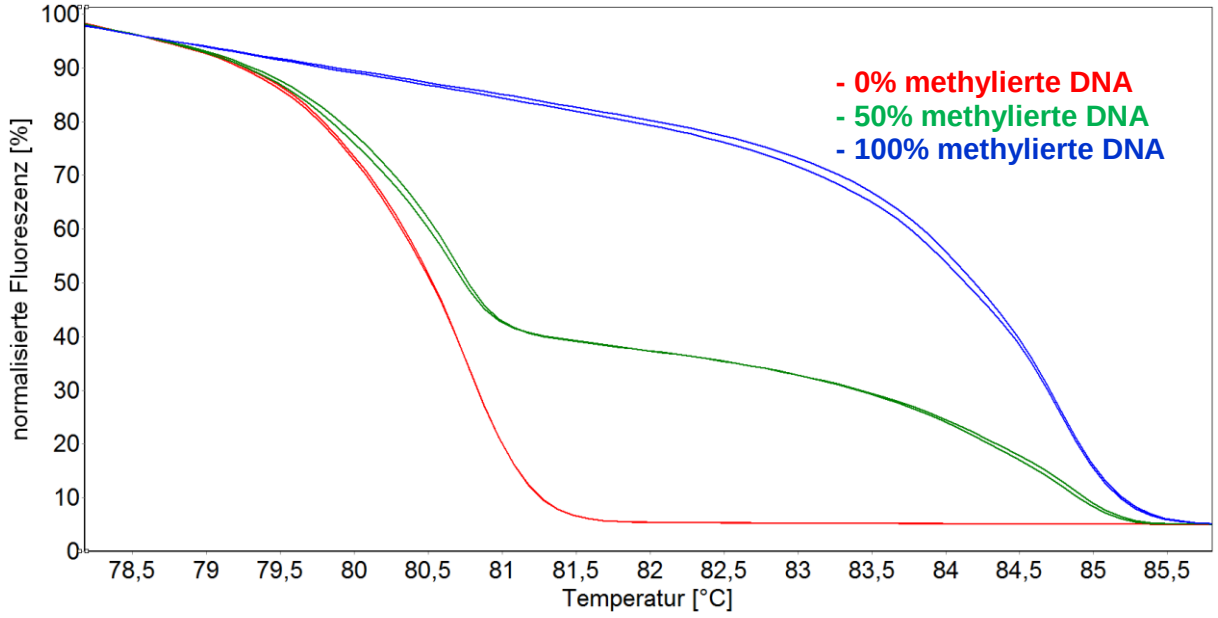


Abbildung 38: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR4*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau

Der LOD dieser Methode wurde auf 2%, der LOQ auf 5% geschätzt.

Primer-Set 2:

In Tabelle 22 und Tabelle 23 sind die Eigenschaften des Primer-Sets und des Amplikons zusammengefasst. Da sich in der zu amplifizierenden Sequenz ein 28 Basen langer Bereich befindet, der 10 CGs enthält, weist das Amplikon des methylierten Standards zwei Schmelzdomänen auf.

Tabelle 22: Eigenschaften des Primer-Sets 2 für *GluR4*

	Forward-Primer	**Reverse-Primer**	**Sequenzier-Primer**
Sequenz (5'→3')	TTTGTAGGTTTGAGGGAGGATAG	[Biotin]AAACTTTACAAATTCCCTAACTATTTAC	TTGAGGGAGGATAGG
Sekundärstruktur			
T_m [°C]	60,9	59,9	46,0

Tabelle 23: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 2 für *GluR4*

Amplikon-Länge [bp]	202
Anzahl der CpGs	12
T_m [°C] des aus dem unmethylierten Templat resultierenden Amplikons	80,5
T_m [°C] des aus dem methylierten Templat resultierenden Amplikons	Zwei Schmelzdomänen wegen eines CG reichen Abschnitts: 81,5 und 91,5

Die optimierten Einstellungen der PCR-Methode sind in Tabelle 24 angegeben.

Tabelle 24: Optimierte PCR-Bedingungen

Testparameter	**Einstellung**
Annealing-Temperatur [°C]	55
Primer-Konzentration [nM]	500
$MgCl_2$ Konzentration [mM]	2

Stellvertretende Amplifikationskurven, welche für Standard-DNA und eine Negativkontrolle unter optimierten Bedingungen erhalten wurden, sind in Abbildung 39 zu sehen.

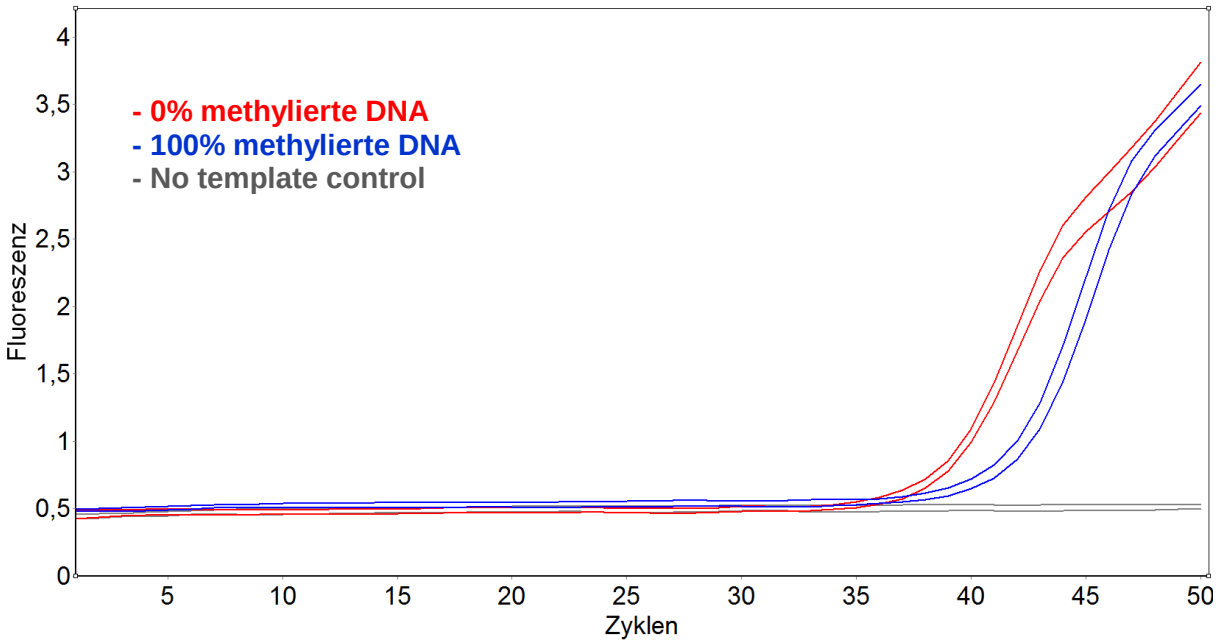


Abbildung 39: Amplifikationskurven für *GluR4*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Die erste negative Ableitung des Schmelzprofils der Standard-DNA und der Negativkontrollen sind in Abbildung 40 dargestellt. Anhand dieser Darstellung kann das inhomogene Schmelzverhalten des methylierten Standards besonders gut erkannt werden.

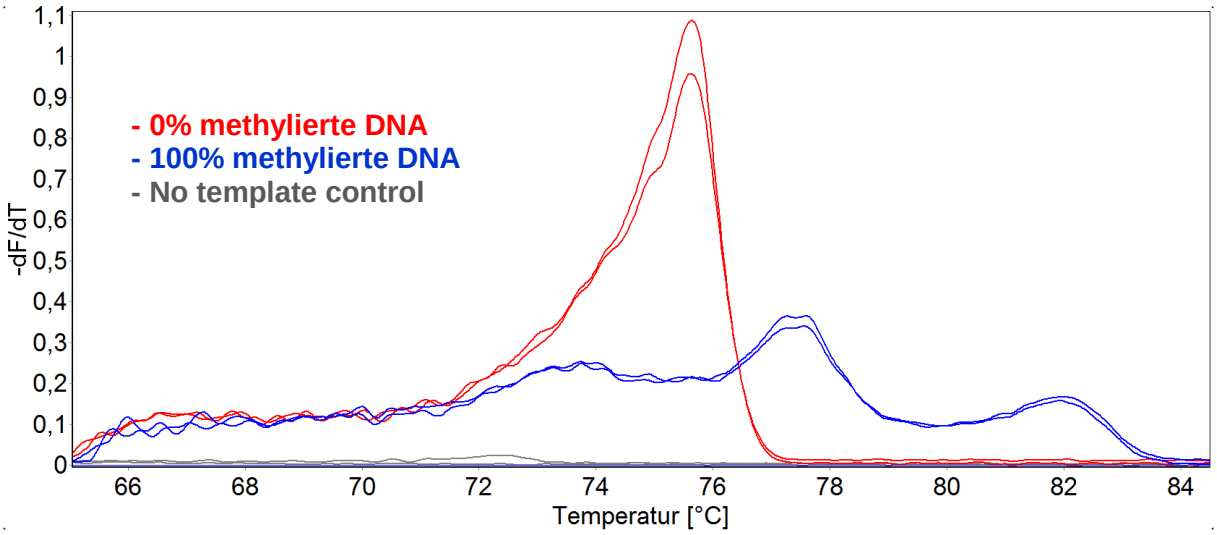


Abbildung 40: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR4*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau

Abbildung 41 zeigt die normalisierten HRM-Kurven. Auch diese PCR-Methode weist keinen Bias auf.

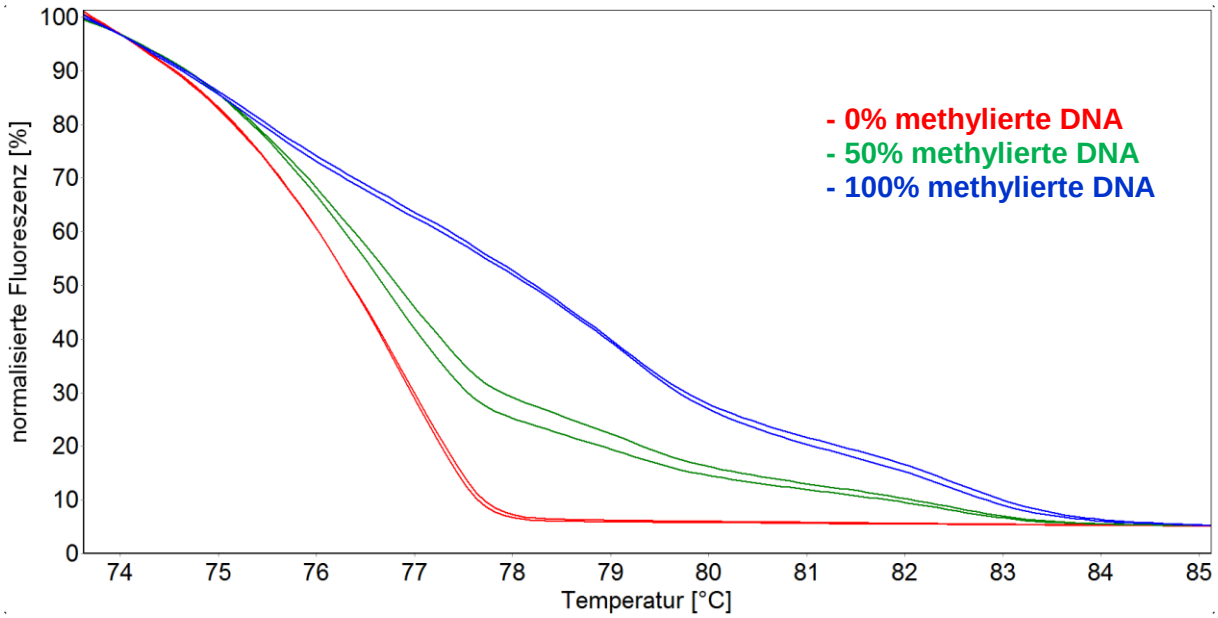


Abbildung 41: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR4*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau

Der LOD dieser Methode wurde auf 9%, der LOQ auf 25% geschätzt.

4.2 Bestimmung des DNA-Methylierungsstatus von *GluR1* - *GluR4* in Rattenhippocampi

Um den Einfluss des räumlichen Lernens auf den Methylierungsgrad in der Promotorregion der vier Gene bestimmen zu können, wurden von Ajinkya Sase, einem Mitarbeiter unseres Kooperationspartners Univ.-Prof. Dr. Gert Lubec, je zehn im Morris Wasserlabyrinth trainierten Ratten und weiteren zehn untrainierten Kontrollratten die Hippocampi entnommen und uns zur Verfügung gestellt. Eine genaue Beschreibung der Durchführung dieser Versuche ist unter 5.1 angegeben. Die Lernerfolge, welche bei diesen Trainings erzielt werden konnten, sind unter 4.2.1 nachzulesen.

Aus den erhaltenen Hippocampi konnten 1,08 bis 2,20 µg DNA extrahiert werden. Anschließend wurde diese bisulfit-konvertiert (siehe Kapitel 5.4).

Danach konnte der DNA-Methylierungsstatus in den bisulfit-konvertierten Proben mittels MS-HRM und PSQ bestimmt werden.

Für die Auswertung der MS-HRM Daten wurde für jede Methode eine Kalibrierfunktion, wie unter 3.3.2 beschrieben, erstellt. An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass die designten Primer-Sets nicht für MS-HRM Messungen optimiert wurden, sondern die MS-HRM Messung den Zweck eines ersten Screenings der Proben erfüllen sollte. Daher weisen diese Analysemethoden einen relativ hohen LOD bzw. LOQ auf. Ergebnisse, welche unter diesen Werten liegen, werden mit „<LOD“ bzw. „<LOQ“ angegeben und in der Auswertung wie unter 5.8.3 beschrieben, behandelt.

Die Ergebnisse, welche mittels PSQ erhalten wurden, sind in einem Scatter Plot, welcher mit dem Programm *SigmaPlot 11.0* erstellt wurde, zusammengefasst. Für jeden Hippocampus (aus trainierten und untrainierten Ratten) wurde der Methylierungsgrad der einzelnen CpGs der untersuchten Region dargestellt. Zusätzlich wurden die PSQ-Daten den Ergebnissen der MS-HRM Messungen in tabellarischer Form gegenübergestellt, sofern diese Messungen durchgeführt wurden.

Unter 4.2.6 werden die mittleren Methylierungsgrade der einzelnen Gene bzw. Genabschnitte von trainierten und untrainierten Ratten miteinander verglichen.

4.2.1 Lernerfolge im Morris Wasserlabyrinth

Durch das wiederholte Trainieren derselben Aufgabe konnten die Ratten diese jeden Tag innerhalb eines kürzeren Zeitraumes erfüllen. Abbildung 42 zeigt den mittleren Verlauf dieses Lernprozesses.

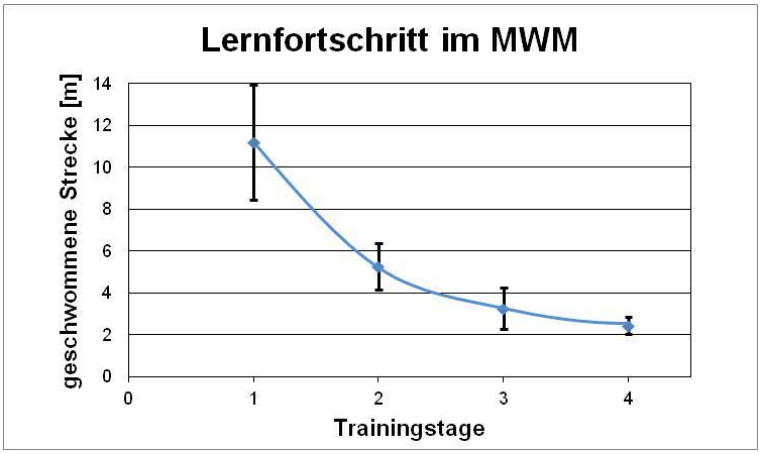


Abbildung 42: Mittlerer Verlauf des Lernprozesses der trainierten Ratten im Morris Wasserlabyrinth

Am fünften Tag, an dem keine Plattform im Becken war, wurden die Zeiten, welche die Ratten in den einzelnen Quadranten verbrachten, gemessen. In Abbildung 43 sind die relativen mittleren Zeiten, welche die trainierten Ratten im Zielquadranten verbrachten, denen der untrainierten Ratten gegenübergestellt.

