

ZUSAMMENFASSUNG

Die Expression der *de novo* DNA-Methyltransferase Dnmt3a2 im Gehirn verringert sich mit dem Alter, kann aber durch Gedächtnisaktivität induziert werden. Bereits publizierte Studien haben gezeigt, dass transiente Überexpression von Dnmt3a2 im Hippocampus alter Mäuse eine altersbedingte Verschlechterung der Gedächtnisleistung rückgängig macht. Diese Experimente weisen auf eine neuronale Funktionen von Dnmt3a2 in Lern- und Gedächtnisvorgängen hin, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und welche Zelltypen im Gehirn daran beteiligt sind ist jedoch zurzeit noch unklar.

Im ersten Teil meiner Doktorarbeit habe ich mittels Zellkulturstudien untersucht, wie die Überexpression von Dnm3a2 die Funktion von Nervenzellen beeinflusst. Dabei konnte ich zeigen, dass sowohl Dnm3a2 allein als auch in Interaktion mit dem Cofaktor Dnm3L (Dnm3a2/3L) die Expression synaptischer Plastizitätsgene verstärkt. Dnm3a2 Überexpression erhöht darüber hinaus die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegenüber oxidativen Stress. Dnm3L verstärkt diese protektive Funktion, indem es die Lokalisation von Dnm3a2 im Zellkern favorisiert. Der Einfluss von Dnm3a2 auf die Expression von synaptischen Plastizitätsgenen wird evtl. durch die direkte Methylierung von Promotoren dieser Gene verursacht. Eine alternative Erklärung liefert die Identifizierung der Histonmethyltransferase MLL1 als neuem Cofaktor von Dnm3a2. Mittels Koimmunopräzipitation und anschließender Massenspektrometrie konnte ich zeigen, dass Dnm3a2 und MLL1 zusammen in einem Komplex vorliegen. MLL1 katalysiert die Trimethylierung von Histon H3 (H3K4me3). Durch Chip-qPCR und Sequenzierung konnte ich nachweisen, dass H3K4me3 Level in den Promotoren von synaptischen Plastizitätsgenen wie Bdnf und Egr1 erhöht sind, wenn Dnm3a2 überexprimiert wird. Daher ist es möglich, dass Dnm3a2 die Expression von synaptischen Plastizitätsgenen durch die Lokalisierung von MLL1 auf bestimmte

Promotorregionen reguliert.

Um die *in vivo* Funktion des Dnmt3a2/3L Komplexes in Gedächtnis und Lokomotion zu untersuchen, habe ich Mauskohorten mit CaMKIIa-Dnm3a2/3L- und Dat-Dnm3a2/3L-Überexpression generiert, um Dnm3a2/3L spezifisch im Vorderhirn bzw. in dopaminergen Neuronen zu überexprimieren. Unter Verwendung verschiedener Verhaltenstests wie "Open Field", "Y Maze", Novel Placement Recognition" und "Water Maze" konnte ich zeigen, dass die Überexpression von Dnm3a2/3L im Vorderhirn Angstverhalten auslösen kann und das räumliche Arbeitsgedächtnis erhöht. Eine durchgeführte FDG-PET Analyse deutet darauf hin, dass neuronal Schaltkreise in der Hirnrinde für das Auslösen des Angstverhaltens ursächlich sein können. Überexpression von Dnmt3a2/3L in dopaminergen Neuronen führte zu einer erhöhten spontanen Feuerrate in diesen Zellen. Zusätzlich war die Erregbarkeit der dopaminergen Nervenzellen erhöht und die Aufnahme des Tracers [¹⁸F]FDOPA im Striatum erhöht, was auf einen erhöhten Umsatz von Dopamin hinweist. Gleichzeitig zeigte sich bei PET-Aufnahmen mit dem Tracer [¹⁸F]FDG eine metabolische Inaktivierung des Striatum sowie eine Disinhibition des Globus pallidus, was als eine Inaktivierung der Basalganglien-Ausgangswege interpretiert werden kann und damit möglicherweise die erhöhte Lokomotionsaktivität dieser Tiere im "Open Field" und Zylindertest erklärt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnissen der *in vivo* Studien, dass Dnm3a2 Gedächtnis und Lokomotion jeweils über bestimmte Neuronentypen reguliert.

SUMMARY

Expression of the *de novo* DNA methyltransferase, Dnmt3a2, decreases with age in the brain, and can be activated by memory training. Recently published studies showed that transient over-expression of Dnmt3a2 in the hippocampus of old mice was sufficient to reverse age-related memory impairments, implying Dnmt3a2 to be involved in memory formation. However, the underlying molecular mechanisms and the neuronal populations in the brain that mediate these effects are currently unclear.

In the first part of my PhD project I conducted cell culture studies to address how Dnmt3a2 overexpression can affect neuronal functions. Interestingly, I found that increasing Dnmt3a2 expression alone, or together with its cofactor Dnmt3L (Dnmt3a2/3L), enhanced the expression of neuronal synaptic plasticity genes. Dnmt3a2 overexpression also increased cellular resistance to oxidative stress, which was further increased by Dnmt3L co-expression. I further showed that Dnmt3L co-expression increased the nuclear localization of Dnmt3a2, which might explain the stronger effect of the combined overexpression. Dnmt3a2 might regulate transcription of synaptic plasticity genes by directly affecting DNA methylation of gene bodies or promoter regions of corresponding target genes. An alternative explanation could come from the identification of the histone methyltransferase MLL1 as novel cofactor of Dnmt3a2. By co-immunoprecipitation coupled with Mass spec-based proteomics analysis I could show that Dnmt3a2 and MLL1 form a complex. MLL1 has previously been shown to specifically catalyze trimethylation of histone H3 (H3K4me3). By CHIP-qPCR and sequencing I showed that H3K4me3 levels were increased in the promoter region of synaptic plasticity genes like *Bdnf* and *Egr1* upon Dnmt3a2 overexpression. Thus, Dnmt3a2 might regulate gene expression of synaptic plasticity genes by targeting MLL1 to specific promoter regions.

In order to address the *in vivo* function of Dnmt3a2/3L in memory and locomotion, I established CaMKIIa-Dnmt3a2/3L and Dat-Dnmt3a2/3L over-expression mouse cohorts to specifically over-express Dnmt3a2/3L in forebrain and dopaminergic neurons, respectively. Using different behavioural assays including open field, Y maze, novel placement recognition and water maze, I could show that Dnmt3a2/3L forebrain-specific overexpression increased anxiety and enhanced spatial novelty short-term memory. FDG-PET scan analysis implicated anxiety short-circuits in the cortex in the anxiety phenotype. Overexpression of Dnmt3a2/3L in dopaminergic neurons resulted in an increase in spontaneous firing frequency of these cells. In addition, excitability of dopaminergic neurons was increased and the uptake of 6-¹⁸F]FMT in the

striatum was higher, indicating higher dopamine turnover. FDG-PET scans revealed inactivation of striatum and increased activation of the globus pallidus, implying that the increased spontaneous activity in open field and cylinder test of these mice may be due to inhibition of the basal ganglia output pathway. Consistently, a higher exercise ability in treadmill was observed in *Dat-Dnmt3a2/3L* mice. In summary, *Dnm3a2* regulates memory and locomotion through distinct neuron types.