

**DNA-Zielsequenzen
des humanen Repressors
Methyl-CpG-bindendes Protein 2
(MeCP2)**

Dissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von:
Christoph Matthias Koch

Hamburg, 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Marquardt

2. Gutachter Prof. Dr. Wolf H. Strätling

Datum der letzten Prüfung: 11.07.2003

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	4
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	21
2.1.2	Antibiotika und Medien für die Bakterienkultur	22
2.1.3	Puffer und Lösungen	23
2.1.4	Kits	28
2.1.5	Zelllinien	29
2.1.6	Datenbanken und Programme	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellkultur	30
2.2.2	Herstellung kompetenter Zellen	31
2.2.3	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	32
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	32
2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.2.7	Transformation	33
2.2.8	Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präp)	34
2.2.9	Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung	34
2.2.10	Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi-Präp)	35
2.2.11	Sequenzierung von DNA	36
2.2.12	Präparative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.13	Expression von rekombinantem hMeCP2	37
2.2.14	Aufreinigung des rekombinanten hMeCP2	38
2.2.15	Produktion von Antikörpern gegen humanes MeCP2	39
2.2.15.1	Klassische Immunisierung	40
2.2.15.2	Genetische Immunisierung	40
2.2.16	Transfektion	42

2.2.17	Präparation von Metaphasechromosomen und Zellkernen	44
2.2.18	Immunfluoreszenzmikroskopie	45
2.2.19	Vernetzung von zellulärer DNA und Proteinen mit cis-Platin (Walter et al., 1997)	47
2.2.19.1	Inkubation mit cis-Platin	47
2.2.19.2	Aufarbeitung cis-Platin-vernetzter Proben (Bloom und Anderson, 1978)	48
2.2.19.3	Radioaktive Endmarkierung des Fragments H1-HaeII	49
2.2.19.4	Southwesternblot Detektion	49
2.2.20	Vernetzung von zellulärer DNA und Protein mit Formaldehyd (<i>Crosslink</i>)	50
2.2.21	Chromatinimmunpräzipitation	52
2.2.21.1	Protein-A-Sepharose-Slurry (50/50 v/v)	52
2.2.21.2	Immunpräzipitation	52
2.2.21.3	Aufreinigung und Klonierung der DNA-Fragmente	53
2.2.21.4	Aufreinigung der Proteinfraction	55
2.2.22	Überprüfen von Bakterienkolonien	55
2.2.23	Westernblot	56
2.2.24	Dotblot immunpräzipitierter DNA	57
2.2.24.1	Produktion radioaktiv markierter Sonden	57
2.2.24.2	Dotblot	58
3	ERGEBNISSE	60
3.1	Produktion von Antikörpern im Huhn	60
3.1.1	Produktion von Antikörpern durch klassische Immunisierung	60
3.1.2	Produktion von Antikörpern durch genetische Immunisierung	63
3.1.2.1	Funktionalität des hMECP2-kodierenden Vektors	63
3.1.2.2	Genetische Immunisierung	64
3.2	Immunzytologische Untersuchungen	65
3.2.1	Lokalisation von hMeCP2 und 5'-Methylcytosin	66
3.2.2	Lokalisation von hMeCP2 verglichen mit murinem MeCP2	68
3.3	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) von MeCP2	70
3.3.1	Studien zur Vernetzung von MeCP2 und DNA	70
3.3.1.1	Studien mit cis-Platin	70
3.3.1.2	Vernetzung mit Formaldehyd	73
3.3.2	Immunpräzipitation	76

3.4	Analyse sequenzierter Klone	80
3.4.1	Klassifizierung und Anteile repetitiver Elemente in sequenzierten Klonen	81
3.4.2	Quantifizierung präzipitierter Alu- und LINE-Sequenzen	88
3.4.3	Einordnung sequenzierter Klone in das humane Genom	91
3.5	Auswertung sequenzierter Klone	94
4	DISKUSSION	107
4.1	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von MeCP2	107
4.2	Chromatin-Immunpräzipitation von MeCP2	110
4.3	Charakteristika sequenzierter Klone	114
4.3.1	Repetitive Elemente in den sequenzierten Klonen	115
4.3.2	Lokalisierung sequenzierter Klone im humanen Genom	121
4.4	Die Rolle von MeCP2 beim Rett-Syndrom	123
5	ZUSAMMENFASSUNG	126
6	SUMMARY	128
7	LITERATUR	130
8	ANHANG	145
8.1	Allgemeine Abkürzungen	145
8.2	Danksagung	148
8.3	Lebenslauf	149
8.4	Erklärung	150

1 Einleitung

Die DNA eukaryotischer Zellen wird durch das Chromatin organisiert. Die Proteine des Chromatins werden in Histone und Nicht-Histon-Proteine eingeteilt. Die Histone sind eine Gruppe kleiner, stark basischer Proteine. Sie tragen zur strukturellen Organisation des Chromatins bei. Ihre basischen Aminosäuren neutralisieren die sauren Phosphatgruppen der DNA und ermöglichen die dichte Packung der DNA im Zellkern. Je zwei Histon-Moleküle der Gruppen H2A, H2B, H3 und H4 bilden einen oktameren Komplex, um den 146 Basenpaare gewickelt sind. Diese Partikel werden als Nukleosomen bezeichnet und stellen die unterste Verpackungsebene der DNA dar. An die zwischen den Nukleosomen befindliche DNA bindet das Histon H1 und unterstützt die Ausbildung einer übergeordneten 30 nm-Faser, der Solenoidstruktur des Chromatins. Die Solenoide wiederum bilden Chromatinschleifen von ca. 20.000 bis 80.000 Basenpaaren. Das Ende jeder Schleife ist an eine Gerüststruktur gebunden, die man als Kerngerüst, *Matrix* oder *Scaffold* bezeichnet. Es wird angenommen, dass die DNA über Anheftungssequenzen an das Kerngerüst gebunden wird. Diese MARs bzw. SARs genannten DNA-Sequenzen, für *Matrix* bzw. *Scaffold Attachment Regions*, sind 250 bis mehrere tausend Basenpaare lang (Gasser und Laemmli, 1987; Phi-Van und Strätling, 1990). Die MARs/SARs sind AT-reiche Sequenzen, für die bisher keine Konsensussequenz identifiziert werden konnte (Gasser und Laemmli, 1987; Boulukas, 1995). Zwischen den MARs liegt die DNA in Schleifen um das Proteingerüst herum. Dieses Modell wurde durch Paulson und Laemmli (1977) experimentell untermauert. Histonproteine wurden durch Behandlung mit Polyanionen von Metaphasechromosomen aus HeLa-Zellen entfernt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde dadurch das Proteingerüst der Chromosomen und die in Schleifen liegende DNA sichtbar.

Um mögliche Funktionen von MARs zu analysieren, wurde ein Reporterkonstrukt mit der 5'-gelegenen MAR-Region des Hühnerlysozyngens flankiert und stabil in das Genom integriert. Dabei konnten zwei Beobachtungen gemacht werden. Einerseits wurde die Expression des Reportergens durch die MAR-Elemente verstärkt, und andererseits war die Genexpression vom Integrationsort des Konstrukts unabhängig (Stief et al., 1989). Dieser Effekt wurde auch mit einigen anderen MARs bestätigt (Phi-Van und Strätling, 1996). Vermutlich stellen die MAR-flankierten DNA-Schleifen Transkriptionseinheiten dar, die Genexpression unabhängig von der

genomischen Lage und ohne störende Einflüsse benachbarter Chromatinregionen ermöglichen (Bode et al., 1995). Dieses Modell der Chromatinorganisation mit Hilfe von MAR/SAR-Sequenzen wurde in vielen Organismen wie Huhn, Mensch, *Drosophila*, Soja und Tabak nachgewiesen (Boulikas, 1995). Es zeigte sich, dass MARs offenbar eine evolutionär stark konservierte Rolle spielen. So ist das 5'-gelegene MAR des Hühnerlysozyngens nicht nur in Monozyten aus Huhn (Stief et al., 1989), sondern auch in Rattenfibroblasten (Phi-Van et al., 1990), in transgenen Mäusen (McKnight et al., 1992) und sogar in Tabakpflanzen (Mlynárová et al., 1994) biologisch aktiv. Daher wird angenommen, dass das Chromatin durch MAR-Sequenzen in einzelne Transkriptionseinheiten unterteilt wird.