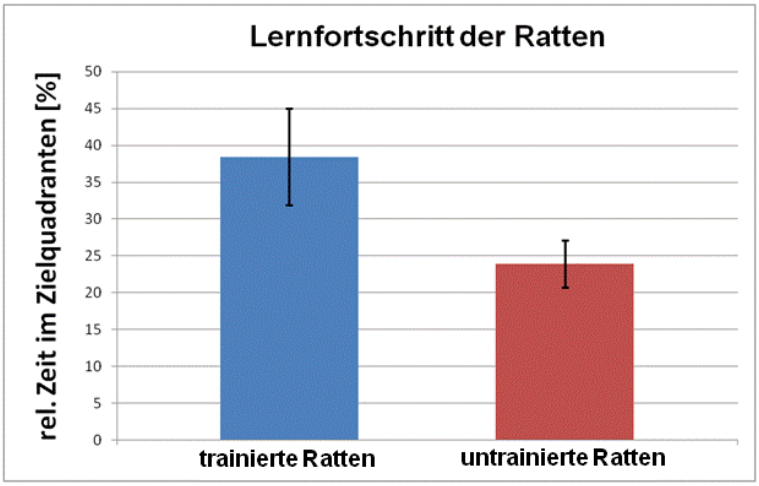


Abbildung 43: Relative mittlere Zeiten der trainierten Ratten (blau) und der untrainierten Ratten (rot)

4.2.2 Glutamatrezeptor 1 (*GluR1*)

Primer-Set 1:

In Abbildung 44 ist die Kalibrierfunktion für die HRM-Auswertung dargestellt. Die für die Kalibrierung benötigte Standardreihe wurde, wie unter 5.6.1 beschrieben, durch Mischen der 0% methylierten und 100% methylierten Standards, hergestellt. Für die Kalibrierung wurde jeder Standard doppelt gemessen und der Mittelwert der standardisierten Fluoreszenz gegen den Methylierungsgrad des Standards aufgetragen. Durch Einsetzen der standardisierten Fluoreszenz der Probe in die Kalibrierfunktion wurde der Methylierungsgrad der Probe bestimmt (siehe 5.8.1).

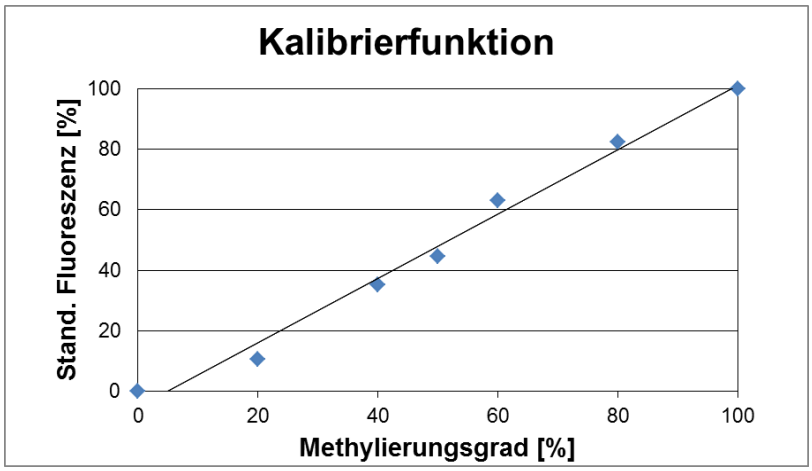


Abbildung 44: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR1* Primer-Set 1

In Tabelle 25 und Tabelle 26 sind die Ergebnisse der HRM-Messung für *GluR1* Primer-Set 1 zusammengefasst. Alle Messwerte, welche unter LOQ bzw. unter LOD liegen, wurden auf LOD/2 bzw. LOQ/2 gesetzt und, wie unter 5.8.3 beschrieben, weiter ausgewertet.

Tabelle 25: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

trainierte Ratte	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	**Messung 2**
1	<LOQ	13
2	<LOQ	<LOQ
3	n.a. *	n.a. *
4	n.a. *	n.a. *
5	16	13
6	14	14
7	16	17
8	-**	<LOQ
9	<LOQ	<LOQ
10	<LOD	<LOD
Mittelwert	**zwischen LOD (= 7) und LOQ (= 13)**	

* nicht analysiert
** atypische Form der Amplifikationskurve

Tabelle 26: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

untrainierte Ratte	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	**Messung 2**
1	20	14
2	16	18
3	16	13
4	16	14
5	17	17
6	<LOD	<LOD
7	<LOQ	<LOQ
8	<LOD	<LOQ
9	<LOQ	<LOD
10	<LOQ	<LOQ
Mittelwert	**zwischen LOD (= 7) und LOQ (= 13)**	

Ein stellvertretendes Pyrogramm (Hippocampus der untrainierten Ratte 2) ist in Abbildung 45 dargestellt.

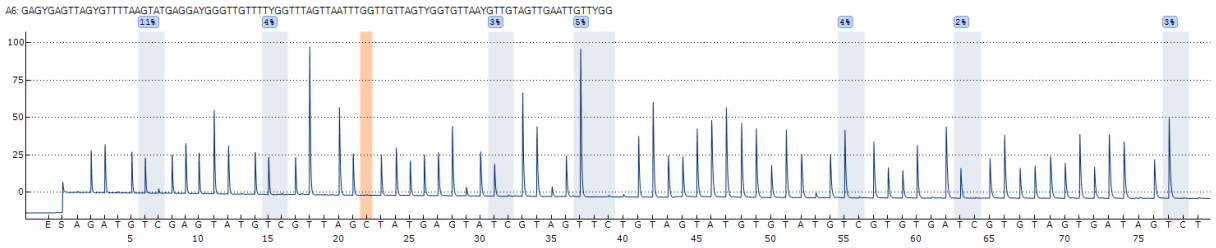


Abbildung 45: Repräsentatives Pyrogramm für *GluR1* Primer Set 1 (Hippocampus der untrainierten Ratte 2)

Abbildung 46 fasst das PSQ-Ergebnis der einzelnen CpGs für trainierte und untrainierte Ratten in einem Scatter Plot zusammen.

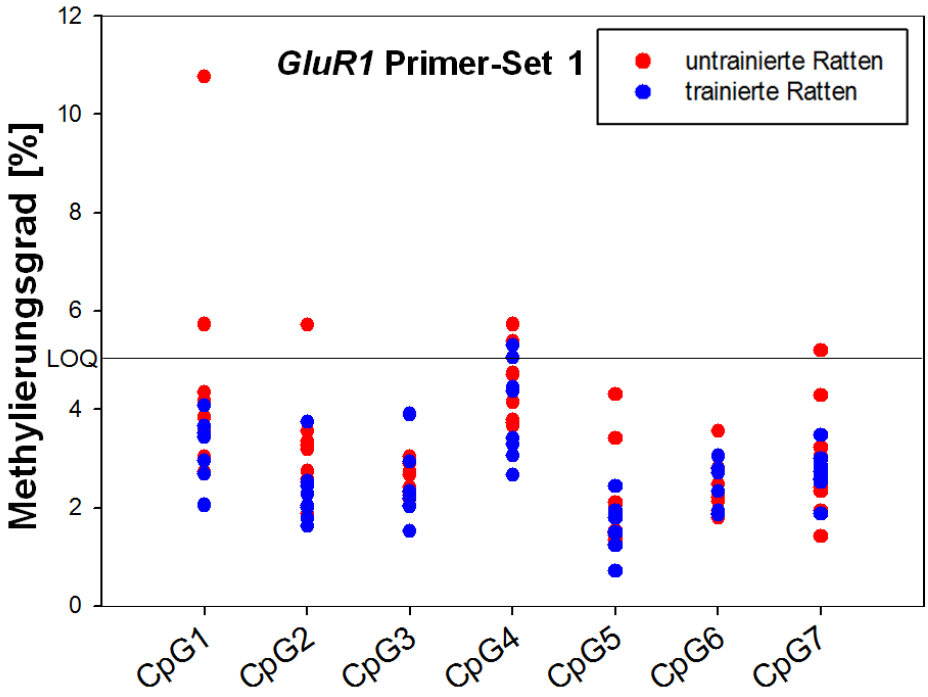


Abbildung 46: PSQ-Ergebnis des *GluR1* Promotors in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

Wie aus Abbildung 46 hervorgeht, weisen die untersuchten CpGs in den meisten Hippocampi, sowohl in denen von trainierten als auch denen von untrainierten Ratten, einen Methylierungsgrad auf, der unter dem LOQ von PSQ-Methoden liegt. Laut Gerätehersteller liegt dieser bei 5%. Um die PSQ-Ergebnisse mit den HRM-Ergebnissen vergleichen zu können, werden die Mittelwerte der Ergebnisse die mit den Methoden erhalten wurden, in Tabelle 27 und Tabelle 28 gegenübergestellt.

Tabelle 27: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

trainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	HRM	**PSQ**
1	<LOQ	<LOQ
2	<LOQ	<LOQ
3	n.a.*	n.a.*
4	n.a.*	<LOQ
5	15	<LOQ
6	14	<LOQ
7	16	<LOQ
8	<LOQ	<LOQ
9	<LOQ	<LOQ
10	<LOD	<LOQ
Mittelwert	**zwischen LOD (= 7) und LOQ (= 13)**	**<LOQ (= 5)**

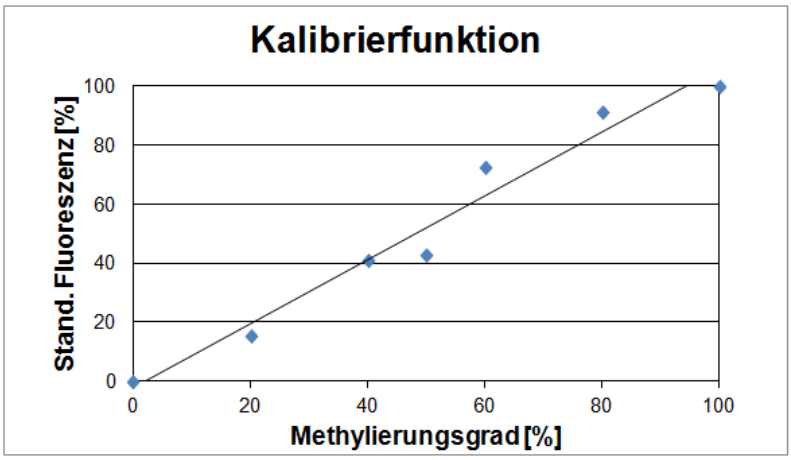
* nicht analysiert

Tabelle 28: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

untrainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	HRM	**PSQ**
1	17	<LOQ
2	17	<LOQ
3	15	<LOQ
4	15	<LOQ
5	17	<LOQ
6	<LOD	<LOQ
7	<LOQ	<LOQ
8	<LOQ	<LOQ
9	<LOD	<LOQ
10	<LOQ	<LOQ
Mittelwert	**zwischen LOD (= 7) und LOQ (= 13)**	**<LOQ (= 5)**

Primer-Set 2:

In Abbildung 47 ist die Kalibrierfunktion für die HRM-Auswertung dargestellt. Die für die Kalibrierung benötigte Standardreihe wurde, wie unter 5.6.1 beschrieben, durch Mischen der 0% methylierten und 100% methylierten Standards hergestellt. Für die Kalibrierung wurde jeder Standard doppelt gemessen und der Mittelwert der standardisierten Fluoreszenz gegen den Methylierungsgrad des Standards aufgetragen. Durch Einsetzen der standardisierten Fluoreszenz der Probe in die Kalibrierfunktion wurde der Methylierungsgrad der Probe bestimmt (siehe 5.8.1).



$R^2 = 0{,}966$

f = k*x+d

k = 1,085

d = -2,363

Abbildung 47: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR1* Primer-Set 2

In Tabelle 29 und Tabelle 30 sind die Ergebnisse der HRM-Messung für *GluR1* Primer-Set 2 zusammengefasst. Alle Messwerte, welche unter LOQ bzw. unter LOD liegen, wurden auf LOD/2 bzw. LOQ/2 gesetzt und wie unter 5.8.3 beschrieben weiter ausgewertet.

Tabelle 29: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2

trainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	Messung 2
1	<LOD	<LOD
2	<LOD	<LOD
3	n.a.*	<LOD
4	<LOD	<LOD
5	<LOD	<LOD
6	<LOD	<LOD
7	<LOD	<LOD
8	<LOD	<LOD
9	<LOD	<LOD
10	<LOD	<LOQ
Mittelwert	**<LOD (= 10)**	

* nicht analysiert

Tabelle 30: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2

untrainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	Messung 2
1	<LOD	<LOD
2	- **	<LOD
3	<LOD	<LOD
4	<LOD	<LOD
5	<LOD	<LOD
6	<LOD	<LOQ
7	<LOD	<LOD
8	<LOD	<LOD
9	<LOD	<LOD
10	<LOD	<LOD
Mittelwert	**<LOD (= 10)**	

** atypische Form der Amplifikationskurve

Aufgrund einer Kontamination mit der Zielsequenz kam es auch bei der *No Template Control* zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals und in der Folge bei der PSQ der Proben zu stark

streuenden Ergebnissen. Diese Ergebnisse wurden nicht zur Ermittlung des Methylierungsgrads herangezogen.

4.2.3 Glutamatrezeptor 2 (*GluR2*)

Primer-Set 1:

In Abbildung 48 ist die Kalibrierfunktion für die HRM-Auswertung dargestellt. Die für die Kalibrierung benötigte Standardreihe wurde, wie unter 5.6.1 beschrieben, durch Mischen der 0% methylierten und 100% methylierten Standards hergestellt. Für die Kalibrierung wurde jeder Standard doppelt gemessen und der Mittelwert der standardisierten Fluoreszenz gegen den Methylierungsgrad des Standards aufgetragen. Durch Einsetzen der standardisierten Fluoreszenz der Probe in die Kalibrierfunktion wurde der Methylierungsgrad der Probe bestimmt (siehe 5.8.1).

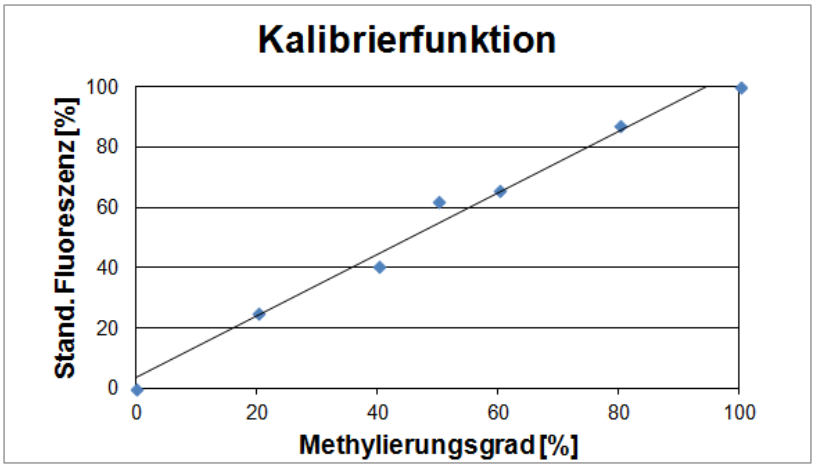


Abbildung 48: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR2* Primer-Set 1

In Tabelle 31 und Tabelle 32 sind die Ergebnisse der HRM-Messung für *GluR2* Primer-Set 1 zusammengefasst. Alle Messwerte, welche unter LOQ bzw. unter LOD liegen, wurden auf LOD/2 bzw. LOQ/2 gesetzt und, wie unter 5.8.3 beschrieben, weiter ausgewertet.

