

DNA-Methylierungsprofil von
humanen spermatogonialen Stammzellen
auf Einzelzell- und Einzelallel-Ebene

und

Der Einfluss von frühkindlichem Stress
auf die Krankheit der Tuberösen Sklerose
im *Tsc2*^{+/-}-Mausmodell

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Desiree Lucia Fend-Guella

Mainz im Oktober 2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VIII
Projekt 1: DNA-Methylierungsanalyse von humanen spermatogonialen Stammzellen	VIII
Projekt 2: Der Einfluss von ELS auf TSC	IX
Abstract	XI
Project 1: DNA Methylation Analysis of human Spermatogonial Stem Cells	XI
Project 2: The Impact of ELS on TSC	XII
1. Einleitung	1
1.1 Projekt 1: DNA-Methylierungsanalyse von hSSCs	2
1.1.1 Epigenetik	2
1.1.2 Histon-Modifikationen	2
1.1.3 DNA-Methylierung	4
1.1.4 Genomische Prägung	7
1.1.5 Epigenetische Reprogrammierung	8
1.1.5.1 Reprogrammierung in der Zygote	9
1.1.5.2 Reprogrammierung in männlichen primordialen Keimzellen.....	10
1.1.6 Männliche Keimzellen im Erwachsenen	11
1.1.7 Epigenetik und männliche Infertilität.....	12
1.1.8 Therapeutischer Einsatz von hSSCs.....	13
1.1.9 Ziel der Arbeit	15
1.2 Projekt 2: Der Einfluss von ELS auf TSC	16
1.2.1 Frühkindlicher Stress und maternaler Einfluss.....	16
1.2.2 Die biologische Stressantwort	18
1.2.2.1 An der Stressreaktion beteiligte Hirnregionen.....	18
1.2.2.2 Endokrine Systeme der Stressreaktionen	22
1.2.2.2.1 Beteiligung der SAM-Achse an der Stressantwort	23
1.2.2.2.2 Beteiligung der HPA-Achse an der Stressantwort	25
1.2.2.3 Das Lernen und Erinnern von Furcht	27
1.2.2.4 Biologische Folgen von chronischem Stress.....	31
1.2.3 Die Folgen von frühkindlichem Stress.....	32
1.2.3.1 Permanente Störung der HPA-Achse	32
1.2.3.2 Reduktion des Gehirngewebes	33
1.2.3.3 Epigenetische Veränderungen	34
1.2.4 Frühkindlicher Stress im Mausmodell	35
1.2.5 Tuberöse Sklerose	36
1.2.5.1 Tuberöse Sklerose im Mausmodell	39
1.2.5.2 Tuberöse Sklerose und Stress	39
1.2.6 Ziel der Arbeit	40

2. Material und Methoden.....	42
2.1 Projekt 1: DNA-Methylierungsanalyse von hSSCs	42
2.1.1 Patienten, Hodenbiopsien und Stellungnahme der Ethikkommission.....	42
2.1.2 Extraktion von Spermato gonien aus Hodenbiopsien	42
2.1.3 DNA aus Spermien und aus Lymphozyten	43
2.1.4 Auswahl der Kandidaten-Gene.....	43
2.1.5 Primer-Design.....	44
2.1.6 Bisulfit-Konvertierung	45
2.1.7 <i>Limiting Dilution</i> und DNA-Amplifikation.....	46
2.1.8 Pyrosequenzierung.....	49
2.1.9 Datenanalyse.....	51
2.1.10 Visualisierung der Daten und statistische Auswertung	51
2.2 Projekt 2: Der Einfluss von ELS auf TSC	57
2.2.1 Haltun gsbedingungen der Mäuse	57
2.2.2 Mauslinien.....	57
2.2.3 ELS-Paradigma	57
2.2.4 Evaluation des maternalen Verhaltens während des ELS-Paradigmas.....	60
2.2.5 Körpergewicht.....	60
2.2.6 Corticosteron (CORT)-Messung im Blutserum.....	61
2.2.7 Bestimmung des <i>Tsc2</i> -Genotyps	61
2.2.7.1 DNA-Extraktion.....	61
2.2.7.2 Genotypisierung-PCR.....	61
2.2.7.3 Genotyp-Bestimmung durch Agarose-Gelelektrophorese	63
2.2.8 Verhaltensversuche mit ELS- und Kontrollnachkommen.....	63
2.2.8.1 <i>Novel Object Recognition</i> -Test.....	64
2.2.8.2 Episodisches Gedächtnis-Testbatterie (EGT).....	65
2.2.8.3 <i>Open Field</i> -Test.....	66
2.2.8.4 <i>Social Interaction</i> -Test.....	67
2.2.8.5 <i>Spontaneous Alternation</i> -Test.....	68
2.2.9 Prozessierung der Daten.....	69
2.2.10 Statistische Auswertung und graphische Darstellung	69
2.2.11 Test-Retest-Reliabilität	69
3. Ergebnisse.....	71
3.1 Projekt 1: DNA-Methylierungsanalyse von hSSCs	71
3.1.1 Ergebnisse aus der Untersuchung der 10-Zell-Proben.....	72
3.1.1.1 Paternal geprägte Gene	72
3.1.1.2 Maternal geprägte Gene.....	73
3.1.1.3 Spermato goniale Markergene	74
3.1.1.4 Pluripotenz-Markergene	75

3.1.2 Ergebnisse aus der Untersuchung der Einzelzellen	76
3.1.3 GpGs mit inversen Methylierungsmustern	77
3.2 Projekt 2: Der Einfluss von ELS auf TSC	93
3.2.1 Etablierungsphase	93
3.2.1.1 Maternales Verhalten während der ELS-Phase	94
3.2.1.2 Gewichtsmessungen	94
3.2.1.3 CORT-Konzentration	96
3.2.1.4 24 Stunden-NORT	97
3.2.1.5 7 Tage-NORT	98
3.2.1.6 Episodisches Gedächtnis-Testbatterie (EGT)	100
3.2.2 ELS-Tsc2-Projekt (Projektphase)	102
3.2.2.1 Maternales Verhalten während der ELS-Phase	102
3.2.2.2 Gewichtsmessungen	103
3.2.2.3 <i>Open Field</i> -Test	105
3.2.2.4 <i>Social Interaction</i> -Test	106
3.2.2.5 7 Tage-NORT	107
3.2.2.6 <i>Spontaneous Alternation</i> (SA)-Tests	109
3.2.3 Vergleich der 7 Tage-NORTs der Etablierungs- und der Projektphase	111
3.2.4 Test/Retest-Reliabilität	113
3.2.5 Verpaarungseffizienz und Geburtenrate	117
4. Diskussion	118
4.1 Projekt 1: DNA-Methylierungsanalyse von hSSCs	118
4.1.1 Die Methylierungsmuster elterlich geprägter Gene	119
4.1.2 Interpretation der CpG-Fraktion mit gegenteiliger Methylierung	120
4.1.3 Die Methylierungsmuster spermatogonialer Markergene	122
4.1.4 Die Methylierungsmuster von Pluripotenzgenen	125
4.1.5 Methodische Aspekte	126
4.2 Projekt 2: Der Einfluss von ELS auf TSC	129
4.2.1 Etablierungsphase	129
4.2.1.1 Maternales Verhalten, CORT-Konzentrationen und Gewicht der Nachkommen	129
4.2.1.2 ELS und kognitive Fähigkeiten	130
4.2.2 Projektphase	131
4.2.2.1 Der Einfluss von ELS und <i>Tsc2</i> -Mutation auf das Gewicht der Nachkommen	131
4.2.2.2 Der Einfluss von ELS und <i>Tsc2</i> -Mutation auf das Angst- und Sozialverhalten	132
4.2.2.3 Der Einfluss von ELS und <i>Tsc2</i> -Mutation auf das Langzeitgedächtnis	133
4.2.2.4 Der Einfluss von ELS und <i>Tsc2</i> -Mutation auf das Arbeitsgedächtnis	135
4.2.2.5 Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse mit ähnlichen Studien	135
4.2.2.6 Effekte durch wiederholtes Testen	139
4.2.2.7 Retesten und Resilienz	141

5. Literatur- und Quellenverzeichnis	143
6. Anhang	159
6.1 Abbildungsverzeichnis	159
6.2 Tabellenverzeichnis	160
6.3 Verwendete Materialien und Equipments	161
6.3.1 Chemikalien/Reagenzien.....	161
6.3.2 Puffer, Lösungen und Gele.....	161
6.3.3 Kommerzielle Kits	161
6.3.4 Geräte und Equipment	162
6.3.5 EDV-Programme	162
6.4 Publikationen und Kongressteilnahmen	163
Selbstständigkeitserklärung	164

Zusammenfassung

Projekt 1: DNA-Methylierungsanalyse von humanen spermatogonialen Stammzellen

Humane spermatogoniale Stammzellen (hSSCs) stellen eine Subpopulation von Spermatogonien (SPG) dar, welche die Kapazität zur Selbsterneuerung haben und eine lebenslange Spermatogenese gewährleisten. Im therapeutischen Rahmen einer Infertilitätsbehandlung können hSSCs zur Wiederaufnahme der Spermatogenese nach einer gonadotoxischen Exposition oder von männlichen Erwachsenen mit Keimzellen im Meiose-Arrest eingesetzt werden. In diesem Kontext ist die *in vitro*-Vermehrung von hSSCs erforderlich, jedoch kann dies zur Bildung von Teratomen führen und die epigenetische Signatur verändern. Aus diesem Grund ist die molekulargenetische Charakterisierung von hSSCs vor einer *in vitro*-Kultur essentiell und aktuell Gegenstand der Forschung. Nicht-proliferierende und nicht-differenzierende SPG exprimieren das Protein „Fibroblast Growth Factor Receptor 3“ (FGFR3) auf der Zellmembranoberfläche (FGFR3⁺-SPG). Hingegen enthalten SPG, welche in den Prozess der Zelldifferenzierung geschleust werden, kein FGFR3 (FGFR3⁻-SPG). In diesem Teilprojekt wurde die DNA-Methylierung in den regulatorischen Regionen von paternal (*H19*, *MEG3*) und maternal (*KCNQ1OT1*, *PEG3*, *SNRPN*) geprägten Genen, von SPG-Markergenen (*FGFR3*, *GFRA1*, *PLZF*, *L1TD1*) und von Pluripotenzgenen (*POU5F1/OCT4*, *NANOG*) in unkultivierten FGFR3⁺- und FGFR3⁻-SPG untersucht und mit der DNA-Methylierung von Spermien und somatischen Zellen verglichen. Unter Anwendung der *Limiting Dilution* (LD)-Methode und Bisulfit-Pyrosequenzierung wurde das Methylierungsmuster von einzelnen Zellen und einzelnen Allelen erfasst. Die untersuchten Kontrollregionen der paternal geprägten Gene und der Pluripotenzgene waren in FGFR3⁺-SPG, FGFR3⁻-SPG und Spermien methyliert. Im Gegensatz dazu waren die regulatorischen Regionen der maternal geprägten Gene und der SPG-Markergene in den Keimzellen unmethyliert. Bei näherer Betrachtung der Methylierung der elterlich geprägten Gene fiel eine Fraktion einzelner Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Dinukleotide und Allele auf, die eine gegenteilige (inverse) Methylierung aufwiesen. Der Anteil dieser Fraktion war am größten in FGFR3⁺-SPG, geringer oder abwesend in FGFR3⁻-SPG und abwesend in Spermien. In der männlichen Keimbahn wird die DNA-Methylierung fast vollständig aufgehoben und geschlechtsspezifisch neu gesetzt. Dabei werden die elterlich geprägten Gene und sogar die Allele eines geprägten Gens asynchron remethyliert. Das detektierte Muster invers methylierter CpGs und Allele deutete daher auf gen- und allelspezifische Methylierungsdynamiken hin, die während der Spermatogenese erfolgen. Daraus lässt sich das Fazit ziehen, dass die in der Keimbahn einsetzende Remethylierung in SPG noch nicht vollständig abgeschlossen ist, sondern erst in ausgereiften Spermien. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erkenntnissen

anderer Studien zur DNA-Methylierung von humanen und murinen Keimzellen in verschiedenen Differenzierungsstadien überein. Im biologischen Kontext sind während der Spermatogenese genetische Prozesse erforderlich, welche der männlichen Keimzelle ihre Identität verleihen und sie dadurch in ein entsprechendes Stadium versetzen bzw. den Übergang in das nächste Stadium induzieren.

Die untersuchte Kontrollregion von *FGFR3* war in beiden SPG-Gruppen und den Spermien unmethyliert. Jedoch wurde *FGFR3* nur in der Zellmembran von in nicht-proliferierenden und nicht-differenzierenden SPG detektiert und entsprechend als hSSC-Marker zur Zellselektion für diese Arbeit verwendet. Da auch andere Studien *FGFR3* als hSSC-Marker bestätigt haben, trägt entweder eine andere regulatorische Region oder ein anderer epigenetischer oder zellspezifischer Mechanismus dazu bei, dass *FGFR3* nur an der Zelloberfläche von hSSCs auftritt.

Projekt 2: Der Einfluss von ELS auf TSC

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von frühkindlichem Stress (*early-life stress*, ELS) auf die Krankheit der Tuberösen Sklerose (*Tuberous sclerosis complex*, TSC) in einem *Tsc2*^{+/-}-Mausmodell untersucht. Es wurde ein in der Wissenschaft häufig verwendetes ELS-Paradigma adaptiert, bei dem Mütter zusammen mit ihrem Wurf vom postnatalen Tag 2 bis 9 in einem spärlich ausgestatteten Versuchskäfig mit reduziertem Nistmaterial verbrachten. Dieses ELS-Paradigma wurde mit C57BL/6J-Mäusen etabliert. Aufgrund einer signifikant veränderten Mutter-Kind-Interaktion während der ELS-Phase sowie zudem signifikant erhöhten Corticosteron-Werten und einer signifikanten Gewichtsreduktion bei den ELS-Nachkommen wurde das ELS-Paradigma als validiert betrachtet. Die Nachkommen der Etablierungsphase wurden ferner im Alter von 8 bis 16 Wochen hinsichtlich ihrer Kurz- und Langzeiterinnerung analysiert. Es gab keine Hinweise darauf, dass die kognitive Kapazität durch ELS beeinträchtigt war. Jedoch fielen ältere ELS-Nachkommen durch eine signifikant verminderte Erkundungszeit auf.

Zur Untersuchung des Einflusses von ELS auf TSC wurden C57BL/6J-Mütter mit *Tsc2*^{+/-}-Männchen verpaart. Abhängig von ihrer Stresserfahrung (kein Stress / ELS) und ihrem Genotypen (*Tsc2*^{+/-} / Wildtyp) wurden vier Gruppen analysiert: (1) wildtypische ungestresste Kontrollmäuse (KONT-wt), (2) ungestresste *Tsc2*^{+/-}-Tiere (KONT-het), (3) wildtypische ELS-Tiere (ELS-wt) und (4) ELS-erfahrene *Tsc2*^{+/-}-Mäuse (ELS-het). Die Tiere wurden im Alter von 2, 4 und 6 Monaten hinsichtlich ihres Angst- und Sozialverhaltens untersucht. Zusätzlich wurden die Mäuse im Alter von 4 und 6 Monaten auf ihre kognitiven Fähigkeiten überprüft.

Die Mäuse wurden wiederholt getestet (Retest), um einen fortschreitenden Einfluss von entweder ELS oder der *Tsc2*-Mutation festzustellen.

Zwei Monate alte ELS-wt-Mäuse waren weniger ängstlich und sozial interaktiver, was auf einen anxiolytischen Effekt durch ELS hindeuten könnte. Im Alter von 4 Monaten fielen ELS-het-Tiere durch verminderte Leistung des Arbeitsgedächtnisses auf, während ihr Langzeitgedächtnis unbeeinträchtigt war. Zudem zeigte diese Gruppe erhöhtes Interesse bzw. erhöhte Motivation während des Versuchs, was bis zum Alter von 6 Monaten fortbestand. Diese Beobachtung könnte auf einen protektiven Effekt durch ELS bei bestehender *Tsc2*-Mutation deuten. Die ersten Hinweise auf eine negative Auswirkung von ELS zeigte die ELS-wt-Gruppe im Alter von 6 Monaten durch eine verminderte Langzeiterinnerung.

Insgesamt waren die hier nachgewiesenen Unterschiede subtil und nicht konsistent. Da in der Literatur deutliche Effekte für jeden der beiden untersuchten Faktoren „ELS“ bzw. „*Tsc2*-Mutation“ beschrieben wurden, wurde überprüft, ob wiederholte Verhaltenstests einen zusätzlichen Einfluss auf die hier untersuchten Tiere hatten. Dabei zeigte sich, dass sich wildtypische Test-erfahrene Mäuse signifikant anders als Test-naive Mäuse verhielten. Somit wurde ein Retest-Effekt bestätigt. In diesem Kontext könnten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hindeuten, dass wiederholtes Testen die negativen Folgen einer frühkindlichen Stresserfahrung bzw. die Entwicklung einer TSC-Symptomatik – zumindest auf Verhaltens-ebene – hinauszögern könnte.

Abstract

Project 1: DNA Methylation Analysis of human Spermatogonial Stem Cells

Human spermatogonial stem cells (hSSCs) constitute a subpopulation of spermatogonia (SPG) possessing self-renewal capacity and enabling a life-long spermatogenesis. For clinical purposes hSSCs can be implemented for infertility treatment after gonadotoxic exposition or for the re-initiation of spermatogenesis of adult males suffering from meiotic arrest. In this context, the *in vitro* propagation of hSSCs is required, which appears challenging, because the occurrence of teratomas and changes in the epigenetic signature has been demonstrated. Thus, the epigenetic characterization of hSSCs prior to *in vitro* systems is required and of scientific interest. Non-proliferating and non-differentiating SPG contain the protein fibroblast growth receptor 3 (FGFR3) on the cell membrane surface (FGFR3⁺ SPG). In contrast, SPG, which are introduced into the process of cell differentiation, do not contain FGFR3 (FGFR3⁻ SPG). In this subproject, the DNA methylation in the regulatory regions of paternally (*H19*, *MEG3*) and maternally (*KCNQ1OT1*, *PEG3*, *SNRPN*) imprinted genes, SPG marker genes (*FGFR3*, *GFRA1*, *PLZF*, *L1TD1*) and pluripotency genes (*POU5F1/OCT4*, *NANOG*) was analyzed in uncultivated FGFR3⁺ and FGFR3⁻ SPG and compared with the DNA methylation of sperm and somatic cells. The “limiting dilution” (LD) method combined with bisulfate-pyrosequencing enabled to deduct methylation patterns of single cells and single alleles. The investigated regions of paternally imprinted genes and pluripotency genes were methylated in FGFR3⁺ SPG, FGFR3⁻ SPG, and spermatozoa. However, the analyzed regions of the maternally imprinted genes and SPG marker genes in the germ cell samples were unmethylated. The detailed examination of the results for the imprinted genes revealed a fraction of single cytosine-phosphate-guanine (CpG) dinucleotides and alleles exhibiting opposite (inverse) methylation values. The proportion of this fraction was largest in FGFR3⁺ SPG, lower or absent in FGFR3⁻ SPG and absent in sperm samples. In the male germ line, DNA methylation is almost completely erased and re-set in a gender-specific manner by which the imprinted genes and even the alleles of an imprinted gene are remethylated asynchronously. Therefore, the detected pattern of inversely methylated CpGs and alleles indicated gene- and allele-specific methylation dynamics during spermatogenesis. The results imply, that the re-methylation process, which already started in the embryonic germ line, is not yet fully completed in SPG, but only in mature sperm. The project's results are in agreement with the findings of other studies investigating DNA methylation of human and murine germ cells of different stages.

In the biological context, genetic processes are required during spermatogenesis to define the male germ cell's identity and corresponding differentiation stage or to induce the transition to the next stage.

The investigated control region of *FGFR3* occurred unmethylated in the SPG samples and in spermatozoa. However, *FGFR3* was detected only in the cell membrane of non-proliferating and non-differentiating SPG and was accordingly used as hSSC marker to select the examined cells. Since other studies have also confirmed *FGFR3* as hSSC marker, either a different regulatory region or another epigenetic or cell-specific mechanism contributes to the fact that *FGFR3* only occurs on the cell surface of hSSCs.

Project 2: The Impact of ELS on TSC

In the present thesis, the impact of early-life stress (ELS) on the Tuberous Sclerosis Complex (TSC) disease was investigated in a *Tsc2*^{+/-} mouse model. A validated ELS paradigm was adapted, in which dams together with their pups were transferred into cages with reduced nesting and bedding (LBN paradigm) from postnatal day 2 until 9. First, the ELS paradigm was established on C57BL/6J mice. A significantly altered mother-child interaction during the ELS period was detected. Furthermore, significantly increased corticosterone levels and a significant body weight reduction were found in the ELS offspring, which confirmed the efficiency of the ELS paradigm. At the age of 8 to 16 weeks, offsprings of control and ELS dams were further analyzed regarding their short-term and long-term memory. There was no evidence that ELS affected the cognitive capacity. However, the ELS offspring seemed to explore significantly less.

To investigate the influence of ELS on TSC, C57BL/6J dams were mated with *Tsc2*^{+/-} males. Thus, four groups were analyzed with respect to their ELS experience and genotype: (1) wild-type control animals (KONT-wt), (2) *Tsc2*^{+/-} control mice (KONT-het), (3) wild-type ELS mice (ELS-wt) and (4) *Tsc2*^{+/-} ELS animals (ELS-het). The animals were examined at the ages of 2, 4 and 6 months regarding anxiety and social behavior. At the age of 4 and 6 months, the mice were additionally tested for cognitive abilities regarding spatial and working memory, and long-term memory. The mice were repeatedly tested (re-test) to detect a progressive influence due to either ELS or the *Tsc2* mutation.

Two-month-old ELS-wt mice were less anxious and socially more interactive, which might indicate an anxiolytic effect of ELS. At the age of 4 months, ELS-het animals showed a reduced working memory performance, while their long-term memory was unaffected.

In addition, this group showed increased interest or motivation during performance of the experiments, which persisted until the age of 6 months. This observation might indicate a protective effect of ELS on the *Tsc2* mutation. The first negative impact due to ELS was found in the 6 months old ELS-wt group in terms of long-term memory capacity.

Collectively, the differences found in this project were subtle and inconsistent. However, since distinct effects were described in the literature for both, ELS and the *Tsc2* mutation, it was further considered, whether repeated behavior tests had an additional effect on the analyzed mice. It turned out, that wild-type mice with a test-history behaved significantly differently from test-naive mice. Moreover, an effect due to re-testing was confirmed. In this context, the results of this work might indicate that repeated testing and challenging may delay the negative consequences of an early-life stress experience or the development of TSC symptoms - at least at the behavioral level.

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Projekte. Im ersten Projekt wurde das DNA-Methylierungsprofil von humanen spermatogonialen Stammzellen untersucht. Humane spermatogoniale Stammzellen (*human spermatogonial stem cells*, hSSCs) stellen eine Subpopulation von Spermatogonien (SPG) dar, die als unipotente Stammzellen eine lebenslange Spermatogenese gewährleisten. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit zur Erhaltung ihrer Zellpopulation, können sich jedoch auch zu differenzierteren Keimzelltypen entwickeln. Die Charakterisierung dieser wenigen Zellen (Fayomi & Orwig, 2018) ist grundlegend für eine mögliche klinische Anwendung in der Fruchtbarkeitsbehandlung von männlichen Erwachsenen, die an genetisch bedingter Azoospermie leiden oder deren Spermien sich im meiotischen Arrest befinden. Ein weiterer Therapieeinsatz wäre die Erhaltung der Fruchtbarkeit von prä-pubertären Jungen nach einer gonadotoxischen Krebsbehandlung (Jahnukainen, Mitchell & Stukenborg, 2015; Mulder et al., 2016). In diesem Projekt wurden die DNA-Methylierungsprofile in den regulatorischen Regionen elf verschiedener Gene von SPG/potenziellen hSSCs auf Einzelzell- und Einzelallel-Ebene untersucht und mit reifen Spermien und somatischen Zellen verglichen.

Im zweiten Projekt wurde der Einfluss von frühkindlichem Stress auf die Krankheit Tuberoöse Sklerose am Mausmodell untersucht. Tuberoöse Sklerose (Tuberoöse Sklerose-Komplex, *Tuberous Sclerosis Complex*, TSC) ist eine komplexe Systemerkrankung, die autosomal dominant vererbt wird und mit einer Prävalenz von 1/25.000-1/11.300 in der Allgemeinbevölkerung Europas auftritt (Orphanet, Curatolo, 2015). Über 90 % der betroffenen Erwachsenen haben Fehlbildungen und Tumore im Gehirn und anderen Organen und zeigen Hautveränderungen. Häufig geht die Krankheit mit Epilepsie und kognitiven Störungen einher (Curatolo, Bombardieri & Jozwiak, 2008).

Stresshafte Lebensereignisse im frühkindlichen und Erwachsenenalter resultieren in Kurz- und Langzeitveränderungen physiologischer, molekularer und psychologischer Mechanismen. Besonders im frühen Kindesalter erfahrener Stress beeinflusst das Verhalten sowie kognitive und physiologische Funktionen insofern, dass die Anfälligkeit für psychische Störungen wie Depression, Verhaltensauffälligkeiten oder Angststörungen erhöht ist (Franklin, Saab & Mansuy, 2012; McEwen, Gray & Nasca, 2015). Zwei Studien haben im Mausmodell jedoch gezeigt, dass frühkindlicher Stress, abhängig von Dauer und Intensität, ein gemindertenes Angstverhalten zur Folge haben kann (Bondar, Lepeshko & Reshetnikov, 2018; Savignac, Dinan & Cryan, 2011). Daran angelehnt wurde in diesem Projekt in einem TSC-Mausmodell auf Verhaltensebene untersucht, ob frühkindlicher Stress einen additiven oder gar protektiven Einfluss haben könnte.

1.1 Projekt 1: DNA-Methylierungsanalyse von hSSCs

1.1.1 Epigenetik

Der Biologe Conrad Waddington untersuchte die Zusammenhänge zwischen Genen und ihren Produkten in Verbindung mit phänotypischen Ausformungen und prägte 1940 den Begriff „Epigenetik“ (griech. *epi* für „auf“: i.S.v. „oberhalb der Genetik“). Während die erbliche Information in der DNA-Sequenz kodiert ist, umfasst Epigenetik nach heutiger Auffassung die reversible und dynamische Regulation der Genexpression innerhalb der Zelle (Zaidi et al., 2011; Szulwach und Jin, 2014).

Prokaryoten verwenden epigenetische Mechanismen zur Detektion und Eliminierung von viraler oder fremder prokaryotischer DNA, ferner bei der Replikation und DNA-Reparatur. Bei Eukaryoten sind epigenetische Prozesse deutlich komplexer aufgestellt und fundamental bei der Entwicklung und Vererbung. Inzwischen ist bekannt, dass Epigenetik nicht nur durch endogene Prozesse, sondern auch durch externe Einflüsse und Umweltfaktoren beeinflusst wird (Walter, 2015a).

Zu den epigenetischen Mechanismen gehören chemische reversible kovalente und nicht-kovalente Modifikationen auf DNA- und Histonebene und bestimmte RNA-Moleküle (RNA-Interferenz), welche im Zusammenspiel die Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsmaschinerie beeinflussen, ein spezifisches Expressionsmuster herbeiführen und einer Zelle Identität verleihen. Als weitere wichtige epigenetische Faktoren sind Enzyme zu erwähnen, welche die oben genannten chemischen Modifikationen katalysieren. Im Folgenden werden die Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung näher vorgestellt (Walter, 2015a).

1.1.2 Histon-Modifikationen

Histone sind sog. „Verpackungsproteine“ der DNA, welche auf die Genomarchitektur einwirken und dadurch bei der Replikation, DNA-Reparaturprozessen und der Genexpression wesentlich sind. Im Zellkern dimerisieren jeweils zwei H2A- und H2B-Histone und jeweils zwei H3- und H4-Histone und bilden ein Oktamer, um welches sich 146 bp DNA aufwinden (Graw, 2016; Henneman, van Emmerik, van Ingen & Dame, 2018). Diese Histon-DNA-Komplexe werden als Nukleosomen bezeichnet, die in der Zelle perlenartig aufgereiht auftreten. Ein weiteres Histonprotein, H1, verhilft zur nächst höheren „Verpackungsebene“ des Genoms, bis schließlich die Struktur des Heterochromatins erreicht und die DNA maximal kondensiert ist (Graw, 2016). Der Zustand der maximalen Kompaktheit eines DNA-Moleküls (Chromosom) oder auch nur bestimmter DNA-Regionen sind mit genetischer Inaktivierung assoziiert, während frei zugängliche DNA mit aktiver Genexpression in

Zusammenhang gebracht wird (Gaspar-Maia, Alajem, Meshorer & Ramalho-Santos, 2011; Graw, 2016).

Die C-, überwiegend jedoch die N-Termini der Histone, aber auch der Kontaktbereich zur DNA sind post-translational Ziel chemischer Modifikationen und steuern den Grad der Kompaktheit und folglich der DNA-Zugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie (Strahl & Allis, 2000; Wang et al., 2011). Je nach Art der Modifikation beeinflussen sterische Bedingungen die Assoziationsstärke der Nukleosomen und die Anlagerungsmöglichkeit von z.B. Transkriptionsfaktoren oder Polymerasen. Folgende chemische Modifikationen sind bekannt: Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, Sumoylierung und Biotinylierung (Brune & Brune, 2017; Cubeñas-Potts & Matunis, 2013; Kothapallia et al., 2005). Dabei zählen die vier erstgenannten Modifikationen zu den häufigsten. Die Modifikationen werden sequenz- oder aminosäurespezifisch von Histon-modifizierenden Proteinen gesetzt bzw. entfernt. Ob die DNA aufgelockert vorliegt und dekodiert werden kann, hängt davon ab, welche Aminosäure des N- bzw. C-Terminus wie häufig (z.B. ein-, zwei- oder dreifach methyliert) durch welches Histon-modifizierendes Protein modifiziert wird (Greer & Shi, 2014; Jenuwein & Allis, 2001).

Am meisten untersucht sind die Modifikationen Acetylierung und Methylierung. Bei der Acetylierung übertragen Histonacetylasen (auch: Histonacetyltransferasen, HATs) Acetylgruppen auf Histone. Hingegen entfernen Histon-Deacetylasen (HDACs) die chemische Modifikation. Während Acetylierung mit einer erhöhten Genexpression assoziiert ist, korreliert Deacetylierung mit einer Genstilllegung oder -repression (Ito, J Barnes & M Adcock, 2000).

Histon-Methyltransferasen (HMTs) katalysieren die Addition von Methylgruppen. Histon-Demethylasen (HDMTs) spalten gesetzte Methylgruppen von Histonen ab. Die Methylierung von Histonen geht mit reduzierter oder reprimierter Genexpression einher. Unmethylierte Histone sind mit aktiver Genexpression assoziiert (Gaspar-Maia et al., 2011; Jenuwein & Allis, 2001).

Da die histonassoziierte Genregulation auf vielfältige Weise erfolgen kann, wurde in den letzten Jahren der Begriff: „Histon-Code“ etabliert. Eine Übersicht über die derzeit bekannten Modifikationsmöglichkeiten der einzelnen Histone und die beteiligten Proteine illustriert Abbildung 1.1.1 (entnommen aus: Xu *et al.*, 2017).

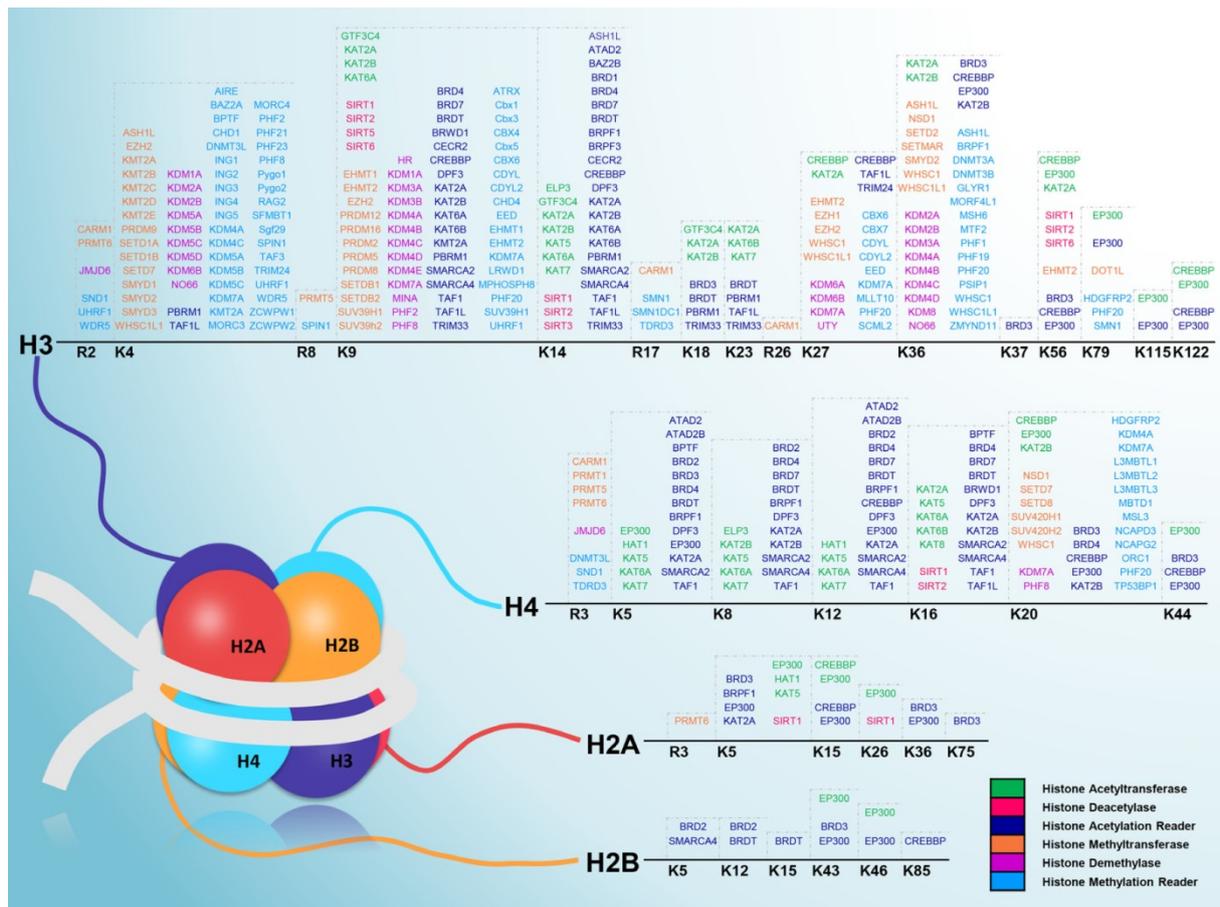


Abbildung 1.1.1: Histon-Code

Übersicht über die humanen aminosäurespezifischen Modifikationen inklusive der Histon-modifizierenden Proteine der vier Nukleosom-bildenden Histone H2A, H2B, H3 und H4 (aus: Xu et al., 2017).

1.1.3 DNA-Methylierung

Die prominenteste epigenetische Modifikation auf DNA-Ebene ist die DNA-Methylierung, welche durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert wird. Dabei wird postreplikativ am 5. Kohlenstoffatom der DNA-Base Cytosin meist in der Dinukleotid-Sequenzabfolge 5'-CpG-3' (Cytosin-Phosphat-Guanin) eine Methylgruppe addiert und 5-Methylcytosin (5mC) gebildet (Abbildung 1.1.2), ohne die Basenpaarung zu beeinflussen (Lim & Maher, 2010; Walter, 2015b). Nach der Replikation werden DNA-Methylierungsmuster semikonversativ auf den neu-synthetisierten Strang und folglich auf Tochterzellen übertragen (Baverstock & Rönkkö, 2008; Kim, Samaranyake & Pradhan, 2009). Etwa 3-4 % der Cytosine eines humanen Genoms sind methyliert (Walter, 2015a). DNA-Methylierung ist mit der Inaktivierung der Genexpression assoziiert und findet sich in Regionen nahe der Telomere, in Regionen bestehend aus repetitiven DNA-Elementen, in genregulatorischen Elementen wie Promotoren, *Enhancer* oder *Silencer* und in regulatorischen Regionen genomisch geprägter Gene (*Genomic Imprinting*, s. Punkt 1.1.4). Außerdem sind die Genpromotoren auf

dem inaktivierten X-Chromosom bei Frauen und transposable DNA-Elemente dauerhaft methyliert und transkriptionell stillgelegt (Graw, 2016; Kim et al., 2009; Walter, 2015b).

Im Gegensatz dazu sind die Promotoren von proteinkodierenden Einzelkopie-Genen selten methyliert, obwohl in ihnen CpG-reiche Abschnitte vorliegen. Häufig befinden sich diese Promotoren in der Nähe von sog. CpG-Inseln (CGIs), die sich mit Promotor-Sequenzen überschneiden können. Nicht selten ist die Expression der zugehörigen Gene konstitutiv (Graw, 2016; Moore, Le & Fan, 2013; Rajender, Avery & Agarwal, 2011).

Ferner haben einige genomweite Studien einen Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Repression und der CpG-Dichte in Promotorregionen gezeigt. Promotorregionen mit geringer CpG-Dichte korrelieren demnach nicht mit Gen-Inaktivierung, obwohl sie - abgesehen von ihrem Expressionsstatus - methyliert vorliegen. Andererseits besteht ein starker Zusammenhang zwischen Promotoren mit hoher CpG-Dichte und genetischer Repression, obwohl diese Gene während der Entwicklung selten methyliert werden (Gene des inaktivierten X-Chromosoms und geprägte Gene ausgenommen). Es scheinen daher zusätzliche zelluläre Mechanismen an der Genregulation mitzuwirken. Eine Korrelation zwischen DNA-Methylierung und unterdrückter Genexpression, wie sie in der Wissenschaft allgemein gilt, zeigt sich bei Promotorregionen mit intermediärer CpG-Dichte, die Gene innehaben, welche gewebsspezifische Methylierungsmuster etablieren (Weber et al., 2007).

Die an der DNA-Methylierung beteiligten Enzyme sind sog. DNA-Methyltransferasen (DNMTs), welche eine hoch-konservierte Struktur innehaben. Im Menschen sind folgende DNMTs bekannt:

DNMT1 ist unmittelbar in die DNA-Replikation involviert, indem sie den neu-synthetisierten Strang gemäß dem Vorlagenstrang methyliert. Dadurch erhält sie das zellspezifische Methylierungsprofil und wirkt als epigenetisches Gedächtnis. In dieser erhaltenden Rolle wird sie vom Protein UHRF1 (*ubiquitin-like containing PHD and ring finger domains*) unterstützt, welches hemimethylierte DNA-Doppelstränge erkennt und DNMT1 rekrutiert (Von Meyenn & Reik, 2015; Moore et al., 2013; Walter, 2015a).

DNMT3A und DNMT3B katalysieren die Neu-Methylierung von Cytosinen, unabhängig von einer „Vorlage“ wie bei der Replikation (s.o.), weshalb sie als *de novo*-Methyltransferasen gelten und Methylierungsmuster etablieren. Aufgrund unterschiedlicher Spezifität von DNMT3A und DNMT3B für genomische Regionen, vermittelt eine weitere Methyltransferase, DNMT3L, den Wirkungsort und den Methylierungsbedarf im Genom. DNMT3L reguliert somit die *de novo*-Methylierung, obwohl ihr die eigene enzymatische Kapazität fehlt. DNMT3L

modifiziert ferner Histone, da sie durch Bindung an das Histon H3 die Methylierung der 4. Aminosäure Lysin vermittelt (Walter, 2015a).

Eine weitere Enzymgruppe, die TET-Dioxygenasen, sind im Zusammenhang mit 5mC-Derivaten und der passiven DNA-Demethylierung zu erwähnen (s. Abbildung 1.1.2). Die drei *Ten Eleven Translocation* (TET)-Enzyme TET1, TET2 und TET3 katalysieren schrittweise die Oxidation von 5mC zu Cytosin. Als erstes Zwischenprodukt entsteht 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), welches, abhängig vom Zelltyp, bis zu 10 % aller modifizierten Cytosinbasen ausmachen kann. Danach werden die Metabolite 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxycytosin (5caC) gebildet, welche in Säugetierzellen lediglich zu 0,03 % bzw. 0,01 % vorkommen (Pastor, Aravind & Rao, 2013).

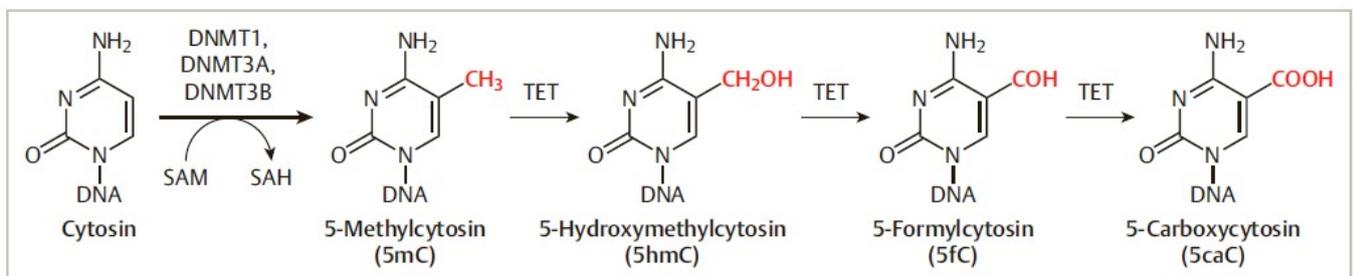


Abbildung 1.1.2: Cytosin-Derivate

DNA-Methyltransferasen addieren unter Anwesenheit des Substrats S-Adenosylmethionin (SAM) eine Methylgruppe (-CH₃) an das 5. Kohlenstoffatom von Cytosin, so dass 5-Methylcytosin (5mC) entsteht. TET-Enzyme oxidieren 5mC zu 5-Hydroxymethylcytosin, 5-Formylcytosin und 5-Carboxycytosin (Abbildung modifiziert nach: Werner, 2015a).

Die Mechanismen der Demethylierung und die genauen Funktionen der TET-Proteine in Bezug auf die Regulation der Genexpression sind noch nicht vollständig aufgeschlüsselt. Mehr Hinweise liegen dafür zum Prozess der aktiven Demethylierung im Zusammenhang mit der Basen-Exzisionsreparatur (BER) vor. Die beiden Cytosin-Derivate 5fC und 5CaC werden hierbei durch die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) erkannt und für den Austausch durch Cytosin vorbereitet. Die Studie von Chen et al. (2012) hat ferner herausgestellt, dass unter gewissen *in vitro*-Bedingungen, DNMT3A und DNMT3B als De-Hydroxymethylasen fungieren können und die direkte Konvertierung von 5hmC zu Cytosin katalysieren (Chen, Wang & Shen, 2012).

Eine passive Demethylierung wird im Rahmen der Replikation beobachtet. Wie oben beschrieben agieren während und kurz nach der Replikation DNMT1 und UHRF1, um hemimethylierte DNA-Doppelstränge zu methylieren. Beide zeigen *in vitro* eine geringere Affinität

zu 5hmC als zu 5mC. Eine erhöhte Aktivität der TET-Proteine beim Replikationsprozess steigert das Vorkommen von 5hmC und gleichzeitig nimmt das Verhältnis an 5mC ab, wodurch die Methylierungsmuster sukzessive aufgehoben werden (Pastor et al., 2013). Diese Form der Demethylierung wird auch passive 5mC-Verdünnung genannt (Guo et al., 2014). In der Embryonalentwicklung spielt die passive Demethylierung im Rahmen der epigenetischen Reprogrammierung eine Rolle, worauf in Abschnitt 1.1.5 ausführlicher eingegangen wird.

1.1.4 Genomische Prägung

In der menschlichen Zelle liegen zwei Kopien eines Gens (Allele) vor, von der eine vom Vater (paternal) und eine von der Mutter (maternal) vererbt wurden. Inzwischen sind über 80 Gene bekannt, die einer sog. genomischen Prägung (*Genomic Imprinting*) unterliegen. Dies bedeutet, dass entweder das paternale oder das maternale Allel methyliert vorliegt und nicht exprimiert wird (Lim and Maher, 2010; <http://www.geneimprint.com/>). Geprägte Gene liegen auf Autosomen und dabei größtenteils in Gen-Clustern vor (Walter, 2015b). Diese Cluster haben mindestens eine Imprinting-Kontrollregion (*Imprinting Control Region*, ICR) oder Imprinting-Kontrollelemente (*Imprinting Control Elements*, ICEs), welche die Expression unterschiedlich vieler, benachbarter (geprägter) Gene parallel regulieren (Graw, 2016). ICRs und ICEs können bis zu 2 Kilobasen (Kb) umfassen und werden auch als differenziell methylierte Regionen (DMRs) bezeichnet. Sie sind reich an CpG-Dinukleotiden und können kurze Sequenzwiederholungen (*repeats*) enthalten (Moore et al., 2013). Die DNA-Methylierungsprofile der regulatorischen Regionen spiegeln auch deren Histon-Modifikationen wider: Während sich Histon-Modifikationen, die Heterochromatin etablieren (z.B. H3K9me3), am methylierten Allel vorfinden, assoziieren euchromatininduzierende Histon-Modifikationen (z.B. H3K4me3) mit dem unmethylierten Allel (Walter, 2015b). Imprinting-Muster werden bereits in der Keimbahn festgelegt und spielen nicht nur während der Embryo- und Gametogenese eine entscheidende Rolle. Sie sind auch in adulten Zellen vorzufinden und werden nicht nur auf Tochterzellen übertragen, sondern über die Keimzellen auch auf nachfolgende Generationen (Lees-Murdock & Walsh, 2008; Lim & Maher, 2010). Genomisches Imprinting stellt somit eine elternspezifische Prägung dar, welche die Gendosis in Balance hält und in der Keimzellentwicklung aufgehoben und neu gesetzt werden muss, um die normale Entwicklung des Embryos zu ermöglichen (Graw, 2016; Pastor et al., 2013; Rajender et al., 2011). Der nächste Abschnitt beschreibt diese epigenetischen Prozesse während der Embryo- und Gametogenese.

1.1.5 Epigenetische Reprogrammierung

Um die korrekte Embryonalentwicklung zu gewährleisten, sind genomweite epigenetische Umstrukturierungen nötig. Zuerst werden die elterlichen Methylierungsmuster aufgehoben, die über ihre Gameten „mitgegeben“ wurden. Dies ist erforderlich, um dem Embryo zuerst in einen pluripotenten Status zu versetzen, damit in der weiteren Entwicklung die zelltypische Differenzierung erfolgen und ein neuer Organismus entstehen kann (Hackett & Azim Surani, 2013; Lees-Murdock & Walsh, 2008). Auch die Urkeimzellen werden *in utero* durch epigenetische Prozesse umprogrammiert, wodurch sie ihre geschlechtsspezifische Prägung erhalten. Somit finden bereits zu Beginn der Embryonalphase zwei epigenetische Reprogrammierungen statt, bei denen das Genom nahezu demethyliert und neu methyliert wird (Haaf, 2006; Lees-Murdock & Walsh, 2008; Leitch, Tang & Surani, 2013). Eine Übersicht über die zeitlichen Abläufe der beiden Reprogrammierungswellen illustriert Abbildung 1.1.3 aus der Publikation: Von Meyenn & Reik (2015).

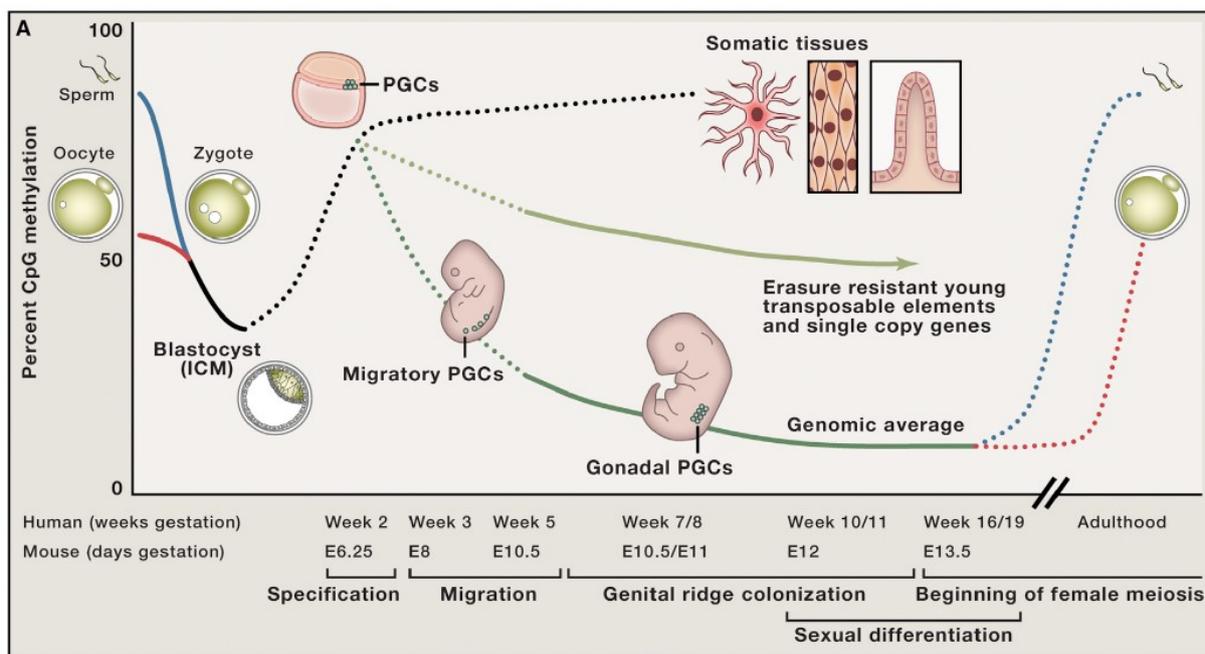


Abbildung 1.1.3: Epigenetische Reprogrammierung bei Mensch und Maus

Die erste genomweite Demethylierung erfolgt kurz nach der Befruchtung in der Zygote. Dabei werden das väterliche (blau) und das mütterliche (rot) Genom nahezu vollständig demethyliert und im Blastozystenstadium ist der Embryo pluripotent. Eine Remethylierung erfolgt in der ersten Schwangerschaftswoche (bei Mäusen am Embryonaltag (E) 6,25), bei der auch die Spezifizierung der Urkeimzellen stattfindet. Die zweite genomweite Demethylierung erfolgt ab der dritten Woche (bei Mäusen ab E8) in den Urkeimzellen, während sie von der Dottersackwand (extraembryonal) zur Urkeimleiste migrieren. Dabei wird auch die elterliche Prägung aufgehoben. Die Remethylierung der Urkeimzellen erfolgt graduell ab der 19. Schwangerschaftswoche (bei Mäusen ab E13,5) (aus: Von Meyenn & Reik, 2015).

1.1.5.1 Reprogrammierung in der Zygote

Während der Spermatogenese werden die Histone der männlichen Keimzellen weitestgehend durch Protamine ersetzt, die eine höhere Kompaktheit der DNA herbeiführen, wodurch Spermien eine spezifische Histon-Zusammenstellung innehaben (Ladstätter & Tachibana, 2019). Die weiblichen Keimzellen befinden sich kondensiert im Meiose-Arrest, weshalb die mütterliche DNA weniger methyliert ist als die väterliche DNA der Spermien (Haaf, 2006). Erst durch die Befruchtung wird die zweite meiotische Teilung des weiblichen Vorkerns induziert. Dabei wird die mütterliche DNA dekondensiert und von Interphasechromatin gestützt (Ladstätter & Tachibana, 2019). Während der Befruchtung werden die Protamine des väterlichen Genoms durch Histone der Eizelle ersetzt (Donkin & Barrès, 2018; Walter, 2015b). Nach der Befruchtung bilden sich in der Eizelle räumlich voneinander getrennte, elterliche Vorkerne (*pronuclei*), welche jeweils eigene epigenetische Muster innehaben: Die väterlichen Histone sind hyperacetyliert und mit transkriptionsfördernden Modifikationen, wie H3K4me3 und H3K36me3, versehen, während maternale Histone heterochromatische Histon-Modifikationen aufweisen (Haaf, 2006; Ladstätter & Tachibana, 2019; Walter, 2015b). Die Demethylierung der Zygoten-DNA wird hauptsächlich von molekularen Faktoren der Eizelle kontrolliert und verläuft bei den parentalen Vorkernen asynchron: Im paternalen Vorkern wird noch vor der ersten DNA-Replikation eine Abnahme an 5mC beobachtet, während die Methylierung der maternalen DNA bis zum Zweizellstadium erhalten bleibt (Haaf, 2006; Ladstätter & Tachibana, 2019) und erst während der Replikation abnimmt (Walter, 2015b). Anfangs wurde davon ausgegangen, dass das paternale Genom durch TET-Enzyme aktiv demethyliert wird und das maternale Genom eine passive Demethylierung durch mehrere DNA-Replikationsrunden durchläuft. Inzwischen haben einige Studien am Tiermodell gezeigt, dass die Demethylierung beider elterlichen Genome sowohl passiv als auch aktiv erfolgt (Guo et al., 2014; Shen et al., 2014). Dabei scheint der passive, replikationsabhängige Prozess hauptsächlich zur Demethylierung beizutragen (Shen et al., 2014), während die aktive Demethylierung über TET-Enzyme nachgeschaltete Prozesse zur Remethylierung einleiten könnten (Amouroux et al., 2016; Diken et al., 2018; Ladstätter & Tachibana, 2019). Einige genomische Regionen entgehen der Reprogrammierung in der Zygote: zentromernahes Heterochromatin zur Stabilisierung der Chromosomenarchitektur, transposable DNA-Elemente (Retrotransposons) zur Unterdrückung der Integration an einem anderen Genort und elterlich geprägte Gene zum Erhalt der elternspezifischen Geninformationen (Morgan, Santos, Green, Dean & Reik, 2005; Murdoch, Murdoch, Greenwood & McKay, 2016).

Die genomweite Demethylierung etabliert in den zygotischen Zellen den Status der Pluripotenz. Nach weiteren Zellteilungen, etwa im Blastozysten-Stadium, in dem sich die Zelllinien des Trophoektoderms (extraembryonale Zellen) und der inneren Zellmasse

(pluripotente embryonale Zellen) bilden, setzt die Remethylierung ein, welche durch die *de novo*-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B und der Erhaltungsmethylase DNMT1 vermittelt wird (Monk, 2015; Murdoch et al., 2016; Otte, Wruck & Adjaye, 2017; Strachan & Read, 2005). Der Embryo entwickelt drei Keimblätter, Ekto-, Endo- und Mesoderm, deren Zellen „nur noch“ multipotent sind (Lehnert, Kirchner, Kirmes, Dahm & Kirmes, 2018). Zum Zeitpunkt der Einnistung des Embryos in die Gebärmutter (etwa 6-8 Tage nach der Befruchtung), ist die Methylierung nahezu wieder hergestellt. Mit nachfolgender Zelldifferenzierung und steigender Zellspezifikation steigt der Methylierungsgrad nur noch leicht an (Ladstätter & Tachibana, 2019; Otte et al., 2017).

1.1.5.2 Reprogrammierung in männlichen primordiales Keimzellen

Primordiale Keimzellen (*primordial germ cells*, PGCs) sind diploide Vorläuferzellen von Oozyten und Spermien. Sie sind in der zweiten Woche nach der Fertilisation im primären Ektoderm (Epiblast) detektierbar, etwa zu Beginn der Gastrulation (Dada et al., 2012; Von Meyenn & Reik, 2015; Otte et al., 2017). Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen des sich entwickelnden Embryos pluripotent. Etwa in der dritten Woche migrieren sie in Richtung Dottersackwand und befinden sich dadurch extraembryonal (Leitch et al., 2013). In dieser Phase beginnt die zweite genomweite Demethylierung in den Urkeimzellen des sich entwickelnden Embryos. Bei dieser epigenetischen Reprogrammierung werden jedoch auch die elterlich geprägten Gene demethyliert, damit die geschlechtsspezifischen Methylierungsmuster der Oozyten bzw. Spermien etabliert werden können (Von Meyenn & Reik, 2015). Nachdem die kraniokaudale Ausrichtung und die laterale Abfaltung des Embryos vollzogen sind und bedingt durch biochemische Faktoren (Raz, 2004), wandern die PGCs zurück in den Embryo und infiltrieren die Urogenitalleisten (Li, Fang, Zhao, Li & Xiong, 2019) etwa innerhalb der 6. bis 9. Woche nach der Befruchtung. Während dieser Migration vermehren sich PGCs durch Mitose (Leitch et al., 2013). Bei Ankunft der PGCs in der Urogenitalleiste sind die Keimzellen nahezu demethyliert (Von Meyenn & Reik, 2015). Ob der Demethylierungsprozess aktiv oder passiv verläuft, ist nicht aufgeschlüsselt. Denn *TET1* mRNA gepaart mit einem gewissen Anteil an 5hmC wurde in 4 - 19 Wochen alten PGCs detektiert, was auf einen passiven Prozess hinweisen könnte. Ferner wurde in diesen PGCs eine Aktivität der BER-Maschinerie gemessen, was auf eine aktive Demethylierung hinweisen könnte (Kawasaki et al., 2015; Otte et al., 2017). In einem Übersichtsartikel von D. Monk (2015) werden zwei Demethylierungswellen geschildert, wonach in der ersten Welle eine passive Demethylierung stattfindet, während die Demethylierung elterlich geprägter Regionen in einer zweiten Welle erfolgt, die in aktiver Form vonstatten geht (Monk, 2015).

Die durch Einnistung der PCGs in die Urkeimstränge gebildete Urogenadenanlage wird als geschlechtlich indifferent bezeichnet, bis etwa in der 7. Woche durch Expression des *Sex determining region of the Y chromosome (SRY)*-Gens und weiterer geschlechtsbestimmender Gene die Ausbildung der männlichen Gonaden beginnt (Hanley et al., 2000). Dabei werden unter anderem in den sich entwickelnden Hodengeweben Sertoli-Zellen gebildet, die durch Sekretion des Anti-Müller-Hormons (AMH) die Differenzierung der männlichen PGCs unterbinden (Leitch et al., 2013; Smith & Turek Medizinischer Atlas, Reproduktionssystem, 2012), sodass sie im mitotischen Arrest bis zur Pubertät verweilen (Otte et al., 2017). Der Zeitpunkt, wann die Remethylierung der DNA erfolgt, ist beim Menschen noch nicht definiert worden. Guo et al. (2015) stellten in 19 Wochen alten PGCs immer noch einen niedrigen Methylierungsgrad fest. Da bis zur Geburt die Etablierung der Methylierungsmuster in männlichen Keimzellen weitestgehend abgeschlossen ist, wird eine graduelle Remethylierung ab der 19. Woche nach Befruchtung angenommen (Donkin & Barrès, 2018; Guo et al., 2015; Leitch et al., 2013; Murdoch et al., 2016; Otte et al., 2017).

1.1.6 Männliche Keimzellen im Erwachsenen

Mit Eintritt in die Pubertät haben sich in den Hoden Samenkanälchen, sog. *Tubuli seminiferi*, entwickelt. Diese bilden postnatal ein Lumen aus, sind mit einem Keimepithel ausgekleidet und enthalten Keimzellen in diversen Differenzierungsstadien der Spermatogenese (siehe auch Abbildung 1.1.4) (Schiebler & Korf, 2007). Die Differenzierung der Keimzellen ist von der Basallamina zum Lumen gerichtet: Auf der Basallamina befinden sich die aus Urkeimzellen hervorgegangenen SPG, während lumenwärts primäre und sekundäre Spermatozyten, Spermatozyten und reife Spermien vorzufinden sind (Schiebler & Korf, 2007). SPG sind diploid, vermehren sich mitotisch und werden anhand ihrer Morphologie und Expressionsmuster in funktionale Subpopulationen unterteilt (von Kopylow, Staeger, Spiess, et al., 2012; von Kopylow & Spiess, 2017; Schiebler & Korf, 2007). Mit Typ A-SPG beginnt die Spermatogenese. Yve Clermont (1966) hat diese Zellen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften in Typ A_{dark} und Typ A_{pale} weiter unterteilt. Der Zellkern von Typ A_{dark} -SPG beschrieb er als kugel- bis eiförmig mit einer bis mehreren Vakuolen und feinkörnigem Chromatin, welches sich dunkel anfärbte, während Zellkerne von Typ A_{pale} -SPG gröberes Chromatin innehatten und im Lichtfeld heller durchschienen. Nach heutigem Forschungsstand schreibt man A_{dark} -SPG die Kapazität zur Selbsterneuerung zu. Sie sind unipotent und differenzieren demnach nicht, wodurch sie ein Keimzell-Reservoir bilden, das eine lebenslange Spermatogenese gewährleistet. Diese Zellen werden als spermatogoniale Stammzellen (*spermatogonial stem cells*, SSCs) bezeichnet (Kubota & Brinster, 2018; Phillips, Gassei & Orwig, 2010).

Die Typ A_{pale}-SPG hingegen werden aus diesem Reservoir ausgeschleust und differenzieren zu Typ B-SPG, welche nicht mehr der Basallamina aufsitzen (Forbes, Flannigan & Schlegel, 2018). Aus Typ B-SPG entstehen primäre Spermatozyten, die in die Meiose I eintreten und sekundäre Spermatozyten bilden. Nach Meiose II entwickeln sich lumenah haploide Spermatisden, die schließlich zu reifen Spermien ausdifferenzieren (Oatley & Brinster, 2008; Otte et al., 2017; Phillips et al., 2010; Schiebler & Korf, 2007).

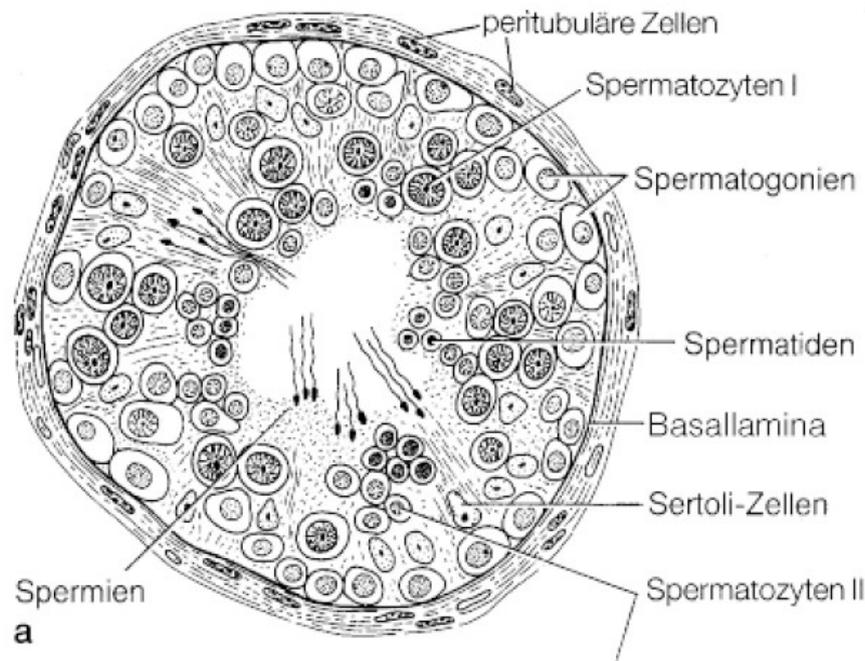


Abbildung 1.1.4: Schematischer Querschnitt durch einen *Tubulus seminiferus*

Die Spermato genese ist gerichtet: Auf der Basallamina liegen SPG, lumenwärts befinden sich Keimzellen fortgeschrittener Differenzierungsstadien. (Abbildung aus: Schiebler & Korf, 2007).

1.1.7 Epigenetik und männliche Infertilität

Während der Embryonalentwicklung und der Gametogenese sind die zeitlichen und molekularen Schritte fein abgestimmt, die durch epigenetische Prozesse gesteuert werden (Okae et al., 2014). Störungen dieser Prozesse verursachen eine aberrante Embryonalentwicklung, die bereits *in utero* zur Letalität führen kann (Girardot, Feil & Lières, 2013). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass potenzielle Imprintingfehler der elterlichen Genome im Rahmen der epigenetischen Reprogrammierungswellen aufgehoben werden können (De Waal et al., 2012). Zahlreiche Studien beschreiben, dass sich Umwelteinflüsse aber auch genetische Faktoren auf die epigenetische Regulation auswirken können, sowohl *in utero* als auch postnatal (Haaf, 2006; Rajender et al., 2011).

Fehlerhafte genomische Prägungen können aus chromosomalen, genetischen oder epigenetischen Defekten hervorgehen, einschließlich aberranter Histon-Modifikation oder DNA-Methylierung innerhalb einer ICR von ent-sprechenden Genen. Bei so genannten Epimutationen sind entweder beide Allele eines Gens oder mehrerer Gene unmethyliert, werden (biallelisch) exprimiert und die Gendosis ist zu hoch. Andererseits können auch beide Allele methyliert und transkriptionell inaktiv vorliegen, was zu einer Haploinsuffizienz führt (Girardot et al., 2013; Nordheim, Knippers & Dröge, 2015).

Es sind diverse Ursachen für eine Infertilität beschrieben worden: Defekte während der Embryonalentwicklung, der Gametogenese oder der Entwicklung des Urogenitalsystems, hormonelle Störungen oder Beeinträchtigungen der Erektion oder Ejakulation (Vlajković, Čukuranović, Daković Bjelaković & Stefanović, 2012). Ferner können externe Faktoren, wie Gonadotoxine oder Krebstherapien, aber auch ein ungesunder Lebensstil (Guerrero-Bosagna & Skinner, 2014) eine erworbene Unfruchtbarkeit herbeiführen. Männliche Infertilität wird häufig durch eine abnorme Spermienfunktion oder -produktion definiert, die auf Störungen der Keimzellproliferation und -differenzierung oder auch der somatischen Zellen beruhen (Vlajković et al., 2012). Ferner zeigen Studien über epigenetische Modifikationen in elterlich geprägten Genen bzw. in den entsprechenden ICRs von infertilen Männern einen Zusammenhang zwischen fehlerhafter DNA-Methylierung bzw. abnormaler Histon-Rekrutierung und Oligozoospermie bzw. Oligo-Asthenoteratozoospermie (Cui et al., 2016; Hartmann, Bergmann, Bohle, Weidner & Steger, 2006; Rajender et al., 2011).

1.1.8 Therapeutischer Einsatz von hSSCs

Aufgrund ihrer unbegrenzten Kapazität zur Selbsterneuerung und dadurch zeitlebens Spermien zu generieren, haben hSSCs eine besondere Stellung für den therapeutischen Einsatz in der regenerativen Medizin. Der Therapiesansatz von hSSCs ist potenziell bei der Erhaltung oder Re-Initiation der Fertilität bei präpubertären Jungen, Jugendlichen oder erwachsenen Männern nach einer Krebsbehandlung oder aus anderen Gründen der Unfruchtbarkeit möglich (Vlajković et al., 2012). Dabei wird die Spermatogenese aus eigenen SSCs entweder *in vivo*, durch Xenotransplantation oder durch *in vitro*-Systeme induziert, um anschließend normaldifferenzierte Spermien zur Befruchtung einzusetzen (Forbes et al., 2018).

Eine große Herausforderung bei der Umsetzung des Therapieansatzes stellt die Isolierung von hSSCs dar, da sie lediglich eine kleine Subpopulation im männlichen Hoden ausmachen. In den letzten Jahren wurde das Glykoprotein THY1 (CD90), ein Oberflächenmarker undifferenzierter SPG einschließlich hSSCs, als Markerprotein zur Zellisolation

genutzt (Altman et al., 2014). Weitere Gene, die spezifisch in hSSCs exprimiert werden und bekanntlich die Zelldifferenzierung unterdrücken, sind z.B. die *Glial Cell Derived Neurotrophic Factor (GDNF)*-Rezeptoren *GDNF Family Receptor Alpha 1 (GFRA1)* und *Ret Proto-Oncogene (RET)*, *Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF; alias ZBTB16/ZFP145)*, *Lin-28 Homolog A (LIN28A)*, *Inhibitor of DNA Binding 4, HLH Protein (ID4)*, *Spalt Like Transcription Factor 4 (SALL4)*, *Stage Specific Embryonic Antigen-1 (SSEA1)* oder *KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase (KIT)* (Leitch et al., 2013; Manku & Culty, 2015). Allerdings haben wiederum andere Studien die hSSC-Spezifität widerlegt und demonstriert, dass die Expression auch in differenzierten Keimzellen, den umliegenden Sertoli-Zellen oder somatischen Zellen des Hodens stattfindet (Altman et al., 2014; Conrad et al., 2008, 2016; Leitch et al., 2013). Neuere Studien haben weitere hSSC-Markergene identifiziert: *Undifferentiated embryonic cell Transcription Factor 1 (UTF1)* und *G Protein-coupled Receptor 125 (GPR125)*. Ein weiteres Markergen ist zudem *LINE1 Type Transposase Domain Containing 1 (L1TD1)* (von Kopylow & Spiess, 2017). Zur hSSC-Charakterisierung werden des Weiteren die Pluripotenz-assoziierten Gene *POU Class 5 Homeobox 1 (POU5F1)* und *Nanog Homeobox (NANOG)* in die Untersuchung eingeschlossen (Forbes et al., 2018; Guo et al., 2015; Howell, Kutiyawalla & Pillai, 2011; Kultz et al., 2014).