Im Labor von Prof. Strätling wurde in *Southwesternblotting-Assays* ein Protein aus dem Huhn identifiziert, das an die 5'-gelegene MAR-Region des Hühnerlysozyngens spezifisch bindet. Es wurde *Attachment Region Binding Protein* (ARBP) genannt (von Kries et al., 1991). ARBP bindet in dieser MAR mit hoher Affinität [$K_D = (2-6) \times 10^{-10}$ M] ein DNA-Motiv bestehend aus der zentralen Sequenz 5'-GGTGT-3' und flankierenden AT-reichen Sequenzen (Buhrmester et al., 1995). Substitutionen in der zentralen Sequenz führen zu Verlust oder Abnahme der ARBP-Bindung, was die Bedeutung der zentralen Sequenz belegt (Buhrmester et al., 1995). ARBP bindet ferner an MARs von *Drosophila*, der Maus und des Menschen (von Kries et al., 1991).

Weitzel et al. (1997) stellten fest, dass das MAR-bindende Protein ARBP homolog zum Methyl-CpG-bindenden Protein MeCP2 ist. MeCP2 wurde als Protein, das spezifisch methylierte CpG-Stellen *in vitro* und *in vivo* bindet, identifiziert (Lewis et al., 1992). Im Folgenden wird hauptsächlich die Bezeichnung MeCP2 verwendet. MeCP2 ist ein abundantes, zwischen Mensch, Ratte, Huhn und afrikanischem Krallenfrosch hoch konserviertes Kernprotein. Humanes MeCP2 ist 486 Aminosäuren lang und besteht aus mehreren Domänen (Abbildung 1): Die im N-terminalen Bereich lokalisierte, evolutionär stark konservierte DNA-Bindungsdomäne, eine sich daran anschließende transkriptionelle Repressordomäne und der C-terminale Bereich, der möglicherweise an der Nukleosomenbindung des Proteins beteiligt ist (Chandler et al., 1999). In der N-terminalen Region des hMeCP2 wurde die MAR-Bindungsdomäne auf einen Bereich von 125 Aminosäuren eingegrenzt (AS 71-195). Sie wurde über die Bindung von Deletionsmutanten an MAR-Sequenzen im Southwesternblot definiert (Weitzel et al., 1997). Innerhalb der MAR-Bindungsdomäne befindet sich die Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD), die 85 Aminosäuren umfasst (AS 78-162). Die MBD wurde über Deletionsmutanten und *Band-*

Shift-Assays lokalisiert. Die MBD von MeCP2 ist in der Lage, eine DNA-Sequenz zu binden, die ein einzelnes, symmetrisch methyliertes CpG-Dinukleotid enthält (Nan et al., 1993).

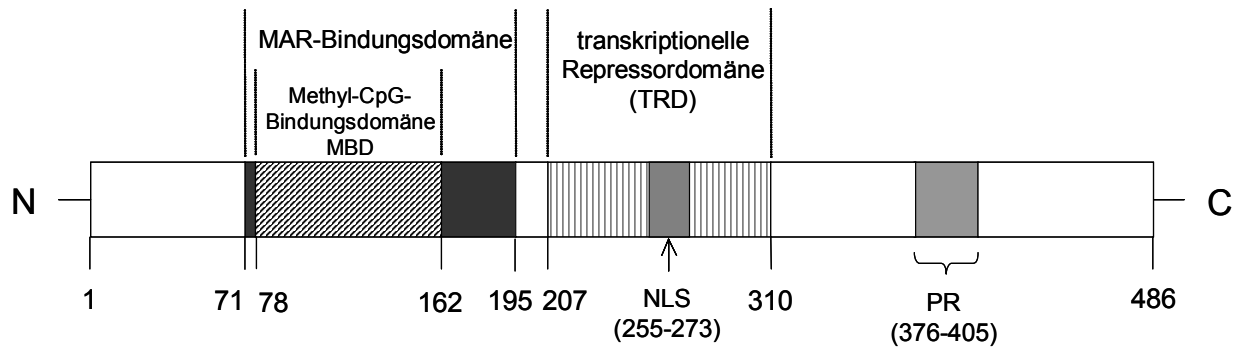


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des humanen Methyl-CpG-bindenden Proteins 2 (hMeCP2). Die MAR-Bindungsdomäne ist schwarz und diagonal gestreift, die Methyl-CpG-Bindungsdomäne diagonal gestreift, die transkriptionelle Repressordomäne senkrecht gestreift dargestellt. Das Kernlokalisierungssignal (NLS) und die Prolin-reiche Region (PR) sind jeweils grau markiert. Die Zahlenangaben bezeichnen die Aminosäurepositionen.

Die Methylierung der 5'-Position von Cytosinen in Cytidin-Guanosin (CpG) Dinukleotiden ist eine häufig auftretende Modifikation des eukaryotischen Genoms. In Genomen von Säugern sind ungefähr 60 bis 90 Prozent der CpG-Dinukleotide methyliert (Fujita et al., 1999). Diese Methylierung ist bedeutend für die Repression von Genen, die X-chromosomale Inaktivierung, die Allel-spezifische Genexpression (*Imprinting*), die negative Regulation transponierbarer Elemente und die Entstehung von Krebs (Eden und Cedar, 1994; Bird, 1992). Im Menschen gibt es drei DNA-Methyltransferasen (DNMT). DNMT1 ist für die Erhaltung des Methylierungsmusters während der Replikation der DNA zuständig, während DNMT3A und 3B *de novo* Methyltransferasen sind, die das Methylierungsmuster der DNA etablieren (Okano et al., 1998, 1999). Der Knock-out von DNA-Methyltransferasen führt bei Mäusen zu schweren Schädigungen. Der Knock-out des *DNMT1*- oder des *DNMT3B*-Gens ist embryonal letal, der Knock-out des *DNMT3A*-Gens ist frühzeitig postnatal letal (Li et al., 1992; Okano et al., 1999). Bei Menschen verursachen Mutationen des *DNMT3B*-Gen das rezessive autosomale ICF-Syndrom (*Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies*; Xu et al., 1999). Eine abnormale DNA-Methylierung ist an der Pathogenese vieler Krebsfälle beteiligt. So kann die Hypomethylierung zur Aktivierung von Onkogenen und die Hypermethylierung zur Repression von Tumorsuppressorgenen führen. In beiden Fällen kann unkontrolliertes Zellwachstum erfolgen (Robertson, 2001; Rountree, 2001). Im Genom ist 5'-Methylcytosin ein

Hotspot für Mutationen (Rideout et al., 1990), da die Desaminierung von 5'-Methylcytosin zu Thymin spontan ablaufen kann (Frederico et al., 1990). Daher sind CpG-Dinukleotide häufig von Mutationen betroffen. Gleichzeitig sind sie seltener im menschlichen Genom anzutreffen als die Basenzusammensetzung erwarten ließe. Ein kleiner Teil der CpG-Dinukleotide liegt im Genom nicht zufällig verteilt vor, sondern gehäuft in CpG-Inseln, die meist mit Promotoren assoziiert sind (Antequera und Bird, 1993; Cross und Bird, 1995). Diese Cluster von CpG-Stellen liegen dort unmethyliert vor (Antequera und Bird, 1993). Im Allgemeinen geht die Methylierung von CpG-Dinukleotiden, die nicht in Clustern vorliegen, mit transkriptioneller Repression von Genen einher (Bird, 1986; Siegfried und Cedar, 1997). Bei weiblichen Säugern ist die starke Methylierung eines der beiden X-Chromosomen an dessen transkriptioneller Inaktivierung beteiligt. Das inaktivierte X-Chromosom ist äußerst kompakt und lichtmikroskopisch als so genannter Barr-Körper im Zellkern sichtbar (Riggs und Pfeifer, 1992).

In *GST-Pulldown-Assays* und mittels Immunpräzipitation wurde gezeigt, dass die Transkription-reprimierende Domäne (TRD) von MeCP2 einen oligomeren Ko-Repressorkomplex bindet (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998). Dieser enthält den transkriptionellen Ko-Repressor mSin3A, die Histondeacetylasen HDAC 1 und 2, die Histon-bindenden Proteine RbAp46 und 48 (*Retinoblastoma protein-associated protein 46/48*) und die Proteine SAP18 und 30 (*Silencer associated protein 18/30*). Nach allgemeiner Auffassung bindet MeCP2 an methyliertes Chromatin und rekrutiert den Ko-Repressorkomplex bestehend aus mSin3A und den erwähnten Proteinen. Die folgende Deacetylierung von Histonen induziert eine Kompaktierung der DNA zu einer transkriptionell inaktiven Chromatinstruktur (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998; Razin, 1998). Durch den Einsatz des Histondeacetylase-Inhibitors Trichostatin A wurde die MeCP2-vermittelte transkriptionelle Repression zumindest teilweise wieder aufgehoben (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998). Damit wurde die Abhängigkeit der transkriptionellen Repression von den Histondeacetylasen gezeigt. Es wurde auch eine MeCP2-vermittelte transkriptionelle Repression beschrieben, die Histondeacetylase-unabhängig ist (Yu et al., 2000; Kaludov und Wolffe, 2000). In Reportergenanalysen wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Repression des SV40-Promotors durch die TRD von MeCP2 mit Trichostatin A nicht aufgehoben wird. Die Repression des adenoviralen *major late promoter* durch die TRD von MeCP2 wurde jedoch durch Trichostatin A aufgehoben. Die Repression ist in diesem Fall also Histondeacetylase-abhängig. So scheint der Mechanismus der Repression durch den Promotor bestimmt zu sein.