Tabelle 31: Methylierungsgrad des *GluR2* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

trainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	Messung 2
1	<LOQ	<LOQ
2	<LOD	<LOD
3	- **	- **
4	<LOD	<LOD
5	<LOD	<LOD
6	<LOD	<LOD
7	<LOD	<LOD
8	<LOD	<LOD
9	<LOD	<LOD
10	<LOD	<LOD
Mittelwert	**<LOD (= 4)**	

** atypische Form der Amplifikationskurve

Tabelle 32: Methylierungsgrad des *GluR2* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

untrainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	Messung 2
1	<LOQ	<LOQ
2	<LOQ	<LOQ
3	<LOD	<LOD
4	<LOD	<LOD
5	<LOD	<LOD
6	<LOD	- **
7	<LOD	- **
8	<LOD	<LOD
9	<LOD	<LOD
10	<LOD	<LOD
Mittelwert	**<LOD (= 4)**	

** atypische Form der Amplifikationskurve

Ein stellvertretendes Pyrogramm (Hippocampus der untrainierten Ratte 6) ist in Abbildung 49 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Methylierungsgrad des CpG an Position 4 nicht

bestimmt werden konnte (rot markiert), da die Sequenz des Amplikons nach dem zu bestimmenden CpG neun gleiche Basen aufweist. Aufgrund der Länge des zu sequenzierenden Amplikons konnte auch der Methylierungsgrad des CpGs an Position 12 nicht ermittelt werden.

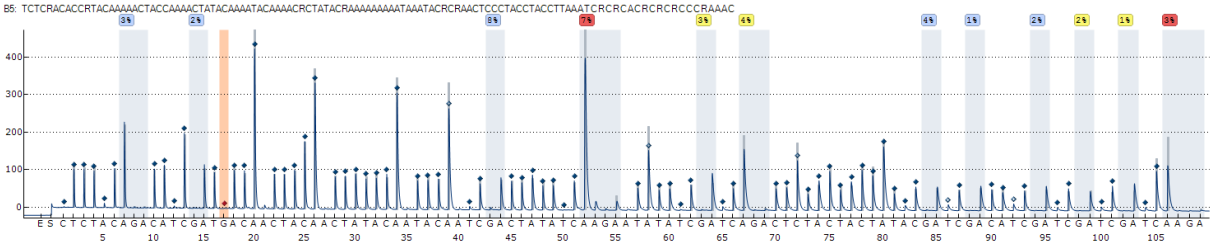


Abbildung 49: Repräsentatives Pyrogramm für *GluR2* Primer Set 1 (Hippocampus der untrainierten Ratte 6)

Abbildung 50 fasst das PSQ-Ergebnis der einzelnen CpGs für trainierte und untrainierte Ratten in einem Scatter Plot zusammen.

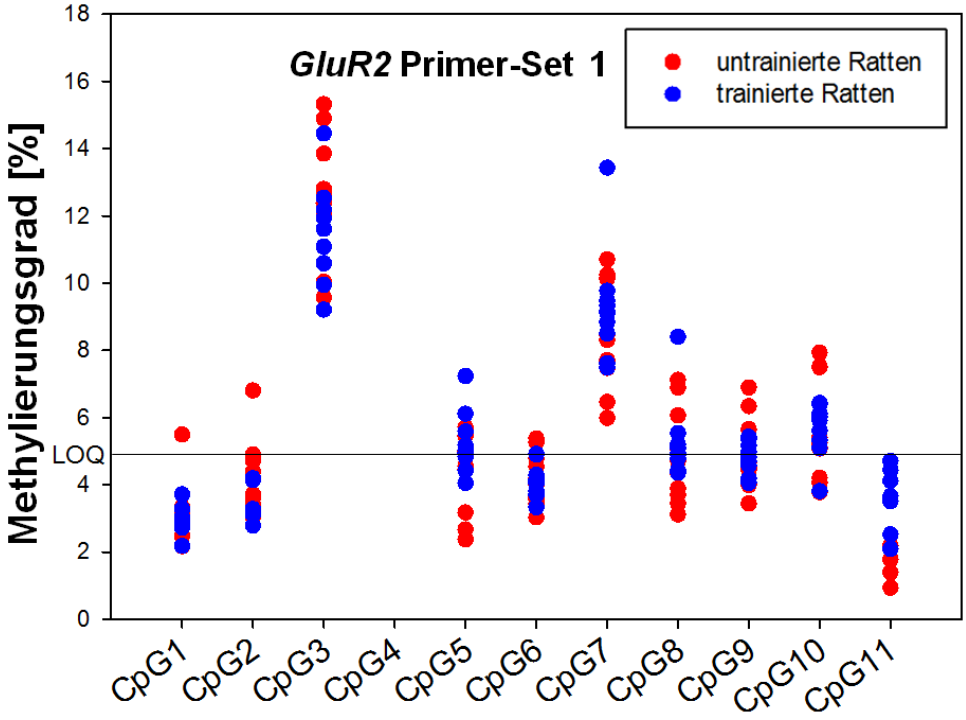


Abbildung 50: PSQ-Ergebnis des *GluR2* Promotors in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1: Der Methylierungsgrad von CpG4 und CpG12 konnte nicht bestimmt werden.

In Abbildung 50 ist zu erkennen, dass diese Proben eine heterogene Verteilung des Methylierungsgrads über die einzelnen CpGs aufweisen. So ist z.B. das CpG an Positon 3 deutlich stärker methyliert als die CpGs an Position 1 und 11. Auch für dieses Primer-Set wurden alle Messwerte, welche unter dem LOQ liegen, auf LOQ/2 = 2,5 gesetzt und, wie unter 5.8.3 beschrieben, weiter ausgewertet. Die Mittelwerte der MS-HRM und PSQ-Ergebnisse werden in Tabelle 33 und Tabelle 34 gegenübergestellt.

Tabelle 33: Methylierungsgrad des *GluR2* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

trainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	HRM	**PSQ**
1	<LOQ	5
2	<LOD	<LOQ
3	n.a.*	5
4	<LOD	<LOQ
5	<LOD	<LOQ
6	<LOD	<LOQ
7	<LOD	<LOQ
8	<LOD	6
9	<LOD	<LOQ
10	<LOD	5
Mittelwert	**<LOD (= 4)**	**<LOQ (= 5)**

* nicht analysiert

Tabelle 34: Methylierungsgrad des *GluR2* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

untrainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	HRM	**PSQ**
1	<LOQ	7
2	<LOQ	6
3	<LOD	<LOQ
4	<LOD	5
5	<LOD	<LOQ
6	<LOD	7
7	<LOD	<LOQ
8	<LOD	<LOQ
9	<LOD	5
10	<LOD	5
Mittelwert	**<LOD (= 4)**	**<LOQ (= 5)**

Primer-Set 2:

Wie schon unter 4.1.2 beschrieben, konnte der Methylierungsgrad in dieser Zielregion in den Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten nicht bestimmt werden, weil es bei der Amplifikation mit diesem Primer-Set zu einer Kontamination mit der Zielsequenz kam.

4.2.4 Glutamatrezeptor 3 (*GluR3*)

Primer-Set 1:

In Abbildung 51 ist die Kalibrierfunktion für die HRM-Auswertung dargestellt. Da diese PCR-Methode einen Bias in Richtung des methylierten Standards aufweist, wurde sie an eine hyperbolische Funktion angepasst. Die für die Kalibrierung benötigte Standardreihe wurde, wie unter 5.6.1 beschrieben, durch Mischen der 0% methylierten und 100% methylierten Standards, hergestellt. Für die Kalibrierung wurde jeder Standard doppelt gemessen und der Mittelwert der standardisierten Fluoreszenz gegen den Methylierungsgrad des Standards aufgetragen. Durch Einsetzen der standardisierten Fluoreszenz der Probe in die Kalibrierfunktion wurde der Methylierungsgrad der Probe bestimmt (siehe 5.8.1).

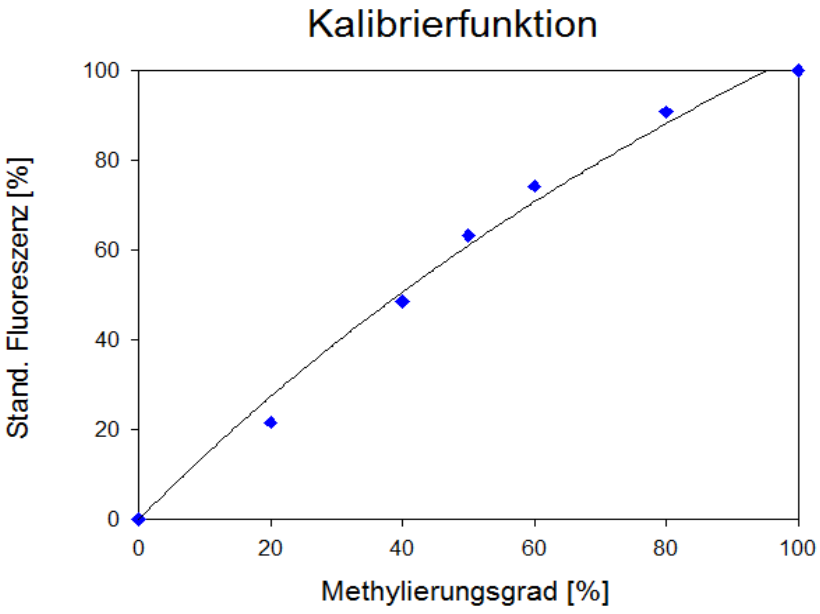


Abbildung 51: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR3* Primer-Set 1

InTabelle 35 und Tabelle 36 sind die Ergebnisse der HRM-Messung für *GluR3* Primer-Set 1 zusammengefasst. Alle Messwerte, welche unter LOQ bzw. unter LOD liegen, wurden auf LOD/2 bzw. LOQ/2 gesetzt und, wie unter 5.8.3 beschrieben, weiter ausgewertet.

Tabelle 35: Methylierungsgrad des *GluR3* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

trainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	Messung 2
1	<LOD	<LOD
2	<LOD	<LOD
3	n.a.*	n.a.*
4	<LOD	<LOD
5	<LOD	<LOD
6	<LOD	<LOD
7	<LOD	<LOD
8	<LOD	<LOD
9	<LOQ	<LOD
10	<LOD	<LOD
Mittelwert	**<LOD (= 5)**	

* nicht analysiert

Tabelle 36: Methylierungsgrad des *GluR3* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

untrainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	Messung 2
1	<LOQ	<LOQ
2	<LOD	<LOD
3	<LOD	<LOD
4	<LOD	<LOD
5	<LOQ	<LOD
6	<LOD	<LOD
7	<LOQ	<LOQ
8	<LOD	<LOD
9	<LOD	<LOD
10	<LOD	<LOD
Mittelwert	**<LOD (= 5)**	

Ein stellvertretendes Pyrogramm (Hippocampus der untrainierten Ratte 3) ist in Abbildung 52 dargestellt.

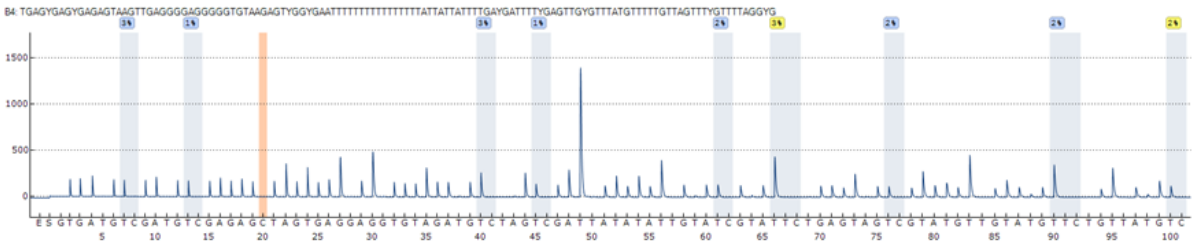


Abbildung 52: Repräsentatives Pyrogramm für *GluR3* Primer Set 1 (Hippocampus der untrainierten Ratte 3)

Abbildung 53 fasst das PSQ-Ergebnis der einzelnen CpGs für trainierte und untrainierte Ratten in einem Scatter Plot zusammen.

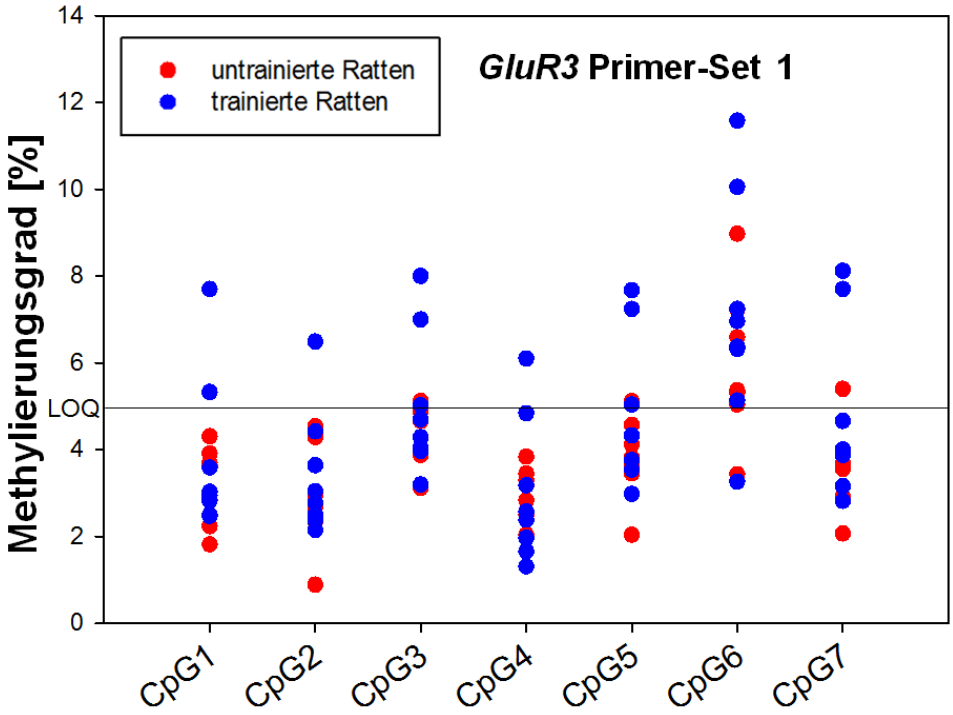


Abbildung 53: PSQ-Ergebnis des *GluR3* Promotors in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

Trotz des Bias der Methode, welcher eine verstärkte Amplifikation der methylierten DNA vermuten ließe, liegt auch hier, mit Ausnahme von CpG 6, ein Großteil der erhaltenen Werte unter der Bestimmungsgrenze. Daher wurden auch für dieses Primer-Set alle Messwerte, welche unter dem LOQ liegen, auf LOQ/2 = 2,5 gesetzt und, wie unter 5.8.3 beschrieben, weiter ausgewertet. Die Mittelwerte der MS-HRM und PSQ-Ergebnisse werden in Tabelle 37 und Tabelle 38 gegenübergestellt.