Herausfordernd ist ferner die Kultivierung der hSSCs, da im Zuge der *in vitro*-Reprogrammierung zu pluripotenten Zellen häufig die Bildung von Teratomen beobachtet wird (Kubota & Brinster, 2018; Vlajković et al., 2012). Auch eine Veränderung in der DNA-Methylierung durch Zellkulturbedingungen wurde beschrieben. Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, haben Nickkholgh et al. (2014) unter Verwendung der MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*)-Technik hSSCs anhand des Oberflächenmarkers *Integrin Subunit Alpha 6 (ITGA6)* isoliert und für 50 Tage kultiviert (Nickkholgh et al., 2014). Die Stabilität der Methylierung wurde in der regulatorischen Region der paternal geprägten Gene *H19* und *Maternally Expressed Gene 3 (MEG3)* sowie der maternal geprägten Gene *KCNQ1 Opposite Strand / Antisense Transcript 1 (KCNQ1OT1)* und *Paternally Expressed Gene 3 (PEG3)* bestimmt. In dieser Studie wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigere Methylierungswerte in den paternal geprägten Genen und höhere Methylierungswerte in den maternal geprägten Genen beobachtet, möglicherweise als Folge eines Überwucherns somatischer Zellen (Langenstroth-Röwer et al., 2017).

Die Identifikation und Charakterisierung von hSSCs anhand morphologischer Eigenschaften und Expressionsmustern und die optimale Zellkulturbedingung zur Vermehrung dieser Zellen sind weiterhin Gegenstand der Forschung. Die Etablierung eines solchen Systems wäre insofern vorteilhaft, dass aus eigenen hSSCs gewonnene Spermien ethisch unbedenklich sind und eine Immunantwort ausbleibt.

1.1.9 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurden SPG/potenzielle hSSCs hinsichtlich ihres Methylierungsprofils charakterisiert. In ihren früheren Untersuchungen haben von Kopylow et al. (2016) anhand von morphologischen Merkmalen und Expressionsmustern das Protein *Fibroblast Growth Receptor 3* (FGFR3) als einen Oberflächenmarker für hSSCs identifiziert (von Kopylow, Schulze, Salzbrunn & Spiess, 2016). Des Weiteren wurde ein Ansatz zur selektiven Isolierung von FGFR3-positiven (FGFR3⁺) und FGFR3-negativen (FGFR3⁻) Einzelzell-SPG aus aggregatfreien Zellsuspensionen von humanen testikulären Spermienextraktion (TESE)-Biopsien etabliert (von Kopylow, Staeger, Schulze, Will & Kirchhoff, 2012). In der hier beschriebenen Arbeit wurden Unterschiede in den DNA-Methylierungsmustern von unkultivierten FGFR3⁺- und FGFR3⁻-SPG untersucht und mit der DNA-Methylierung von reifen Spermien und somatischen Zellen verglichen. Dafür wurde der Methylierungsgrad der regulatorischen Regionen von vier verschiedenen Gengruppen analysiert.

Die erste Gruppe bestand aus den SPG-Markergenen *FGFR3*, *PLZF*, *GFRA1* und *L1TD1*. Zur Untersuchung des Stammzellcharakters der untersuchten Proben wurden in der zweiten Gengruppe die Pluripotenzgene *POU5F1* und *NANOG* untersucht. In der dritten Gengruppe wurden die regulatorischen Regionen (DMRs) der paternal geprägten Gene *MEG3* und *H19* analysiert und in der vierten die DMRs der maternal geprägten Gene *KCNQ1OT1*, *PEG3* und *Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N (SNRPN)*. Aufgrund der monoallelischen Expression von elterlich geprägten Genen und der im Zusammenhang mit Infertilität beobachteten abnormalen Methylierung dieser Gene, ist ihre Methylierungsanalyse in Keimzellen üblich (Cui et al., 2016; Guerrero-Bosagna & Skinner, 2014; Rajender et al., 2011).

Dazu wurde neben der Untersuchung einzelner Zellen die sog. *Limiting Dilution*-Methode mit anschließender Bisulfit-Pyrosequenzierung (LD-BSP®) mit 10-Zell-Proben angewendet (El Hajj et al., 2011a; 2015), welche für geringste Mengen DNA aus einer begrenzten Anzahl von Zellen, wie sie für dieser Arbeit zugrunde lagen, geeignet ist. Durch diese Vorgehensweise konnte der Methylierungszustand einzelner DNA-Moleküle abgeleitet werden.

1.2 Projekt 2: Der Einfluss von ELS auf TSC

1.2.1 Frühkindlicher Stress und maternaler Einfluss

In den 1920er Jahren beobachtete der Österreicher Hans Hugo Bruno Selye während seines Medizinstudiums, dass Patienten mit mehreren verschiedenen Krankheiten viele ähnliche Symptome zeigten, die alle aus körperlichen Belastungsreizen resultierten (Fink, 2016). Diese Beobachtung weiterverfolgend wurde er zu einem der ersten Stressforscher, der es sich zur Aufgabe machte, eine gemeinsame physiologische und pathologische Erklärung für die unterschiedlichen klinischen Merkmale zu finden, um Gesundheit besser zu begreifen und folglich die Behandlung von Krankheiten zu definieren (Selye, 1952). Sein Bestreben basierte auf der Erkenntnis aus seiner mehrjährigen Forschung, dass alle Organismen auf jedwede Art von Stress reagieren können und ein gemeinsames Muster hinsichtlich ihrer Stressreaktion zeigen (Selye, 1952). Die Stressreaktion bezeichnete er als „Allgemeines Adaptationssyndrom“, welches im Übermaß zu Krankheiten führt (Selye, 1952).

Allgemein wird die reale oder empfundene Bedrohung eines Organismus als „Stressor“ bezeichnet und die Reaktion darauf, wie schon von Selye erwähnt, als „Stressreaktion“ (Schneiderman, Ironson & Siegel, 2005). Im Leben ist Stress ein unvermeidlicher Faktor, welcher sogar schon intrauterin eine Rolle spielt. Stress an sich ist in gewisser Weise überlebensnotwendig, da er entweder Bewältigungsmechanismen fördert oder schützende Vermeidungsstrategien hervorruft (Flucht-oder-Kampf-Reaktion) (Schneiderman et al., 2005). Zudem bereitet eine Stressreaktion auf zukünftige, potenziell bedrohliche Stressexpositionen vor. Ist ein Stressor jedoch ausreichend intensiv oder lange genug anhaltend, sodass er nicht mehr bewältigt werden kann, kann dies kurz- und langfristige negative Folgen auf die Gesundheit haben (Middlebrooks & Audage, 2008).

Im frühen Kindesalter erlebter Stress kann auf reziproker Eltern-Kind-Interaktion beruhen und umfasst Armut, elterlichen Stress, elterliche emotionale Krankheiten wie Depressionen, emotionalen, physikalischen oder sexuellen Missbrauch, emotionale oder physikalische Vernachlässigung und negative Einflüsse durch die Familie, wie häusliche Gewalt, Drogen- oder Alkoholkonsum, Scheidung oder Trennung der Eltern, Tod eines Elternteils und kriminelle Familienmitglieder (Fernald & Gunnar, 2009; Middlebrooks & Audage, 2008; Neece, Green & Baker, 2012). Die „*Adverse Childhood Experiences*“ (ACE)-Studie untersuchte retrospektiv im Zeitraum von 1995 bis 1997 den Zusammenhang von kindlichen Stresserfahrungen und die gesundheitlichen Folgen. Dazu wurden über 17.000 weiße, erwachsene Amerikaner der Mittelklasse zu negativen Kindheitserlebnissen befragt, die zuvor in bestimmte Kategorien eingeteilt wurden. Die Häufigkeit dieser Erfahrungen wurde aufsummiert und der „ACE-score“ gebildet (Felitti, Fink, Fishkin & Anda, 2007; Joggerst, 2019). Die Studie zeigte unter anderem, dass ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen

der Anzahl von negativen Stresserfahrungen und der Entwicklung von physischen und psychischen Krankheiten, sozialen Komplikationen im Erwachsenenalter oder auch einer erhöhten Selbstmordrate besteht (Chapman et al., 2004; Felitti et al., 1998, 2007).

Neben der Quantität und der Art des Stresses ist darüber hinaus entscheidend, zu welchem Lebenszeitpunkt die Stressexposition erfolgt (Dunn, Nishimi, Powers & Bradley, 2017). Die Entwicklung des Gehirns beginnt *in utero* und hält bei Menschen bis etwa zum 5. Lebensjahr an (Fox, Levitt & Nelson, 2011; Hambrick, Brawner & Perry, 2019). Dabei prägen neben endogenen Prozessen auch äußere Einflüsse die Formierung des Gehirns (Dunn et al., 2017; Hambrick et al., 2019). Erfolgen während dieser Phase Störungen, treten physiologische Veränderungen ein, die bis ins Erwachsenenalter persistieren (Fox et al., 2011; Korosi, Baram & Schmidt, 2009).

Im frühen postnatalen Leben ist die Qualität der Erfahrungen mit der emotionalen und kognitiven Entwicklung assoziiert. Dabei nimmt die Mutter eine wichtige Rolle ein, indem sie dem Säugling die äußere Umwelt vermittelt (Ammerman, Van Hasselt & Hersen, 1991; Korosi et al., 2009; Neece et al., 2012). Dadurch trägt die Mutter-Kind-Bindung zur Gehirnentwicklung bei, wodurch das Kind auf die Umwelt und das Leben vorbereitet wird (Chen & Baram, 2016; Korosi et al., 2009). Die Beziehung bietet einen adaptiven und evolutionären Vorteil, wenn die mütterliche Fürsorge und die Mutter-Kind-Beziehung intakt ist und auf „reale“ (i. S. v. „normale“) Lebensverhältnisse prägt (Gourion et al., 2008; Middlebrooks & Audage, 2008). Ist das Verhältnis jedoch durch die Mutter betreffende Faktoren (Krankheit, Depression, Drogenabhängigkeit, häusliche Gewalt), oder instabile Mutter-Kind-Bindungen, wie reduzierte oder fragmentierte mütterliche Fürsorge, beeinträchtigt, wirkt sich dies auf die Gehirnentwicklung des Kindes aus (Chen & Baram, 2016; Curley & Champagne, 2016; Korosi et al., 2009). Zudem ist das Risiko des Kindes erhöht, im späteren Alter metabolische, kardiovaskuläre und psychische Krankheiten zu entwickeln (Danese et al., 2009; Fink, 2016; Gourion et al., 2008; Hambrick et al., 2019) und kognitiv und sozial beeinträchtigt zu sein (Chen & Baram, 2016; Schneiderman et al., 2005; Wilson et al., 2007). Diese Zusammenhänge werden durch Studien an Heimkindern belegt, die zudem verdeutlichen, wie wichtig das Vorhandensein von wenigstens einer Bezugsperson, wenn nicht der Mutter, im Leben eines Kindes ist. Bei Heimkindern, die vor und während der Aufnahme in ein Heim bereits stressvollen Lebenssituationen ausgesetzt waren, ist eine intensive Fürsorge in den institutionellen Einrichtungen oftmals nicht gewährleistet, weshalb bei ihnen häufig kognitive und emotionale Beeinträchtigungen beobachtet wurden (Gunnar, Bruce & Grotevant, 2000; Gunnar, Morison, Chisholm & Schuder, 2001; Nelson et al., 2007). Diese Auffälligkeiten können allerdings durch eine Adoption zum Teil abgemildert oder aufgehoben werden (Fernald & Gunnar, 2009; Gunnar

et al., 2000, 2001; Nelson et al., 2007). Und obwohl frühkindlicher Stress als Ursache bestimmt werden kann, ist eine Kausalität nicht immer offensichtlich. Wie bereits geschildert, wirken Häufigkeit, Zeitpunkt und Dauer von Stresserlebnissen auf Stressantworten ein, die sehr heterogen sind. Bei einigen Menschen treten nach einer Stresserfahrung gar keine oder erst sehr späte klinische Symptome auf (Brunson et al., 2005; Walker et al., 2017). Humanstudien sind zum Teil retrospektiv, weshalb die Erinnerung an Kindheitserfahrungen verzerrt sein kann. Zudem werden genetische Prädispositionen für gewisse Krankheiten oder das aktuelle Lebensumfeld nicht immer berücksichtigt (Korosi et al., 2009). In den letzten Jahren hat die Resilienz-Forschung in der Wissenschaft immer größere Bedeutung erlangt. In multidisziplinären Studien werden dabei die Ursachen erforscht, weshalb stressvolle Erfahrungen bei einigen Individuen negative Auswirkungen zur Folge haben, während andere Stress-resistent, also resilient, zu sein scheinen (Cadet, 2014; Franklin et al., 2012; McEwen et al., 2015; Russo, Murrough, Han, Charney & Nestler, 2012). Erkenntnisse über Resilienz fördernde Mechanismen könnten translationale therapeutische Ansätze liefern, um frühkindliche Stresserfahrungen auch nachträglich besser oder ganz zu bewältigen (Walker et al., 2017).

Um das Entstehen von physiologischen und emotionalen Folgen von Stress, insbesondere von stressvollen Erfahrungen im frühen Kindesalter, zu erläutern, werden in den folgenden Abschnitten die biologischen Reaktionen von akutem und chronischem Stress vorgestellt.

1.2.2 Die biologische Stressantwort

Endogene und exogene Stressoren werden zuerst vom zentralen Nervensystem (ZNS) entweder bewusst oder unbewusst wahrgenommen (Rensing, 2006 S. 124). Daraufhin wird die physiologische Stressreaktion über neuroendokrine Prozesse induziert, an denen unterschiedliche Hirnregionen beteiligt sind. In den folgenden Abschnitten werden die Hirnregionen vorgestellt, die an der Vermittlung und Prozessierung der Stressreaktion direkt oder indirekt involviert sind.

1.2.2.1 An der Stressreaktion beteiligte Hirnregionen

Jede Form von Stress wird vom limbischen System verarbeitet, indem der Stressimpuls zusätzlich emotional bewertet wird, um das Ausmaß der Stressreaktion zu koordinieren (Rensing, 2006, S. 102). Das limbische System stellt ein neurologisches Netzwerk dar und umfasst *Amygdala*, Mamillarkörper, *Fornix*, *Gyrus cinguli*, *Thalamus*, *Hypothalamus*, *Griseum centrale* (zentrales Höhlengrau), Strukturen des *Hippocampus* und weitere

Hirnareale, welche mit Bereichen des *Cortex* verbunden sind (Ehlert, 2013, S. 74; Rensing, 2006, S. 102). Diese Areale sind nicht nur untereinander vernetzt, sondern auch mit den exekutiven Kernen des Hirnstamms und des autonomen Nervensystems (ANS) (Rensing, 2006, S. 102). Durch das Zusammenwirken unterschiedlicher Hirnregionen mittels neuronaler Verschaltungen und entsprechender Neurotransmitter und -peptide kann der Organismus eine situationsgerechte Anpassung in einer Stresssituation bewerkstelligen (Abbildung 1.2.1) (Ehlert, 2013, S. 74). Außerdem vermittelt das limbische System, welches auch das Verhalten steuert, neben der Stressor-Bewertung auch Lern- und Erinnerungsprozesse, um den Organismus für zukünftige Stresssituationen vorzubereiten (Ehlert, 2013, S. 76).

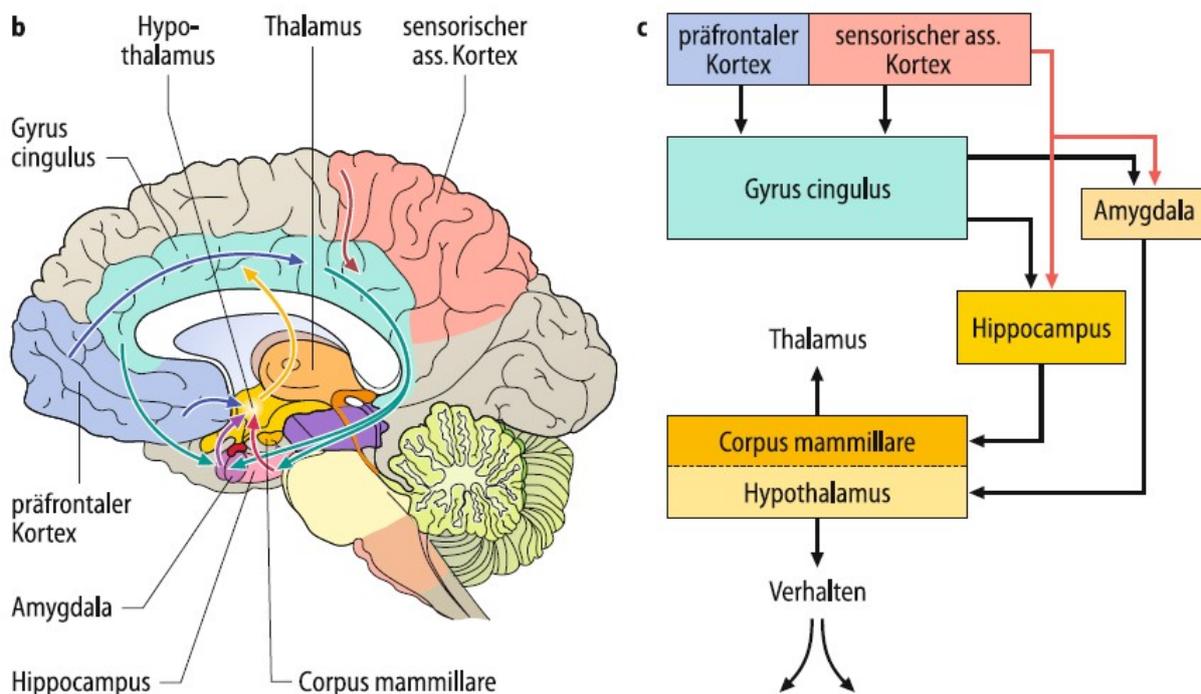


Abbildung 1.2.1: Das limbische System

Links (b): In der sagittalen Ansicht werden die wichtigsten Kerngruppen des limbischen Systems und die höher geschalteten Areale farblich dargestellt. Die Informationsweiterleitung wird durch entsprechend gefärbte Pfeile illustriert. **Rechts (c):** Übersichtsschema über die Reizweiterleitung aus den corticalen Regionen zum Hypothalamus. Abbildung aus: Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 80.

Eine zentrale Stellung bei der Stressverarbeitung nimmt die Amygdala ein, welche aus mehreren Kerngruppen zusammengesetzt ist, die einerseits untereinander verschaltet sind und die andererseits auch mit weiteren Arealen des limbischen Systems, des Cortex und des vegetativen Nervensystems in Verbindung stehen. Über Verbindungen zum Hypothalamus ist sie an der Steuerung neuro-hormoneller Vorgänge beteiligt. Des Weiteren trägt sie zur Steuerung von Verhaltensweisen über Verbindungen zum Striatum bei, das zum Beispiel mit einfachen motorischen Handlungen, Explorationsverhalten und Vermeidung bedrohlicher Orte assoziiert ist.

Die Affektkontrolle wird über Verbindungen gesteuert, die zu bestimmten Arealen von *Cortex* und *Hippocampus* bestehen, die ferner die bewusste Wahrnehmung einer Stresssituation vermitteln (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 79-81; Rensing, 2006, S. 105-108).

Sensorische, motorische und vegetative Informationen laufen zuerst in den *Thalamus* ein, bevor sie in die Großhirnrinde weitergeleitet werden. Daraufhin übernimmt der *Thalamus* eine sensorische Bewertung darüber, ob die Informationen an die corticalen Regionen weitergeleitet werden und somit „bewusst“ wahrgenommen werden sollen (selektive Aufmerksamkeit). Neben den prominenten Verbindungen zum *Cortex* bestehen auch Verschaltungen mit dem *Hippocampus*, der *Amygdala* und dem *Hypothalamus*. Über Afferenzen vom *Cerebellum* wirkt der Thalamus an der Kontrolle motorischer und geplanter Vorgänge mit (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 78-79; Rensing, 2006, S. 105-108, 110-111).

In einer Stresssituation sind vor allem die amygdaloidalen Verbindungen mit dem *Cortex* und dem *Thalamus* beteiligt. Denn noch vor einer (bewussten) sensorischen Bewertung durch den *Cortex* erreichen über den *Thalamus* sensorische (Stress-) Informationen die *Amygdala*, die in wenigen Millisekunden bereits eine (unbewusst wahrgenommene) Stressreaktion auslöst. Nachdem die selbe Information vom *Cortex* verarbeitet wurde und erneut in die *Amygdala* eingeht, wird durch die *Amygdala* die (bewusst wahrgenommene) Stressreaktion weiter aufrecht erhalten oder abgebrochen (Abbildung 2.1.2) (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 724; Rensing, 2006, S. 105-108, 110-111). Wie die *Amygdala* das Lernen von Furcht vermittelt, wird in Punkt 1.2.2.3 ausführlicher geschildert.

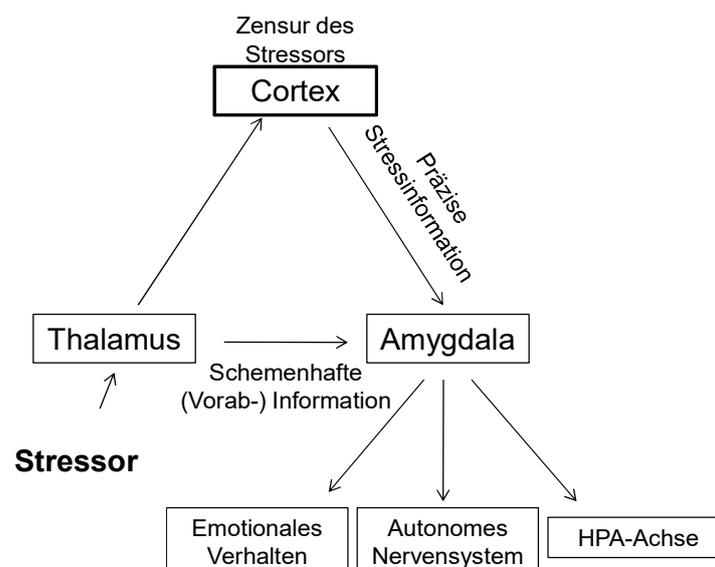


Abbildung 1.2.2: Die Entstehung von Furcht.

Die Stressinformation wird vom *Thalamus* sehr schnell an die *Amygdala* weitergeleitet, welche die nachgeschalteten Systeme in Alarmbereitschaft setzt. Die selbe Stressinformation wird vom *Thalamus* auch an corticale Regionen zur Bewertung des Reizes gesendet. Die vom *Cortex* zensierte Version des Stressors erreicht anschließend die *Amygdala*, wonach die Stressreaktion entweder aufrecht erhalten bleibt bzw. verstärkt wird oder abgebrochen wird. Abbildung nach LeDoux, 1994.

Der *Hypothalamus* gilt als Integrationszentrale zur Aufrechterhaltung der Homöostase. Die paraventriculären Kerne (PVN) sind eng mit der Hypophyse verbunden, worüber der *Hypothalamus* den Hormonhaushalt und endogene Rhythmen (Ovarialzyklus, zirkadiane Periodik) steuert. In der medialen Region befindet sich das Vorderhirnbündel, in das neuronale Ein- und Ausgänge vieler weiterer Kerne konvergieren. Darunter fallen Verbindungen mit der *Amygdala*, dem *Thalamus*, corticalen und subcorticalen Regionen und weiteren Kernen des limbischen Systems. Darüber hinaus ist der *Hypothalamus* mit dem ANS verbunden, worüber er an der Regulation organischer Vorgänge, aber auch an der unmittelbaren Stressantwort beteiligt ist (Abschnitt 1.2.2.2) (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 75-78; Rensing, 2006, S. 105-108).

Der *Hippocampus* selbst besteht aus dem Ammonshorn (*Cornu ammonis*, CA), das aus vier nachgeschalteten Schichten, CA 1 - 4, aufgebaut ist und Zellschichten aus Pyramidenzellen enthält, und dem *Gyrus dentatus* mit den Granularzellen. Zur *Hippocampus*-Formation zählen des Weiteren der *Nucleus dentatus*, der entorhinale, perirhinale und parahippocampale *Cortex* und das *Subiculum*. Im *Hippocampus* bestehen reziproke Verbindungen zu allen Assoziationscortices, in welchen die Speicherung und das Abrufen von Gedächtnisinhalten stattfindet, außerdem zu Regionen des Temporal- und des Frontallappens, in welchen Prozesse des deklarativen und Kurzzeit-Gedächtnisses verortet sind (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 652, 791). Durch die limbischen Verschaltungen, vor allem zur *Amygdala*, werden auch emotionale Informationen vom *Hippocampus* berücksichtigt. Im Zusammenspiel mit dem entorhinalen *Cortex* erfolgt im *Hippocampus* eine zeitliche und räumliche (assoziative) Verknüpfung von Informationen, die gleichzeitig über corticale Verschaltungen mit erinnerten Situationen abgeglichen werden und an die entsprechenden Assoziationsareale zur Speicherung weitergereicht werden. Insofern besteht eine Funktion des *Hippocampus* darin, eingehende und bestehende Informationen zu vergleichen und kontextabhängig zu prozessieren, wodurch er zur Konsolidierung von Gedächtnisinhalten beiträgt. Dabei ist die Verbindung zwischen *Septum* und *Hippocampus* herauszustellen, die ebenfalls mit Lernen und Gedächtnisbildung assoziiert ist, außerdem mit Orientierungs- und Explorationsverhalten und der Extinktion bestehender Erinnerungen und Verhaltensmuster (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 81-85; Rensing, 2006, S. 105-108).

Bezogen auf Langzeitprozesse, die auf ein dauerhaftes oder intensives Stresserlebnis folgen, spielen die hier erwähnten Regionen des limbischen Systems eine entscheidende Rolle, denn nicht nur vegetative Reaktionen, sondern auch kognitive Prozesse werden aktiviert, die Verhaltensweisen in gegenwärtigen und zukünftigen Stressexpositionen steuern.

1.2.2.2 Endokrine Systeme der Stressreaktionen

An der endokrinologischen Stressreaktion sind vor allem zwei Neurohormonachsen beteiligt. Die *Sympathikus-Nebennierenmark-Achse* (*sympathetic adreno-medullary (SAM) axis*) vermittelt eine rasche Reaktion über die Katecholamin-Neurotransmitter Noradrenalin (NA) und Adrenalin (A). Die *Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse* (*hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis*) reagiert über die Ausschüttung von Glukokortikoiden wie Cortisol in den Blutstrom etwas zeitversetzt (Abbildung 1.2.3) (Rensing, 2006, S. 126). Vor allem die Aktivierung der SAM-Achse bereitet den Organismus auf eine mögliche Kampf- oder-Flucht-Reaktion vor. Zusammenwirkend mit der HPA-Achse werden Energiereserven mobilisiert, wie im nächsten Abschnitt noch verdeutlicht wird. Die Anpassungsfähigkeit an den jeweiligen Stressor wird ferner durch weitere interagierende Hormonachsen moduliert, um den Zustand der Homöostase wiederherzustellen. Zu diesen Hormonachsen zählen das Renin-Angiotensin-II-Aldosteron-System (RAAS), die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen (HPT)-Achse, die Hypothalamus-Hypophysen-Wachstumshormon-Achse, das Hypothalamus-Hypophysen-Prolaktinerge-System und das Arginin-Vasopressin-System (Rensing, 2006, S. 127; Wippert & Borgetto, 2009, S. 110). Einige der freigesetzten Hormone wirken dabei amplifizierend oder signalverstärkend, während andere die in Gang gesetzten Reaktionen herunter regulieren oder sie abdämpfen (z.B. Stress durch Schmerzen) (Rensing, 2006, S. 127). Zusammenfassend sind an der Stressantwort komplexe Interaktionen von Neuronen, Hirnregionen, Neurotransmittern, Neuropeptiden, Hormonen und deren Rezeptoren beteiligt, die den Organismus situationsabhängig reagieren lassen, um ihn an die Umwelt anzupassen und dadurch sein Fortbestehen zu sichern.

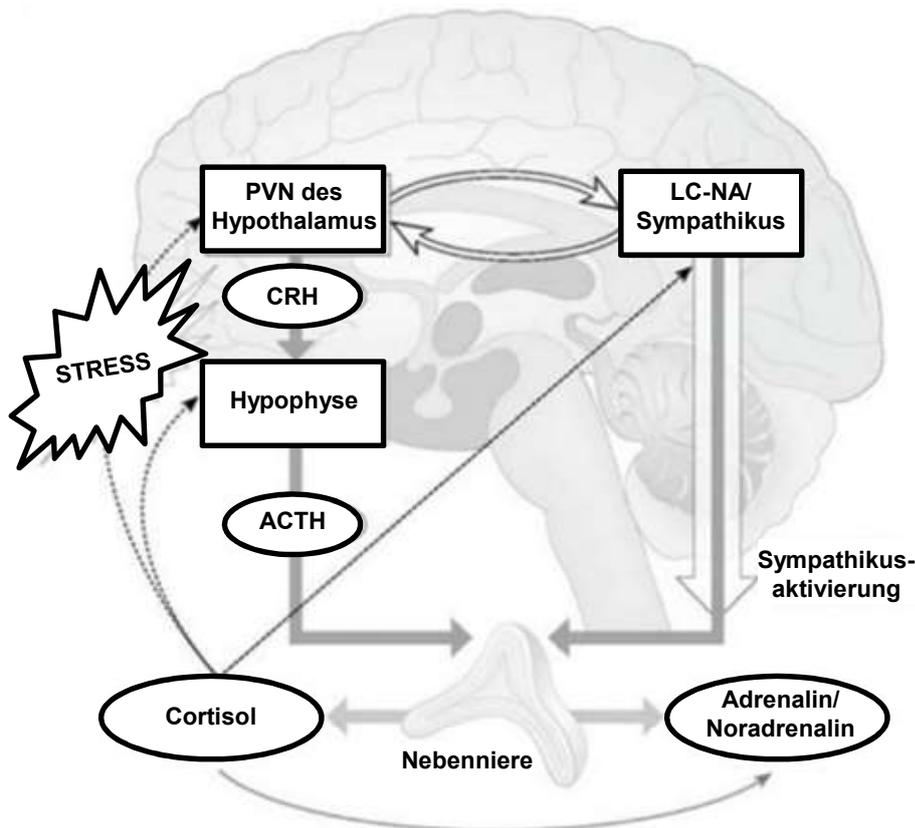


Abbildung 1.2.3: Schematische Übersicht über die HPA- und die SAM-Achse.

Die schnelle Stressreaktion wird über die SAM-Achse (LC-NA/Sympathikus) vermittelt, während kurz darauf auch die HPA-Achse ausgehend von den PVN des *Hypothalamus* aktiviert wird. Rechtecke stellen Hirnregionen dar, durch Kreise werden Neurohormone, Neuropeptide und Hormone veranschaulicht. Abbildung modifiziert nach Wippert & Borgetto, 2009, S. 80.

1.2.2.2.1 Beteiligung der SAM-Achse an der Stressantwort

Stressoren psychischer, psychosozialer oder physischer Art aktivieren eine neuronale und humorale Reaktion des Organismus (Wippert & Borgetto, 2009, S. 108). An der SAM-Achse ist das sympathische Nervensystem (SNS) beteiligt. (Rensing, 2006, S. 131). Ein weiterer Bestandteil der SAM-Achse ist das Mark der Nebennierenrinde (NNM), welches endokrine Zellen enthält, die aus Ganglien des *Sympathikus* evolviert sind (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 107). Die dritte Komponente des SAM-Systems sind die Katecholamine Noradrenalin (NA) und Adrenalin (A), welche aus Tyrosin im Hirn, im SNS und in chromaffinen Zellen des NNM synthetisiert werden und sowohl als Neurotransmitter als auch als Hormone wirken (Rensing, 2006, S. 85, Wippert & Borgetto, 2009, S. 108).

Die Aktivierung und der Ablauf des SAM-Achsensystems ist wie folgt: Die Stressperzeption erfolgt im ZNS und wird an den *Locus coeruleus* (LC) im Hirnstamm weitergeleitet (Rensing, 2006, S. 129). Einige der LC-Neuronen projizieren in den *Hypothalamus*, der wiederum Neuronenkerne der *Medulla oblongata* innerviert, die erregende Impulse auf sympathische präganglionäre Neuronen überträgt (Rensing, 2006, S. 87). Die Vermittlung der Stressantwort wird daher von LC und *Hypothalamus* gesteuert und führt im Gehirn zu einer NA-Ausschüttung, die eine erhöhte Erregung zur Folge hat (Wippert & Borgetto, 2009, S. 107). Dabei wird das SNS aktiviert, das über seine postganglionären Axone Muskulatur, Atmung und das Herz-Kreislauf-System moduliert (Rensing, 2006, S. 129; Purves, Markl, Sadava & Held, 2011, S. 1204). Durch direkte Verbindung zum *Sympathikus* sezernieren die endokrinen NNM-Zellen NA und A im Verhältnis von 4:1 in die Blutbahn (Rensing, 2006, S. 129, 131). Durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems werden die vegetativen Fähigkeiten des Organismus gesteigert. Die Sauerstoffversorgung wird durch Steigerung der Frequenz und des Schlagvolumens des Herzens sowie durch Erweiterung der Bronchien erhöht (Purves, Markl, Sadava & Held, 2011, S. 1204). Gleichzeitig werden die Tätigkeit der Verdauung und der glatten Muskulatur der Blutgefäße gemindert, um die Blutzufuhr zu den „wichtigeren“ Organen zu ermöglichen (Rensing, 2006, S. 131; Wippert & Borgetto, 2009, S. 108). Die Ausschüttung der Katecholamine in das Blut koordiniert eine ähnliche Wirkungskette. Die Leistungsfähigkeit der wichtigen Organe wie Gehirn, Lunge und Herz wird erhöht, während die Funktion der minder relevanten Organe gedrosselt wird (Rensing, 2006, S. 131; Wippert & Borgetto, 2009, S. 108). Eine weitere wichtige Aufgabe der Katecholamine ist die kurzfristige Mobilisierung von Energiereserven, die auch vom SNS vermittelt wird (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 103). Zur Energieversorgung von Muskeln und Gehirn wird über den Prozess der Gluconeogenese Glukose aus dem Glykogenvorrat in der Leber und den Muskeln synthetisiert. Außerdem erfolgt eine Lipolyse in den Fettzellen, um energiereiche Fettsäuren bereitzustellen (Rensing, 2006, S. 131).

Die Terminierung der SAM-Achsen-Aktivität erfolgt durch verschiedene negative Rückkopplungsschleifen, die bereits bei Ausschüttung von NA als Neurotransmitter induziert werden (Rensing, 2006, S. 146). Die in den Blutstrom sezernierten Katecholamine werden innerhalb weniger Minuten entweder wieder in die Nervenzellen aufgenommen oder enzymatisch zum Beispiel durch Monoamino-Oxidasen (MAO) abgebaut. Die Wirkung des SNS auf die entsprechenden Organe hält noch kürzer an (Wippert & Borgetto, 2009, S. 108). Auf rasche Weise werden die Signalmoleküle der SAM-Achse auf ihre ursprüngliche Konzentration herunter gedrosselt (Rensing, 2006, S. 146), um die Überlastung des Organismus zu vermeiden.

1.2.2.2 Beteiligung der HPA-Achse an der Stressantwort

Wie bei der SAM-Achse aktivieren psychische, psychosoziale oder physische Stressoren die HPA-Achse, allerdings reagiert letztere etwas zeitversetzt und zeigt dafür eine länger andauernde und vielseitigere Wirkung (Rensing, 2006, S. 147). Wahrgenommene Stressoren werden vom *Cortex* und dem limbischen System an die PVN des *Hypothalamus* weitergeleitet (Rensing, 2006, S. 149; Wippert & Borgetto, 2009, S. 109). Durch seine neuronalen Vernetzungen innerhalb des limbischen Systems und des peripheren ANS, steuert der *Hypothalamus* sämtliche vegetativen Funktionen und stimmt diese mit den aktuellen Vorgängen im Organismus ab (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 123, 126). Zudem ist der *Hypothalamus* über den Hypophysenstiel mit der Hypophyse verbunden, über welche er die organismischen Funktionen reguliert (Bear et al., 2018, S. 562-563). Bei Vermittlung einer Stressreaktion durch die HPA-Achse sezernieren neurosekretorische Zellen des PVN Corticoliberin (*corticotropin releasing hormon*, CRH), welches in der Adenohypophyse die Synthese und Freisetzung von Corticotropin (adrenocorticotropes Hormon, ACTH) bewirkt. Über die Blutbahn erreicht ACTH die Nebennierenrinde (NNR) (Bear et al., 2018, S. 567) und vermittelt die Sekretion von Mineralocorticoiden aus der *Zona glomerulosa* und Glucocorticoiden aus der *Zona fasciculata* der NNR (Rensing, 2006, S. 155).

Während Mineralocorticoide den Mineralstoffwechsel regulieren (Purves et al., 2011, S. 1205), ist die Wirkung des Glucocorticoids Cortisol weitreichender. Cortisol unterliegt (zusammen mit den anderen Hormonen der HPA-Achse) einer zirkadianen Synthese und Sekretion, die nach dem Aufwachen am höchsten ist (Wippert & Borgetto, 2009, S. 109). Da es lipidlöslich ist, gelangt Cortisol in das Zellinnere und bindet dort an intrazelluläre Mineralocorticoid- und Glucocorticoidrezeptoren (MR und GR), die in fast allen Körperzellen vorkommen (Rensing, 2006, S. 155; Wippert & Borgetto, 2009, S. 109). Auf diese Weise erreicht Cortisol nicht nur Zielzellen in der Peripherie. Da es die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, wirkt es zudem im Gehirn. GR sind in der *Amygdala*, in Regionen des präfrontalen *Cortex*, im *Hippocampus*, im *Hypothalamus*, der *BNST* und im *Rhombencephalon* verortet. MR co-lokalisieren mit GR, ihr Vorkommen beschränkt sich jedoch auf den präfrontalen *Cortex*, den *Hippocampus* und die *Amygdala* (Myers, McKlveen & Herman, 2014). Cortisol werden sowohl genomische als auch nicht-genomische Wirkungsweisen zugeschrieben. Im Cytoplasma gelangt Cortisol durch Bindung an GR oder – mit höherer Affinität – an MR in den Zellkern, lagert dort an Zielsequenzen (sog. GRE-Sequenzen) in Genpromotoren an und reguliert die Transkription (Rensing, 2006, S. 148, 155, 159). Die nicht-genomischen Effekte werden durch Aktivierung oder Inaktivierung zellulärer Proteine (z. B. Transkriptionsfaktoren, Kinasen) vermittelt.

Aufgrund schneller neurologischer und physiologischer Reaktionen auf eine Cortisol-ausschüttung werden ferner membranständige GR und MR angenommen (siehe: Groeneweg, Karst, de Kloet & Joëls, 2012).

In einer Stresssituation kann die Cortisolkonzentration bis zu 10-fach erhöht sein (Rensing, 2006, S. 156) und die Cortisol-abhängigen Signalkaskaden werden überwiegend über GR vermittelt (Groeneweg et al., 2012; Myers et al., 2014). Die wesentliche Aufgabe von Cortisol ist dabei die Bereitstellung von Energie (über Gluconeogenese und Lipolyse) und die Drosselung der Funktion der weniger wichtigen Organe (Wippert & Borgetto, 2009, S. 109). Cortisol amplifiziert ferner die Aktivität des SAM-Systems (Rensing, 2006, S. 148). Außerdem hat Cortisol eine unterdrückende Wirkung von Entzündungsreaktionen, weshalb es auch das Immunsystem beeinflusst (Rensing, 2006, S. 157, 160; Wippert & Borgetto, 2009, S. 109).

Die HPA-Achse wird wie die SAM-Achse durch negative Rückkopplungssignale terminiert. Dies erfolgt durch Bindung der gebildeten Hormone an Rezeptoren der beteiligten Komponenten der Stressreaktion. Beispielsweise hemmen Cortisol oder ACTH die Aktivität der HPA-Achse durch Bindung an CRH-sezernierende PVN-Neuronen (Rensing, 2006, S. 151). Wie bereits geschildert, erfolgt das Einsetzen der HPA-Achse in einer Stresssituation nicht so rasch wie das der SAM-Achse; ihre Wirkung ist jedoch langfristiger. Nach einer gewissen Stressdauer drosselt die HPA-Achse die Aktivität der SAM-Achse zusätzlich herunter, um einer Überbelastung des Organismus entgegenzuwirken (Rensing, 2006, S. 148). Des Weiteren wird die HPA-Achsen-Aktivität durch den *Hippocampus* mitgesteuert, der zahlreiche GR und MR enthält und durch die Cortisolfreisetzung aus der NNR zusätzlich die CRH-Neuronen des *Hypothalamus* hemmt (Bear et al., 2018, S. 824). Darüber hinaus wird durch Aktivierung der HPA-Achse das Gedächtnis über das limbische System geprägt, sodass sich der Organismus an eine Stresssituation erinnert, wodurch in zukünftigen Situationen ein angepasstes Verhalten (Konditionierung, Rensing, 2006, S. 110) erfolgen kann.

1.2.2.3 Das Lernen und Erinnern von Furcht

Furcht löst im Organismus eine Stressreaktion aus. Die Konditionierung von Furcht basiert auf dem Prinzip der Pavlov'schen Konditionierung, bei der ein spezifischer Reiz mit einem unspezifischen Reiz assoziativ verknüpft wird (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 723; Rensing, 2006, S. 110). Dieser Prozess wird von der *Amygdala* bewerkstelligt (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 724). Neben der *Amygdala* sind am Lernen und Konsolidieren von stresshaften Ereignissen auch der *Hippocampus* und Regionen des präfrontalen *Cortex* beteiligt (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 724-725). Wie bereits beschrieben, vermittelt der *Hippocampus* dabei kontextabhängige Informationen (Raum und Zeit), während der mediale präfrontale *Cortex* das Verlernen aversiver Erinnerung reguliert (Abbildung 1.2.4).

Die schnellste Furchtkonditionierung ist unbewusst und erfolgt in der *Amygdala* über erregende (glutamaterge) efferente Verbindungen des *Thalamus*, der (vom *Cortex*) unzensurierte Reize in den amygdaloidalen Zentralkern weiterleitet. Ist eine Diskriminierung zwischen zwei Stressinformationen erforderlich, werden Verbindungen aus sensorischen Regionen des *Neocortex* und der Assoziationszentren benötigt. Fließen jedoch in die Stresssituation zusätzlich kontextabhängige Informationen mit ein, sind bei der Konditionierung von Furcht Verbindungen von *Temporalcortex* (deklaratives Gedächtnis) und *Hippocampus* beteiligt (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 724-725). Als Folge dessen werden über intra-amygdaloidale Verschaltungen die lateralen Kerne und der Zentralkern der *Amygdala* angeregt und die gelernten Informationen an den orbitofrontalen *Cortex* und das *Striatum* weitergeleitet (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 724; Rensing, 2006, S. 111). Während über den orbitofrontalen *Cortex* durch einen Abgleich der neuen Erfahrung mit bestehenden Erfahrungen eine adäquate Verhaltensreaktion abgewogen wird (Wahlreaktion), werden über das *Striatum*, in Verbindung mit dem *Nucleus accumbens*, direkte und aktive Verhaltensweisen gesteuert (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 725).

Die Extinktion von konditionierter Erinnerung erfolgt über anregende Signale aus dem medialen präfrontalen *Cortex*, die inhibitorische Neuronen der basolateralen *Amygdala* anregen (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 724).

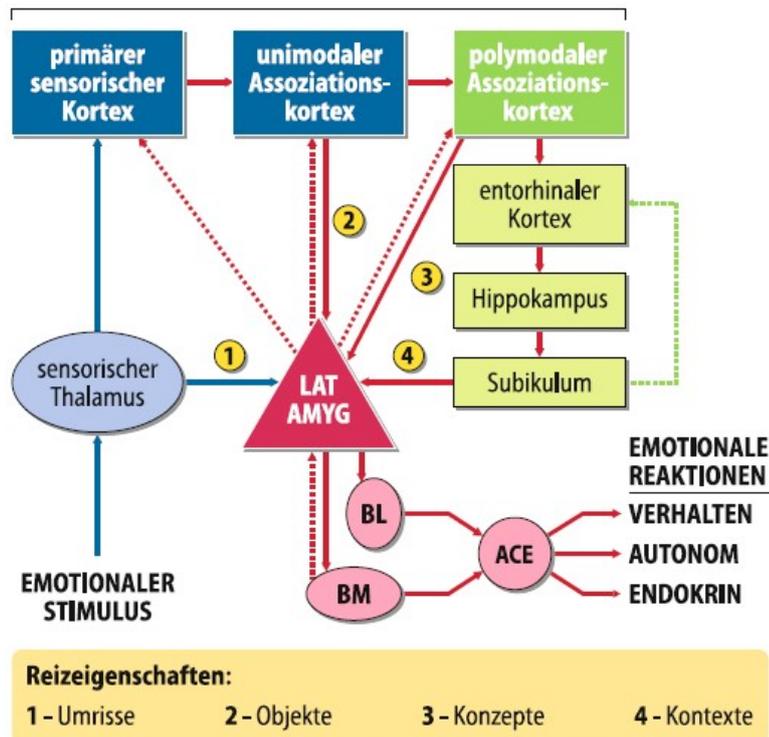


Abbildung 1.2.4: Furchtkonditionierung

In den lateralen Kern der *Amygdala* (LAT AMYG) konvergieren Reizinformationen aus *Thalamus*, *Neocortex*, höher geschalteten Assoziationsarealen und *Hippocampus*. Bei der Furchtkonditionierung werden diese verschiedenen Versionen eines Stressors von der *Amygdala* prozessiert. Abhängig von der Art der Stressinformation (siehe „Reizeigenschaften“), erfolgt die Konditionierung unter Beteiligung diverser neuronaler Regionen und Verbindungen (1-4). Über intra-amygdaloide Verschaltungen werden die basomedialen (BM) und basolateralen (BL) Kerne aktiviert, welche die Stressinformationen an den Zentralkern (ACE) weiterleiten, wodurch eine adäquate Reaktion veranlasst wird. Abbildung aus: Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 724.

Auf molekularer Ebene erfolgen die assoziative Verknüpfung und die Konsolidierung des zu erlernenden Reizes über den Mechanismus der Langzeitpotenzierung (LTP) und über postsynaptische *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (Hebb-Regel) des lateralen Kerns der *Amygdala* (Abbildung 1.2.5) (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 725; Rensing, 2006, S. 111-115). Während einer „normalen“ neuronalen Reizweiterleitung wird Glutamat an der Präsynapse ausgeschüttet und bindet an NMDA und *non*-NMDA-Rezeptoren, welche häufig α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)-Rezeptoren sind. NMDA-Rezeptoren sind liganden- und spannungsgesteuerte Ionenkanäle, die zudem durchlässig für Calciumionen sind, welche als *second messenger* nachgeschaltete zelluläre Prozesse aktivieren. Zunächst sind die NMDA-Rezeptoren durch Magnesiumionen blockiert und die elektrische Transmission einzelner Signale erfolgt über AMPA-Rezeptoren. Die Magnesiumionen an NMDA-Rezeptoren werden erst verdrängt, wenn sowohl präsynaptisch Glutamat ausgeschüttet wird und zusätzlich die postsynaptische Membran nach tetanischer, elektrischer (hochfrequenter) Reizung depolarisiert wird. Hierauf strömen neben Natrium- auch Calciumionen in die Zelle und aktivieren Calcium-abhängige Kinasen, die wiederum die Glutamat-Sensitivität der AMPA-Rezeptoren durch Phosphorylierung erhöhen. Zusätzlich wird die Erregbarkeit durch retrograde Botenstoffe (z. B. Stickoxid) an der Präsynapse erhöht, welche wiederum die präsynaptische Transmitterausschüttung verstärken. Bei anhaltender LTP werden weitere NMDA- und AMPA-Rezeptoren in die synaptischen Dornfortsätze integriert. Es erfolgt eine synaptische Verdichtung, bei der die Kontaktstelle der Postsynapse vergrößert und verstärkt wird, wodurch neue prä- und postsynaptische Interaktionsbereiche entstehen und die Verbindungen permanent verstärkt werden. Sind diese Prozesse auf neuronaler Ebene etabliert, wird eine gelernte Furchtsituation in den nachgeschalteten limbischen und gedächtnisassoziierten Hirnarealen konsolidiert und erinnert (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 644-647; Rensing, 2006, S. 111-115).

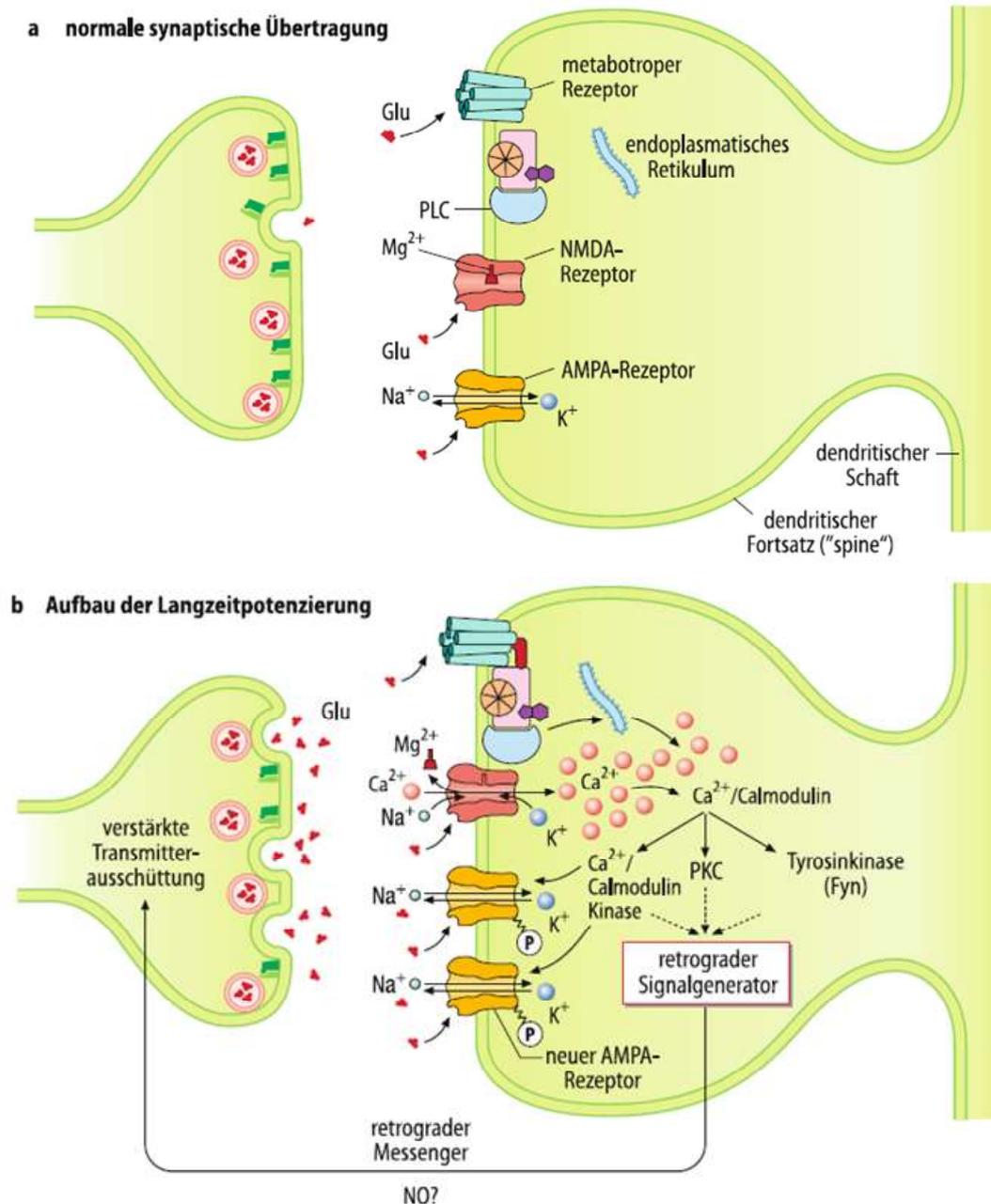


Abbildung 1.2.5: Lernen durch Langzeitpotenzierung (LTP)

Oben: Während einer normalen synaptischen Übertragung sind non-NMDA-Rezeptoren (hier: AMPA-Rezeptoren) durch Magnesiumionen (Mg^{2+}) blockiert. **Unten:** Bei gleichzeitig erhöhter (tetanischer) Reizweiterleitung und Transmitterausschüttung (Glutamat, Glu) wird die Postsynapse über AMPA-Rezeptoren depolarisiert. Durch einströmende Calciumionen (Ca^{2+}) werden intrazelluläre Kinase-abhängige Prozesse induziert, wodurch stillgelegte AMPA-Rezeptoren reaktiviert bzw. neue AMPA-Rezeptoren in die Synapse integriert werden. Die Transmitterausschüttung wird durch retrograde Botenstoffe verstärkt. Abbildung aus: Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 645.

1.2.2.4 Biologische Folgen von chronischem Stress

Durch Langzeitstress werden die an einer Stressreaktion beteiligten Systeme aufgebraucht und eine Erschöpfung der Energie tritt ein. Anfangs bleiben die autonomen und endokrinen Prozesse im Aktivzustand. Vor allem durch permanent erhöhte Cortisolkonzentrationen treten mit der Zeit organische Schäden auf und auch das Immunsystem wird beeinträchtigt. Während aktive Bewältigungsstrategien die Rückführung der Homöostase und eine Adaptation bewirken können, führt eine dauerhafte Belastung durch Stress zur Entwicklung von Krankheiten (Wippert & Borgetto, 2009, S. 114).

Dauerhafte Stressoren erhöhen zudem die Produktion von Katecholaminen im LC und in der Peripherie. Aufgrund der Verbindungen zum *Hippocampus* und der *Amygdala* wird in diesen Regionen die Erregungsleistung gesteigert. Neben erhöhter Erregung und Vigilanz, welche die Fokussierung auf die Stressoren erhöhen, werden emotionale Reaktionen verstärkt und die Wahrscheinlichkeit zur Entstehung von Angststörungen, Belastungsstörungen oder Depressionen wird gefördert (Birbaumer & Schmidt, 2010, S. 728).

Bei chronischem Stress werden sowohl eine Hyper- als auch eine Hypoaktivität der HPA-Achse beobachtet, die durch erhöhtes oder reduziertes Vorkommen von CRH, ACTH oder Cortisol gekennzeichnet ist (Wippert & Borgetto, 2009, S. 115-116). Eine hypoaktive HPA-Achse ist mit dem Erschöpfungssyndrom assoziiert, das in unterschiedlicher Ausprägung durch reduzierte Stresstoleranz, Schmerz und/oder Erschöpfung charakterisiert wird. Im Zusammenhang mit einer permanenten Hyperaktivität der HPA-Achse steht das Metabolische Syndrom, welches mit erhöhten Konzentrationen von Glukose, Insulin und Fetten im Blut sowie Bluthochdruck oder Adipositas einhergeht. Dies ist damit zu begründen, dass die Hormone der HPA-Achse zusammen mit denen der SAM-Achse stets Energie-reserven mobilisieren, die eine Fettansammlung und eine Insulinresistenz fördern. Dieses Ungleichgewicht führt ferner dazu, dass Skelettmasse und Muskulatur abgebaut werden. Da auch die anderen Hormonachsen verändert sind, wirkt sich Dauerstress zudem auf Wachstums- und Schilddrüsenhormone aus, welche die entwickelten Störungen der metabolische Funktionen zusätzlich verstärken (Wippert & Borgetto, 2009, S. 118-119).

Eine dauerhaft erhöhte Cortisolkonzentration durch permanenten Stress oder einer traumatischen Erfahrung ist zytotoxisch und spiegelt sich auch auf neuronaler Ebene wider (Rensing, 2006, S. 116). Vor allem im Tiermodell wurde gezeigt, dass Dauerstress zu einer funktionalen Reduktion der Pyramidenzellen in *Hippocampus* und *Präfrontalcortex* führt. Außerdem ist die Neurogenese im *Gyrus dentatus* beeinträchtigt (Rensing, 2006, S. 116-117). Daher ist naheliegend, dass sich dauerhafter Stress negativ auf kognitive Prozesse auswirkt. Des Weiteren wurde in Tierstudien eine Vergrößerung der *Amygdala* als Folge von dauerhaftem Stress beobachtet, womit eine erhöhte Ängstlichkeit assoziiert ist (Rensing,

2006, S. 115). Bei Menschen, die ein Trauma erlebt haben oder bereits an einer posttraumatischen Belastungsstörung leiden, wurde ein Verlust an Gewebe des präfrontalen *Cortex* gepaart mit reduzierter Aktivität festgestellt (Rensing, 2006, S. 115). Da der Fokus dieser Arbeit auf frühkindlichem Stress liegt, werden weitere biologische Veränderungen, die daraus resultieren, im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.2.3 Die Folgen von frühkindlichem Stress

1.2.3.1 Permanente Störung der HPA-Achse

Viele Studien haben gezeigt, dass frühkindlicher Stress (*early-life stress*, ELS) zu erhöhter Aktivität der SAM- und der HPA-Achse führt. Heim et al. (2000) haben bei ELS-erfahrenen Frauen deutlich erhöhte ACTH- und Cortisol-Werte und vegetative Parameter (Herzschlagrate) festgestellt. Zudem litten die meisten dieser Frauen (85 %) an Depression (Heim, 2000). In einer späteren Studie fanden die Wissenschaftler darüber hinaus eine reduzierte Oxytocin-Konzentration in der Rückenmarksflüssigkeit, was weitere hormonelle Veränderungen bestätigte (Heim et al., 2009). Die meisten Untersuchungen bei Kindern bestätigen ebenfalls eine veränderte HPA-Achsenaktivität als Folge von ELS. Allerdings fließen zahlreiche Faktoren in diese Beobachtungen mit ein, die zum Teil zu gegensätzlichen Ergebnissen führen. Solche Faktoren umfassen bestehende Prädispositionen für psychische Störungen (Hart, Gunnar & Cicchetti, 1996; Kaufman, 1991), die Art und Dauer der stressvollen Erfahrung (Gunnar & Quevedo, 2007) und die elterliche Beziehung zum Kind (Essex et al., 2012). Dennoch zeigen viele Studien, dass bei ELS-Erfahrungen das Risiko für zusätzliche Erkrankungen im Erwachsenenalter erhöht ist (Essex et al., 2012) und eine Korrelation zur Stressintensität besteht (Rensing, 2006, S. 110). Vor allem scheint bei Kindern, die Probleme in ihrem Lebensumfeld erfahren oder bei denen eine Depression festgestellt wurde, eine veränderte HPA-Achsen-Aktivität zu bestehen (Harkness, Stewart & Wynne-Edwards, 2011; Hart et al., 1996; Kaufman, 1991). Allerdings ist auch zu erwähnen, dass in einigen Studien über ELS-erfahrenen Kindern mit Verhaltensauffälligkeiten eine gedämpfte Aktivität der HPA-Achse beschrieben wurde. Diese Beobachtung könnte durch eine Art Habituation nach permanenten, frühkindlichen Stresserfahrungen erklärt werden oder ebenfalls auf genetischen oder multifaktoriellen Gegebenheiten beruhen (van Goozen & Fairchild, 2008; McCrory, De Brito & Viding, 2011).

Um die unterschiedlichen Variablen von ELS-Erfahrungen einzugrenzen, hatten Essex et al. (2012) in einer prospektiven Langzeitstudie verschiedene ELS-Arten, die Kinder im Säuglings- und Vorschulalter (1 Monat bis 4,5 Jahre alt) erfahren hatten, in Zusammenhang mit

gesundheitlicher Symptomatik und Aktivität der HPA-Achse im Alter von 9 bis 15 Jahren untersucht (Essex et al., 2012). Die ELS-Varianten bestanden aus maternaler und/oder paternaler Depression und angespannten häuslichen Verhältnissen oder aus einer Kombination aus allen drei Gegebenheiten. Die Autoren stellten heraus, dass die ELS-Formen kumulativ zu einer Veränderung der HPA-Achse führten, die im jugendlichen Alter entweder hyper- oder hypoaktiv war. Des Weiteren hing die gesundheitliche Symptomatik und die Aktivität der HPA-Achse von der ELS-Art ab: Bei isolierter maternaler Depression hatten die Kinder eine hyperaktive HPA-Achse und eine zunehmende Symptomatik oder eine hypoaktive HPA-Achse und eine abnehmende Symptomatik. Hatten die Kinder jedoch lediglich häusliche Turbulenzen erfahren, zeigten sie entweder eine hypoaktive HPA-Achse und eine zunehmende Symptomatik oder eine hyperaktive HPA-Achse und eine abnehmende Symptomatik (Essex et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren daher nicht nur, dass die Art und Intensität der ELS-Erfahrungen die HPA-Achsenaktivität beeinflussen, sondern auch, dass die HPA-Achsenaktivität gegensätzlich reagieren kann.

1.2.3.2 Reduktion des Gehirngewebes

Der *Hippocampus* ist an der Glucocorticoid-abhängigen, negativen Rückkopplung der HPA-Achsenaktivität beteiligt. Darüber hinaus ist er besonders empfindlich für stressbedingte Schäden, wahrscheinlich aufgrund einer Erhöhung von GR und Glutamatrezeptoren (Neigh, Gillespie & Nemeroff, 2009). Eine Reduktion von *Hippocampus*-Gewebe wurde von De Bellis et al. (1999) bei ELS-erfahrenen Kindern mit posttraumatischer Stressbelastung (PTSB) beobachtet. Die Autoren fanden bei ihnen mittels Magnetresonanztomographie ein vermindertes (intracranielles und cerebrales) Gehirnvolumen, ein kleineres *Corpus callosum* und ein vergrößertes Volumen der lateralen Ventrikel (De Bellis et al., 1999). In nachfolgenden Studien wurden diese Beobachtungen jedoch nicht bestätigt (McCrary et al., 2011). Jedoch wurde eine hippocampale Atrophie bei Erwachsenen mit frühkindlicher Stresserfahrung in mehreren Studien beschrieben. Zudem wurde in einer Studie ein geschlechtsspezifische Stressantwort festgestellt (Colle et al., 2017). Als mögliche Erklärung für das verminderte *Hippocampus*-Volumen bei Erwachsenen werden zwei potenzielle Erklärungsansätze formuliert: Die „Neurotoxizitätstheorie“ basiert auf erhöhtem Cortisolvorkommen aufgrund chronischen Stresses, das zur neuronalen Degeneration im *Hippocampus* führt. Hingegen postuliert die „Vulnerabilitätstheorie“ ein bereits bestehendes, vermindertes *Hippocampus*-Volumen, das ursächlich für die Entstehung von angstassoziierten Leiden sein könnte (Lupien, McEwen, Gunnar & Heim, 2009; McCrary et al., 2011).

Ähnlich gegensätzliche Ergebnisse sind in der Literatur für die *Amygdala* von ELS-erfahrenen Kindern oder Erwachsenen mit PTSD zu finden. Bis auf zwei Studien (Mehta et

al., 2013; Tottenham et al., 2010) werden keine Auffälligkeiten hinsichtlich des *Amygdala*-Volumens bei Untersuchungen von Kindern festgestellt. Tottenham et al. (2010) fanden dafür einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem *Amygdala*-Volumen und dem Adoptionsalter von Heimkindern bzw. der Dauer des Heimaufenthalts, was auf eine veränderte Gehirnentwicklung durch chronischen frühkindlichen Stress hinweisen könnte (Tottenham et al., 2010). Das *Amygdala*-Volumen von ELS-erfahrenen Erwachsenen ist bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht ausreichend untersucht worden, um einen Zusammenhang ableiten zu können (McCrary et al., 2011).

Gleichfalls unterschiedlich fallen die Beobachtungen für die Region des präfrontalen *Cortex* von ELS-erfahrenen Kindern aus. Manche Studien fanden keine Unterschiede (De Bellis et al., 1999), manche vergrößerte präfrontale *Cortices* (Carrion et al., 2009; Richert, Carrion, Karchemskiy & Reiss, 2006) oder reduzierte *Cortex*-Volumina (Hanson et al., 2010). Die Studien basierten allerdings auf unterschiedlichen Untersuchungsweisen und es wurden Kinder verschiedenen Alters mit diversen Stressexpositionen untersucht, was die Diskrepanzen in den Ergebnissen erklären könnte (McCrary et al., 2011). Bei Erwachsenen mit ELS-Erfahrung ist das Volumen des präfrontalen *Cortex* allerdings in mehreren Studien verringert (van Harmelen et al., 2010; Tomoda et al., 2009; Treadway et al., 2009).

Durch ELS verursachte Veränderungen im Gehirn liefern eine Erklärungsgrundlage für die psychischen Leiden, kognitiven Beeinträchtigungen, Verhaltensstörungen, Abhängigkeiten und sozialen Probleme bis hin zum Selbstmord, welche im Erwachsenenalter häufig beobachtet werden. Wenn die Folgen einer chronischen Stressexposition in der Kindheit jedoch bis ins Erwachsenenalter persistieren, ist ein (epi)genetischer Zusammenhang offensichtlich. Da nahezu jede Zelle GR und MR enthält und Cortisol auf die Genexpression einwirkt, ist es naheliegend, dass ELS-induzierte Störungen der Stress-Hormonachsen das Transkriptom verändern können. Dauerhafte Veränderungen der Genexpression werden durch epigenetische Mechanismen vermittelt.

1.2.3.3 Epigenetische Veränderungen

Während für Tiermodelle bereits einige epigenetische Ergebnisse vorliegen, ist die Untersuchung von menschlichem Hirngewebe sehr schwierig. Einige Hinweise gibt es vor allem aus Hirngewebe, das *post mortem* von Suizidopfern mit vorangegangener ELS-Erfahrung untersucht wurde. In der Studie von McGowan et al. (2009) wurde eine reduzierte Expression von *NR3C1*, welches für GR kodiert, im *Hippocampus* von ELS-erfahrenen Erwachsenen festgestellt, die mit einer erhöhten DNA-Methylierung in der Promotorregion korrelierte (McGowan et al., 2009). Zur Identifikation von genetischen Markern und zur

Entwicklung von medikamentösen Therapiemaßnahmen werden epigenetische Untersuchungen daher an DNA-Proben aus Blut oder Speichel durchgeführt. Obwohl epigenetische Modifikationen einer Zelle ihre Identität verleihen und deshalb gewebspezifisch sind, haben Tyrka et al. (2012) erhöhte Werte der DNA-Methylierung des *NR3C1*-Promotors in Leukozyten von ELS-erfahrenen Erwachsenen festgestellt (Tyrka, Price, Marsit, Walters & Carpenter, 2012). Neben der Analyse von Kandidatengenen, die unmittelbar an der biologischen Stressreaktion beteiligt sind, haben erste genomweite Methylierungsanalysen verschiedene Genpromotoren identifiziert, die unterschiedliche Methylierungsmuster (sowohl Hypo- als auch Hypermethylierung) bei ELS-erfahrenen im Vergleich zu Stress-unerfahrenen Erwachsenen zeigten (Suderman et al., 2014). Aufgrund der Variabilität und Komplexität von ELS-induzierten organismischen Veränderungen hat sich ein umfangreiches Forschungsfeld aufgetan, das noch weiterer Untersuchungen bedarf, um die genetischen und epigenetischen Vorgänge aufzuschlüsseln. Durch die Verwendung von Tiermodellen ist es möglich, die verschiedenen ELS-Arten (z.B. Mutter-Kind-Beziehung, maternaler Stress) einzeln zu verschiedenen Lebenszeitpunkten zu analysieren. Im nächsten Abschnitt werden daher ELS-Paradigmen vorgestellt, welche sich auf die Mutter-Kind-Interaktion im Tiermodell fokussieren.