Der Repressor MeCP2 verbindet durch die Domänen MBD und TRD zwei generelle Mechanismen der Genregulation, DNA-Methylierung und Histondeacetylierung (Razin, 1998). Strätling und Yu (1999) vermuteten, dass durch die Bindung von MeCP2 an MAR-Elemente das Chromatin in der näheren Umgebung in einen transkriptionell inaktiven, kompakten Zustand überführt wird. Infolgedessen käme es weiter entfernt vom MAR-Element zu einer relativ erhöhten Konzentration an Proteinen, die Acetyltransferase-Aktivität besitzen und das Chromatin in einen „offenen“ Zustand überführen. Transkriptionsfaktoren könnten dadurch besser an Promotoren binden und die Expression steigern.

MeCP2 gehört zu einer Familie von Kernproteinen, die alle das Aminosäuremotiv der Methyl-CpG-bindenden Domäne (MBD) besitzen. Sie wurden aufgrund der Sequenzhomologie mit der MBD von MeCP2 in einer EST-Datenbank identifiziert (Hendrich und Bird, 1998). Die weiteren Mitglieder dieser Familie wurden MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 genannt. Außerhalb der MBD besitzen die fünf Proteine keine hohe Homologie (Hendrich und Bird, 1998). Für MeCP2, MBD1, MBD2 und MBD4 wurde gezeigt, dass sie spezifisch an methylierte DNA binden, unabhängig von der DNA-Sequenz (Lewis et al., 1992; Cross et al., 1997; Hendrich und Bird, 1998).

MBD1 und MBD2 sind wie MeCP2 ebenfalls transkriptionelle Repressoren (Fujita et al., 1999; Ng et al., 2000; Cross et al., 1997). Rekombinantes MBD1 reprimiert *in vitro* die Transkription von methylierter, nicht aber von unmethylierter DNA (Fujita et al., 1999). MBD1 besitzt eine C-terminale transkriptionelle Repressordomäne, die jedoch keine Sequenzähnlichkeit zu der von MeCP2 aufweist (Ng et al., 2000). Die transkriptionelle Repression kann durch den Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A teilweise aufgehoben werden. Es ist noch unbekannt, welche Histondeacetylaser mit MBD1 assoziiert sind (Ng et al., 2000). MBD2 ist Bestandteil von MeCP1 (Cross et al., 1997; Ng et al., 1999), einem großen Proteinkomplex von 400 bis 800 kDa, der zwölf oder mehr methylierte CpG-Stellen unabhängig vom Sequenzkontext bindet (Meehan et al., 1989). Der MeCP1-Komplex bindet und deacetyliert methylierte Nukleosomen *in vitro* und reprimiert somit methylierte Gene (Feng und Zhang, 2001). MBD2 besitzt eine transkriptionelle Repressordomäne, die mSin3A bindet und teilweise mit der Methyl-CpG-Bindungsdomäne überlappt (Boeke et al., 2000). Die transkriptionelle Repression von MBD2 ist ebenfalls Histondeacetylase-abhängig, sie wird durch Trichostatin A aufgehoben (Ng et al., 1999). Humanes MBD3 bindet als einziges Mitglied der MBD-Familie nicht an

methylierte DNA (Hendrich und Bird, 1998). Nur für MBD3 aus dem afrikanischen Krallenfrosch konnte eine Bindung an methylierte DNA nachgewiesen werden (Wade et al., 1999). MBD3 wurde als eine Komponente des Ko-Repressorkomplexes Mi-2/NuRD identifiziert (Tong et al., 1998; Wade et al., 1998, 1999; Xue et al., 1998). Der Mi-2/NuRD-Komplex ist am *Nucleosome-Remodeling* beteiligt (Zhang et al., 1999). Der NuRD-Komplex kann von MBD2 *in vitro* an methylierte DNA rekrutiert werden, obwohl MBD2 nicht Teil des Komplexes ist (Zhang et al., 1999). Für MBD2 und MBD3 wurde gezeigt, dass sie über C-terminale *coiled-coil*-Motive dimerisieren können (Tatematsu et al., 2000). Nach Dimerisierung sind sie in der Lage, an hemimethylierte DNA zu binden. MBD4 hat eine ähnliche Proteinsequenz wie bakterielle DNA-Reparatur-Enzyme und ist an der Reparatur von TG-Mismatches (TG•CG) beteiligt, welche durch spontane Desaminierung von Methylcytosin zu Thymin entstehen (Hendrich et al., 1999a und 1999b).

Die Strukturen der hochkonservierten MBD von humanem MeCP2 und MBD1 wurden mit kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR) aufgeklärt. Die Domäne besteht aus einem drei- oder viersträngigen, antiparallelen β -Faltblatt, einer direkt folgenden α -Helix und zwei Schleifen (Wakefield et al., 1999; Ohki et al., 1999, 2001; Brunner et al., 2000). Die β -Faltblätter und die α -Helix bilden eine keilförmige Tertiärstruktur, wobei basische, in der MBD-Familie konservierte Aminosäuren weitestgehend auf eine Seite der Struktur und eine flexible Schleife begrenzt sind. Durch diese basischen Aminosäuren ergibt sich eine große positiv geladene Oberfläche, die mit der DNA interagiert (Ohki et al., 1999). Diese Struktur wurde bisher bei keinem anderen Protein gefunden (Wakefield et al., 1999). Für die exponiert lokalisierten Aminosäurereste Tyrosin-123 und Isoleucin-125 der MBD von MeCP2 wird eine Bindung über van der Waals'sche Kräfte mit den Methylgruppen der 5'-Methylcytosine diskutiert (Wakefield et al., 1999). Ohki et al. (2001) zeigten für MBD1, dass die zwei Methylgruppen der methylierten CpG-Stelle durch Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren Valin-20 (Lysin-109), Arginin-22 (111), Tyrosin-34 (123), Arginin-44 (133) und Serin-45 (134) und der großen Furche der DNA-Helix erkannt werden (in Klammern: Positionen im hMeCP2). Diese fünf Aminosäuren bilden eine kontinuierliche hydrophobe Struktur, die die Wechselwirkungen zwischen DNA und Protein vermittelt. Bis auf das Valin-20 sind diese Aminosäuren in allen funktionsfähigen MBD-Proteinen konserviert. MeCP2 enthält stattdessen ein basisches Lysin. Die eine Methylgruppe der methylierten CpG-Stelle wird in einer Tasche

bestehend aus den hydrophoben Aminosäuren Valin-20 und Tyrosin-34 (123) sowie dem aliphatischen Arginin-22 (111) gebunden (Ohki et al., 2001). Die zweite Methylgruppe wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den aliphatischen Resten der konservierten Aminosäuren Arginin-44 (133) und Serin-45 (134) erkannt. Die Wechselwirkungen mit den Guanin-Basen erfolgen über Wasserstoffbrückenbindungen der Aminosäuren Arginin-22 (111) und -44 (133). Das Arginin-22 (111) interagiert mit seiner Guanidiniumgruppe zusätzlich mit der zwischen Methylcytosin und Guanin liegenden Phosphatgruppe (Ohki et al., 2001). Mutationsanalysen ergaben, dass die Arginine-22 (111) und -44 (133) für die Bindung methylierter DNA essentiell sind. Die Erkennung methylierter CpG-Stellen erfolgt ausschließlich durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen der fünf genannten Aminosäuren (Ohki et al., 2001). Das von Wakefield et al. (1999) für die DNA-Bindung diskutierte Isoleucin-125 ist nur zwischen MeCP2 und MBD4 konserviert, MBD1 enthält stattdessen Glutamin, MBD2 Phenylalanin und MBD3 Tyrosin. Die Aminosäure Tyrosin-123 des humanen MeCP2 wird von beiden Arbeitsgruppen für die Bindung methylierter DNA favorisiert und ist zwischen MeCP2, MBD1, MBD2 und MBD4 konserviert, nur MBD3 enthält Phenylalanin an dieser Position (Wakefield et al., 1999; Ohki et al., 1999, 2001). Wie bereits erwähnt, ist MBD3 das einzige Mitglied der MBD-Familie, das nicht an methylierte DNA bindet. Es hat an den beiden Positionen, die für die Bindung von MeCP2 an methylierte DNA favorisiert werden, andere Aminosäuren (Wakefield et al., 1999). Das MBD3 des afrikanischen Krallenfroschs, welches als einziges beschriebenes MBD3 an methylierte DNA bindet, enthält an der Position 123 ein Tyrosin, analog zu MeCP2 und MBD1 (Ohki et al., 1999, 2001). Dies weist auf die Bedeutung dieser Aminosäure für die Bindung methylierter DNA hin. Im MeCP2 existiert noch eine dritte hydrophobe Aminosäure (Alanin-131), die in den anderen Homologen durch basische Aminosäuren ersetzt wird. Die keilförmige DNA-bindende Struktur der MBD von MeCP2 wird durch ein hydrophobes Trio aus Leucin-108, Tyrosin-120 und Valin-159 begrenzt, das bei MBD1 bis 3 nicht vorkommt (Wakefield et al., 1999). Aufgrund dieser Unterschiede kann angenommen werden, dass jedes Mitglied der MBD-Familie zur Bindung an methylierte CpG-Sequenzen individuelle flankierende DNA-Sequenzen benötigt.