Tabelle 37: Methylierungsgrad des *GluR3* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

trainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	HRM	**PSQ**
1	<LOD	7
2	<LOD	<LOQ
3	n.a.*	n.a.*
4	<LOD	7
5	<LOD	<LOQ
6	<LOD	<LOQ
7	<LOD	<LOQ
8	<LOD	<LOQ
9	<LOD	<LOQ
10	<LOD	<LOQ
Mittelwert	**<LOD (= 5)**	**<LOQ (= 5)**

* nicht analysiert

Tabelle 38: Methylierungsgrad des *GluR3* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

untrainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	HRM	**PSQ**
1	<LOQ	<LOQ
2	<LOD	<LOQ
3	<LOD	<LOQ
4	<LOD	<LOQ
5	<LOD	<LOQ
6	<LOD	<LOQ
7	<LOQ	<LOQ
8	<LOD	<LOQ
9	<LOD	5
10	<LOD	<LOQ
Mittelwert	**<LOD (= 5)**	**<LOQ (= 5)**

Primer-Set 2:

Da es während der Entwicklung der Methoden zu einer Kontamination mit der Zielsequenz kam, konnte der Methylierungsgrad in den Hippocampi der Ratten nicht ermittelt werden.

4.2.5 Glutamatrezeptor 4 (*GluR4*)

Primer-Set 1:

In Abbildung 54 ist die Kalibrierfunktion für die HRM-Auswertung dargestellt. Die für die Kalibrierung benötigte Standardreihe wurde wie unter 5.6.1 beschrieben, durch Mischen der 0% methylierten und 100% methylierten Standards, hergestellt. Für die Kalibrierung wurde jeder Standard doppelt gemessen und der Mittelwert der standardisierten Fluoreszenz gegen den Methylierungsgrad des Standards aufgetragen. Durch Einsetzen der standardisierten Fluoreszenz der Probe in die Kalibrierfunktion wurde der Methylierungsgrad der Probe bestimmt (siehe 5.8.1).

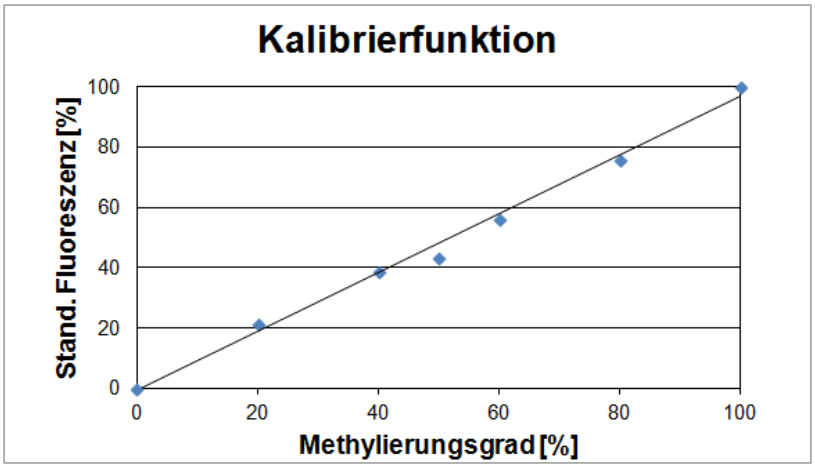


Abbildung 54: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR4* Primer-Set 1

In Tabelle 39 und Tabelle 40 sind die Ergebnisse der HRM-Messung für *GluR4* Primer-Set 1 zusammengefasst. Alle Messwerte, welche unter LOQ bzw. unter LOD liegen, wurden auf LOD/2 bzw. LOQ/2 gesetzt und, wie unter 5.8.3 beschrieben, weiter ausgewertet.

Tabelle 39: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

trainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	Messung 2
1	<LOQ	<LOQ
2	<LOD	<LOD
3	n.a.*	n.a.*
4	<LOQ	<LOQ
5	<LOQ	<LOQ
6	<LOQ	<LOQ
7	<LOQ	<LOQ
8	<LOQ	<LOQ
9	<LOQ	<LOQ
10	<LOQ	<LOQ
Mittelwert	**zwischen LOD (= 7) und LOQ (= 13)**	

* nicht analysiert

Tabelle 40: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

untrainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	Messung 2
1	<LOQ	<LOQ
2	<LOQ	<LOQ
3	<LOD	<LOD
4	<LOD	<LOQ
5	<LOQ	<LOQ
6	<LOQ	<LOQ
7	<LOQ	<LOQ
8	<LOQ	<LOQ
9	<LOD	<LOD
10	<LOQ	<LOQ
Mittelwert	**zwischen LOD (= 7) und LOQ (= 13)**	

Ein stellvertretendes Pyrogramm (Hippocampus der trainierten Ratte 5) ist in Abbildung 55 dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass aufgrund der Länge des Amplikons nur der Methylierungsgrad der ersten sieben CpGs bestimmt werden konnte.

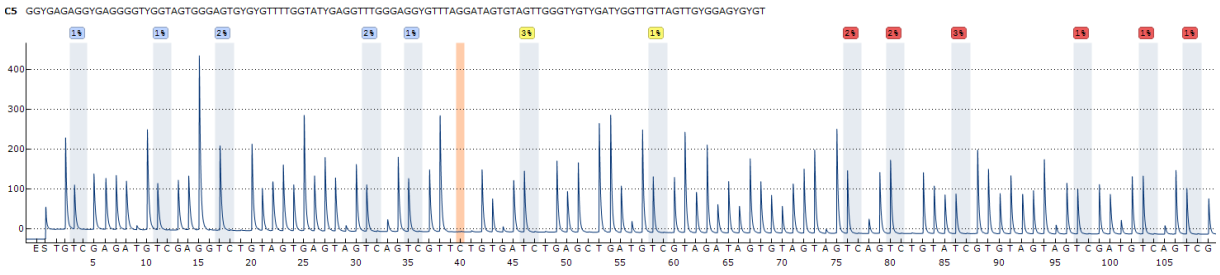


Abbildung 55: Repräsentatives Pyrogramm für *GluR4* Primer Set 1 (Hippocampus der trainierten Ratte 5)

Abbildung 56 fasst das PSQ-Ergebnis der einzelnen CpGs für trainierte und untrainierte Ratten in einem Scatter Plot zusammen.

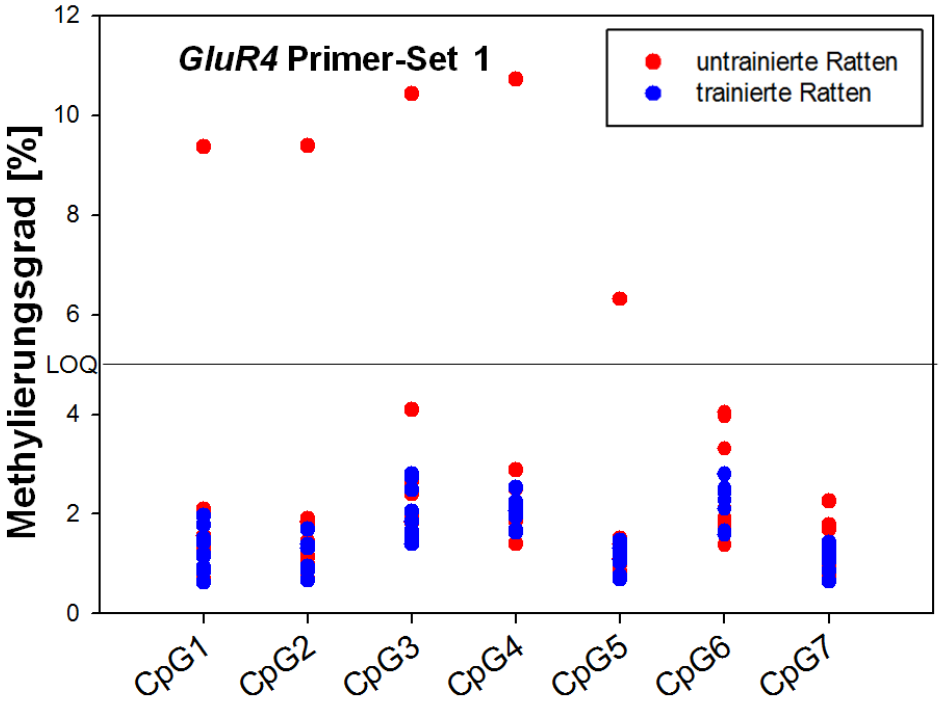


Abbildung 56: PSQ-Ergebnis des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

Auch die in Abbildung 56 dargestellten Werte liegen zum Großteil unter der Bestimmungsgrenze. Nur im Hippocampus der untrainierten Ratte 1 wiesen die CpGs 1 bis 5 einen Methylierungsgrad >LOQ auf. Da dieses Ergebnis aber nicht, wie in Tabelle 42 ersichtlich, mit dem HRM-Screening im Einklang steht, sollten die erhaltenen Werte durch eine weitere Messung überprüft werden. Auch für dieses Primer-Set wurden alle Messwerte, welche unter dem LOQ liegen, auf LOQ/2 = 2,5 gesetzt und wie unter 5.8.3 beschrieben

weiter ausgewertet. Die Mittelwerte der MS-HRM und PSQ-Ergebnisse werden in Tabelle 41 und Tabelle 42 gegenübergestellt.

Tabelle 41: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

trainierte Ratten	**Methylierungsgrad [%]**	
	HRM	**PSQ**
1	<LOQ	<LOQ
2	<LOD	<LOQ
3	n.a.*	n.a.*
4	<LOQ	<LOQ
5	<LOQ	<LOQ
6	<LOQ	<LOQ
7	<LOQ	<LOQ
8	<LOQ	<LOQ
9	<LOQ	<LOQ
10	<LOQ	<LOQ
Mittelwert	**zwischen LOD (= 7) und LOQ (= 13)**	**<LOQ (= 5)**

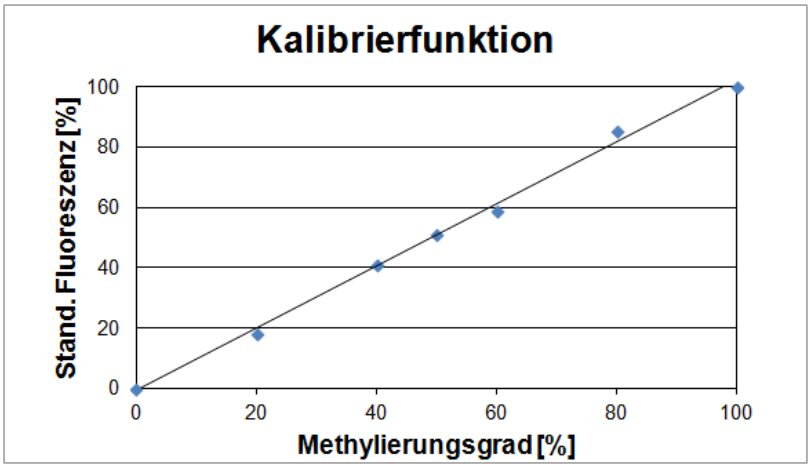
* nicht analysiert

Tabelle 42: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1

untrainierte Ratten	**Methylierungsgrad [%]**	
	HRM	**PSQ**
1	<LOQ	9
2	<LOQ	<LOQ
3	<LOD	<LOQ
4	<LOD	<LOQ
5	<LOQ	<LOQ
6	<LOQ	<LOQ
7	<LOQ	<LOQ
8	<LOQ	<LOQ
9	<LOD	<LOQ
10	<LOQ	<LOQ
Mittelwert	**zwischen LOD (= 7) und LOQ (= 13)**	**<LOQ (= 5)**

Primer-Set 2:

In Abbildung 57 ist die Kalibrierfunktion für die HRM-Auswertung dargestellt. Die für die Kalibrierung benötigte Standardreihe wurde wie unter 5.6.1 beschrieben, durch Mischen der 0% methylierten und 100% methylierten Standards, hergestellt. Für die Kalibrierung wurde jeder Standard doppelt gemessen und der Mittelwert der standardisierten Fluoreszenz gegen den Methylierungsgrad des Standards aufgetragen. Durch Einsetzen der standardisierten Fluoreszenz der Probe in die Kalibrierfunktion wurde der Methylierungsgrad der Probe bestimmt (siehe 5.8.1).



$R^2 = 0,996$

f = k*x+d

k = 1,028

d = -0,639

Abbildung 57: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR4* Primer-Set 2

In Tabelle 43 und Tabelle 44 sind die Ergebnisse der HRM-Messung für *GluR4* Primer-Set 2 zusammengefasst. Alle Messwerte, welche unter LOQ bzw. unter LOD liegen, wurden auf LOD/2 bzw. LOQ/2 gesetzt und, wie unter 5.8.3 beschrieben, weiter ausgewertet.

Tabelle 43: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2;

trainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	**Messung 2**
1	<LOD	<LOD
2	<LOD	<LOD
3	n.a.*	n.a.*
4	<LOD	<LOD
5	<LOD	<LOD
6	<LOD	<LOD
7	<LOD	<LOD
8	<LOD	<LOD
9	<LOD	<LOD
10	<LOD	<LOD
Mittelwert	**<LOD (= 9)**	

* nicht analysiert

Tabelle 44: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2

untrainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	Messung 1	**Messung 2**
1	<LOD	<LOD
2	<LOD	<LOD
3	<LOD	<LOD
4	<LOD	<LOD
5	<LOD	<LOD
6	<LOD	<LOD
7	<LOD	<LOD
8	<LOD	<LOD
9	<LOD	<LOD
10	<LOD	<LOD
Mittelwert	**<LOD (= 9)**	

Ein stellvertretendes Pyrogramm (Hippocampus der untrainierten Ratte 7) ist in Abbildung 58 dargestellt.

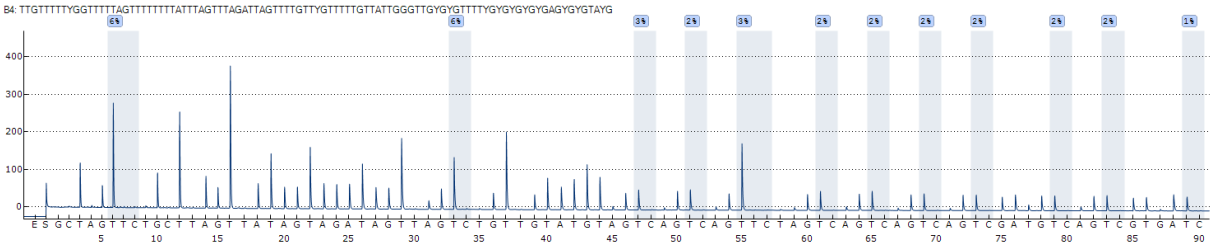


Abbildung 58: Repräsentatives Pyrogramm für *GluR4* Primer Set 2 (Hippocampus der untrainierten Ratte 7)

Abbildung 59 fasst das PSQ-Ergebnis der einzelnen CpGs für trainierte und untrainierte Ratten in einem Scatter Plot zusammen.