1.2.4 Frühkindlicher Stress im Mausmodell

Wie bereits geschildert, sind die Zusammenhänge zwischen der Entwicklung von physischen und psychischen Störungen und frühkindlichem Stress bereits geschildert worden; jedoch ist es schwierig eine unmittelbare Kausalität herzuleiten. Aus diesem Grund werden die Zusammenhänge in zahlreichen Tiermodellen basierend auf unterschiedlichen Stress-Paradigmen untersucht. Das Bewusstsein über die Bedeutung einer intakten Beziehung in den ersten Lebensjahren eines Kindes zu einer Bezugsperson, vor allem zur Mutter, besteht seit Jahrhunderten in der Allgemeinbevölkerung. Erst seit den 1950er Jahren werden die Zusammenhänge zwischen mangelnder Fürsorge und den biologischen Auswirkungen erforscht (Walker et al., 2017). Daher wurden ELS-Paradigmen im Tiermodell etabliert, die sich auf maternale Separation für eine gewisse Dauer oder gar Unterbindung maternaler Fürsorge konzentrierten (Walker et al., 2017). Ein häufig verwendetes ELS-Paradigma bei Nagetieren, welches inzwischen von über 50 Forschungsgruppen verwendet wurde und wird (Chen & Baram, 2016), basiert auf der Reduktion von Nistmaterial innerhalb der ersten Lebenswochen der Nachkommen, was zu einer fragmentierten Mutter-Kind-Interaktion führt und bei den Nachkommen chronischen Stress induziert (Chen & Baram, 2016). In Folge dessen zeigen die Nachkommen neben einer veränderten Aktivität der HPA-Achse auch vielfältige Änderungen in der Konnektivität kognitiver und emotionaler Hirnbereiche, in der

Hirnentwicklung und auf Verhaltensebene (Chen & Baram, 2016; Gunn et al., 2013; Marrocco et al., 2019; Naninck et al., 2015; Rice, Sandman, Lenjavi & Baram, 2008; Walker et al., 2017; Yam, Naninck, Schmidt, Lucassen & Korosi, 2015). Aufgrund der hohen Analogie zur menschlichen Symptomatik als Folge von ELS und der stabilen Reproduzierbarkeit des ELS-Paradigmas im Tiermodell stellt die Reduktion von Nistmaterial ein robustes Modell zur Induktion von frühkindlichem Stress dar.

1.2.5 Tuberöse Sklerose

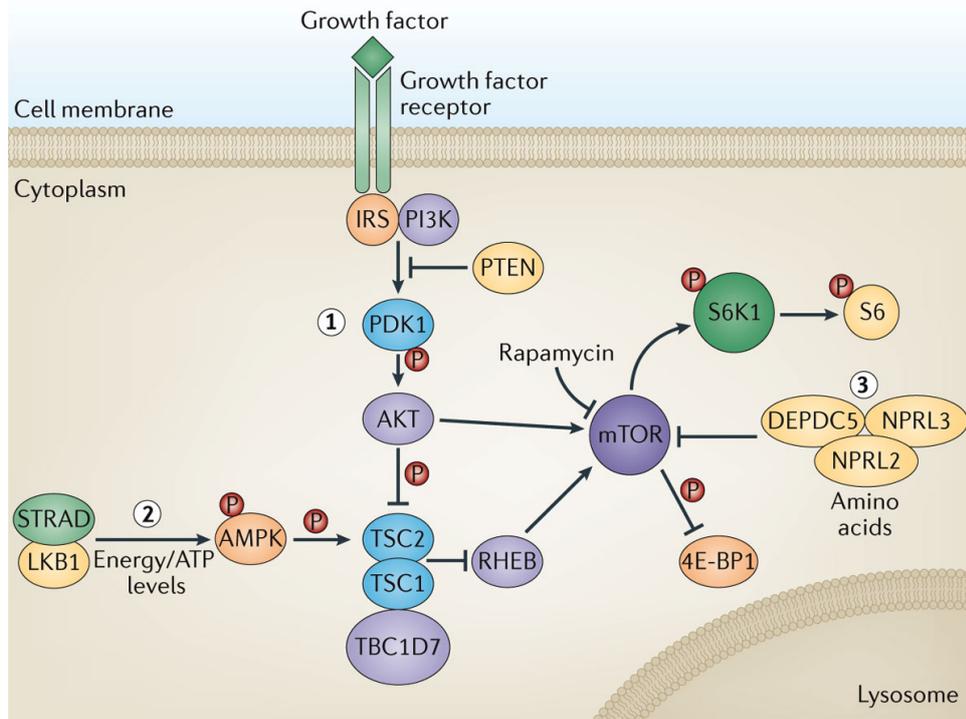
Tuberöse Sklerose (TSC) ist eine vererbare Multisystemerkrankung, die primär durch die Ausprägung von gutartigen Tumoren und Läsionen in verschiedensten Körperorganen charakterisiert ist. Die am häufigsten betroffenen Organe sind Haut, Gehirn, Nieren, Lungen und Herz (Switon, Kotulska, Janusz-Kaminska, Zmorzynska & Jaworski, 2016). Im Gehirn können dabei retinale Hamartome, kortikale Knollen, subependymale Knoten oder Riesenzellastrozytome (sog. „SEGA“) entstehen (Switon et al., 2016). Auf der Haut treten hypomelanotische Makulae, Angiofibrome, fibröse Stirnplaques, unguale Fibrome und Shagreen-Flecken auf (Ebrahimi-Fakhari, Meyer, Vogt, Pföhler & Müller, 2017). Weitere Manifestationen sind unter anderem kardiale Rhabdomyome, renale Angiomyolipome, eine multifokale, mikrozytäre Pneumozytenhyperplasie (MMPH), eine Lymphangioliomyomatosis (LAM) oder pulmonale Zysten (Curatolo, 2015; Switon et al., 2016). Außerdem treten diverse neurologische Symptome auf, wie Intelligenzminderung (bei 60 % der Betroffenen), Autismus (25 - 50 % der Betroffenen) oder Epilepsie (Switon et al., 2016). Dabei sind die am meisten beeinträchtigenden Symptome der Tuberösen Sklerose SEGA, Epilepsie und renale Angiomyolipome. Epilepsie kommt bei 80 – 90 % der TSC-Patienten vor und tritt erstmals in den ersten fünf Lebensmonaten auf (Switon et al., 2016). Des Weiteren können SEGA die Entstehung eines *Hydrocephalus* verursachen, wodurch die neurologischen Symptome verschlimmert werden (Curatolo, 2015; Switon et al., 2016). Renale Angiomyolipome führen zu inneren Blutungen oder Zerstörungen des umliegenden Gewebes (Switon et al., 2016).

TSC wird in 80 - 85 % der Betroffenen durch trunkierende, *loss-of-function*-Mutationen in den Genen *TSC1* (9q34) oder *TSC2* (16p13.3) verursacht (Northrup, Koenig & Pearson, 2018). Für *TSC1* sind über 200 Mutationen bekannt und etwa 30 % der TSC-Fälle werden durch Mutationen in *TSC1* verursacht (Northrup et al., 2018). Genveränderungen in *TSC2* treten in 70 % der Patienten auf. Bisher wurden über 700 *TSC2*-Mutationen beschrieben. Patienten mit *TSC2*-Mutationen sind in der Regel schwerer betroffen als Patienten mit *TSC1*-Mutationen (Northrup et al., 2018; Polchi, Magini, Di Meo, Tancini & Emiliani, 2018). Des Weiteren sind intronische Genvarianten und genetische Mosaik bekannt (Tyburczy et al., 2015).

TSC1 kodiert für HAMARTIN (140 kDa) und *TSC2* für TUBERIN (200 kDa), die in der Zelle einen Komplex (TSC-Komplex) bilden, der die inhibitorische Regulation des *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Signalwegs vermittelt (Switon et al., 2016). mTOR wiederum ist eine Serin/Threonin-Kinase und stellt die katalytische Untereinheit zweier Proteinkomplexe mit unterschiedlichen Funktionen dar: Der mTOR-Komplex 1 (mTORC1) wirkt entscheidend bei der Regulation des Zellwachstums und des Stoffwechsels mit und wird allosterisch durch Rapamycin (ein Kinase-hemmendes Immunsuppressivum) gehemmt. Hingegen ist der mTOR-Komplex 2 (mTORC2) für eine akute Rapamycin-Behandlung resistent und kontrolliert die Organisation des Cytoskeletts und die Zellproliferation. mTOR detektiert und moduliert sowohl intrazelluläre als auch externe Umweltsignale und erhält die Homöostase der Zelle aufrecht (Polchi et al., 2018; Switon et al., 2016). Durch vorgeschaltete Signalwege, die auf Wachstumsfaktoren, verfügbare Nährstoffe, Hormone und Stresssignale reagieren, wird die Aktivität von mTOR, insbesondere von mTORC1, gesteuert (Polchi et al., 2018). Über diverse Proteinkinase-Signalwege, wie den PI3K-AKT-Signalweg, die Ras-ERK-Kaskade oder die AMPK-Aktivität, wird die Aktivierung von mTORC1 unter anderem vom TSC-Komplex über die GTPase *Ras homolog enriched in brain* (RHEB) gesteuert (Abbildung 1.2.6) (Polchi et al., 2018). In der Zelle vermittelt die aktive Form von RHEB die spezifische Aktivierung der mTORC1-Kinaseaktivität (Bockaert & Marin, 2015). Die RHEB-Aktivität selbst wird von TUBERIN (*TSC2*) reguliert. Da TUBERIN eine C-terminale Domäne mit GTPase-aktivierender Funktion (GAP-Aktivität) besitzt, katalysiert es die GTP-gebundene (aktive) bzw. die GDP-gebundene (inaktive) Form von RHEB (Parmar & Tamanoi, 2010). In Anwesenheit des TSC-Komplexes ist RHEB und folglich mTORC1 inaktiv und der mTOR-Signalweg gehemmt. Aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf mTOR, wird der TSC-Komplex als Tumorsuppressor angesehen. Der Verlust oder die Fehlfunktion des TSC-Komplexes verursacht eine mTOR-Hyperaktivität, die als ursächlich für die Symptomatik von TSC-Patienten gesehen wird (Polchi et al., 2018; Switon et al., 2016). Eine Hochregulation von mTORC1 wurde nicht nur in Zellsystemen und Tiermodellen, sondern auch in Gewebeproben von TSC-Patienten beobachtet und darüber hinaus kann die Symptomatik durch eine Rapamycin-Medikation verbessert werden (Polchi et al., 2018; Switon et al., 2016).

Im Gehirn ist mTOR nicht nur an neuronalem Zellwachstum, sondern auch an neuronaler Polarität, Axonführung, dendritischer Plastizität und Differenzierung von Oligodendrocyten beteiligt (Graber, McCamphill & Sossin, 2013; Tyler et al., 2009). Des Weiteren zeigen einige Studien, dass mTOR bei der Konsolidierung von Erinnerungen mitwirkt, da es die Expression der nötigen Proteine wie synaptische Rezeptoren (vor allem AMPA-Rezeptoren) induziert sowie LTP und die Synaptogenese fördert (Pereyra, Kathe, De Landeta & Medina, 2018; Xiong et al., 2015).

Eine Dysfunktion des TSC-Komplexes verursacht eine aberrante Ausbildung und Differenzierung von Neuronen, die durch erhöhte Zellgröße bei gleichzeitig reduzierter Anzahl von Dendriten oder Entstehung von multiplen Axonen charakterisiert sind (Lipton & Sahin, 2014).



Nature Reviews | Neurology

Abbildung 1.2.6: Regulation des mTOR-Signalwegs

Schematische Übersicht über die drei Hauptmechanismen zur Regulation des mTOR-Signalwegs.

(1) Wachstumsfaktor-Signalweg: Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und anschließend von „Phosphoinositide-dependent kinase-1“ (PDK1) führt zur Phosphorylierung von „RAC-alpha serine/threonine-protein kinase“ (AKT). AKT hemmt TSC2, wodurch RHEB aktivierend auf mTORC1 einwirkt. Als Folge dessen wird einerseits über „S6-Kinase beta-1“ (S6K1) „Ribosomal protein S6“ (S6) aktiviert, wodurch die Proteinsynthese initiiert wird. Andererseits wird mTORC1 auf „Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1“ (4E-BP1) und löst Translationsvorgänge aus.

(2) Signalweg zur Detektion von Energiemangel: Bei Unterversorgung von zellulärem ATP phosphoryliert „Serine/Threonine Kinase 11“ (STK11) „AMP-activated protein kinase“ (AMPK), was zu einer TSC2-vermittelten mTOR-Inhibition führt, bis die ATP-Sollwerte wieder hergestellt werden.

(3) Signalweg zur Detektion von Aminosäuremangel: „DEP domain-containing protein 5“ (DEPDC5) bildet zusammen mit den „nitrogen permease regulator“-Proteinen NPRL2 und NPRL3 einen Komplex, der bei Aminosäuremangel (vor allem Leucin und Arginin) mTOR inhibiert. Abbildung und Beschreibung von: Crino, 2016.

1.2.5.1 Tuberöse Sklerose im Mausmodell

Zur Untersuchung der Tuberösen Sklerose wurden bisher diverse Tiermodelle etabliert, welche der menschlichen Symptomatik ähnliche Merkmale zeigen, wie Hirnläsionen, Tumorbildung, veränderte Architektur des Gehirns und Epilepsie bis hin zu Verhaltensauffälligkeiten. Damit lassen sich TSC-assoziierte Untersuchungen auf molekularer und zellulärer Ebene zur Entwicklung therapeutischer Maßnahmen durchführen und die reziproke Beziehung zwischen Tumorgenese und Epilepsie analysieren (Switon et al., 2016).

Zwei Forschergruppen haben bereits 1999 eine Mauslinie generiert, bei der ein Allel des *Tsc2*-Gens konstitutiv ausgeknockt war (Kobayashi et al., 1999; Onda, Lueck, Marks, Warren & Kwiatkowski, 1999). Als Folge dessen beobachteten die Autoren eine Tumorbildung in Nieren, Leber, Lungen und Extremitäten von adulten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen (Kobayashi et al., 1999; Onda et al., 1999). Zudem wurden auf Verhaltensebene *Hippocampus*-basierte kognitive Beeinträchtigungen und Veränderungen im Sozialverhalten beschrieben. Ähnliche Auffälligkeiten wurden auch im Tiermodell mit konstitutivem *knock-out* des *Tsc1*-Gens beobachtet (Ehninger et al., 2008, 2012; Goorden, Van Woerden, Van Der Weerd, Cheadle & Elgersma, 2007).

Wenn auch nicht alle bei TSC-Patienten auftretenden klinischen Merkmale in einem einzigen Tiermodell reproduziert wurden, werden die bisher etablierten Tiermodelle zur TSC-Forschung als geeignet betrachtet (Switon et al., 2016).

1.2.5.2 Tuberöse Sklerose und Stress

Wie oben beschrieben, besteht eine übereinstimmende Erkenntnis, dass ein Mangel des TSC-Proteinkomplexes zu einer Hyperaktivierung von mTOR führt. Im präfrontalen *Cortex* von verstorbenen Patienten mit Depression wurde eine Reduktion von mTORC1 und vor- bzw. nachgeschalteten Proteinen festgestellt (Bockaert & Marin, 2015; Jernigan et al., 2011; Karege et al., 2007). Zudem war die postmortal gemessene Proteinkonzentration von REDD1, welches den TSC-Komplex stabilisiert, im Präfrontalcortex von depressiven Menschen und von chronisch gestressten Ratten erhöht (Ota et al., 2014). Bei Untersuchungen von Depression wurde in Tierstudien eine verminderte mTOR-Aktivität im präfrontalen *Cortex*, in der *Amygdala* und im *Hippocampus* von chronisch gestressten Ratten und Mäusen bestätigt (Chandran et al., 2013; Tang et al., 2015; Zhong et al., 2014). Des Weiteren zeigten Howell et al. (2011) am Tiermodell und an murinen und humanen Neuronen, dass eine 7-wöchige Cortisolmedikation (bei Nagetieren Corticosteron, CORT) den mTOR-Signalweg inhibiert (Howell et al., 2011). Polman et al. (2012) zeigten ferner, dass Glucocorticoide auf beteiligte Komponenten (FKBP51, DDIT4 und DDIT3) des mTOR-

Signalwegs einwirken und dass die basalen mTOR-Proteinkonzentrationen im *Hippocampus* von chronisch gestressten Ratten höher als bei Kontrolltieren waren (Polman et al., 2012). Nach einer zusätzlichen Administration von Glucocorticoiden jedoch sank die mTOR-Konzentration nur bei den Stress-erfahrenen Tieren (Polman et al., 2012).

Mit Ausnahme der zuletzt erwähnten Studie von Polman et al. (2012), die eine erhöhte basale mTOR-Proteinkonzentrationen bei Ratten vorgefunden hat, weisen erste Studien mehrheitlich auf eine geminderte mTOR-Aktivität als Folge von chronischem Stress hin. Eine der wesentlichen Funktionen von mTOR ist das Aufrechterhalten der zellulären Homöostase. Insofern ist es naheliegend, dass mTOR an der Stressreaktion unmittelbar beteiligt ist und eine veränderte mTOR-assoziierte Regulation bei einer Überbelastung durch Stress eintritt, welche sich auch auf neuronaler Ebene ausprägt. Bisher wurden bei der Erforschung von Stress im Zusammenhang mit der Entstehung von Krankheiten die Bestandteile der Hormonachsen aufgearbeitet. *TSC1* und *TSC2* wurden zumeist in der Rolle als Gegenregulator von mTOR im Zusammenhang mit Krankheiten wie Tuberöse Sklerose untersucht. Daher liegen derzeit kaum Ergebnisse vor, wie sich chronischer Stress oder ein erlebtes Trauma bei einer angeborenen Fehlregulation von mTOR auf den Organismus auswirkt.

1.2.6 Ziel der Arbeit

Während an Depression leidende Menschen eine verminderte Aktivität des mTOR-Signalwegs zeigen, führt der Verlust der Gene *TSC1* oder *TSC2* zur Hyperaktivierung von mTOR. Jedoch sind beide Faktoren, ELS und TSC, mit einer kognitiven Beeinträchtigung assoziiert. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von frühkindlichem Stress (ELS) auf Tuberöse Sklerose (TSC) untersucht. Dazu wurde zuerst ein mehrfach erprobtes ELS-Paradigma an einem neuen Standort etabliert. Zur Bestätigung der erfolgreichen Etablierung wurden einige Parameter untersucht, die bereits in der Literatur für das ELS-Paradigma beschrieben wurden. Dazu wurde evaluiert, wie häufig ELS-Mütter ihren Nachwuchs verließen, als Indikator für eine induzierte Störung der Mutter-Kind-Interaktion. Anschließend wurde das Gewicht und die CORT-Konzentration im Blut von ELS-erfahrenen und ELS-unerfahrenen Nachkommen quantifiziert. Außerdem wurde in Verhaltenstests, die *Hippocampus*-basiertes Lernen, Konsolidieren und Erinnern erfordern, eine kognitive Beeinträchtigung durch ELS untersucht. Im nächsten Schritt wurde das ELS-Paradigma mit einer validierten TSC-Mauslinie mit einem funktionsunfähigen *Tsc2*-Allel durchgeführt. Es wurden adulte heterozygote (*Tsc2*^{+/-}) und wildtypische (*Tsc2*^{+/+}) Männchen mit bzw. ohne ELS-Erfahrung hinsichtlich ihres Angst- und Sozialverhaltens und ihrer kognitiven Leistung getestet.

Um eine phänotypische Veränderung durch die *Tsc2*-Mutation oder ELS-Erfahrung oder beide Faktoren festzustellen, wurden die Tiere der vier Gruppen (ELS / kein ELS und *Tsc2*^{+/-} / *Tsc2*^{+/+}) im Alter von 2, 4 und 6 Monaten wiederholt getestet (Re-Test). Das Anliegen dieser Arbeit war, auf Verhaltensebene zu untersuchen, ob frühkindlicher Stress einen additiven oder gar protektiven Effekt auf Mäuse mit genetischer TSC-Disposition hat.

2. Material und Methoden

2.1 Projekt 1: DNA-Methylierungsanalyse von hSSCs

2.1.1 Patienten, Hodenbiopsien und Stellungnahme der Ethikkommission

Die untersuchten SPG-Proben stammten von fünf normogonadotropen Erwachsenen im Alter von 26 bis 44 Jahren, die im Institut für Andrologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Deutschland) bzw. am „Fertility Center Hamburg“ (Deutschland) behandelt wurden. Die Hodenbiopsien wurden während einer therapeutischen testikulären Spermatozoenextraktion (TESE) oder zur Diagnosesicherung durchgeführt. Vier der Patienten wiesen eine vollständige Spermatogenese auf. Der fünfte Patient wurde mit meiotischem Spermatogenese-Arrest diagnostiziert, sodass bei ihm eine SPG-Bildung gegeben war.

Eine schriftliche Zustimmung der Patienten und die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission wurden eingeholt (WF-007/11 und WF-005/13) und die Studie gemäß den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

2.1.2 Extraktion von Spermatogonien aus Hodenbiopsien

Die Extraktion der SPG wurde von der Projektkooperationspartnerin Kathrein von Kopylow am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Deutschland) vorgenommen. Pro Patient wurden aus zwei Hodenbiopsien von ca. 30 mg Zellsuspensionen hergestellt und zur magnetischen Markierung mit Dynabeads® (Dynabeads® Ziege Anti-Maus IgG #110.33, Thermo Fisher Scientific, Oslo, Norwegen) von FGFR3⁺-SPG (Bead⁺-Fraktion) eingesetzt (von Kopylow et al., 2016).

Nach der magnetischen Separation der Zellen wurden aus der Suspension mittels der Kapillare eines Mikromanipulators (VACU Tip FCH #5175240.006, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) einzelne FGFR3⁺- sowie Bead⁻ (FGFR3⁻)-SPG unter dem Lichtmikroskop isoliert, wobei die Selektion der FGFR3⁻-SPG nach morphologischen Kriterien erfolgte. Von Patient 1 wurden Einzelzellen und von den Patienten 2, 3, 4 und 5 wurden zehn Zellen (gepoolt) sofort bei -20°C eingefroren, an das Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Deutschland) geliefert und dort bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

2.1.3 DNA aus Spermien und aus Lymphozyten

In dieser Arbeit wurde die DNA von FGFR3⁺-und FGFR3⁻-SPG mit der von reifen Spermien und von Lymphozyten aus peripherem Blut verglichen. Zwei verschiedene Proben isolierter Spermien-DNA wurden von Prof. Dr. Thomas Haaf (Institut für Humangenetik, Julius Maximilians Universität Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Lymphozyten-DNA von zwei Erwachsenen, die als somatische Kontroll-DNA diente, wurde in bereits isolierter Form durch das Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin der JGU Mainz, Deutschland) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Auswahl der Kandidaten-Gene

Um den Methylierungsstatus regulatorischer Regionen von SPG zu bestimmen, wurden Gene ausgewählt, die in thematisch verwandten humanen und murinen Studien im Zusammenhang mit artifiziellen Reproduktionstechniken (ART) beschrieben wurden (El Hajj, Zechner, et al., 2011; Nickkholgh et al., 2014; Pliushch et al., 2010; Schneider et al., 2010; Zechner et al., 2010). Da während der Gametogenese das elterliche Methylierungsmuster in primordialen Keimzellen zunächst aufgehoben und anschließend mit geschlechtsspezifischer Prägung wiederhergestellt wird (siehe Abschnitte 1.1.4 und 1.1.5), ist die Analyse elterlich geprägter Gene von wesentlichem Interesse. Für diese Studie sollte unter anderem abgeleitet werden, ob die elterliche Prägung in SPG, die als Vorläuferzellen von ausdifferenzierten Spermien gelten, bereits etabliert wurde. Dazu wurden die regulatorischen Regionen der paternal geprägten Gene *H19* (DMR) und *MEG3* (Promotor) und der maternal geprägten Gene *KCNQ1OT1* (DMR), *PEG3* (Promotor) und *SNPRN* (Promotor) untersucht. Die genomischen Regionen wurden dem Protokoll von El Hajj et al. (2015) entnommen (El Hajj, Kultz & Haaf, 2015).

Um den Stammzellcharakter der SPG zu untersuchen, wurden die regulatorischen Regionen der Pluripotenzgene *NANOG* und *POU5F1* analysiert, deren genomische Koordinaten ebenfalls aus dem Protokoll von El Hajj et al. (2015) stammten (El Hajj et al., 2015).

Ferner wurden die spermatogonialen Markergene *FGFR3*, *GFRA1*, *L1TD1* und *PLZF* untersucht. Zum Zeitpunkt der Auswahl dieser Gene waren noch keine Methylierungsergebnisse von hSSCs bzw. SPG publiziert, aber es lagen Ergebnisse aus Transkriptions- und Proteinanalysen vor (von Kopylow, Staeger, Schulze, et al., 2012). Die regulatorischen Regionen der SPG-Markergene wurden daher Studien entnommen, die Methylierungsergebnisse in anderen humanen Zelltypen beschrieben hatten (siehe Tabelle 2.1.1, Spalte: „Referenzen“). Die Kandidaten-Regionen wurden anschließend mit den Informationen der molekulargenetischen

Online-Datenbanken „Ensembl“ (Hubbard, 2002) und „Methbase“ (Song et al., 2013) abgeglichen und verifiziert.

2.1.5 Primer-Design

Zur Amplifikation der Zielregionen der elterlich geprägten Gene (mit Ausnahme der *H19*-DMR) und der Pluripotenzgene wurden die Primersequenzen von El Hajj et al. (2015) adaptiert (El Hajj et al., 2015). Für die Zielregionen der paternal geprägten *H19*-DMR und der SPG-Markergene *FGFR3*, *GFRA1*, *L1TD1* und *PLZF* wurden die Primer mit der „Pyromark Assay Design Software“ (Version 2.0.1.15) designt. Da DNA durch eine Bisulfit-Konversion stark fragmentiert wird, wurden die Primer so gewählt, dass PCR-Produkte mit einer max. Fragmentlänge von 400 bp entstanden.

Pro Gen-Assay waren aufgrund des geringen DNA-Gehalts der 10-Zell- und Einzelzell-Proben und der angewandten *Limiting Dilution* (LD)-Methode (s. Abschnitt 2.1.7) zwei aufeinanderfolgende Amplifikationsrunden erforderlich. In der ersten Amplifikationsrunde (PCR1) wurde eine *Multiplex*-PCR durchgeführt, bei welcher ein Primer-Mix die Primerpaare aller elf untersuchten Zielregionen enthielt.

In der zweiten Amplifikationsrunde (PCR2) wurde eine sog. *nested*- bzw. *semi-nested* PCR durchgeführt, bei der (1) das PCR-Produkt aus PCR1 als Matrize eingesetzt wurde, (2) lediglich ein Primerpaar pro Gen im PCR-Mix enthalten war (*Singleplex*-PCR), (3) beide Primer innerhalb des generierten PCR1-Produkts hybridisierten (*nested* PCR) bzw. einer der beiden Primer identisch mit dem aus PCR1 war (*semi-nested* PCR) und (4) ein Primer eines Primerpaares zum Zwecke der späteren Pyrosequenzierung (s. Abschnitt 2.1.8) biotinyliert war (Abbildung 2.1.1). Diese Strategie erhöht die Spezifität und Quantität hinsichtlich der gewünschten Zielregionen.

Sämtliche PCR-Primerpaare wurden abschließend *in silico* mit dem Online-Tool der Homepage „Bisearch“ (Tusnady, Simon, Varadi & Aranyi, 2005) bezüglich ihrer Bindungsspezifität geprüft.

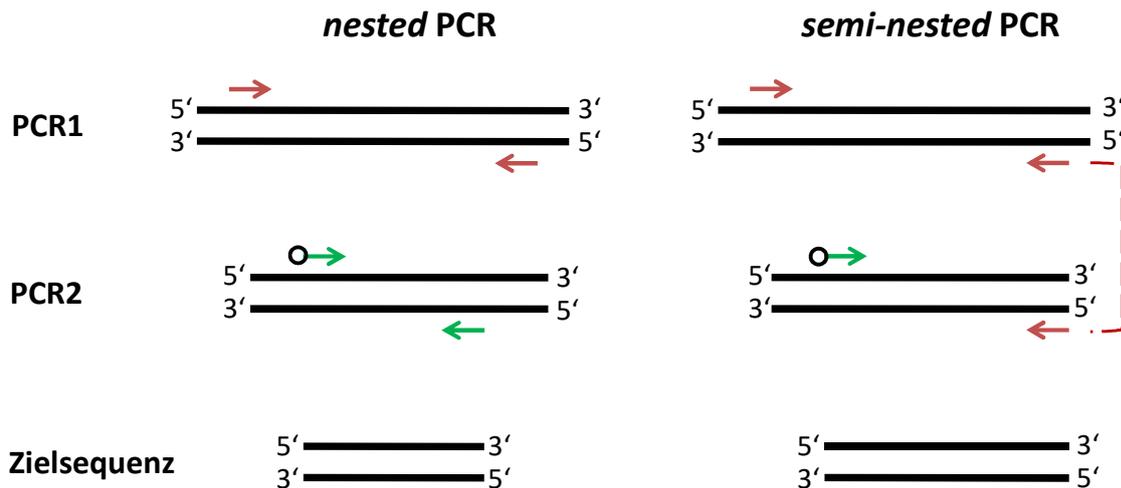


Abbildung 2.1.1: Schematische Darstellung der *nested* und *semi-nested* PCR

Die PCR2-Primer (grüne Pfeile) binden an das synthetisierte Produkt aus PCR1. Bei der *semi-nested* PCR wird ein PCR1-Primer (rote Pfeile) auch in PCR2 verwendet, worauf die rote gestrichelte Linie hinweist. Für die anschließende Pyrosequenzierung ist einer der beiden PCR2-Primer biotinyliert (schwarzer Kreis am Pfeil).

2.1.6 Bisulfit-Konvertierung

Durch die Behandlung mit Bisulfit werden unmethylierte Cytosin-Nukleotide deaminiert, wodurch sie zu Uracil-Basen konvertieren. Zuerst wird ein Hydrogensulfit-Ion (HSO_3^-) an die 5,6-Doppelbindung von Cytosin addiert, wodurch ein sulfoniertes Cytosin (C-SO_3) entsteht. Anschließend wird die Aminogruppe hydrolysiert und ein sulfoniertes Uracil (U-SO_3) gebildet. Schließlich wird im basischen Milieu die Sulfongruppe wieder abgespalten, die 5,6-Doppelbindung wieder hergestellt und das Endprodukt Uracil liegt vor (Hayatsu, 2008) (s. Abbildung 2.1.2). Die Bisulfit-behandelte DNA ist nach der Konvertierung einzelsträngig. In einer nachgeschalteten PCR-Reaktion, welche doppelsträngige Ziel-Fragmente erzeugt, werden Uracil-Basen durch Thymin-Nukleotide substituiert (Walter, 2015b). In der finalen Sequenzanalyse liefert das Verhältnis von Cytosin- zu Thymin-Basen Rückschlüsse über den Methylierungsgrad der untersuchten DNA auf Einzelnukleotidebene.

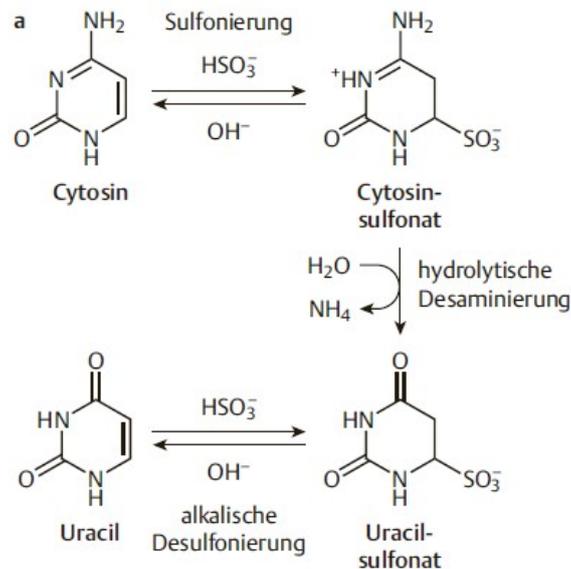


Abbildung 2.1.2: Molekulare Schritte der Bisulfit-Konvertierung

Während der Bisulfit-Konvertierung werden Cytosin-Basen schrittweise zu Uracil umgewandelt. Weitere Erklärung siehe im Text Punkt 2.1.6. (Abbildung aus Walter, 2015a)

Die SPG-Proben (10 Zellen pro Reaktionsgefäß bzw. eine Einzelzelle pro Reaktionsgefäß) wurden entsprechend des Protokolls von El Hajj et al. (2015) prozessiert (El Hajj et al., 2015). Zu den Reaktionsgefäßen wurden zuerst 10 μl Wasser in PCR-Qualität (PCR-Wasser; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) hinzugefügt. Für den Probenverdau und die Bisulfit-Konvertierung wurde das „EZ DNA Methylation Direct™“-Kit (Zymo Research, Irvine CA, USA) verwendet. Nach der Aufreinigung wurden die SPG-Proben in 2 mal 5,5 μl auf 50°C erwärmten Elutionspuffer des Kits eluiert. Von den verwendeten Positivkontrollen (Spermien- und Lymphozyten-DNA) wurden den Herstellerempfehlungen entsprechend 500 ng DNA zur Konvertierung eingesetzt und in 2 mal 16,5 μl Elutionspuffer des Kits gelöst.

2.1.7 Limiting Dilution und DNA-Amplifikation

Bei der *Limiting Dilution* (LD)-Methode, auch bekannt als „*digital PCR*“, „*single molecule PCR*“ oder „*limiting dilution PCR*“ (Morley, 2014), wird eine Probe zu einem bestimmten Grad verdünnt und auf eine gewisse Anzahl PCR-Reaktionen aufgeteilt (partitioniert), sodass sowohl quantitative als auch qualitative Analysen einzelner DNA-Moleküle möglich sind (Abbildung 2.1.3). Gemäß dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ erhält man ein digitales Signal („Ja/Nein-Antwort“) über die Eigenschaft eines Moleküls (Saiki et al., 1988) oder die Gesamtanzahl der Moleküle in der Probe (Sieburg, Cho & Müller-Sieburg, 2002). Die LD-Methode ist daher auch für Proben aus einer begrenzten Anzahl an Zellen, wie sie in dieser

Studie vorlagen, geeignet. Zudem lassen sich Kontaminationen durch Fremd-DNA feststellen und die präferentielle Amplifikation eines Allels vermeiden, welche die Methylierungsergebnisse verfälschen würde (El Hajj, Trapphoff, et al., 2011).

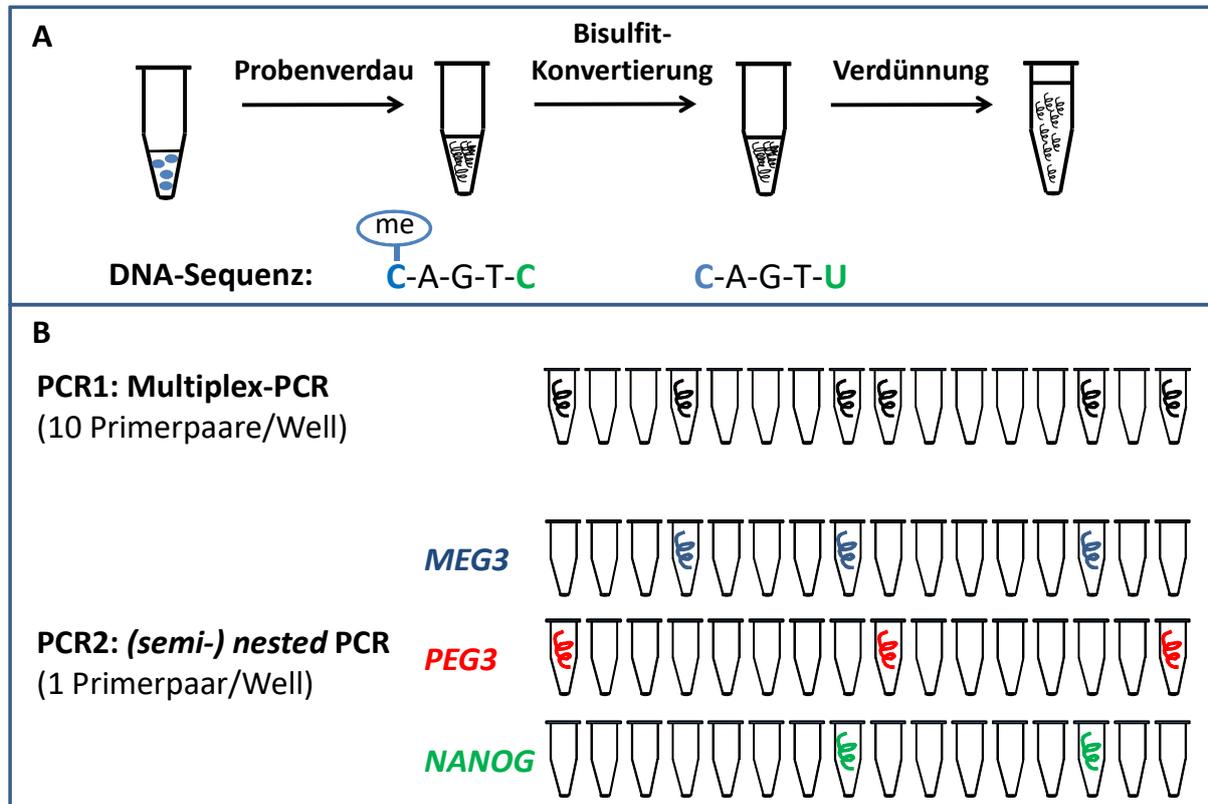


Abbildung 2.1.3: Limiting Dilution Bisulfit-Pyrosequenzierung

Schematischer Arbeitsablauf von Probenverdau, Bisulfit-Konvertierung, *Limiting Dilution*-Methode, Amplifikation. **A) Probenprozessierung:** Nach dem Probenverdau von 10 Einzelzellen (blaue Kreise) pro Reaktionsgefäß waren die DNA-Moleküle (Spiralen) zugänglich für die Bisulfit-Behandlung, bei der unmethylierte Cytosin-Basen (C) zu Uracil (U) deaminiert werden, während methylierte (me) Cytosine nicht konvertiert werden. Nach der Bisulfitkonvertierung wurden die DNA-Moleküle verdünnt und auf mehrere PCR-Reaktionen aufgeteilt. **B) Amplifikation:** In der ersten Amplifikationsrunde (PCR1) wurden die Primerpaare der elf untersuchten Genassays eingesetzt (*Multiplexing*). Für die zweite Runde (PCR2) wurde das Amplikon aus PCR1 mit jedem Primerpaar einzeln (Genassay: *MEG3*, *PEG3* und *NANOG*) vervielfältigt (*Singleplex-PCR*). Weitere Erklärung siehe im Text, Abschnitte 2.1.6 und 2.1.7.

Die LD-Methode wurde für die 10-Zell-Proben angewandt mit dem Ziel, die einzelnen DNA-Moleküle (Allele) der gepoolten zehn Zellen zu separieren, sodass lediglich ein Allel als Ausgangsmaterial für nachgeschaltete PCR-Reaktionen pro Reaktionsgefäß vorlag. Das Verhältnis der DNA-Verdünnung zur Anzahl der PCR-Reaktionen wurde theoretisch und empirisch ermittelt (s. u.). Wie im vorigen Punkt beschrieben, waren aufgrund des geringen DNA-Gehalts der analysierten Proben und der verwendeten LD-Methode sowohl eine *Multiplex*-(PCR1) als auch eine *(semi-) nested*-PCR (PCR2) erforderlich.

Für beide Amplifikationsrunden wurde das „FastStart“ PCR-System (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet.

Für die PCR1 wurde ein 50 µl Reaktionsansatz hergestellt (Tabelle 2.1.2), um ausreichend Volumen für die nachfolgenden *singleplex*-PCRs (PCR2) zu generieren. Die Bisulfit-konvertierte DNA der 10-Zell-Proben wurde mit PCR-Wasser (Sigma Aldrich, München, Deutschland) auf ein Endvolumen von 200 µl verdünnt und in Aliquots von jeweils 10 µl auf 20 PCR-Reaktionsgefäße verteilt, um statistisch gesehen lediglich ein DNA-Molekül als Ausgangsmaterial pro Reaktion zu erzielen (Abbildung 2.1.3). Die Verteilung der einzelnen DNA-Moleküle erfolgt theoretisch einer Poisson-Verteilung mit λ (20 Allele aus 10 Zellen verteilt über 20 Reaktionsgefäße), resultierend in:

- 36,8 % der Reaktionen mit 0 Allelen,
- 36,8 % der Reaktionen mit 1 Allel,
- 18,4 % der mit 2 Allelen,
- 6,1 % der Reaktionen mit 3 Allelen oder
- 1,5 % der Reaktionen mit 4 Allelen.

Da jedoch die DNA laut Hersteller des verwendeten Bisulfit-Konvertierungskits (Zymo Research, Irvine CA, USA) stark degradiert wird und durch den Aufreinigungsschritt über Silika-Membran-Säulchen etwa 20 % der DNA verloren geht, war von einer reduzierten Allel-Anzahl (< 20) als Ausgangsmaterial für die PCR-Reaktionen auszugehen.

Die Bisulfit-konvertierte DNA der Einzelzell-Proben wurde unverdünnt in die PCR1 eingesetzt (10 µl Endvolumen nach Elution). Die Kontroll-Proben (Spermien- und Lymphozyten-DNA) wurden 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und davon 1 µl in die PCR2 eingesetzt.

Als Qualitätskontrolle wurden gemäß der Empfehlung des LD BSP®-Protokolls (El Hajj et al., 2015) pro 10-Zell-Probe 4 - 6 Leerkontrollen (ohne DNA) mitgeführt. Die Annealing-Temperatur der elf gepoolten Primer-Paare für PCR1 wurde zuerst durch eine Gradienten-PCR empirisch ermittelt. Die etablierten PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 2.1.1 und 2.1.2 aufgeführt.

Von den in PCR1 generierten PCR-Produkten wurde 1 µl in die PCR2 eingesetzt. Dazu wurden PCR-Reaktionen mit 25 µl Endvolumen angefertigt (Tabelle 2.1.2). Wie bereits in Punkt 2.1.5 beschrieben, war ein Primer eines PCR2-Primerpaares biotinyliert. Durch eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese wurde visualisiert, ob in einem PCR-Reaktionsansatz ein DNA-Molekül als Ausgangsmaterial vorgelegen hat oder nicht („Ja/Nein-Antwort“) bzw. ob die Amplifikation erfolgreich war (Überprüfung durch Banden bei Positivkontrollen) (Abbildung 2.1.4).

Für die positiven Reaktionsansätze (Bande im Gel sichtbar) wurde die PCR2 wiederholt, dann jedoch in einem PCR-Reaktionsansatz mit 50 µl Endvolumen (Tabelle 2.1.2), um die Ausbeute zu erhöhen und die Qualität für die anschließende Pyrosequenzierung zu gewährleisten. Die PCR2 wurde ferner wiederholt, wenn eine durch Banden im Gelbild festgestellte Kontamination der Leerkontrollen vorlag.

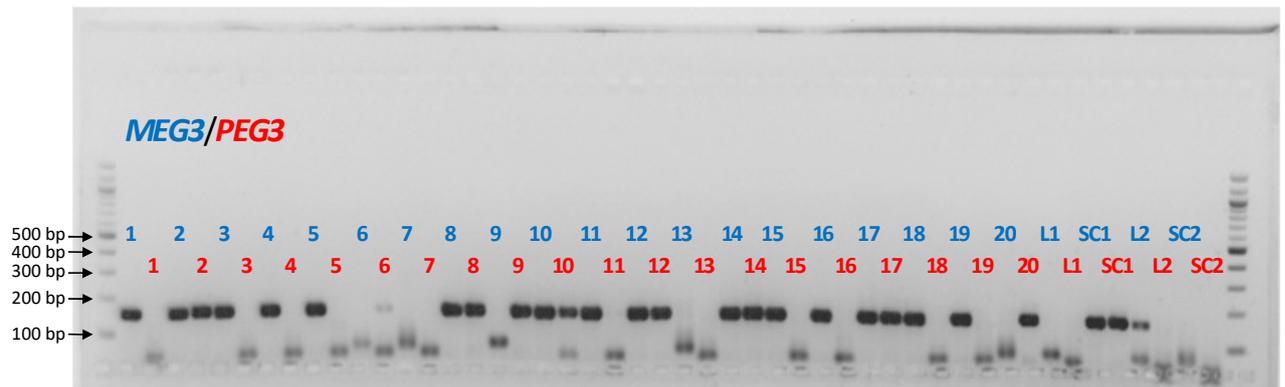


Abbildung 2.1.4: PCR-Kontrolle mittels Gelelektrophorese, Beispiel-Gelbild

Die PCR-Produkte aus PCR2 wurden für die Gen-Assays *MEG3* (blau) und *PEG3* (rot) in die Taschen eines Agarosegels aufgetragen. Die äußeren Taschen enthalten einen 100-Basenpaar (bp)-Längenstandard. Die Taschen 1-20 stammten aus der 10-Zell-Probe, die auf 20 PCR-Reaktionen verteilt wurde. „SC1“ und „SC2“ entsprechen zwei Einzelzell-Proben, „L1“ und „L2“ zwei Leerkontrollen. Banden in Höhe von ca. 150 bp repräsentieren ein PCR-Produkt, welches von einem DNA-Molekül ausgehend synthetisiert wurde. Banden kleiner als 100 bp repräsentieren Primer-Dimere. Siehe auch Text, Abschnitt 2.1.7.

2.1.8 Pyrosequenzierung

Die Technologie der Pyrosequenzierung wurde 1996 durch Ronaghi et al. (1996) entwickelt und ermöglicht die DNA-Sequenzierung zur Ermittlung von Einzelnukleotidvarianten und Methylierungsprofilen in Echtzeit (Ronaghi, Karamohamed, Pettersson, Uhlén & Nyrén, 1996). Wie bei der Sanger-Sequenzierung oder der *Next-Generation-Sequencing*-Technologie erfolgt hier ein sog. *Sequencing-by-Synthesis*-Verfahren (Metzker, 2010). Durch Verwendung eines biotinylierten Primers (Tabelle 2.1.1) liegen PCR-Produkte mit terminalen Biotingruppen an einem der beiden Stränge vor. Der biotinylierte Strang dient während der Pyrosequenzierung als Vorlagenstrang zur Neusynthese.

Zuerst wird der biotinylierte Einzelstrang isoliert, dann erfolgt die Anlagerung eines Sequenzierprimers, ab dem eine DNA-Polymerase die Gegenstrangsynthese beginnt. Nun folgen mehrere enzymatische Prozesse: zuerst werden die Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) gemäß einer Referenzsequenz seriell zugeführt.

Bei erfolgreicher Inkorporation eines dNTPs durch die Polymerase wird ein Pyrophosphat frei (Ronaghi, 2001). Das Pyrophosphat wird von einer Sulfurylase unter Anwesenheit ihres Substrats „Adenosin-5'-phosphosulfat“ (APS) zu ATP umgewandelt, welches die Energie für die Transformation von Luciferin zu Oxiluciferin durch Luciferase liefert (Delaney, Garg & Yung, 2015). Dabei wird ein Lichtquant frei, das von einer CCD-Kamera erfasst und als Peaksignal in der Sequenz von einer Analysesoftware als Pyrogramm übersetzt wird, wobei die Anzahl der Lichtquanten adäquat zur Anzahl inkorporierter dNTPs ist (Ronaghi et al., 1996). Weil ATP das Substrat der Luciferase ist, wird für die Strangsynthese stattdessen das Derivat dATP α S (Desoxyadenosin-alpha-thiotriphosphat) eingesetzt (Delaney et al., 2015).

Bei Methylierungsanalysen mittels Pyrosequenzierung wird im Pyrogramm neben der Sequenzabfolge für jede CpG-Dinukleotid-Position das relative Verhältnis von Cytosin- zu Thyminbasen angegeben. Daraus lässt sich der Grad der Methylierung in der ursprünglichen DNA-Sequenz ableiten (Ronaghi, 2001).

Alle im Gelbild „positiven“ PCR2-Produkte (25 μ l- und 50 μ l-Endvolumen, Abbildung 2.1.4) wurden mit dem „Pyromark Q96 ID“-System sequenziert. Dazu wurde ein modifiziertes Protokoll und das Kit „PyroMark Gold® Q96 reagents“ (Qiagen, Hilden, Germany) verwendet.

Zuerst wurden in einer 96-Well-Platte pro Sequenzierreaktion 40 μ l Bindepuffer (Qiagen, Hilden, Germany) und 4 μ l „Sephärose-Beads“ (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) vorlegt. Dann wurde das PCR-Produkt (25 μ l- und 50 μ l Volumen) dazupipettiert und auf einem Vortexer für etwa 5 Min. geschüttelt. In eine sog. „Pyrosequenzierplatte“ (Qiagen, Hilden Germany) wurden 1,6 μ l 10 μ M Sequenzierprimer (Tabelle 2.1.1) und 40 μ l Annealingpuffer (Qiagen, Hilden, Germany) pipettiert.

Aufgrund der hohen Affinität der „Sephärose-Beads“ zur Biotingruppe des PCR-Produkts wurden an einer sog. „Vacuum Prep Workstation“ (Biotage, Uppsala, Schweden) die Proben unter Verwendung einer Vakuumpumpe an den Nadeln des Handteils („Vacuum Prep Tool“; Biotage, Uppsala, Schweden) als Pellet fixiert. Die Proben wurden dann für je 5 Sek. erst in vergälltem 70%-igen Ethanol (Entsalzen der Probenpellets), danach in Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH) (Denaturieren des PCR-Produkts) und zuletzt in Waschpuffer (10 mM Tris-Acetat) (Waschen und Verwerfen des unbiotinylierten Strangs) getaucht. Nach Abstellen des Unterdrucks wurden die Pellets in den Wells der zuvor vorbereiteten Pyrosequenzierplatte gelöst. Anschließend wurden die Pellets für 2 Min. bei 80°C inkubiert, um die Bildung von Sekundärstrukturen des PCR-Einzelstrangs zu minimieren. Während des Abkühlens bei Raumtemperatur erfolgte die Hybridisierung des Sequenzierprimers an den biotinylierten Einzelstrang der Probe. Entsprechend den Volumenvorgaben durch die „Pyromark CpG

Software“ (Version 1.0.11) wurde eine Kartusche (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit dNTPs, Substrat sowie Enzym (enthalten im „PyroMark Gold® Q96 reagents“-Kit) befüllt und zusammen mit der Sequenzierplatte in den Pyrosequenzierer eingesetzt. Dann wurde der Lauf gestartet.

2.1.9 Datenanalyse

Nach der Pyrosequenzierung wurden die Methylierungsergebnisse durch die „Pyromark CpG Software“ (Version 1.0.11) ermittelt. Diese errechnet den Methylierungsgrad für ein sequenziertes PCR-Produkt, das ausgehend von einem DNA-Molekül/Allel vervielfältigt wurde. Es wurde der Wert „15.0“ für den Analyse-Parameter: „Allowed percentage for passed/check quality“ festgelegt. Dies beschreibt einen Schwellenwert für die Sequenzierungsqualität, bei der „passed“ eine erfolgreiche Sequenzierung bedeutet und „check“ eine Prüfung durch den Experimentator erfordert. Nach Evaluierung der Ergebnisse mit „check“-Qualität, wurden diese zusammen mit den „passed“-Werten prozessiert. Zur Definition von unmethylierten bzw. methylierten Allelen wurden die Vorgaben von El Hajj (2015) adaptiert, sodass Allele mit Methylierungswerten (Mittelwert aller CpGs eines sequenzierten PCR-Produkts) $\leq 20\%$ als unmethyliert betrachtet wurden und mit Werten $\geq 80\%$ als methyliert (El Hajj et al., 2015). Die Rohdaten wurden demnach auf Kontaminationshinweise überprüft, die durch Methylierungswerte zwischen 20 % und 80 % für die SPG-Proben bzw. durch falsch-positive Ergebnisse von Leerkontrollen auffielen. In letzterem Fall wurde die PCR2 wiederholt und bei unverändertem Ergebnis wurden sämtliche PCR-Produkte des entsprechenden Assays verworfen. Wenn jedoch nur einzelne Allele (max. 20 % pro Assay) oder einzelne CpGs (max. 20 % eines Allels) eine aberrante Methylierung (zwischen 20 % und 80 %) aufwiesen, wurden nur diese Werte eines Assays verworfen. Falls ein PCR-Produkt mehrfach sequenziert wurde, wurde mit Excel (Microsoft, USA) der Mittelwert auf CpG-Ebene berechnet.

2.1.10 Visualisierung der Daten und statistische Auswertung

Durch Anwendung der LD-Methode für die SPG-Proben (10-Zell- und Einzelzell-Proben) wurde das Methylierungsprofil der CpG-Dinukleotide (CpGs) einzelner sequenzierter Allele erhoben, während für die Kontroll-DNA aus Spermien und Lymphozyten die durchschnittliche Methylierung aller technischen Replikate (TR) zusammengetragen wurde. Zur Darstellung der CpG-Methylierungswerte der Patienten 2 - 5 wurden Streudiagramme mit „GraphPad Prism“ (Version 5.00) erstellt. In den Streudiagrammen wurden einzelne CpGs mit Methylierungswerten zwischen 20 % und 80 % bei den elterlich geprägten Genen und den

Pluripotenzgenen ausgeschlossen. Bei den SPG-Markergenen wurden sie jedoch angezeigt, da in der Literatur zum Zeitpunkt der Etablierung der SPG-Assays keine Methylierungswerte zum direkten Vergleich vorhanden waren und nicht eindeutig als Artefakte eingestuft werden konnten. Des Weiteren wurden Methylierungsdiagramme verwendet, um die Methylierung der SPG-Proben jedes einzelnen Patienten auf Allel-Ebene zu illustrieren. Die Methylierungsdiagramme wurden durch Stefan Diederich, Mitarbeiter des Instituts, mittels eines „R-Scripts“ (Version 3.4.3, www.r-project.org) umgesetzt. CpGs mit einer Methylierung $\leq 20\%$ (Hypomethylierung; me-) wurden durch weiße Kreise (O), Werte $\geq 80\%$ (Hypermethylierung; me+) durch schwarze Kreise (●), Werte zwischen 20 % und 80 % durch Dreiecke (Δ) und nicht erhobene Werte durch „X“ veranschaulicht (R Development Core Team, 2008).

Es wurden statistische Vergleiche auf CpG- und Allel-Ebene durchgeführt. Für den Vergleich auf CpG-Ebene wurden die CpGs der 10-Zell-Proben (FGFR3⁺- und FGFR3⁻-SPG) von den Patienten 2 – 5 summiert und das Verhältnis von methylierten (me+) zu unmethylierten (me-) CpGs zwischen den Gruppen: „FGFR3⁺-SPG“, „FGFR3⁻-SPG“ und „Spermien“ verglichen. Für den Vergleich auf Allel-Ebene wurden die Allele zunächst in unmethylierte und methylierte Allele kategorisiert. Dabei wurden Allele als „methyliert“ (me+) definiert, in welchen 2/3 der CpGs eine Methylierung von $\geq 80\%$ innehatten. Hingegen wurden Allele als „unmethyliert“ (me-) betrachtet, bei denen 2/3 der CpGs Methylierungswerte von $\leq 20\%$ zeigten. Auch hier wurde das Verhältnis von me+ zu me- Allelen zwischen FGFR3⁺-SPG, FGFR3⁻-SPG und Spermien verglichen. Bei den statistischen Analysen wurden CpG-Methylierungswerte, die bei den SPG-Markergenen zwischen 20 % und 80 % lagen, nicht berücksichtigt.

Die statistischen Vergleiche zwischen den SPG- und Spermienproben wurden mit dem „Online-Calculator“ für Kontingenztabellen von „GraphPad“ durchgeführt (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2/> verwendet im August und September 2018). Da kategorische Daten verglichen wurden (Anzahl methylierter CpGs bzw. Allele gegen die Anzahl unmethylierter CpGs bzw. Allele), wurde ein zweiseitiger „Fisher-Test“ (*Fisher's Exact Test*) verwendet. Da die drei Probengruppen: „FGFR3⁺“, „FGFR3⁻“ und „Spermien“ untereinander verglichen wurden, wurde eine *post-hoc* Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Dabei wurde das in der Wissenschaft übliche α -Signifikanzniveau von 0,05 durch die Anzahl der Vergleiche (in dieser Studie 3 Vergleiche zwischen 4 Gruppen) dividiert, sodass sich folgende Signifikanzniveaus ergaben:

* entspricht $p \leq 0,017$;

** : $p \leq 0,003$;

*** : $p \leq 0,0003$;

nicht signifikant, n.s.: $p > 0,017$.

Tabelle 2.1.1: Verwendete Gen-Assays

Primersequenzen inklusive Angabe der Biotinylierung (-bio), Annealing-Temperaturen in Grad Celsius (°C), genomische Bindestellen je Primer, Fragmentlänge der PCR-Produkte in Basenpaaren (bp), Anzahl der untersuchten CpGs innerhalb der sequenzierten Region und Referenz, aus der die Primersequenzen bzw. die regulatorische Regionen entnommen wurden. Die genomischen Positionen wurden mit „Bisearch“ ermittelt, Abfragen basierten auf „Genome Build GRch 38.92“ für *Homo sapiens*.

Gen	Bezeichnung, -bio(tinyliert)	Primersequenz	Annealing Temp. (°C)	Chromosom	Binde position	PCR-Produktlänge (bp)	Anzahl CpGs	Referenz zur analysierten genom. Region
FGFR3	PCR1 for.	TTAGGAGTTTAGAGGGGAGGTTT	58	4	1792606	369	6	Ezura et al., 2009
	PCR1 rev.	CTATACTCCCCAAACCAAAAATATC			1792975			
	PCR2 for.	TTTTAGGTGGAGGAGGGTAGGA	58,3	1792670	209			
	PCR2 rev. -bio Seq.	CCCCAAACCTATATCCTCCTT GGAAGGTATTTTAGGTTGAGTTT		1792879 1792860				
L1TD1	PCR1 for.	GTAATTTAAGGATTTAGGAATGGATTAAT	58	1	62194520	454	5	Chen et al., 2016
	PCR1 rev.	AAACCAACCTTACCCAAAACAC	57		62194974	152		
	PCR2 for.	GGGTAGTAATGGAAGTTAGTAATTG		62194716				
	PCR2 rev. -bio Seq.	AAACCTTATAACTAAAACTAAAAAATT GGAAGTTAGTAATTGTTTAGG	62194868 62194726					
GFRA1	PCR1 for.	AGGGTTTTTTTTTTTTAGGGTAAT	58	10	116273736	327	6	Sato et al., 2013
	PCR1 rev.	ACCAAAATAAAAATCAACTTATAAATTTTC			116274063			
	PCR2 for.	AGATTTGGTGTTTTTAAGATATATTTAGA	58,3	116273821	242			
	PCR2 rev. Seq.	ACCAAAATAAAAATCAACTTATAAATTTTC TTGGAGAGGAGATTTTGGGA		116274063 116273812				
PLZF	PCR1 for.	GGGTAGGATGAGGGTAGAG	58	11	114058823	457	5	Hui et al., 2014
	PCR1 rev.	CCCACCTACTCCCAAAATTTTAATTTACA			114059280			
	PCR2 for.	GGTTGTTAAGGTTTGGGAGAGA	58,3	114058848	220			
	PCR2 rev. -bio Seq.	ACCCTCTCATCCTCCTAATT GGATTTTTTGGTATTTGGTTTATTA		114059068 114058957				

Fortsetzung Tabelle 2.1.1

Gen	Bezeichnung, -bio(tinyliert)	Primersequenz	Annealing Temp. (°C)	Chromosom	Binde position	PCR-Produktlänge (bp)	Anzahl CpGs	Referenz zur analysierten genom. Region
MEG3	PCR1 for.	GAATTATAGGGAATGATGGTGTGA	58	14	100809297	188	5	El Hajj et al., 2015
	PCR1 rev.	CCAAAATACTAATACTCCTTAAACA			100809485			
	PCR2 for.	AGGGTTAGGAAGTTTAGTAGGTTA	58,3		100809308	150		
	PCR2 rev.	ACTACTCCTTAAACAAAAAACACATAAT			100809458			
	Seq.	GTAGTAAATTAAGTGTATTAGAGA			100809416			
H19 DMR	PCR1 for.	TGATTTATTTTAGGGTGTATTGTTGAAG	58	11	1999945	283	3	Nickkholgh et al., 2014
	PCR1 rev.	AACTATAATATATAAACCTACACTACC	58,3		2000228			
	PCR2 for.	GATATTAGGGGAATAATGAGGTGTTTT			2000042	140		
	PCR2 rev. -bio	AAACCTCCAAAATACCCATATAC			2000182			
	Seq.	ATGGATGATGGGGAT			2000153			
KCNQ1OT1	PCR1 for.	GGGAGAATAGTGTTGAGGAGTTT	58	11	2699856	225	6	El Hajj et al., 2015
	PCR1 rev.	CCCTACTACCCCCAATCAACAAATAA	57		2700081			
	PCR2 for.	GGGGAGGATTAAGTTGAGAGGTA			2699880	201		
	PCR2 rev. -bio	CCCTACTACCCCCAATCAACAAATAA			2700081			
	Seq.	GGAGTTTTTTGGAGG			2699946			
PEG3	PCR1 for.	GGTTGTTGATTGGTTAGTATAG	58	19	56840574	229	11	El Hajj et al., 2015
	PCR1 rev.	CACTCACCTCACCTCAATAC	58,3		56840803			
	PCR2 for.	GGTGTAGAAGTTGGGTAGTTG			56840576	153		
	PCR2 rev. -bio	CTCACCTCACCTCAATACTAC			56840729			
	Seq.	TGTTTTATTTGGGTTGGT			56840677			

Fortsetzung Tabelle 2.1.1

Gen	Bezeichnung, -bio(tinyliert)	Primersequenz	Annealing Temp. (°C)	Chromosom	Binde position	PCR-Produktlänge (bp)	Anzahl CpGs	Referenz zur analysierten genom. Region	
SNRPN	PCR1 for.	GGGTTTTAGGGGTTTAGTAGT	58	15	24954815	337		El Hajj et al., 2015	
	PCR1 rev.	ACTCCAAATCCTAAAACTTAAAATATC			24955152				
	PCR2 for. -bio	AGGGAGTTGGGATTTTTGTATT	58,3		24954865	237			
	PCR2 rev.	CCCAAATCTCTCTTAAAAAAAC			24955102				
	Seq. 1	ACACAACCTAACCTTACCC			24955073				3
	Seq. 2	CCAACCTACCTCTAC			24954949				3
NANOG	PCR1 for.	TAGAGTAATTTAGATTAGGTGGGGAAT	58	12	7789011	262		El Hajj et al., 2015	
	PCR1 rev.	TAACCAAATAATTTCAAATCCTAACTT			7789273				
	PCR2 for.	GGAATATGGTTTAATAGGAATGGGATAA	58,3		7789013	152			
	PCR2 rev. -bio	ACCAAATAATTTCAAATCCTAACTTCA			7789165				
	Seq.	ATTTTTGTAATTTAGTAAATTGGG			7789089				2
POU5F1	PCR1 for.	AGAAGGATTGTTTTGGTTTAGTAGA	58	6	31170674	330		El Hajj et al., 2015	
	PCR1 rev.	AACTACTCAACCCCTCTCT			31171004				
	PCR2 for.	AAGTTTTTGTGGGGGATTTGTAT	58,3		31170705	185			
	PCR2 rev. -bio	CCACCCACTAACCTTAACCTCTA			31170890				
	Seq.	TGAGGTTTTGGAGGG			31170866				2

Tabelle 2.1.2: Multiplex- und Singleplex-PCR-Protokoll

A: Verwendete Chemikalien inklusive Konzentrationen der Stocklösung und in der PCR-Reaktion und Herstellerfirmen. Je nach Endvolumen der PCR-Reaktion variieren die Volumina. **B:** Thermocycler-Bedingungen.

Abschnitt A

Reagenzien	Konzentration der Stocklösung	PCR1	PCR2 (25 µl)	PCR2 (50 µl)	Konzentration der PCR-Reaktion	Hersteller
		Volumen pro Reaktion [µl]	Volumen pro Reaktion [µl]	Volumen pro Reaktion [µl]		
PCR Buffer FastStart, MgCl ₂ 20 mM	10 X	5,00	2,50	5,00	1 X	Roche, Mannheim, Deutschland
dNTPs FastStart	je 10 mM	1,00	0,50	1,00	200 µM	Roche, Mannheim, Deutschland
Primer-Mix	je Primer 10 µM	4,00	1,00	2,00	0,4 µM	Sigma Aldrich, München, Deutschland
FastStartTaq (Polymerase)	5 U/µl	0,40	0,20	0,40	1 U	Roche, Mannheim, Deutschland
H ₂ O (höchstrein)		29,60	19,80	40,60		B. Braun Melsungen AG, Deutschland
DNA (PCR1) bzw. PCR-Produkt (PCR2)		10,00	1,00	1,00		
Endvolumen		50,00	25,00	50,00		

Abschnitt B

Temp (°C)	Dauer	Schritt
95	5 Min	Initiale Denaturierung zur Aktivierung der thermostabilen Taq-Polymerase
95	30 Sek	Doppelstrang Denaturierung der DNA bzw. des PCR-Produkts
*	30 Sek	Primer-Annealing-Temperatur (s. Tabelle 2.1.1, pro Gen, Spalte „ AnnealingTemp. (°C) “.
72	30 Sek	Elongation
PCR-Zyklen 45 total		
72	7 Min	Finale Elongation
4	Hold	Verwahren der PCR-Reaktion

2.2 Projekt 2: Der Einfluss von ELS auf TSC

2.2.1 Haltungsbedingungen der Mäuse

Alle experimentellen Verfahren wurden nach den Richtlinien des institutionellen Tierschutzes durchgeführt und von der Ethikkommission der rheinland-pfälzischen Landesregierung (Deutschland) genehmigt. Die Mäuse wurden in einem Tierstall gehalten bei einem 12-Stunden Hell-Dunkel-Zyklus beginnend um 7:30 Uhr. Die Tiere wurden *ad libitum* mit Futter und Wasser versorgt und der Käfigwechsel fand ein Mal pro Woche statt. Die Elterntiere wurden vor der Verpaarung mindestens 8 Tage an den Tierstall akklimatisiert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

2.2.2 Mauslinien

Die drei verwendeten Mauslinien wurden vom „Translational Animal Research Center“ der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz (Deutschland) bezogen. Es wurde die Mauslinie „C57BL/6J“ für wildtypische Tiere verwendet. Außerdem wurde die Mauslinie „B6;129S4-Tsc2tm1Djk/J“ eingesetzt, bei der ein Allel des zweiten kodierenden Exons des murinen *Tsc2*-Gens durch Insertion einer Neomycin-Kassette konstitutiv ausgeknockt war (Ehninger et al., 2008; Onda et al., 1999). Daneben wurde die Mauslinie „CrI:CD1(ICR)“, im Folgenden als „CD1“ bezeichnet, verwendet.

2.2.3 ELS-Paradigma

Das Modell des frühkindlichen Stresses (*early-life stress*, ELS) durch fragmentierte Fürsorge des Muttertiers wurde bereits durch Rice et al. (2008) und Gunn et al. (2013) beschrieben (Gunn et al., 2013; Rice et al., 2008). Zur Etablierung des ELS-Paradigmas (Etablierungsphase) wurden wildtypische (wt) männliche und weibliche Tiere des Mausstamms C57BL/6J verwendet. Die Untersuchung der eigentlichen Projektphase (ELS-Tsc2-Projekt) wurde mit wt Weibchen und heterozygoten *Tsc2*-Männchen (*Tsc2*^{+/-}) durchgeführt. Um die Infantizid-Rate zu verringern, wurden zuchterfahrene Weibchen im Alter von 3 – 6 Monaten verwendet. Die Weibchen wurden für vier Tage entweder mit wt C57BL/6J- (Etablierungsphase) oder mit *Tsc2*^{+/-}-Böckchen (Projektphase) im Alter von mindestens 8 Wochen verpaart (1:1- und 2:1-Verpaarungen). Danach wurden die Weibchen bis zum Tag der errechneten Geburt (ca. 20 Tage) allein gehalten und von sämtlichen Stress verursachenden Faktoren (z.B. Lärm) verschont. Ab dem Tag der errechneten Geburt wurden die Käfige der Weibchen zwei Mal täglich behutsam auf Jungtier-Würfe kontrolliert. Die männlichen Tiere wurden nach der Verpaarung verworfen.