In Mausembryonen führt der Knock-out der DNA-Methyltransferase 1 zu schweren Defekten während der Entwicklung und zu früher embryonaler Letalität (Li et al., 1992). Gleiches gilt für die *MBD3* Knock-out-Maus. Sie stirbt während der frühen Embryogenese, während die *MBD2* Knock-out-Maus lebensfähig ist (Hendrich et al., 2001). Die Deletion des *MBD3*-Gens führt

möglicherweise zu einem kompletten Ausfall des NuRD-Komplexes, während die Deletion des *MBD2*-Gens nur einen Einfluss auf einen Teil der NuRD-Funktion hat (Hendrich et al., 2001). Die lebensfähige *MBD2* Knock-out-Maus zeigt jedoch ein gestörtes mütterliches Verhalten, da ihr Geruchssinn eingeschränkt ist (Hendrich et al., 2001).

Das *MECP2*-Gen liegt auf dem X-Chromosom (Xq28), ist 75,9 Kb lang und enthält vier Exons (Quaderi et al., 1994; Vilain et al., 1996; Reichwald et al., 2000). Der Promotor und das erste, nicht kodierende Exon (69 bp) liegen in einer CpG-Insel. Der Translationsstart befindet sich im zweiten Exon (124 bp). Das dritte und vierte Exon (351 und 9642 bp) kodieren für die wichtigen Domänen von MeCP2, die MBD (Exon 3 und 4) und die TRD (Exon 4). Das *MECP2*-Gen wird in allen untersuchten Geweben ubiquitär exprimiert und besitzt zwei Polyadenylierungsstellen (Reichwald et al., 2000). Daher entstehen zwei unterschiedlich lange Transkripte von 1,9 Kb und etwa 10 Kb, deren Verteilung gewebespezifisch ist (Reichwald et al., 2000). So wird im Gehirn das 10 Kb-Transkript stark, das 1,9 Kb-Transkript dagegen kaum exprimiert. In Muskelgeweben wie der Skelettmuskulatur und dem Herz wird das kurze Transkript stark exprimiert, das längere wiederum sehr viel weniger (Reichwald et al., 2000). Der Gehalt von MeCP2 ist in der adulten Maus in Geweben aus Hirn, Lunge und Milz hoch, in Herz und Niere schwächer und in Leber, Magen und Dünndarm gerade noch zu detektieren (Shahbazian et al., 2002). Es wurde keine Korrelation zwischen Protein- und RNA-Gehalt gefunden, so dass die Translation des Proteins möglicherweise durch gewebsspezifische Faktoren posttranskriptionell reguliert wird. Der Zeitpunkt der Expression von MeCP2 korreliert bei Maus und Mensch mit der Reifung des zentralen Nervensystems, wobei die ontogenetisch älteren Strukturen wie das Rückenmark und der Hirnstamm MeCP2 früher als die neueren Strukturen wie Hippocampus und cerebraler Cortex exprimieren (Shahbazian et al., 2002). Im Cortex erscheint MeCP2 zuerst in den Cajal-Retzius-Zellen, dann in den Neuronen der tiefer gelegenen, reiferen kortikalen Schichten und zum Schluss in den Neuronen der höheren Schichten. Im ausgereiften Gehirn ist MeCP2 in der Mehrzahl der Neurone vorhanden, in Gliazellen jedoch nicht (Shahbazian et al., 2002). Durch Untersuchungen mit *Laser-Scanning-Cytometrie* zeigten LaSalle et al. (2001), dass es im normalen humanen Hirn eine Subpopulation von Zellen gibt, die MeCP2 stark exprimieren, während die übrigen Zellen eine niedrigere MeCP2-Expression aufweisen. Die unterschiedlich MeCP2-exprimierenden Zellen waren mosaikartig verteilt: die MeCP2 stark exprimierenden Zellen lagen in der Schicht IV der Großhirnrinde, die MeCP2 schwach exprimierenden Zellen in

der granulären Schicht des Cerebellums akkumuliert vor (LaSalle et al., 2001). In dieser Arbeit wurde MeCP2 auch in Gliazellen schwach detektiert (LaSalle et al., 2001).

Amir et al. (1999) identifizierten Mutationen im *MECP2*-Gen als Ursache für das Rett-Syndrom. Bereits 1966 beschrieb der Wiener Kinderarzt Dr. Andreas Rett erstmals diese neurologische Störung (Rett, 1966). Es handelt sich um eine dominante Erkrankung, von der vor allem Mädchen betroffen sind (Amir et al., 1999). Das Rett-Syndrom tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1 zu 15.000 weiblichen Neugeborenen auf (Hagberg, 1985; Kerr und Stephenson, 1985). Männliche Embryonen sind von dem sporadisch auftretenden Rett-Syndrom kaum betroffen, da die bevorzugt zugrunde liegenden *de novo* Mutationen in der paternalen Keimbahn entstehen (Girard et al., 2001; Trappe et al., 2001). Da Jungen nur ein X-chromosomal lokalisiertes *MECP2*-Allel besitzen, sind Mutationen des Gens darüberhinaus für Jungen möglicherweise letal. Es wurden jedoch auch einige Fälle von männlichen Trägern mit *MECP2*-Mutationen beschrieben, die nicht letal waren (Wan et al., 1999; Orrico et al., 2000; Clayton-Smith et al., 2000; Villard et al., 2000). Bei Rett-Patientinnen sind im Vergleich zu gesunden Frauen der Kopfumfang, das Gewicht des Gehirns, die Größe der Neuronen und Zellkerne sowie die Zelldichte im Gehirn reduziert (Hagberg et al., 2000; Baumann et al., 1995; Belichenko et al., 1994). Viele Hirnregionen weisen eine geringere Anzahl an Dendriten und Verzweigungen auf (Belichenko et al., 1994; Armstrong et al., 1995, 1998). Aus klinischer Sicht entwickeln sich die Patientinnen in den ersten sechs bis 18 Lebensmonaten normal. Es folgt eine Phase, in der es zu mentaler Retardierung und zu einer rasch fortschreitenden Rückentwicklung bereits erworbener Fähigkeiten kommt, z. B. zum Verlust bereits erlernter Sprache, gezielter Handbewegungen und sozial-kommunikativer Fähigkeiten. Es werden stereotype Bewegungen entwickelt, z. B. Waschbewegungen der Hände, die während der gesamten Wachperiode ausgeführt werden. Oft treten Atemprobleme auf. Ab dem vierten Lebensjahr folgt eine Phase der Stagnation, in der es auch zu epileptischen Anfällen kommen kann. Zu den klinischen Diagnosekriterien gehören neben der mentalen Retardierung und den stereotypen Handbewegungen auch Atemprobleme, Krämpfe, Skoliose und allgemeine Hypoaktivität. Bisher sind weder eine biochemische Diagnose noch eine kausale Therapie verfügbar, die Diagnostik erfolgt PCR-basiert. Es wurde noch nicht geklärt, wie das Fehlen von funktionellem MeCP2 die Pathogenese des Rett-Syndroms verursacht.