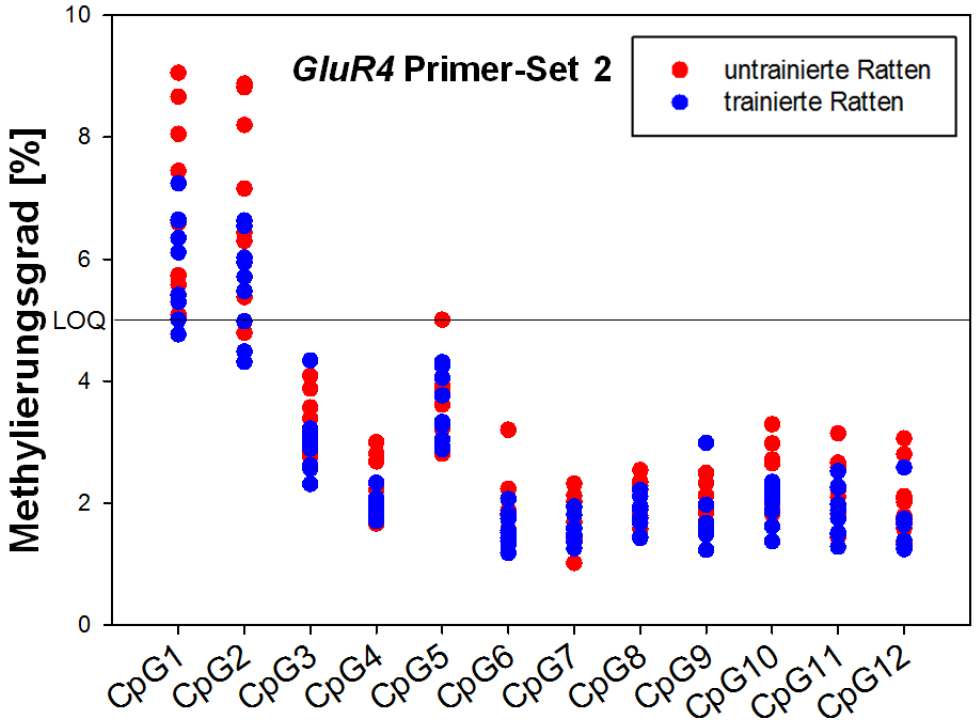


Abbildung 59: PSQ-Ergebnis des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2

In Abbildung 59 ist zu erkennen, dass die im Amplikon enthaltenen CpGs unterschiedlich stark methyliert sind. Dabei weisen besonders die CpGs an Position 1 und 2 sowohl bei trainierten als auch bei untrainierten Ratten einen höheren Methylierungsgrad auf. Da auch für dieses Primer-Set der Großteil der Messwerte unter der Bestimmungsgrenze liegt, wurden die Proben wie unter 5.8.3 beschrieben weiter ausgewertet. Die Mittelwerte der MS-HRM und PSQ-Ergebnisse werden in Tabelle 45 und Tabelle 46 gegenübergestellt.

Tabelle 45: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2

trainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	HRM	**PSQ**
1	<LOD	<LOQ
2	<LOD	<LOQ
3	n.a.*	n.a.*
4	<LOD	<LOQ
5	<LOD	<LOQ
6	<LOD	<LOQ
7	<LOD	<LOQ
8	<LOD	<LOQ
9	<LOD	<LOQ
10	<LOD	<LOQ
Mittelwert	**<LOD (= 9)**	**<LOQ (= 5)**

* nicht analysiert

Tabelle 46: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2

untrainierte Ratten	Methylierungsgrad [%]	
	HRM	**PSQ**
1	<LOD	<LOQ
2	<LOD	<LOQ
3	<LOD	<LOQ
4	<LOD	<LOQ
5	<LOD	<LOQ
6	<LOD	<LOQ
7	<LOD	<LOQ
8	<LOD	<LOQ
9	<LOD	<LOQ
10	<LOD	<LOQ
Mittelwert	**<LOD (= 9)**	**<LOQ (= 5)**

4.2.6 Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Promotorregionen der untersuchten Gene *GluR1-GluR4* sowohl in den Hippocampi von untrainierten als auch in denen von trainierten Ratten nur einen geringen Methylierungsgrad aufwiesen. Für keine untersuchte Genregion konnte eine Verringerung des Methylierungsgrads durch das Training im Morris Wasserlabyrinth festgestellt werden. Daher wird davon ausgegangen, dass die Expression dieser Gene nicht über den Methylierungsgrad der Promotorregion reguliert wird. In den folgenden Tabellen werden die erhaltenen Mittelwerte der einzelnen Ergebnisse für trainierte und untrainierte Ratten nochmals direkt miteinander verglichen, um dies zu verdeutlichen.

GluR1:

Tabelle 47: Gegenüberstellung des Methylierungsgrads in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten

Primer-Set 1:			
HRM Methylierungsgrad [%]		**PSQ** Methylierungsgrad [%]	
untrainierte Ratten	trainierte Ratten	untrainierte Ratten	trainierte Ratten
zwischen LOD (= 7) und LOQ (= 13)	zwischen LOD (=7) und LOQ (= 13)	<LOQ (= 5)	<LOQ (= 5)
Primer-Set 2:			
<LOD (= 10)	<LOD (= 10)	n.a.*	n.a.*

* nicht analysiert

GluR2:

Tabelle 48: Gegenüberstellung des Methylierungsgrads in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten

Primer-Set 1:			
HRM Methylierungsgrad [%]		**PSQ** Methylierungsgrad [%]	
untrainierte Ratten	trainierte Ratten	untrainierte Ratten	trainierte Ratten
<LOD (= 4)	<LOD (= 4)	<LOQ (= 5)	<LOQ (= 5)
Primer-Set 2:			
n.a.*	n.a.*	n.a.*	n.a.*

* nicht analysiert

GluR3:

Tabelle 49: Gegenüberstellung des Methylierungsgrads in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten

Primer-Set 1:			
HRM Methylierungsgrad [%]		**PSQ** Methylierungsgrad [%]	
untrainierte Ratten	trainierte Ratten	untrainierte Ratten	trainierte Ratten
<LOD (= 5)	<LOD (= 5)	<LOQ (= 5)	<LOQ (= 5)
Primer-Set 2:			
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

GluR4:

Tabelle 50: Gegenüberstellung des Methylierungsgrads in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten

Primer-Set 1:			
HRM Methylierungsgrad [%]		**PSQ** Methylierungsgrad [%]	
untrainierte Ratten	trainierte Ratten	untrainierte Ratten	trainierte Ratten
zwischen LOD (= 7) und LOQ(= 13)	zwischen LOD (= 7) und LOQ(= 13)	<LOQ (= 5)	<LOQ (= 5)
Primer-Set 2:			
<LOD (= 9)	<LOD (= 9)	<LOQ (= 5)	<LOQ (= 5)

Die in der Masterarbeit präsentierten Ergebnisse beruhen auf einem einzigen Versuch im Morris Wasserlabyrinth, der mit zehn trainierten und zehn untrainierten Ratten durchgeführt wurde. Um die im Rahmen der Masterarbeit erhaltenen Ergebnisse abzusichern, sollte der Versuch im Morris Wasserlabyrinth wiederholt werden. Interessant wäre es, dann nicht nur den Methylierungsgrad in der Promotorregion von *GluR1-GluR4*, sondern auch die Genexpression, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene, zu bestimmen.

5 Experimentelles

5.1 Training der Ratten im Morris Wasserlabyrinth

Die für diese Arbeit verwendeten Hippocampi stammten aus 12 bis 14 Wochen alten, männlichen Sprague Dawley Ratten, welche am Department für Biomedizinische Forschung in der Abteilung für Labortierkunde und –genetik der Medizinischen Universität Wien gehalten und im Morris Wasserlabyrinth trainiert wurden. Die Ratten wurden in zwei Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt. Die erste Gruppe bestand aus Ratten, welche im MWM darauf trainiert wurden, eine Plattform zu finden, die zweite Gruppe bestand aus untrainierten Kontrollratten. Das Training wurde von Ajinkya Sase, einem Mitarbeiter unseres Kooperationspartners Univ.-Prof. Dr. Gert Lubec, wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

Das MWM bestand aus einem runden Becken mit einem Durchmesser von 150 cm und einer Tiefe von 60 cm. In diesem Becken wurden Ratten darauf trainiert, sich auf eine unsichtbare Plattform, welche sich 1,5 cm unter der Wasseroberfläche befand, zu retten. Um die Plattform zu finden, konnten sich die Ratten nur an Markierungen, welche außerhalb des Beckens angebracht wurden, orientieren. Das Becken war in vier Quadranten eingeteilt. Die Plattform befand sich in der Mitte eines Quadranten und blieb währen des gesamten Trainings an dieser Stelle.

Die Raumerfassungsphase der Tiere (engl.: spatial acquisition phase) bestand aus vier Trainingseinheiten pro Tag, über einen Zeitraum von vier Tagen. Der erste Tag begann mit einer Akklimatisierungseinheit, in der die Ratten auf die versteckte Plattform gesetzt wurden, für 30 Sekunden im Becken schwimmen durften und anschließend zur Plattform geleitet wurden. In jeder weiteren Einheit wurden die Ratten für 120 Sekunden mit einer zufälligen Startposition in das Becken gegeben. Während dieser 120 Sekunden versuchten die Ratten, die Plattform zu finden, um auf ihr zu verweilen. Konnte ein Tier die Plattform innerhalb dieser Zeit nicht finden, wurde es für 30 Sekunden auf die Plattform gesetzt. Daraufhin wurde jedes Tier für 20 Minuten in seinen Käfig zurückgebracht, bevor der nächste Trainingsdurchgang durchgeführt wurde. Während dieser Versuche wurden der zurückgelegte Weg und die Geschwindigkeit, mit der die Ratten die Plattform erreichten, gemessen und aufgezeichnet.

Die untrainierten Ratten wurden gleich wie die trainierten Ratten behandelt und auch täglich viermal in das Becken gegeben, jedoch mit dem Unterschied, dass die Plattform zuvor immer entfernt wurde. Dadurch wurden diese Tiere demselben Stress und denselben physiologischen Belastungen ausgesetzt, ohne jedoch eine Verbindung zwischen den Markierungen außerhalb des Beckens und der Rettungsplattform herstellen zu können.

Am fünften Tag wurde der Lernfortschritt der Ratten getestet. Hierfür wurden diese für 60 Sekunden in das Becken, von dem zuvor die Plattform entfernt wurde, gegeben und die Zeit, die sie in den einzelnen Quadranten verbrachten, gemessen.

Sechs Stunden nach diesem abschließenden Test wurden die Ratten getötet, ihre Hippocampi direkt danach entnommen und bei -80°C für spätere biochemische Analysen aufbewahrt.

5.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde mit dem *QIAamp DNA Mini Kit* von Qiagen nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. [57]

Zu Beginn wurden die Hippocampi jeder Ratte gewogen und in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Da die Hippocampi die vom Hersteller empfohlene Höchstmenge für die Lyse des Gewebes um das Vierfache überschritten, wurde die vierfache Menge an Proteinase K (80 µl) und ATL Lysepuffer (720 µl) zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden kurz gevortext und anschließend in einem *Thermomixer comfort* (Eppendorf) für zwei Stunden bei 56°C und 1200 rpm inkubiert, bis eine klare Lösung vorlag. Anschließend wurde kurz in einer *Centrifuge 5424* (Eppendorf) zentrifugiert, um die Flüssigkeit vom Deckel zu entfernen. Dann wurde die Lösung auf vier Reaktionsgefäße aufgeteilt, RNase zugegeben, für 15 Sekunden gevortext und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden 200 µl AL Lysepuffer zugegeben, für 15 Sekunden gevortext, für zehn Minuten bei 70°C inkubiert, mit 200 µl Ethanol versetzt und 15 Sekunden gevortext. Der Inhalt der Reaktionsgefäße wurde in QIAamp Mini Spin Säulen überführt, eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, das Filtrat verworfen und die Säulen in ein frisches Auffanggefäß gegeben. 500 µl AW1 Waschpuffer wurden auf die Säulen gegeben und eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, die Säulen in ein frisches Auffanggefäß gegeben, mit 500 µl AW2 Waschpuffer versetzt und für drei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde wieder verworfen, die Säulen in frische Auffanggefäße gegeben und für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert, um restliche Flüssigkeit zu entfernen. Daraufhin wurden die Säulen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Es wurden 200 µl AE Elutionspuffer auf die Säulen gebracht, für fünf Minuten inkubiert und anschließend für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, um die DNA zu eluieren. Dieser Schritt wurde wiederholt. Die zwei erhaltenen Eluatfraktionen wurden getrennt bei -20°C aufbewahrt.

5.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der DNA in den erhaltenen Eluaten wurde mit einem *NanoDrop 2000c Spectrophotometer* und der *NanoDrop 2000/2000c Software* von Thermo Scientific bestimmt. Die Messung wurde nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. [58] Vor der Messung wurde der Nullwert des Elutionspuffers bestimmt. Für die Messung wurden 1,5 µl des Eluates auf die Linse des Spektrometers gegeben. Gemessen wurde in einem Bereich zwischen 220 nm und 350 nm. Das Programm berechnete die Konzentration aus der Extinktion bei 260 nm über das Lambert-Beer'sche Gesetz. Zusätzlich wurde das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu dem bei 280 nm bestimmt. Dieses ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA mit Proteinen. Bei einer reinen DNA-Lösung liegt das Verhältnis zwischen 1,7 und 1,9. [57]

5.4 Bisulfit-Konvertierung

Die Bisulfit-Konvertierung der DNA wurde mit dem *EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit* von Qiagen nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. [59] Es wurden sowohl die Standard-DNA (*Rat low methylated genomic DNA* (5 µg; 100 ng /µL) und *Rat high methylated genomic DNA* (5 µg; 100 ng /µL) von EpigenDx), als auch die Proben-DNA vor der PCR bisulfit-konvertiert.

Die Bisulfit-Reagenzien wurden, wie in Tabelle 51 angegeben, in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert. Die Standard-DNA wurde nach Ansatz 1 und die Proben-DNA nach Ansatz 2 zusammen gegeben.

Tabelle 51: Pipettierschema für die zwei Reaktionsansätze

	Ansatz 1 (1 ng – 2 µg DNA)	**Ansatz 2** (1 – 500 ng DNA)
Komponenten	**Volumen [µl]**	**Volumen [µl]**
DNA RNase freies Wasser *Bisulfite Solution* *DNA Protect Buffer*	variabel x (0 - 20) variabel (20 minus x) 85 35	variabel x (0 - 40) variabel (40 minus x) 85 15
Gesamtvolumen	140	140

Die Reaktionsansätze wurden gevortext und in einen *Rotor-Gene Q* Thermocycler von Qiagen gegeben. Das Temperaturprogramm für die Bisulfit-Konvertierung ist in Tabelle 52 angegeben.