Der Tag der Geburt der Jungtiere wurde als postnataler Tag 0 (P0) verzeichnet. Bis zum Tag P2 blieben die Muttertiere mit ihrem Wurf in Standardkäfigen (Filtertopfhaltung, Typ II-Käfige, kurz) ungestört. An Tag P2 wurden die Muttertiere zusammen mit ihrem Wurf für eine Woche in Experimentierkäfige (Modell „Mouse Cage M3 – sloping front“, Maße: 48 x 15 x 13 cm; Volumen: 490 cm² x 13 cm, Abbildung 2.2.1, Hersteller „NPK Cages“, Wageningen, Niederlande) überführt, die zwecks Videoaufzeichnungen während der ELS-Phase wie folgt modifiziert waren (Abbildung 2.2.1):

- Standard-Experimentierkäfige
enthielten ausreichend (standardgemäß) Einstreu und Nistmaterial (zu Quadraten gepresste Watte, 4 x 4 cm, Hersteller „DBM“, Schottland).
- ELS-Experimentierkäfige
waren mit einer Lochbodenplatte aus Edelstahl ausgestattet, unter welcher sich eine gewisse Menge Einstreu befand, um Urin und Kot aufzufangen und den Hygienestandards zu entsprechen. Ferner wurden in diesen Käfigen 2/3 des Nistmaterials zur Verfügung gestellt.

In der Etablierungsphase wurden die Würfe auf maximal 8 Nachkommen verkleinert, für die Projektphase (ELS-Tsc2-Projekt) wurden alle Tiere eines Wurfes verwendet. Die Mütter wurden inklusive Wurf zufällig abwechselnd entweder in einen ELS- oder Standard-Experimentierkäfig gesetzt (Abbildung 2.2.2). An Tag P9 wurden die Muttertiere zusammen mit ihrem Wurf in herkömmliche Standardkäfige mit Standardausstattung überführt. An P21 wurden die Jungtiere abgestillt und nach Geschlecht zu 2-5 Tieren pro Gruppe aufgeteilt und in Standardkäfige gesetzt. Für die ELS-Etablierung wurden männliche und weibliche Nachkommen verwendet. In der Projektphase wurden nur männliche Nachkommen untersucht, die nach dem Abstillen mit Ohrmarkierungen zur Identifikation versehen wurden. Die weiblichen Nachkommen, die in der Projektphase generiert wurden, und die Mütter wurden verworfen. Nicht schwangere Muttertiere wurden in der nächsten Verpaarungsrunde eingesetzt und bei erneut ausbleibender Schwangerschaft verworfen. Käfigwechsel, Verpaarungen, Abstillen, Geschlechtsbestimmung und Töten der Tiere (z.B. Elterntiere, weibliche Nachkommen, erkrankte Tiere) wurden teilweise durch Tierpfleger vorgenommen.

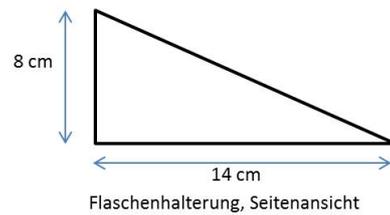
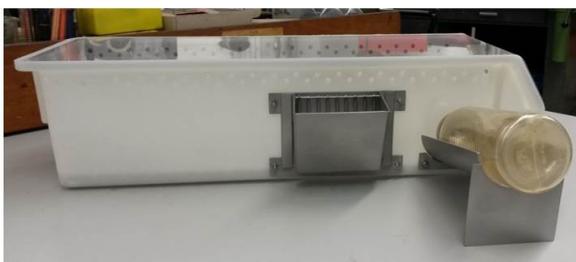
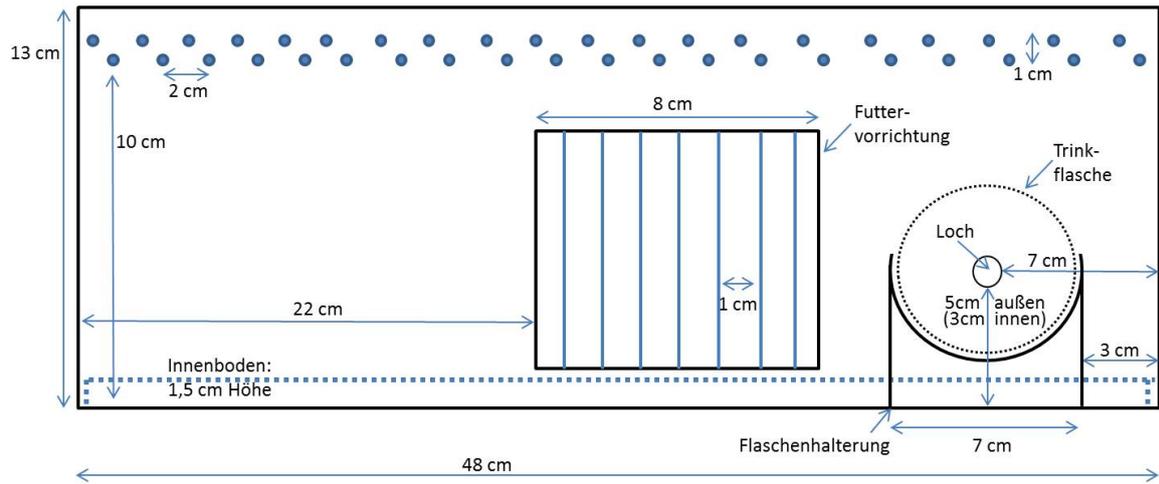


Abbildung 2.2.1: Abbildung der Experimentierkäfige

Oben: Skizze, Seitenansicht des Käfigs mit Futtervorrichtung und Trinkflaschenhalterung mit Maßangaben. **Mitte links:** Fotografie, Seitenansicht des Käfigs. **Mitte rechts:** Skizze mit Maßen der Trinkflaschenhalterung. **Unten:** Weitere Fotografien der Käfige aus verschiedenen Blickwinkeln.

2.2.4 Evaluation des maternalen Verhaltens während des ELS-Paradigmas

Während des ELS-Paradigmas wurden von P3 bis P9 die Experimentierkäfige täglich um 7:30 Uhr, 15:00 Uhr und 19:30 Uhr (2 Hellphasen und eine Dunkelphase) für 30 Minuten gefilmt (Abbildung 2.2.2). Nachträglich wurde mit dem Programm „VLC mediaplayer“ (Version 2.1.5, VideoLan Project) gezählt, wie häufig die Muttertiere das Nest verließen, in dem sich die Jungtiere befanden (kein Mutter-Kind-Kontakt). Es wurde statistisch ermittelt, ob ein Unterschied in der Häufigkeit des Verlassens des Nests zwischen den ELS- und Kontrollmüttern vorlag.

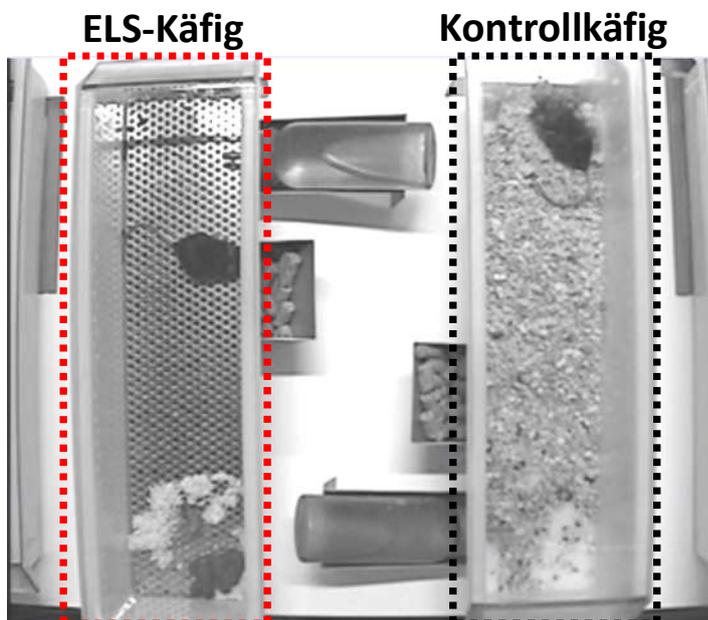


Abbildung 2.2.2: Darstellung des ELS-Paradigmas

ELS-Käfige (rot eingrahmt) enthielten kein Einstreu und reduziertes Nistmaterial wodurch das Nest im Käfig zerstreut war (s. untere rechte Ecke). Kontrollkäfige (schwarz eingrahmt) waren zu Standardbedingungen ausgestattet. Durch das vorhandene Einstreu blieb das Nest kompakt.

2.2.5 Körpergewicht

Während der Etablierungsphase wurden weibliche und männliche Nachkommen im Alter von 9 Tagen (P9) sowie mit 3, 9 und 12 Wochen gewogen. Die Tiere der Projektphase wurden an P9 und im Alter von 2, 4 und 6 Monaten gewogen. Das Wiegen wurde mit einer Präzisionswaage (Messskala: 0,01 g – 500 g) vorgenommen. Anschließend wurde statistisch ermittelt, ob ein Gewichtsunterschied zwischen den Gruppen vorlag.

2.2.6 Corticosteron (CORT)-Messung im Blutserum

Während der Etablierungsphase wurde die CORT-Konzentration im Blutserum der Nachkommen von ELS- und Kontroll-Müttern beiden Geschlechts gemessen. Im Alter von 9 Tagen, sowie 3 und 8 Wochen wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und deren Kopf umgehend mit einer Schere abgetrennt. Das Blut wurde mit einer „Microvette® CB 300 K2E“ (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen und bei 4°C für 10 Min. mit 10.000 x g zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und bei -80°C gelagert. Zur Quantifizierung der CORT-Konzentration wurden 2 technische Replikate pro biologischer Probe generiert, die mit dem „Corticosterone ELISA Kit“ von Enzo Life Sciences (New York, USA) behandelt und mit dem Photometer „Multiskan FC“ (ESW version 1.00.96) gemessen wurden. Die Ergebnisse wurden durch die Software „SkanIt 4.1 for Microplate Readers RE“ (Version 4.1.0.43) geliefert. Anschließend wurde untersucht, ob sich die Gruppen in der durchschnittlichen CORT-Konzentration unterschieden.

2.2.7 Bestimmung des *Tsc2*-Genotyps

Da für die Projektphase wt Mütter mit *Tsc2*^{+/-}-Männchen verpaart wurden, wurden zu 50 % heterozygote (*Tsc2*^{+/-})-Nachkommen und 50 % wildtypische Nachkommen generiert. Zur Bestimmung des Genotyps der männlichen Nachkommen von ELS- und Kontrollmüttern wurde die DNA aus Ohrbiopsien extrahiert.

2.2.7.1 DNA-Extraktion

Die zur Tieridentifikation gestanzten Ohrbiopsien wurden bei -20°C in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufbewahrt. Es wurden 200 µl *Digestion Buffer* (Anhang, Tabelle 6.3.2) und 12 µl Proteinase K (20 mg/µl, PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland) zur Gewebeprobe pipettiert und unter kontinuierlichem Schütteln über Nacht bei 55°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Reaktionsgefäße für 5 Minuten bei 4°C und 10.000 x g zentrifugiert. Das Lysat wurde für die Genotypisierungs-PCR verwendet.

2.2.7.2 Genotypisierungs-PCR

Zur Identifikation von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen wurden das Primerset „H162, H163 und H163“ von Onda et al. (1999) verwendet (Onda et al., 1999). Im Primerset waren ein Forward-Primer „H162“ und zwei Reverse-Primer enthalten, von denen der Primer „H163“ in der wildtypischen *Tsc2*-Sequenz und der Primer „H164“ in der modifizierten, transgenen *Tsc2*-

Sequenz (Tabelle 2.2.1 und Punkt 2.2.2) hybridisierten. Zur Amplifikation wurde das „FastStart“ PCR-System (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Das DNA-Lysat (siehe Punkt 2.2.7.1) wurde 1:5 verdünnt in die PCR-Reaktion eingesetzt (Tabelle 2.2.2).

Tabelle 2.2.1: Verwendete Primer und Primersequenzen für die Genotypisierungs-PCR

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
H162 (forward)	CAAACCCACCTCCTCAAGCTTC
H163 (reverse 1)	AATGCGGCCTCAACAATCG
H164 (reverse 2)	AGACTGCCTTGGGAAAAGCG

Tabelle 2.2.2: Genotypisierungs-PCR-Protokoll

A: Verwendete Chemikalien inklusive Konzentrationen der Stocklösung sowie in der PCR-Reaktion und Herstellerfirmen. **B:** Thermocycler-Bedingungen.

Abschnitt A

Reagenzien	Konzentration der Stocklösung	Volumen pro Reaktion [µl]	Konzentration in der PCR-Reaktion	Hersteller
PCR Buffer FastStart, MgCl ₂ 20 mM	10 X	2,50	1 X	Roche, Mannheim, Deutschland
dNTPs FastStart	je 10 mM	0,50	200 µM	Roche, Mannheim, Deutschland
Primer H162	100 µM	2,00	20 µM	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Primer H163	100 µM	1,00	10 µM	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Primer H164	100 µM	1,00	10 µM	Sigma Aldrich, München, Deutschland
FastStartTaq	5 U/µl	0,20	1 U	Roche, Mannheim, Deutschland
H ₂ O (höchstrein)		16,80		B. Braun Melsungen AG, Deutschland
DNA		1,00		
Endvolumen		25,00		

Abschnitt B

Temp (°C)	Dauer	Schritt
95	5 Min	Initiale Denaturierung zur Aktivierung der thermostabilen Taq-Polymerase
95	30 Sek	Doppelstrang-Denaturierung der DNA bzw. des PCR-Produkts
62	30 Sek	Primer-Annealing-Temperatur
72	1 Min	Elongation
PCR-Zyklen 35 total		
72	7 Min	Finale Elongation
4	Hold	Verwahren der PCR-Reaktion

2.2.7.3 Genotyp-Bestimmung durch Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund des verwendeten PCR-Primersets wurde für $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse neben der Bande des wt Allels (86 bp Fragmentlänge) auch die Bande des modifizierten Allels (105 bp) im Gelbild visualisiert (Abbildung 2.2.3). Demnach wurden die $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse anhand einer Doppelbande identifiziert.

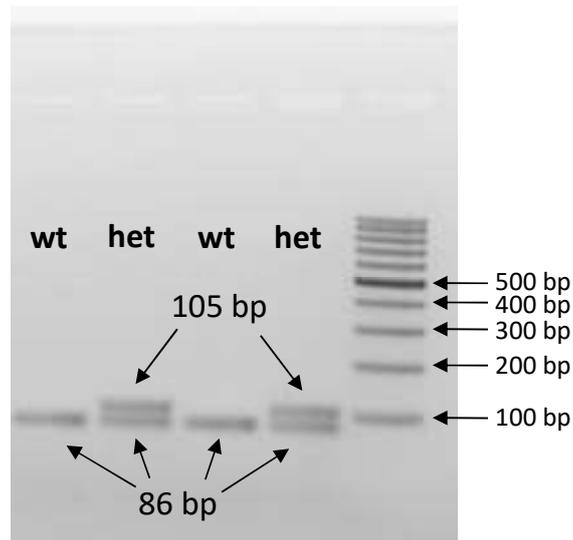


Abbildung 2.2.3: Genotypisierung, Beispiel-Gelbild

Bestimmung des Genotyps mittels Agarose-Gelelektrophorese. $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse wiesen neben der Bande für das wt Allel (86 bp Fragmentlänge) auch eine Bande für das modifizierte (het-) Allel (105 bp) im Gelbild auf. In die Tasche rechts außen wurde ein 100 bp-Längenstandard aufgetragen.

2.2.8 Verhaltensversuche mit ELS- und Kontrollnachkommen

Die Verhaltensversuche wurden ebenfalls im Tierstall während der Hell-Phase durchgeführt. Die für die Etablierungsphase verwendeten Mäuse führten jeden Verhaltenstest ein Mal durch und wurden vor Beginn der Tests eine Woche täglich an den Experimentator gewöhnt (*handling*). Ferner wurden sie an die verwendeten Versuchsboxen habituiert. Die Mäuse der Projektphase absolvierten die selben Tests in verschiedenem Alter (Retest). Da diese Mäuse zu Beginn eines Verhaltenstestdurchgangs gewogen wurden, fand währenddessen das *handling* statt. Mittels Videoaufzeichnung (Kameras: „Security Camera“, Modell „PZ0420H“, Hersteller: Camera2000 Ltd., China; Aufzeichnungssoftware „Capture Studio“, Hersteller Magewell, Nanjing, China, Auswertungssoftware „VLC mediaplayer“) wurde das Verhalten der Testmäuse (ELS- und Kontrollmäuse) im jeweiligen Versuch festgehalten und nachträglich ausgewertet. Die Auswertung erfolgte entweder manuell mit Stoppuhren oder im automatisierten Verfahren unter Verwendung der „EthoVision XT Tracking“-Software (Hersteller Noldus, Wageningen, Niederlande).

In der Etablierungsphase wurde mit den ELS- und Kontrollmäusen ein *Novel Object Recognition*-Test (NORT) und eine Episodisches Gedächtnis-Testbatterie (EGT) durchgeführt. Im ELS-Tsc2-Projekt wurden die Mäuse im *Open Field* (OF)-Test, im *Social Interaction* (SI)-Test, im *Spontaneous Alternation* (SA)-Test und im NORT untersucht.

2.2.8.1 Novel Object Recognition-Test

Mit Hilfe des NORTs wird das Langzeit-Erinnerungsvermögen der Versuchstiere untersucht. Dazu werden einer Testmaus an zwei aufeinander folgenden Tagen zwei identische Kopien eines Objektes demonstriert (Trainingsphase 1 und 2). Nach einem weiteren Tag (24 Stunden-NORT, 24 Std.-NORT) oder nach einer Woche (7 Tage-NORT) werden der Testmaus das bereits bekannte und ein neues Objekt gezeigt (Testphase) (siehe Abbildung 2.2.4). Aufgrund des natürlichen Verhaltens von Mäusen, neue Objekte zu erkunden, kann anhand der Dauer und Häufigkeit der Erkundung des neuen Objektes abgeleitet werden, ob sich die Testmaus an das bekannte Objekt erinnert und deshalb bevorzugt das neue Objekt erkundet. Dafür werden zwei Parameter erhoben (Antunes & Biala, 2012). (1) Der Diskriminierungsindex (DI) gibt an, ob die Testmaus das neue Objekt präferiert. Der Wert liegt zwischen -1 und +1 und je höher er ist, desto mehr Zeit verbringt die Maus mit dem neuen Objekt. Der DI wird durch folgende Formel berechnet:

$$DI = \frac{\text{Erkundungsdauer neues Objekt (Sek.)} - \text{Erkundungsdauer bekanntes Objekt (Sek.)}}{\text{Erkundungsdauer neues Objekt (Sek.)} + \text{Erkundungsdauer bekanntes Objekt (Sek.)}}$$

(2) Die Explorationszeit (EZ) gibt die Erkundungsdauer der beiden gezeigten Objekte an und gibt Aufschluss über die Bereitwilligkeit der Maus, am Versuch teilzunehmen. Berechnet wurde die EZ mit der Formel:

$$EZ = \text{Erkundungsdauer neues Objekt (Sek.)} + \text{Erkundungsdauer bekanntes Objekt (Sek.)}$$

Die NOR-Tests wurden in weißen Holzboxen (40 × 40 × 40 cm Innenmaß) durchgeführt. In der Etablierungsphase wurden der Testmaus die Objekte für jeweils 3 Minuten demonstriert. In der Projektphase wurden die Objekte in Trainingsphase 1 und in der Testphase für 5 Minuten gezeigt, in der Trainingsphase 2 für 3 Minuten. Die Boxen und die Objekte wurden nach jeder Testmaus mit 70 %igen, vergälltem Ethanol gereinigt. Außerdem wurde in der Testphase die Position des neuen Objektes getauscht. Dadurch wurde eine Verfälschung der Versuchsergebnisse durch Gerüche bzw. eine Habituation an die Demonstrationsstelle des neuen Objekts vermieden.

Trainings- und Testphasen wurden aufgezeichnet und nachträglich ausgewertet. Dabei wurde manuell die Zeit des Nasenkontakts mit jedem einzelnen Objekt festgehalten (Abbildung 2.2.4).

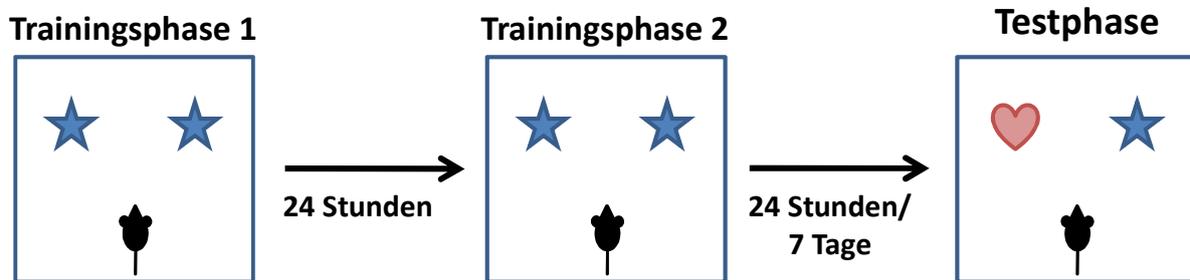


Abbildung 2.2.4: Schematischer Versuchsablauf der 24 Stunden- und 7 Tage-NORTs

An zwei Trainingstagen wurden den Testmäusen zwei identische Kopien eines Objekts (Stern) gezeigt. Nach weiteren 24 Stunden bzw. nach 7 Tagen wurde ein neues Objekt (Herz) demonstriert.

2.2.8.2 Episodisches Gedächtnis-Testbatterie (EGT)

Das episodische Gedächtnis bedarf eines komplexen Erinnerungsvermögens und wurde im stufenweisen Versuch analysiert (Abbildung 2.2.3). Für den Versuchsaufbau wurden zwei Holzboxen (40 × 40 × 40 cm Innenmaß) verwendet, deren Böden jeweils anders gemustert und farbig waren als deren Seitenwände. In diesen beiden andersartigen Umgebungen (Kontext 1 und Kontext 2) wurden den Testmäusen zwei verschiedene Objekte demonstriert. In der ersten Versuchsstufe wurde ein NORT im selben Kontext durchgeführt und es wurde gemessen, ob die Mäuse das neue Objekt erkennen (*object-recognition task*, ORT). Als zweite Stufe wurde wieder im selben Kontext evaluiert, ob das neue Objekt an einem neuen Ort erkannt wurde (*object-place task*, OPT). In der dritten Stufe sahen die Mäuse zwei identische Kopien eines Objekts (als Beispiel: A/A) in Kontext 1 und anschließend zwei identische Kopien eines anderen Objekts (B/B) in Kontext 2. Danach wurden ihnen, wieder in Kontext 2, die beiden verschiedenen Objekte gezeigt (A/B). Die Mäuse sollten erkennen, welches Objekt im selben Kontext neu war (*object-context task*, OCT). In der letzten Versuchsstufe wurden den Mäusen zuerst zwei verschiedene Objekte (A/B) in Kontext 1 gezeigt, danach sahen sie die beiden Objekte seitenvertauscht in Kontext 2 (B/A). Zuletzt wurden den Mäusen in Kontext 1 zwei identische Kopien eines der beiden Objekte gezeigt (z.B. AA). Bei diesem Versuchsteil sollten Mäuse mit intakter episodischer Erinnerung das neue Objekt kontextabhängig an der neuen Position erkennen (*object-place-context task*, OPCT) (siehe Abbildung 2.2.5) (Mitchell, 2012).

Die Mäuse hatten zur Untersuchung der Objekte jeweils 3 Minuten Zeit und 2 Minuten Pause zwischen zwei Versuchsteilen, in der die Boxen und Objekte mit 70 %igem Ethanol abgewischt wurden, um Gerüche zu beseitigen. Jede Versuchsstufe wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Am zweiten Tag wurde die Position der neu zu erkennenden Objekte vertauscht, um einen Gewöhnungseffekt zu vermeiden. Bei der Videoanalyse wurde die Zeit des Nasenkontakts mit jedem einzelnen Objekt manuell festgehalten. Anschließend wurde wie in Abschnitt 2.2.8.1 der DI und die EZ berechnet.

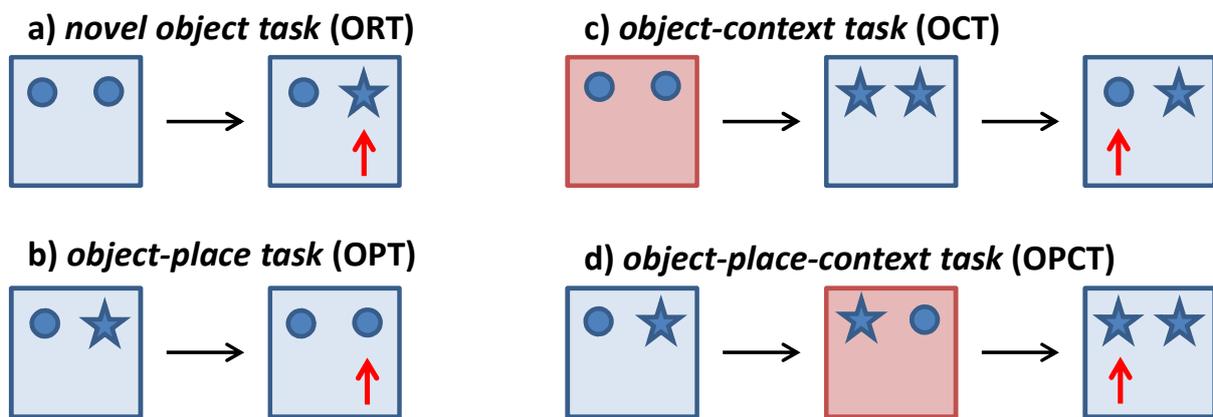


Abbildung 2.2.5: Schematische Darstellung der Episodischen Gedächtnis-Testbatterie

Die Testbatterie wurde in vier aufeinander aufbauenden Tests durchgeführt. In zwei verschiedenen Kontexten (blaue oder rote Umgebung) wurden den Testmäusen verschiedene Objekte demonstriert. Die roten Pfeile weisen auf Objekte, welche versuchsabhängig natürlicher Weise präferiert werden sollten. Im ORT sollte das neue Objekt erkannt werden (Kreis → Stern). Im OPT wurde das Erkennen der Lokation des neuen Objekts (Stern → Kreis) geprüft. Beim OCT sollte das neue Objekt kontextabhängig identifiziert werden (blauer Kontext, Stern → Kreis). Und im OPCT galt es, die Lokation des neuen Objektes kontextabhängig zu erkennen (blauer Kontext, Kreis → Stern).

2.2.8.3 Open Field-Test

Im *Open Field* (OF)-Test werden das allgemeine Erkundungsverhalten und die Bewegungsaktivität untersucht, wodurch sich auch angstassoziiertes Verhalten ableiten lässt. Tiere, die weniger ängstlich sind, zeigen eine erhöhte Exploration und halten sich länger im Zentrum eines Areals auf. Hingegen weisen ängstlichere Tiere ein vermindertes Erkundungsverhalten auf und bevorzugen die Randbereiche der Testumgebung (Gould, 2009). Im Versuch wurde das Verhalten der Testmaus in einer weißen Holzbox (40 × 40 × 40 cm Innenmaß) für 5 Minuten aufgezeichnet. In der nachträglichen Videoanalyse wurden im automatisierten Verfahren die Gesamtlaufstrecke der Maus (Lokomotion in cm) und die Aufenthaltsdauer innerhalb des Areals (Zentrum oder Rand) ausgewertet (Abbildung 2.2.6). Als Randbereich wurde ein Abstand entsprechend der Mausekörperlänge senkrecht zu den Seitenwänden festgelegt, der mit fortschreitendem Alter entsprechend größer wurde.

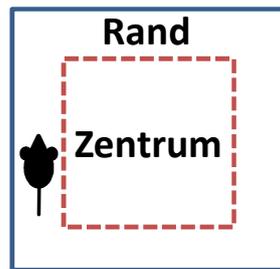


Abbildung 2.2.6: Schematische Darstellung des *Open Field*-Tests

Die Testmaus (schwarz) konnte sich für 5 Minuten frei in einem Areal (angedeutet durch die blaue Linie) bewegen. Nachträglich wurden die Aufenthaltsdauer im Arealszentrum und die zurückgelegte Wegstrecke evaluiert. Das Arealszentrum (gekennzeichnet durch die rote Linie) wurde bei Auswertung nachträglich virtuell festgelegt.

2.2.8.4 *Social Interaction*-Test

In diesem Test wird das Sozialverhalten durch Interaktion mit einer zweiten Maus analysiert (Kaidanovich-Beilin, Lipina, Vukobradovic, Roder & Woodgett, 2011). Hierzu wurde der Testmaus für 2,5 Minuten in einer weißen Holzbox (40 × 40 × 40 cm Innenmaß) in einer Trainingsphase ein zylindrischer Käfig mit Metallstreben gezeigt. In der anschließenden Testphase wurde der Testmaus im Zylinderkäfig eine CD1-Maus für weitere 2,5 Minuten demonstriert (siehe Abbildung 2.2.7). In der nachträglichen Videoanalyse der Trainingsphase wurde manuell die Zeit des Nasenkontakts der Testmaus mit dem Zylinderkäfig gemessen. Außerdem wurde für die Testphase die Dauer des Nasenkontakts der Testmaus mit der CD1-Maus evaluiert. Mit der unten aufgeführten Formel wurde der relative *Social Interaction*-Index (SI) berechnet. Je höher der Wert ist, desto länger dauerte die Interaktion zwischen den beiden Mäusen.

$$SI = \frac{\text{Interaktionsdauer (Sek.) während Habituationsphase}}{\text{Interaktionsdauer (Sek.) während Testphase}} \times 100$$

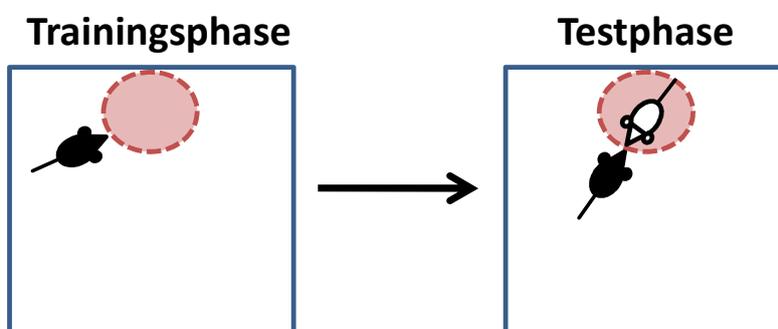


Abbildung 2.2.7: Schematische Darstellung des *Social Interaction*-Tests

Während der Trainingsphase wurde der Testmaus (schwarz) ein zylindrischer Käfig (rotes Feld) mit Gitterstäben demonstriert. In der Testphase befand sich im Zylinder eine fremde CD1-Maus (weiß).

2.2.8.5 Spontaneous Alternation-Test

Auch dieser Test basiert auf der Erkundungsbereitschaft von Mäusen in einer neuen Umgebung und erfordert räumliche Orientierung und Erinnerungsvermögen (Kraeuter, Guest & Sarnyai, 2019). Für den Versuch wird ein Y-förmiger Apparat (*Y Maze*) verwendet, dessen drei Arme im 120°-Winkel zueinander stehen. Das Material des verwendeten *Y Maze* war aus Plastik, der Boden war weiß und die Wände waren schwarz gefärbt. Im Versuch wurde die Testmaus in das Zentrum des *Y Maze* gesetzt und durfte diesen für 10 Minuten erkunden (siehe Abbildung 2.2.8). In der anschließenden Videoanalyse wurden die Richtungswechsel der Testmaus quantifiziert. Es wurde außerdem abgeleitet, ob die Testmaus spontane Richtungswechsel vorgenommen hatte und in einen nicht zuvor gewesenen Arm ging oder ob sie in den zuvor besuchten Arm zurückkehrte. Je höher der relative Wert lag, desto mehr spontane Richtungswechsel wurden vorgenommen und umso besser war das räumliche Arbeitsgedächtnis der Testmaus. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$SA\ Index = \frac{\text{Anzahl der spontanen Richtungswechsel}}{\text{Summe der Richtungswechsel}} \times 100$$

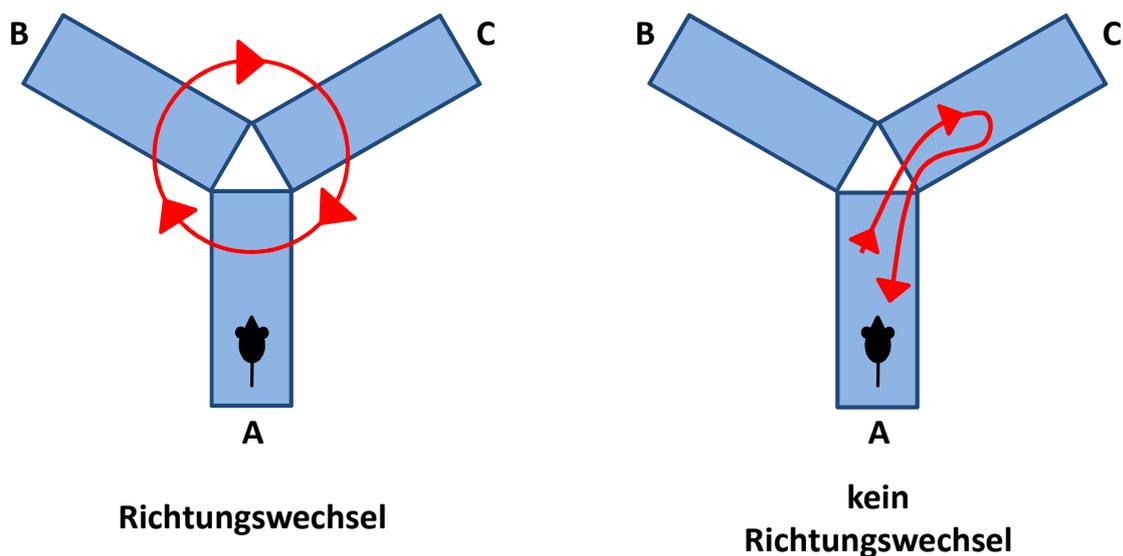


Abbildung 2.2.8: Schematische Darstellung des Spontaneous Alternation-Tests

In einem Y-förmigen Areal konnte die Testmaus für 10 Minuten frei explorieren. Ein spontaner Richtungswechsel fand statt, wenn die Maus – ausgehend von dem Arm (A, B oder C), in dem sie sich gerade befand – in einen zuvor unbetretenen Arm gewechselt ist (linke Abbildung). Wenn die Maus jedoch in einen Arm zurücklief, aus dem sie zuvor kam, galt dies nicht als Richtungswechsel (rechte Abbildung).

2.2.9 Prozessierung der Daten

Aufgrund der lärmsensiblen ELS-Phase und der währenddessen begrenzten Aufzeichnungsmöglichkeit wurden die untersuchten Nachkommen durch zeitversetzte Verpaarungsdurchgänge generiert. Die Daten von den Nachkommen eines Durchgangs (*Batch*) wurden für die festgelegten altersabhängigen Untersuchungen sukzessive erhoben. Die Rohdaten wurden in Excel (Microsoft, USA) zusammengefasst.

2.2.10 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Der statistische Gruppenvergleich wurde für jeden Verhaltenstest altersabhängig unter Verwendung des zweiseitigen *Student's t*-Test ohne Messwiederholungen mit dem Programm „GraphPad Prism“ (Versionen 5.0 und 8.0, San Diego, USA) durchgeführt. Als α -Signifikanzlevel wurde 0,05 verwendet mit der vom Programm voreingestellten Signifikanzskala:

* $p \leq 0,05$;

** : $p \leq 0,01$;

*** : $p \leq 0,001$;

**** : $p \leq 0,0001$

nicht signifikant: $p > 0,05$.

2.2.11 Test-Retest-Reliabilität

Die Test/Retest-Reliabilität bezeichnet die Zuverlässigkeit, dass bei Testwiederholungen gleiche Ergebnisse erzielt werden. Die Zuverlässigkeit wird dementsprechend als hoch bewertet, wenn ein Individuum nahezu gleiche Ergebnisse hervorbringt. Hingegen ist die Zuverlässigkeit gering, wenn die Ergebnisse innerhalb einer Gruppe variieren oder das Testverfahren unzuverlässig ist. Als Folge dessen wird die statistische Aussagekraft verringert und es besteht das Risiko, Ergebnisse falsch zu bewerten. Außerdem können individuelle, verfassungsabhängige Schwankungen die Ergebnisse verfälschen. Um dem entgegenzuwirken, können Tests häufiger wiederholt oder die Versuchsdauer verlängert werden. Zudem steigern Variationen eines Tests die Reliabilität (Crusio, W., Sluyter, F., Gerlai, R., & Pietropaolo, 2013). Die Retest-Reliabilität kann durch den Pearson Korrelationskoeffizienten „ r “ angegeben werden, der im Wertebereich von -1 bis +1 liegt. Dabei besteht eine Korrelation, wenn $r = +1$, keine Korrelation, wenn $r = 0$ und eine negative Korrelation, wenn $r = -1$.

Zur Analyse einer Retest-Reliabilität wurde die *Pearson*-Korrelationsanalyse mit „GraphPad Prism“ (Version 8.0, San Diego, USA) vorgenommen. Es wurde ein Altersvergleich pro untersuchter Mausgruppe durchgeführt. Als „zuverlässig“ wurde ein Wertebereich von $r = 0,7 - 0,9$ angesehen, wie es für Verhaltensversuche mit Mäusen empfohlen wird (Crusio, W., Sluyter, F., Gerlai, R., & Pietropaolo, 2013). Sämtliche Grafiken des Ergebnisteils wurden ebenfalls mit „GraphPad Prism“ (Version 8.0, San Diego, USA) erstellt. Die Schemata über die Verhaltensversuche des Material- und Methodenteils wurden in PowerPoint (Microsoft, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Projekt 1: DNA-Methylierungsanalyse von hSSCs

In dieser Arbeit wurden FGFR3⁺- und FGFR3⁻-SPG, Spermien und Kontroll-DNA aus Lymphozyten hinsichtlich ihres DNA-Methylierungsprofils in den regulatorischen Regionen der paternal geprägten Gene *MEG3* und *H19*, der maternal geprägten Gene *KCNQ1OT1*, *PEG3* und *SNRPN*, der Pluripotenz-assoziierten Gene *NANOG* und *POU5F1* und der hSSCs-Markergene *FGFR3*, *GFRA1*, *L1TD1* und *PLZF* analysiert. Dazu wurde die LD-BSP Methode (El Hajj et al., 2015) angewandt, welche die Untersuchung auf Einzelzell- und Einzelallel-Ebene ermöglicht (Abbildungen 3.1.2 A bis M). Insgesamt wurden jeweils fünf einzelne FGFR3⁺- und FGFR3⁻-Zellen des Patienten 1 und jeweils 15 10-Zell-Pools aus FGFR3⁺- und FGFR3⁻-SPG der Patienten 2 - 5 prozessiert. Die DNA-Methylierungsergebnisse wurden mit erzeugten technischen Replikaten (TR) von Spermien und Blut-Lymphozyten verglichen (jeweils zwei biologische Replikate).

Die Anzahl der methylierten (me⁺) und unmethylierten (me⁻) CpG-Dinukleotide (CpGs) einer untersuchten genomischen Region wurde in Tabelle 3.1.1 zusammengetragen. In Abschnitt A der Tabelle 3.1.1 wurden die summierten CpG-Anzahlen der Patienten 2 – 5 in absoluten und relativen Werten inklusive der statistischen Ergebnisse (*p*-Werte) des *Fisher's Exact* Tests angegeben. In Abschnitt B derselben Tabelle wurden diese Werte für jeden Patienten einzeln aufgeführt. In Abschnitt C wurden die statistischen Ergebnisse zusammengetragen, die für jeden einzelnen Patienten erhoben wurden. Ebenso wurde eine Tabelle mit gleicher Gliederung für die Methylierungswerte auf Allel-Ebene erstellt (Tabelle 3.1.2). Außerdem wurde unter Abschnitt D derselben Tabelle die durchschnittliche Methylierung der Spermien- und Kontroll-DNA aller TRs zusammengetragen.

Die untersuchten Regionen wurden schematisch in den Abbildungen 3.1.1 A1 bis M1 abgebildet. Für jedes Genassay wurden alle CpG-Methylierungswerte der Patienten 2 – 5 in Streudiagrammen dargestellt. Zudem wurden die *p*-Werte und der Prozentsatz an methylierten (me⁺) und unmethylierten (me⁻) CpGs der Patienten 2 - 5 visualisiert (Abbildungen 3.1.1 A2 bis M2, Tabelle 3.1.1). Die Verteilung der CpG-Methylierung auf Allel-Ebene wurde für jeden einzelnen Patienten durch Methylierungsdiagramme dargestellt (Abbildungen 3.1.1 A3 bis M3, Tabelle 3.1.2). Im Folgenden werden die Ergebnisse für die zusammengeführten Daten der Patienten 2 - 5 aufgeführt (Abschnitt 3.1.1) und für die Einzelzellen des Patienten 1 (Abschnitt 3.1.2).

3.1.1 Ergebnisse aus der Untersuchung der 10-Zell-Proben

3.1.1.1 Paternal geprägte Gene

Zur Methylierungsanalyse der *MEG3*-DMR lagen 15 10-Zell-Proben mit $FGFR3^+$ -SPG ($FGFR3^+$ -Pools) und 15 10-Zell-Proben mit $FGFR3^-$ -SPG ($FGFR3^-$ -Pools) der Patienten 2 - 4 vor. Anhand der LD-Methode konnten 63 Allele des $FGFR3^+$ -Pools und 55 Allele des $FGFR3^-$ -Pools untersucht werden. Davon waren 92 % (58 von 63) der Allele der $FGFR3^+$ -Pools und 100 % der $FGFR3^-$ -Pools methyliert (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Die durchschnittliche Methylierung von 22 TRs der Spermien betrug 93 % und von 20 TRs der Kontroll-DNA 58 % (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Auf Allel-Ebene wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Probengruppen festgestellt (Tabelle 3.1.2 Abschnitt C). Auf CpG-Ebene war das Verhältnis von methylierten zu unmethylierten (me^+/me^-) CpGs zwischen den $FGFR3^+$ - und den $FGFR3^-$ -Pools signifikant verschieden ($p = 0,0028$). Auch im Vergleich der beiden SPG-Gruppen mit den Spermien gab es einen signifikanten Unterschied ($FGFR3^+$ versus Spermien: $p < 0,0001$; $FGFR3^-$ versus Spermien: $p = 0,0129$) (Abbildung 3.1.1 A2, Tabelle 3.1.1 Abschnitt A).

Die Untersuchung der Methylierung in der *H19*-DMR basierte auf 59 Allelen von 9 $FGFR3^+$ -Pools und 45 Allelen von 10 $FGFR3^-$ -Pools der Patienten 4 und 5. Die Allele der $FGFR3^+$ -Pools waren zu 97 % (57 von 59 Allelen) und der $FGFR3^-$ -Pools zu 93 % (42 von 45 Allelen) methyliert (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Im Durchschnitt war die Spermien-DNA zu 99 % (38 TRs) und die Kontroll-DNA zu 33 % (37 TRs) methyliert (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Die statistische Analyse auf Allel-Ebene ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Verhältnisses von me^+/me^- Allelen in den vier Gruppen (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Zwischen den beiden SPG-Gruppen wurde ferner kein Unterschied hinsichtlich des Verhältnisses von me^+/me^- CpGs detektiert, jedoch unterschieden sich beide im Vergleich zur Spermien-Gruppe ($FGFR3^+$ versus Spermien: $p = 0,0042$; $FGFR3^-$ versus Spermien: $p = 0,0014$) (Abbildung 3.1.1 B2, Tabelle 3.1.1 Abschnitt A).

Zusammenfassend kann aus der Methylierungsanalyse der regulatorischen Regionen der untersuchten paternal geprägten Gene *MEG3* und *H19*-DMR festgehalten werden, dass die SPG-Proben wie auch die Spermien eine Hypermethylierung aufwiesen (Abbildungen 3.1.1 A und B).

3.1.1.2 Maternal geprägte Gene

Die Methylierungsuntersuchung der regulatorischen Region von *KCNQ1OT1* umfasste 50 Allele aus 15 FGFR3⁺-Pools und 39 Allele aus 15 FGFR3⁻-Pools der Patienten 2 – 4. Die FGFR3⁺-Pools enthielten 82 % (41 von 50 Allelen) und die FGFR3⁻-Pools 92 % (36 von 39) unmethylierte Allele (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Die durchschnittliche Methylierung der Spermien-DNA betrug 4 % (27 TRs) und der Kontroll-DNA 64 % (19 TRs) (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Auf Allel-Ebene wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben ermittelt (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Im statistischen Vergleich der Proportion von me⁺ zu me⁻ CpGs fand sich ein Unterschied zwischen den FGFR3⁺- und den FGFR3⁻-Proben ($p = 0,0020$), aber auch im Vergleich beider SPG-Gruppen zur Spermien-Methylierung (FGFR3⁺ versus Spermien: $p < 0,0001$; FGFR3⁻ versus Spermien: $p < 0,0001$) (Abbildung 3.1.1 C2, Tabelle 3.1.1 Abschnitt A).

Die Methylierungsanalyse der regulatorischen Region von *PEG3* beruhte auf 64 Allelen von 15 FGFR3⁺-Pools und 54 Allelen aus 15 FGFR3⁻-Pools der Patienten 2 - 4. Die FGFR3⁺-Pools enthielten zu 94 % (60 von 64) und die FGFR3⁻-Pools 98 % (53 von 54) unmethylierte Allele (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Die durchschnittliche Methylierung der Spermien-DNA betrug 2 % (27 TRs) und der Kontroll-DNA 47 % (22 TRs) (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Auf Allel-Ebene gab es keinen Unterschied zwischen den Probengruppen (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Auf CpG-Ebene unterschieden sich alle Probengruppen in Bezug auf ihren Anteil von me⁺ und me⁻ CpGs signifikant voneinander (FGFR3⁺ versus FGFR3⁻: $p = 0,0008$; FGFR3⁺ versus Spermien: $p < 0,0001$; FGFR3⁻ versus Spermien: $p = 0,0059$) (Abbildung 3.1.1 D2, Tabelle 3.1.1 Abschnitt A).

In der regulatorischen Region von *SNRPN* wurden zwei genomische Bereiche untersucht, die im Folgenden als „Region 1“ und „Region 2“ bezeichnet werden (Abbildung 3.1.1 E1 und F1). Von den Patienten 2 – 4 lagen 15 FGFR3⁺-Pools vor, 47 Allele der Region 1 und 44 Allele der Region 2. Von den 15 FGFR3⁻-Pools wurden 45 Allele der Region 1 und 36 Allele der Region 2 untersucht (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Die Allele der FGFR3⁺-Pools waren zu 94 % (44 von 47) in der Region 1 und zu 93 % (41 von 44) in der Region 2 unmethyliert. In den FGFR3⁻-Proben waren in Region 1 und in Region 2 sämtliche Allele (100 %) unmethyliert (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Die durchschnittliche Methylierung der Spermien-DNA betrug für beide Regionen 1%. Die Kontroll-DNA wies eine durchschnittliche Methylierung von 46 % in Region 1 und 42 % in Region 2 auf (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Auf Allel-Ebene wurde kein Unterschied zwischen den Probengruppen festgestellt. Auf CpG-Ebene jedoch unterschieden sich die SPG-Proben signifikant in beiden Regionen angesichts der Proportion von me⁺ zu me⁻ CpGs (FGFR3⁺ versus FGFR3⁻: Region 1 $p = 0,0071$ und Region 2 $p = 0,0047$). Ferner lag eine signifikante Differenz zwischen den FGFR3⁺-Pools und den

Spermien für Region 2 vor ($p = 0,0143$). Die übrigen Vergleiche waren statistisch unauffällig (Abbildungen 3.1.1 E2 und F2, Tabelle 3.1.1 Abschnitt A).

Insgesamt waren die regulatorischen Regionen der maternal geprägten Gene *KCNQ1OT1*, *PEG3* und *SNRPN* in den *FGFR3*⁺- und *FGFR3*⁻-SPG hypomethyliert. Wie bei den paternal geprägten Genen entsprach das Methylierungsmuster der SPG-Gruppen dem reifer Spermien (Abbildungen 3.1.1 C bis F).

3.1.1.3 Spermatogoniale Markergene

In früheren Studien wurde *FGFR3* als Oberflächenprotein von nicht-proliferierenden und nicht-differenzierenden SPG / potenziellen hSSCs identifiziert (von Kopylow et al., 2010, 2016; von Kopylow, Staeger, Schulze, et al., 2012). Daher wurde in dieser Arbeit die Promotorregion von *FGFR3* (Ezura, Sekiya, Koga, Muneta & Noda, 2009) als mögliches Markergen für männliche hSSCs hinsichtlich ihres Methylierungsprofils untersucht.

Insgesamt wurden von den Patienten 2 – 5 von 19 *FGFR3*⁺-Pools 54 Allele und von 20 *FGFR3*⁻-Pools 52 Allele der *FGFR3*-Promotorregion analysiert. Die *FGFR3*⁺-Pools enthielten 94 % (51 von 54) und die *FGFR3*⁻-Pools 98 % (51 von 52) unmethylierte Allele (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Die Spermien-DNA zeigte eine durchschnittliche Methylierung von 4 % (48 TRs) und die Kontroll-DNA 43 % (39 TRs) (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Statistische Untersuchungen auf Allel-Ebene ergaben keine Unterschiede zwischen den Probengruppen (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Die Anteile von me⁺ und me⁻ CpGs waren in beiden SPG-Gruppen ähnlich, hingegen signifikant verschieden im Vergleich zur Spermien-DNA (*FGFR3*⁺ versus Spermien: $p < 0,0001$; *FGFR3*⁻ versus Spermien: $p < 0,0075$) (Abbildung 3.1.1 G2, Tabelle 3.1.1 Abschnitt A). Des Weiteren sind bei den *FGFR3*⁻-Pools und den Spermien-Proben insgesamt 6 CpGs mit einem Methylierungswert zwischen 20 % und 80 % aufgetreten, die in der statistischen Analyse nicht berücksichtigt wurden. In den *FGFR3*⁻-Proben betrug die Methylierung der CpG 70,56 % und in der Spermien-Gruppe (5 CpGs): 32,58 %, 32,75 %, 36,16 %, 26,06 % und 27,53 % (s. Abbildung 3.1.1 G2).

Die Untersuchung der Promotorregion von *GFRA1* umfasste jeweils 25 Allele sowohl von 15 *FGFR3*⁺- als auch von 15 *FGFR3*⁻-Pools, welche von den Patienten 2 - 4 stammten. Alle Allele beider SPG-Probengruppen waren vollständig unmethyliert (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Der Methylierungsdurchschnitt der Spermien-Gruppe betrug 5 % (26 TRs) und der Kontrollgruppe 11 % (19 TRs) (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Weder auf Allel- noch auf CpG-Ebene wurde im statistischen Vergleich ein Unterschied zwischen den Probengruppen ermittelt (Abbildung 3.1.1 H2, Tabellen 3.1.1 und 3.1.2, jeweils Abschnitt A).

Die Methylierungsanalyse der Promotorregion von *L1TD1* bezog sich auf 36 Allele aus 15 *FGFR3*⁺-Pools und auf 25 Allele aus 15 *FGFR3*⁻-Pools der Patienten 2 - 4. Von den *FGFR3*⁺-Pools waren 97 % (35 von 36) der Allele und von den *FGFR3*⁻-Pools alle Allele unmethyliert (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Im Durchschnitt waren die Spermien zu 3 % (33 TRs) und die Kontroll-DNA zu 21 % (29 TRs) methyliert (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Das Verhältnis von me⁺ zu me⁻ Allelen bzw. CpGs war bei allen vier Gruppen ähnlich (Abbildung 3.1.1 J2, Tabellen 3.1.1 und 3.1.2, jeweils Abschnitt A).

Es wurde die Promotorregion von *PLZF* in 27 Allelen von 15 *FGFR3*⁺-Pools und 20 Allelen von 15 *FGFR3*⁻-Pools der Patienten 2 - 4 hinsichtlich ihres Methylierungsprofils untersucht. Sämtliche Allele beider SPG-Probengruppen waren unmethyliert (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Auch die Spermien- (Durchschnitt 3 %, 32 TRs) und die Kontroll-DNA-Gruppe (Durchschnitt 7%, 26 TRs) waren unmethyliert (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Im statistischen Vergleich wurde kein Unterschied zwischen den Probengruppen festgestellt, weder auf Allel- noch auf CpG-Ebene (Abbildung 3.1.1 K2, Tabellen 3.1.1 und 3.1.2, jeweils Abschnitt A).

In der Zusammenfassung hat die Analyse der SPG-Markergene *FGFR3*, *GFRA1*, *L1TD1* und *PLZF* ergeben, dass die DNA aller vier Probengruppen in den untersuchten regulatorischen Regionen hypomethyliert war (Abbildung 3.1.1 G bis K).

3.1.1.4 Pluripotenz-Markergene

Um den Stammzell-Charakter der nicht-proliferierenden und nicht-differenzierenden *FGFR3*⁺-SPG / potenziellen hSSCs zu analysieren, wurde die Methylierung in den Promotorregionen der Pluripotenz-Markergene *NANOG* und *POU5F1* ermittelt. Da deren analysierte Regionen nur zwei CpG-Dinukleotide enthielten, konnte keine Allel-Einteilung in methyliert (me⁺) und unmethyliert (me⁻) vorgenommen werden, weshalb keine statistischen Analysen auf Allel-Ebene durchgeführt wurden.

Es wurde die DNA-Methylierung in der regulatorischen Region von *NANOG* in 75 Allelen von 15 *FGFR3*⁺-Pools und in 45 Allelen von 15 *FGFR3*⁻-Pools der Patienten 2 – 4 untersucht (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Die Allele enthielten überwiegend methylierte CpGs: In den *FGFR3*⁺-Pools waren 138 von 142 CpGs methyliert, in den *FGFR3*⁻-Pools 82 von 83 CpGs (Tabelle 3.1.1 Abschnitt A). Es wurde eine durchschnittliche Methylierung von 96 % (25 TRs) in der Spermien-DNA und 94 % (21 TRs) in der Kontroll-DNA gemessen (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Beim Vergleich der vier Probengruppen untereinander war das Verhältnis von me⁺ zu me⁻ CpGs ähnlich (Abbildung 3.1.1 L2).

Die Methylierungsanalyse der regulatorischen Region von *POU5F1* beruhte auf 36 Allelen aus 15 *FGFR3*⁺-Pools und auf 27 Allelen aus 15 *FGFR3*⁻-Pools der Patienten 2 – 4 (Tabelle 3.1.2 Abschnitt A). Auch hier waren die meisten CpGs methyliert: 65 von 69 CpGs in der *FGFR3*⁺-Gruppe und 42 von 49 CpGs in der *FGFR3*⁻-Gruppe (Tabelle 3.1.1 Abschnitt A). Die durchschnittliche Methylierung der Spermien-DNA betrug 95 % (31 TRs) und der Kontroll-DNA 88 % (26 TRs) (Tabelle 3.1.2 Abschnitt D). Es wurde zudem kein statistisch signifikanter Unterschied im Verhältnis von me⁺ zu me⁻ CpGs zwischen den vier Probengruppen festgestellt (Abbildung 3.1.1 M2, Tabellen 3.1.1 Abschnitt A).

Insgesamt waren die Promotorregionen der beiden untersuchten Pluripotenz-Markergene *NANOG* und *POU5F1* in SPG-Proben, Spermien und somatischen Zellen nahezu vollständig methyliert (Abbildungen 3.1.1 L und M).

3.1.2 Ergebnisse aus der Untersuchung der Einzelzellen

Es wurden jeweils fünf einzelne *FGFR3*⁺- und *FGFR3*⁻-SPG auf ihr Methylierungsprofil untersucht, die von Patient 1 stammten (Tabelle 3.1.1 und Tabelle 3.1.2 jeweils Abschnitt B). Die Analyse der regulatorischen Region des paternal geprägten Gens *MEG3* umfasste 4 Allele der *FGFR3*⁺-SPG, die methyliert waren. Bei den *FGFR3*⁻-SPG waren 2 Allele methyliert und 1 Allel unmethyliert (Abbildung 3.1.1 A3).

Die regulatorische Region des maternal geprägten Gens *KCNQ1OT1* war in den *FGFR3*⁺- (2 Allele) und in den *FGFR3*⁻- (5 Allele) SPG unmethyliert. Für die Kontrollregion von *PEG3* lagen 1 Allel aus den *FGFR3*⁺-Einzelzellen und 2 Allele aus den *FGFR3*⁻-Einzelzellen vor, die jeweils unmethyliert waren. Für beide untersuchte Regionen von *SNRPN* wurden jeweils 1 unmethyliertes Allel in *FGFR3*⁺-SPG und 3 unmethylierte Allele in *FGFR3*⁻-SPG detektiert (Tabelle 3.1.2 Abschnitt B, Abbildung 3.1.1 C3 bis F3).

Ferner wurden die Promotorregionen der SPG-Markergene in den Einzelzellen untersucht. Für *FGFR3* wurden 1 Allel aus den *FGFR3*⁺- und 5 Allele aus den *FGFR3*⁻-Einzelzellen, jedes unmethyliert, festgestellt. Bei der Analyse von *GFRA1* waren die Allele in den *FGFR3*⁺-SPG (3 Allele) und den *FGFR3*⁻-SPG (ein Allel) unmethyliert. Für das *L1TD1*-Assay wurden 2 unmethylierte Allele in den *FGFR3*⁺-Zellen und 1 unmethyliertes Allel in *FGFR3*⁻-Zellen detektiert. Für die Analyse von *PLZF* lag ein unmethyliertes Allel in *FGFR3*⁺-SPG vor (Tabelle 3.1.2 Abschnitt B, Abbildung 3.1.1 G3 bis K3).

Außerdem wurde die Promotor-Methylierung der Pluripotenzgene *NANOG* und *POU5F1* auf CpG-Ebene untersucht. Die *NANOG*-Analyse ergab sowohl in den $FGFR3^+$ - als auch in den $FGFR3^-$ -Einzelzellen 2 Allele mit jeweils 2 me+ CpGs. Für *POU5F1* wurden 1 Allel mit 2 me+ CpGs in den $FGFR3^+$ -SPG und 2 Allele mit 4 me+ CpGs in den $FGFR3^-$ -SPG festgestellt (Tabelle 3.1.2 Abschnitt B, Abbildung 3.1.1 L3 und M3).

Die Untersuchung der Methylierungsprofile in einzelnen $FGFR3^+$ - und $FGFR3^-$ -SPG führte zu Ergebnissen, welche mit denen der 10-Zell-Proben vergleichbar waren. Die regulatorischen Regionen der paternal geprägten Gene und der Pluripotenz-Markergene waren methyliert. Hingegen waren die regulatorischen Regionen der maternal geprägten Gene und der SPG-Markergene unmethyliert. Außerdem stimmten die Methylierungsmuster in $FGFR3^+$ - und $FGFR3^-$ -SPG überein. Eine Ausnahme stellen die Ergebnisse für das paternal geprägte Gen *MEG3* in den $FGFR3^-$ -SPG dar, da hier ein unmethyliertes Allel und zwei methylierte Allele vorlagen (s.a. Abbildung 3.1.1 A3).

3.1.3 GpGs mit inversen Methylierungsmustern

In dieser Arbeit wurden die Methylierungsprofile von Keimzellen fortschreitender Differenzierungsstadien untersucht, beginnend mit nicht-differenzierenden und nicht-proliferierenden $FGFR3^+$ -SPG als potenzielle Stammzellen der männlichen Keimbahn, über $FGFR3^-$ -SPG als mögliche Zellen, die in den Differenzierungsprozess eintreten, bis hin zu Spermien mit abgeschlossener Differenzierung. In ausgereiften Spermien sind die Kontrollregionen von paternal geprägten Genen methyliert und von maternal geprägten Genen unmethyliert (Kultz et al., 2014).

Durch Visualisierung der Methylierungsergebnisse aus den 10-Zell-Proben mittels Streudiagrammen (Darstellung einzelner CpGs; Abbildungen 3.1.1 A2 bis M2) und Methylierungsdiagrammen (Verteilung der CpG-Methylierung innerhalb eines sequenzierten Allels; Abbildungen 3.1.1 A3 bis M3), fiel bei den elterlich geprägten Genen der SPG-Proben auf, dass einige CpGs gegenteilige (inverse) Methylierungswerte innehatten. Der Anteil dieser inversen CpGs war am größten in den $FGFR3^+$ -Pools, geringer oder abwesend in den $FGFR3^-$ -Pools und abwesend in der Spermiengruppe (Abbildungen 3.1.1 A2 bis F2). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Fraktion invers methylierter CpGs mit wachsendem Differenzierungsgrad der Keimzellen abnimmt (negative Korrelation).

Im Detail zeigte sich bei den Ergebnissen folgendes Muster: Bei *MEG3* waren 12 % der CpGs in $FGFR3^+$ -Pools, 5 % in $FGFR3^-$ -Pools und 0 % in Spermien unmethyliert (Tabelle 3.1.1 Abschnitt A). Für die *H19*-DMR wurde eine Abnahme der CpGs mit inversem

Methylierungsmuster nicht beobachtet. Hier waren 7 % der CpGs in $FGFR3^+$ -Pools, 8 % in $FGFR3^-$ -Pools und 0 % in Spermien unmethyliert (Abbildungen 3.1.1 A und B, Tabelle 3.1.1 Abschnitt A).

Die Ergebnisse für die maternal geprägten Gene bestätigten wiederum die oben genannte Beobachtung: *KCNQ1OT1* zeigte einen Anteil methylierter CpGs von 18 % in den $FGFR3^+$ -Pools, 8 % in den $FGFR3^-$ -Pools und 0 % in der Spermien-DNA. Bei *PEG3* waren 6 % der CpGs in $FGFR3^+$ -Pools, 2 % in $FGFR3^-$ -Pools und 0 % in Spermien methyliert. Der Anteil methylierter CpGs in *SNRPN* betrug in den $FGFR3^+$ -Pools 6 % für Region 1 und 7 % für Region 2. In den $FGFR3^-$ -Pools und den Spermienproben waren alle *SNRPN*-CpGs unmethyliert (Tabelle 3.1.1 Abschnitt A). Insgesamt fiel beim Vergleich zu den DMRs paternaler Gene auf, dass bei den untersuchten maternal geprägten Genen ganze Allele gegenteilig methyliert waren. Der höchste Anteil invers methylierter CpGs wurde bei *KCNQ1OT1* nachgewiesen (18 %). Augenscheinlich stammten die meisten invers methylierten CpGs von den Proben des Patienten 2 mit 7 methylierten von insgesamt 25 Allelen (28 %) (siehe Abbildung 3.3.1 C). Auch bei den Ergebnissen der $FGFR3^+$ -Pools für *PEG3* fanden sich bei Patient 2 mehr gegenteilig methylierte Allele als bei den übrigen Patienten, jedoch weniger stark ausgeprägt (3 von 20 Allelen, 15 %; siehe Abbildung 3.3.1 D). Bei den beiden untersuchten *SNRPN*-Regionen waren die inversen Methylierungsmuster auf alle untersuchten Patienten gleichmäßig verteilt (siehe Abbildungen 3.3.1 E und F).

Bei zwei der vier analysierten SPG-Markergene wurden ähnliche Muster invers methylierter CpGs wie bei den maternal geprägten Genen beobachtet. Bei *FGFR3* waren 5 % der CpGs in den $FGFR3^+$ -Pools, 3 % in den $FGFR3^-$ -Pools und 0 % in den Spermien methyliert und bei *L1TD1* waren es 3 % der CpGs in $FGFR3^+$ -Pools, 1 % in $FGFR3^-$ -Pools und 0 % in der Spermien-DNA. Für *GFRA1* und *PLZF* wurden keine CpGs mit inverser Methylierung verzeichnet (Tabelle 3.1.1 Abschnitt A).

In der Gruppe der Pluripotenzgene wurden bei *NANOG* 3 % unmethylierte CpGs in den $FGFR3^+$ -Pools, 1 % in den $FGFR3^-$ -Pools und 0 % in den Spermien festgestellt. Für *POU5F1* lag der Anteil an unmethylierten CpGs bei 6 % in den $FGFR3^+$ -Pools, bei 4 % in den $FGFR3^-$ -Pools und 0 % in der Spermienengruppe (Tabelle 3.1.1 Abschnitt A).

Bei den Ergebnissen der Einzelzell-SPG kamen im Gegensatz zu den 10-Zell-Proben keine CpGs mit inverser Methylierung innerhalb eines Allels vor. Wie jedoch bereits in Punkt 3.1.2 beschrieben, wurden für *MEG3* in den $FGFR3^-$ -SPG insgesamt 3 Allele detektiert, von denen zwei Allele methyliert und ein Allel unmethyliert waren (Tabelle 3.1.1 Abschnitt B).

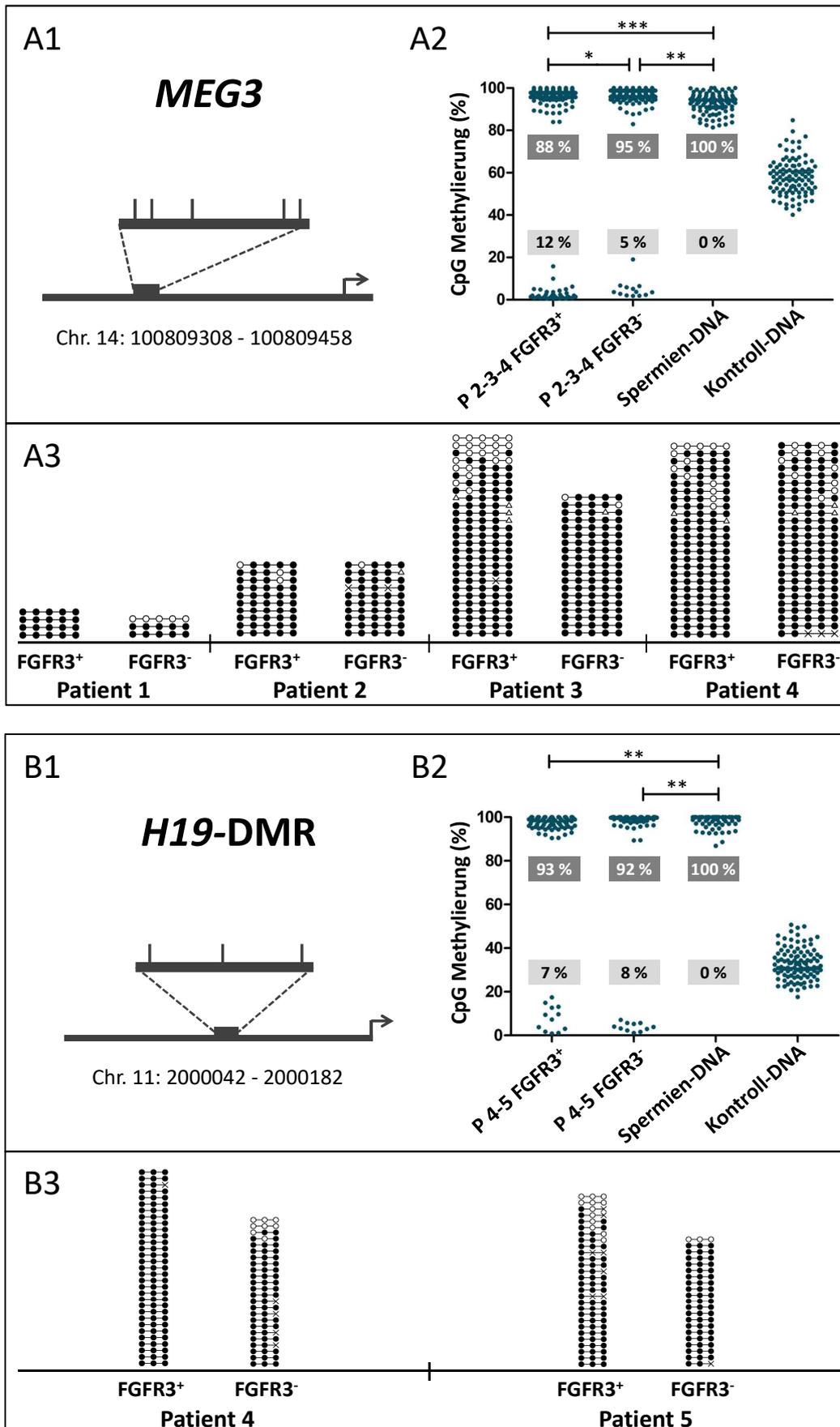


Abbildung 3.1.1 A und B: Methylierungsergebnisse für *MEG3* und *H19-DMR*.
Beschreibung siehe Seite 85.