In ca. 80 % der sporadisch auftretenden Fälle mit klassischem Rett-Syndrom und der Patienten mit einer variablen Form des Syndroms wurden Mutationen im *MECP2*-Gen gefunden (Amir et al., 1999; Wan et al., 1999; Bienvenu et al., 2000; Cheadle et al., 2000; Dragich et al., 2000; Huppke et al., 2000). Es wurden Missense- und Nonsense-Mutationen sowie Insertionen und Deletionen detektiert. Im *MECP2*-Gen sind sämtliche Bereiche der kodierenden Sequenz von Mutationen betroffen. Häufig kommen Transitionen von C zu T innerhalb von CpG-Stellen vor. Sie können durch die Desaminierung von 5'-Methylcytosin zu Thymin entstehen. Transitionen sind für etwa 65 % der Mutationen in Patienten mit klassischem Rett-Syndrom verantwortlich und treten bevorzugt im kodierenden Bereich der MBD und der TRD auf. Deletionen und Insertionen sind die Ursache für *Frame-Shift*-Mutationen, die besonders häufig im 3'-Ende des vierten Exons anzutreffen sind. Sie sind für ca. 10 % der Mutationen bei Rett-Patienten verantwortlich (Dragich et al., 2000). In etwa 20 % der sporadisch auftretenden Fälle mit klassischem Rett-Syndrom wurden keine Mutationen im *MECP2*-Gen gefunden. Da sich die Untersuchungen jedoch überwiegend auf die kodierende Sequenz beschränkten, können in diesen Fällen Mutationen in den bisher kaum untersuchten nicht-translatierten Bereichen des *MECP2*-Gens nicht ausgeschlossen werden. Ebenso können größere Deletionen oder Insertionen mit Hilfe der verwendeten Analyseverfahren wie PCR-basiertes oder direktes Sequenzieren nicht detektiert werden. In den seltenen familiär auftretenden Fällen mit Rett-Syndrom werden im Vergleich zu den sporadischen Fällen weitaus weniger Mutationen detektiert (Amir et al., 2000; Cheadle et al., 2000). Eine Korrelation zwischen Mutationstyp und Krankheitsbild wurde von den meisten Autoren nicht gefunden. Es wurden auch Fälle von Frauen mit Mutationen im *MECP2*-Gen beschrieben, die wahrscheinlich durch nicht-zufällige X-chromosomale Inaktivierung symptomfrei sind (Amir et al., 2000; Bienvenu et al., 2000). Amir et al. (2000) fanden in 31 von 34 Patientinnen mit klassischem Rett-Syndrom (91 %) eine zufällige Inaktivierung des X-Chromosoms. Bei drei Patientinnen lag eine nicht-zufällige Inaktivierung vor, die mit einem milderem Phänotyp assoziiert war.

Konditionale *MECP2* Knock-out-Mäuse zweier Arbeitsgruppen wiesen dem humanen Rett-Syndrom vergleichbare Eigenschaften auf (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Beide *MECP2*-Null-Mutanten, männlich hemizygot und weiblich homozygot, waren lebensfähig und zeigten direkt nach der Geburt keinen Rett-Phänotyp. Nach ungefähr drei bis acht Wochen stellten sich Rett-ähnliche Symptome wie unkoordinierte Bewegungen, reduzierte Aktivität und Atmungsprobleme ein (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Diese Mäuse hatten insbesondere

kleinere Gehirne sowie kleinere und dichter gepackte Neuronen (Chen et al., 2001). Die Tiere starben innerhalb von zehn Wochen. Bei heterozygoten Weibchen wurde ein Rett-ähnlicher Phänotyp erst nach drei bis zwölf Monaten diagnostiziert (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Durch gezielte Mutagenese wurden Mäuse erzeugt, in denen *MECP2* während des Embryonalstadiums spezifisch im Gehirn deletiert wurde (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Diese Mäuse zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie die Null-Mutanten. Bei weiteren Knock-out-Mäusen, in denen *MECP2* selektiv in post-mitotischen Neuronen des Gehirns ausgeschaltet wurde, trat ebenfalls ein den Null-Mutanten vergleichbarer Phänotyp auf, wenn auch später und schwächer ausgeprägt (Chen et al., 2001). Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass durch *MECP2*-Mutationen vor allem die Neuronen des Gehirns geschädigt werden, andere Gewebe scheinen nicht oder kaum betroffen zu sein. Des Weiteren scheint sich die Mutation erst im ausgereiften postmitotischen Gehirn zu manifestieren, die Hirnentwicklung wird nur geringfügig beeinträchtigt (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Es wird diskutiert, dass MeCP2 im Gehirn die unspezifische Transkription, das „Hintergrundrauschen“, unterdrückt und deshalb das Gehirn in der Lage ist, differenzierte Signale wahrzunehmen und auf diese ebenso geordnet mit der Transkription neuer Gene zu reagieren (Nan et al., 1997; Carter und Segal, 2001, Van den Veyver und Zoghbi, 2000). Möglicherweise sind Neuronen gegenüber dem transkriptionellen Rauschen empfindlicher als andere Zelltypen, so dass sich die *MECP2*-Mutationen hauptsächlich im Gehirn auswirken. MeCP2 könnte außerdem für das Neuronen-spezifische Expressionsmuster mitverantwortlich sein. Eine *MECP2*-Mutation führt in diesem Fall zur unkontrollierten Expression Neuronen-spezifischer Gene (Carter und Segal, 2001). Genexpressionsanalysen des Hirngewebes von Rett-Patienten zeigten eine Erhöhung von Glia-Transkripten, die in bekannte neuropathologische Mechanismen involviert sind (Colantuoni et al., 2001). Eine Abnahme der Expression wurde bei vielen Neuronen-spezifischen mRNAs beobachtet. Die dramatische Abnahme der Expression von präsynaptischen Markern deutet auf ein spezifisches Defizit der präsynaptischen Entwicklung hin (Colantuoni et al., 2001).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erstellung einer Bibliothek, in der MeCP2-gebundene DNA-Sequenzen angereichert sind. Untersuchungen von MeCP2 gebundenen humanen Sequenzen wurden bisher meist *in vitro* durchgeführt, *in vivo* sind die Zielsequenzen noch weitestgehend unbekannt. *In vitro* wurde gezeigt, dass Mutationen in der MBD von humanem MeCP2 die Affinität zu methylierter DNA herabsetzen oder gänzlich unterbinden (Ballestar et al., 2000; Free et al., 2001). ARBP/MeCP2 bindet *in vitro* an unmethylierte sowie methylierte

Mäuse- und Hühner-Satelliten-DNA (Weitzel et al., 1997). In Übereinstimmung damit wurde durch Immunfluoreszenzuntersuchungen gezeigt, dass murines MeCP2 ein abundanter Bestandteil des *in vivo* stark methylierten, pericentromeren Heterochromatins von murinen Metaphasechromosomen ist (Lewis et al., 1992). Es stellt sich die Frage, ob MeCP2 im humanen Genom ebenfalls an stark methylierten DNA-Sequenzen lokalisiert ist. Aufgrund der beschriebenen Affinität zu methylierter DNA stellen Retrotransposons, α -Satelliten- und klassische Satelliten-DNA im humanen Genom ein mögliches Ziel von MeCP2 dar. Die Retrotransposons stellen mit etwa 90 % den größten Anteil an methylierter DNA im humanen Genom (Lander et al., 2001). Die α -Satelliten- und klassischen Satelliten-DNAs liegen ebenfalls stark methyliert vor. α -Satelliten-DNA ist in den Centromeren, die klassischen Satelliten-DNAs in den Juxtacentromeren der Chromosomen lokalisiert.

Im humanen Genom werden vier Klassen von Retrotransposons unterschieden.

Eine große Familie von Retrotransposons ist die Gruppe der *Short Interspersed Nuclear Elements* (SINEs). SINEs sind ca. 100 bis 400 bp kurze Elemente, die einen internen Polymerase-III-Promotor beinhalten und keine Proteine kodieren. SINEs sind nicht-autonome Transposons, die vermutlich unter Verwendung der LINE-Maschinerie transponieren. Die Familie der SINEs besteht aus der Subgruppe der Alu-Elemente und der Subgruppe der *Mammalian-wide Interspersed Repeats* (MIRs). Die MIRs stellen etwa 2 % des humanen Genoms, stammen von tRNA-Sequenzen ab und sind im humanen Genom inaktiv (Lander et al., 2001). Alu-Elemente stellen dagegen mit 1,09 Millionen Kopien etwa 10 % des humanen Genoms (Lander et al., 2001), stammen vom 7SL-Gen ab (Quentin, 1994) und zählen zu den noch aktiven Nicht-LTR-Retrotransposons. Alu-Elemente wurden nach ihrem evolutionärem Alter mit der Nomenklatur J, S, Y benannt. Die ältesten Alu-Elemente mit ca. 60 bis 100 Millionen Jahren sind die AluJ, die mittelalten mit ca. 25 bis 60 Millionen Jahren die AluS und die jüngsten mit bis zu ca. 30 Millionen Jahren die AluY. Zur Gruppe der älteren Alu-Elemente J und S zählen ca. 83 % aller Alu-Elemente, etwa 17 % sind der jüngeren und noch aktiven Gruppe der AluY zugeordnet (Roy-Engel et al., 2001). Die jüngeren AluY-Elemente weisen mehr CpG-Stellen auf als die älteren AluS- und AluJ-Elemente. Die älteren Alu-Elemente haben diese CpG-Stellen aufgrund von C→T Transitionen verloren. Bei der Retrotransposition sind Alu-Elemente auf die Maschinerie von LINE-1-Elementen angewiesen (Boeke, 1997). Die Alu-Elemente können durch Retrotransposition oder homologe Rekombination Krankheiten auslösen.