Tabelle 52: Temperaturprogramm für die Bisulfit-Konvertierung

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Denaturierung	5	95
Inkubation	10	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	10	60
Hold	1	25

Die Reaktionsgefäße wurden aus dem Thermocycler genommen, die Reaktionslösungen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 310 µl BL Ladepuffer versetzt. Im Fall von Proben-DNA wurde dieser zuvor mit 3,1 µl Carrier-RNA-Lösung (1µg/µl) versetzt. Anschließend wurden 250 µl Ethanol (absolut) zugegeben und für 15 Sekunden gevortext. Die Reaktionslösung wurde auf eine MinElute Säule überführt und für eine Minute bei 14000 rmp zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säulen wieder in die Auffanggefäße gegeben. Daraufhin wurden 500 µl BW Waschpuffer auf die Säulen gegeben und erneut bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde wieder verworfen und die Säulen zurück in das Auffanggefäß gegeben. Als nächstes wurden 500 µl BD Desulphonierungspuffer auf die Säule gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde wieder für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert, das Eluat verworfen und die Säulen zurück in die Auffanggefäße gegeben. 500 µl BW Waschpuffer wurden auf die Säulen gegeben und erneut für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden 250 µl Ethanol (absolut) zugegeben und für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde wieder verworfen, die Säulen in neue Auffanggefäße gegeben und erneut für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden anschließend in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben und für fünf Minuten mit offenem Deckel bei 60°C stehen gelassen, um den restlichen Ethanol verdampfen zu lassen. Die Säulen wurden wieder in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben, 15 µl EB Eluationspuffer direkt in die Mitte der Säulenmembran gegeben, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, bei 12000 rpm zentrifugiert und das Eluat mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 5ng/µl verdünnt. Die verdünnten Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

5.5 Entwicklung und Optimierung der MS-HRM und PSQ-Methoden

5.5.1 Suche der Zielsequenz

Die DNA-Sequenz der untersuchten Gene wurde der *National Center for Biotechnology Information* (*NCBI*) Datenbank entnommen. [60] Die Promotorregion der Gene wurde aus der *Transcriptional Regulatory Element Database* (*TRED*) ausgelesen. [55]

5.5.2 Primer-Design

Die Primer (Forward-, Reverse- und Sequenzier-Primer) wurden mit Hilfe der *PyroMark Assay Design 2.0* Software designt. Hierfür wurde die Sequenz der Promotorregion in das Programm geladen und ein CpG-reicher Abschnitt mit einer Länge von bis zu 120 Basen als zu amplifizierende *Region of Interest* definiert. Von der Software wurden, unter Berücksichtigung der in Tabelle 53 angegebenen Einstellungen, sowohl PCR-Primer als auch dazugehörige Sequenzier-Primer vorgeschlagen.

Tabelle 53: Einstellungen für das Design der Primer

Parameter für PCR-Primer	
Minimale Primerlänge	18 Basen
Maximale Primerlänge	30 Basen
Optimale Amplikonlänge von	80 Basen
Optimale Amplikonlänge bis	200 Basen
Maximale Amplikonlänge	400 Basen
Primer über variabler Position erlaubt	Nein
Minimale Schmelztemperatur	50°C
Maximale Schmelztemperatur	72°C
Maximale GC Differenz in %	50%
Parameter für Sequenzier-Primer	
Minimale Primerlänge	15 Basen
Maximale Primerlänge	25 Basen
Minimaler Abstand zur Zielsequenz	0 Basen
Maximaler Abstand zur Zielsequenz	10 Basen
Primer über variabler Position erlaubt	Nein
Minimale Schmelztemperatur	29°C
Maximale Schmelztemperatur	59°C

Die von der Software vorgeschlagenen Primer-Sets wurden anschließend nach den in Kapitel 3.3.3 und 3.4.3 angegebenen Kriterien bewertet. Die Schmelztemperaturen der Primer wurden mit Hilfe des Webservers *Oligonucleotide Properties Calculator* [61] überprüft. Bei Abweichungen vom vorgegebenen Schmelzbereich wurde versucht, die Schmelztemperatur durch Änderungen in der Länge der Primer zu optimieren. War dies nicht möglich, wurde das Primer-Set verworfen. Anschließend wurden die Bildung möglicher Primer-Dimere und die Sekundärstruktur der einzelnen Primer mit Hilfe der Webserver *Oligo Analyzer 3.1* [62] und *RNAfold* [63] überprüft. Auch das Schmelzverhalten des gesamten Amplikons wurde mit Hilfe des Webservers *uMELT* [64] simuliert.

Die Primer wurden von Sigma-Aldrich synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert.

5.5.3 Optimierung der PCR-Methode

Mit jedem neu designten Primer-Set wurden zu Beginn Testläufe unter Standardbedingungen durchgeführt, um die idealen Bedingungen für die Amplifikation zu ermitteln. Diese Standardeinstellungen sind in Tabelle 54 angegeben.

Tabelle 54: Standardeinstellungen für Testläufe mit neuen Primern

Testparameter 1	**Einstellung**
Annealing-Temperatur	5°C unter T_m der Primer
Primer-Konzentration	250 nM
$MgCl_2$ Konzentration	0 mM
Testparameter 2	**Einstellung**
Annealing-Temperatur	5°C unter T_m der Primer
Primer-Konzentration	250 nM
$MgCl_2$ Konzentration	2 mM

Diese Parameter, besonders die Annealing-Temperatur, wurden dann in weiteren Versuchen optimiert, um Amplifikationskurven mit geringem C_T-Wert und dem Erreichen des Plateaus zu erhalten. Die Bildung von Primer-Dimeren und ihren Schmelztemperaturen wurden mit Negativkontrollen, bei denen anstelle von Templat-DNA RNase-freies Wasser zugegeben wurde, untersucht. Um die Reinheit des gewünschten Produktes zu erhöhen, wurde in den ersten sieben Zyklen ein sogenannter „touch down“ in das Temperaturprogramm eingefügt. Dieser wurde so gestaltet, dass die eingestellte Annealing-Temperatur im ersten Zyklus um 6°C über der optimalen Annealing-Temperatur lag und in den darauf folgenden sechs Zyklen um je 1°C verringert wurde. Ab dem siebten Zyklus wurde die optimale Annealing-Temperatur verwendet. Dies führt zu einer hochspezifischen Anlagerung der Primer in den

ersten Zyklen. In Tabelle 55 sind die optimierten Einstellungen der einzelnen Primer-Sets angegeben.

Tabelle 55: Optimierte Einstellungen der verwendeten Primer-Sets

		c ($MgCl_2$) [mM]	c (Primer) [nM]	Ta [°C]
GluR1	Primer-Set 1	2	500	61 → 55*
	Primer-Set 2	0	250	61 → 55*
GluR2	Primer-Set 1	0	250	66 → 60*
	Primer-Set 2	2	250	70 → 64*
GluR3	Primer-Set 1	0	250	61 → 55*
	Primer-Set 2	2	250	61 → 55*
GluR4	Primer-Set 1	0	250	64 → 58*
	Primer-Set 2	2	500	61 → 55*

*Touchdown: 1°C in den ersten sieben Zyklen

5.6 PCR Amplifikation und HRM Messung

Die PCR Amplifikationen wurden mit dem *EpiTect HRM PCR Kit* von Qiagen nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. [65] Von Proben, die mit dem *EpiTect HRM PCR Kit* amplifiziert wurden, wurde nach der Amplifikation eine hochaufgelöste Schmelzkurve aufgenommen.

5.6.1 Vorbereitung der PCR

Das Reaktionsgemisch der PCR wurde aus folgenden Lösungen zusammengegeben:

- Supermix: HotStarTaq Plus DNA-Polymerase, EpiTect HRM PCR Buffer, EvaGreen
- Primerlösungen (Forward und Reverse) (10 µM)
- $MgCl_2$ Lösung (40 mM)
- Bisulfit-konvertierte DNA-Lösung der Proben (5 ng/µl)
- Bisulfit-konvertierte Standard-DNA (5 ng/µl)
- RNase-freies Wasser
- Farbstoff, dNTP Mix und RNase-freies Wasser

Vor Beginn jeder Messung wurde der Arbeitsplatz mit *DNA-Exitus Plus IF* gereinigt, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Die für die Erstellung der Kalibrierfunktion benötigte Standardreihe wurde durch Mischen der 0% methylierten und 100% methylierten Standards hergestellt.

Der Mastermix, welcher die beiden Primer, die zusätzlich benötigte Menge an $MgCl_2$ und das RNase-freie Wasser enthielt, wurde für alle gemeinsam gemessenen Proben vorbereitet. Der Mastermix wurde immer in einem Überschuss hergestellt, sodass er für zwei weitere Proben reichen sollte. In Tabelle 56 sind die Pipettierschemata für die Erstellung der Mastermixe angegeben. Die angegebenen Volumina beziehen sich immer auf eine Probe. Die PCR-Ansätze wurden in 0,1 ml „strip tube“ Reaktionsgefäße, wie in Tabelle 57 angegeben, pipettiert. Zusätzlich wurde bei jeder Messung eine Negativkontrolle (*No template control*) mitgemessen, welche statt der DNA-Lösung RNase-freies Wasser enthielt. Alle Proben, inklusive der Negativkontrolle, wurden immer im Doppelansatz gemessen.

Tabelle 56: Zusammensetzung des Mastermixes pro Probe

Mastermix für EpiTect HRM PCR Kit	
Komponente	Volumen [µl]
Forward-Primer (250 nM bzw. 500 nM) Reverse-Primer (250 nM bzw. 500 nM) $MgCl_2$ H_2O	0,5 bzw. 1 0,5 bzw. 1 x y
Gesamtvolumen	8

Tabelle 57: Zusammensetzung des PCR Ansatzes pro Probe

PCR Ansatz für EpiTect HRM PCR Kit	
Komponente	Volumen [µl]
Supermix Mastermix DNA-Lösung	10 8 2
Gesamtvolumen	20

5.6.2 Einstellungen der PCR

Die PCR-Experimente wurden mit einem *Rotor-Gene Q* Thermocycler von Qiagen und der dazugehörigen *Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0* durchgeführt.

Das Temperaturprogramm, welches für die Amplifikation verwendet wurde, ist in Tabelle 58 angegeben. Die PCR wurde in 50 Zyklen durchgeführt. Bei dem verwendeten Temperaturprogramm wurde für jedes Primer-Set die in Tabelle 55 angegebene Annealing-Temperatur verwendet.

Tabelle 58: Temperaturprogramme der jeweiligen PCR-Kits

EpiTect HRM PCR Kit			
Initialisierung		10 min	95°C
PCR in 50 Zyklen	Denaturierung Annealing Elongation*	10 s 30 s 10 s	95°C 72°C
Denaturierung Hybridisierung		60 s 60 s	95°C 40°C
HRM Schritt*		0,1°C pro 2 s	65 – 90°C

*Fluoreszenzmessung

Bei der Amplifikation wurde die Fluoreszenz einerseits während der Elongation und andererseits während der HRM-Analyse gemessen. So konnte der Anstieg der DNA-Konzentration beobachtet und ein Schmelzprofil aufgenommen werden. Die Auswertung der so erhaltenen Daten ist unter 5.8.1 beschrieben. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

5.7 Pyrosequenzierung

Die PSQ-Versuche wurden mit den *PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents* von Qiagen nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. [53] Zusätzlich wurde für die Immobilisierung *Streptavidin Sepharose™ High Performance* von GE Healthcare verwendet. Sequenziert wurde mit einem *PyroMark Q24* von Qiagen, welcher mit der dazugehörigen *PyroMark Q24 Advanced 3.0.0* Software gesteuert wurde.

5.7.1 Vorbereitungen für die Sequenzierung

Die PyroMark Q24 Cartridge wurde, wie vom Programm vorgegeben, mit den entsprechenden Reagenzien beladen und in das Gerät gegeben. Anschließend wurde der DNA-Immobilisierungsmix, wie in Tabelle 59 angegeben, hergestellt. Die angegebenen Volumina beziehen sich immer auf eine Probe. Das vorbereitete Volumen an Mastermix entsprach immer dem für zwei zusätzliche Proben.

Tabelle 59: Zusammensetzung des Mastermixes pro Probe

Mastermix	
Komponente	**Volumen [µl]**
Streptavidin Sepharose	1
PyroMark Binding Buffer	40
RNase freies Wasser	24
Gesamtvolumen	65

In einer *iCycler iQ PCR plate* von Bio-Rad wurden je 15 µl der nach der PCR erhaltenen DNA-Lösung mit 65 µl des Immobilisierungs-Mixes zusammen gegeben, die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und diese für 15 Minuten bei 1400 rpm geschüttelt. Währenddessen wurde jede verwendete Position auf der PyroMark Q24 Plate mit 20 µl 0,375 µM Sequenzier-Primer befüllt und die Platte auf die V*acuum Workstation* gegeben. Anschließend wurde auch die PCR-Platte auf der Workstation platziert. Mit Hilfe des *Vacuum tooles* wurde die immobilisierte DNA denaturiert, gewaschen und auf die Sequenzierplatte übertragen. Daraufhin wurde diese für fünf Minuten bei 80°C inkubiert und dann innerhalb von 30 Sekunden in das Sequenziergerät gegeben und das Gerät gestartet. Die Auswertung der so erhaltenen Daten ist unter 5.8.2 beschrieben.

5.8 Datenauswertung

5.8.1 HRM

Die aus den HRM-Messungen erhaltenen Rohdaten wurden mit der *Rotor-Gene® Q Series Software 2.1.0* ausgewertet. Die Messwerte wurden nach den in 3.3.2 angegebenen Kriterien bewertet. In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob es zu einer Amplifikation der Standards, der Proben und der Negativkontrolle kam. Im nächsten Schritt wurden die auf die Anfangs- und Endintensität der Schmelzkurven normalisierten HRM-Kurven erstellt. Die daraus resultierenden Daten wurden in das Programm *Microsoft Excel 2010* übertragen. Dann wurde das arithmetische Mittel der normalisierten Fluoreszenz (NF) der einzelnen Proben gebildet und daraus, nach Formel 1, die zwischen 0% und 100% standardisierte Fluoreszenz (SF) gebildet.

$$SF = \frac{NF_{\mathrm{Probe}} - NF_{0\%methylierteDNA}}{NF_{100\%methylierteDNA} - NF_{0\%MethylierteDNA}}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung der standardisierten Fluoreszenz der Proben und Standards

Die SF-Werte der doppelt gemessenen DNA-Standards wurden gemittelt und daraus die Kalibrierfunktionen erstellt. Durch mehrmaliges Messen des unmethylierten Standards

wurden der LOD und der LOQ abgeschätzt. Hierfür wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der NF-Werte dieser Messungen gebildet. Anschließend wurde die Standardabweichung dreimal für die Berechnung des LOD bzw. zehnmal für die Berechnung des LOQ zum Mittelwert addiert und der LOD bzw. LOQ durch Einsetzen dieser Werte in die Kalibrierfunktion ermittelt. Der Methylierungsgrad der Proben wurde durch Einsetzen der SF-Werte der Proben in die Kalibrierfunktionen bestimmt.

5.8.2 Pyrosequenzierung

Die aus den PSQ-Messungen erhaltenen Rohdaten wurden von der *PyroMark Q24 Advanced 3.0.0* Software in das Programm *SigmaPlot 11.0* übertragen. In einem multiplen Scatter Plot wurde der Methylierungsgrad der einzelnen CpGs dargestellt.

5.8.3 Umgang mit Messwerten unter LOD bzw. LOQ

Für die Bestimmung des mittleren Methylierungsgrads der Promotorregion wurden Messwerte, welche unter LOD bzw. LOQ lagen, auf LOD/2 bzw. LOQ/2 gesetzt. [66] Im Anschluss wurde der Mittelwert aller Werte gebildet. Wenn dieser unter dem LOD bzw. LOQ lag, wurde das Ergebnis mit „<LOD“ bzw. „<LOQ“ angegeben.

5.8.4 Ausreißer-Test nach Nalimov

Alle zur Auswertung herangezogenen Daten wurden nach dem Nalimov Test auf Ausreißer überprüft. [66] Hierfür wurden mit Hilfe von *Microsoft Excel 2010* die Prüfgröße PG nach Nalimov bestimmt und mit den dazugehörigen kritischen Werten für P = 0.95 verglichen. War PG größer als dieser Wert, lag ein Ausreißer vor und der entsprechende Wert wurde aus der Datenreihe entfernt. Der Test wurde solange durchgeführt, bis keine Ausreißer mehr vorlagen.