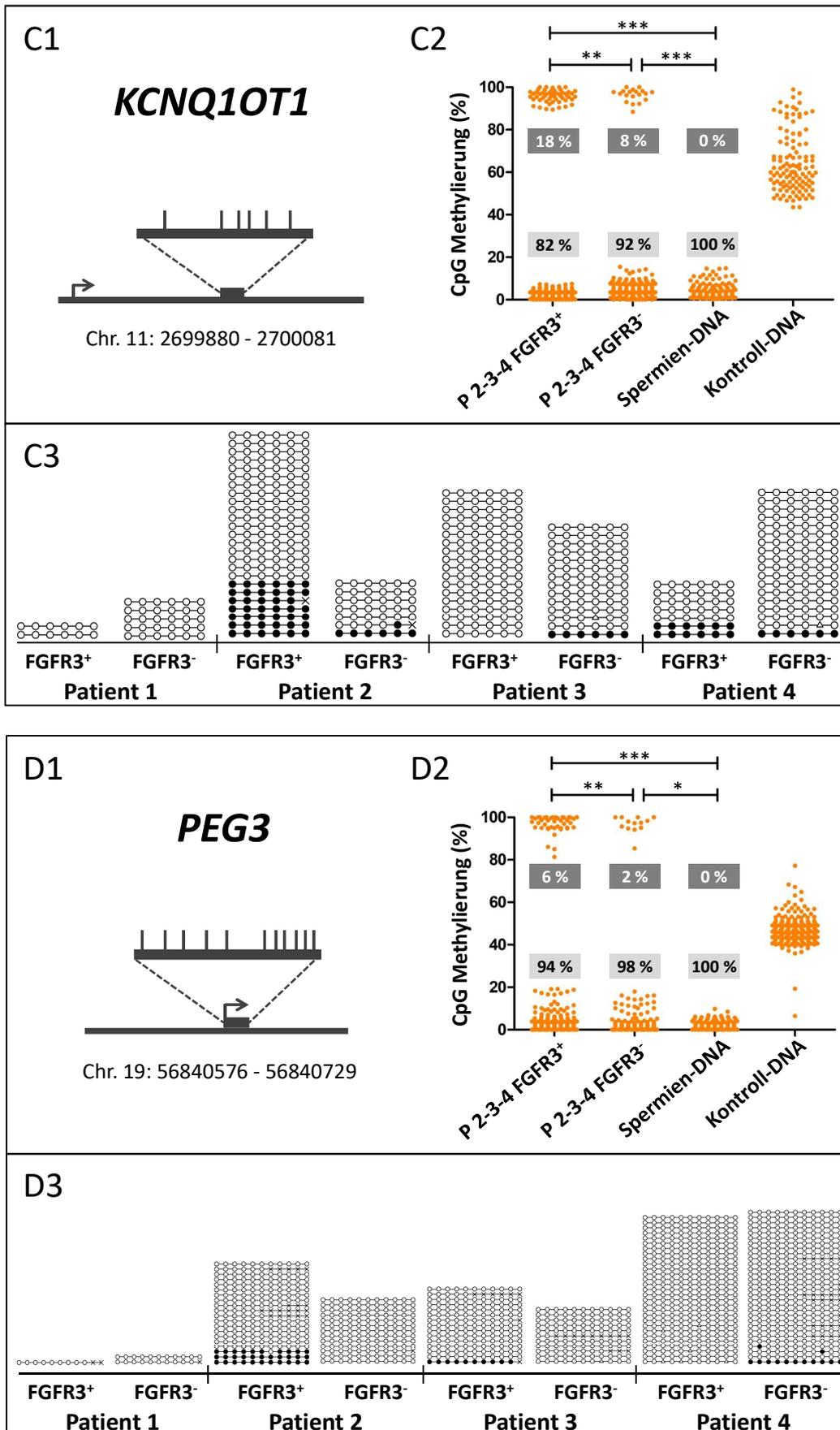


Abbildung 3.1.1 C und D: Methylierungsergebnisse für *KCNQ10T1* und *PEG3*.
Beschreibung siehe Seite 85.

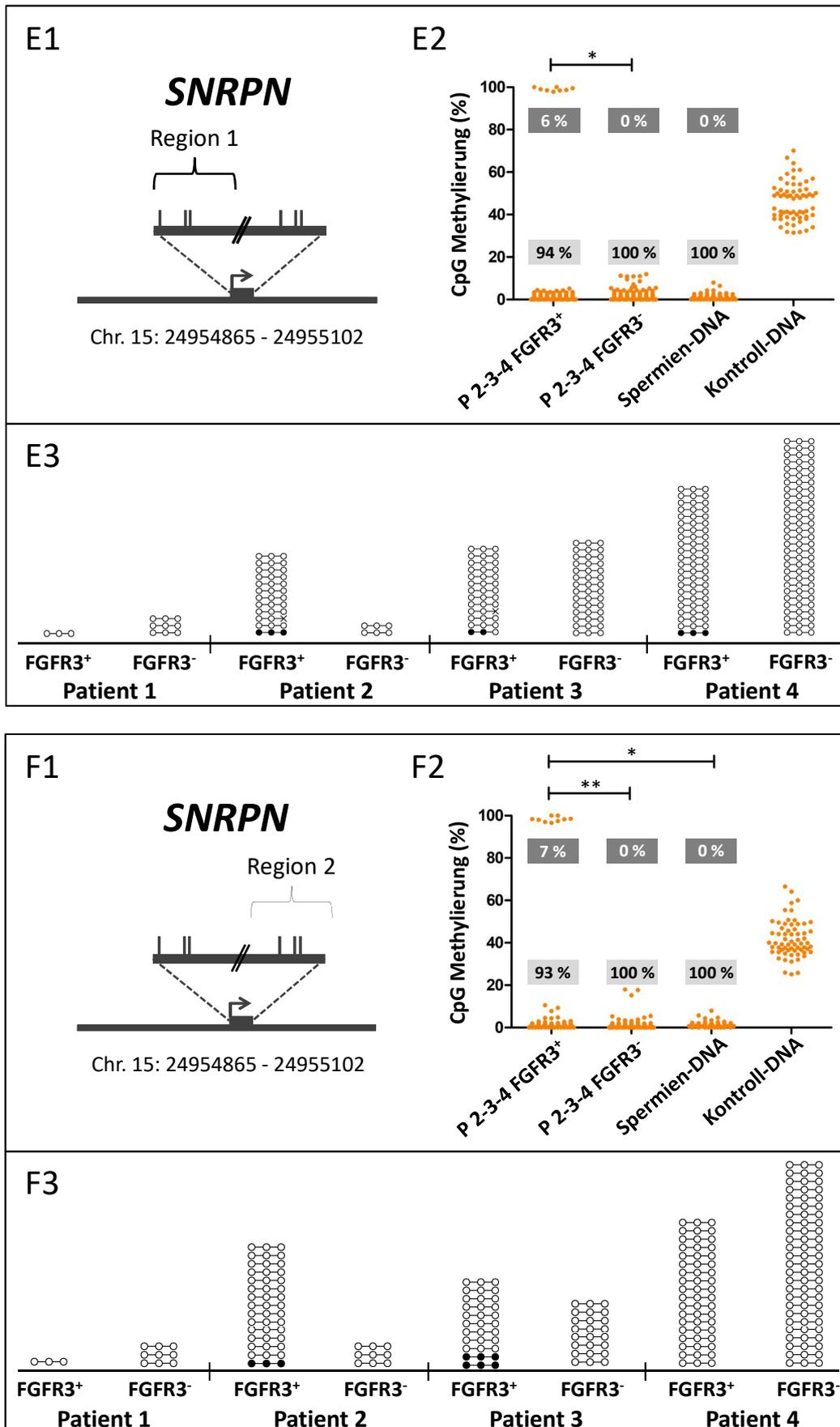


Abbildung 3.1.1 E und F: Methylierungsergebnisse für *SNRPN* Region 1 und 2
Beschreibung siehe Seite 85.

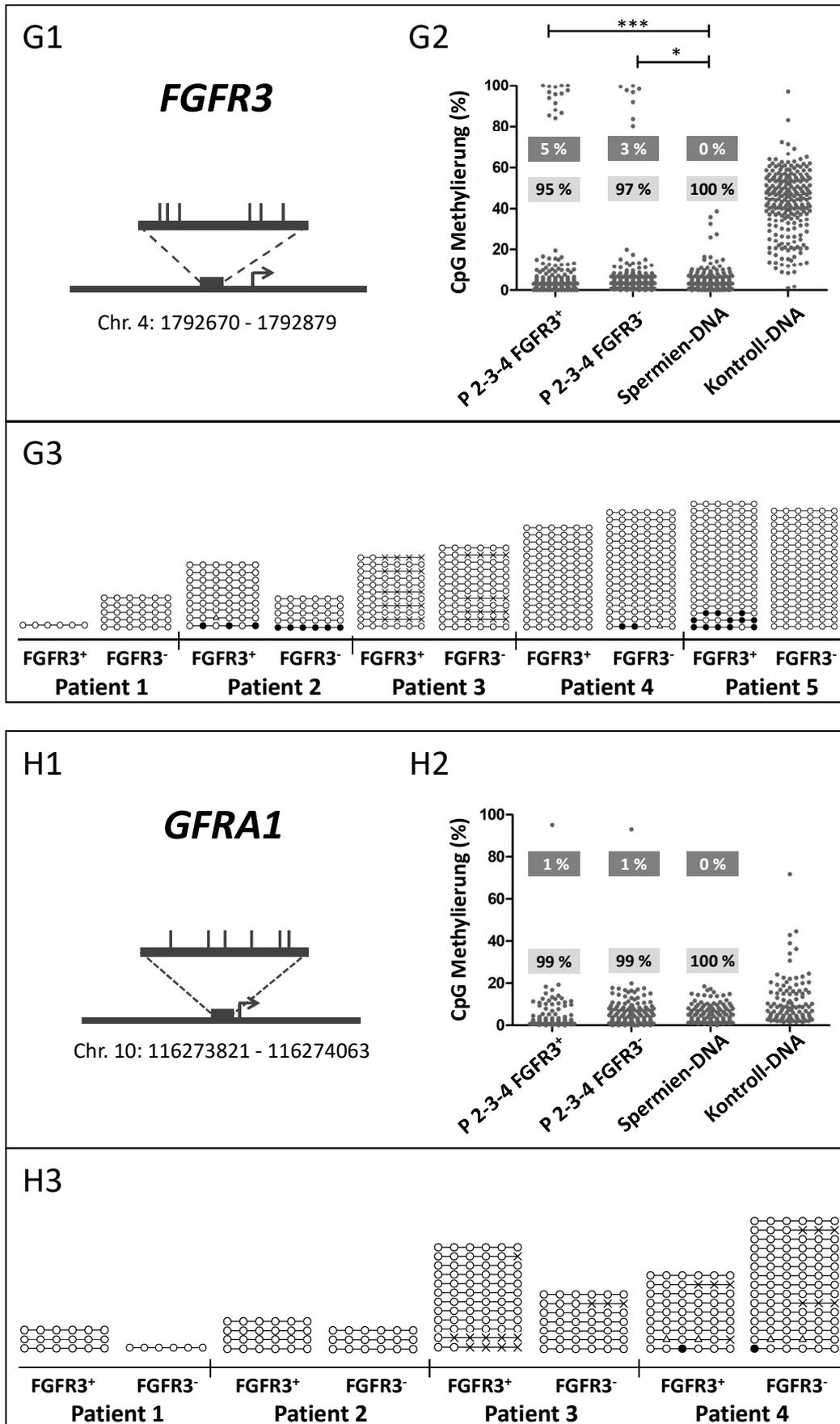


Abbildung 3.1.1 G und H: Methylierungsergebnisse für *FGFR3* und *GFRA1*
 Beschreibung siehe Seite 85.

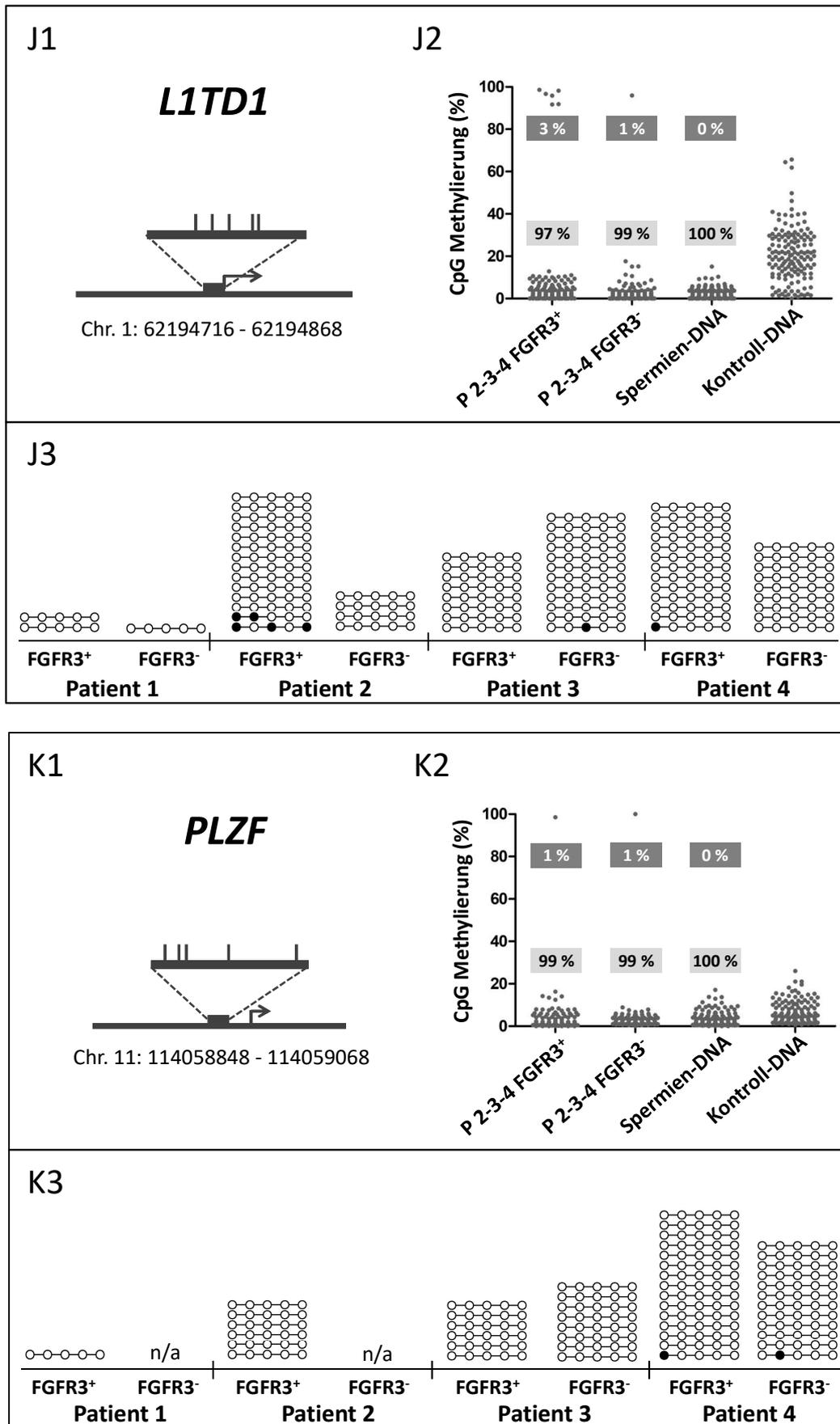


Abbildung 3.1.1 J und K: Methylierungsergebnisse für *L1TD1* und *PLZF*
 Beschreibung siehe Seite 85.

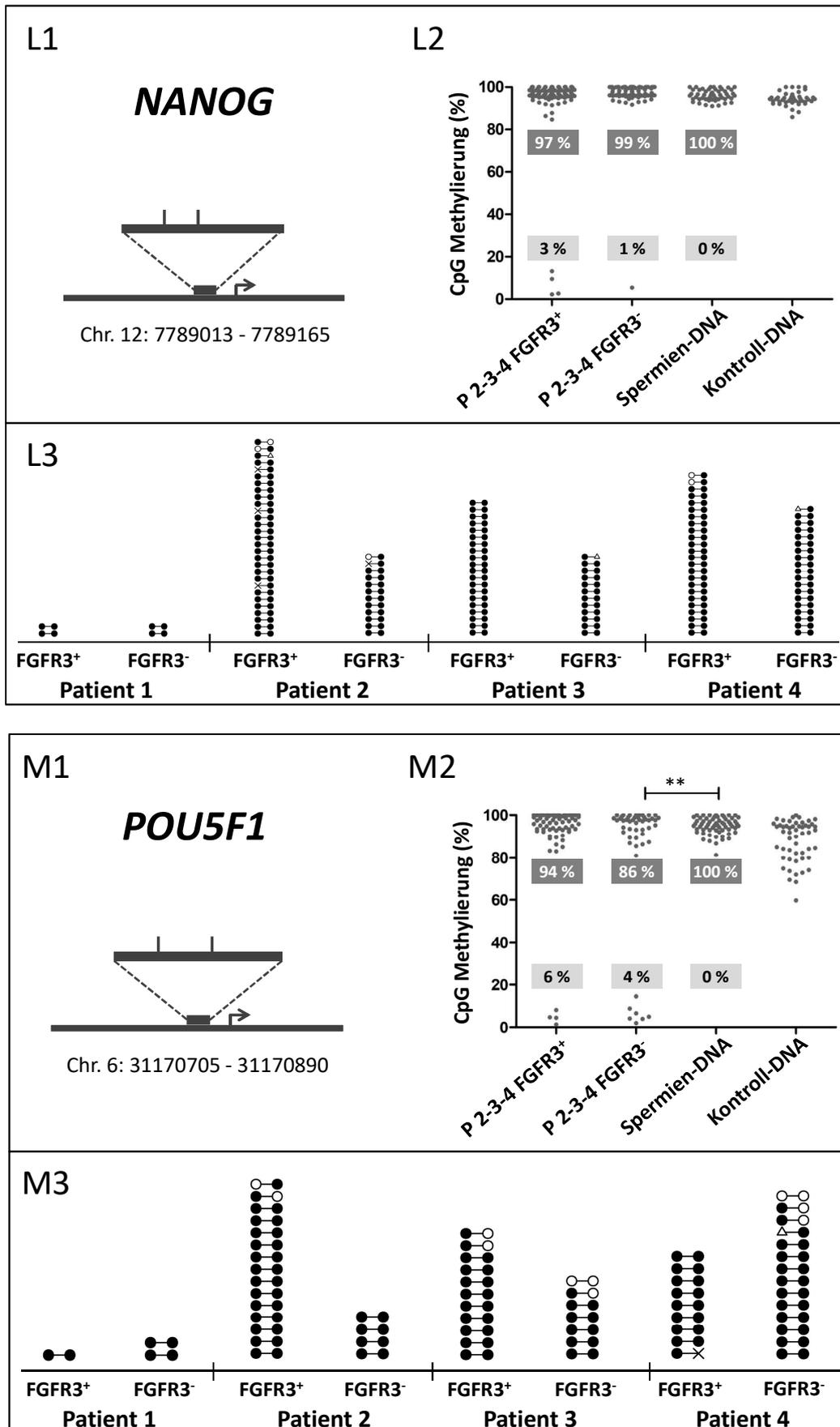


Abbildung 3.1.1 L und M: Methylierungsergebnisse für *NANOG* und *POU5F1*
Beschreibung siehe Seite 85.

Abbildung 3.1.1 A bis M (Seiten 79-84) Methylierungsmuster der Kontroll- und Promotorregionen der paternal geprägten Gene *MEG3* und *H19*, der maternal geprägten Gene *KCNQ10T1*, *PEG3* und *SNPRN*, der SPG-Markergene *FGFR3*, *GFRA1*, *L1TD1* und *PLZF* und der Pluripotenzgene *NANOG* und *POU5F1* von *FGFR3*⁺- und *FGFR3*⁻-SPG im Vergleich zur Methylierung von Spermien und somatischer DNA (Kontroll-DNA). **A1 bis M1: Schema der analysierten genomischen Region (basierend auf „Genome Build GRCh38.p12“), die durch die (*semi-*)*nested* PCR (PCR2) generiert wurde. Das schwarze Rechteck innerhalb des PCR-Produkts repräsentiert die sequenzierte Region, die (durch gestrichelte Linien angedeutet) vergrößert dargestellt wird. Innerhalb der sequenzierten Region werden die untersuchten CpGs durch vertikale Linien visualisiert. Die Region des Transkriptionsstarts des jeweiligen Gens wird durch den Pfeil angedeutet. **A2 bis M2 Streudiagramm:** Die CpG-Methylierung der Patienten 2 - 5 sind für die vier Probengruppen: *FGFR3*⁺-Pools, *FGFR3*⁻-Pools, Spermien-DNA und Kontroll-DNA aufgetragen. Ein Punkt repräsentiert eine CpG. Die Prozentzahlen innerhalb der Boxen geben den relativen Anteil methylierter CpGs (me+, $\geq 80\%$ Methylierung, dunkelgraue Boxen) und unmethylierter CpGs (me-, $\leq 20\%$ Methylierung, hellgraue Boxen) der SPG-Proben und Spermien an. * entspricht $p \leq 0,017$; **: $p \leq 0,003$; ***: $p \leq 0,0003$; nicht signifikant: $p > 0,017$ (ohne Kennzeichnung). **G2:** In den *FGFR3*⁻-Pools und der Spermien-DNA wurden bei *FGFR3* CpGs mit einer Methylierung zwischen 20 und 80 % detektiert, die in der statistischen Analyse nicht berücksichtigt wurden. **A3 bis M3 Methylierungsdiagramm:** Darstellung der Methylierungsergebnisse auf Allel-Ebene für die einzelnen Patienten. Eine horizontale Linie entspricht einem sequenzierten Allel. CpGs mit einer Methylierung $\leq 20\%$ (me-) werden durch weiße Kreise (○), Werte $\geq 80\%$ (me+) durch schwarze Kreise (●), Werte zwischen 20 und 80 % durch Dreiecke (△) und nicht erhobene Werte durch „X“ veranschaulicht.**

Tabelle 3.1.1: Aufstellung der methylierten (me+) und unmethylierten (me-) CpGs

In Abschnitt A) wurden die summierten CpGs der Patienten (P) 2 - 5 inklusive der statistischen Auswertungen nach me+ und me- zusammengefasst. In Abschnitt B) wurden me+ und me- CpGs für jeden einzelnen Patienten aufgelistet. In Abschnitt C) wurden die statistischen Ergebnisse für jeden einzelnen Patienten zusammengetragen. Die statistische Analyse wurde mit dem *Fisher's Exact Test* durchgeführt. Als *post hoc*-Test wurde die Bonferroni-Korrektur verwendet mit folgenden α -Signifikanzniveaus: $p > 0,017$ entspricht nicht signifikant (n.s.); * entspricht $p \leq 0,017$; ** entspricht $p \leq 0,003$ und *** entspricht $p \leq 0,0003$. „n/a“ weist darauf hin, dass keine Daten erhoben wurden.

A: Summierte Anzahl der CpGs der Patienten 2-5 pro Gen und statistischer Vergleich

Absolute Anzahl	MEG3			H19-DMR			KCNQ1OT1			PEG3			SNRPN 1			SNRPN 2			FGFR3			GFRA1			L1TD1			PLZF			NANOG			POU5F1		
	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ			
FGFR3+	271	37	308	157	12	169	53	246	299	42	629	671	8	131	139	9	123	132	15	288	303	1	133	134	6	174	180	1	134	135	138	4	142	65	4	69
FGFR3-	252	13	265	119	11	130	19	212	231	13	542	555	0	135	135	0	108	108	8	287	295	1	138	139	1	124	125	1	99	100	82	1	83	42	7	49
Spermien	110	0	110	104	0	104	0	153	153	0	294	294	0	81	81	0	81	81	0	283	283	0	152	152	0	164	164	0	157	157	50	0	50	62	0	62

Relative Anzahl (%)	MEG3			H19-DMR			KCNQ1OT1			PEG3			SNRPN 1			SNRPN 2			FGFR3			GFRA1			L1TD1			PLZF			NANOG			POU5F1		
	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ			
FGFR3+	88	12	100	93	7	100	18	82	100	6	94	100	6	94	100	7	93	100	5	95	100	1	99	100	3	97	100	1	99	100	97	3	100	94	6	100
FGFR3-	95	5	100	92	8	100	8	92	100	2	98	100	0	100	100	0	100	100	3	97	100	1	99	100	1	99	100	1	99	100	99	1	100	86	14	100
Spermien	100	0	100	100	0	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	100	0	100	100	0	100

Fisher's Exact Test (p-Wert)	MEG3	H19-DMR	KCNQ1OT1	PEG3	SNRPN 1	SNRPN 2	FGFR3	GFRA1	L1TD1	PLZF	NANOG	POU5F1
FGFR3- / FGFR3+	0,0028	0,5276	0,0020	0,0008	0,0071	0,0047	0,2021	1,000	0,2466	1,000	0,654	0,1969
FGFR3+ / Spermien	<0,0001	0,0042	<0,0001	<0,0001	0,0278	0,0143	<0,0001	0,4685	0,0309	0,4623	0,5743	0,1214
FGFR3- / Spermien	0,0129	0,0014	<0,0001	0,0059	1,0000	1,0000	0,0075	0,4777	0,4325	1,0000	1,0000	0,0025

Fortsetzung der Tabelle 3.1.1: Aufstellung der methylierten (me+) und unmethylierten (me-) CpGs

B: Anzahl der CpGs pro Gen und Patient (P)

Absolute Anzahl	MEG3			H19-DMR			KCNQ1OT1			PEG3			SNRPN 1			SNRPN 2			FGFR3			GFRA1			L1TD1			PLZF			NANOG			POU5F1		
	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ			
P1 FGFR3+	20	0	20	n/a	n/a		0	12	12	0	9	9	0	3	3	0	3	3	0	6	6	0	18	18	0	10	10	n/a	n/a		4	0	4	2	0	2
P1 FGFR3-	5	10	15	n/a	n/a		0	30	30	0	20	20	0	9	9	0	9	9	0	30	30	0	6	6	0	6	6	0	5	5	4	0	4	4	0	4
P2 FGFR3+	47	3	50	n/a	n/a		41	108	149	32	169	201	3	32	35	3	42	45	3	50	53	0	24	24	5	65	70	0	30	30	52	2	54	28	2	30
P2 FGFR3-	46	1	47	n/a	n/a		7	34	41	0	142	142	0	6	6	0	9	9	6	24	30	0	18	18	0	20	20	n/a	n/a		22	1	23	8	0	8
P3 FGFR3+	109	21	130	n/a	n/a		0	108	108	10	147	157	2	36	38	6	27	33	0	46	46	0	62	62	0	45	45	0	30	30	40	0	40	20	2	22
P3 FGFR3-	92	2	94	n/a	n/a		6	77	83	0	108	108	0	42	42	0	24	24	0	56	56	0	39	39	1	59	60	0	40	40	23	0	23	11	3	14
P4 FGFR3+	115	13	128	92	0	92	12	30	42	0	313	313	3	63	66	0	54	54	0	90	90	1	47	48	1	64	65	1	74	75	46	2	48	17	0	17
P4 FGFR3-	114	10	124	60	8	68	6	101	107	13	292	305	0	87	87	0	75	75	2	99	101	1	81	82	0	45	45	1	59	60	37	0	37	23	4	27
P5 FGFR3+	n/a	n/a		65	12	77	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		12	102	114	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a	
P5 FGFR3-	n/a	n/a		59	3	62	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		0	108	108	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a	
Spermien	110	0	110	104	0	104	0	153	153	0	294	294	0	81	81	0	81	81	0	283	283	0	152	152	0	164	164	0	157	157	50	0	50	62	0	62

Relative Anzahl (%)	MEG3			H19-DMR			KCNQ1OT1			PEG3			SNRPN 1			SNRPN 2			FGFR3			GFRA1			L1TD1			PLZF			NANOG			POU5F1		
	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ			
P1 FGFR3+	100	0	100	n/a	n/a		0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	n/a	n/a		100	0	100	100	0	100
P1 FGFR3-	33	67	100	n/a	n/a		0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	100	0	100	100	0	100
P2 FGFR3+	94	6	100	n/a	n/a		28	72	100	16	84	100	9	91	100	7	93	100	6	94	100	0	100	100	7	93	100	0	100	100	96	4	100	93	7	100
P2 FGFR3-	98	2	100	n/a	n/a		17	83	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	20	80	100	0	100	100	0	100	100	n/a	n/a		96	4	100	100	0	100
P3 FGFR3+	84	16	100	n/a	n/a		0	100	100	6	94	100	5	95	100	18	82	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	100	0	100	91	9	100
P3 FGFR3-	98	2	100	n/a	n/a		7	93	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	2	98	100	0	100	100	100	0	100	79	21	100
P4 FGFR3+	90	10	100	100	0	100	29	71	100	0	100	100	5	95	100	0	100	100	0	100	100	2	98	100	2	98	100	1	99	100	96	4	100	100	0	100
P4 FGFR3-	92	8	100	88	12	100	6	94	100	4	96	100	0	100	100	0	100	100	2	98	100	1	99	100	0	100	100	2	98	100	100	0	100	85	15	100
P5 FGFR3+	n/a	n/a		84	16	100	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		11	89	100	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a	
P5 FGFR3-	n/a	n/a		95	5	100	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		0	100	100	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a	
Spermien	100	0	100	100	0	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	157	100	100	0	100	100	0	100

Fortsetzung der Tabelle 3.1.1: Aufstellung der methylierten (me+) und unmethylierten (me-) CpGs

C: Statistischer Vergleich für die Patienten (P) 2 - 4, p-Werte mittels Fisher's Exact Test

	<i>MEG3</i>	<i>H19-DMR</i>	<i>KCNQ1OT1</i>	<i>PEG3</i>	<i>SNRPN 1</i>	<i>SNRPN 2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>GFRA1</i>	<i>L1TD1</i>	<i>PLZF</i>	<i>NANOG</i>	<i>POU5F1</i>
P2 FGFR3+ / FGFR3-	0,6178	n/a	0,2242	<0,0001	1,0000	1,0000	0,0653	1,0000	0,5827	n/a	1,0000	1,0000
P2 FGFR3+ / Spermien	0,0293	n/a	0,0001	<0,0001	0,0258	0,0436	0,0037	1,0000	0,0205	1,0000	0,4959	0,1039
P2 FGFR3- / Spermien	0,2994	n/a	<0,0001	1,0000	1,0000	1,0000	<0,0001	1,0000	1,0000	n/a	0,3151	1,0000
P3 FGFR3+ / FGFR3-	0,0005	n/a	0,0061	0,0064	0,2225	0,0342	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3566
P3 FGFR3+ / Spermien	<0,0001	n/a	1,0000	0,0007	0,1001	0,0034	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0663
P3 FGFR3- / Spermien	0,2111	n/a	0,0017	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2679	1,0000	1,0000	0,0052
P4 FGFR3+ / FGFR3-	0,6636	0,0008	0,0003	<0,0001	0,0782	1,0000	0,4990	1,0000	1,0000	1,0000	0,5025	0,1468
P4 FGFR3+ / Spermien	0,0003	1,0000	<0,0001	1,0000	0,0882	1,0000	1,0000	0,2400	0,2838	0,3233	0,2373	1,0000
P4 FGFR3- / Spermien	0,0019	0,0005	0,0045	0,0002	1,0000	1,0000	0,0687	0,3504	1,0000	0,2765	1,0000	0,0072
P5 FGFR3+ / FGFR3-	n/a	0,0546	n/a	n/a	n/a	n/a	0,0004	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
P5 FGFR3+ / Spermien	n/a	<0,0001	n/a	n/a	n/a	n/a	<0,0001	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
P5 FGFR3- / Spermien	n/a	0,0505	n/a	n/a	n/a	n/a	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabelle 3.1.2: Aufstellung der methylierten (me+) und unmethylierten (me-) Allele

In Abschnitt A) wurden die summierten Allele der Patienten 2 - 5 inklusive der statistischen Auswertungen nach me+ und me- zusammengefasst. In Abschnitt B) wurden die me+ und me- Allele für jeden einzelnen Patienten aufgelistet. In Abschnitt C wurden die statistischen Ergebnisse für jeden einzelnen Patienten zusammengetragen. Die statistische Analyse wurde mit dem *Fisher's Exact Test* durchgeführt. Als *post hoc*-Test wurde die Bonferroni-Korrektur verwendet mit folgenden α -Signifikanzniveaus: $p > 0,017$ entspricht nicht signifikant (n.s.); * entspricht $p \leq 0,017$; ** entspricht $p \leq 0,003$ und *** entspricht $p \leq 0,0003$. In Abschnitt D wurde die durchschnittliche Methylierung der Spermien- und Kontroll-DNA pro Genassay zusammengetragen inklusive der Anzahl der technischen Replikate (TRs).

A: Summierte Anzahl der me+ und me- Allele der Patienten 2-5 pro Gen und statistischer Vergleich

Absolute Anzahl	MEG3			H19-DMR			KCNQ1OT1			PEG3			SNRPN 1			SNRPN 2			FGFR3			GFRA1			L1TD1			PLZF			NANOG			POU5F1					
	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ						
FGFR3+	58	5	63	57	2	59	9	41	50	4	60	64	3	44	47	3	41	44	3	51	54	0	25	25	1	35	36	0	27	27				75			36		
FGFR3-	55	0	55	42	3	45	3	36	39	1	53	54	0	45	45	0	36	36	1	51	52	0	25	25	0	25	25	0	20	20				45			27		
Spermien	22	0	22	38	0	38	0	19	19	0	27	27	0	27	27	0	27	27	0	51	51	0	26	26	0	28	28	0	32	32									

Relative Anzahl (%)	MEG3			H19-DMR			KCNQ1OT1			PEG3			SNRPN 1			SNRPN 2			FGFR3			GFRA1			L1TD1			PLZF			NANOG			POU5F1					
	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ						
FGFR3+	92	8	100	97	3	100	18	82	100	6	94	100	6	94	100	7	93	100	6	94	100	0	100	100	3	97	100	0	100	100									
FGFR3-	100	0	100	93	7	100	8	92	100	2	98	100	0	100	100	0	100	100	2	98	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100									
Spermien	100	0	100	100	0	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100									

Fisher's Exact Test (p-Wert)	MEG3	H19-DMR	KCNQ1OT1	PEG3	SNRPN 1	SNRPN 2	FGFR3	GFRA1	L1TD1	PLZF	NANOG	POU5F1
FGFR3+ / FGFR3-	0,0601	0,6500	0,2160	0,3734	0,2421	0,2481	0,6180	1,0000	1,0000	1,0000		
FGFR3+ / Spermien	0,3208	0,5185	0,0548	0,3143	0,2953	0,2829	0,2439	1,0000	1,0000	1,0000		
FGFR3- / Spermien	1,0000	0,2463	0,5437	1,0000	1,0000	1,0000	0,2434	1,0000	1,0000	1,0000		

Fortsetzung der Tabelle 3.1.2: Aufstellung der methylierten (me+) und unmethylierten (me-) Allele

B: Anzahl der me+ und me- Allele pro Gen und Patient (P)

Absolute Anzahl	MEG3			H19-DMR			KCNQ1OT1			PEG3			SNRPN 1			SNRPN 2			FGFR3			GFRA1			L1TD1			PLZF			NANOG			POU5F1		
	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ			
P1 FGFR3+	4	0	4	n/a	n/a		0	2	2	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	3	3	0	2	2	0	1	1			2			1
P1 FGFR3-	2	1	3	n/a	n/a		0	5	5	0	2	2	0	3	3	0	3	3	0	5	5	0	1	1	0	1	1	n/a	n/a				2			2
P2 FGFR3+	10	0	10	n/a	n/a		7	18	25	3	17	20	1	11	12	1	14	15	1	8	9	0	4	4	1	13	14	0	6	6			29			15
P2 FGFR3-	10	0	10	n/a	n/a		1	6	7	0	13	13	0	2	2	0	3	3	1	4	5	0	3	3	0	4	4	n/a	n/a				12			4
P3 FGFR3+	23	4	27	n/a	n/a		0	18	18	1	14	15	1	12	13	2	9	11	0	11	11	0	12	12	0	9	9	0	6	6			20			11
P3 FGFR3-	19	0	19	n/a	n/a		1	13	14	0	11	11	0	14	14	0	8	8	0	12	12	0	7	7	0	12	12	0	8	8			12			7
P4 FGFR3+	25	1	26	31	0	31	2	5	7	0	29	29	1	21	22	0	18	18	0	15	15	0	9	9	0	13	13	0	15	15			24			9
P4 FGFR3-	26	0	26	22	2	24	1	17	18	1	29	30	0	29	29	0	25	25	0	17	17	0	15	15	0	9	9	0	12	12			19			14
P5 FGFR3+	n/a	n/a		26	2	28	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		2	17	19	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a							
P5 FGFR3-	n/a	n/a		20	1	21	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		0	18	18	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a							
Spermien	22	0	22	38	0	38	0	19	19	0	27	27	0	27	27	0	27	27	0	51	51	0	26	26	0	28	28	0	32	32			25			31

Relative Anzahl (%)	MEG3			H19-DMR			KCNQ1OT1			PEG3			SNRPN 1			SNRPN 2			FGFR3			GFRA1			L1TD1			PLZF			NANOG			POU5F1		
	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ	me+	me-	Σ			
P1 FGFR3+	100	0	100	n/a	n/a		0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100						
P1 FGFR3-	67	33	100	n/a	n/a		0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	n/a	n/a							
P2 FGFR3+	100	0	100	n/a	n/a		28	72	100	15	85	100	8	92	100	7	93	100	11	89	100	0	100	100	7	93	100	0	100	100						
P2 FGFR3-	100	0	100	n/a	n/a		14	86	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	20	80	100	0	100	100	0	100	100	n/a	n/a							
P3 FGFR3+	85	15	100	n/a	n/a		0	100	100	7	93	100	8	92	100	18	82	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100						
P3 FGFR3-	100	0	100	n/a	n/a		7	93	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100						
P4 FGFR3+	96	4	100	100	0	100	29	71	100	0	100	100	5	95	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100						
P4 FGFR3-	100	0	100	92	8	100	6	94	100	3	97	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100						
P5 FGFR3+	n/a	n/a	100	93	7	100	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		11	89	100	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a							
P5 FGFR3-	n/a	n/a	100	95	5	100	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a		0	100	100	n/a	n/a		n/a	n/a		n/a	n/a							
Spermien	100	0	100	100	0	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	157	100						

Fortsetzung der Tabelle 3.1.2: Aufstellung der methylierten (me+) und unmethylierten (me-) Allele

C: Statistischer Vergleich für die Patienten (P) 2 - 4, p-Werte mittels Fisher's Exact Test

	<i>MEG3</i>	<i>H19-DMR</i>	<i>KCNQ1OT1</i>	<i>PEG3</i>	<i>SNRPN 1</i>	<i>SNRPN 2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>GFRA1</i>	<i>L1TD1</i>	<i>PLZF</i>	<i>NANOG</i>	<i>POU5F1</i>
P2 FGFR3- / FGFR3+	1,0000	n/a	0,6464	0,2614	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	n/a		
P2 FGFR3+ / Spermien	1,0000	n/a	0,0139	0,0703	0,3077	0,3571	0,1500	1,0000	0,3333	1,0000		
P2 FGFR3- / Spermien	1,0000	n/a	0,2692	1,0000	1,0000	1,0000	0,0893	1,0000	1,0000	n/a		
P3 FGFR3- / FGFR3+	0,1313	n/a	0,4375	1,0000	0,4815	0,4854	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		
P3 FGFR3+ / Spermien	0,1174	n/a	1,0000	0,3571	0,3250	0,0782	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		
P3 FGFR3- / Spermien	1,0000	n/a	0,4242	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		
P4 FGFR3- / FGFR3+	1,0000	0,1859	0,1796	1,0000	0,4314	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		
P4 FGFR3+ / Spermien	1,0000	1,0000	0,0646	1,0000	0,4490	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		
P4 FGFR3- / Spermien	1,0000	0,1460	0,4865	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		
P5 FGFR3- / FGFR3+	n/a	1,0000	n/a	n/a	n/a	n/a	1,0000	n/a	n/a	n/a		
P5 FGFR3+ / Spermien	n/a	0,1762	n/a	n/a	n/a	n/a	1,0000	n/a	n/a	n/a		
P5 FGFR3- / Spermien	n/a	0,3559	n/a	n/a	n/a	n/a	1,0000	n/a	n/a	n/a		

Fortsetzung der Tabelle 3.1.2: Aufstellung der methylierten (me+) und unmethylierten (me-) Allele

D: Durchschnittliche Methylierung (%) der Spermien- und Kontroll-DNA und Anzahl der technischen Replikate (TRs)

	<i>MEG3</i>	<i>H19-DMR</i>	<i>KCNQ1OT1</i>	<i>PEG3</i>	<i>SNRPN 1</i>	<i>SNRPN 2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>GFRA1</i>	<i>L1TD1</i>	<i>PLZF</i>	<i>NANOG</i>	<i>POU5F1</i>
Spermien Methylierung	93%	99%	4%	2%	1%	1%	4%	5%	3%	3%	96%	95%
Spermien Anzahl TRs	22	38	27	27	27	27	48	26	33	32	25	31
Kontroll-DNA Methylierung	58%	33%	64%	47%	46%	42%	43%	11%	21%	7%	94%	88%
Kontroll-DNA Anzahl TRs	20	37	19	22	21	21	39	19	29	26	21	26

3.2 Projekt 2: Der Einfluss von ELS auf TSC

3.2.1 Etablierungsphase

Das für diese Arbeit verwendete ELS-Paradigma wurde von Gunn et al. (2013) und Rice et al. (2008) adaptiert und nun am Standort Mainz zunächst mit wildtypischen C57BL/6J-Mäusen etabliert (Gunn et al., 2013; Rice et al., 2008). Zur Validierung des Paradigmas wurden das maternale Verhalten während der ELS-Phase (P3 bis P8), die Corticosteron (CORT)-Konzentration im Blutserum und das Körpergewicht der Nachkommen von ELS- und Kontrollmüttern untersucht. Mögliche Auswirkungen von ELS auf die Nachkommen wurden anschließend durch Verhaltenstests analysiert. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Nachkommen von ELS- und Kontrollmüttern getestet. Da nach statistischer Prüfung keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt wurden (die Ergebnisse werden hier nicht gezeigt), wurden die Ergebnisse beider Geschlechter für die ELS-Gruppe und die Kontrollgruppe im Folgenden zusammengefasst. In Tabelle 3.2.1 wurde die Anzahl der Nachkommen zusammengetragen.

Tabelle 3.2.1: Aufstellung der generierten Nachkommen (Etablierungsphase)

Die Nachkommen, die während der Etablierungsphase generiert wurden, sind nach *Batch*, Bedingung (Kontroll- /ELS-Mäuse) und Geschlecht aufgelistet. *Batch* E3 wurde vor der Geschlechtsbestimmung für CORT-Analysen verwendet.

Etablierungsphase

<i>Batch</i>	Kontrollen		ELS	
	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
E1	10	6	8	6
E2	5	2	7	6
E3	12		14	
Summe	35		41	

3.2.1.1 Maternales Verhalten während der ELS-Phase

Während der ELS-Phase vom postnatalen Tag (P) P2 - P9 wurde quantifiziert, wie häufig ELS- und Kontrollmütter das Nest und folglich den Wurf verlassen hatten. Dazu wurden von 7 Kontrollmüttern und 6 ELS-Müttern 30-minütige Videoaufzeichnungen von P3 - P8 ausgewertet, zwei während der Lichtphase und eine während der Dunkelphase. Es wurde erhoben, wie häufig die Mütter das Nest und folglich ihren Wurf verließen. Im Durchschnitt verließen ELS-Mütter (6 Tiere: $11,75 \pm 6,482$) signifikant häufiger das Nest als Kontrollmütter (7 Tiere: $5,429 \pm 2,605$) ($t(76) = 5,802$, $p < 0,0001$) (Abbildung 3.2.1).

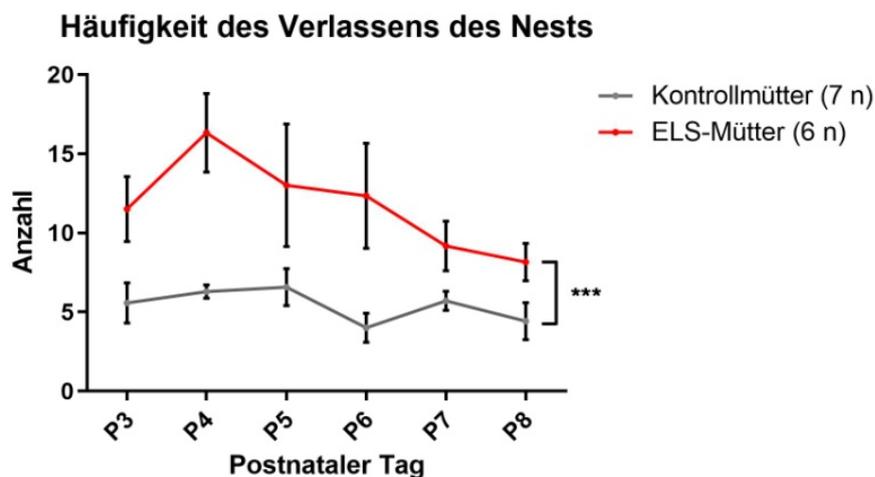


Abbildung 3.2.1: Maternales Verhalten (Etablierungsphase)

Während der ELS-Phase wurde vom postnatalen Tag (P) 3 bis P8 quantifiziert, wie häufig ELS- und Kontrollmütter das Nest und somit ihren Wurf verließen (keine Interaktion mit den Nachkommen). Im Durchschnitt verließen ELS-Mütter während der ELS-Phase signifikant häufiger das Nest als Kontrollmütter ($p < 0,0001$). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

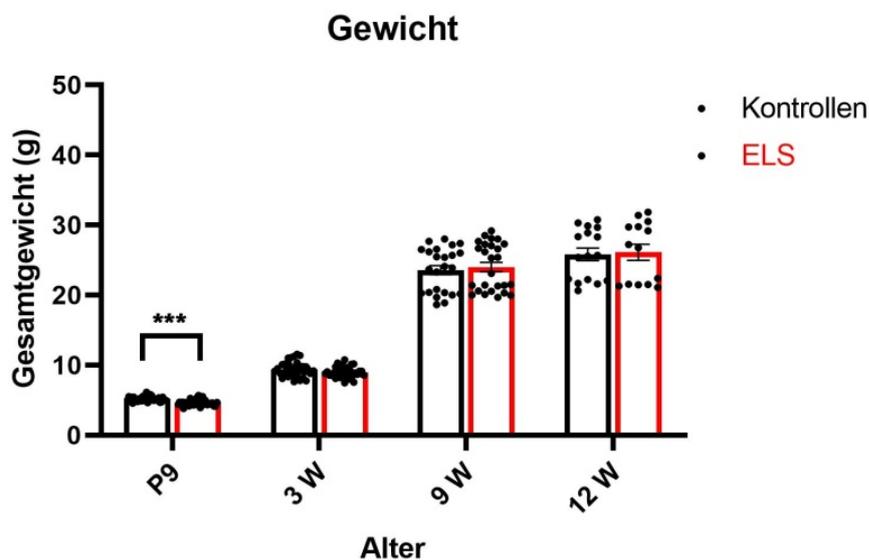
3.2.1.2 Gewichtsmessungen

Im Alter von 9 Tagen sowie 3, 6 und 9 Wochen wurde das Gewicht von den Nachkommen der ELS- und Kontrollmütter quantifiziert. Im Alter von 9 Tagen, unmittelbar nach Beendigung der ELS-Phase, wogen ELS-Nachkommen signifikant weniger als Kontrollnachkommen ($p < 0,0001$). Während im Alter von 3 Wochen ein Trend ($p = 0,0531$) vorlag, dass ELS-Tiere weniger wogen, lag mit fortschreitendem Alter kein Gewichtsunterschied mehr vor (Tabelle 3.2.2 und Abbildung 3.2.2).

Tabelle 3.2.2: Gewichtsmessung (Etablierungsphase)

Durchschnittliches Gewicht von ELS- und Kontrolltieren zu verschiedenen Lebenszeitpunkten und statistische Auswertung ($t \triangleq t$ -Verteilung, $df \triangleq$ Freiheitsgrade).

Alter	Gruppe	Anzahl (n)	Mittelwert (Gramm)	Standardabweichung	t;df	p-Wert
P9	Kontrollen	40	5,24	0,36	t=6,949;df=79	<0,0001
	ELS	41	4,65	0,40		
3 Wochen	Kontrollen	37	9,40	1,04	t=1,966;df=72	0,0531
	ELS	37	8,98	0,77		
9 Wochen	Kontrollen	24	23,60	3,17	t=0,4616;df=48	0,6464
	ELS	26	24,03	3,37		
12 Wochen	Kontrollen	16	25,84	3,65	t=0,2049;df=28	0,8391
	ELS	14	26,14	4,32		

**Abbildung 3.2.2: Gewichtsmessungen (Etablierungsphase)**

Gesamtgewicht von ELS- und Kontrollnachkommen zu verschiedenen Altersstufen. Unmittelbar nach Beenden der ELS-Phase am postnatalen Tag (P) 9 wogen ELS-Nachkommen signifikant weniger als Nachkommen von Kontrollmüttern ($p < 0,0001$). Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Ein Punkt repräsentiert das Gewicht eines Tiers. W \triangleq Wochen.

3.2.1.3 CORT-Konzentration

Im Alter von 9 Tagen sowie von 3 und 8 Wochen wurde die Corticosteron (CORT)-Konzentration im Blutserum von ELS- und Kontrollnachkommen gemessen. Es wurde kein Unterschied in der CORT-Konzentration in 9 Tage alten Mäusen festgestellt. Im Alter von 3 und 8 Wochen war die CORT-Konzentration von ELS-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant höher (3 Wochen: $p = 0,0058$; 8 Wochen: $p = 0,0361$) (Tabelle 3.2.3 und Abbildung 3.2.3).

Tabelle 3.2.3: Ergebnisse der CORT-Messungen (Etablierungsphase)

Aufstellung der durchschnittlichen CORT-Konzentration im Blut von ELS- und Kontrolltieren zu verschiedenen Lebenszeitpunkten und statistische Auswertung ($t \triangleq$ t-Verteilung, $df \triangleq$ Freiheitsgrade).

Alter	Gruppe	Anzahl (n)	Mittelwert (pg/ml)	Standardabweichung	t;df	p-Wert
P9	Kontrollen	3	4,25	2,06	t=1,124;df=5	0,3122
	ELS	4	9,14	7,15		
3 Wochen	Kontrollen	3	60,80	11,23	t=4,609;df=5	0,0058
	ELS	4	123,50	21,08		
8 Wochen	Kontrollen	4	26,46	11,31	t=2,588;df=7	0,0361
	ELS	5	53,23	17,90		

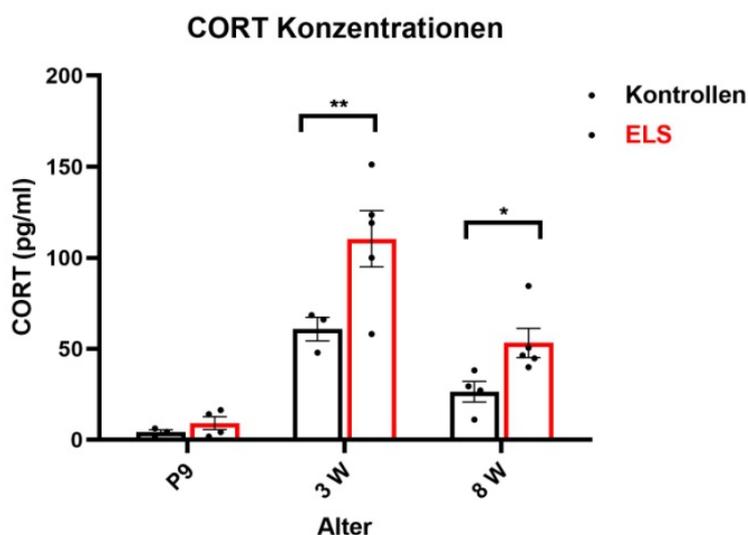


Abbildung 3.2.3: Ergebnisse der CORT-Messungen (Etablierungsphase)

Durchschnittliche CORT-Konzentration im Blut von ELS- und Kontrollnachkommen im Alter von 9 Tagen sowie von 3 und 8 Wochen (W). ELS-Nachkommen hatten signifikant höhere CORT-Konzentrationen im Serum als gleichaltrige Kontrolltiere im Alter von 3 Wochen ($p = 0,0058$) und 8 Wochen ($p = 0,0361$). Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Ein Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Tiers.

3.2.1.4 24 Stunden-NORT

In diesem Versuch wurde das Langzeitgedächtnis von zwei verschiedenen Gruppen (*Batches*) im Alter von 8 und 14 Wochen analysiert. Es wurde kein Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich der Präferenz (abgeleitet durch den Diskriminierungsindex, DI) für das neue Objekt oder der Erkundungsdauer (Erkundungszeit, EZ) von beiden gezeigten Objekten festgestellt (Tabelle 3.2.4 und Abbildung 3.2.4).

Tabelle 3.2.4: Ergebnisse des 24 Std.-NORTs (Etablierungsphase)

Durchschnittliche Werte für den DI und die EZ des 24 Std.-NORTs von zwei verschiedenen alten *Batches* und Ergebnisse des statistischen Vergleichs ($t \triangleq$ t-Verteilung, $df \triangleq$ Freiheitsgrade).

DI

Alter	Gruppe	Anzahl (n)	DI	Standardabweichung	t;df	p-Wert
8 Wochen	Kontrollen	7	0,56	0,10	t=0,3029;df=18	0,7654
	ELS	13	0,58	0,16		
14 Wochen	Kontrollen	16	0,62	0,22	t=0,4387;df=28	0,6643
	ELS	14	0,65	0,14		

EZ

Alter	Gruppe	Anzahl (n)	EZ (Sek.)	Standardabweichung	t;df	p-Wert
8 Wochen	Kontrollen	7	18,27	6,14	t=0,1440;df=18	0,8871
	ELS	13	17,71	9,19		
14 Wochen	Kontrollen	16	27,28	17,10	t=0,8085;df=28	0,4256
	ELS	14	23,19	8,69		

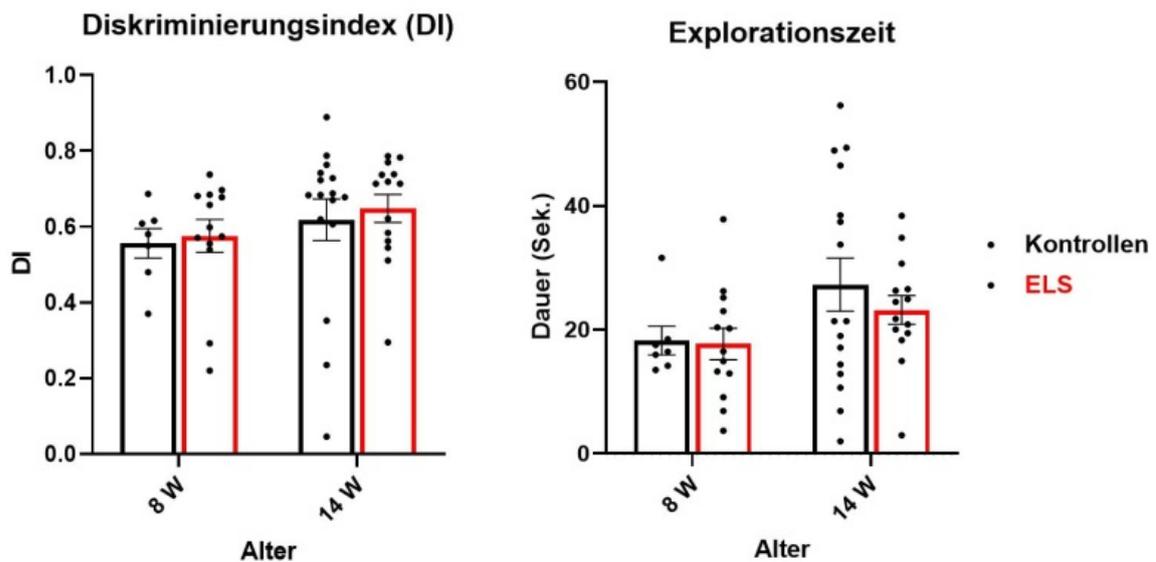


Abbildung 3.2.4: Ergebnisse des 24 Std.-NORTs (Etablierungsphase)

Zwei *Batches* im Alter von 8 und 14 Wochen (W) wurden auf ihr Langzeitgedächtnis (24 Stunden) getestet. Es bestand kein Unterschied zwischen ELS- und Kontrollmäusen hinsichtlich des DI oder der EZ. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Ein Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Tiers.

3.2.1.5 7 Tage-NORT

Nachdem zwischen den beiden getesteten *Batches* im 24 Std.-NORT kein Unterschied festgestellt wurde, wurden diese Mäuse anschließend im 7 Tage-NORT untersucht. Die *Batches* waren 9 und 16 Wochen alt. Die statistische Analyse ergab bezüglich des DI keinen Unterschied zwischen ELS- oder Kontrollmäusen. Hinsichtlich der EZ fanden sich ein Trend ($p = 0,0628$) bei 9 Wochen alten Tieren und ein signifikanter Unterschied bei 16 Wochen alten Tieren ($p = 0,0437$), die zeigten, dass ELS-Mäuse insgesamt weniger Zeit mit der Erkundung beider Objekte verbrachten (Tabelle 3.2.5 und Abbildung 3.2.5).

Tabelle 3.2.5: Ergebnisse des 7 Tage-NORTs (Etablierungsphase)

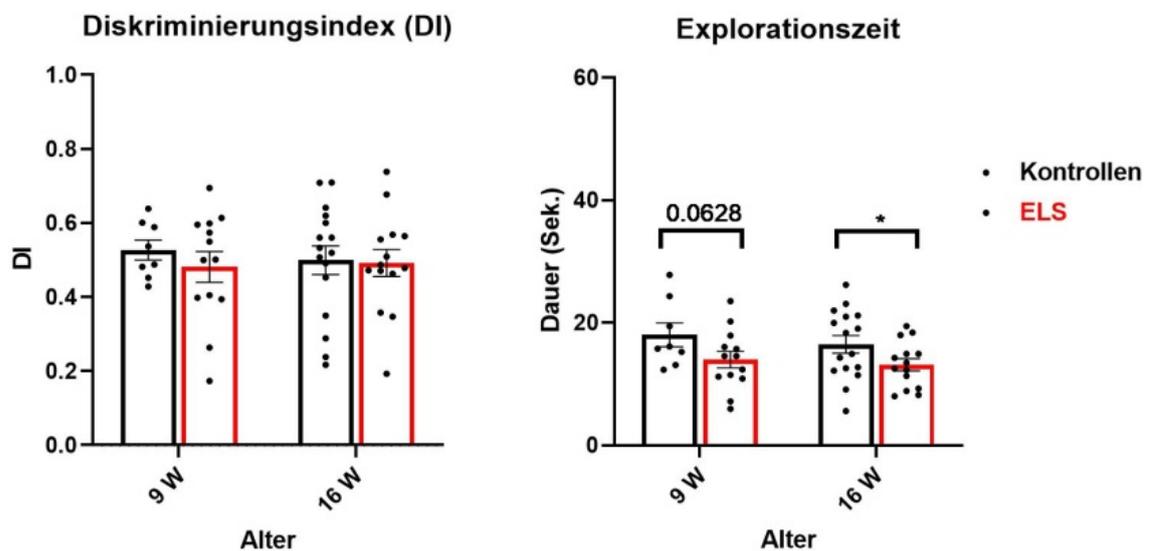
Durchschnittliche Werte für den DI und die EZ im Rahmen des durchgeführten 7 Tage-NORTs von zwei verschiedenen alten Mausgruppen und Ergebnisse der statistischen Auswertung ($t \triangleq$ t-Verteilung, $df \triangleq$ Freiheitsgrade).

DI

Alter	Gruppe	Anzahl (n)	DI	Standardabweichung	t, df	p-Wert
9 Wochen	Kontrollen	8	0,53	0,08	t=0,9019, df=18	0,379
	ELS	12	0,47	0,15		
16 Wochen	Kontrollen	16	0,50	0,15	t=0,5154, df=27	0,6105
	ELS	13	0,47	0,12		

EZ

Alter	Gruppe	Anzahl (n)	EZ (Sek.)	Standardabweichung	t, df	p-Wert
9 Wochen	Kontrollen	8	18,03	5,48	t=1,984, df=18	0,0628
	ELS	12	13,46	4,75		
16 Wochen	Kontrollen	16	16,48	5,70	t=2,117 df=27	0,0437
	ELS	13	12,66	3,47		

**Abbildung 3.2.5: Ergebnisse des 7 Tage-NORTs (Etablierungsphase)**

Im Alter von 16 Wochen (W) verbrachten ELS-Mäuse signifikant weniger Zeit ($p = 0,0437$) mit der Erkundung des bekannten und des neuen Objekts. Ein Trend diesbezüglich wurde für jüngere ELS-Mäuse im Alter von 9 Wochen festgestellt. Die DI-Werte waren in beiden Gruppen beider *Batches* ähnlich. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Ein Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Tiers.

3.2.1.6 Episodisches Gedächtnis-Testbatterie (EGT)

Ein Maus-*Batch* im Alter von 16 Wochen wurde im vierstufigen Test auf das episodische Erinnerungsvermögen untersucht. In allen vier Tests wurde kein Unterschied zwischen der ELS- und der Kontrollgruppe bei den DI-Werten festgestellt. Im Vergleich zu Kontrollmäusen war die EZ beider Objekte im ORT von ELS-Mäusen signifikant geringer ($p = 0,008$) (Tabelle 3.2.6 und Abbildung 3.2.6).

Tabelle 3.2.6: Ergebnisse der Episodisches Gedächtnis-Testbatterie

Durchschnittliche DI- und EZ-Werte der vier absolvierten Tests der EGT-Batterie und Ergebnisse des statistischen Vergleichs zwischen den Gruppen ($t \triangleq t$ -Verteilung, $df \triangleq$ Freiheitsgrade). ORT: *object recognition task*; OPT: *object-place task*; OCT: *object-context task*; OPCT: *object-place-context task*.

Diskriminierungsindex (DI)

Test	Gruppe	Anzahl (n)	DI	Standardabweichung	t;df	p-Wert
ORT	Kontrollen	14	0,51	0,13	t=0,2477;df=26	0,8063
	ELS	14	0,49	0,16		
OPT	Kontrollen	16	0,21	0,34	t=1,329;df=26	0,1955
	ELS	12	0,36	0,25		
OCT	Kontrollen	16	0,50	0,32	t=1,277; df=28	0,2121
	ELS	14	0,36	0,27		
OPCT	Kontrollen	16	0,31	0,23	t=0,1034;df=28	0,9184
	ELS	14	0,32	0,24		

Explorationszeit (EZ)

Test	Gruppe	Anzahl (n)	EZ (Sek.)	Standardabweichung	t;df	p-Wert
ORT	Kontrollen	14	50,10	18,19	t=2,874;df=26	0,0080
	ELS	14	29,16	20,31		
OPT	Kontrollen	16	22,73	8,25	t=1,440;df=28	0,1609
	ELS	12	18,54	7,59		
OCT	Kontrollen	16	30,85	19,36	t=0,9934;df=28	0,3290
	ELS	14	25,29	8,45		
OPCT	Kontrollen	16	10,62	5,23	t=0,9944;df=28	0,3285
	ELS	14	8,79	4,83		

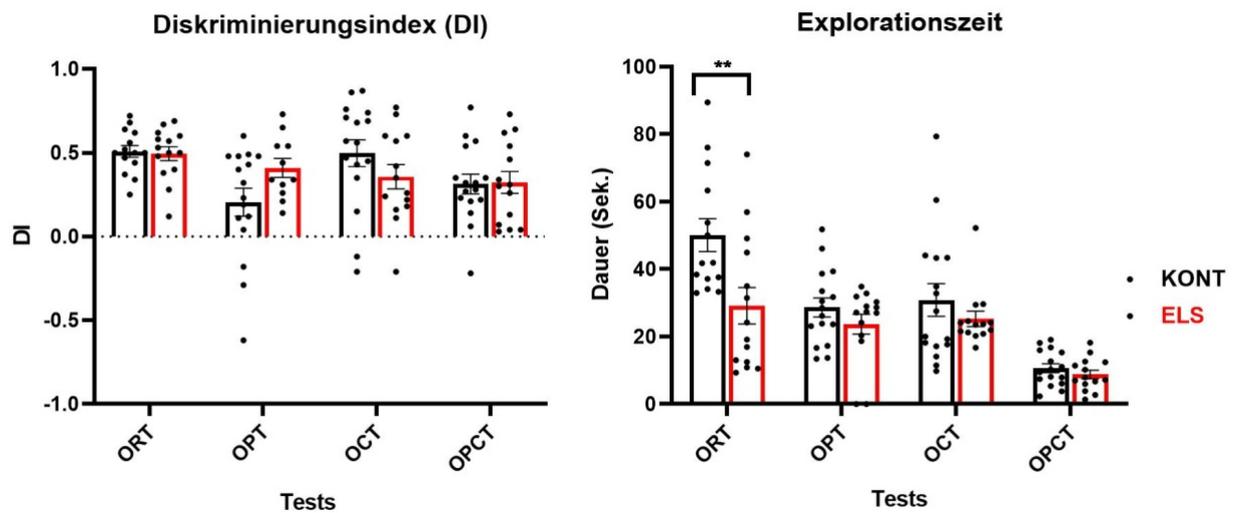


Abbildung 3.2.6: Ergebnisse der Episodisches Gedächtnis-Testbatterie

16 Wochen alte Mäuse wurden in vier aufeinander folgenden Tests der EGT-Batterie auf das episodische Erinnerungsvermögen getestet. Im ersten Test, dem ORT, verbrachten ELS-Mäuse signifikant weniger Zeit ($p = 0,0080$) mit der Erkundung des bekannten und des neuen Objekts, jedoch wurde kein Unterschied hinsichtlich des DI zwischen den Gruppen in keinem der Tests festgestellt. ORT: *object recognition*-Test; OPT: *object-place*-Test; OCT: *object-context*-Test; OPCT: *object-place-context*-Test. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Ein Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Tiers.

3.2.2 ELS-Tsc2-Projekt (Projektphase)

Das Ziel dieses Projekts war die Untersuchung, ob und inwiefern sich frühkindlicher Stress auf das Verhalten von $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen auswirkt. Es wurden $Tsc2^{+/-}$ -Böckchen mit wt C57BL/6J-Müttern verpaart, um mutationsspezifische Effekte auf das maternale Verhalten während der ELS-Phase auszuschließen. Wie in der Etablierungsphase wurde quantifiziert, wie häufig die ELS- und Kontrollmütter während der ELS-Phase von P3 bis P8 das Nest verließen. Außerdem wurden Gewichtsmessungen der Nachkommen im Alter von 9 Tagen (P9) und 3 Wochen, außerdem 2, 4 und 6 Monate vorgenommen. Ebenfalls wurden die Nachkommen im Alter von 2, 4 und 6 Monaten auf Verhaltensebene getestet. Mit Abstillen der Mäuse im Alter von 3 Wochen fand die Geschlechtsbestimmung statt und es wurden ab diesem Zeitpunkt nur noch männliche Tiere untersucht. Die vier untersuchten Nachkommen-Gruppen wurden wie folgt bezeichnet: wildtypische Kontrolltiere = KONT-wt, $Tsc2^{+/-}$ -Kontrolltiere = KONT-het, wildtypische ELS-Tiere = ELS-wt und $Tsc2^{+/-}$ -ELS-Tiere = ELS-het. In Tabelle 3.2.7 wurde die Anzahl der Nachkommen zusammengetragen.

Tabelle 3.2.7: Aufstellung der generierten Nachkommen (Projektphase)

Die Nachkommen, die während der Projektphase generiert wurden, sind nach *Batch*, Bedingung (Kontroll- / ELS-Mäuse) und Genotyp (wt / het) aufgelistet.