Sie können durch Insertion unter anderem Hämophilie B, Hypercholesterinämie und Duchenne-Muskeldystrophie auslösen (Deininger und Batzer, 1999). Alu-Elemente haben möglicherweise eine physiologische Funktion. Unter zellulären Stressbedingungen werden vermehrt Alu-Transkripte produziert, diese können die Interferon-induzierbare, durch doppelsträngige RNA aktivierte Proteinkinase (PKR) inhibieren und infolgedessen die Proteintranslation induzieren (Chu et al., 1998). Alu-Elemente sind stark methyliert (Liu und Schmid, 1993). Die DNA-Methylierung hemmt die Alu-Transkription *in vitro* und diese Inhibition wird durch einen limitierenden, bislang nicht identifizierten Faktor vermittelt (Liu und Schmid, 1993).

Eine weitere Familie an Retrotransposons bilden die *Long Interspersed Nuclear Repeats* (LINEs). Es existieren etwa 868.000 LINE-Kopien im humanen Genom, dies entspricht einem Gehalt von über 20 % (Lander et al., 2001). LINE-Elemente sind autonome Retrotransposons (Smit, 1996), die aufgrund ihrer Verbreitung als „erfolgreichste Erfindung“ im eukaryotischen Genom gelten (Furano, 2000). Bei den LINE-Elementen sind drei Subfamilien zu unterscheiden: LINE-1, LINE-2 und LINE-3. Nur eine Untergruppe der LINE-1-Elemente ist im humanen Genom noch aktiv. Vollständige humane LINE-Elemente sind ca. 6 Kb lang, beinhalten einen internen RNA-Polymerase-II-Promotor im 5'-untranslatierten Bereich und enthalten zwei lange offene Leserahmen (ORF). Der interne 5'-Polymerase-II-Promotor enthält eine stark methylierte CpG-Insel (Woodcock et al., 1997). ORF1 kodiert für ein RNA-bindendes Protein, ORF2 für ein Protein mit Endonuklease- und reverse Transkriptase-Domänen. Der Mechanismus der Retrotransposition beinhaltet die Entstehung eines vollständigen Transkripts des LINE-Elements, die Translation der beiden offenen Leserahmen sowie die reverse Transkription und Insertion in neue genomische Loci (Boeke, 1997). Im Cytosol binden die gerade translatierten Proteine direkt an die LINE-RNA. Dieser Komplex gelangt auf noch unbekanntem Weg in den Zellkern. Hier induziert die Endonuklease einen Einzelstrangbruch, bevorzugt in der Sequenz 5'-TTTT|AA-3' (Feng et al., 1996; Cost und Boeke, 1998). Das 3'-Ende der LINE-RNA hybridisiert an die Schnittstelle und das 3'-Ende der geschnittenen DNA dient als Primer für die reverse Transkriptase. Nach reverser Transkription wird der zweite DNA-Strang geschnitten und durch eine DNA-Polymerase mit der LINE-Sequenz aufgefüllt. Häufig erfolgt die reverse Transkription nicht vollständig, so dass 5'-deletierte, inaktive LINE-Kopien entstehen. Die wenigsten LINE-Elemente im Genom (etwa 5.000) verfügen über eine vollständige Sequenz, daher ist die überwiegende Mehrheit der LINE-Elemente nicht mehr aktiv. Insbesondere LINE-2- und LINE-3-Elemente liegen nur mutiert und stark trunkiert vor und sind daher inaktiv.

Auch die LINE-1-Elemente sind oft am 5'-Ende verkürzt, intern umgeordnet oder mutiert und können daher meist nicht mehr transponieren (Kazazian und Moran, 1998). Etwa 5.000 LINE-Kopien mit kompletter Sequenz sind bekannt, wirklich aktiv sind nur noch ca. 60 bis 100 LINE-1-Elemente (Sassaman et al., 1997; Lander et al., 2001). LINE-Elemente sind egoistische molekulare Parasiten, die durch Transpositionereignisse den Wirt aktiv schaden können. Durch LINE-1-Insertion werden mindestens 13 humane Krankheitsbilder verursacht, unter anderem Hämophilie A, Retinitis Pigmentosum und verschiedene Muskeldystrophien (Ostertag und Kazazian, 2001). Die LINE-Maschinerie ist vermutlich für die meisten Retrotranspositionereignisse im humanen Genom verantwortlich, einschließlich der Retrotransposition nicht-autonomer SINES (Okada et al., 1997; Goodier et al., 2000) und der Erzeugung prozessierter Pseudogene (Esnault et al., 2000). Humane X- und Y-Chromosomen besitzen dreimal bzw. neunmal mehr vollständige Kopien von LINE-1-Elementen als Autosomen. In männlichen Keimzellen können die durch Insertion von LINE-Elementen geschädigten Loci auf dem X- bzw. Y-Chromosom nicht durch chromosomale Rekombination repariert werden (Boissinot et al., 2001). Daher treten hier vermehrt intakte LINE-1-Elemente auf. Es wird diskutiert, dass die starke Methylierung der LINE-1-Promotorregion einen wesentlichen Abwehrmechanismus gegen diese genomischen Parasiten darstellt (*Self defense* Hypothese, Yoder et al., 1997). Yu et al. (2001) zeigten in Transfektionsexperimenten, dass MeCP2 die Transkriptionsrate des LINE-1.3-Elements stark reduzieren kann, wenn dessen interner Promotor durch HpaII methyliert wurde. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Repressordomäne (TRD) von MeCP2 in der Lage ist, die Retrotransposition von LINE-Element L1.3 effektiv zu reprimieren (Yu et al., 2001). Diese vorausgegangenen Analysen lassen vermuten, dass LINE-Elemente auch *in vivo* wichtige Zielsequenzen von MeCP2 sind.

Eine weitere Gruppe transposabler Elemente bilden die *Long Terminal Repeat* Retrotransposons (LTRs). Die LTRs sind autonome Elemente und stellen gut 8 % des humanen Genoms (Lander et al., 2001). Vollständige LTR-Retrotransposons kodieren für eine Protease, eine reverse Transkriptase, eine RNase H und eine Integrase. Sie sind von langen terminalen direkten Repeats (LTRs) flankiert und haben sich durch einen retroviralen Mechanismus verbreitet. Die reverse Transkription fand unter Benutzung von tRNA als Primer in cytoplasmatischen, virus-ähnlichen Partikeln statt. Möglicherweise stammen exogene Retroviren von endogenen LTR-Retrotransposons ab, die sich zusätzlich das zelluläre Hüllprotein (env) angeeignet haben

(Malik et al., 2000). Von den LTR-Retrotransposons scheinen nur die Vertebraten-spezifischen endogenen Retroviren (ERV) im humanen Genom aktiv gewesen zu sein. Sie sind jedoch schon lange inaktiv, oft ging die kodierende Sequenz durch homologe Rekombination zwischen den flankierenden LTR-Sequenzen verloren oder der Promotor wurde durch unvollständige reverse Transkription deletiert. Hinzu kamen zahlreiche natürliche Mutationen, so dass die LTR-Elemente heute nur noch als Fossile betrachtet werden. 85 % der im Genom existierenden LTR-Retrotransposon-Sequenzen bestehen nur noch aus den flankierenden LTRs. Zuletzt waren zwei endogene retrovirale LTR-Familien in Primaten vor 10 bis 15 Millionen Jahren aktiv (Goodchild et al., 1993; Di Cristofano et al., 1995).

Die letzte Klasse an Retrotransposons bilden die DNA-Transposons, sie stellen knapp 3 % des humanen Genoms, haben terminal invertierte Repeats und kodieren eine Transposase (Lander et al. 2001). Die Transposase bindet nahe der invertierten Repeats und vermittelt die Mobilität des Elements über einen *cut and paste* Mechanismus. DNA-Transposons sind innerhalb einer Spezies kurzlebig, da die im Cytoplasma produzierte Transposase im Zellkern nicht zwischen vollständigen und unvollständigen Kopien des DNA-Transposons unterscheiden kann. So akkumulieren die inaktiven Kopien im Genom, die Transposition wird immer ineffizienter und führt zum Aussterben des Elements. Es gibt Anzeichen dafür, dass DNA-Transposons den horizontalen Transfer in „jungfräuliche“ Genome zum Überleben benutzen (Haring et al., 2000). Im menschlichen Genom wurden sieben große Familien der DNA-Transposons mit unterschiedlichem Ursprung gefunden (Smit, 1996).