5.9 Chemikalien und Kits

DNA-Exitus Plus™ IF	AppliChem	Deutschland
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit	Qiagen	Deutschland
EpiTect HRM PCR Kit	Qiagen	Deutschland
Ethanol absolut (EtOH)	VWR	Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2$ * 6 H_2O)	Sigma-Aldrich	Deutschland
Primer	Sigma-Aldrich	Deutschland
Proteinase K solution from *Engyodontium album*	Sigma-Aldrich	USA
PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents	Qiagen	Deutschland
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	Deutschland
Rat high methylated genomic DNA	EpigenDx	USA
Rat low methylated genomic DNA	EpigenDx	USA
Ribonuclease A solution from bovine pancreas	Sigma-Aldrich	USA
RNase-free water (ultra-filtered and autoclaved)	Sigma-Aldrich	Deutschland
Streptavidin Sepharose™	GE Healthcare	Deutschland

5.10 Verbrauchswaren

Ep Dualfilfilter Tips in Racks	Eppendorf	Germany
iCycler iQ PCR plate	BioRad	USA
Reaktionsgefäße, 1.5 mL, sterile	VWR	Germany
PCR tubes, 0.2 mL, sterile	Qiagen	Germany
PyroMark Q24 Plate	Qiagen	Germany
Strip Tubes und caps 0,1 ml	Qiagen	Germany
Zentrifugenröhrchen, 50 mL	VWR	Germany
Zentrifugenröhrchen, 15 mL, sterile	VWR	Germany

5.11 Arbeitsgeräte

Analysenwaage	TE2144S	Sartorius
Pipetten		Eppendorf, Biorad

Pyrosequenzierer	PyroMark Q24	Qiagen
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Scientific
Thermocycler	Rotor-Gene® Q	Qiagen
Thermomixer	Thermomixer comford	Eppendorf
Vortexmixer	VF2	Janke & Kunkel
Vortexmixer	VV3	VWR
Zentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf
	Rotor FA-45-24-11	

5.12 Webserver und Datenbanken

National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Oligo Analyzer 3.1	http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/
Oligo Calc	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html
RNAfold	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi
Transcriptional Regulatory Element Database (TRED)	https://cb.utdallas.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=home

5.13 Software

Microsoft Excel 2010

PyroMark Assay Design 2.0

PyroMark Q24 Advanced

NanoDrop 2000/2000c Software

Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0

SigmaPlot 11.0

TeeChart Office 2.0

6 Anhang

A Kurzbeschreibung

Bei der Gedächtnisbildung und beim Lernen spielt die Langzeit-Potenzierung (LTP) von Synapsen und Nervenzellen im Hippocampus eine bedeutende Rolle. Für die Entstehung dieser LTP ist unter anderem der ionotrope Glutamatrezeptor AMPA (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure-Rezeptor) von Bedeutung. In Säugetieren kommt dieser trans-membrane Ionenkanal als tetramerer Komplex, welcher aus unterschiedlichen Kombinationen der folgenden 4 Untereinheiten gebildet wird, vor: GluR1, GluR2, GluR3 und GluR4. Die Anzahl und Art der Untereinheiten, aus denen der Rezeptor aufgebaut ist, bestimmen die physiologischen Eigenschaften wie Kinetik, Leitfähigkeit und Durchlässigkeit für Ionen und damit auch die post-synaptische Antwort des Rezeptors. Daher ist die Regulation der Expression dieser Rezeptoruntereinheiten von besonderem Interesse.

In dieser Masterarbeit wurde untersucht, ob sich durch das Trainieren im Morris Wasserlabyrinth (engl.: Morris Water Maze, MWM) einem weit verbreiteten Paradigma, um räumliches Lernen und die Gedächtnisbildung zu beurteilen, der Methylierungsgrad der DNA von Ratten in den Genen *GluR1*, *GluR2*, *GluR3* und *GluR4* ändert.

Dazu wurden Ratten von Ajinkya Sase, einem Mitarbeiter unseres Kooperationspartners Univ.-Prof. Dr. Gert Lubec, im MWM trainiert und anschließend deren Hippocampi entnommen.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die DNA aus diesen Hippocampi extrahiert und gemeinsam mit DNA-Standards bisulfit-konvertiert. Um eine anschließende Analyse des Methylierungsgrads mittels methylierungssensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) und Pyrosequenzierung (PSQ) durchführen zu können, wurden die Proben und Standards mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Hierfür wurden genspezifische Primer entworfen. Die entwickelten PCR-Methoden wurden getestet und die Primer- und Magnesium-Konzentration sowie die Annealing-Temperatur optimiert.

Die Promotorregionen der untersuchten Gene *GluR1-GluR4* wiesen sowohl in den Hippocampi von untrainierten als auch von trainierten Ratten einen geringen Methylierungsgrad, welcher oft sogar unter der Nachweisgrenze der entwickelten Methoden lag, auf. Für keine der untersuchten Genregionen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad und dem Training im Morris Wasserlabyrinth festgestellt werden. Daher wird davon ausgegangen, dass die Expression dieser Gene nicht über den Methylierungsgrad der Promotorregion reguliert wird.

B Abstract

Memory formation and learning are linked to long-term potentiation (LTP) of synapses in the hippocampus. Ionotropic glutamate receptors including the AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) are known to play an important role in LTP formation. In mammals, this transmembrane ion channel is a tetrameric complex expressed in different combinations of four subunits: GluR1, GluR2, GluR3 and GluR4. Number and type of the subunits assembling determine the physiological properties of the receptor, i.e. kinetics, conductance and permeability, and thus size and shape of the postsynaptic response of the receptor. So far, it is unknown how expression of the genes coding these receptor subunits is regulated.

In this Master thesis I aimed at investigating if the DNA methylation status of the promoter region of *GluR1-GluR4* in the hippocampi of rats is related to the training in the Morris Water Maze (MWM), a widely used paradigm to assess spatial learning and memory formation.

Rats were trained in the MWM by Ajinkya Sase, a co-worker of our co-operation partner Univ.-Prof. Dr. Gert Lubec.

In the course of this work, the DNA of hippocampi from trained (and untrained rats as control) was extracted and, together with DNA standards, bisulfite-converted. In order to be able to determine the methylation level by methylation sensitive high resolution melting analysis (MS-HRM) and pyrosequencing (PSQ), the samples and standards were amplified by polymerase chain reaction (PCR). For this purpose, gene-specific primers were designed. The PCR methods were optimized with regard to primer concentration, magnesium concentration and annealing temperature.

The methylation status of *GluR1-GluR4* in the hippocampi of trained and untrained rats was very low, most frequently even below the limit of detection of the developed methods. For none of the gene regions we found a correlation between the methylation status and the training in the Morris water maze. Therefore, we assume that the expression of *GluR1-GluR4* is not regulated by methylation of the promoter region.

C Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
APS	Adenosinphosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin Dinukleotid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dATPαS	Desoxyadenosin-α-Thiotriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
-dF/dt	negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Zeit
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EtOH	Ethanol
F	Fluoreszenz
GluR1	ionotroper Glutamat-Rezeptor 1
GluR2	ionotroper Glutamat-Rezeptor 2
GluR3	ionotroper Glutamat-Rezeptor 3
GluR4	ionotroper Glutamat-Rezeptor 4
H_2O	Wasser
LH_2	D-Luciferin
LOD	Limit of dedection bzw. Nachweisgrenze
LOQ	Limit of quantification bzw. Bestimmungsgrenze
LTD	Long-term Depression bzw. Langzeit-Depression
LTP	Long-term Potentiation bzw. Langzeit-Potenzierung
Mg	Magnesium
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MS-HRM	methylierungssensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
MWM	Morris water Maze bzw. Morris Wasserlabyrinth

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF	normalisierte Fluoreszenz
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NTC	*No template control*
n.a.	nicht analysiert
nM	Nanomolar
O_2	Sauerstoff
Oligo Calc	Oligonucleotide Properties Calculator
Oxy-L	Oxyluciferin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PPi	Pyrophosphat
PSQ	Pyrosequenzierung
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
SF	standardisierte Fluoreszenz
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Temperatur
Ta	Annealing-Temperatur
T_m-Wert	Schmelztemperatur
TRED	Transcriptional Regulatory Element Database
µl	Mikroliter

D Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften des Primer-Sets 1 für *GluR1* 22
Tabelle 2: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 1 für *GluR1* 23
Tabelle 3: Optimierte PCR-Bedingungen 23
Tabelle 4: Eigenschaften des Primer-Sets 2 für *GluR1* 25
Tabelle 5: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 2 für *GluR1* 26
Tabelle 6: Optimierte PCR-Bedingungen 26
Tabelle 7: Eigenschaften des Primer-Sets 1 für *GluR2* 28
Tabelle 8: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 1 für *GluR2* 29
Tabelle 9: Optimierte PCR-Bedingungen 29
Tabelle 10: Eigenschaften des Primer-Sets 2 für *GluR2* 31
Tabelle 11: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 2 für *GluR2* 31
Tabelle 12: Optimierte PCR-Bedingungen 31
Tabelle 13: Eigenschaften des Primer-Sets 1 für *GluR3* 34
Tabelle 14: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 1 für *GluR3* 34
Tabelle 15: Optimierte PCR-Bedingungen 34
Tabelle 16: Eigenschaften des Primer-Sets 2 für *GluR3* 36
Tabelle 17: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 2 für *GluR3* 37
Tabelle 18: Optimierte PCR-Bedingungen 37
Tabelle 19: Eigenschaften des Primer-Sets 1 für *GluR4* 39
Tabelle 20: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 1 für *GluR4* 40
Tabelle 21: Optimierte PCR-Bedingungen 40
Tabelle 22: Eigenschaften des Primer-Sets 2 für *GluR4* 42
Tabelle 23: Eigenschaften des Amplikons von Primer-Set 2 für *GluR4* 42
Tabelle 24: Optimierte PCR-Bedingungen 42
Tabelle 25: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 48
Tabelle 26: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 48
Tabelle 27: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 50
Tabelle 28: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 50
Tabelle 29: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2 52
Tabelle 30: Methylierungsgrad des *GluR1* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2 52

Tabelle 31: Methylierungsgrad des *GluR2* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 54
Tabelle 32: Methylierungsgrad des *GluR2* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 54
Tabelle 33: Methylierungsgrad des *GluR2* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 56
Tabelle 34: Methylierungsgrad des *GluR2* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 56
Tabelle 35: Methylierungsgrad des *GluR3* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 58
Tabelle 36: Methylierungsgrad des *GluR3* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 58
Tabelle 37: Methylierungsgrad des *GluR3* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 60
Tabelle 38: Methylierungsgrad des *GluR3* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 60
Tabelle 39: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 62
Tabelle 40: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 62
Tabelle 41: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 64
Tabelle 42: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 64
Tabelle 43: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2; 66
Tabelle 44: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2 66
Tabelle 45: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2 68
Tabelle 46: Methylierungsgrad des *GluR4* Promotors in Hippocampi von untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2 68
Tabelle 47: Gegenüberstellung des Methylierungsgrads in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten 69
Tabelle 48: Gegenüberstellung des Methylierungsgrads in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten 69

Tabelle 49: Gegenüberstellung des Methylierungsgrads in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten 70
Tabelle 50: Gegenüberstellung des Methylierungsgrads in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten 70
Tabelle 51: Pipettierschema für die zwei Reaktionsansätze 73
Tabelle 52: Temperaturprogramm für die Bisulfit-Konvertierung 74
Tabelle 53: Einstellungen für das Design der Primer 75
Tabelle 54: Standardeinstellungen für Testläufe mit neuen Primern 76
Tabelle 55: Optimierte Einstellungen der verwendeten Primer-Sets 77
Tabelle 56: Zusammensetzung des Mastermixes pro Probe 78
Tabelle 57: Zusammensetzung des PCR Ansatzes pro Probe 78
Tabelle 58: Temperaturprogramme der jeweiligen PCR-Kits 79
Tabelle 59: Zusammensetzung des Mastermixes pro Probe 80

E Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer chemischen Synapse; nach [4] 1
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus; verändert nach [30]..... 8
Abbildung 3: Repräsentatives Temperaturprofil einer PCR-Reaktion..... 9
Abbildung 4: Amplifikationskurve einer PCR; verändert nach [33] 10
Abbildung 5: Anlagerung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes an die dsDNA; verändert nach [35] 11
Abbildung 6: Prinzip der Bisulfit-Konvertierung; verändert nach [39].....12
Abbildung 7: Reaktionsschema der Bisulfit-Konvertierung; verändert nach [40] 12
Abbildung 8: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleobasen des Adenin-Thymin und des Guanin-Cytosin Basenpaares; verändert nach [42].....14
Abbildung 9: Schmelzverhalten einer unmethylierten DNA-Sequenz (rot) und einer methylierten DNA-Sequenz (blau); links Fluoreszenz (F) gegen die Temperatur (T); rechts negative Ableitung der Fluoreszenz (-dF/dt) gegen die Temperatur (T).....15
Abbildung 10: Normalisierte Schmelzkurven eines 0% Standards (rot), eines 50% Standards (grün), eines 100% Standards (blau) und einer Probe mit unbekanntem Methylierungsgrad (violett) 16
Abbildung 11: Schematische Darstellung der enzymkatalysierten Reaktionen beim Sequenzieren einer Base; verändert nach [49].....18
Abbildung 12: Reaktionsgleichungen der vier bei der PSQ eingesetzten Enzyme; Abkürzungen: LH2 Luciferin, oxy-L Oxyluciferin, NMP Nucleosidmonophosphate; verändert nach [50] 18
Abbildung 13: Desoxyadenosin-α-Thiotriphosphat (dATPαS); verändert nach [52].....19
Abbildung 14: Auszug der Sequenz der Promotorregion von *GluR1*; *Regions of Interest* sind fett und unterstrichen markiert 22
Abbildung 15: Amplifikationskurven für *GluR1*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....23
Abbildung 16: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR1*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau 24
Abbildung 17: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR1*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün,100% methylierte DNA in Blau.....25
Abbildung 18: Amplifikationskurven für *GluR1*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....26
Abbildung 19: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR1*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau 27
Abbildung 20: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR1*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau.....27

Abbildung 21: Auszug der Sequenz der Promotorregion von *GluR2*; *Regions of Interest* sind fett bzw. unterstrichen markiert.....28
Abbildung 22: Amplifikationskurven für *GluR2*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....29
Abbildung 23: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR2*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....30
Abbildung 24: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR2*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau.....30
Abbildung 25: Amplifikationskurven für *GluR2*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....32
Abbildung 26: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR2*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....32
Abbildung 27: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR2*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau.....33
Abbildung 28: Auszug der Sequenzen der Promotorregion von *GluR3*; *Regions of Interest* sind fett und unterstrichen markiert.....33
Abbildung 29: Amplifikationskurven für *GluR3*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....35
Abbildung 30: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR3*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....35
Abbildung 31: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR3*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau.....36
Abbildung 32: Amplifikationskurven für *GluR3*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....37
Abbildung 33: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR3*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....38
Abbildung 34: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR3*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau.....38
Abbildung 35: Auszug der Sequenz der Promotorregion von *GluR4*; *Regions of Interest* sind fett und unterstrichen markiert.....39
Abbildung 36: Amplifikationskurve für *GluR4*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....40
Abbildung 37: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR4*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau.....41
Abbildung 38: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR4*; Primer-Set 1: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau.....41

Abbildung 39: Amplifikationskurven für *GluR4*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 100% methylierte DNA in Blau, NTC in Grau 43
Abbildung 40: Erste negative Ableitung der Schmelzprofile für *GluR4*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, methylierte DNA in Blau, NTC in Grau 43
Abbildung 41: Normalisierte Schmelzprofile für *GluR4*; Primer-Set 2: unmethylierte DNA in Rot, 50% methylierte DNA in Grün, 100% methylierte DNA in Blau 44
Abbildung 42: Mittlerer Verlauf des Lernprozesses der trainierten Ratten im Morris Wasserlabyrinth 46
Abbildung 43: Relative mittlere Zeiten der trainierten Ratten (blau) und der untrainierten Ratten (rot) 46
Abbildung 44: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR1* Primer-Set 1 47
Abbildung 45: Repräsentatives Pyrogramm für *GluR1* Primer Set 1 (Hippocampus der untrainierten Ratte 2) 49
Abbildung 46: PSQ-Ergebnis des *GluR1* Promotors in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 49
Abbildung 47: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR1* Primer-Set 2 51
Abbildung 48: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR2* Primer-Set 1 53
Abbildung 49: Repräsentatives Pyrogramm für *GluR2* Primer Set 1 (Hippocampus der untrainierten Ratte 6) 55
Abbildung 50: PSQ-Ergebnis des *GluR2* Promotors in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1: Der Methylierungsgrad von CpG4 und CpG12 konnte nicht bestimmt werden. 55
Abbildung 51: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR3* Primer-Set 1 57
Abbildung 52: Repräsentatives Pyrogramm für *GluR3* Primer Set 1 (Hippocampus der untrainierten Ratte 3) 59
Abbildung 53: PSQ-Ergebnis des *GluR3* Promotors in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 59
Abbildung 54: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR4* Primer-Set 1 61
Abbildung 55: Repräsentatives Pyrogramm für *GluR4* Primer Set 1 (Hippocampus der trainierten Ratte 5) 63
Abbildung 56: PSQ-Ergebnis des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 1 63
Abbildung 57: Kalibrierfunktion der HRM-Methode für *GluR4* Primer-Set 2 65
Abbildung 58: Repräsentatives Pyrogramm für *GluR4* Primer Set 2 (Hippocampus der untrainierten Ratte 7) 67
Abbildung 59: PSQ-Ergebnis des *GluR4* Promotors in Hippocampi von trainierten und untrainierten Ratten; Amplifikation der DNA mit Primer-Set 2 67

F Quellenverzeichnis

[1] C. A. Barnes, M. W. Jung, B. L. McNaughton, D. L. Korol, K. Andreasson, and P. F. Worley, “LTP saturation and spatial learning disruption: effects of task variables and saturation levels,” *J. Neurosci.*, vol. 14, no. 10, pp. 5793–5806, 1994.