Projektphase

<i>Batch</i>	Kontrollen		ELS	
	wt	het	wt	het
T2	7	2	3	3
T6	6	3	6	2
T7	3	3	3	6
T8	10	6	4	4
Summe	26	14	16	15

3.2.2.1 Maternales Verhalten während der ELS-Phase

In der Projektphase wurde im Zeitraum von P3 – P9 quantifiziert, wie häufig Kontroll- und ELS-Mütter das Nest und folglich den Wurf verließen. Wie in der Etablierungsphase wurde hier im Durchschnitt ein signifikant höherer Wert bei den ELS-Müttern (9 Tiere: $9,778 \pm 4,816$) im Vergleich zu Kontrollmüttern (9 Tiere: $4,093 \pm 2,121$) vorgefunden ($t(106) = 7,938$; $p < 0,0001$) (Abbildung 3.2.7).

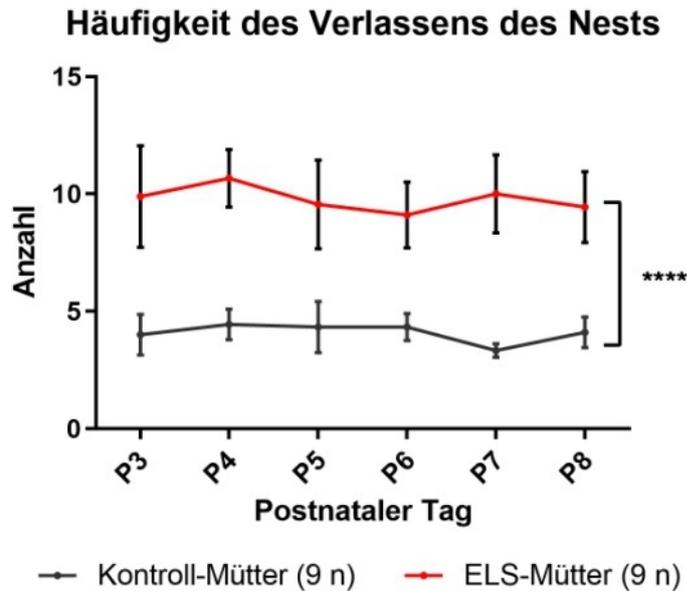


Abbildung 3.2.7: Maternales Verhalten (Projektphase)

Während der ELS-Phase wurde vom postnatalen Tag (P) 3 bis P8 quantifiziert, wie häufig ELS- und Kontrollmütter das Nest und somit ihren Wurf verließen (keine Interaktion mit den Nachkommen). Im Durchschnitt verließen ELS-Mütter im Vergleich zu Kontrollmüttern signifikant häufiger das Nest ($p < 0,0001$). Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

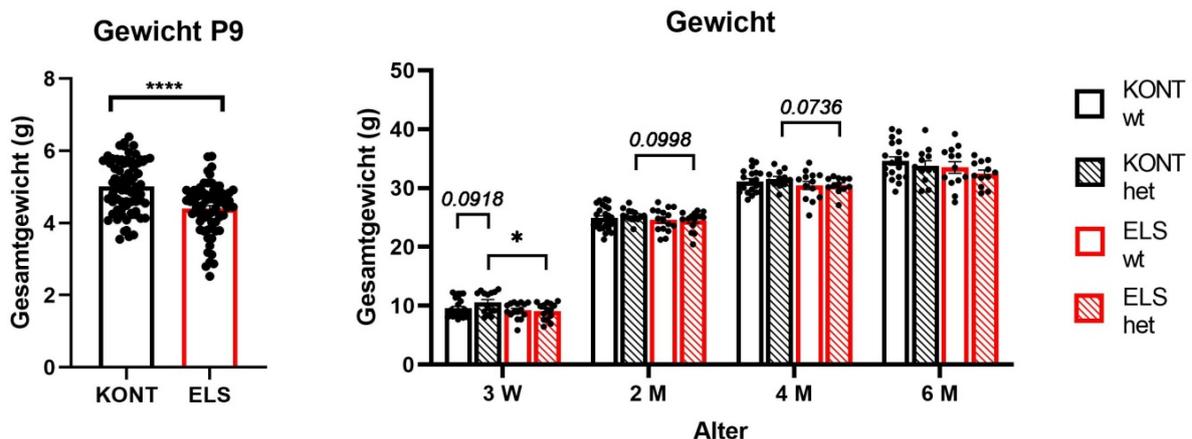
3.2.2.2 Gewichtsmessungen

Im Alter von 9 Tagen, 3 Wochen sowie von 2, 4 und 6 Monaten wurde das Gewicht der Nachkommen von ELS- und Kontrollmüttern quantifiziert. Die Gewichtsmessung im Alter von 9 Tagen umfasste Nachkommen beider Geschlechts (männlich und weiblich) und beider Genotyps (wt und het). Ab einem Alter von 3 Wochen wurden nur männliche Tiere abhängig von ihrem Genotypen bestimmt. Am letzten Tag der ELS-Phase wogen ELS-Nachkommen signifikant weniger als Kontrollnachkommen ($p < 0,0001$, Tabelle 3.2.8 und Abbildung 3.2.8). Der Vergleich von 3 Wochen alten Männchen ergab, dass ELS-het-Mäuse signifikant weniger wogen als KONT-het-Tiere ($p = 0,0287$). Ferner wurde ein Trend ($p > 0,10$) beobachtet, dass ELS-het-Mäuse im Alter von 2 und 4 Monaten im Durchschnitt weniger wogen als KONT-het-Tiere (2 Monate: $p = 0,0998$; 4 Monate $p = 0,0736$) und dass 3 Wochen alte KONT-wt-Mäuse weniger wogen als KONT-het-Tiere ($p = 0,0918$) (Tabelle 3.2.8 und Abbildung 3.2.8).

Tabelle 3.2.8: Gewichtsmessungen (Projektphase)

Durchschnittliches Gewicht von ELS- und Kontrolltieren (KONT) abhängig von Genotyp (wt/het) und Alter ($W \triangleq$ Wochen, $M \triangleq$ Monate) und Ergebnisse der statistischen Auswertung. Der Genotyp und das Geschlecht waren in 9 Tage alten Nachkommen noch nicht identifiziert (n/a). Fett gedruckte p -Werte heben signifikante Unterschiede hervor und durch Kursivschrift werden Trendwerte ($p > 0,10$) angedeutet. Stabw. \triangleq Standardabweichung, $t \triangleq$ t-Verteilung, $df \triangleq$ Freiheitsgrade.

Alter	Gruppe	Genotyp	Anzahl (n)	Mittelwert (Gramm)	Stabw.	Vergleich	t; df	p -Wert
P9	KONT	n/a	73	5,02	0,72	KONT / ELS	t=5,202; df=139	<0,0001
	ELS	n/a	68	4,40	0,69			
3 W	KONT	wt	26	9,57	1,59	KONT-wt / KONT-het	t=1,730; df=38	<i>0,0918</i>
		het	14	10,55	1,89	KONT-wt / ELS-wt	t=0,7487; df=40	0,4584
	ELS	wt	16	9,21	1,35	KONT-het / ELS-het	t=2,311; df=27	0,0287
		het	15	9,12	1,43	ELS-wt / ELS-het	t=0,1944; df=29	0,8472
2 M	KONT	wt	26	24,89	1,93	KONT-wt / KONT-het	t=0,8419; df=38	0,4051
		het	14	25,36	1,05	KONT-wt / ELS-wt	t=0,5284; df=40	0,6001
	ELS	wt	16	24,57	1,95	KONT-het / ELS-het	t=1,704; df=27	<i>0,0998</i>
		het	15	24,49	1,62	ELS-wt / ELS-het	t=0,1188; df=29	0,9063
4 M	KONT	wt	19	31,14	2,00	KONT-wt / KONT-het	t=0,6686; df=29	0,5090
		het	12	31,58	1,41	KONT-wt / ELS-wt	t=0,8518; df=30	0,4011
	ELS	wt	13	30,46	2,48	KONT-het / ELS-het	t=1,879; df=22	<i>0,0736</i>
		het	12	30,52	1,36	ELS-wt / ELS-het	t=0,0699; df=23	0,9449
6 M	KONT	wt	19	34,60	3,11	KONT-wt / KONT-het	t=0,7272; df=29	0,4729
		het	12	33,79	2,94	KONT-wt / ELS-wt	t=0,9358; df=30	0,3569
	ELS	wt	13	33,50	3,48	KONT-het / ELS-het	t=1,274; df=22	0,2159
		het	12	32,45	2,13	ELS-wt / ELS-het	t=0,9015; df=23	0,3767

**Abbildung 3.2.8: Gewichtsmessungen (Projektphase)**

Durchschnittliches Gewicht von ELS- und Kontrollmäusen (KONT). **Links:** Ergebnisse der Messung am postnatalen Tag (P) 9, als das Geschlecht und der Genotyp noch unbestimmt waren. ELS-Nachkommen wogen signifikant weniger als Nachkommen von Kontrollmüttern (KONT) ($p < 0,0001$). **Rechts:** Alters- und genotypabhängige Darstellung des durchschnittlichen Körpergewichts männlicher Nachkommen. Drei Wochen (W) alte ELS-het-Männchen wogen signifikant weniger als gleichaltrige KONT-het-Tiere ($p = 0,0287$) und dieser Unterschied dauerte im Trend an, als die Mäuse 2 und 4 Monate alt waren. Zudem bestand ein Trend, dass 3 W alte KONT-het-Mäuse mehr wogen als KONT-wt-Tiere. Trendwerte ($p > 0,10$) werden durch Kursivschrift dargestellt. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Ein Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Tiers. $W \triangleq$ Wochen, $M \triangleq$ Monate.

3.2.2.3 Open Field-Test

Um angstassoziiertes Verhalten zu untersuchen, wurde mit den vier Gruppen im Alter von 2, 4 und 6 Monaten ein *Open Field* (OF)-Test durchgeführt. Dazu wurden die relative Dauer des Aufenthalts im Arealzentrum und die zurückgelegte Wegstrecke zwischen den Gruppen verglichen. Es wurde ein Trend festgestellt, dass sich 2 Monate alte Tiere der ELS-wt-Gruppe länger im Zentrum aufhielten als KONT-wt-Tiere ($p = 0,0731$). Weitere Unterschiede lagen nicht vor (Tabelle 3.2.9 und Abbildung 3.2.9).

Tabelle 3.2.9: Ergebnisse des Open Field-Tests (Projektphase)

Durchschnittliche Werte der relativen Aufenthaltsdauer im Arealzentrum und der zurückgelegten Wegstrecke von ELS- und Kontrolltieren (KONT) abhängig von Genotyp (wt/het) und Alter ($M \triangleq$ Monate) und Ergebnisse der statistischen Auswertung. Trendwerte ($p > 0,10$) sind mittels Kursivschrift hervorgehoben, Stabw. \triangleq Standardabweichung, $t \triangleq$ t-Verteilung, $df \triangleq$ Freiheitsgrade.

Aufenthaltsdauer im Zentrum

Alter	Gruppe	Genotyp	Anzahl (n)	Dauer (Sek.)	Stabw.	Vergleich	t; df	p-Wert
2 M	KONT	wt	23	22,24	6,88	KONT-wt / KONT-het	t=0,2006; df=34	0,8422
		het	13	21,77	6,21	KONT-wt / ELS-wt	t=1,848; df=35	<i>0,0731</i>
	ELS	wt	14	26,43	6,38	KONT-het / ELS-het	t=1,684; df=24	0,1052
		het	13	25,43	4,76	ELS-wt / ELS-het	t=0,4606; df=25	0,6491
4 M	KONT	wt	18	29,38	12,17	KONT-wt / KONT-het	t=1,155; df=28	0,2578
		het	12	24,72	8,34	KONT-wt / ELS-wt	t=1,088; df=28	0,2858
	ELS	wt	12	24,93	8,81	KONT-het / ELS-het	t=0,1442; df=21	0,8867
		het	11	24,21	8,68	ELS-wt / ELS-het	t=0,1981; df=21	0,8449
6 M	KONT	wt	19	27,16	9,15	KONT-wt / KONT-het	t=0,4607; df=29	0,6484
		het	12	25,63	8,75	KONT-wt / ELS-wt	t=0,7324; df=30	0,4696
	ELS	wt	13	29,81	11,32	KONT-het / ELS-het	t=0,5097; df=22	0,6153
		het	12	27,66	10,71	ELS-wt / ELS-het	t=0,4868; df=23	0,6310

Zurückgelegte Wegstrecke

Alter	Gruppe	Genotyp	Anzahl (n)	Wegstrecke (cm)	Stabw.	Vergleich	t; df	p-Wert
2 M	KONT	wt	23	2734,00	570,40	KONT-wt / KONT-het	t=0,2821; df=34	0,7796
		het	13	2683,00	399,00	KONT-wt / ELS-wt	t=0,2281; df=35	0,8209
	ELS	wt	14	2693,00	461,80	KONT-het / ELS-het	t=0,4077; df=24	0,6871
		het	13	2754,00	483,50	ELS-wt / ELS-het	t=0,3382; df=25	0,7381
4 M	KONT	wt	18	2267,00	572,90	KONT-wt / KONT-het	t=0,9256; df=28	0,3626
		het	12	2443,00	398,60	KONT-wt / ELS-wt	t=1,291; df=28	0,2071
	ELS	wt	12	1983,00	613,10	KONT-het / ELS-het	t=0,3112; df=21	0,7587
		het	11	2382,00	532,80	ELS-wt / ELS-het	t=1,660; df=21	0,1118
6 M	KONT	wt	19	2132,00	573,50	KONT-wt / KONT-het	t=1,285; df=29	0,2089
		het	12	2416,00	636,60	KONT-wt / ELS-wt	t=1,455; df=30	0,1561
	ELS	wt	13	1832,00	573,00	KONT-het / ELS-het	t=1,579; df=22	0,1285
		het	12	2101,00	269,20	ELS-wt / ELS-het	t=1,478; df=23	0,1529

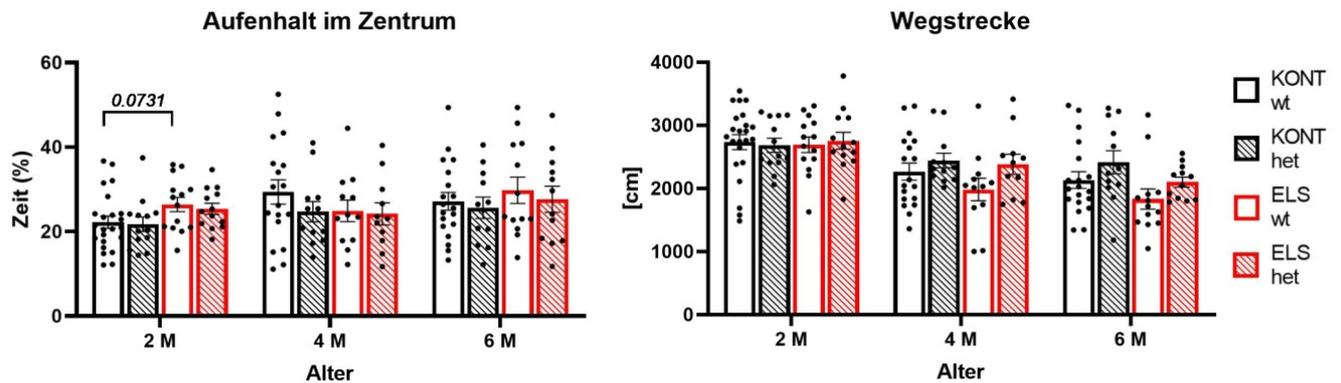


Abbildung 3.2.9: Ergebnisse des *Open Field*-Tests (Projektphase)

ELS-wt-Tiere zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen KONT-wt-Mäusen im Alter von 2 Monaten einen Trend ($p > 0,10$), mehr Zeit im Zentrum des Testareals zu verweilen. M \triangleq Monate.

3.2.2.4 Social Interaction-Test

In diesem Test wurde die Dauer der sozialen Interaktion (SI) mit einer fremden CD1-Maus untersucht. Die vier Gruppen wurden mit 2, 4 und 6 Monaten getestet. Dabei zeigte sich im Alter von zwei Monaten ein Trend, bei dem ELS-wt-Mäuse mehr mit der fremden Maus interagierten als KONT-wt-Tiere ($p = 0,0801$). Ansonsten verhielten sich die Gruppen bei diesem Test ähnlich (Tabelle 3.2.10 und Abbildung 3.2.10).

Tabelle 3.2.10: Ergebnisse des *Social Interaction*-Tests (Projektphase)

Durchschnittliche Werte des SI-Index von ELS- und Kontrolltieren (KONT) abhängig von Genotyp (wt/het) und Alter (M \triangleq Monate) und Ergebnisse der statistischen Auswertung. Trendwerte ($p > 0,10$) mittels Kursivschrift hervorgehoben. Stabw. \triangleq Standardabweichung, t \triangleq t-Verteilung, df \triangleq Freiheitsgrade.

Alter	Gruppe	Genotyp	Anzahl (n)	Dauer (Sek.)	Stabw.	Vergleich	t; df	<i>p</i> -Wert
2 M	KONT	wt	23	139,50	32,87	KONT-wt / KONT-het	t=0,6512;df=34	0,5193
		het	13	131,30	41,63	KONT-wt / ELS-wt	t=1,804; df=34	<i>0,0801</i>
	ELS	wt	13	165,30	53,00	KONT-het / ELS-het	t=0,9499;df=24	0,3516
		het	13	145,40	33,47	ELS-wt / ELS-het	t=1,142;df=24	0,2648
4 M	KONT	wt	19	159,30	84,24	KONT-wt / KONT-het	t=1,109;df=29	0,2765
		het	12	130,70	34,82	KONT-wt / ELS-wt	t=0,2894;df=30	0,7743
	ELS	wt	13	151,10	69,83	KONT-het / ELS-het	t=0,7470;df=22	0,4630
		het	12	142,20	40,22	ELS-wt / ELS-het	t=0,3835;df=23	0,7049
6 M	KONT	wt	19	124,00	67,47	KONT-wt / KONT-het	t=0,2203;df=29	0,8272
		het	12	130,20	87,80	KONT-wt / ELS-wt	t=0,8034;df=30	0,4280
	ELS	wt	13	141,80	51,47	KONT-het / ELS-het	t=0,3833;df=22	0,7052
		het	12	117,90	68,30	ELS-wt / ELS-het	t=0,9954;df=23	0,3299

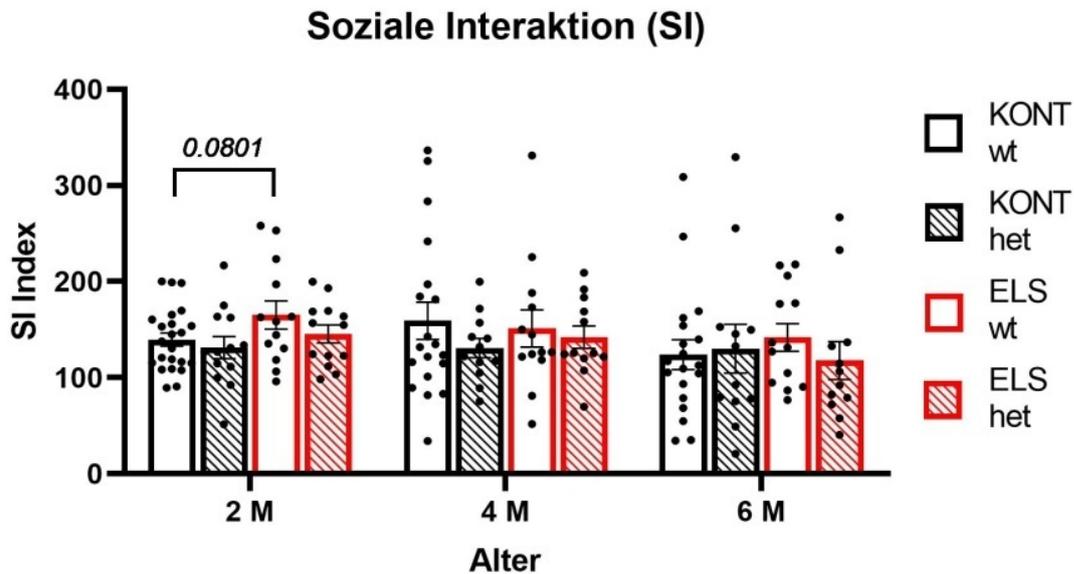


Abbildung 3.2.10: Ergebnisse des Social Interaction-Tests (Projektphase)

ELS-wt-Tiere zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen KONT-wt-Mäusen im Alter von 2 Monaten einen Trend, länger mit der fremden Maus zu interagieren. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Ein Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Tiers. M \triangleq Monate.

3.2.2.5 7 Tage-NORT

Das Langzeitgedächtnis der vier Gruppen wurde im Alter von 4 und 6 Monaten anhand des DI und der EZ abgeleitet. Zwischen Trainings- und Testphase lagen 7 Tage. Der statistische Vergleich für den DI ergab einen Trend bei 6 Monate alten Mäusen, bei dem der Durchschnittswert der ELS-wt-Gruppe geringer war als der DI der ELS-het-Gruppe (ELS-wt: $0,06 \pm 0,28$ versus ELS-het: $0,28 \pm 0,29$; $p = 0,0649$). Ansonsten wurde kein Unterschied hinsichtlich des DI ermittelt.

Auch bei der durchschnittlichen EZ zeichneten sich Trends ab. Im Alter von 4 Monaten explorierte die ELS-het-Gruppe länger im Vergleich zur KONT-het-Gruppe (ELS-het: $36,11 \pm 10,41$ Sek. versus KONT-het: $25,93 \pm 15,39$ Sek.; $p = 0,071$) und zur ELS-wt-Gruppe (ELS-het: $36,11 \pm 10,41$ Sek. versus ELS-wt: $27,02 \pm 13,11$ Sek.; $p = 0,069$). Außerdem erkundeten 6 Monate alte ELS-wt-Tiere beide Objekte signifikant weniger im Vergleich zu KONT-wt-Tieren (ELS-wt: $45,43 \pm 14,55$ Sek. versus KONT-wt: $58,44 \pm 19,32$ Sek.; $p = 0,0483$) (Tabelle 3.2.11 und Abbildung 3.2.11).

Tabelle 3.2.11: Ergebnisse des 7 Tage-NORTs (Projektphase)

Durchschnittswerte für DI und EZ von ELS- und Kontrolltieren (KONT) abhängig von Genotyp (wt/het) und Alter (M \triangleq Monate) und Vergleiche der jeweiligen Gruppen inklusive Ergebnisse der statistischen Auswertung. Fett gedruckte p -Werte heben signifikante Unterschiede hervor, Kursivschrift wurde für Trendwerte ($p > 0,10$) verwendet. Stabw. \triangleq Standardabweichung, $t \triangleq t$ -Verteilung, $df \triangleq$ Freiheitsgrade.

Diskriminierungsindex (DI)

Alter	Gruppe	Genotyp	Anzahl (n)	DI	Stabw.	Vergleich	t; df	p -Wert
4 M	KONT	wt	19	0,32	0,30	KONT-wt / KONT-het	t=0,9789; df=29	0,3357
		het	12	0,21	0,30	KONT-wt / ELS-wt	t=0,1590; df=30	0,8748
	ELS	wt	13	0,33	0,29	KONT-het / ELS-het	t=1,556; df=22	0,1340
		het	12	0,38	0,24	ELS-wt / ELS-het	t=0,4301; df=23	0,6711
6 M	KONT	wt	19	0,18	0,26	KONT-wt / KONT-het	t=0,1929; df=29	0,8484
		het	12	0,16	0,28	KONT-wt / ELS-wt	t=1,235; df=30	0,2265
	ELS	wt	13	0,06	0,28	KONT-het / ELS-het	t=1,023; df=22	0,3175
		het	12	0,28	0,29	ELS-wt / ELS-het	t=1,938; df=23	0,0649

Explorationszeit (EZ)

Alter	Gruppe	Genotyp	Anzahl (n)	EZ (Sek.)	Stabw.	Vergleich	t; df	p -Wert
4 M	KONT	wt	19	30,33	12,20	KONT-wt / KONT-het	t=0,8851; df=29	0,3834
		het	12	25,93	15,39	KONT-wt / ELS-wt	t=0,7318; df=30	0,4700
	ELS	wt	13	27,02	13,11	KONT-het / ELS-het	t=1,897; df=22	0,0710
		het	12	36,11	10,41	ELS-wt / ELS-het	t=1,908; df=23	0,0690
6 M	KONT	wt	19	58,44	19,32	KONT-wt / KONT-het	t=0,3328; df=29	0,7417
		het	12	60,85	20,04	KONT-wt / ELS-wt	t=2,058; df=30	0,0483
	ELS	wt	13	45,43	14,55	KONT-het / ELS-het	t=0,8282; df=22	0,4164
		het	12	54,45	17,75	ELS-wt / ELS-het	t=1,394; df=23	0,1767

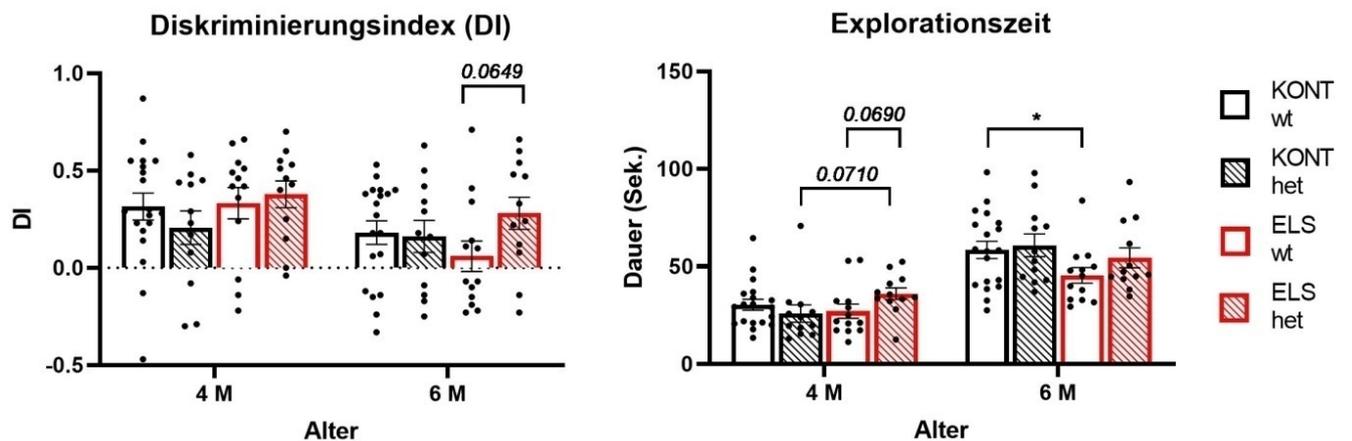


Abbildung 3.2.11: Ergebnisse des 7 Tage-NORTs (Projektphase)

Links DI: 6 Monate (M) alte ELS-wt-Mäuse zeigten einen geringeren DI (Trend) im Vergleich zu ELS-het-Tieren. **Rechts Explorationszeit (EZ):** Im Alter von 4 Monaten explorierten ELS-het-Mäuse im Durchschnitt länger als ELS-wt- und KONT-het-Tiere (Trends). Im Alter von 6 Monaten zeigten ELS-wt-Tiere eine signifikant geringere EZ als KONT-wt-Mäuse gleichen Alters ($p = 0,0483$). Trendwerte ($p > 0,10$) werden in Kursivschrift angezeigt. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Ein Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Tiers.

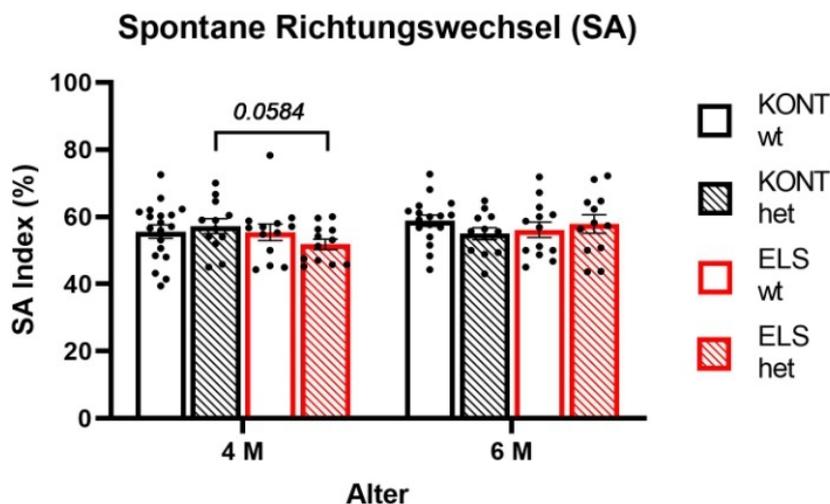
3.2.2.6 Spontaneous Alternation (SA)-Tests

Räumliche Orientierung gepaart mit Erinnerungsvermögen (Arbeits- und räumliches Gedächtnis) wurden im SA-Test mit 4 und 6 Monate alten Mäusen untersucht. Dabei wurden spontane Richtungswechsel in einen zuvor unbetretenen Arm quantifiziert und durch den relativen SA-Index ausgedrückt. Bei 4 Monate alten Tieren zeigte sich ein starker Trend, dass ELS-het-Mäuse im Durchschnitt weniger Richtungswechsel vornahmen als KONT-het-Mäuse (ELS-het: $51,82 \pm 5,48$ versus KONT-het: $57,27 \pm 7,69$; $p = 0,0584$) (Tabelle 3.2.12 und Abbildung 3.2.12).

Tabelle 3.2.12: Ergebnisse des Spontaneous Alternation-Test (Projektphase)

Durchschnittliche Richtungswechsel (angegeben durch den relativen SA-Index) der 4 und 6 Monate alten Mausgruppen abhängig von Genotyp (wt/het) und Alter (M $\hat{=}$ Monate) und Vergleiche der jeweiligen Gruppen inklusive Ergebnisse der statistischen Auswertung. Der Trendwert ($p > 0,10$) wird durch Kursivschrift hervorgehoben. Stabw. $\hat{=}$ Standardabweichung, t $\hat{=}$ t-Verteilung, df $\hat{=}$ Freiheitsgrade.

Alter	Gruppe	Genotyp	Anzahl (n)	SA Index	Stabw.	Vergleich	t; df	p-Wert
4 M	KONT	wt	19	55,64	8,62	KONT-wt / KONT-het	t=0,5326; df=29	0,5983
		het	12	57,27	7,69	KONT-wt / ELS-wt	t=0,07584; df=30	0,9401
	ELS	wt	13	55,40	8,80	KONT-het / ELS-het	t=1,997; df=22	0,0584
		het	12	51,82	5,48	ELS-wt / ELS-het	t=1,208; df=23	0,2392
6 M	KONT	wt	17	58,85	6,85	KONT-wt / KONT-het	t=1,535; df=27	0,1365
		het	12	55,01	6,31	KONT-wt / ELS-wt	t=0,9767; df=28	0,3371
	ELS	wt	13	56,15	8,29	KONT-het / ELS-het	t=0,8760; df=22	0,3905
		het	12	57,91	9,55	ELS-wt / ELS-het	t=0,4918; df=23	0,6275

**Abbildung 3.2.12: Ergebnisse des Spontaneous Alternation-Tests (Projektphase)**

Bei 4 und 6 Monate (M) alten Tieren wurde kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der spontanen Richtungswechsel (SA Index in %) in einem Y Maze-Apparatus detektiert. Im Alter von 4 Monaten wurde ein Trend ($p > 0,10$) ermittelt, dass KONT-het-Tiere häufiger einen Richtungswechsel vornahmen als ELS-het-Mäuse. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Ein Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Tiers.

3.2.3 Vergleich der 7 Tage-NORTs der Etablierungs- und der Projektphase

Sowohl während der Etablierungs- als auch der Projektphase wurde der 7 Tage-NORT mit 4 Monate alten Mäusen durchgeführt. In der Etablierungsphase wurde dafür ein *Batch* verwendet, das zuvor den 24 Std.-NORT durchgeführt hatte. In der Projektphase wurden die Ergebnisse von 4 Maus-*Batches* gepoolt. Bevor die Mäuse der Projektphase den 7 Tage-NORT durchgeführt hatten, waren sie bereits zwei Mal im *Open Field*-Test und im *Social Interaction*-Test und ein Mal im *Spontaneous Alternation*-Test untersucht worden. Im Vergleich zu den Tieren der Etablierungsphase waren die Mäuse der Projektphase demnach deutlich testerfahrener. Zur Überprüfung, ob sich testerfahrene Tiere anders verhielten als testunerfahrene Mäuse, wurde ein Vergleich der Parameter DI und EZ vom 7 Tage-NORT von 4 Monate alten, wildtypischen Kontroll- und ELS-Mäusen der Etablierungs- und der Projektphase angestellt.

Der durchschnittliche DI-Wert der Kontrollmäuse der Etablierungsphase war signifikant höher als bei den Kontrolltieren der Projektphase (KONT-Etablierung: $0,50 \pm 0,15$ versus KONT-Projekt: $0,32 \pm 0,30$; $p = 0,034$). Im Gegensatz dazu verbrachten die Mäuse der Etablierungsphase im Durchschnitt fast halb so viel Zeit mit der Erkundung beider gezeigten Objekte wie die Kontrolltiere der Projektphase (KONT-Etablierung: $16,48 \pm 5,7$ Sek. versus KONT-Projekt $30,33 \pm 12,20$ Sek.; $p = 0,0002$).

Beim Vergleich des DI der ELS-Gruppen aus der Etablierungs- und Projektphase wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt, jedoch war der Durchschnittswert bei den Tieren der Etablierungsphase höher (ELS-Etablierung: $0,47 \pm 0,12$ versus ELS-Projektphase: $0,33 \pm 0,29$). Hingegen war die EZ der ELS-Mäuse in der Projektphase signifikant höher als bei den Tieren der Etablierungsphase (ELS-Etablierung: $12,66 \pm 3,47$ Sek. versus ELS-Projektphase: $27,02 \pm 13,11$ Sek.; $p = 0,0008$) (Tabelle 3.2.13 und Abbildung 3.2.13).

Tabelle 3.2.13: NORT-Vergleich der Etablierungs- und Projektphase

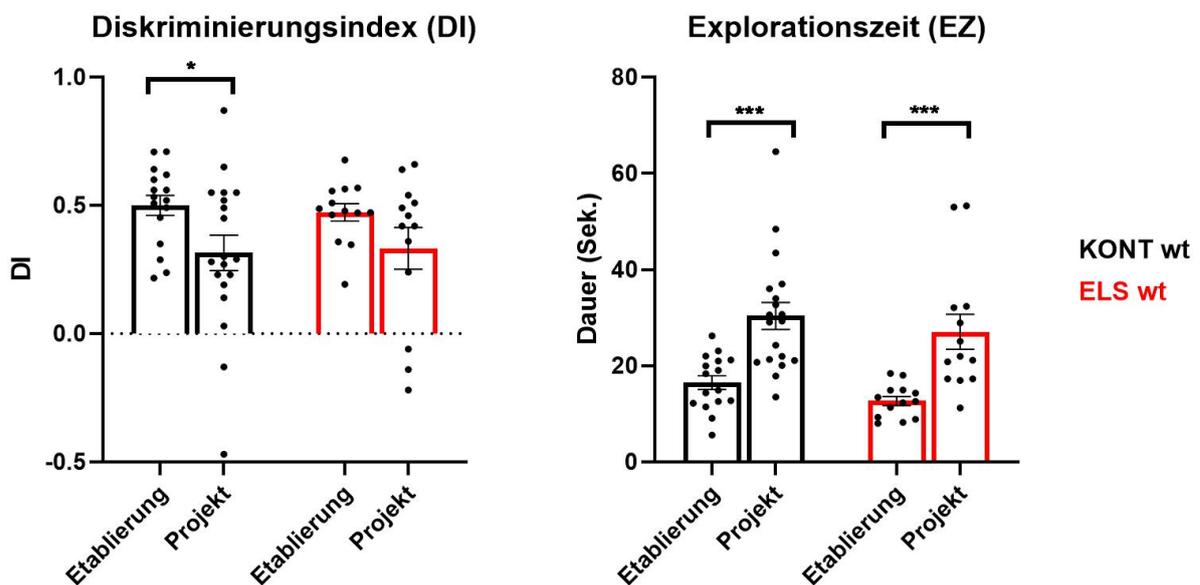
Vergleich der im 7 Tage-NORT untersuchten Parameter DI und EZ von wildtypischen Kontroll- und ELS-Mäusen der Etablierungs- und der Projektphase im Alter von 4 Monaten inklusive der statistischen Auswertung. Stabw. $\hat{=}$ Standardabweichung, t $\hat{=}$ t-Verteilung, df $\hat{=}$ Freiheitsgrade.

Diskriminierungsindex (DI)

Gruppe	Phase	Anzahl (n)	DI	Stabw.	t;df	p-Wert
Kontrollen	Etablierung	16	0,50	0,15	t=2,212;df=33	0,034
	Projekt	19	0,32	0,30		
ELS	Etablierung	13	0,47	0,12	t=1,601;df=24	0,1224
	Projekt	13	0,33	0,29		

Explorationszeit (EZ)

Gruppe	Phase	Anzahl (n)	EZ (Sek.)	Stabw.	t;df	p-Wert
Kontrollen	Etablierung	16	16,48	5,70	t=4,169;df=33	0,0002
	Projekt	19	30,33	12,20		
ELS	Etablierung	13	12,66	3,47	t=3,819;df=24	0,0008
	Projekt	13	27,02	13,11		

**Abbildung 3.2.13: NORT-Vergleich der Etablierungs- und Projektphase**

Vergleich der wildtypischen Kontroll- und ELS-Gruppen der Etablierungs- und der Projektphase im Alter von 4 Monaten im 7 Tage-NORT. Die Kontrollmäuse der Etablierungsphase zeigten einen signifikant höheren DI ($p = 0,034$) im Vergleich zu den Kontrollmäusen der Projektphase. Die DI-Werte der ELS-Gruppen waren nicht signifikant verschieden. Während der Etablierungsphase verbrachten sowohl die Kontrollmäuse ($p = 0,0002$) als auch die ELS-Mäuse ($p = 0,0008$) signifikant weniger Zeit mit der Erkundung beider Objekte als die entsprechenden Tiere der Projektphase. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Ein Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Tiers.

3.2.4 Test/Retest-Reliabilität

Da sich gleichaltrige, wildtypische Kontroll- und ELS-Tiere im 7 Tage-NORT unterschiedlich verhielten (s. Punkt 3.2.3), wurde überprüft, wie stark die Retest-Reliabilität für die Tiere der Projektphase bei den Testwiederholungen war. Dabei wurden Korrelationskoeffizienten $r \geq 0,7$ als zuverlässig hinsichtlich des Retestens angesehen (Crusio, W., Sluyter, F., Gerlai, R., & Pietropaolo, 2013).

Dazu wurde für jede Gruppe analysiert, ob die Ergebnisse beim Wiederholen des selben Tests im fortschreitenden Alter korrelierten. Beim 7 Tage-NORT bestand eine Korrelation ($r = 0,78$) im DI zwischen 4 und 6 Monate alten ELS-het-Tieren (Abbildung 3.2.14). Ferner wurde eine Korrelation ($r = 0,73$) im SI-Test zwischen 2 und 4 Monate alten KONT-het-Mäusen detektiert (Abbildung 3.2.15). Weitere Korrelationen wurden nicht beobachtet (Abbildungen 3.2.14 bis 3.2.17).

7 Tage-NORT

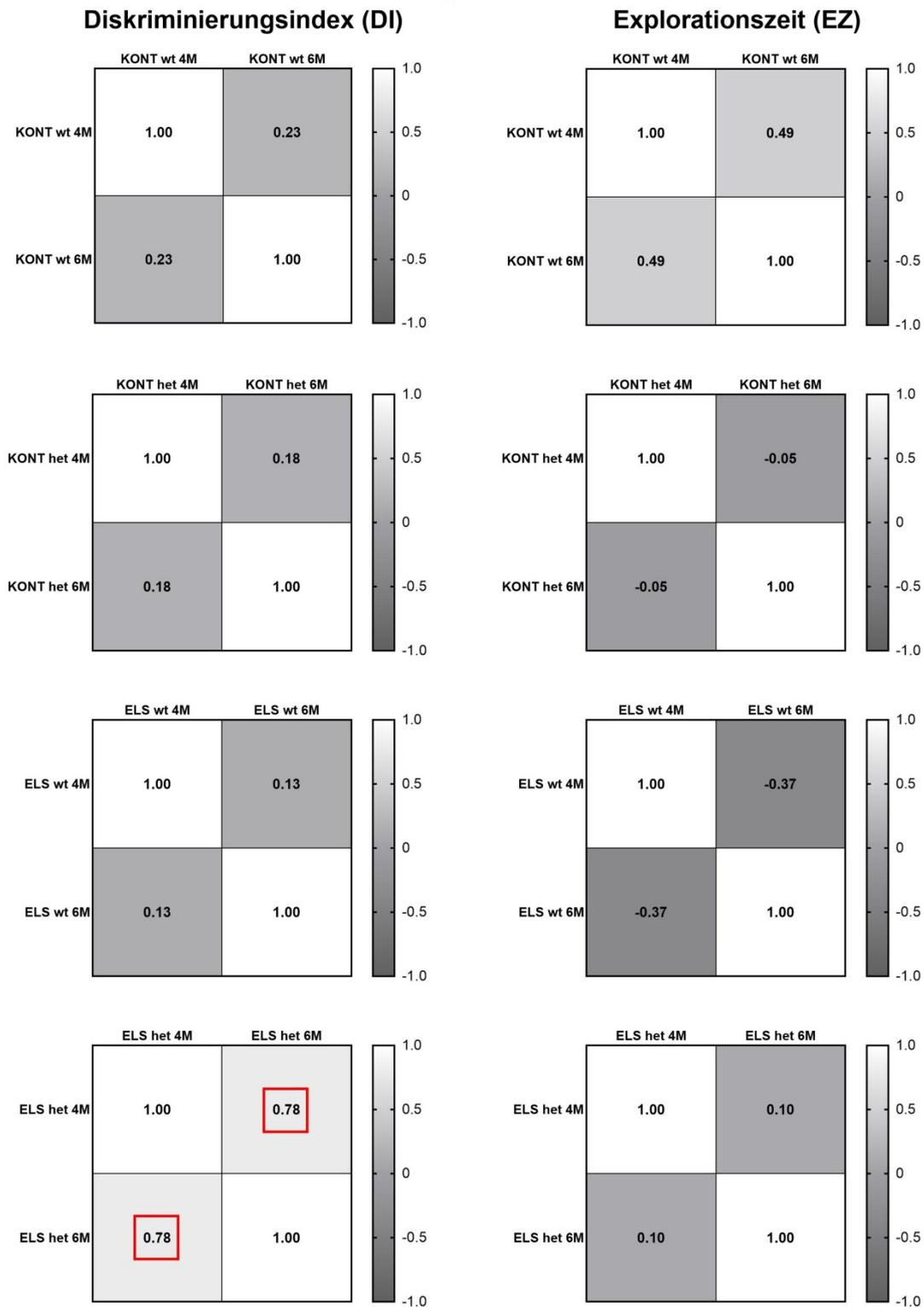


Abbildung 3.2.14: Korrelationskoeffizienten für den 7 Tage-NORT

Der DI (linke Spalte) und die EZ (rechte Spalte) jeder Gruppe wurden altersabhängig miteinander verglichen. ELS-het-Mäuse zeigten ähnliche DI-Werte ($r = 0,78$) in fortschreitendem Alter (angedeutet durch rote Umrandung). KONT \triangleq Kontrolltiere, M \triangleq Monate.

Soziale Interaktion

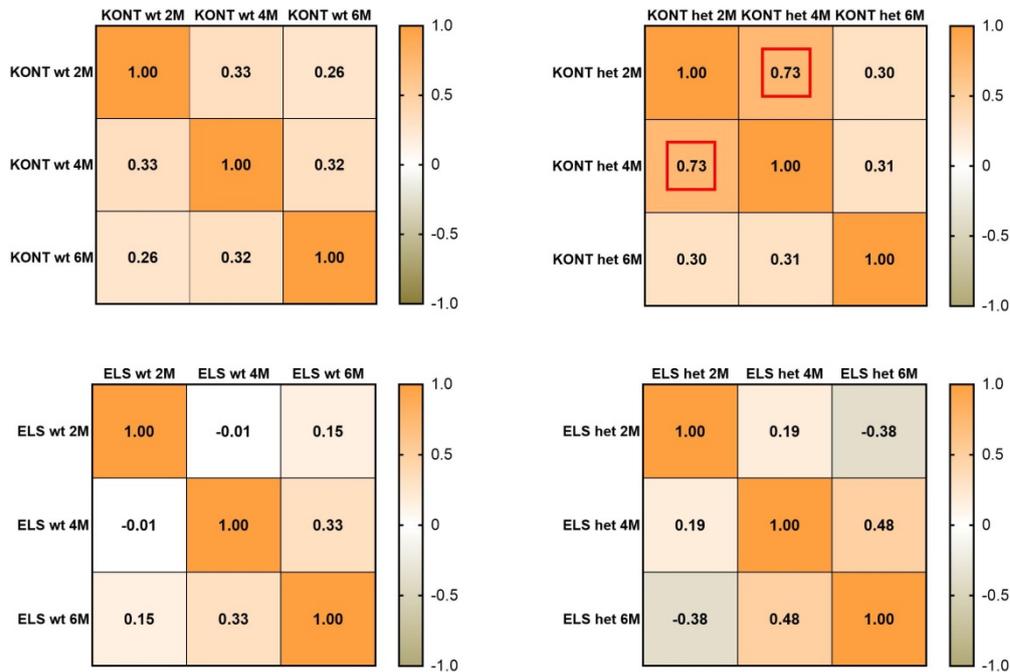


Abbildung 3.2.15: Korrelationskoeffizienten für den *Social Interaction*-Test

Für jede Gruppe wurde ein altersabhängiger Vergleich durchgeführt. Im Alter von 2 und 4 Monaten (M) verhielten sich KONT-het-Mäuse ähnlich ($r = 0,73$; angedeutet durch rote Umrandung).

Spontane Richtungswechsel (%)

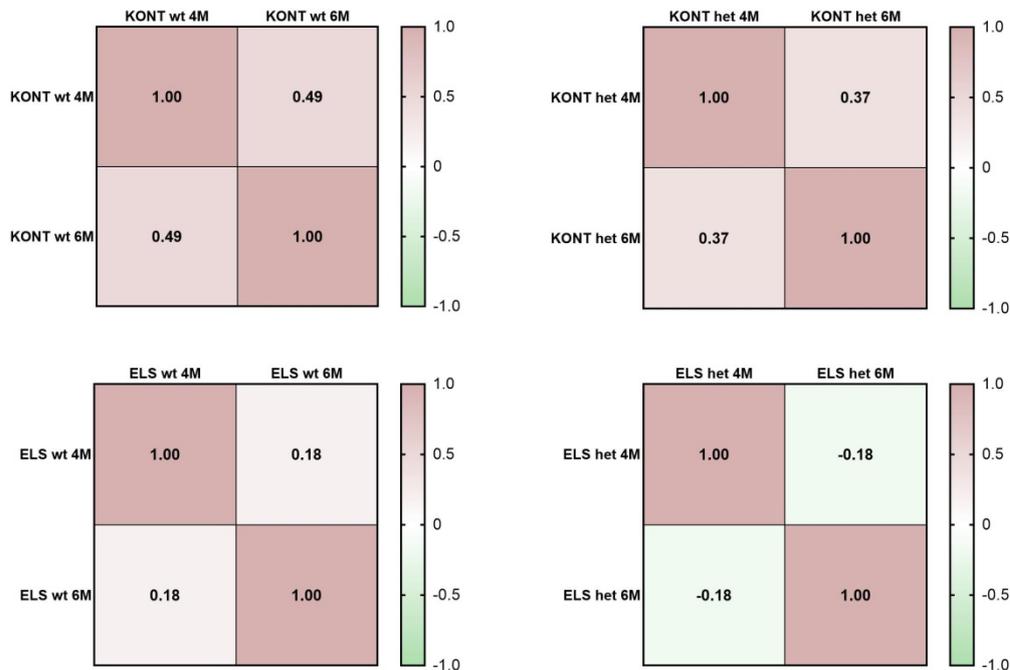


Abbildung 3.2.16: Korrelationskoeffizienten für den *Spontaneous Alternation*-Test

Für jede Gruppe wurde ein altersabhängiger Vergleich durchgeführt. Keine der vier Gruppen verhielten sich im Retest ähnlich. KONT \triangleq Kontrolltiere, M \triangleq Monate.

Open Field-Test

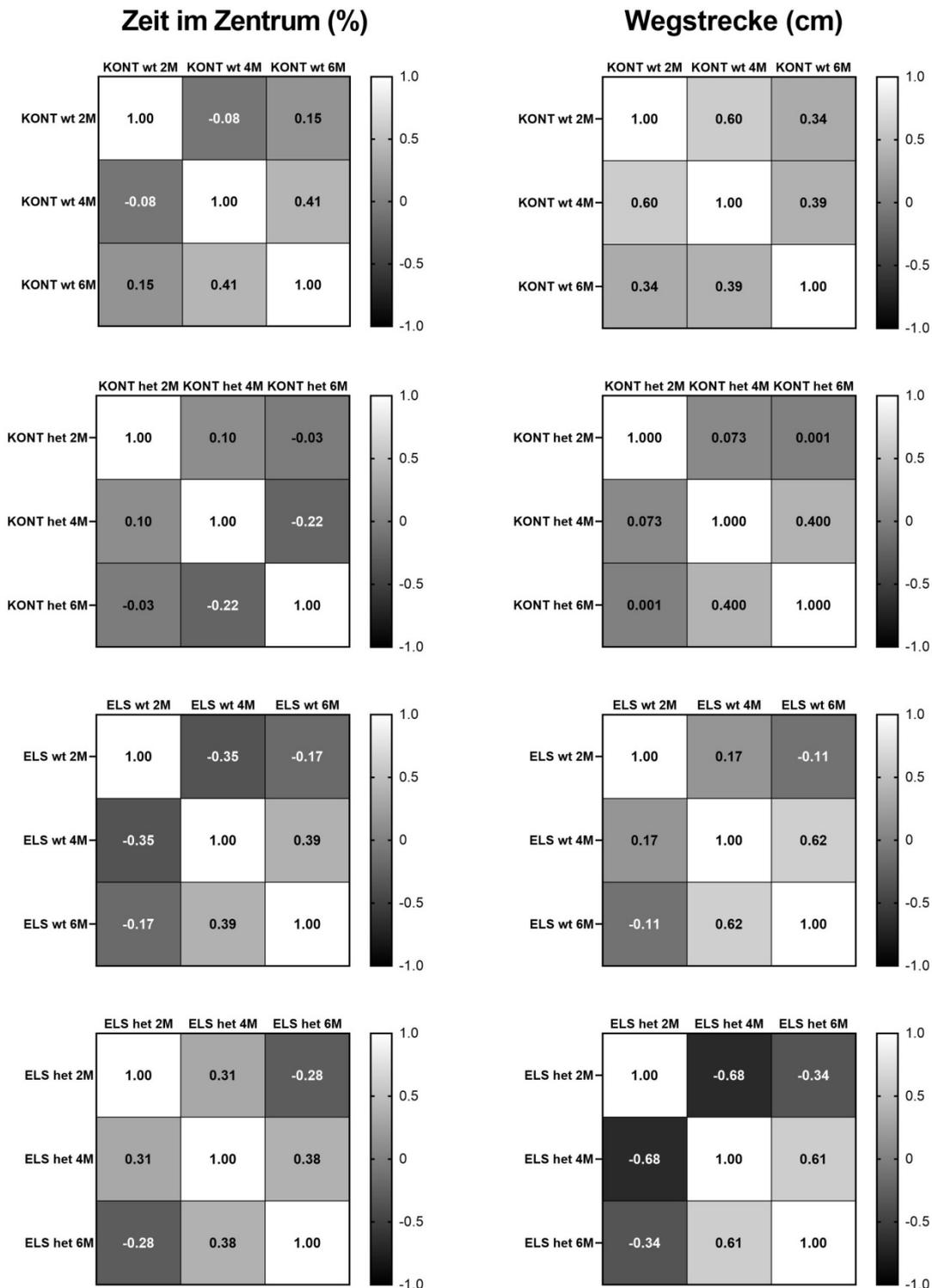


Abbildung 3.2.17: Korrelationskoeffizienten für den Open Field-Test

Für jede Gruppe wurde ein altersabhängiger Vergleich durchgeführt. Die Retest-Reliabilität wurde für keine der untersuchten Gruppen bestätigt. KONT \triangleq Kontrolltiere, M \triangleq Monate.

3.2.5 Verpaarungseffizienz und Geburtenrate

Um die Infantizidrate zu verringern, wurden für diese Arbeit zuchterfahrene Mütter gewählt. Ferner wurden für die Projektphase Muttertiere des Stammes C57BL/6J verwendet, um das maternale Verhalten nicht durch genspezifische Einflüsse zu beeinträchtigen. Dennoch wurde während der Projektphase beobachtet, dass Mütter ihren Wurf während P0 und P2 aufaßen. Daher wurde die Anzahl der Verpaarungen zum Teil mehr als verdoppelt, um pro Durchgang wenigstens eine Mutter inklusive Wurf pro Bedingung (Kontrolle/ELS) zu bekommen. Zur Erhöhung der Verpaarungseffizienz wurden als weitere Maßnahme zwischen Verpaarung und Abstillen keine Verhaltensversuche mit anderen *Batches* durchgeführt. Aufgrund eines Rohrbruchs während der Projektphase waren unvorhergesehene Handwerksarbeiten im Tierstall nötig, die während zwei Verpaarungsrunden stattfanden, sodass die Mütter der *Batches* T3 und T4 beeinträchtigt waren und nicht berücksichtigt werden konnten. In Tabelle 3.2.13 wurden die Anzahl der Verpaarungen und daraus resultierende Schwangerschaften und die Anzahl der Mütter, die ihren Wurf aufgegessen hatten (Spalte „Infantizid-Mütter“), zusammengetragen. Aus diesen Werten wurden die Schwangerschaftsrate und die Überlebensrate des Wurfs errechnet.

Tabelle 3.2.14: Verpaarungseffizienz und Geburtenrate

Relative Schwangerschaftsrate und Überlebensrate der Nachkommen während der Etablierungsphase (*Batches* E1 – E3) und während der Projektphase (*Batches* T1 – T9). Die Nachkommen der **fett** gedruckten *Batches* wurden für diese Arbeit verwendet.

<i>Batch</i>	Anzahl verpaarte Weibchen	Anzahl schwangere Weibchen	Anzahl Infantizid-Mütter	Kommentar	Schwangerschaftsrate (%)	Überlebensrate des Wurfs (%)
E1	6	4	0		66,67	100,00
E2	6	5	0		83,33	100,00
E3	6	4	0		66,67	100,00
Summe:	18	13	0	Mittelwert:	72,22	100,00
T1	4	2	1		50,00	50,00
T2	7	4	0		57,14	100,00
T3	6	3	3	Rohrbruch	50,00	0,00
T4	4	0	0	Rohrbruch	0,00	0,00
T5	6	1	0		16,67	100,00
T6	11	7	3		63,64	42,86
T7	10	4	0		40,00	100,00
T8	14	6	0		42,86	100,00
T9	8	4	3		50,00	75,00
Summe:	70	31	10	Mittelwert:	41,14	66,79

4. Diskussion

4.1 Projekt 1: DNA-Methylierungsanalyse von hSSCs

Die molekulare Charakterisierung von Keimzellen, im Besonderen zur Identifizierung von hSSCs, nimmt einen großen Stellenwert vor dem klinischen Hintergrund einer Infertilitätsbehandlung ein. hSSCs stellen durch ihren Stammzell-Charakter eine lebenslange Spermatogenese sicher und könnten zu therapeutischem Zwecke z. B zur Wiederherstellung der Fruchtbarkeit bei prä-pubertären Knaben nach gonadotoxischer Krebstherapie oder zur Behandlung von männlichen Erwachsenen mit SPG im Meiose-Arrest eingesetzt werden (Manku & Culty, 2015). Die Kultivierung von hSSCs gestaltet sich anspruchsvoll. Aufgrund ihrer Pluripotenz wurde die Bildung von Teratomen und eine Veränderung der DNA-Methylierungsmuster beobachtet (Leitch et al., 2013; Nickkholgh et al., 2014).

Ziel dieser Arbeit war, das Methylierungsprofil von SPG / potenziellen hSSCs vor einer *in vitro*-Vermehrung auf Einzelzell- und Einzelallel-Ebene zu untersuchen und mit der Methylierung von Spermien- und somatischer DNA zu vergleichen. Die SPG wurden anhand des Proteins FGFR3 selektiert, das auf der Oberfläche der Zellmembran von nicht-differenzierenden und nicht-proliferierenden SPG vorkommt, wodurch diese Zellen als potenzielle spermatogoniale Stammzellen (hSSCs) betrachtet werden (von Kopylow et al., 2016) und in der Arbeit als FGFR3⁺-SPG definiert wurden. Es wurde zudem eine SPG-Population untersucht, welche anhand von morphologischen Merkmalen wie Zellgröße oder Körnung als SPG eingestuft wurde, jedoch kein FGFR3 exprimiert. Von dieser Population (FGFR3⁻-SPG) wurde angenommen, dass sie im Vergleich zu FGFR3⁺-SPG einer fortgeschrittenen Differenzierungsstufe angehören. Schließlich wurde das DNA-Methylierungsprofil in ausdifferenzierten Spermien und von somatischen Zellen (Lymphozyten) erhoben. Die Methylierungsanalysen umfassten die regulatorischen Regionen (DMRs) der paternal geprägten Gene *MEG3* und *H19*, der maternal geprägten Gene *PEG3*, *KCNQ1OT1* und *SNRPN*, der SPG-Markergene *L1TD1*, *GFRA1* und *PLZF* und der Pluripotenz-Markergene *NANOG* und *POU5F1*. Die Analysen wurden zum einen an SPG-Einzelzellen durchgeführt, zum anderen an SPG-Pools aus zehn Zellen, welche durch Einsatz der *Limiting Dilution* (LD)-Methode gefolgt von Bisulfit-Pyrosequenzierung auf Allel-Ebene untersucht werden konnten. Da das Protein FGFR3 als Marker für hSSCs zur SPG-Selektion verwendet wurde, galt es als weiteres Ziel dieser Arbeit, die *FGFR3*-Methylierung zu untersuchen.

4.1.1 Die Methylierungsmuster elterlich geprägter Gene

Elterlich geprägte Gene unterliegen dem genomischen Imprinting. Dieser Prozess findet bereits während der Embryogenese in der Keimbahn statt. Dabei wird zellspezifisch durch DNA-Methylierung eines der elterlichen Allele inaktiviert, sodass die Genexpression ausschließlich vom anderen elterlichen Allel erfolgt (Bajrami & Spiroski, 2016). In dieser Arbeit wurden die DMRs der paternal geprägten Gene *MEG3* und *H19* untersucht, die beide für *long non-coding* (lnc) RNAs kodieren und als Tumorsuppressoren wirken (Abi Habib et al., 2019; Ghafouri-Fard & Taheri, 2019; Sellers, Schneider, Maj & Ratajczak, 2018). In männlichen Keimzellen liegen die DMRs von *MEG3* und *H19* methyliert vor (Kuhtz et al., 2014; Nickkholgh et al., 2014; Sellers et al., 2018). Des Weiteren wurden die DMRs der maternal geprägten Gene *KCNQ1OT1*, *PEG3* und *SNRPN* analysiert. Da eine fehlerhafte Methylierung der *PEG3*-DMR in humanem Tumorgewebe vorgefunden wurde, wird angenommen, dass auch *PEG3* als Tumorsuppressor fungieren könnte (He & Kim, 2014). *KCNQ1OT1* kodiert für eine lncRNA, welche die Regulation von weiteren benachbarten geprägten Genen beeinflusst und auf Histon-Modifikationen einwirkt (Wright, 2015). *SNRPN* ist an der Prozessierung von prä-mRNA und an der genomischen Prägung weiterer Gene beteiligt (Lee et al., 2014; Zechner et al., 2010). In der männlichen Keimbahn sind maternal geprägte Gene hypomethyliert (Kuhtz et al., 2014; Monk, 2015).

Die Untersuchung der DMRs der paternal und maternal geprägten Gene ergab insgesamt ein einheitliches Methylierungsmuster, sowohl in den Einzelzellen als auch in den 10-Zell-Proben. Die paternal geprägten Gene waren in den FGFR3⁺- und FGFR3⁻-SPG ebenso wie in den differenzierten Spermien methyliert. Die DMRs der maternal geprägten Gene lagen hingegen unmethyliert vor, sowohl in den beiden SPG-Gruppen als auch in den Spermien. Dieses Ergebnis stimmt mit denen anderer Methylierungsstudien an Keimzellen überein. Marques et al. (2011) und Kerjean et al. (2000) haben die Methylierung von *H19* und dem maternal geprägten Gen *MEST* analysiert und keinen Unterschied in den Methylierungsmustern zwischen Keimzellen aller Differenzierungsstadien festgestellt (Kerjean, 2000; Marques et al., 2011). Hartmann et al. (2006) haben in ihrer Studie ebenfalls gezeigt, dass sich die *H19*- und *SNRPN*-Methylierungsprofile von SPG und Spermien ähneln (Hartmann et al., 2006). Eine genomweite Methylierung von Keimzell-DNA wurde von Guo et al. (2017) untersucht, die als Resultat nahezu identische Methylierungsmuster in den Promotoren, Kontrollelementen und elterlich geprägten Regionen von hSSCs und Spermien vorgefunden haben (Guo et al., 2017).

4.1.2 Interpretation der CpG-Fraktion mit gegenteiliger Methylierung

Bei den oben angeführten Studien wurde nur von Guo et al. (2017) eine markerspezifische Selektion zur Isolation der hSSCs vorgenommen, während die Zellen in den anderen Studien nach morphologischen Kriterien selektiert wurden (Guo et al., 2017; Hartmann et al., 2006; Kerjean, 2000; Marques et al., 2011). In keiner der Studien wurden jedoch wie in der hier vorliegenden Arbeit Untersuchungen an einzelnen Zellen durchgeführt, wodurch sich mittels der LD-Methode und nachgeschalteter Pyrosequenzierung die Methylierung einzelner DNA-Moleküle ableiten ließ. Durch Erfassen der Methylierung auf Allel- und CpG-Dinukleotid (CpG)-Ebene stellte sich bei den elterlich geprägten Genen heraus, dass einige CpGs eine gegenteilige (inverse) Methylierung innehatten. Die Quantifizierung der invers methylierten CpG-Fraktion ergab, dass der Anteil am größten in $FGFR3^+$ -SPG war, geringer oder abwesend in $FGFR3^-$ -SPG und abwesend in Spermien. Eine Ausnahme hinsichtlich dieser Beobachtung stellen die Ergebnisse der *H19*-DMR. Hier betrug der Anteil invers methylierter CpGs in den $FGFR3^+$ -Pools 7 % und in den $FGFR3^-$ -Pools 8 %. Allerdings basierte die Untersuchung der *H19*-DMR auf SPG-Proben von nur zwei Patienten, während bei den übrigen analysierten Genregionen vier biologische Proben vorlagen. Eine weitere Abweichung wurde bei den einzelnen $FGFR3^-$ -Zellen für *MEG3* mit zwei methylierten und einem unmethylierten Allel detektiert.

Hinweise zur Interpretation dieses aufgefallenen Musters bei den paternal geprägten Genen liefern die Ergebnisse der im Folgenden aufgeführten Studien. Kerjean et al. (2000) haben die Methylierung in der *H19*-DMR von SPG analysiert, die nach Morphologie und Lage innerhalb eines *Tubulus seminiferus* selektiert wurden (Kerjean, 2000). Die Autoren haben in diesen Zellen sowohl methylierte als auch unmethylierte Allele detektiert, in Spermatozyten hingegen nur methylierte Allele. Nach deren an Erkenntnissen aus murinen Keimzellen angelehnter Vermutung, ist die *H19*-Prägung abgeschlossen, bevor männliche Keimzellen in die Meiose eintreten (Kerjean, 2000), also bei der Transition von Typ B-SPG zu primären Spermatozyten. Von Maus-Studien ist außerdem bekannt, dass während der epigenetischen Reprogrammierung in den männlichen Urkeimzellen *Meg3* weniger demethyliert und schneller *de novo* methyliert wird als *H19* und dass erst in primären Spermatozyten im Pachytän-Stadium ein spermienähnliches Methylierungsniveau erreicht wird (Li, Lees-Murdock, Xu & Walsh, 2004; Oakes, La Salle, Smiraglia, Robaire & Trasler, 2007). Darüber hinaus haben Maus-Studien für *H19* eine asynchrone Remethylierung berichtet, bei welcher das paternale früher als das maternale Allel remethyliert wird (Davis, Trasler, Moss, Yang & Bartolomei, 1999; Lees-Murdock & Walsh, 2008).

Eine inverse Methylierung wurde ferner in den DMRs der in dieser Arbeit untersuchten maternal geprägter Gene beobachtet. Im Gegensatz zu den Kontrollregionen der paternal

geprägten Gene, überspannte die inverse Methylierung überwiegend gesamte Allele. Diese stammten in *KCNQ1OT1* und *PEG3* in der Mehrheit von den SPG-Proben des Patienten 2. Bei den beiden untersuchten *SNRPN*-Regionen jedoch waren die invers-methylierten Allele in den SPG-Proben der Patienten in gleichem Maße vorhanden.

Und auch für die Beobachtungen bei den maternal geprägten Genen finden sich ähnliche Ergebnisse in Maus-Studien. Li et al. (2004) haben in ihrer Studie zu Remethylierungsprozessen an Urkeimzellen von 17,5 Tage alten Mausembryos für *Snrpn* in der männlichen Keimbahn ebenfalls ganze methylierte Allele und einzelne CpGs festgestellt (Li et al., 2004). Interessanterweise waren zum selben Zeitpunkt die paternal geprägten Gene *H19* und *Meg3* nahezu remethyliert (Li et al., 2004). Dieses Ergebnis bestätigt die asynchrone Remethylierung von elterlich geprägten Allelen, die auch von Davis et al. (1999) und Lees-Murdock & Walsh (2008) beobachtet wurde (Davis et al., 1999; Lees-Murdock & Walsh, 2008). Bei Menschen würde diese Zeitangabe der 19. Schwangerschaftswoche entsprechen, bei welcher in primordialen Keimzellen der Beginn der Remethylierung beschrieben wurde (Von Meyenn & Reik, 2015). In murinen Spermien jedoch waren die *Snrpn*-Allele unmethyliert (Li et al., 2004). Ein gewisser Anteil invers-methylierter CpGs wurde zudem in einer anderen Studie in maternal geprägten Genen von humanen Spermien detektiert (Kutzt et al., 2014, Tabelle 2).

Ein weiterer Interpretationsansatz der Ergebnisse ist, dass das Muster invers methylierter CpGs ein technisches Artefakt darstellen könnte. Einzelne aberrant methylierte CpGs in unmethylierten Allelen bzw. einzelne aberrant unmethylierte CpGs in methylierten Allelen können aus einer unvollständigen Bisulfit-Konvertierung oder aus Amplifikationsfehlern resultieren (El Hajj, Zechner, et al., 2011; El Hajj et al., 2015). In den Methylierungsdiagrammen der zuvor erwähnten Studien finden sich ebenfalls einzelne, gegenteilig methylierte CpGs (Davis et al., 1999; Hartmann et al., 2006; Kerjean, 2000; Lees-Murdock & Walsh, 2008; Marques et al., 2011; Nickkholgh et al., 2014; Oakes et al., 2007; Tremblay, Duran & Bartolomei, 1997). Marques et al. (2011) fanden diese „Ausreißer-CpGs“ zudem in Spermien gesunder erwachsener Männer, weswegen dies als stochastisch-biologischer Prozess angesehen wurde (Hartmann et al., 2006; Marques et al., 2011). Die Autoren merkten ferner an, dass in menschlicher DNA Einzelnukleotidpolymorphismen in CpG-Dinukleotiden vorliegen können, die ebenfalls zu gegensätzlich methylierten Ergebnissen einzelner CpGs führen (Marques et al., 2011). Um diesen Punkt weiter zu verfolgen wäre es im nächsten Schritt aufschlussreich, auch einzelne Spermien-Zellen mit der LD-Methode zu untersuchen. Da die oben aufgeführten Studien ähnliche Methylierungsmuster beschrieben haben, ist es sehr unwahrscheinlich, dass technische Artefakte die Ursache für das beobachtete inverse

Methylierungsmuster darstellen, aber dennoch ist dieser Aspekt nicht vollständig ausschließbar.

Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das hier vorgefundene inverse Methylierungsmuster durch unterschiedliche Differenzierungsstadien der Spermatogenese einhergehen könnte. Wie bereits geschildert haben Marques et al (2011) humane, nach morphologischen Kriterien selektierte Keimzellen diverser Differenzierungsstadien hinsichtlich der Methylierung von *H19* und *MEST* untersucht und ferner mit dem Vorkommen der Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B korreliert (Marques et al., 2011). Die Autoren konnten in allen untersuchten Stadien alle drei Methyltransferasen auf Protein- und mRNA-Ebene nachweisen. In Zusammenhang mit den stochastisch auftretenden, invers-methylierten CpGs in ihren Ergebnissen schlussfolgerten sie, dass dynamische De- und Remethylierungsprozesse stattfinden, um die Transition der Keimzellen zur nächsten Differenzierungsstufe zu ermöglichen (Marques et al., 2011).

Aus dem Vergleich der Ergebnisse für die elterlich geprägten Genen in dieser Arbeit mit denen anderer Studien ist zusammenfassend festzuhalten, dass das Vorkommen invers-methylierter CpGs auch in anderen, sehr ähnlichen humanen und murinen Studien beschrieben wurde und durch gen- und allelspezifische Remethylierungsdynamiken während der Spermatogenese erklärt wird. Dass die Fraktion gegenteilig methylierter CpGs in den Zellen fortschreitender Differenzierungsstufen (FGFR3⁺-SPG → FGFR3⁻-SPG → Spermien) abnahm, könnte demnach darauf hinweisen, dass die DNA-Methylierung in postnatalen Keimzellen erst während der Spermatogenese vervollständigt wird. Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, wäre ein Vergleich des DNA-Methylierungsprofils von männlichen Keimzellen aufschlussreich, die in der Differenzierungsstufe weiter fortgeschritten sind (z.B. Typ B-SPG).

4.1.3 Die Methylierungsmuster spermatogonialer Markergene

Zur weiteren Charakterisierung des DNA-Methylierungsprofils von SPG wurden die SPG-Markergene *FGFR3*, *GFRA1*, *L1TD1* und *PLZF* untersucht. Da die Spezifität dieser Gene in Studien bereits beschrieben wurde, sollte ihre Analyse herausstellen, ob deren Regulation mit ihrer DNA-Methylierung korreliert (Guo et al., 2017; von Kopylow & Spiess, 2017). *GFRA1* kodiert für Komponenten eines Rezeptorkomplexes, an welchen *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) bindet, ein Molekül, das an der Erhaltung des Stammzellcharakters beteiligt ist (Meng, 2000). Als Zelloberflächenmarker wurde *GFRA1* zur Selektion von SPG bzw. hSSCs verwendet (von Kopylow & Spiess, 2017). *L1TD1* kodiert für ein RNA-Bindeprotein und ist Mitglied im Pluripotenz-regulierenden Netzwerk von *OCT4* /

NANOG / *SOX2* und spielt ferner bei der Stammzellerneuerung eine Rolle (Emani et al., 2015). In humanen Testikeln wird *L1TD1* ausschließlich in undifferenzierten SPG exprimiert (Guo et al., 2018; von Kopylow & Spiess, 2017; Uhlén et al., 2005). Die Kapazität zum Erhalt des Stammzellcharakters wird ferner *PLZF* zugeschrieben, welches ebenfalls in undifferenzierten SPG exprimiert wird (Costoya et al., 2004; von Kopylow & Spiess, 2017). *FGFR3* kodiert für einen Rezeptor, an welchen Wachstumsfaktoren binden, wodurch es an der Regulation der Zelldifferenzierung mitwirkt. In früheren Studien haben von Kopylow et al. (2016) eine *FGFR3*-Expression in einer Subpopulation von humanen Typ A-SPG festgestellt, die in kleinen Gruppen von 2 bis 4 Zellen auftraten (von Kopylow et al., 2016).

Bei Beginn dieser Arbeit lagen keine zu dieser Arbeit ähnlichen Studien mit Methylierungsdaten zu den untersuchten SPG-Markergenen von humanen Keimzellen vor. Daher wurden die regulatorischen Regionen dieser Gene von Studien adaptiert, die andere Fragestellungen verfolgten und dazu andere Zelltypen untersuchten (s. Tabelle 2.1.1). Zusätzlich wurden die Kandidatenregionen anhand der Genexpressionsdaten der „Ensembl“-Datenbank verifiziert und mit den epigenetischen Einträgen der „Methbase“-Datenbank abgeglichen.

In dieser Arbeit zeigte sich bei der Untersuchung der SPG-Markergene wie bei den elterlich geprägten Genen ein einheitliches Methylierungsmuster. Die Promotorregionen waren in den SPG-Proben sowie in den Spermienproben unmethyliert. Dieses Ergebnis galt sowohl für die Einzelzellen als auch für die 10-Zell-Proben. Die untersuchten SPG-Markergene *FGFR3* und *PLZF* zeigten ein ähnliches inverses Methylierungsmuster wie die maternal geprägten Gene. Dabei betrug die entsprechende (methylierte) CpG-Fraktion allerdings nur maximal 5 %. Bei *L1TD1* und *GFRA1* wurde in den SPG-Proben jeweils nur ein invers-methyliertes CpG detektiert. Die beobachtete Hypomethylierung der SPG-Markergene korreliert mit den Ergebnissen aus Transkriptomstudien von humanen SPG von Guo et al. (2017) und wird auch auf Proteinebene in murinen SPG bestätigt (Guo et al., 2017; von Kopylow & Spiess, 2017).

Das Membranprotein *FGFR3* wurde in dieser Arbeit zur Selektion der potenziellen hSSC-Zellen (*FGFR3*⁺-SPG) verwendet. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass sich zumindest bei diesem Gen die Methylierung zwischen *FGFR3*⁺-SPG von *FGFR3*⁻-SPG unterscheiden könnte. Daher wurde die *FGFR3*-Promotorregion, die zuvor von Ezura et al. (2009) beschrieben wurde, als regulatorische Kandidaten-Region analysiert (Ezura et al., 2009). Die *FGFR3*-Methylierung in der untersuchten Region war allerdings sowohl bei *FGFR3*⁻- und *FGFR3*⁺-SPG als auch in Spermien nahezu identisch.

Auch in anderen Studien, die Transkriptionsanalysen in Keimzellen durchgeführt haben, wurde *FGFR3* als hSSC-Marker identifiziert. So haben Guo et al. (2018) Keimzellen von erwachsenen Männern hinsichtlich ihrer Genexpression in die Differenzierungsstadien „0 bis 4“ („state 0 to state 4“) eingeteilt (Guo et al., 2018). Die mRNA von *FGFR3* wurde zusammen mit *UTF1*, *ID4* und *TCF3* in Keimzellen des Stadiums „0“ detektiert. Dieses Stadium wurde „ruhenden“, naiven (mitotisch inaktiven) Keimzellen zugeordnet, welches ferner den Keimzellen von 13 Monate alten, männlichen Kindern entsprach (Guo et al., 2018). Wang et al. (2018) teilten ebenfalls anhand von Expressionsmustern männliche Keimzellen in entsprechende Differenzierungsstadien ein (Wang et al., 2018). Sie fanden eine erhöhte *FGFR3*-mRNA in „Cluster 1“, das hSSCs zugeschrieben wurde. Ferner ergab eine Gen-Ontologie-Analyse der Autoren, dass die Gene des „Clusters 1“ mit unterdrückter Genexpression assoziiert waren („*negative regulation of gene expression*“), was demnach auf die „ruhenden“ Keimzellen der Studie von Guo et al. (2018) zutreffen würde (Wang et al., 2018). Auch Sohni et al. (2019) bestätigten eine Anreicherung von *FGFR3*-mRNA im hSSC-spezifischen Gen-Cluster, zusammen mit den SSC-Markergenen *ID4* und *SIX1* (Sohni et al., 2019).

Die Funktion des Proteins *FGFR3* als hSSC-Marker wurde in den oben aufgeführten Studien bestätigt. Die hier vorgefundenen ähnlichen *FGFR3*-Methylierungsniveaus bei den SPG-Proben und Spermien könnten dadurch begründet sein, dass die untersuchte regulatorische Kandidatenregion nicht mit der zellspezifischen *FGFR3*-Expression assoziiert ist, sondern dass in hSSCs ein anderer Promotor zur Transkription abgelesen wird. Diese Vermutung wird jedoch dadurch in Frage gestellt, da in der Kontroll-DNA eine durchschnittliche Methylierung von 43 % gemessen wurde, was auf eine biallelische Expression in somatischen Zellen hinweist. Außerdem wurden in den Ergebnissen der *FGFR3*⁻-Pools und Spermien-DNA insgesamt 6 CpGs detektiert, deren Methylierung zwischen 20 % und 80 % betrug. Da zum Zeitpunkt der Etablierung und Auswertung des *FGFR3*-Assays keine zellspezifischen Referenzwerte in der Literatur vorlagen, konnten diese Resultate nicht als technische Artefakte eingestuft werden. Daher wurden diese CpGs zwar in den Streudiagrammen angezeigt, jedoch nicht in der statistischen Analyse berücksichtigt. Die wahrscheinlichere Erklärung für die ähnlichen Methylierungsergebnisse der *FGFR3*⁺- und *FGFR3*⁻-SPG ist daher, dass andere epigenetische Regulationsmechanismen wie Histon-Modifikationen die *FGFR3*-Expression in hSSCs steuern, weswegen *FGFR3* lediglich in der Zellmembranoberfläche von *FGFR3*⁺-SPG auftrat. Um mögliche Histon-Modifikationen zu untersuchen, könnte man zum Beispiel mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ermitteln, ob und welche (Histon-modifizierenden) Proteine mit den untersuchten regulatorischen Regionen assoziiert sind.

Es bleibt festzuhalten, dass die hier vorgefundene Hypomethylierung in den untersuchten Regionen der SPG-Markergene weitere Studien bestätigen konnte, die bereits eine Spezifität für SPG und hSSCs hergestellt haben. Da die Methylierungsprofile in den Probengruppen jedoch ähnlich waren, empfiehlt es sich, die regulatorischen Regionen für Keimzellen durch weitere Versuche zu verifizieren (s. Punkt 4.1.5). Ansonsten wäre die Interpretation der hier vorgefundenen Ergebnisse, dass die spezifische Expression der SPG-Markergene nicht durch DNA-Methylierung reguliert wird.

4.1.4 Die Methylierungsmuster von Pluripotenzgenen

Um den Stammzellcharakter der SPG-Proben zu bestimmen, wurden die Promotorregionen der Pluripotenzgene *NANOG* und *POU5F1* auf ihren Methylierungsstatus untersucht. Im Gegensatz zu murinen SPG kommt in humanen SPG die Pluripotenz-assoziierte Isoform 1 von *POU5F1* nicht auf mRNA- und Proteinebene vor (von Kopylow & Spiess, 2017). *NANOG* wurde in humanen SPG detektiert (Izadyar et al., 2011), jedoch nicht in Hodengewebe von Erwachsenen (Hart, Hartley, Ibrahim & Robb, 2004). In der Studie von Izadyar et al. (2011) wurde mittels Immunfärbung eine *NANOG*-Expression nicht nur in undifferenzierten SPG, sondern auch in differenzierenden Keimzellen im Lumen von humanen *Tubuli seminiferi* detektiert. Die Autoren vermuteten eine unterschiedliche Funktion von *NANOG*, die mit dem Differenzierungsgrad der Keimzellen korreliert (Izadyar et al., 2011). Das Vorkommen möglicher unterschiedlicher *NANOG*-Transkripte wurde jedoch nicht weiter untersucht und zur Transkriptspezifität des verwendeten Antikörpers wurde in der Studie nichts angegeben. In der Studie von Nettersheim et al. (2011) wurde bei der Untersuchung des *NANOG*-Promotors eine Hypomethylierung in SPG und eine Hypermethylierung in Spermien evaluiert (Nettersheim et al., 2011). In der genomweiten Studie von Guo et al. (2017) jedoch waren *NANOG* und *POU5F1* methyliert und in ihrer mRNA-Expression reprimiert (Guo et al., 2017). Die widersprüchlichen Ergebnisse der aufgeführten Studien sind wahrscheinlich zum Teil der unterschiedlichen Verfahrensweisen zur Zellisolation und der verschiedenen zell- und entwicklungspezifischen Transkripte geschuldet.

Gegensätzliche Ergebnisse sind gleichfalls von Mausstudien bekannt. Kuijk et al. (2010) fanden eine schwache *NANOG*-Expression in Typ A-SPG, dafür eine starke Expression in Spermatozyten im Pachytän-Stadium und runden Spermatiden (Kuijk et al., 2010). Ventelä et al. (2012) ermittelten einige wenige *NANOG*-positive SPG, während bei Yamaguchi et al. (2011) im Hodengewebe erwachsener Mäuse gar kein *NANOG* vorkam (Ventelä, Mäkelä, Kulmala, Westermarck & Toppari, 2012; Yamaguchi, Kimura, Tada, Nakatsuji & Tada, 2005).

Die in dieser Arbeit untersuchten Promotorregionen der Pluripotenz-Markergene *NANOG* und *POU5F1* waren in den vier untersuchten Probengruppen sowohl in den 10-Zell-Proben als auch in den Einzelzellen methyliert und bestätigen die Transkriptionsergebnisse, die von Guo et al. (2017) berichtet wurden (Guo et al., 2017).

4.1.5 Methodische Aspekte

Um die SPG-Proben auf Einzelzell- und Einzelallel-Ebene untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit mehrere Methoden miteinander kombiniert. Die verwendete Technik der Bisulfit-Pyrosequenzierung erlaubt die Quantifizierung der DNA-Methylierung von mehreren CpGs eines bis zu 100 bp langen PCR-Fragments auf Nukleotidebene (Gharizadeh, Nordström, Ahmadian, Ronaghi & Nyrén, 2002; El Hajj et al., 2015). Dazu wird DNA mit Bisulfit behandelt, um eine Diskriminierung zwischen methylierten und unmethylierten Cytosin-Basen innerhalb einer Sequenz zu ermöglichen. Dabei werden Cytosin-Basen deaminiert, was zu Strangbrüchen führt, sodass die DNA vor einer PCR-Amplifikation fragmentiert vorliegt (Hayatsu, 2008). Bei der Analyse von wenigen Zellen, wie in dieser Arbeit, stellt fragmentierte DNA beim Genassay-Design eine Herausforderung dar, da die Primer-Hybridisierungsregion entsprechend ausgewählt und zudem empirisch ermittelt werden muss. Bei der Untersuchung weniger Zellen werden für das *Multiplexing* von Primern pro PCR-Reaktion maximal 8 Primerpaare empfohlen, um die PCR-Effizienz und erfolgreiche anschließende Untersuchungen zu gewährleisten (El Hajj et al., 2015). In dieser Arbeit wurden elf Genassays gleichzeitig mittels zwei Amplifikationsrunden untersucht. In der ersten Runde wurde ausreichend Ausgangsmaterial generiert, um in der zweiten Runde lediglich ein spezifisches Gen-Amplikon zu vervielfältigen.

Das Prinzip der verwendeten LD-Methode beruht darauf, Bisulfit-behandelte DNA mehrerer Zellen zu einem bestimmten Grad zu verdünnen und anschließend auf eine gewisse Anzahl PCR-Reaktionen zu verteilen, sodass stochastisch ein DNA-Molekül als Ausgangsmaterial zur PCR-Amplifikation vorliegt (Daser et al., 2006; El Hajj, Trapphoff, et al., 2011). Durch diese Vorgehensweise ist es möglich, mittels Pyrosequenzierung den Methylierungsstatus eines ursprünglichen DNA-Moleküls abzuleiten. Das Methylierungsergebnis ist dabei binär, da das untersuchte DNA-Molekül / Allel in der Zelle entweder methyliert oder unmethyliert vorlag. Anhand der DNA-Methylierung mehrerer nacheinander auftretender CpGs innerhalb einer untersuchten Region können auf diese Weise Rückschlüsse über die Genregulation gezogen werden. Im biologischen Kontext und unter Berücksichtigung technischer Schwankungen werden dabei Allele mit Methylierungswerten bis 20 % als genetisch aktiv und ab 80 % als genetisch stillgelegt betrachtet. Hingegen deuten Werte zwischen 20 % und 80 % darauf hin, dass mehr als ein Ausgangsmolekül zur Untersuchung vorgelegen hat, eine

Kontamination während der Probenprozessierung aufgetreten ist oder Artefakte während der Bisulfitkonversion oder Pyrosequenzierung entstanden sind (El Hajj et al., 2015). In dieser Arbeit wurden Kontaminationen durch mehrere Leerkontrollen (PCR-Reaktionen ohne DNA) überprüft und technische Artefakte durch Evaluation der Methylierungswerte (20 - 80 %) identifiziert. Dadurch wurden lediglich diese Ergebnisse berücksichtigt, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf einzelnen Zellen bzw. Allelen beruhten.

Ein weiterer Vorteil der angewandten LD-Methode ist, dass eine präferenzielle Amplifikation von Allelen aufgrund einer gegebenen DNA-Sequenz vermieden wird, da lediglich ein DNA-Molekül zur Vervielfältigung vorliegt (El Hajj et al., 2015). Ebenfalls vorteilhaft ist, dass sich einzelne Allele mit auffälliger Methylierung identifizieren lassen, die bei der Analyse vieler Zellen oder Zellpopulationen mit epigenetischer Heterogenität unentdeckt bleiben würden (El Hajj, Trapphoff, et al., 2011). Die Untersuchung einzelner Keimzellen mit diversen Differenzierungsstadien wie in dieser Arbeit war die Methode der LD-Pyrosequenzierung zweckdienlich, um potenziell unterschiedliche Methylierungsprofile innerhalb einer Zellpopulation zu evaluieren.

Zuletzt soll auf die in dieser Arbeit angewendete experimentelle Strategie eingegangen und Optimierungspotenziale diskutiert werden. Wie bereits weiter oben aufgeführt, würde eine Analyse von einzelnen Spermien parallel zu den Einzelzell-SPG ein detaillierteres Ergebnis liefern, um die Methylierungsdynamik während der Spermatogenese besser einschätzen zu können. Auch die zusätzliche Untersuchung von Keimzellen fortgeschrittener Differenzierungsstufen (Typ B-Spermatogonien, primäre und sekundäre Spermatozyten) würde Remethylierungsprozesse weiter herausstellen. Allerdings wäre dafür der Einsatz der LD-Methode mit 10-Zell-Proben zu empfehlen. Die Untersuchung der Einzelzellen war technisch durchführbar und lieferte verwertbare Ergebnisse. Die Prozessierung der 10-Zell-Proben war jedoch im Hinblick auf Zeit, Kosten und Ertrag deutlich effizienter. Ferner konnten mit der LD-Methode einzelne Allele analysiert werden, während bei den Einzelzellen die Wahrscheinlichkeit bestand, gleichzeitig zwei Allele zu untersuchen. Zudem war das inverse Methylierungsmuster erst in den umfangreicheren Ergebnissen der 10-Zell-Proben aufgefallen, abgesehen vom *MEG3*-Resultat aus den *FGFR3*⁻-SPG mit zwei methylierten Allelen und einem unmethylierten Allel. Des Weiteren empfiehlt es sich, weniger 10-Zell-Proben einer biologischen Probe zu untersuchen (in dieser Arbeit je SPG-Gruppe 5 10-Zell-Pool eines Patienten) und stattdessen mehrere biologische Proben zu analysieren. Dadurch würden die Ergebnisse einer biologischen Probe nicht so stark ins Gewicht fallen wie z.B. die für das Gen *KCNQ1OT1* in den *FGFR3*⁺-Pools des Patienten 2.

Um Unterschiede in der Remethylierungsdynamik zwischen paternalen und maternalen Allelen zu ermitteln, könnte man die in dieser Arbeit verwendete Vorgehensweise ergänzen und Einzelnukleotidvarianten („*single nucleotide variants*“, SNVs) untersuchen, die spezifisch für das jeweilige Allel sind. Optimal wäre, wenn elternspezifische SNVs innerhalb der sequenzierten Region liegen würden, sodass man den PCR2-Reaktionsansatz aufsplitten und sowohl eine SNV- und eine Methylierungsanalyse durchführen könnte. Ansonsten könnte man einen neuen PCR-Assay zur Untersuchung des SNV designen und in die Multiplex-PCR (PCR1) integrieren. Da die Anzahl der zu untersuchenden Genregionen bei geringer DNA-Ausgangskonzentration limitiert ist, müsste empirisch ermittelt werden, um wie viele Gen-Assays man die in dieser Arbeit etablierte Multiplex-PCR erweitern kann.

Wie weiter oben erwähnt, ist die Verifizierung der untersuchten Promotorregionen der SPG-Markergene zu empfehlen, da ähnliche Methylierungswerte in allen vier Proben Gruppen vorgefunden wurden. So könnte die Promotoraktivität durch Luciferase-Assays abgeleitet werden. Dazu werden die Kandidaten-Promotorregionen in einen Reporter-Vektor kloniert, der selbst keinen Promotor enthält, anschließend in eine geeignete Zelllinie eingeführt und ihre Aktivität über die Expression eines Reportergens gemessen (Solberg & Krauss, 2013; Tae et al., 2005).

Eine Alternative zu der in dieser Arbeit angewandten, methodischen Vorgehensweise wäre die Untersuchung einzelner Zellen mittels Hochdurchsatzsequenzierung (*next generation sequencing*, NGS). Neuere Studien zeigen, dass die Technologie bereits soweit fortgeschritten ist, dass neben der Methylierung auf CpG-Ebene auch die Bestimmung des elterlichen Allels möglich ist, um beispielsweise Remethylierungsdynamiken weiter zu erforschen (Hui et al., 2018; Lee & Smallwood, 2018; Zhu et al., 2018). Die NGS-Technologie erlaubt eine parallele Untersuchung mehrerer Proben und ermöglicht genomweite Transkriptom-, Methylo- und Proteom-Analysen. Aufgrund der Quantität der Ergebnisse stellt die Hochdurchsatzsequenzierung im Vergleich zur methodischen Vorgehensweise dieser Arbeit eine effizientere und ökonomischere Untersuchungsweise dar. In Kombination mit der LD-Methode wäre es wahrscheinlich sogar möglich, den Methylierungsstatus einzelner Allele zu ermitteln. Zukünftige Forschungsergebnisse werden zeigen, ob molekulargenetische Analysen von DNA im Pikogramm-Bereich mit der NGS-Technologie genauso robuste Ergebnisse erzielen wie mit der LD-Bisulfit-Pyrosequenzierung dieser Arbeit.

4.2 Projekt 2: Der Einfluss von ELS auf TSC

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von frühkindlichem Stress (ELS) auf das Verhalten von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen untersucht. Im ersten Schritt (Etablierungsphase) wurde das ELS-Paradigma mit wildtypischen C57BL/6J-Mäusen an einem neuen Standort etabliert. Dazu wurden das maternale Verhalten während der ELS-Phase, das Gewicht und die CORT-Konzentration im Blut der Nachkommen von ELS- und Kontrollmüttern untersucht. Außerdem wurde in kognitiven Verhaltenstest das Gedächtnisvermögen der Nachkommen analysiert. Im zweiten Schritt (Projektphase) wurde das ELS-Paradigma mit *Tsc2*^{+/-}-Mäusen durchgeführt. Erneut wurden das maternale Verhalten und das Gesamtgewicht der Nachkommen evaluiert. Entsprechend der zwei analysierten Faktoren „ELS“ und „*Tsc2*-Mutation“ wurden vier Gruppen untersucht: (1) Stress-unerfahrene wildtypische Tiere (KONT-wt), (2) Stress-unerfahrene *Tsc2*^{+/-}-Mäuse (KONT-het), (3) ELS-erfahrene wildtypische Mäuse (ELS-wt) und (4) ELS-erfahrene *Tsc2*^{+/-}-Tiere (ELS-het). Die vier Gruppen wurden im Alter von 2, 4 und 6 Monaten hinsichtlich ihres Angstverhaltens, ihrer sozialen Interaktion und ihrer kognitiven Leistung untersucht. Durch das Retesten dieser Mäuse sollte eine Progression durch die beiden untersuchten Faktoren (ELS/*Tsc2*-Mutation) ermittelt werden.

4.2.1 Etablierungsphase

4.2.1.1 Maternales Verhalten, CORT-Konzentrationen und Gewicht der Nachkommen

Das in dieser Arbeit verwendete ELS-Paradigma hatte sowohl in der Etablierungs- als auch in der Projektphase die Mausmütter in reduziert ausgestatteten Experimentierkäfigen im Vergleich zu Kontrollmüttern in normal ausgestatteten Experimentierkäfigen dazu veranlasst, das Nest und ihren Wurf signifikant häufiger zu verlassen. Als indirekte Konsequenz wogen die Nachkommen der ELS-Mütter an Tag 9 signifikant weniger als die Nachkommen von Kontrollmüttern. Ferner zeigten ELS-Nachkommen im Alter von 3 Wochen und 2 Monaten signifikant höhere Corticosteron (CORT)-Konzentrationen im Blut als Kontrollmäuse. Rice et al. (2008) fanden erhöhte CORT-Konzentrationen in 4 – 7 Monate alten, männlichen ELS-Mäusen (C57BL/6J-Mauslinie) und signifikant reduziertes Gewicht an P9 (Rice et al., 2008). Arp et al. (2016) adaptierten ebenfalls das ELS-Paradigma von Rice et al. (2008) und konnten in 2,5 Monate alten männlichen Mäusen (C57BL/6J-Mauslinie) erhöhte CORT-Konzentrationen nachweisen. Außerdem war das Gewicht von ELS-Tieren an P9 und P21 (3 Wochen) signifikant niedriger, jedoch wogen sie im Alter von 4 Monaten ähnlich viel wie Kontrolltiere (Arp et al., 2016). Reduziertes Gewicht und erhöhte CORT-Konzentrationen an P9 wurden ferner von Naninck et al. (2015) unter Verwendung des gleichen ELS-Para-

digmas beschrieben. Die Unterschiede in Gewicht und CORT-Konzentrationen waren allerdings in 5 Monate alten männlichen Mäusen (C57BL/6J-Mauslinie) nicht mehr vorhanden (Naninck et al., 2015). In der ebenfalls auf dem gleichen ELS-Paradigma basierenden Studie von Gunn et al. (2013) wurde bei 2 Monate alten männlichen und weiblichen ELS-Tieren ein signifikanter Gewichtsunterschied festgestellt (Gunn et al., 2013).

Zusammengefasst stimmten die Ergebnisse zur Gewichtsdivergenz an P9 und zu den CORT-Werten im Alter von 3 und 8 Wochen in dieser Arbeit weitestgehend mit denen anderer Studien überein. Dass keine Unterschiede in der CORT-Konzentration an P9 gefunden wurden, könnte dadurch erklärt werden, dass in den ersten beiden Lebenswochen eine Hyporesponsivität der HPA-Achse besteht (Brinks, van der Mark, de Kloet & Oitzl, 2007; Yam et al., 2015). Insofern zeigten die Resultate, dass die Aktivität der HPA-Achse der ELS-Nachkommen durch das ELS-Paradigma beeinflusst worden war. Das etablierte ELS-Paradigma konnte daher als validiert betrachtet werden.

4.2.1.2 ELS und kognitive Fähigkeiten

Studien haben gezeigt, dass sich ELS auf das Verhalten von Mäusen auswirkt. In dieser Arbeit wurden während der Etablierungsphase kognitive Verhaltenstests zur Untersuchung des Langzeitgedächtnisses und komplexer Erinnerungsvorgänge (Episodisches Gedächtnis) an adulten ELS- und Kontrollmäusen durchgeführt. Die Experimente (24 Std.-NORT, 7 Tage-NORT und die Versuche der EGT-Batterie) beruhten darauf, dass die Tiere das neue Objekt erkennen und gegenüber dem bereits bekannten bevorzugen. Jedoch wurde hinsichtlich der Präferenz zum neuen Objekt, abgeleitet durch den Diskriminierungsindex (DI), kein Unterschied zwischen den Tieren in keinem der absolvierten Tests festgestellt. Lediglich in der Erkundungsdauer von beiden gezeigten Objekten (bekannt und neu) wurden bei ELS-Tieren vereinzelt niedrigere Werte verzeichnet. In der Studie von Rice et al. (2008) zeigten 8 Monate alte ELS-Männchen im Vergleich zu Kontrolltieren im 24 Std.-NORT eine signifikant reduzierte Präferenz für das neue Objekt (Rice et al., 2008). Naninck et al. (2015) fanden ebenfalls dieses Ergebnis in 5 Monate alten Tieren (Naninck et al., 2015). Ferner wurden in dieser Studie die Tiere im *object location*-Test analysiert, in welchem Mäuse in einer Trainingsphase zwei identische Kopien eines Objekts explorieren und in der anschließenden Testphase eines der beiden Objekte an einem neuen Ort vorfinden. Dieser Verhaltenstest ist ähnlich zum *object-place task* der in dieser Arbeit durchgeführten EGT-Batterie. In der Studie von Naninck et al. (2015) bevorzugten die ELS-Männchen das Objekt am bekannten Ort, während die Kontrollen überwiegend das Objekt am neuen Ort erkundeten (Naninck et al., 2015). Ein weiterer Verhaltenstest zur Ableitung des episodischen Gedächtnisvermögens stellt der *temporal order memory*-Test dar, der die Reihenfolge von gezeigten Objekte

abfragt und neben dem Erkennen von Gegenständen eine kontext- und zeitabhängige Erinnerung erfordert (Barker, Bird, Alexander & Warburton, 2007; Chiba, Kesner & Gibson, 1997; Jacques, Rubin, Labar & Cabeza, 2008; Naya, Chen, Yang, Suzuki & Squire, 2017). Erwachsene männliche ELS-Mäuse (ca. 2,5 Monate alt, C57BL/6), die das gleiche ELS-Paradigma erfahren hatten, schnitten in diesem Test signifikant schlechter ab als Kontrolltiere (Yang et al., 2015). Insgesamt zeigten alle aufgeführten, auf dem gleichen ELS-Paradigma basierenden Studien, dass adulte ELS-Tiere im Vergleich zu Kontrollen ein schlechteres Kurz- und Langzeitgedächtnis innehatten und deren episodisches Gedächtnis durch ELS eingeschränkt war. Diese Schlussfolgerung konnte aus den Ergebnissen der Etablierungsphase dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz könnte darauf beruhen, dass die Tiere der Etablierungsphase über einen längeren Zeitraum (über 6 Wochen) an fünf Tagen pro Woche gestestet wurden und sich ein Habituationseffekt eingestellt hatte. Auf diese Vermutung wird noch in Punkt 4.2.2.6 näher eingegangen.

4.2.2 Projektphase

4.2.2.1 Der Einfluss von ELS und *Tsc2*-Mutation auf das Gewicht der Nachkommen

In der Projektphase wurde zusätzlich zum frühkindlichen Stress der Einfluss der *Tsc2*-Mutation untersucht. Im Alter von 3 Wochen wogen ELS-het-Mäuse signifikant weniger als KONT-het-Tiere und diese Tendenz bestand bei diesen Gruppen bis zu einem Alter von 4 Monaten. Diese Beobachtung könnte aus einem möglichen additiven Effekt frühkindlichen Stresses auf den Genotypen resultieren. Außerdem fand sich ein Trend, dass 3 Wochen alte KONT-het-Tiere im Vergleich zu KONT-wt-Mäusen (beide Gruppen Stress-unerfahren) weniger wogen. Ab einem Alter von 2 Monaten lagen bei diesen beiden Gruppen keine Gewichtsunterschiede mehr vor. Eine mögliche Erklärung, die auch für die ELS-het-Mäuse gelten könnte, wäre, dass die Mutter-Jungtier-Interaktion durch den Genotyp beeinflusst war und sich auf das Stillverhalten bzw. die Nahrungsaufnahme auswirkte. In der Studie von Young et al. (2011) wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der in dieser Arbeit verwendeten *Tsc2*-Mauslinie und einer veränderten Interaktion und Kommunikation zwischen wildtypischen Müttern und ihren wildtypischen bzw. heterozygoten *Tsc2*-Nachkommen beschrieben (Young, Schenk, Yang, Jan & Jan, 2010).

4.2.2.2 Der Einfluss von ELS und *Tsc2*-Mutation auf das Angst- und Sozialverhalten

Die Resultate der Verhaltensexperimente mit 2 Monate alten Mäusen könnten auf einen protektiven Einfluss von ELS hinweisen. Im *Open Field* (OF)- und *Social Interaction* (SI)-Test zeigte sich nämlich ein Trend, dass ELS-wt-Tiere im Vergleich zu KONT-wt-Mäusen mutiger und sozial interaktiver waren. Dieses Ergebnis wurde bei den heterozygoten Tieren nicht festgestellt. Jedoch wurde weder im OF- noch im SI-Test ein Unterschied ermittelt, als die vier untersuchten Gruppen älter wurden.

Rice et al. (2008) stellten im OF-Test keinen Unterschied zwischen wildtypischen ELS- und Kontrolltieren im Alter von 7-8 Monaten fest, genauso wenig wie Wang et al. (2012) in 3 Monate alten Versuchstieren (129S2/Sv und C57BL/6J) (Rice et al., 2008; Wang et al., 2012). Ferner zeigten 2-3 Monate alte *Tsc2*^{+/-}-Mäuse im OF-Test ein ähnliches Verhalten wie Wildtypen (Potter et al., 2013; Yang et al., 2015).

Ehninger et al. (2008, 2012) detektierten hinsichtlich der sozialen Interaktion von 3-6 Monate alten *Tsc2*^{+/-}- und Kontrollmäusen keinen Unterschied, allerdings wurde hier ein anderer Versuchsaufbau als in dieser Arbeit verwendet (*3-chamber test*) (Ehninger et al., 2008, 2012). Sato et al. (2012) verwendeten einen zu dieser Arbeit ähnlicheren SI-Test, bei dem *Tsc2*^{+/-}-Tiere (3 - 7 Monate alt) signifikant weniger interagierten. Dabei wurden allerdings die Mäuse 2 Stunden lang getestet, während der SI-Test dieser Arbeit 2,5 Minuten dauerte (Sato et al., 2013). Eine reduzierte Interaktion berichteten auch Tang et al. (2014) bei jüngeren *Tsc2*^{+/-}-Tieren (P30 – P35) im *3-chamber*-Test (Tang et al., 2014). Verglichen mit dem SI-Versuch dieser Arbeit unterschied sich die Versuchsdurchführung und -auswertung bei Tang et al. (2014): Es wurde die durchschnittliche absolute Erkundungszeit des neuen Objektes zwischen wildtypischen und *Tsc2*^{+/-}-Mäusen verglichen anstatt des relativen Verhältnisses (SI Index) wie in dieser Arbeit (Tang et al., 2014).

Der Einfluss des hier verwendeten ELS-Paradigmas auf die soziale Interaktion bei C57BL/6J-Mäusen wurde in der Literatur m. E. bisher noch nicht beschrieben. Um jedoch die oben geschilderte Hypothese eines möglichen protektiven Einflusses von ELS zu erörtern, sollen im Folgenden zwei Studien vorgestellt werden, die ähnliche Beobachtungen wie in dieser Arbeit veröffentlicht haben. Bondar et al. (2018) haben die Auswirkung von unterschiedlich intensivem, frühkindlichem Stress auf das Verhalten adulter Mäuse untersucht und herausgefunden, dass sich „moderater“ frühkindlicher Stress positiv auswirkt (Bondar et al., 2018). So zeigten 3 Monate alte männliche C57BL/6J-Mäuse, die von P2 – P14 täglich für 15 Minuten von der Mutter separiert worden waren, eine signifikant bessere Fähigkeit zur sozialen Interaktion im Vergleich zu Kontrollmäusen oder Tieren, die intensiveren frühkindlichen Stress erfahren hatten (3 Stunden Separation täglich im gleichen Zeitraum).

Außerdem hielten sich männliche Tiere mit milder Stressexposition im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen signifikant länger im Arealszentrum während des *Open Field*-Tests auf (Bondar et al., 2018). Auch Savignac et al. (2011) haben zwei verschiedene Protokolle neonatalen Stresses verwendet und die Auswirkungen auf Verhaltensebene bei männlichen C57BL/6OlaHsd-Mäusen analysiert (Savignac et al., 2011). Dabei waren die Nachkommen entweder von P1 – P14 (starker Stress) oder von P6 – P10 (milder Stress) täglich für 3 Stunden von der Mutter getrennt worden. Im Alter von 2 Monaten wurde bei den Stressgruppen kein Unterschied im *Open Field*-Test im Vergleich zu Kontrolltieren ermittelt. Auch anhand der untersuchten Parameter in anderen Verhaltenstests fanden die Autoren kein reduziertes Angstverhalten als Folge von chronischem frühkindlichem Stress. Stattdessen fanden die Autoren, dass Mäuse aus der stärkeren Stressgruppe sogar weniger ängstlich waren (Savignac et al., 2011).

In dieser Arbeit wurden bei den Ergebnissen des OF- und SI-Tests keine statistisch signifikanten Unterschiede, sondern nur Tendenzen gefunden. Möglicherweise war das verwendete ELS-Paradigma im Vergleich zu denen von Bondar et al. (2018) und Savignac et al. (2011) nicht ausreichend effektiv, um Änderungen auf Verhaltensebene zu bewirken. Die Ergebnisse dieser Arbeit von ELS-erfahrenen und ELS-unerfahrenen *Tsc2*^{+/−}-Tieren (KONT-het und ELS-het) im Vergleich zu Wildtypen (KONT-wt und ELS-wt) lassen sich mit denen anderer Studien nicht unmittelbar vergleichen, da unterschiedliche Verfahrensweisen verwendet wurden. Schlussendlich haben weder ELS noch die *Tsc2*-Mutation bzw. eine Kombination aus beiden Faktoren gravierende Auswirkungen auf das Angstverhalten, auf die Lokomotion oder auf die soziale Interaktion bei 2 bis 6 Monate alten Tieren induziert.

4.2.2.3 Der Einfluss von ELS und *Tsc2*-Mutation auf das Langzeitgedächtnis

Wie bereits für die Etablierungsphase geschildert, war die Explorationszeit (EZ) von 9 und 16 Wochen alten ELS-Tieren in den NORTs geringer im Vergleich zu ELS-unerfahrenen Tieren, während die Präferenz für das neue Objekt zwischen den Gruppen ähnlich war. In der Projektphase zeigte sich im 7 Tage-NORT bei 6 Monate alten Tieren ein Trend, dass ELS-wt-Mäuse im Vergleich zu ELS-het-Tieren das neue Objekt weniger präferierten. Hinsichtlich der EZ unterschieden sich die beiden Gruppen nicht. Allerdings war die EZ der ELS-wt-Mäuse signifikant niedriger als die der KONT-wt-Gruppe. Berücksichtigt man, dass die 4 Monate alten ELS-wt-Tiere der Etablierungsphase keine kognitiven Beeinträchtigungen zeigten, besteht die Vermutung, dass sich ein möglicher ELS-Einfluss auf das Langzeitgedächtnis erst in älteren Tieren abzeichnet. Dies wird ferner durch die Ergebnisse von Naninck et al. (2015) und Rice et al (2008) bestätigt, die in 5 Monate alten ELS-Mäusen im 7 Tage-NORT

bzw. in 8 Monate alten ELS-Mäusen (wt) im 24 Std.-NORT ein beeinträchtigtetes Erinnerungsvermögen durch ELS feststellen konnten (Naninck et al., 2015; Rice et al., 2008).

Der DI-Unterschied zwischen ELS-wt- und ELS-het-Tieren könnte wiederum dafür sprechen, dass sich ELS entweder protektiv auf das Langzeitgedächtnis der heterozygoten Tiere (ELS-het) auswirkt, da bei diesen Tieren die höchsten DI-Werte gemessen wurden. Andererseits könnte die Möglichkeit bestehen, dass ELS-induzierte Veränderungen des Langzeitgedächtnisses bei *Tsc2^{+/-}*-Mäusen nicht durchschlagen und sie demnach ELS-resistent sind. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass die *Tsc2^{+/-}*-Mutation die Tiere vor ELS-Effekten auf das Erinnerungsvermögen in gewisser Weise schützt.

Wie bei den 4 Monate alten ELS-wt-Mäusen der Etablierungsphase fanden sich vor allem Auffälligkeiten hinsichtlich der EZ bei gleichaltrigen ELS-Tieren der Projektphase. ELS-het-Tiere explorierten mehr als ELS-wt-Mäuse oder KONT-het-Mäuse (statistische Tendenzen). Und im Alter von 6 Monaten explorierten ELS-wt-Tiere im Durchschnitt signifikant länger als KONT-wt-Mäuse. Diese Beobachtung von den ELS-wt-Tieren könnte durch eine verminderte Aktivität erklärt werden. Die 3 Monate alten ELS-Tiere in der Studie von Wang et al. (2012) zeigten schließlich im OF-Test eine reduzierte lokomotorische Aktivität (Wang et al., 2012). In den übrigen das gleiche ELS-Paradigma wie in dieser Arbeit verwendenden Studien wurde keine ELS-assoziierte Änderung in der Lokomotion berichtet (Naninck et al., 2015; Rice et al., 2008; Yang et al., 2015). Auch Savignac et al. (2011) beobachteten eine weder durch moderaten noch durch strengeren frühkindlichen Stress beeinflusste Aktivität bei männlichen Tieren (Savignac et al., 2011). Im Gegensatz dazu beobachteten Bondar et al. (2018), dass sich männliche Mäuse weniger bewegten, nachdem sie das intensivere Stress-Protokoll erfahren hatten (Bondar et al., 2018). Die Ergebnisse der aufgeführten Studien liefern daher keinen eindeutigen Hinweis, dass die reduzierte EZ der ELS-wt-Tiere auf lokomotorische Veränderungen zurückzuführen sein könnte. Da der NORT auf spontanem Erkundungsverhalten basiert, könnte es eher sein, dass bei den ELS-wt-Mäusen eine geminderte Motivation oder Bereitschaft zur Testdurchführung vorlag. Angst-assoziiertes Verhalten konnte ausgeschlossen werden, da diese Tiere im OF-Test mehr Zeit als Kontrollmäuse im Arealszentrum verbrachten.

Bei den KONT-het-Tieren wurde keine Einschränkung des Langzeitgedächtnisses beobachtet. Sato et al. (2012) fanden ebenfalls keinen Unterschied zwischen 2 Monate alten wildtypischen Kontrollen und *Tsc2^{+/-}*-Mäusen (Sato et al., 2012). In der Studie von Tang et al. (2014) präferierten 1 Monat alte *Tsc2^{+/-}*-Mäuse das neue Objekt genau so sehr wie wildtypische Kontrollen, allerdings hielten sie sich signifikant kürzer mit dessen Erkundung auf (Tang et al., 2014). Da von Tang et al. (2014) jedoch wieder andere Messwerte (absolute

Explorationszeiten der neuen Objekte) statistisch analysiert wurden und die Tiere deutlich jünger waren, ist ein unmittelbarer Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht möglich.

Für die NORT-Ergebnisse dieser Arbeit kann zusammenfassend festgehalten werden, dass keine Genotyp-assoziierten Einflüsse auf das Langzeit-Erinnerungsvermögen von bis zu 6 Monate alten Mäusen festgestellt wurden. ELS-erfahrene Mäuse zeigten zwar keine kognitiven Beeinträchtigungen, jedoch war das spontane Erkundungsverhalten in diesen Mäusen reduziert. Mäuse, bei welchen beide Faktoren – ELS und *Tsc2*-Mutation – vorlagen, schienen den Test mit 6 Monaten im Vergleich zu den anderen drei Gruppen am besten zu absolvieren. Dies könnte andeuten, dass ELS entweder gar keinen Einfluss auf die *Tsc2*^{+/-}-Tiere hatte oder sogar einen positiven Effekt.

4.2.2.4 Der Einfluss von ELS und *Tsc2*-Mutation auf das Arbeitsgedächtnis

Im *Sponaneous Alternation* (SA)-Test, der Aufschluss über das kurzzeitige, räumliche und das Arbeitsgedächtnis gibt und ebenfalls auf spontanem Erkundungsverhalten beruht, zeigte sich im Alter von 4 Monaten ein starker Trend, dass ELS-het-Mäuse diesen Versuch schlechter absolvierten als KONT-het-Tiere. Im Alter von 6 Monaten lagen keine Unterschiede zwischen den vier Gruppen vor. Yang et al. (2015) hatten den SA-Test mit 2,5 Monate alten Mäusen durchgeführt und ebenfalls keinen Unterschied zwischen wildtypischen Kontroll- und ELS-Tieren vorgefunden (Yang et al., 2015). Savignac et al. (2011) zeigten, dass weder das milde noch das strenge Protokoll neonatalen Stresses eine Auswirkung auf 2 Monate alte, männliche Wildtyp-Mäuse im SA-Test hatten (Savignac et al., 2011). Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit lagen keine Publikationen vor, die den Test bereits mit der *Tsc2*^{+/-}-Mauslinie beschrieben haben, weshalb ein Vergleich der Ergebnisse der Arbeit und ihre Interpretation nicht möglich war. Die Beobachtung, dass ELS-het-Tiere mit 4 Monaten in kognitiven Kurzzeit-Prozessen eingeschränkter sind, könnte zwar auf einen, sich in diesem Fall negativ auswirkenden additiven Effekt von ELS auf den *Tsc2*^{+/-}-Genotypen hinweisen. Da sich dieses Ergebnis jedoch im Alter von 6 Monaten nicht wiederholte, könnten andere Faktoren ursächlich dafür sein, wie später noch erörtert werden soll (s. Punkt 4.2.2.6).

4.2.2.5 Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse mit ähnlichen Studien

In der Zusammenfassung haben die Verhaltensexperimente der Projektphase dokumentiert, dass ELS bei 2 Monate alten wildtypischen Tieren (ELS-wt-Gruppe) einen subtilen anxiolytischen Effekt hat und sozial aktiveres Verhalten induziert. Im Alter von 4 Monaten

zeigten ELS-het-Mäuse keine Einschränkung des Langzeitgedächtnisses, allerdings eine erhöhte Motivation zur Exploration (abgeleitet durch die erhöhte EZ). Dafür schienen ihr räumliches und ihr Arbeits-Gedächtnis im Vergleich zu den anderen Gruppen beeinträchtigt zu sein (starker Trend). Im Alter von 6 Monaten wurde jedoch in keiner der vier Gruppen eine Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses vorgefunden. Dafür wurde in diesem Alter ein negativer ELS-Effekt auf das Langzeitgedächtnis mit gleichzeitig reduziertem Erkundungsverhalten bei wildtypischen Tieren (ELS-wt-Gruppe) festgestellt. Ferner waren diese Mäuse am wenigsten motiviert oder interessiert. Das Gegenteil wurde bei ELS-het-Mäusen beobachtet, was entweder auf einen positiven ELS-Effekt oder eine Art ELS-Resistenz bedingt durch die *Tsc2*-Mutation bei diesen Tieren hindeuten könnte. Eine mögliche Theorie zur Erklärung des positiven Effekts von ELS auf die *Tsc2*-Mutation wäre, dass die Kombination aus beiden Faktoren (ELS und *Tsc2*-Mutation) den mTOR-Signalweg in gewisser Weise normalisieren könnte. Denn einerseits entwickeln *Tsc2*^{+/-}-Tiere aufgrund einer Haploinsuffizienz eine mTOR-Hyperaktivität (Polchi et al., 2018; Switon et al., 2016). Andererseits haben Studien gezeigt, dass chronischer Stress zu einer mTOR-Hypoaktivität führt (Chandran et al., 2013; Tang et al., 2015; Zhong et al., 2014). Auch wenn molekularebiologische Untersuchungen weitere Hinweise geliefert hätten, steht dieser Theorie jedoch die Tatsache entgegen, dass kein Unterschied zwischen ELS-unerfahrenen Wildtypen (KONT-wt) und *Tsc2*^{+/-}-Mäusen (KONT-het) bis zu einem Alter von 6 Monaten festgestellt wurde.

In den Studien, die zum Vergleich und zur Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit herangezogen wurden, sowie auch in weiteren Studien wurde allerdings von molekulargenetischen Hirngewebs- und Verhaltensauffälligkeiten als Folge von ELS oder bedingt durch die *Tsc2*-Haploinsuffizienz berichtet:

Als Folge von frühkindlichem Stress durch reduziertes Nistmaterial fanden Malter Cohen et al. (2013) verstärktes angstassoziiertes Verhalten im „*novelty-induced hypophagia*“ (NIH)-Test (Malter Cohen et al., 2013). Dieser Test erfasst das Zögern bei der Nahrungsaufnahme, das in einer ungewohnten Situation besteht. Dabei wird nach einer bestimmten Trainingsphase dem Nagetier schmackhaftes Futter in einer neuen Umgebung präsentiert und die Latenzzeit bis zum Fressen bzw. die Nahrungsmenge gemessen (Dulawa & Hen, 2005). Die Autoren haben anhand dieses Tests und weiterer neurologischer Untersuchungen festgestellt, dass Veränderungen in der neuronalen Vernetzung und Funktion der *Amygdala* in ELS-Mäusen (2 Monate alt, wt, C57BL/6J) vorhanden waren und bis ins Erwachsenenalter persistierten (Malter Cohen et al., 2013). Dementsprechend schlussfolgerten sie, dass ELS das emotionale Verhalten beeinflusst, und stellten ferner Analogien zum Verhalten menschlicher Waisen fest, die im frühen Kindesalter adoptiert wurden (Malter Cohen et al., 2013).

Defizite in kognitiven Leistungen fanden Rice et al. (2008) und Wang et al. (2012) in 4-6 Monate alten wildtypischen ELS-Tieren im „*Morris Water Maze*“ (MWM)-Test (Rice et al., 2008; Wang et al., 2012). Beim MWM-Test schwimmen die Tiere in einem Wasserbecken, in dem sich eine Zuflucht bietende Plattform befindet. Da das Wasser eingetrübt und die Plattform nicht sichtbar ist, ist räumliches Orientierungsvermögen erforderlich, das die Maus durch angebrachte Hinweise in der Versuchsumgebung ableiten kann. Nach mehreren Trainingstagen, an denen die Mäuse die Lokation der Plattform erlernen, wird die Plattform am Testtag entfernt. Die Lerngeschwindigkeit während des Trainings weist auf das räumliche Orientierungsvermögen und die Erinnerungskonsolidierung hin. Die Aufenthaltsnähe zur vorherigen Position der Plattform am Testtag lässt Rückschlüsse auf das Referenzgedächtnis zu (Nunez, 2008). Neben den kognitiven Leistungsdefiziten wurden veränderte *corticotropin releasing hormone (Crh)*-Expressionen im PVN beobachtet, die auf eine veränderte Regulation der HPA-Achse hinwiesen (Gunn et al., 2013; Rice et al., 2008). Wang et al. (2012) stellten keine Veränderung in der *Crh*- und *Arginin-Vasopressin*-Expression in PVN und *Hippocampus* fest, zudem auch keinen Unterschied im Vorkommen von Mineralogluocorticoid- und Glucocorticoidrezeptoren (MR und GR) im *Hippocampus* (Wang et al., 2012). Dafür fanden die Autoren eine reduzierte Expression von *Neurexin-1* und *Neurotrophin-3* gepaart mit elektrophysiologischen Veränderungen der Neuronen des *Hippocampus* (Molet, Maras, Avishai-Eliner & Baram, 2014; Wang et al., 2012). Arp et al. (2016) gingen der Frage nach, ob die Angst-Erinnerung (*fear memory*) durch ELS beeinflusst ist (Arp et al., 2016). Im Speziellen wurde die Fähigkeit der Mäuse gemessen, zwischen bedrohlichen und sicheren Situationen zu unterscheiden (Arp et al., 2016). Die Autoren dokumentierten bei adulten (4 Monate, wt) männlichen ELS-Tieren eine erhöhte *Freezing* (Erstarren)-Rate, die erst nach wiederholter Stress-Exposition auftrat, jedoch keinen Unterschied im Vorkommen von GR und MR im *Hippocampus* (Arp et al., 2016). Naninck et al. (2015) fanden bei 9 Tage alten wildtypischen ELS-Nachkommen eine erhöhte Neurogenese im Gewebe des *Hippocampus*, jedoch eine Reduktion im Alter von 4 Monaten. Zudem korrelierten diese Veränderungen mit dem Lern- und Erinnerungsvermögen der Mäuse, sodass auch diese Autoren ELS-abhängige Veränderungen im *Hippocampus* zeigten (Naninck et al., 2015). Eine durch ELS veränderte und zum Teil bis ins Erwachsenenalter nachweisbare strukturelle Plastizität der Neuronen des präfrontalen *Cortex* beschrieben Yang et al. (2015). Diese Veränderungen korrelierten die Autoren mit einer reduzierten kognitiven Leistung, wie bereits weiter oben ausführlich geschildert wurde (Yang et al., 2015).

Während Ehninger et al. (2008), wie bereits geschildert, keine veränderte soziale Interaktion von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen feststellten, zeigten diese Mäuse signifikante Defizite bei *Hippocampus*-basierten Aufgaben wie dem MWM-Test oder dem „*radial arm maze*“-Test (Ehninger et al., 2008), welcher ebenfalls Rückschlüsse über das räumliche Erinnerungsvermögen ziehen lässt. Zudem wiesen die Autoren eine Veränderung der synaptischen Plastizität der *hippocampalen* Neuronen bei den Mutanten nach (Ehninger et al., 2008). Wie zuvor erwähnt, hatten Potter et al. (2013) keinen Unterschied im OF-Test zwischen *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und Wildtypen festgestellt, dafür aber im *radial arm water maze*-Test (Potter et al., 2013). Dieser Test stellt eine anspruchsvollere Version des MWM-Tests dar. In dem Experiment sollten Testmäuse die zuvor erlernte Objektposition in einem Kontext „vergessen“ und stattdessen die zuletzt gelernte Objektposition anpeilen. In der Studie lokalisierten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse jedoch häufiger die zuerst gelernte Position (Potter et al., 2013). Tang et al. (2014) fanden im Temporallappen sowohl beim Menschen als auch in der Maus eine erhöhte Dichte und ein reduziertes „*pruning*“ der dendritischen Dornfortsätze. *Pruning* ist Bestandteil der postnatalen Entwicklungsdynamik von Synapsen im Säugetier-Cortex, die sowohl auf Neubildung als auch auf Eliminierung (*pruning*) von Synapsen beruht. Da im Kindesalter die Synapsenbildung überwiegt, ermöglichen überschüssige exzitatorische Synapsen den Aufbau neuronaler Schaltkreise. Dementsprechend ist die Dichte der dendritischen Dornfortsätze im Kindesalter am höchsten, bis der *pruning*-Prozess einsetzt. Dieser wirkt der Dornfortsatzbildung entgegen, sodass die Dornfortsatzdichte bis zum Erwachsenenalter stetig abnimmt. Auf diese Weise erfolgt eine bedarfsabhängige Selektion und Etablierung neuronaler Schaltkreise. Genau dieser Mechanismus war bei *Tsc2*^{+/-}-Mäusen gestört (Tang et al., 2014).

Wenn auch die hier angeführten Studien verschiedene Verhaltenstests, Auswertungen und Mäuse unterschiedlichen Alters verwendet haben, belegen diese einen molekularen und verhaltensphänotypischen Effekt durch ELS und durch die *Tsc2*-Haploinsuffizienz. Daher stellt sich die Frage, weshalb sich in dieser Arbeit nur dezente Unterschiede in den Verhaltensparametern ergaben. In diesem Kontext ist die Studie von Lesuis et al. (2016) anzuführen. Die Autoren untersuchten die Auswirkung von ELS auf die Ausprägung und den Fortschritt der Alzheimer-Krankheit im Mausmodell (Lesuis et al., 2016). Typisch für die Alzheimer-Krankheit sind die Einlagerungen von extrazellulären amyloiden Plaques (A β -Amyloide) und aberrante Neurofibrillen innerhalb der Neuronen (neurofibrilläre Tauopathie). Da beide Merkmale sämtliche Gehirnregionen betreffen, wird ein Zusammenhang mit synaptischen und neuronalen Störungen diskutiert, die ursächlich für die Abnahme kognitiver Leistungen sein können (Lesuis et al., 2016). Für ihre Untersuchungen verwendeten die Autoren ein validiertes, bigenes transgenes Mausmodell (APP.V717I x Tau.P301L, „biAT“), das sowohl amyloide Plaques als auch Tau-Fibrillen entwickelt. In der postnatalen Phase (P2 bis P9) erfuhren biAT-Mäuse entweder ELS oder „*daily handling*“. Bei letzterem Paradigma wurden

die Mäuserinnen täglich für 15 Minuten von ihrem Wurf getrennt, was eine übermäßige Zuwendung der Mutter bei der Wiedervereinigung zur Folge hatte und in der Studie für die Jungtiere als positive frühkindliche Erfahrung erachtet wurde (Lesuis et al., 2016). Tatsächlich überlebten die ELS-biAT-Mäuse kürzer und zeigten im Alter von 4 Monaten erhöhte A β -Amyloid-Proteine im *Hippocampus*. Hingegen überlebten die *daily handling*-biAT-Mäuse deutlich länger und zeigten eine reduzierte A β -Konzentration im *Hippocampus* (Lesuis et al., 2016). Die biAT-Mäuse wurden des Weiteren im Alter von 3 Monaten im OF-Test und NORT untersucht und es wurde kein Unterschied festgestellt. Allerdings waren beim NORT zwischen der Trainings- und der Testphase lediglich 4 Stunden Zeit vergangen (Lesuis et al., 2016). Als möglichen Mechanismus diskutierten die Autoren eine ELS-induzierte Änderung der Aktivität der HPA-Achse, denn im Alzheimer-Mausmodell wurden bereits erhöhte CORT-Konzentrationen nachgewiesen, welche mit einer beschleunigten Plaque-Bildung und abnormen Tau-Neurofibrillen korrelierten (Lesuis et al., 2016). Analog dazu wurde bei Alzheimer-Patienten ein erhöhter Cortisolspiegel gemessen, was ebenfalls auf eine geänderte Aktivität der HPA-Achse hinweisen könnte (Lesuis et al., 2016). Zusammengefasst zeigten Lesuis et al. (2016) in den untersuchten biAT-Mäusen auf molekularer Ebene einen negativen Einfluss von ELS auf den Verlauf der Alzheimer-Krankheit, jedoch nicht auf kognitiver Ebene, obwohl das Mausmodell von den Autoren als „starkes“ Modell hinsichtlich verwendeten Transgene bezeichnet wurde (Lesuis et al., 2016).

Interessanterweise war das verwendete *daily handling*-Paradigma von Lesuis et al. (2016) sehr ähnlich zum „moderaten“ neonatalen Stressprotokoll von Bondar et al. (2018), nur dass bei letzterem das ELS-Paradigma 5 Tage länger dauerte (Bondar et al., 2018). Beide Studien testeten 3 Monate alte Mäuse im OF-Test, allerdings waren die Tiere bei Bondar et al. (2018) weniger ängstlich (Bondar et al., 2018; Lesuis et al., 2016). Insofern stellt sich die Frage, ob die Dauer des Paradigmas oder die genetische Veränderung der Tiere ursächlich für die verschiedenen Verhaltensergebnisse sind.

4.2.2.6 Effekte durch wiederholtes Testen

Wie bereits geschildert, wurde in der Projektphase dieser Arbeit die Beobachtung gemacht, dass sich ein ELS-induzierter Effekt altersabhängig manifestiert. Während Naninck et al. (2015) kognitive Einschränkungen in 5 Monate alten, wildtypischen ELS-Mäusen geschildert haben, wurde in dieser Arbeit erst in 6 Monate alten, wildtypischen Mäusen ein leichter ELS-Effekt detektiert (Naninck et al., 2015). Daher wurde die Vorgehensweise bei den Verhaltenstests hinterfragt und der Faktor des Retestens als mögliche Ursache für den subtilen ELS-Phänotypen in Betracht gezogen. Denn bei keiner der hier angeführten Studien wurden wie in dieser Arbeit Mäuse in denselben Tests zu verschiedenen Lebenszeitpunkten

mehrfach getestet. Um einem Retest-Effekt nachzugehen, wurden die Ergebnisse der 7 Tage-NORTs während der Etablierungs- und der Projektphase statistisch miteinander verglichen. Die wildtypischen Kontrollmäuse der Projektphase zeigten einen signifikant reduzierten DI-Wert und eine signifikant erhöhte EZ im Vergleich zu Kontrollmäusen der Etablierungsphase. Während bei den ELS-Mäusen kein Unterschied im DI vorlag, war die EZ bei den ELS-Tieren der Projektphase ebenfalls signifikant höher als bei den ELS-Mäusen der Etablierungsphase. Offensichtlich waren die Mäuse der Projektphase durch das Retesten beeinflusst. McIlwain et al. (2001) zeigten in ihrer Studie nicht nur, dass die Reihenfolge der Experimente für das Verhalten von Mäusen entscheidend ist, sondern auch, dass sich Test-naive Mäuse anders verhalten als Mäuse, die eine „Test-Historie“ mitbringen (McIlwain, Merriweather, Yuva-Paylor & Paylor, 2001). Die Autoren verglichen daher das Verhalten von 3 – 4 Monate alten Test-erfahrenen und Test-naiven C57BL/6J-Mäusen. Im OF-Test waren die Werte der Test-naiven Mäuse im Vergleich zu denen der Test-erfahrenen Mäuse signifikant höher hinsichtlich der zurückgelegten Wegstrecke, der Bewegungsdauer und der vertikalen Aktivität. Dafür war die Aufenthaltsdauer im Arealszentrum gleich (McIlwain et al., 2001). In der Studie wurden die Mäuse des Weiteren hinsichtlich ihres Angstverhaltens in der *Light-Dark-Box* analysiert. In diesem Test wird der Maus innerhalb des Areals eine abgedunkelte Rückzugsmöglichkeit gegeben. Während kein Unterschied in der Aufenthaltsdauer und dem Wechsel zwischen dem hellen und dunklen Bereich gemessen wurde, war die Latenzzeit bis zum Betreten des dunklen Bereichs in Test-naiven Mäusen signifikant höher (McIlwain et al., 2001). Der Rotarod-Test findet auf einer Art Laufrad statt, in welchem die motorische Koordination und die Lernkapazität gemessen werden können. Diesen Test absolvierten die Test-erfahrenen Mäuse signifikant besser als Test-naive Tiere, obwohl zuvor eine Trainingsphase stattfand (in der Studie 4 Versuche an einem Versuchstag) (McIlwain et al., 2001). Im MWM-Test wurde kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt, allerdings zeigten die Test-naiven Mäuse bereits während der Trainingsphase aber auch in der Testphase ein selektiveres Suchverhalten (McIlwain et al., 2001). Auf eine heiße Platte gestellt (*hot plate*-Test) reagierten die Test-naiven Mäuse dafür signifikant langsamer als die Test-erfahrenen Mäuse (McIlwain et al., 2001). Vöikar et al. (2004) haben Test-erfahrene und Test-naive Mäuse verschiedener Mauslinien verglichen, unter anderem die Linie C57BL/6JOlaHsd (Vöikar, Vasar & Rauvala, 2004). Im OF-Test fanden die Autoren keinen Effekt durch eine Test-Historie. Interessant war jedoch, dass sie den OF-Test am Folgetag wiederholten und bereits einen Habituationseffekt bei den Mäusen feststellten (Vöikar et al., 2004). Im SA-Test waren Test-erfahrene Mäuse weniger aktiv und im *hot plate*-Test reagierten sie schneller als Test-naive Tiere (Vöikar et al., 2004). Auch im MWM-Test wurden für einzelne Parameter signifikante Unterschiede zwischen Test-naiven und Test-erfahrenen Mäusen beobachtet (Vöikar et al., 2004).

In der Studie von Schubert et al. (2004) absolvierten Test-erfahrene „NIRKO“-Mäuse mit neuronenspezifischem Insulinrezeptor-*Knock-out* den MWM-Test im Alter von 11 Monaten signifikant besser als gleichaltrige Test-naive Mäuse, da sie den Test schon 9 Monate zuvor absolviert hatten und sich immer noch daran erinnern konnten (Schubert et al., 2004).

Ein potenzieller Lerneffekt könnte auch bei den wiederholt getesteten Mäusen in dieser Arbeit eingestellt haben und eine mögliche Erklärung für die nur subtilen nachgewiesenen Unterschiede sein. Die Studien von McIlwain et al. (2001) und Vöikar et al. (2004) haben jedenfalls gezeigt, dass sich Test-erfahrene Mäuse anders verhalten. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit aus dem Vergleich der wildtypischen Kontroll- und ELS-Mäuse der Etablierungsphase mit den entsprechenden Gruppen der Projektphase. Ein Effekt durch Retesten könnte ferner die mit fortschreitendem Alter beobachtete Abnahme in der Aktivität und der Motivation der Tiere erklären.

4.2.2.7 Retesten und Resilienz

Um einen Effekt des Retestens bei den Verhaltensexperimenten zu überprüfen, wurde die Test/Retest-Reliabilität für jede Mausgruppe der Projektphase geprüft. Die Test/Retest-Reliabilität bezeichnet die Zuverlässigkeit, dass bei wiederholten Prüfungen gleiche Ergebnisse erzielt werden. Testwiederholungen geben Aufschluss über die Verbesserung oder Verschlechterung individueller Leistung über einen gewissen Zeitraum. Jedoch kann die Zuverlässigkeit durch Vorerfahrungen, die durch das Absolvieren von identischen Tests gemacht wurden, verfälscht werden. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, abgewandelte Verfahren bei Testwiederholungen einzusetzen, um mögliche Lerneffekte zu umgehen (De Fiebre, Sumien, Forster & De Fiebre, 2006). Die Test/Retest-Reliabilität wurde anhand der Ergebnisse aus der Projektphase mittels einer Korrelationsanalyse durchgeführt (Crusio, W., Sluyter, F., Gerlai, R., & Pietropaolo, 2013). Eine Retest-Reliabilität wurde lediglich im 7 Tage-NORT beim DI von ELS-het-Tieren und im *Social Interaction*-Test bei KONT-het-Mäusen verzeichnet. Ansonsten lagen keine weiteren Korrelationen vor. Die Retest-Reliabilität war durch die experimentelle Vorgehensweise demnach nicht erfüllt, da die Varianz der Gruppen zu hoch war. Dies spiegelte sich in der Streuung der Messwerte jeder Gruppe in allen Tests wider. Somit konnte ein Lerneffekt durch das Retesten nicht ausgeschlossen werden.

Wenn jedoch durch Retesten die ELS- und Genotyp-abhängigen Effekte abgemildert werden, wäre Retesten an sich als positiver Einfluss, zumindest auf Verhaltensebene, zu betrachten. Dass sich sowohl ELS als auch die *Tsc2*-Mutation auf endokriner, neurologischer und Verhaltensebene auswirken, wurde bereits weiter oben anhand anderer Studien

detailliert ausgeführt. Insofern könnte das Retesten, welches das mehrfach wiederholte Habitieren an den Experimentator, an die Versuchsumgebung und an den Ablauf des Experiments umfasst, bei Versuchstieren zu einer Resilienz führen. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Lehmann und Herkenham (2011) im Zusammenhang mit einer „angereicherten Umgebung“ bei gestressten Mäusen beschrieben (Lehmann & Herkenham, 2011). In ihrer Studie wurden 10 – 12 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse für 3 Wochen entweder (a) in größeren, komfortableren Käfigen mit diversen Unterschlupf bietenden Objekten und Laufrädern (angereicherte Umgebung), (b) in kleineren Standardkäfigen (Standardumgebung) oder (c) in kleineren, reduziert ausgestatteten Käfigen (dürftige Umgebung) gehalten. Die einzelnen Gruppen erfuhren anschließend ein 2-wöchiges Stressparadigma (*social defeat*), in welchem sie täglich für 5 Minuten den Attacken einer aggressiven CD1-Maus ausgesetzt wurden (Lehmann & Herkenham, 2011). In anschließenden Verhaltenstests untersuchten die Autoren einen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Haltungsbedingungen und der nachträglich erfahrenen Stressexposition. Mäuse, die in einer angereicherten Umgebung gehalten wurden, waren weniger ängstlich, weniger depressiv und zeigten eine höhere soziale Interaktion im Vergleich zu Mäusen, die in einer Standard- oder dürftigen Umgebung gehalten worden waren und maladaptives Verhalten zeigten (Lehmann & Herkenham, 2011). Daher schlussfolgerten die Autoren, dass durch eine angereicherte Umgebung die Entstehung von Resilienz gefördert wird (Lehmann & Herkenham, 2011).