Möglicherweise unterbindet die Methylierung all dieser Retrotransposons ihre Ausbreitung im Genom, die zu schweren Erkrankungen führen kann (Yoder et al., 1997; Ostertag und Kazazian Jr., 2001). Yu et al. (2001) haben bereits gezeigt, dass MeCP2 eine Rolle bei der Repression der LINE-1-Expression und LINE-1-Retrotransposition spielen kann, es wurde jedoch bislang kein reprimierender Einfluss auf die Alu-Transkription festgestellt.

Neben den Retrotransposons sind die α -Satelliten- und klassischen Satelliten-DNAs potentielle Zielsequenzen von MeCP2. Sie liegen im humanen Genom stark methyliert vor. Die humane α -Satelliten-DNA-Familie besteht aus tandemartig wiederholten Monomeren von etwa 171 bp Länge, ist AT-reich und in den centromeren Regionen der Chromosomen lokalisiert (Manuelidis, 1976; Willard und Wayne, 1987a, 1987b; Wayne und Willard, 1987). Die α -Satelliten

verschiedener Chromosomen weisen charakteristische Sequenzmotive auf, die spezifisch für das jeweilige Chromosom sind (Waye und Willard, 1987). α -Satelliten-DNAs liegen im centromeren Heterochromatin normalerweise methyliert vor, hypomethylierte Sequenzen wurden mit dem ICF-Syndrom (*Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies*) assoziiert (Miniou et al., 1994).

Klassische Satelliten-DNA gliedert sich in drei Subfamilien (1, 2 und 3) und wurde ebenfalls in den centromeren Regionen der Chromosomen lokalisiert (Prosser et al., 1986). Die Satelliten-DNA 1 besteht aus zwei AT-reichen Sequenzen (17 bp und 25 bp) (Waye und Willard, 1987). Die Satelliten-DNAs 2 und 3 sind verwandte Familien, die Wiederholungen des Sequenzmotivs 5'-ATTCC-3' enthalten. Satelliten-DNA 2 wurde definiert als Wiederholung der Sequenz ATTCCAATTCG, gefolgt von einem oder zwei ATG. Die Konsensussequenz besteht aus 23 bp und 26 bp. Die Definition basiert auf drei Hinfl-DNA-Fragmenten (Prosser et al., 1986). Satelliten-DNA 3 wurde definiert als die Alternation zahlreicher CCATT-Pentamere mit dem Pentamer CGGGT (Prosser et al., 1986). Die Satelliten-DNAs 2 und insbesondere 3 enthalten somit zahlreiche methylierbare CpG-Stellen, die im humanen Genom meist auch methyliert vorliegen. In fötalen Geweben werden asynchron methylierte klassische Satelliten-DNAs und α -Satelliten-DNAs gefunden (Miniou et al., 1997). Es wird angenommen, dass diese asynchrone Methylierung der klassischen und α -Satelliten-DNAs das asynchrone Timing der Methylierung während der Embryogenese widerspiegelt (Miniou et al., 1997).

Für das Verständnis der *in vivo* Funktion von MeCP2 ist die Charakterisierung der durch das Protein gebundenen Sequenzen unerlässlich. Die Identifizierung der Bindungssequenzen von MeCP2 und deren Lage im Genom könnte Hinweise für die molekularen Ursachen des Rett-Syndroms liefern und helfen, dieses Krankheitsbild kausal zu verstehen. Mit indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die MeCP2-Verteilung in Zellkernen und auf Metaphasechromosomen mit der methylierten DNA verglichen. Es wurden festgestellt, dass das Methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2) in stark methylierten DNA-Bereichen nicht angereichert vorliegt. Die Methode der Wahl zur Identifizierung von DNA-Zielsequenzen ist die Chromatin-Immunpräzipitation. Bisher wurde diese Technik für Interaktionsanalysen von MeCP2 mit Promotorregionen bestimmter Gene verwendet (Nguyen et al., 2001; Lorincz et al., 2001; Gregory et al., 2001; Ghoshal et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit

wurde die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) eingesetzt, um eine Bibliothek MeCP2-gebundener DNA-Sequenzen zu erstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in p. A. Qualität bezogen. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Roche (Mannheim) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot) erworben. Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

30 % Acrylamid Lösung	Bio-Rad, München
BenchMark gefärbte Protein Leiter	Life Technologies, Karlsruhe
cis-Platin	Sigma, Deisenhofen
Colcemid	Life Technologies, Karlsruhe
Dialyseschlauch (12 kDa <i>cut off</i>)	Roth, Karlsruhe
DNA-Leiter-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
ECL-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>ExpressHyp</i> -Hybridisierungslösung	BD Bioscience, Clontech, Heidelberg
Fugene 6 Reagenz	Roche, Mannheim
Geneticinsulfat (G418)	Life Technologies, Karlsruhe
GeneScreen plus Membran	NEN, Boston, MA, USA
Hydroxylapatit (4 g/A ₂₆₀ Units)	Biorad, München
inkomplettes Freundsches Adjuvans	Sigma, Deisenhofen
komplettes Freundsches Adjuvans	Sigma, Deisenhofen
Lachssperma-DNA/Agarose	Upstate, Lake Placid, NY, USA
Magermilchpulver	Uelzena Milchwerke e. G., Uelzen
Mineralöl, PCR-grade	Sigma, Deisenhofen
Nickel-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Nitrozellulosemembran	
Protan BA85, 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Nick-Säule, Sephadex G-50	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe

Protein-A-Sepharose CL-4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Sephadex G-50 Spin Säulen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Trypanblaufärbelösung	Sigma, Deisenhofen

Enzyme

<i>BigDye Terminator Ready Reaction Mix</i>	ABI PRISM, Applied Biosystems, Darmstadt
	Dye Terminatoren (Rosenblum et al., 1997)
	Deoxynucleosidtriphosphate (dATP, dUTP, dCTP, dITP)
	Ampli Taq-DNA Polymerase FS
	<i>rTth</i> Pyrophosphatase
	Magnesiumchlorid
	Puffer
CIAP (<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNaseI	Roche, Mannheim
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
RNase	Sigma, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase (30 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Radiochemikalien

[α ³² P]dATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
[γ ³² P]dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
[<i>Methyl</i> - ³ H]Thymidin (250 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig

2.1.2 Antibiotika und Medien für die Bakterienkultur

Ampicillin	Stammlösung: 50 mg/ml in Ethanol bei -20 °C lagern Endkonzentration: 50 μg/ml
Streptomycin	Stammlösung: 50 mg/ml in Ethanol bei -20 °C lagern Endkonzentration: 50 μg/ml
Agar	Difco, Detroit, USA

Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit, USA
LB-Agarplatten	10 g Bacto-Tryptone 5 g Bacto-Yeast-Extract 10 g NaCl 15 g Agar ad 1 Liter mit H ₂ O, pH 7,0, nach dem Autoklavieren auf 50 °C abkühlen, bei Bedarf Antibiotika zugeben, in sterile Ø10 cm-Platten gießen, ca. 20 ml pro Platte, erstarren lassen und bei 4 °C lagern
LB-IPTG/X-Gal-Agarplatten	20 µl 500 mM IPTG 50 µl 20 mg/ml X-Gal auf eine LB-Agarplatte ausplattieren, 30 min bei 37°C, frisch verwenden
LB-Medium	10 g Bacto-Tryptone 5 g Bacto-Yeast-Extract 10 g NaCl ad 1 Liter mit H ₂ O, pH 7,0 nach dem Autoklavieren auf 50 °C abkühlen, bei Bedarf Antibiotika zugeben, bei 4 °C lagern

2.1.3 Puffer und Lösungen

Antifade	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 90 % Glycerin 2,3 % DABCO
Block-Puffer B	3 % BSA in PBS-Puffer
Block-Puffer M	5 % Magermilchpulver in TBS-Puffer
10x CIAP-Reaktionspuffer	0,1 M Tris-HCl 0,1 M MgCl ₂ pH 7,5
Colcemid	10 µg/ml in PBS steril filtriert
Coomassie-Färbelösung	0,1 % Coomassie-Blau 200 ml Methanol 50 ml Eisessig 250 ml H ₂ O