[2] T. V. P. Bliss, G. L. Collingridge, and S. Laroche, “ZAP and ZIP, a Story to Forget,” *Science*, vol. 313, no. 5790, pp. 1058–1059, 2006.

[3] R. Thompson, *Das Gehirn: Von der Nervenzelle zur Verhaltenssteuerung*, 3. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, pp. 53-72, 81-102, 119-156, 2010.

[4] “Synapse - Erregungsübertragung.” [Online]. Available: http://www.biologie-schule.de/synapse-erregungsuebertragung.php. [Accessed: 09-Jan-2015].

[5] E. Evergren, F. Benfenati, and O. Shupliakov, “The synapsin cycle: a view from the synaptic endocytic zone,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 85, no. 12, pp. 2648–2656, 2007.

[6] D. Debanne, G. Daoudal, V. Sourdet, and M. Russier, “Brain plasticity and ion channels,” *J. Physiol. Paris*, vol. 97, no. 4–6, pp. 403–414, 2003.

[7] I. J. Weiler and W. T. Greenough, “Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 90, no. 15, pp. 7168–7171, 1993.

[8] S. Maren, G. Tocco, S. Standley, M. Baudry, and R. F. Thompson, “Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 90, no. 20, pp. 9654–9658, 1993.

[9] J. R. Whitlock, A. J. Heynen, M. G. Shuler, and M. F. Bear, “Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus,” *Science*, vol. 313, no. 5790, pp. 1093–1097, 2006.

[10] I. Song and R. L. Huganir, “Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity,” *Trends Neurosci.*, vol. 25, no. 11, pp. 578–588, 2002.

[11] J. Boehm, M.-G. Kang, R. C. Johnson, J. Esteban, R. L. Huganir, and R. Malinow, “Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1,” *Neuron*, vol. 51, no. 2, pp. 213–225, 2006.

[12] A. Barria, D. Muller, V. Derkach, L. C. Griffith, and T. R. Soderling, “Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation,” *Science*, vol. 276, no. 5321, pp. 2042–2045, 1997.

[13] K. Borges and R. Dingledine, “Chapter 11 AMPA receptors: Molecular and functional diversity,” in *Progress in Brain Research*, vol. 116, I. A. L. and L. G. O.P. Ottersen, Ed. Elsevier, pp. 153–170, 1998.

[14] M. Ghafari, S. K. Falsafi, H. Hoeger, and G. Lubec, “Hippocampal levels of GluR1 and GluR2 complexes are modulated by training in the Multiple T-maze in C57BL/6J mice,” *Brain Struct. Funct.*, vol. 217, no. 2, pp. 353–362, 2012.

[15] S. K. Falsafi, M. Ghafari, A. Pollak, H. Höger, and G. Lubec, “Hippocampal AMPA-type receptor complexes containing GluR3 and GluR4 are paralleling training in the Multiple T-Maze,” *Neurochem. Int.*, vol. 60, no. 4, pp. 425–430, 2012.

[16] N.-K. Yu, S. H. Baek, and B.-K. Kaang, “DNA methylation-mediated control of learning and memory,” *Mol. Brain*, vol. 4, p. 5, 2011.

[17] F. A. Sultan and J. J. Day, “Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function,” *Epigenomics*, vol. 3, no. 2, pp. 157–181, 2011.

[18] L. Lande-Diner, J. Zhang, I. Ben-Porath, N. Amariglio, I. Keshet, M. Hecht, V. Azuara, A. G. Fisher, G. Rechavi, and H. Cedar, “Role of DNA Methylation in Stable Gene Repression,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 16, pp. 12194–12200, Apr. 2007.

[19] C. H. Waddington, “The epigenotype. 1942,” *Int. J. Epidemiol.*, vol. 41, no. 1, pp. 10–13, 2012.

[20] C. Dupont, D. R. Armant, and C. A. Brenner, “Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective,” *Semin. Reprod. Med.*, vol. 27, no. 5, pp. 351–357, 2009.

[21] Y. Zhang and D. Reinberg, “Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails,” *Genes Dev.*, vol. 15, no. 18, pp. 2343–2360, 2001.
[22] V. Ambros, “microRNAs: tiny regulators with great potential,” *Cell*, vol. 107, no. 7, pp. 823–826, 2001.
[23] J. S. Griffith and H. R. Mahler, “DNA ticketing theory of memory,” *Nature*, vol. 223, no. 5206, pp. 580–582, 1969.
[24] M. Kulis and M. Esteller, “DNA methylation and cancer,” *Adv. Genet.*, vol. 70, pp. 27–56, 2010.
[25] M. Noyer-Weidner and T. A. Trautner, “Methylation of DNA in Prokaryotes,” in *DNA Methylation*, D. J.-P. Jost and D. H.-P. Saluz, Eds. Birkhäuser Basel, 1993, pp. 39–108.
[26] J. Tost, “DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker,” *Mol. Biotechnol.*, vol. 44, no. 1, pp. 71–81, 2010.
[27] R. Chahwan, S. N. Wontakal, and S. Roa, “Crosstalk between genetic and epigenetic information through cytosine deamination,” *Trends Genet. TIG*, vol. 26, no. 10, pp. 443–448, 2010.
[28] H.-J. Müller, *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*, Heidelberg u.a.: Spektrum Akademischer Verlag, pp. 1-7, 9-11, 61-73, 2001.
[29] E. van Pelt-Verkuil, A. van Belkum, and J. P. Hays, *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer, pp. 9-14, 17-22, 2008.
[30] “On-chip Device for Isothermal, Chemical Cycling Polymerase Chain Reaction (ccPCR).”[Online].Available: http://microfluidics.stanford.edu/Projects/Current/OnChipPCR.html. [Accessed: 19-May-2014].
[31] M. McPherson and S. Møller, *PCR*. 2. Auflage, Taylor & Francis Group, pp. 1-6, 9-20, 2006.
[32] A. S. Kaledin, A. G. Sliusarenko, and S. I. Gorodetskiĭ, “Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophylic bacteria Thermus aquaticus YT-1,” *Biokhimiia Mosc. Russ.*, vol. 45, no. 4, pp. 644–651, 1980.
[33] “Colombia Médica - PCR en tiempo real. Modelo de aplicación en dengue.” [Online]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342011000200016&lng=es&nrm=iso. [Accessed: 20-May-2014].
[34] T. Dorak, “An introduction to real-time PCR,” in *Real-Time PCR*, Taylor & Francis Ltd., pp. 1-37, 2006.
[35] “SYBR® Green Detection Method.” [Online]. Available: http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m05_07_a.htm. [Accessed: 22-May-2014].
[36] T. K. Wojdacz, A. Dobrovic, and L. L. Hansen, “Methylation-sensitive high-resolution melting,” *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 12, pp. 1903–1908, 2008.
[37] M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, and C. L. Paul, “A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 89, no. 5, pp. 1827–1831, 1992.
[38] M. Erali, K. V. Voelkerding, and C. T. Wittwer, “High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 85, no. 1, pp. 50–58, 2008.
[39] S. J. Clark, J. Harrison, C. L. Paul, and M. Frommer, “High sensitivity mapping of methylated cytosines.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 15, pp. 2990–2997, 1994.
[40] “3 Methoden.” [Online]. Available: http://www.grailmaster.com/genetics/diplomhtml/methoden.htm. [Accessed: 23-May-2014].
[41] R. H. A. M. Vossen, E. Aten, A. Roos, and J. T. den Dunnen, “High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening,” *Hum. Mutat.*, vol. 30, no. 6, pp. 860–866, 2009.
[42] “Lecture Notes.” [Online]. Available: http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture9.html. [Accessed: 23-May-2014].

[43] F. Malentacchi, G. Forni, S. Vinci, and C. Orlando, “Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 12, p. e86, 2009.
[44] F. Migheli, A. Stoccoro, F. Coppedè, W. A. Wan Omar, A. Failli, R. Consolini, M. Seccia, R. Spisni, P. Miccoli, J. C. Mathers, and L. Migliore, “Comparison Study of MS-HRM and Pyrosequencing Techniques for Quantification of APC and CDKN2A Gene Methylation,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, p. e52501, 2013.
[45] T. K. Wojdacz, L. L. Hansen, and A. Dobrovic, “A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies,” *BMC Res. Notes*, vol. 1, no. 1, p. 54, 2008.
[46] S. Marsh, “The History of Pyrosequencing,” in *Pyrosequencing Protocols*, Totowa, N.J: Humana Press, pp. 1-13, 2007.
[47] M. Ronaghi, “Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing,” *Genome Res.*, vol. 11, no. 1, pp. 3–11, 2001.
[48] M. Ronaghi, M. Uhlén, and P. Nyrén, “A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate,” *Science*, vol. 281, no. 5375, pp. 363–365, 1998.
[49] R. England and M. Pettersson, “Pyro Q-CpG™: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing®,” *Nat. Methods*, vol. 2, no. 10, 2005.
[50] Pal Nyren, “Using polymerase chain reaction to extend a primer and release inorganic pyrophosphate, then detecting release of inorganic phosphate to identify base complementary to target position; removing unincorporated nucleotides using enzyme.”
[51] M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlén, and P. Nyrén, “Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release,” *Anal. Biochem.*, vol. 242, no. 1, pp. 84–89, 1996.
[52] “Nucleoside triphosphates - IBA.” [Online]. Available: https://www.iba-lifesciences.com/Nucleoside_triphosphates_Products.html?page=12. [Accessed: 02-Jun-2014].
[53] Qiagen, PyroMark®, “PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents Handbook.”
[54] I. L. M. Candiloro, T. Mikeska, and A. Dobrovic, “Assessing combined methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing for the analysis of heterogeneous DNA methylation,” *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.*, vol. 6, no. 4, pp. 500–507, 2011.
[55] “Promoter Database.” [Online]. Available: https://cb.utdallas.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=home. [Accessed: 21-Jul-2014].
[56] S. J. Myers, J. Peters, Y. Huang, M. B. Comer, F. Barthel, and R. Dingledine, “Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural-specific expression, multiple promoters, and regulatory elements,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 18, no. 17, pp. 6723–6739, 1998.
[57] Qiagen, QIAamp®, “DNA Mini and Blood Mini Handbook. 2010.”
[58] Thermo Scientific®, “NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual.”
[59] Qiagen, EpiTect®, “Fast Bisulfite Conversion Handbook. 2012.”
[60] “Home - Nucleotide - NCBI.” [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/. [Accessed: 21-Jul-2014].
[61] “OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator.” [Online]. Available: http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html. [Accessed: 21-Jul-2014].
[62] “Oligo Analyzer.” [Online]. Available: http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/. [Accessed: 21-Jul-2014].
[63] “RNAfold web server.” [Online]. Available: http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi. [Accessed: 21-Jul-2014].
[64] “uMelt - Melting Curve Prediction Software for Single, Batch, and Multiplex PCR Products.” [Online]. Available: https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html. [Accessed: 19-Dec-2014].
[65] Qiagen, EpiTect®, “HRM PCR Handbook.”
[66] W. Gottwald, *Statistik für Anwender*. Weinheim; Berlin; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto: Wiley-VCH, 1999.
[66] Office of Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC: Assigning values to non-detected/non-quantified pesticide residues in human health

food exposure assessments. March 23, 2000
(http://www.epa.gov/oppfead1/trac/science/trac3b012.pdf)

G Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Maximilian Klingler
Geburtsdatum	07.11.1987
Geburtsort	Innsbruck, Österreich
E-Mail Adresse	klinglermaximilian@gmail.com

Ausbildung

1992 – 1998	Volksschule in Allerheiligen, Innsbruck
1998 – 2002	Hauptschule Hötting-West, Innsbruck
2002 –2007	HTL Elektrotechnik, Innsbruck
2008 – 2012	Bakkalaureatsstudium der Chemie an der Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck
Sommer 2012	Bachelorarbeit zum Thema „Synthese und in vitro Charakterisierung eines stabilisierten Minigastrin-Analogons, derivatisiert mit DOTA für die radioaktive Markierung mit Radiometallen“
2012 – 2015	Masterstudium der Chemie an der Universität Wien
Seit Sept 2013	Masterarbeit am Institut für Analytische Chemie der Universität Wien

Bisherige Tätigkeiten

Sommer 2004, 2005, 2006	Ferialpraktikum bei der Tiroler Wasserkraft AG
Sommer 2007	Ferialarbeit bei der Tiroler Wasserkraft AG
Okt 2007 – Jun 2008	Zivildiener, Rotes Kreuz Tirol
Sommer 2009, 2010, 2011	Ferialpraktikum an der Universitätsklinik für Nuklearmedizin der Medizinischen Universität Innsbruck, Abteilung Radiopharmazie
Apr 2012 – Jun 2012	Freizeitbetreuung an der Volksschule Hötting
Nov 2014, Mär 2015	Tutor am Institut für Analytische Chemie der

	Universität Wien, Betreuung des Lebensmittelanalytischen Praktikums für Ernährungswissenschaftler

Wissenschaftliche Arbeiten

Jul 2014	14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Bratislava Posterbeitrag: “Determination of the DNA methylation status of AMPA receptors in rats by methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing”

Zusätzliche Qualifikationen

Jul 2005	Führerschein der Klasse B
Okt – Nov 2008	Ausbildung zum Rettungssanitäter
Mär 2009	Einstiegs - Seminar der Pfadfinder und Pfadfinderinnen Österreich (PPÖ)
Jän 2010	Grundlagen - Seminar der Pfadfinder und Pfadfinderinnen Österreich (PPÖ)