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit, vor allem den Resultaten der Projektphase, müssen also aufgrund der Strategie des Retestens als weitere Faktoren ein Lerneffekt bzw. das Einstellen einer Resilienz in Betracht gezogen werden, welche mit eingeflossen sein könnten. Um den Einfluss von ELS oder der *Tsc2*-Mutation in fortschreitendem Alter zu bestimmen, hätte die zusätzliche Verwendung von Test-naiven Tieren pro Altersstufe eine Aufschlüsselung über den Beitragsgehalt jedes untersuchten Faktors (ELS, *Tsc2*-Mutation, Lerneffekt, Resilienz) erlaubt. Alternativ hätte man den Versuchsaufbau variieren können. Lerneffekte lassen sich zum Beispiel durch neue Testumgebungen abmildern, indem man anders gestaltete Testareale verwendet. Im SI-Test könnte man die Mauslinien der fremden Maus wechseln oder besser noch, einen anderen Aufbau, wie den *3-chamber*-Test, verwenden. Kurzum, durch eine leichte Abwandlung, die dennoch Rückschlüsse auf die zu untersuchenden Fertigkeiten gibt, werden Lerneffekte durch Testwiederholungen abgeschwächt (Crusio, W., Sluyter, F., Gerlai, R., & Pietropaolo, 2013).

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abi Habib, W., Brioude, F., Azzi, S., Rossignol, S., Linglart, A., Sobrier, M.-L. et al. (2019). Transcriptional profiling at the DLK1/MEG3 domain explains clinical overlap between imprinting disorders. *Science Advances*, 5(2), eaau9425. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9425>
- Altman, E., Yango, P., Moustafa, R., Smith, J. F., Klatsky, P. C. & Tran, N. D. (2014). Characterization of human spermatogonial stem cell markers in fetal, pediatric, and adult testicular tissues. *Reproduction*, 148(4), 417–427. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0123>
- Ammerman, R. T., Van Hasselt, V. B. & Hersen, M. (1991). Parent - child problem-solving interactions in families of visually impaired youth. *Journal of Pediatric Psychology*, 16(1), 87–101. <https://doi.org/10.1093/jpepsy/16.1.87>
- Amouroux, R., Nashun, B., Shirane, K., Nakagawa, S., Hill, P. W. S., D'Souza, Z. et al. (2016). De novo DNA methylation drives 5hmC accumulation in mouse zygotes. *Nature Cell Biology*, 18(2), 225–233. <https://doi.org/10.1038/ncb3296>
- Antunes, M. & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Arp, J. M., ter Horst, J. P., Loi, M., den Blaauwen, J., Bangert, E., Fernández, G. et al. (2016). Blocking glucocorticoid receptors at adolescent age prevents enhanced freezing between repeated cue-exposures after conditioned fear in adult mice raised under chronic early life stress. *Neurobiology of Learning and Memory*, 133, 30–38. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.05.009>
- Bajrami, E. & Spiroski, M. (2016). Genomic Imprinting. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 4(1), 181. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2016.028>
- Barker, G. R. I., Bird, F., Alexander, V. & Warburton, E. C. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: A disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *Journal of Neuroscience*, 27(11), 2948–2957. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5289-06.2007>
- Baverstock, K. & Rönkkö, M. (2008). Epigenetic regulation of the mammalian cell. *PLoS ONE*, 3(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002290>
- Bear, M. F., Connors, B. W. & Paradiso, M. A. (2018). *Neurowissenschaften*. (A.K. Engel, Hrsg.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-57263-4>
- De Bellis, M. D., Keshavan, M. S., Clark, D. B., Casey, B. ., Giedd, J. N., Boring, A. M. et al. (1999). Developmental traumatology part II: brain development. *Biological Psychiatry*, 45(10), 1271–1284. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00045-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00045-1)
- Birbaumer, N. & Schmidt, R. F. (2010). *Biologische Psychologie* (Springer-Lehrbuch). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-95938-0>
- Bockaert, J. & Marin, P. (2015). mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiological Reviews*, 95(4), 1157–1187. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2014>
- Bondar, N. P., Lepeshko, A. A. & Reshetnikov, V. V. (2018). Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects. *Behavioural Neurology*, 2018, 32–34. <https://doi.org/10.1155/2018/1538931>
- Brinks, V., van der Mark, M., de Kloet, R. & Oitzl, M. (2007). Emotion and cognition in high and low stress sensitive mouse strains: A combined neuroendocrine and behavioral study in BALB/c and C57BL/6J mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 1(DEC). <https://doi.org/10.3389/neuro.08.008.2007>
- Brune, B. & Brune, T. (2017). Epigenetik: Einfluss auf die fetale Entwicklung. *Frauenheilkunde up2date*, 11(05), 479–498. <https://doi.org/10.1055/s-0043-123627>
- Brunson, K. L., Kramár, E., Lin, B., Chen, Y., Colgin, L. L., Yanagihara, T. K. et al. (2005). Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress. *Journal of Neuroscience*, 25(41), 9328–9338. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2281-05.2005>

- Cadet, J. L. (2014). Epigenetics of Stress, Addiction, and Resilience: Therapeutic Implications. *Molecular Neurobiology*, 12, 145–153. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9040-y>
- Carrion, V. G., Weems, C. F., Watson, C., Eliez, S., Menon, V. & Reiss, A. L. (2009). Converging evidence for abnormalities of the prefrontal cortex and evaluation of midsagittal structures in pediatric posttraumatic stress disorder: An MRI study. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 172(3), 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2008.07.008>
- Chandran, A., Iyo, A. H., Jernigan, C. S., Legutko, B., Austin, M. C. & Karolewicz, B. (2013). Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 40(1), 240–245. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.08.001>
- Chapman, D. P., Whitfield, C. L., Felitti, V. J., Dube, S. R., Edwards, V. J. & Anda, R. F. (2004). Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood. *Journal of Affective Disorders*, 82(2), 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2003.12.013>
- Chen, C. C., Wang, K. Y. & Shen, C. K. J. (2012). The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. *Journal of Biological Chemistry*, 287(40), 33116–33121. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.406975>
- Chen, Y. & Baram, T. Z. (2016). Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 197–206. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.181>
- Chiba, A. A., Kesner, R. P. & Gibson, C. J. (1997). Memory for temporal order of new and familiar spatial location sequences: Role of the medial prefrontal cortex. *Learning and Memory*, 4(4), 311–317. <https://doi.org/10.1101/lm.4.4.311>
- Colle, R., Segawa, T., Chupin, M., Tran Dong, M. N. T. K., Hardy, P., Falissard, B. et al. (2017). Early life adversity is associated with a smaller hippocampus in male but not female depressed in-patients: A case-control study. *BMC Psychiatry*, 17(1), 1–8. BMC Psychiatry. <https://doi.org/10.1186/s12888-017-1233-2>
- Conrad, S., Azizi, H., Hatami, M., Kubista, M., Bonin, M., Hennenlotter, J. et al. (2016). Expression of Genes Related to Germ Cell Lineage and Pluripotency in Single Cells and Colonies of Human Adult Germ Stem Cells. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8582526>
- Conrad, S., Renninger, M., Hennenlotter, J., Wiesner, T., Just, L., Bonin, M. et al. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*, 456(7220), 344–349. <https://doi.org/10.1038/nature07404>
- Costoya, J. A., Hobbs, R. M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M. et al. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature Genetics*, 36(6), 653–659. <https://doi.org/10.1038/ng1367>
- Crino, P. B. (2016). The mTOR signalling cascade: Paving new roads to cure neurological disease. *Nature Reviews Neurology*, 12(7), 379–392. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.81>
- Crusio, W., Sluyter, F., Gerlai, R., & Pietropaolo, S. (Hrsg.). (2013). *Behavioral Genetics of the Mouse: Volume 1: Genetics of Behavioral Phenotypes. Cambridge Handbooks in Behavioral Genetics* (Band 1). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/DOI:10.1017/CBO9781139541022>
- Cubeñas-Potts, C. & Matunis, M. J. (2013). SUMO: A Multifaceted Modifier of Chromatin Structure and Function. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.11.020>
- Cui, X., Jing, X., Wu, X., Yan, M., Li, Q., Shen, Y. et al. (2016). DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(4), 1973–1979. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3569>
- Curatolo, P., Bombardieri, R. & Jozwiak, S. (2008). Tuberous sclerosis. *The Lancet*, 372(9639), 657–668. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61279-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61279-9)
- Curatolo, P. P. (2015). Orphanet Encyclopedia. *Tuberöse Sklerose Komplex*. Zugriff am 30.12.2019. Verfügbar unter: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=DE&Expert=805

- Curley, J. P. & Champagne, F. A. (2016). Influence of maternal care on the developing brain: Mechanisms, temporal dynamics and sensitive periods. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 40, 52–66. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.11.001>
- Dada, R., Kumar, M., Jesudasan, R., Fernández, J. L., Gosálvez, J. & Agarwal, A. (2012). Epigenetics and its role in male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(3), 213–223. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9715-0>
- Danese, A., Moffitt, T. E., Harrington, H., Milne, B. J., Polanczyk, G., Pariante, C. M. et al. (2009). Adverse Childhood Experiences and Adult Risk Factors for Age-Related Disease. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 163(12), 1–7. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2009.214>
- Daser, A., Thangavelu, M., Pannell, R., Forster, A., Sparrow, L., Chung, G. et al. (2006). Interrogation of genomes by molecular copy-number counting (MCC). *Nature Methods*, 3(6), 447–453. <https://doi.org/10.1038/nmeth880>
- Davis, T. L., Trasler, J. M., Moss, S. B., Yang, G. J. & Bartolomei, M. S. (1999). Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics*, 58(1), 18–28. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5813>
- Delaney, C., Garg, S. K. & Yung, R. (2015). Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1343, 249–264. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2963-4_19
- Diken, E., Linke, M., Baumgart, J., Eshkind, L., Strand, D., Strand, S. et al. (2018). Superovulation Influences Methylation Reprogramming and Delays Onset of DNA Replication in Both Pronuclei of Mouse Zygotes. *Cytogenetic and Genome Research*, 95–105. <https://doi.org/10.1159/000493779>
- Donkin, I. & Barrès, R. (2018). Sperm epigenetics and influence of environmental factors. *Molecular Metabolism*, (March), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.006>
- Dulawa, S. C. & Hen, R. (2005). Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: The novelty-induced hypophagia test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4–5), 771–783. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.017>
- Dunn, E. C., Nishimi, K., Powers, A. & Bradley, B. (2017). Is developmental timing of trauma exposure associated with depressive and post-traumatic stress disorder symptoms in adulthood? *Journal of Psychiatric Research*, 84, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.09.004>
- Ebrahimi-Fakhari, D., Meyer, S., Vogt, T., Pföhler, C. & Müller, C. S. L. (2017). Dermatological manifestations of tuberous sclerosis complex (TSC). *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 15(7), 695–700. <https://doi.org/10.1111/ddg.13264>
- Ehlert, U. (Hrsg.). (2013). *Biopsychologie (Grundriß der Psychologie ; 26) (Band 722)*. Stuttgart: Kohlhammer. Verfügbar unter: http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=4013664&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm
- Ehninger, D., Han, S., Shilyansky, C., Zhou, Y., Li, W., Kwiatkowski, D. J. et al. (2008). Reversal of learning deficits in a Tsc2^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis. *Nature Medicine*, 14(8), 843–848. <https://doi.org/10.1038/nm1788>
- Ehninger, D., Sano, Y., De Vries, P. J., Dies, K., Franz, D., Geschwind, D. H. et al. (2012). Gestational immune activation and Tsc2 haploinsufficiency cooperate to disrupt fetal survival and may perturb social behavior in adult mice (*Molecular Psychiatry* (2012) 17, (62-70) DOI:10.1038/mp.2010.115). *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.115>
- Emani, M. R., Närvä, E., Stubb, A., Chakroborty, D., Viitala, M., Rokka, A. et al. (2015). The L1TD1 protein interactome reveals the importance of post-transcriptional regulation in human pluripotency. *Stem Cell Reports*, 4(3), 519–528. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.01.014>
- Essex, M. J., Shirtcliff, E. A., Burk, L. R., Ruttle, P. L., Klein, M. H., Slattery, M. J. et al. (2012). Influence of early life stress on later hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning and its covariation with mental health symptoms: A study of the allostatic process from childhood into adolescence. *Developmental psychopathology*, 23(4), 1039–1058. <https://doi.org/10.1017/S0954579411000484>.Influence

- Ezura, Y., Sekiya, I., Koga, H., Muneta, T. & Noda, M. (2009). Methylation status of CpG islands in the promoter regions of signature genes during chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis and rheumatism*, 60(5), 1416–1426. United States. <https://doi.org/10.1002/art.24472>
- Fayomi, A. P. & Orwig, K. E. (2018). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Research*, (29), 139–148. <https://doi.org/doi:10.1016/j.scr.2018.04.009>
- Felitti, V. J., Anda, R. F., Nordenberg, D., Williamson, D. F., Spitz, A. M., Edwards, V. et al. (1998). Relationship of Childhood Abuse and Household Dysfunction to Many of the Leading Causes of Death in Adults. *American Journal of Preventive Medicine*, 14(4), 245–258. [https://doi.org/10.1016/S0749-3797\(98\)00017-8](https://doi.org/10.1016/S0749-3797(98)00017-8)
- Felitti, V. J., Fink, P. J., Fishkin, R. E. & Anda, R. F. (2007). Ergebnisse der Adverse Childhood Experiences (ACE) – Studie zu Kindheitstrauma und Gewalt : Ergebnisse der Adverse Childhood Experiences (ACE) – Studie zu Kindheitstrauma und Gewalt. *Trauma & Gewalt* (Band 1, S. 18–32). Verfügbar unter: <https://elibrary.klett-cotta.de/article/99.120130/tg-1-2-18>
- Fernald, L. C. H. & Gunnar, M. R. (2009). Poverty-alleviation program participation and salivary cortisol in very low-income children. *Social science & medicine* (1982), 68(12), 2180–2189. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2009.03.032>
- De Fiebre, N. E. C., Sumien, N., Forster, M. J. & De Fiebre, C. M. (2006). Spatial learning and psychomotor performance of C57BL/6 mice: Age sensitivity and reliability of individual differences. *Age*, 28(3), 235–253. <https://doi.org/10.1007/s11357-006-9027-3>
- Fink, G. (2016). Stress, Definitions, Mechanisms, and Effects Outlined: Lessons from Anxiety. *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior: Handbook of Stress*, (December 2016), 3–11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00001-7>
- Forbes, C. M., Flannigan, R. & Schlegel, P. N. (2018). Spermatogonial stem cell transplantation and male infertility: Current status and future directions. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 171–180. Arab Association of Urology. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.015>
- Fox, S. E., Levitt, P. & Nelson, C. A. (2011). How the Timing and Quality of Early Experiences Influence the Development of Brain ArchitectureFox, S. E., Levitt, P., & Nelson, C. A. (2011). How the Timing and Quality of Early Experiences Influence the Development of Brain Architecture. *Child development*, 81(1), 28–40. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2009.01380.x>
- Franklin, T. B., Saab, B. J. & Mansuy, I. M. (2012). Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability. *Neuron*, 75(5), 747–761. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.016>
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E. & Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 36–47. <https://doi.org/10.1038/nrm3036>
- Ghafouri-Fard, S. & Taheri, M. (2019). Maternally expressed gene 3 (MEG3): A tumor suppressor long non coding RNA. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109129. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109129>
- Gharizadeh, B., Nordström, T., Ahmadian, A., Ronaghi, M. & Nyrén, P. (2002). Long-Read Pyrosequencing Using Pure 2'-Deoxyadenosine-5'-O'-(1-thiotriphosphate) Sp-Isomer. *Analytical Biochemistry*, 301(1), 82–90. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5494>
- Girardot, M., Feil, R. & Llères, D. (2013). Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications. *Epigenomics*, 5(6), 715–725. <https://doi.org/10.2217/epi.13.58>
- Goorden, S. M. I., Van Woerden, G. M., Van Der Weerd, L., Cheadle, J. P. & Elgersma, Y. (2007). Cognitive deficits in Tsc1+/- mice in the absence of cerebral lesions and seizures. *Annals of Neurology*, 62(6), 648–655. <https://doi.org/10.1002/ana.21317>
- van Goozen, S. H. M. & Fairchild, G. (2008). How can the study of biological processes help design new interventions for children with severe antisocial behavior? *Development and Psychopathology*, 20(3), 941–973. <https://doi.org/10.1017/S095457940800045X>

- Gould, T. D. (Hrsg.). (2009). *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (Neuromethods) (Band 42). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9>
- Gourion, D., Arseneault, L., Vitaro, F., Brezo, J., Turecki, G. & Tremblay, R. E. (2008). Early environment and major depression in young adults: A longitudinal study. *Psychiatry Research*, *161*(2), 170–176. Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2007.07.026>
- Graber, T. E., McCamphill, P. K. & Sossin, W. S. (2013). A recollection of mTOR signaling in learning and memory. *Learning and Memory*, *20*(10), 518–530. <https://doi.org/10.1101/lm.027664.112>
- Graw, J. (2016). Epigenetik. *Genetik* (Band 16, S. 129–145). <https://doi.org/10.1007/978>
- Greer, E. L. & Shi, Y. (2014). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*, *13*(5), 343–357. <https://doi.org/10.1038/nrg3173.Histone>
- Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R. & Joëls, M. (2012). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *350*(2), 299–309. Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.020>
- Guerrero-Bosagna, C. & Skinner, M. K. (2014). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of male infertility. *Current Opinion in Genetics and Development*, *26*, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.06.005>
- Gunn, B. G., Cunningham, L., Cooper, M. A., Corteen, N. L., Seifi, M., Swinny, J. D. et al. (2013). Dysfunctional Astrocytic and Synaptic Regulation of Hypothalamic Glutamatergic Transmission in a Mouse Model of Early-Life Adversity: Relevance to Neurosteroids and Programming of the Stress Response. *Journal of Neuroscience*, *33*(50), 19534–19554. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1337-13.2013>
- Gunnar, M. & Quevedo, K. (2007). The neurobiology of stress and development. *Annual review of psychology*, *58*, 145–173. United States. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.58.110405.085605>
- Gunnar, M. R., Bruce, J. & Grotevant, H. D. (2000). International adoption of institutionally reared children: Research and policy. *Development and Psychopathology*, *12*(4), 677–693. <https://doi.org/10.1017/S0954579400004077>
- Gunnar, M. R., Morison, S. J., Chisholm, K. & Schuder, M. (2001). Salivary cortisol levels in children adopted from Romanian orphanages. *Development and Psychopathology*, *13*(3), 611–628. <https://doi.org/10.1017/S095457940100311X>
- Guo, F., Li, X., Liang, D., Li, T., Zhu, P., Guo, H. et al. (2014). Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. *Cell Stem Cell*, *15*(4), 447–459. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.08.003>
- Guo, F., Yan, L., Guo, H., Li, L., Hu, B., Zhao, Y. et al. (2015). The transcriptome and DNA methylome landscapes of human primordial germ cells. *Cell*, *161*(6), 1437–1452. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.015>
- Guo, J., Grow, E. J., Mlcochova, H., Maher, G. J., Lindskog, C., Nie, X. et al. (2018). The adult human testis transcriptional cell atlas. *Cell Research*, *28*(12), 1141–1157. Springer US. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0099-2>
- Guo, J., Grow, E. J., Yi, C., Mlcochova, H., Maher, G. J., Lindskog, C. et al. (2017). Chromatin and Single-Cell RNA-Seq Profiling Reveal Dynamic Signaling and Metabolic Transitions during Human Spermatogonial Stem Cell Development. *Cell Stem Cell*, *21*(4), 533–546.e6. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.003>
- Haaf, T. (2006). Epigenetische Genomreprogrammierung in der Keimbahn und im frühen Embryo: Implikationen für die Reproduktionsmedizin. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol*, *3*(3), 136–140.
- Hackett, J. A. & Azim Surani, M. (2013). DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1609), 1–8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0328>

- El Hajj, N., Kutzt, J. & Haaf, T. (2015). Limiting Dilution Bisulfite Pyrosequencing®: A Method for Methylation Analysis of Individual DNA Molecules in a Single or a Few Cells. In U. Lehmann & J. Tost (Hrsg.), *Pyrosequencing: Methods and Protocols* (Band 1315, S. 221–239). New York, NY: Springer Science+Business Media New. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2715-9_17
- El Hajj, N., Trapphoff, T., Linke, M., May, A., Hansmann, T., Kutzt, J. et al. (2011). Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes. *Epigenetics*, *6*(10), 1176–1188. <https://doi.org/10.4161/epi.6.10.17202>
- El Hajj, N., Zechner, U., Schneider, E., Tresch, A., Gromoll, J., Hahn, T. et al. (2011). Methylation Status of Imprinted Genes and Repetitive Elements in Sperm DNA from Infertile Males. *Sexual Development*, *5*(2), 60–69. <https://doi.org/10.1159/000323806>
- Hambrick, E. P., Brawner, T. W. & Perry, B. D. (2019). Timing of Early-Life Stress and the Development of Brain-Related Capacities. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00183>
- Hanley, N. A., Hagan, D. M., Clement-Jones, M., Ball, S. G., Strachan, T., Salas-Cortés, L. et al. (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of Development*. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00307-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00307-X)
- Hanson, J. L., Chung, M. K., Avants, B. B., Shirtcliff, E. A., Gee, J. C., Davidson, R. J. et al. (2010). Early Stress Is Associated with Alterations in the Orbitofrontal Cortex: A Tensor-Based Morphometry Investigation of Brain Structure and Behavioral Risk. *Journal of Neuroscience*, *30*(22), 7466–7472. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0859-10.2010>
- Harkness, K. L., Stewart, J. G. & Wynne-Edwards, K. E. (2011). Cortisol reactivity to social stress in adolescents: Role of depression severity and child maltreatment. *Psychoneuroendocrinology*, *36*(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.07.006>
- van Harmelen, A.-L., van Tol, M.-J., van der Wee, N. J. A., Veltman, D. J., Aleman, A., Spinhoven, P. et al. (2010). Reduced Medial Prefrontal Cortex Volume in Adults Reporting Childhood Emotional Maltreatment. *Biological Psychiatry*, *68*(9), 832–838. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.011>
- Hart, A. H., Hartley, L., Ibrahim, M. & Robb, L. (2004). Identification, Cloning and Expression Analysis of the Pluripotency Promoting Nanog Genes in Mouse and Human. *Developmental Dynamics*, *230*(1), 187–198. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20034>
- Hart, J., Gunnar, M. & Cicchetti, D. (1996). Altered neuroendocrine activity in maltreated children related to symptoms of depression. *Development and Psychopathology*, *8*(1), 201–214. <https://doi.org/10.1017/S0954579400007045>
- Hartmann, S., Bergmann, M., Bohle, R. M., Weidner, W. & Steger, K. (2006). Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, *12*(6), 407–411. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal040>
- Hayatsu, H. (2008). Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis. *Proc. Jpn. Acad.*, *84*(8), 321–330. <https://doi.org/10.2183/pjab/84.321>
- He, H. & Kim, J. (2014). Regulation and Function of the Peg3 Imprinted Domain. *Genomics & Informatics*, *12*(3), 105. <https://doi.org/10.5808/GI.2014.12.3.105>
- Heim, C. (2000). Pituitary-Adrenal and Autonomic Responses to Stress in Women After Sexual and Physical Abuse in Childhood. *JAMA*, *284*(5), 592. <https://doi.org/10.1001/jama.284.5.592>
- Heim, C., Young, L. J., Newport, D. J., Mletzko, T., Miller, A. H. & Nemeroff, C. B. (2009). Lower CSF oxytocin concentrations in women with a history of childhood abuse. *Molecular Psychiatry*, *14*(10), 954–958. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.112>
- Henneman, B., van Emmerik, C., van Ingen, H. & Dame, R. T. (2018). Structure and function of archaeal histones. *PLoS Genetics*, *14*(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007582>
- Howell, K. R., Kutiyawalla, A. & Pillai, A. (2011). Long-term continuous corticosterone treatment decreases VEGF receptor-2 expression in frontal cortex. *PLoS ONE*, *6*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020198>

- Hubbard, T. (2002). The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 38–41. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.38>
- Hui, T., Cao, Q., Wegrzyn-Woltosz, J., O'Neill, K., Hammond, C. A., Knapp, D. J. H. F. et al. (2018). High-Resolution Single-Cell DNA Methylation Measurements Reveal Epigenetically Distinct Hematopoietic Stem Cell Subpopulations. *Stem Cell Reports*, 11(2), 578–592. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.07.003>
- Ito, K., J Barnes, P. & M Adcock, I. (2000). Histone acetylation and deacetylation. *Methods in molecular medicine*, 44, 309–319. United States. <https://doi.org/10.1385/1-59259-072-1:309>
- Izadyar, F., Wong, J., Maki, C., Pacchiarotti, J., Ramos, T., Howerton, K. et al. (2011). Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Human Reproduction*, 26(6), 1296–1306. <https://doi.org/10.1093/humrep/der026>
- Jacques, P. S., Rubin, D. C., Labar, K. S. & Cabeza, R. (2008). The short and long of it: Neural correlates of temporal-order memory for autobiographical events. *J Cogn Neurosci.*, 20(7), 1327–1341. <https://doi.org/10.1162/jocn.2008.20091>.The
- Jahnukainen, K., Mitchell, R. T. & Stukenborg, J. B. (2015). Testicular function and fertility preservation after treatment for haematological cancer. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 22(3), 217–223. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000156>
- Jenuwein, T. & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
- Jernigan, C. S., Goswami, D. B., Austin, M. C., Iyo, A. H., Chandran, A., Stockmeier, C. A. et al. (2011). The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(7), 1774–1779. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.05.010>
- Joggerst, B. (2019). Ergebnisse der Adverse Childhood Experiences (ACE)-Studie zu Kindheitstrauma und Gewalt. *Gesundheitswesen*, 81(03), V13. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1679263>
- Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Roder, J. & Woodgett, J. R. (2011). Assessment of Social Interaction Behaviors. *Journal of Visualized Experiments*, (48). <https://doi.org/10.3791/2473>
- Karege, F., Perroud, N., Burkhardt, S., Schwald, M., Ballmann, E., La Harpe, R. et al. (2007). Alteration in Kinase Activity But Not in Protein Levels of Protein Kinase B and Glycogen Synthase Kinase-3 β in Ventral Prefrontal Cortex of Depressed Suicide Victims. *Biological Psychiatry*, 61(2), 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.04.036>
- Kaufman, J. (1991). Depressive Disorders in Maltreated Children. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 30(2), 257–265. <https://doi.org/10.1097/00004583-199103000-00014>
- Kawasaki, Y., Lee, J., Matsuzawa, A., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T. & Ishino, F. (2015). Active DNA demethylation is required for complete imprint erasure in primordial germ cells. *Scientific Reports*, 4(1), 3658. <https://doi.org/10.1038/srep03658>
- Kerjean, A. (2000). Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Human Molecular Genetics*, 9(14), 2183–2187. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.14.2183>
- Kim, J. K., Samaranyake, M. & Pradhan, S. (2009). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(4), 596–612. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8432-4>
- Kobayashi, T., Minowa, O., Kuno, J., Mitani, H., Hino, O. & Noda, T. (1999). Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomas, and embryonic lethality caused by a germ-line Tsc2 mutation in mice. *Cancer Research*, 59(6), 1206–1211.
- von Kopylow, K., Kirchhoff, C., Jezek, D., Schulze, W., Feig, C., Primig, M. et al. (2010). Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: a whole genome approach. *Human Reproduction*, 25(5), 1104–1112. England. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq053>

- von Kopylow, K., Schulze, W., Salzbrunn, A. & Spiess, A.-N. (2016). Isolation and gene expression analysis of single potential human spermatogonial stem cells. *Molecular Human Reproduction*, 22(4), 229–239. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw006>
- von Kopylow, K. & Spiess, A.-N. (2017). Human spermatogonial markers. *Stem Cell Research*, 25, 300–309. England. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.11.011>
- von Kopylow, K., Staeger, H., Schulze, W., Will, H. & Kirchoff, C. (2012). Fibroblast growth factor receptor 3 is highly expressed in rarely dividing human type A spermatogonia. *Histochemistry and Cell Biology*, 138(5), 759–772. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-0991-7>
- von Kopylow, K., Staeger, H., Spiess, A.-N., Schulze, W., Will, H., Primig, M. et al. (2012). Differential marker protein expression specifies rarefaction zone-containing human Adark spermatogonia. *REPRODUCTION*, 143(1), 45–57. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0290>
- Korosi, A., Baram, T. Z. & Schmidt, M. (2009). The pathways from mother's love to baby's future. *Behavioral Neuroscience*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.027>
- Kothapallia, N., Camporeale, G., Kueha, A., Chewa, C. Y., Oommen, A. M., Griffina, J. B. et al. (2005). Biological functions of biotinylated histones. *J Nutr Biochem*, 16(7), 446–448. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Kraeuter, A.-K., Guest, P. C. & Sarnyai, Z. (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice (S. 105–111). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10
- Kubota, H. & Brinster, R. L. (2018). Spermatogonial stem cells. *Biology of Reproduction*, 99(1), 52–74. <https://doi.org/10.1093/biolre/iory077>
- Kuutz, J., Schneider, E., El Hajj, N., Zimmermann, L., Fust, O., Linek, B. et al. (2014). Epigenetic heterogeneity of developmentally important genes in human sperm: Implications for assisted reproduction outcome. *Epigenetics*, 9(12), 1648–1658. <https://doi.org/10.4161/15592294.2014.988063>
- Kuijk, E. W., de Gier, J., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Chambers, I., van Pelt, A. M. M., Colenbrander, B. et al. (2010). A distinct expression pattern in mammalian testes indicates a conserved role for NANOG in spermatogenesis. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010987>
- Ladstätter, S. & Tachibana, K. (2019). Genomic insights into chromatin reprogramming to totipotency in embryos. *Journal of Cell Biology*, 218(1), 70–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807044>
- Langenstroth-Röwer, D., Gromoll, J., Wistuba, J., Tröndle, I., Laurentino, S., Schlatt, S. et al. (2017). De novo methylation in male germ cells of the common marmoset monkey occurs during postnatal development and is maintained in vitro. *Epigenetics*, 12(7), 527–539. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1248007>
- LeDoux, J. E. (1994). The amygdala: Contributions to fear and stress. *Seminars in the Neurosciences*. <https://doi.org/10.1006/smns.1994.1030>
- Lee, H. J. & Smallwood, S. A. (2018). Genome-Wide Analysis of DNA Methylation in Single Cells Using a Post-bisulfite Adapter Tagging Approach (S. 87–95). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7514-3_7
- Lee, M.-S., Lin, Y.-S., Deng, Y.-F., Hsu, W.-T., Shen, C.-C., Cheng, Y.-H. et al. (2014). Modulation of alternative splicing by expression of small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N. *FEBS Journal*, 281(23), 5194–5207. <https://doi.org/10.1111/febs.13059>
- Lees-Murdock, D. J. & Walsh, C. P. (2008). DNA Methylation Reprogramming in the Germ Line. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Band 626, S. 1–15). https://doi.org/10.1007/978-0-387-77576-0_1
- Lehmann, M. L. & Herkenham, M. (2011). Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *Journal of Neuroscience*, 31(16), 6159–6173. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0577-11.2011>

- Lehnert, H., Kirchner, H., Kirmes, I., Dahm, R. & Kirmes, I. (2018). Grundlagen der Epigenetik BT - Epigenetik – Grundlagen und klinische Bedeutung: Aus der Vortragsreihe der Medizinischen Gesellschaft Mainz e.V. In H. Lehnert, H. Kirchner, I. Kirmes & R. Dahm (Hrsg.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (Band 53, S. 1–23). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54023-7_1
- Leitch, H. G., Tang, W. W. C. & Surani, M. A. (2013). Primordial Germ-Cell Development and Epigenetic Reprogramming in Mammals. *Current Topics in Developmental Biology* (Band 104, S. 149–187). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416027-9.00005-X>
- Lesuis, S. L., Maurin, H., Borghgraef, P., Lucassen, P. J., Van Leuven, F. & Krugers, H. J. (2016). Positive and negative early life experiences differentially modulate long term survival and amyloid protein levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *Oncotarget*, 7(26), 39118–39135. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9776>
- Li, J. Y., Lees-Murdock, D. J., Xu, G. L. & Walsh, C. P. (2004). Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics*, 84(6), 952–960. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.08.012>
- Li, Z., Fang, F., Zhao, Q., Li, H. & Xiong, C. (2019). Supplementation of vitamin C promotes early germ cell specification from human embryonic stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 324. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1427-2>
- Lim, D. H. K. & Maher, E. R. (2010). DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 12, 37–42. <https://doi.org/10.1576/toag.12.1.037.27556>
- Lipton, J. O. & Sahin, M. (2014). The Neurology of mTOR. *Neuron*, 84(2), 275–291. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.034>
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R. & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434–445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- Malter Cohen, M., Jing, D., Yang, R. R., Tottenham, N., Lee, F. S. & Casey, B. J. (2013). Early-life stress has persistent effects on amygdala function and development in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(45), 18274–18278. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310163110>
- Manku, G. & Culty, M. (2015). Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: Recent advances and remaining challenges. *Reproduction*, 149(3), R139–R157. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0431>
- Marques, J. C., Pinho, M. J., Carvalho, F., Bièche, I., Barros, A. & Sousa, M. (2011). DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics*, 6(11), 1354–1361. <https://doi.org/10.4161/epi.6.11.17993>
- Marrocco, J., Gray, J. D., Kogan, J. F., Einhorn, N. R., O'Conneide, E. M., Rubin, T. G. et al. (2019). Early life stress restricts translational reactivity in CA3 neurons associated with altered stress responses in adulthood. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00157>
- McCrory, E., De Brito, S. A. & Viding, E. (2011). The impact of childhood maltreatment: A review of neurobiological and genetic factors. *Frontiers in Psychiatry*, 2(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2011.00048>
- McEwen, B. S., Gray, J. D. & Nasca, C. (2015). Neurobiology of Stress Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. *Neurobiology of Stress*, 1, 1–11. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.09.001>
- McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M. et al. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience*, 12(3), 342–348. <https://doi.org/10.1038/nn.2270>
- McIlwain, K. L., Merriweather, M. Y., Yuva-Paylor, L. A. & Paylor, R. (2001). The use of behavioral test batteries: Effects of training history. *Physiology and Behavior*, 73(5), 705–717. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00528-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00528-5)

- Mehta, D., Klengel, T., Conneely, K. N., Smith, A. K., Altmann, A., Pace, T. W. et al. (2013). Childhood maltreatment is associated with distinct genomic and epigenetic profiles in posttraumatic stress disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(20), 8302–8307. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217750110>
- Meng, X. (2000). Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF. *Science*, 287(5457), 1489–1493. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1489>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics*, 11(1), 31–46. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Von Meyenn, F. & Reik, W. (2015). Forget the parents: Epigenetic reprogramming in human germ cells. *Cell*, 161(6), 1248–1251. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.039>
- Middlebrooks, J. S. & Audage, N. C. (2008). The Effects of Childhood Stress on Health Across the Lifespan. *Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control, Atlanta (GA)*, 1–18.
- Mitchell, R. C. (2012). *Cognitive and synaptic dysfunction in a mouse model of Huntington's disease*. University of Dundee. Verfügbar unter: https://discovery.dundee.ac.uk/ws/portalfiles/portal/1618337/Mitchell_phd_2012.pdf
- Molet, J., Maras, P. M., Avishai-Eliner, S. & Baram, T. Z. (2014). Naturalistic Rodent Models of Chronic Early-Life Stress. *Developmental psychobiology*, 56(8), 1675–1688. <https://doi.org/10.1002/dev.21230>
- Monk, D. (2015). Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 67, 128–138. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.014>
- Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Morgan, H. D., Santos, F., Green, K., Dean, W. & Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14(SPEC. ISS. 1), 47–58. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi114>
- Morley, A. A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomolecular Detection and Quantification*, 1(1), 1–2. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.06.001>
- Mulder, C. L., Zheng, Y., Jan, S. Z., Struijk, R. B., Repping, S., Hamer, G. et al. (2016). Spermatogonial stem cell autotransplantation and germline genomic editing: A future cure for spermatogenic failure and prevention of transmission of genomic diseases. *Human Reproduction Update*, 22(5), 561–573. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw017>
- Murdoch, B. M., Murdoch, G. K., Greenwood, S. & McKay, S. (2016). Nutritional influence on epigenetic marks and effect on livestock production. *Frontiers in Genetics*, 7(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00182>
- Myers, B., McKlveen, J. M. & Herman, J. P. (2014). Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(2), 180–196. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.12.003>
- Naninck, E. F. G., Hoeijmakers, L., Kakava-Georgiadou, N., Meesters, A., Lazic, S. E., Lucassen, P. J. et al. (2015). Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice. *Hippocampus*, 25(3), 309–328. <https://doi.org/10.1002/hipo.22374>
- Naya, Y., Chen, H., Yang, C., Suzuki, W. A. & Squire, L. R. (2017). Contributions of primate prefrontal cortex and medial temporal lobe to temporal-order memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(51), 13555–13560. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712711114>
- Neece, C. L., Green, S. A. & Baker, B. L. (2012). Parenting Stress and Child Behavior Problems: A Transactional Relationship Across Time. *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities*, 117(1), 48–66. <https://doi.org/10.1352/1944-7558-117.1.48>

- Neigh, G. N., Gillespie, C. F. & Nemeroff, C. B. (2009). The neurobiological toll of child abuse and neglect. *Trauma, Violence, and Abuse*, 10(4), 389–410. <https://doi.org/10.1177/1524838009339758>
- Nelson, C. A., Zeanah, C. H., Fox, N. A., Marshall, P. J., Smyke, A. T. & Guthrie, D. (2007). Cognitive Recovery in Socially Deprived Young Children: The Bucharest Early Intervention Project. *Science*, 318(5858), 1937–1940. <https://doi.org/10.1126/science.1143921>
- Nettersheim, D., Biermann, K., Gillis, A. J. M., Steger, K., Looijenga, L. H. J. & Schorle, H. (2011). NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development. *Epigenetics*, 6(1), 114–122. <https://doi.org/10.4161/epi.6.1.13433>
- Nickkholgh, B., Mizrak, S. C., van Daalen, S. K. M., Korver, C. M., Sadri-Ardekani, H., Repping, S. et al. (2014). Genetic and epigenetic stability of human spermatogonial stem cells during long-term culture. *Fertility and sterility*, 102(6), 1700–7.e1. United States. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.022>
- Nordheim, A., Knippers, R. & Dröge, P. (2015). *Molekulare Genetik*. (A. Nordheim & R. Knippers, Hrsg.) (10. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-002-101354>
- Northrup, H., Koenig, M. & Pearson, D. (2018). Tuberous Sclerosis Complex. In E. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (Hrsg.), *GeneReviews® [Internet]*. University of Washington, Seattle: University of Washington, Seattle; 1993-2020. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1220/>
- Nunez, J. (2008). Morris water maze experiment. *Journal of Visualized Experiments*, (19), 12–13. <https://doi.org/10.3791/897>
- Oakes, C. C., La Salle, S., Smiraglia, D. J., Robaire, B. & Trasler, J. M. (2007). Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Developmental Biology*, 307(2), 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.05.002>
- Oatley, J. M. & Brinster, R. L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, 263–286. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175355>
- Okae, H., Chiba, H., Hiura, H., Hamada, H., Sato, A., Utsunomiya, T. et al. (2014). Genome-Wide Analysis of DNA Methylation Dynamics during Early Human Development. *PLoS Genetics*, 10(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004868>
- Onda, H., Lueck, A., Marks, P. W., Warren, H. B. & Kwiatkowski, D. J. (1999). Tsc2+/- mice develop tumors in multiple sites that express gelsolin and are influenced by genetic background. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(6), 687–695.
- Ota, K. T., Liu, R.-J., Voleti, B., Maldonado-Aviles, J. G., Duric, V., Iwata, M. et al. (2014). REDD1 is essential for stress-induced synaptic loss and depressive behavior. *Nature Medicine*, 20(5), 531–535. <https://doi.org/10.1038/nm.3513>
- Otte, J., Wruck, W. & Adjaye, J. (2017). New insights into human primordial germ cells and early embryonic development from single-cell analysis. *FEBS Letters*, 591(15), 2226–2240. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12716>
- Parmar, N. & Tamanoi, F. (2010). Rheb G-proteins and the activation of mTORC1. *Enzymes*, 27(C), 39–56. [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(10\)27003-8](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(10)27003-8)
- Pastor, W. A., Aravind, L. & Rao, A. (2013). TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(6), 341–356. <https://doi.org/10.1038/nrm3589>
- Pereyra, M., Katche, C., De Landeta, A. B. & Medina, J. H. (2018). mTORC1 controls long-term memory retrieval. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27053-5>
- Phillips, B. T., Gassei, K. & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1663–1678. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0026>
- Pliushch, G., Schneider, E., Weise, D., El Hajj, N., Tresch, A., Seidmann, L. et al. (2010). Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths. *American Journal of Pathology*, 176(3), 1084–1090. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090764>

- Polchi, A., Magini, A., Di Meo, D., Tancini, B. & Emiliani, C. (2018). mTOR signaling and neural stem cells: The tuberous sclerosis complex model. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms19051474>
- Polman, J. A. E., Hunter, R. G., Speksnijder, N., van den Oever, J. M. E., Korobko, O. B., McEwen, B. S. et al. (2012). Glucocorticoids Modulate the mTOR Pathway in the Hippocampus: Differential Effects Depending on Stress History. *Endocrinology*, 153(9), 4317–4327. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1255>
- Potter, W. B., Basu, T., O’Riordan, K. J., Kirchner, A., Rutecki, P., Burger, C. et al. (2013). Reduced Juvenile Long-Term Depression in Tuberous Sclerosis Complex Is Mitigated in Adults by Compensatory Recruitment of mGluR5 and Erk Signaling. *PLoS Biology*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001627>
- Purves, W. K., Markl, J., Sadava, D. E. & Held, A. (2011). *Purves Biologie*. (D.E. Sadava, W.K. Purves, J. Markl & A. Held, Hrsg.) *Life, the science of biology*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. Verfügbar unter: <http://d-nb.info/1012863859/04>
- R Development Core Team. (2008). R: A language and environment for statistical computing. Wien, Österreich: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Verfügbar unter: <http://www.r-project.org>
- Rajender, S., Avery, K. & Agarwal, A. (2011). Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 727(3), 62–71. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.04.002>
- Raz, E. (2004). Guidance of primordial germ cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.01.004>
- Rensing, L. (Hrsg.). (2006). *Mensch im Stress : Psyche, Körper, Moleküle*. München: Elsevier, Spektrum Akad. Verl. Verfügbar unter: http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=2670434&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm
- Rice, C. J., Sandman, C. A., Lenjavi, M. R. & Baram, T. Z. (2008). A Novel Mouse Model for Acute and Long-Lasting Consequences of Early Life Stress. *Endocrinology*, 149(10), 4892–4900. The Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0633>
- Richert, K. A., Carrion, V. G., Karchemskiy, A. & Reiss, A. L. (2006). Regional differences of the prefrontal cortex in pediatric PTSD: an MRI study. *Depression and Anxiety*, 23(1), 17–25. <https://doi.org/10.1002/da.20131>
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research*, 11(1), 3–11. <https://doi.org/10.1101/gr.11.1.3>
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M. & Nyrén, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry*, 242(1), 84–89. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0432>
- Russo, S. J., Murrough, J. W., Han, M., Charney, D. S. & Nestler, E. J. (2012). Neurobiology of resilience. *Nature Neuroscience*, 15(11), 1475–1484. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nn.3234>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T. et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Sato, A., Kasai, S., Kobayashi, T., Takamatsu, Y., Hino, O., Ikeda, K. et al. (2012). Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Nature Communications*, 3, 1–9. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ncomms2295>
- Sato, T., Arai, E., Kohno, T., Tsuta, K., Watanabe, S., Soejima, K. et al. (2013). DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. *PLoS one*, 8(3), e59444. United States. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059444>
- Savignac, H. M., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. (2011). Resistance to early-life stress in mice: Effects of genetic background and stress duration. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5(APRIL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00013>

- Schiebler, T. H. & Korf, H.-W. (2007). Abdomen und Pelvis BT - Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. In T.H. Schiebler & H.-W. Korf (Hrsg.), (S. 307–448). Heidelberg: Steinkopff. https://doi.org/10.1007/978-3-7985-1771-4_11
- Schneider, E., Pliushch, G., El Hajj, N., Galetzka, D., Puhl, A., Schorsch, M. et al. (2010). Spatial, temporal and interindividual epigenetic variation of functionally important DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Research*, 38(12), 3880–3890. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq126>
- Schneiderman, N., Ironson, G. & Siegel, S. D. (2005). Stress and Health: Psychological, Behavioral, and Biological Determinants. *Annual Review of Clinical Psychology*, 1(1), 607–628. <https://doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.144141>
- Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D. et al. (2004). Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 3100–3105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308724101>
- Sellers, Z. P., Schneider, G., Maj, M. & Ratajczak, M. Z. (2018). Analysis of the Paternally-Imprinted DLK1–MEG3 and IGF2–H19 Tandem Gene Loci in NT2 Embryonal Carcinoma Cells Identifies DLK1 as a Potential Therapeutic Target. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(6), 823–836. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9838-5>
- Selye, H. (1952). Allergy and the general adaptation syndrome. *International Archives of Allergy and Immunology*, 3(4), 267–278. <https://doi.org/10.1159/000227975>
- Shen, L., Inoue, A., He, J., Liu, Y., Lu, F. & Zhang, Y. (2014). Tet3 and DNA Replication Mediate Demethylation of Both the Maternal and Paternal Genomes in Mouse Zygotes. *Cell Stem Cell*, 15(4), 459–471. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.002>
- Sieburg, H. B., Cho, R. H. & Müller-Sieburg, C. E. (2002). Limiting dilution analysis for estimating the frequency of hematopoietic stem cells: Uncertainty and significance. *Experimental Hematology*, 30(12), 1436–1443. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00963-3](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00963-3)
- Smith, R. P. & Turek Medizinischer Atlas, Reproduktionssystem, P. J. B. T.-N. C. (Hrsg.). (2012). Entwicklung von Genitaltrakt und Gonadenfunktion (S. 1–18). Munich: Urban & Fischer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-3-437-41795-5.00001-0>
- Sohni, A., Tan, K., Song, H.-W., Burow, D., de Rooij, D. G., Laurent, L. et al. (2019). The Neonatal and Adult Human Testis Defined at the Single-Cell Level. *Cell Reports*, 26(6), 1501-1517.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.045>
- Solberg, N. & Krauss, S. (2013). Luciferase assay to study the activity of a cloned promoter DNA fragment. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 977, 65–78. United States. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-284-1_6
- Song, Q., Decato, B., Hong, E. E., Zhou, M., Fang, F., Qu, J. et al. (2013). A reference methylome database and analysis pipeline to facilitate integrative and comparative epigenomics. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081148>
- Strachan, T. & Read, A. P. (2005). *Molekulare Humangenetik* (3. Auflage). München: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>
- Suderman, M., Borghol, N., Pappas, J. J., Pinto Pereira, S. M., Pembrey, M., Hertzman, C. et al. (2014). Childhood abuse is associated with methylation of multiple loci in adult DNA. *BMC Medical Genomics*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-13>
- Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J. & Jaworski, J. (2016). Tuberous sclerosis complex: From molecular biology to novel therapeutic approaches. *IUBMB Life*, 68(12), 955–962. <https://doi.org/10.1002/iub.1579>
- Szulwach, K. E. & Jin, P. (2014). Incorporating DNA Methylation Dynamics Into Epigenetic Codes. *Bioessays*, 36(1), 107–117. <https://doi.org/10.1002/bies.201300090.Incorporating>

- Tae, H. K., Barrera, L. O., Qu, C., Van Calcar, S., Trinklein, N. D., Cooper, S. J. et al. (2005). Direct isolation and identification of promoters in the human genome. *Genome Research*, 15(6), 830–839. <https://doi.org/10.1101/gr.3430605>
- Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S.-H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A. et al. (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*, 83(5), 1131–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>. Loss
- Tang, J., Xue, W., Xia, B., Ren, L., Tao, W., Chen, C. et al. (2015). Involvement of normalized NMDA receptor and mTOR-related signaling in rapid antidepressant effects of Yuesu and ketamine on chronically stressed mice. *Scientific Reports*, 5(August), 1–13. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/srep13573>
- Tomoda, A., Suzuki, H., Rabi, K., Sheu, Y.-S., Polcari, A. & Teicher, M. H. (2009). Reduced prefrontal cortical gray matter volume in young adults exposed to harsh corporal punishment. *NeuroImage*, 47, T66–T71. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.03.005>
- Tottenham, N., Hare, T. A., Quinn, B. T., Mccarry, T. W., Nurse, M., Gilhooly, T. et al. (2010). Age Ranges and Puberty Stage Should Also Be Comparable, 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2009.00852.x>. Prolonged
- Treadway, M. T., Grant, M. M., Ding, Z., Hollon, S. D., Gore, J. C. & Shelton, R. C. (2009). Early Adverse Events, HPA Activity and Rostral Anterior Cingulate Volume in MDD. (B. Baune, Hrsg.) *PLoS ONE*, 4(3), e4887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004887>
- Tremblay, K. D., Duran, K. L. & Bartolomei, M. S. (1997). A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Molecular and Cellular Biology*, 17(8), 4322–4329. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.8.4322>
- Tusnady, G. E., Simon, I., Varadi, A. & Aranyi, T. (2005). BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(1), e9. <https://doi.org/10.1093/nar/gni012>
- Tyburczy, M. E., Dies, K. A., Glass, J., Camposano, S., Chekaluk, Y., Thorner, A. R. et al. (2015). Mosaic and Intronic Mutations in TSC1/TSC2 Explain the Majority of TSC Patients with No Mutation Identified by Conventional Testing. *PLoS Genetics*, 11(11), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005637>
- Tyler, W. A., Gangoli, N., Gokina, P., Kim, H. A., Covey, M., Levison, S. W. et al. (2009). Activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) is essential for oligodendrocyte differentiation. *Journal of Neuroscience*, 29(19), 6367–6378. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0234-09.2009>
- Tyrka, A. R., Price, L. H., Marsit, C., Walters, O. C. & Carpenter, L. L. (2012). Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: Preliminary findings in healthy adults. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030148>
- Uhlén, M., Björling, E., Agaton, C., Szigyarto, C. A. K., Amini, B., Andersen, E. et al. (2005). A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4(12), 1920–1932. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500279-MCP200>
- Ventelä, S., Mäkelä, J. A., Kulmala, J., Westermarck, J. & Toppari, J. (2012). Identification and regulation of a stage-specific stem cell niche enriched by Nanog-positive spermatogonial stem cells in the mouse testis. *Stem Cells*, 30(5), 1008–1020. <https://doi.org/10.1002/stem.1077>
- Vlajković, S., Čukuranović, R., Daković Bjelaković, M. & Stefanović, V. (2012). Possible therapeutic use of spermatogonial stem cells in the treatment of male infertility: A brief overview. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/374151>
- Vöikar, V., Vasar, E. & Rauvala, H. (2004). Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6J and 129S2/ Sv mice: Implications for phenotyping screens. *Genes, Brain and Behavior*, 3(1), 27–38. <https://doi.org/10.1046/j.1601-183X.2003.0044.x>
- De Waal, E., Yamazaki, Y., Ingale, P., Bartolomei, M., Yanagimachi, R. & McCarrey, J. R. (2012). Primary epimutations introduced during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are corrected by germline-specific epigenetic reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), 4163–4168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201990109>

- Walker, C.-D., Bath, K. G., Joels, M., Korosi, A., Larauche, M., Lucassen, P. J. et al. (2017). Chronic early life stress induced by limited bedding and nesting (LBN) material in rodents: critical considerations of methodology, outcomes and translational potential. *Stress*, 20(5), 421–448. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1343296>
- Walter, J. (2015a). Epigenetische Mechanismen. In A. Nordheim & R. Knippers (Hrsg.), *Molekulare Genetik* (10. Auflage, S. 443–458). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Walter, J. (2015b). Epigenetische Kontrolle biologischer Prozesse. In A. Nordheim & R. Knippers (Hrsg.), *Molekulare Genetik* (10. Auflage, S. 460–471). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Wang, C. Y., Hua, C. Y., Hsu, H. E., Hsu, C. L., Tseng, H. Y., Wright, D. E. et al. (2011). The C-terminus of histone H2B is involved in chromatin compaction specifically at telomeres, independently of its monoubiquitylation at lysine 123. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022209>
- Wang, M., Liu, X., Chang, G., Chen, Yidong, An, G., Yan, L. et al. (2018). Single-Cell RNA Sequencing Analysis Reveals Sequential Cell Fate Transition during Human Spermatogenesis. *Cell Stem Cell*, 23(4), 599-614.e4. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.08.007>
- Wang, X. D., Labermaier, C., Holsboer, F., Wurst, W., Deussing, J. M., Müller, M. B. et al. (2012). Early-life stress-induced anxiety-related behavior in adult mice partially requires forebrain corticotropin-releasing hormone receptor 1. *European Journal of Neuroscience*, 36(3), 2360–2367. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08148.x>
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M. et al. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, 39(4), 457–466. <https://doi.org/10.1038/ng1990>
- Wilson, R. S., Schneider, J. A., Boyle, P. A., Arnold, S. E., Tang, Y. & Bennett, D. A. (2007). Chronic distress and incidence of mild cognitive impairment. *Neurology*, 68(24), 2085–2092. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000264930.97061.82>
- Wippert, P.-M. & Borgetto, B. (Hrsg.). (2009). *Stress- und Schmerzursachen verstehen : Gesundheitspsychologie und -soziologie in Prävention und Rehabilitation*. Stuttgart [u.a.]: Thieme. Verfügbar unter: <http://d-nb.info/991780744/04>
- Wright, C. M. (2015). Long Noncoding RNAs and Cancer. *Epigenetic Cancer Therapy* (S. 91–114). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800206-3.00005-7>
- Xiong, H., Cassé, F., Zhou, Y., Zhou, M., Xiong, Z. Q., Joëls, M. et al. (2015). mTOR is essential for corticosteroid effects on hippocampal AMPA receptor function and fear memory. *Learning and Memory*, 22(12), 577–583. <https://doi.org/10.1101/lm.039420.115>
- Xu, Y., Zhang, S., Lin, S., Guo, Y., Deng, W., Zhang, Y. et al. (2017). WERAM: A database of writers, erasers and readers of histone acetylation and methylation in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D264–D270. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1011>
- Yam, K. Y., Naninck, E. F. G., Schmidt, M. V., Lucassen, P. J. & Korosi, A. (2015). Early-life adversity programs emotional functions and the neuroendocrine stress system: The contribution of nutrition, metabolic hormones and epigenetic mechanisms. *Stress*, 18(3), 328–342. <https://doi.org/10.3109/10253890.2015.1064890>
- Yamaguchi, S., Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N. & Tada, T. (2005). Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expression Patterns*, 5(5), 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.03.001>
- Yang, X. D., Liao, X. M., Uribe-Mariño, A., Liu, R., Xie, X. M., Jia, J. et al. (2015). Stress during a Critical Postnatal Period Induces Region-Specific Structural Abnormalities and Dysfunction of the Prefrontal Cortex via CRF 1. *Neuropsychopharmacology*, 40, 1203–1215. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.304>
- Young, D. M., Schenk, A. K., Yang, S. B., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (2010). Altered ultrasonic vocalizations in a tuberous sclerosis mouse model of autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 11074–11079. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005620107>

- Zaidi, S. K., Young, D. W., Montecino, M., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B. et al. (2011). Bookmarking the genome: Maintenance of epigenetic information. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18355–18361. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.197061>
- Zechner, U., Pliushch, G., Schneider, E., Hajj, N. El, Tresch, A., Shufaro, Y. et al. (2010). Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy losses after ART and spontaneous conception. *Molecular Human Reproduction*, 16(9), 704–713. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap107>
- Zhong, P., Wang, W., Pan, B., Liu, X., Zhang, Z., Long, J. Z. et al. (2014). Monoacylglycerol lipase inhibition blocks chronic stress-induced depressive-like behaviors via activation of mTOR signaling. *Neuropsychopharmacology*, 39(7), 1763–1776. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.24>
- Zhu, P., Guo, H., Ren, Y., Hou, Y., Dong, J., Li, R. et al. (2018). Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nature Genetics*, 50(1), 12–19. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0007-6>

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1: Histon-Code.....	4
Abbildung 1.1.2: Cytosin-Derivate	6
Abbildung 1.1.3: Epigenetische Reprogrammierung bei Mensch und Maus	8
Abbildung 1.1.4: Schematischer Querschnitt durch einen <i>Tubulus seminiferus</i>	12
Abbildung 1.2.1: Das limbische System.....	19
Abbildung 1.2.2: Die Entstehung von Furcht.....	20
Abbildung 1.2.3: Schematische Übersicht über die HPA- und die SAM-Achse.	23
Abbildung 1.2.4: Furchtkonditionierung	28
Abbildung 1.2.5: Lernen durch Langzeitpotenzierung (LTP)	30
Abbildung 1.2.6: Regulation des mTOR-Signalwegs	38
Abbildung 2.1.1: Schematische Darstellung der <i>nested</i> und <i>semi-nested</i> PCR	45
Abbildung 2.1.2: Molekulare Schritte der Bisulfit-Konvertierung.....	46
Abbildung 2.1.3: <i>Limiting Dilution</i> Bisulfit-Pyrosequenzierung.....	47
Abbildung 2.1.4: PCR-Kontrolle mittels Gelelektrophorese, Beispiel-Gelbild	49
Abbildung 2.2.1: Abbildung der Experimentierkäfige	59
Abbildung 2.2.2: Darstellung des ELS-Paradigmas	60
Abbildung 2.2.3: Genotypisierung, Beispiel-Gelbild	63
Abbildung 2.2.4: Schematischer Versuchsablauf der 24 Stunden- und 7 Tage-NORTs.....	65
Abbildung 2.2.5: Schematische Darstellung der Episodisches Gedächtnis-Testbatterie	66
Abbildung 2.2.6: Schematische Darstellung des <i>Open Field</i> -Tests.....	67
Abbildung 2.2.7: Schematische Darstellung des <i>Social Interaction</i> -Tests	67
Abbildung 2.2.8: Schematische Darstellung des <i>Spontaneous Alternation</i> -Tests	68
Abbildung 3.1.1 A und B: Methylierungsergebnisse für <i>MEG3</i> und <i>H19-DMR</i>	79
Abbildung 3.1.1 C und D: Methylierungsergebnisse für <i>KCNQ1OT1</i> und <i>PEG3</i>	80
Abbildung 3.1.1 E und F: Methylierungsergebnisse für <i>SNRPN</i> Region 1 und 2.....	81
Abbildung 3.1.1 G und H: Methylierungsergebnisse für <i>FGFR3</i> und <i>GFRA1</i>	82
Abbildung 3.1.1 J und K: Methylierungsergebnisse für <i>L1TD1</i> und <i>PLZF</i>	83
Abbildung 3.1.1 L und M: Methylierungsergebnisse für <i>NANOG</i> und <i>POU5F1</i>	84
Abbildung 3.2.1: Maternales Verhalten (Etablierungsphase)	94
Abbildung 3.2.2: Gewichtsmessungen (Etablierungsphase)	95
Abbildung 3.2.3: Ergebnisse der CORT-Messungen (Etablierungsphase).....	96
Abbildung 3.2.4: Ergebnisse des 24 Std.-NORTs (Etablierungsphase)	98
Abbildung 3.2.5: Ergebnisse des 7 Tage-NORTs (Etablierungsphase).....	99
Abbildung 3.2.6: Ergebnisse der Episodisches Gedächtnis-Testbatterie	101
Abbildung 3.2.7: Maternales Verhalten (Projektphase).....	103
Abbildung 3.2.8: Gewichtsmessungen (Projektphase).....	104
Abbildung 3.2.9: Ergebnisse des <i>Open Field</i> -Tests (Projektphase)	106
Abbildung 3.2.10: Ergebnisse des <i>Social Interaction</i> -Tests (Projektphase)	107
Abbildung 3.2.11: Ergebnisse des 7 Tage-NORTs (Projektphase)	109
Abbildung 3.2.12: Ergebnisse des <i>Spontaneous Alternation</i> -Tests (Projektphase).....	110
Abbildung 3.2.13: NORT-Vergleich der Etablierungs- und Projektphase	112
Abbildung 3.2.14: Korrelationskoeffizienten für den 7 Tage-NORT	114
Abbildung 3.2.15: Korrelationskoeffizienten für den <i>Social Interaction</i> -Test.....	115
Abbildung 3.2.16: Korrelationskoeffizienten für den <i>Spontaneous Alternation</i> -Test	115
Abbildung 3.2.17: Korrelationskoeffizienten für den <i>Open Field</i> -Test.....	116

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1: Verwendete Gen-Assays	53
Tabelle 2.1.2: <i>Multiplex</i> - und <i>Singleplex</i> -PCR-Protokoll.....	56
Tabelle 2.2.1: Verwendete Primer und Primersequenzen für die Genotypisierungs-PCR.....	62
Tabelle 2.2.2: Genotypisierungs-PCR-Protokoll.....	62
Tabelle 3.1.1: Aufstellung der methylierten (me+) und unmethylierten (me-) CpGs	86
Tabelle 3.1.2: Aufstellung der methylierten (me+) und unmethylierten (me-) Allele.....	89
Tabelle 3.2.1: Aufstellung der generierten Nachkommen (Etablierungsphase).....	93
Tabelle 3.2.2: Gewichtsmessung (Etablierungsphase).....	95
Tabelle 3.2.3: Ergebnisse der CORT-Messungen (Etablierungsphase).....	96
Tabelle 3.2.4: Ergebnisse des 24 Std.-NORTs (Etablierungsphase).....	97
Tabelle 3.2.5: Ergebnisse des 7 Tage-NORTs (Etablierungsphase).....	99
Tabelle 3.2.6: Ergebnisse der Episodisches Gedächtnis-Testbatterie	100
Tabelle 3.2.7: Aufstellung der generierten Nachkommen (Projektphase)	102
Tabelle 3.2.8: Gewichtsmessungen (Projektphase).....	104
Tabelle 3.2.9: Ergebnisse des <i>Open Field</i> -Tests (Projektphase)	105
Tabelle 3.2.10: Ergebnisse des <i>Social Interaction</i> -Tests (Projektphase)	106
Tabelle 3.2.11: Ergebnisse des 7 Tage-NORTs (Projektphase)	108
Tabelle 3.2.12: Ergebnisse des <i>Spontaneous Alternation</i> -Test (Projektphase).....	110
Tabelle 3.2.13: NORT-Vergleich der Etablierungs- und Projektphase	112
Tabelle 3.2.14: Verpaarungseffizienz und Geburtenrate.....	117

6.3 Verwendete Materialien und Equipments

6.3.1 Chemikalien/Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi (Bad Homburg v. d. H., Deutschland)
Annealing Buffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Binding Buffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
EDTA	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
NaCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaOH	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PCR-Wasser	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Primer	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Proteinase K	PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
SDS	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sepharose-Beads	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
StarPure Agarose	StarLab (Hamburg, Deutschland)
TRIS	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

6.3.2 Puffer, Lösungen und Gele

Puffer	Zusammensetzung
50 X TAE Puffer	242 g Tris, 18,6 g EDTA, 57,1 ml Essigsäure (1 M) ad 1 l H ₂ O
1 X TAE Puffer	100 ml 50 X TAE Puffer; 4,9 l H ₂ O (höchstrein)
70 % Ethanol	700 ml 100 % Ethanol ad 1 l H ₂ O
Agarosegel (2 %)	2 g Agarose, ad 100 ml 1 X TAE Puffer, 2 µl EtBr
Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH)	8,00 g NaOH ad 1 l H ₂ O
Digestion buffer	3 ml 1 M TRIS (pH 8,0); 400 µl 0,5 M EDTA; 6 ml 1 M NaCl; 60 µl 10 % SDS, ad 30 ml H ₂ O
Waschpuffer (10 mM Tris-Acetat, pH 7,6)	1,21 g TRIS; pH 7,6 mit Essigsäure; ad 1 l H ₂ O

6.3.3 Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
Corticosterone ELISA Kit	Enzo Life Sciences (New York, USA)
EZ DNA Methylation Direct™ Kit	Zymo Research (Irvine CA, USA)
FastStart™ PCR-System	Roche (Mannheim, Deutschland)
PyroMark Gold® Q96 reagents	Qiagen (Hilden, Deutschland)

6.3.4 Geräte und Equipment

Gerät	Hersteller
DNA BioEngine Tetrad® 2	BioRad (Hercules, USA)
Gelkammern, -schlitten, -kämme	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
HLC Heating Thermo Mixer HTM 130	Digital Biomedical Imaging Systems AG (Pforzheim, Deutschland)
Kartusche zur Pyrosequenzierung	(Qiagen, Hilden Germany)
Microvette® CB 300 K2E	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Microzentrifuge	Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mouse Cage M3 – sloping front	NPK Cages, Wageningen, Niederlande
Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PyroMark Q96 ID	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
Pyrosequenzierplatten	(Qiagen, Hilden Germany)
Security Camera, Modell „PZ0420H“	Camera2000 Ltd. (Shenzhen, China)
Stromgenerator für Gelelektrophorese	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
UV System	Intas (Göttingen, Deutschland)
Vacuum Prep Workstation	Biotage (Uppsala, Schweden)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

6.3.5 EDV-Programme

Programm	Hersteller
Capture Studio	Magewell (Nanjing, China)
GraphPad Prism (Version 5.00 und 8.00)	GraphPad (San Diego, USA)
Online-Calculator für Kontingenztabellen	GraphPad (San Diego, USA)
Pyromark CpG Software (Version 1.0.11)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
R-Script (Version 3.4.3)	www.r-project.org (Wien, Österreich)
Skant™ for Microplate Readers RE (Version 4.1.0.43)	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
VLC mediaplayer (Version 2.1.5)	VideoLan Project (Paris, Frankreich)

6.4 Publikationen und Kongressteilnahmen

Publikationen:

Teile der Arbeit zum Projekt „**DNA-Methylierungsanalysen von Spermatozoen**“ basieren auf der Publikation:

„The DNA methylation profile of human spermatogonia at single-cell- and single-allele-resolution refutes its role in spermatogonial stem cell function and germ cell differentiation”

Desiree Lucia Fend-Guella, Kathrein von Kopylow, Andrej-Nikolai Spiess, Wolfgang Schulze, Andrea Salzbrunn, Stefan Diederich, Nady El Hajj, Thomas Haaf, Ulrich Zechner, Matthias Linke

Journal-Artikel in *Molecular Human Reproduction*, Band 25, Heft 6, Seiten 283–294 (2019)

„Inhibition of histone deacetylation rescues Birk-Barel - Intellectual Disability syndrome in mice”

Alexis Cooper, Tamer Butto, Niklas Hammer, Somanath Jagannath, **Desiree Lucia Fend-Guella**, Junaid Akhtar, Konstantin Radyushkin, Florian Lesage, Jennifer Winter, Susanne Strand, Jochen Roeper, Ulrich Zechner, Susann Schweiger

Journal-Artikel in *Nature Communications*, Band 11, Artikelnummer: 480 (2020)

„Targeted next-generation sequencing analysis in couples at increased risk for autosomal recessive disorders”

Katalin Komlosi, Stefan Diederich, **Desiree Lucia Fend-Guella**, Oliver Bartsch, Jennifer Winter, Ulrich Zechner, Michael Beck, Peter Meyer, Susann Schweiger

Journal-Artikel in *Orphanet Journal of Rare Diseases*, Band 13, Artikelnummer: 23 (2018)

Besuchte Kongresse:

29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Münster

Poster: „**Methylation profiling of human Spermatogonial Stem Cells (hSSCs) at single allele resolution”**

Desiree Lucia Fend-Guella, Kathrein von Kopylow, Wolfgang Schulze, Andrea Salzbrunn, Andrej-Nikolai Spiess, Nady El Hajj, Thomas Haaf, Ulrich Zechner, Matthias Linke

Abstract veröffentlicht in *Medizinische Genetik-Berlin*, Band 30, Heft 1, Seite 135 (2018)

4th biannual meeting rhine main neuroscience network in Oberwesel

Poster: „**Epigenetic Programming of the Brain by Early Life Stress”**

Desiree Fend-Guella, Amy Forster, Matthias Linke, Marianne Müller, Michael van der Kooij, Benjamin G Gunn, Delia Belelli, Jeremy J Lambert, Susann Schweiger, Ulrich Zechner (2016)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Desiree Lucia Fend-Guella (geboren am 13.02.1981 in Bad Schwalbach), die hier vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Zudem versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch an keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat.

Mir ist der Inhalt der Promotionsordnung bekannt.