Coomassie-Entfärbelösung	50 ml Methanol 75 ml Eisessig 875 ml H ₂ O
DNA-Bindungspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM NaCl 2 mM EDTA
DNA-Denaturierungspuffer	0,25 M NaOH 0,5 M NaCl
DNase I	10 KU lyophilisierte DNase I 550 µl steriles H ₂ O, bei -20 °C lagern
DNA-Verdünnungspuffer	0,125 M NaOH 0,1x SSC
Elutionspuffer	0,1 M NaHCO ₃ 1 % SDS
<i>ExpressHyb</i> -Hybridisierungslösung	keine Angaben über Zusammensetzung
Extraktionspuffer E1	10 mM Tris-HCl 10 mM Na ₂ S ₂ O ₅ 1 M NaCl 0,1 % NP-40 1 mM EDTA-KOH 0,5 mM PMSF pH 8,0
Extraktionspuffer E2	10 mM Tris-HCl 10 mM Na ₂ S ₂ O ₅ 0,1 M NaCl 0,1 % NP-40 1 mM EDTA-KOH 0,5 mM PMSF pH 8,0
Formaldehydlösung 11 % (Orlando et al., 1997)	5,9 ml 14,1 ml 37 % Formaldehydlösung 0,1 M NaCl 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 50 mM HEPES, pH 8,0
Fixativ (für Metaphasen)	75 ml Methanol 25 ml Essigsäure

Glycin-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 254 mM Glycin 0,1 % SDS pH 8,3
Hank's Puffer	1,3 mM CaCl_2 5,4 mM KCl 0,4 mM KH_2PO_4 0,5 mM MgCl_2 0,6 mM MgSO_4 137 mM Na-Acetat 4,2 mM NaHCO_3 0,3 mM Na_2HPO_4 5,6 mM D-Glukose
2x HBS	50 mM HEPES 280 mM NaCl 1,5 mM Na_2HPO_4 pH 7,1 steril filtrieren, bei -20 °C lagern
IgY-Lagerpuffer	0,1 M NaCl 0,01 M K_2HPO_4 50 µg/ml Gentamycinsulfat, pH 7,4
10x Ligase-Puffer (Roche)	400 mM Tris-HCl 100 mM MgCl_2 100 mM DTT 5 mM ATP pH 7,8
Lysispuffer (Samuel et al., 1998)	5 M Harnstoff 2 M Guanidin-HCl 2 M NaCl 200 mM K_2HPO_4 1 mM PMSF pH 7,5
Lysozym	10 mg Lysozym lösen in 1 ml H_2O steril filtrieren, lagern bei -20 °C
Neutralisationspuffer	0,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 7,5

2x NP40-Puffer (Hecht et al., 1996)	280 mM NaCl 100 mM HEPES/KOH, pH 7,5 2 mM EDTA 2 mM PMSF 20 % Glycerin 1 % NP-40 steril filtrieren, lagern bei -20 °C
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3
PBSmn	154 mM NaCl 10 mM Na ₂ PO ₄ 5 mM 2-Mercaptoethanol 0,005 % NaN ₃ pH 7,5
10x PCR Puffer (MBI Fermentas)	100 mM Tris-HCl (pH 8,8) 500 mM KCl 0,8 % Nonidet P40 25 mM MgCl ₂
Puffer B (Roche)	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM 2-Mercaptoethanol pH 8,0
Puffer MM	2,5 % Magermilchpulver in TBS
RF I	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, bei 4 °C lagern
RF II	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin pH 6,8 mit Essigsäure einstellen, bei 4 °C lagern

RSB	10 mM Tris-HCl 10 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ pH 8,0
1x SDS-Gelladepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 6,8 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 2 % SDS 0,1 % Bromphenolblau 10 % Glycerin
20x SSC-Puffer	175,3 g NaCl 88,2 g Na ₃ -Citrat ad 1 Liter pH 7,0
STET-Puffer	8 % Saccharose 0,5 % Triton X 100 50 mM EDTA 10 mM Tris-HCl pH 8,0
5x TBE-Puffer	445 mM Tris-HCl 445 mM Borsäure 10 mM EDTA pH 8,0
TBS-Puffer	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,5
TBS-T-Puffer	0,5 % Tween-20 in TBS-Puffer
TE	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH 8,0
Transfer-Puffer	195 mM Glycin 25 mM Tris 0,01 % SDS 20 % Methanol pH-Wert nicht justieren frisch ansetzen
Trypsin-Lösung	0,05 % Trypsin 0,02 % EDTA in PBS pH 7,3

Waschpuffer 1	PBS, pH 7,7 10 % Glycerin 10 mM Imidazol
Waschpuffer 2	PBS, pH 7,7 10 % Glycerin 50 mM Imidazol
Waschpuffer 3	PBS, pH 7,7 10 % Glycerin 500 mM Imidazol

2.1.4 Kits

<i>EGGstract IgY Purification System</i>	Promega, Mannheim
<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen, Hilden
Qiagen P1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A, bei 4 °C lagern
Qiagen P2	200 mM NaOH 1 % SDS
Qiagen P3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5, bei 4 °C lagern
Qiagen QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Ethanol 0.15% Triton X-100
Qiagen QC	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Ethanol
<i>Expand Long Template PCR System</i>	Roche, Mannheim
<i>Helios Gene Gun Optimization Kit</i>	Biorad, München
<i>NucleoSpin Plasmid</i>	Macherey-Nagel, Düren (basierend auf Birnboim und Doly, 1979)
A1	Lysepuffer mit RNase, bei 4 °C lagern
A2	Lysepuffer mit SDS
A3	Neutralisationspuffer mit Guanidiniumhydrochlorid
A4	Ethanolischer Waschpuffer
AW	Waschpuffer mit Guanidiniumhydrochlorid
AE	5 mM Tris-HCl, pH 8,5

<i>NucleoSpin Extract</i>	Macherey-Nagel, Düren (basierend auf Vogelstein und Gillespie, 1979)
NT1	keine Zusammensetzung angegeben
NT3	keine Zusammensetzung angegeben
NE	5 mM Tris-HCl, pH 8,5
<i>pGEM-T easy Vektor System I</i>	Promega, Mannheim
2x Rapid Ligationspuffer	60 mM Tris-HCl, pH 7,8 20 mM MgCl ₂ 20 mM DTT 2 mM ATP 10 % Polyethylenglycol (MW 8000)
T4-DNA-Ligase (3 U/μl)	
<i>pGEM-T easy</i> (50 ng/μl)	
<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Qiaquick Gel Extraktions-Kit</i>	keine Zusammensetzung angegeben, Qiagen, Hilden
<i>Rediprime II Random Prime Labelling System</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.5 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden vier verschiedene Zelllinien verwandt. Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde hauptsächlich für Chromatin-Immunpräzipitationen und Immunfluoreszenzuntersuchungen benutzt. Sie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hölzel (IMBM, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. MCF-7-Zellen stammen ursprünglich aus dem Pleura-Exudat einer 69-jährigen Patientin mit einem metastasierenden Mammakarzinom (Soule et al., 1973). Des Weiteren wurde die Fibroblastenzelllinie Tasp7 (Luckow und Schütz, 1989) aus Huhn für *Crosslink*-Versuche mit cis-Platin benutzt. Für Transfektionsexperimente und Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden die murine Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 (Cox und Gesner, 1967) und die adenoviral transformierte humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 (Graham et al., 1977) verwandt.

2.1.6 Datenbanken und Programme

Homologievergleiche von Sequenzdaten wurden in den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) und der Datenbank *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>) des *Sanger Institute* und des *European Bioinformatics Institute*

durchgeführt. Weiterhin wurden Sequenzvergleiche und Sequenzformatierungen mit dem Programm Bioedit (T.A. Hall Software) erstellt. Der Gehalt und die Klassifizierung repetitiver Sequenzen wurde mit dem RepeatMasker Programm durchgeführt (<http://repeatmasker.genome.washington.edu>, Smit und Green). Es erkennt weitestgehend alle humanen repetitiven Sequenzen. Die Analyse von MAR-Sequenzen erfolgte mit den Internet-basierten Programmen MAR-Wiz 1.5 von Futuresoft (<http://www.futuresoft.org/MAR-Wiz>) und dem S/MAR-Test von Genomatix (http://www.genomatix.de/cgi-bin/smartest_pd/smartest.pl). Tabellenkalkulationen und Abbildungen wurden mit Hilfe des MS-Office Pakets von Microsoft, dem HP-Deskscan Programm von Hewlett Packard und dem Photoshop von Adobe erstellt. Proteinmengen gescannter Westernblots wurden mit dem Programm SigmaPlot (SPSS Science) quantifiziert.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden an sterilen Werkbänken (Hera Safe, Heraeus) mit vertikalem Luftstrom durchgeführt.

Das Zellwachstum wurde mit einem Lichtmikroskop (Zeiss) überprüft. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank (Heraeus) bei 37 °C in einer Wasserdampf gesättigten 5 % CO₂-Atmosphäre. Die Zelllinien HEK293 und NIH-3T3 wurden in DMEM-Medium (Life Technologies) mit 10 % FCS (Life Technologies) kultiviert. Das DMEM-Medium für Tasp-7-Zellen war neben 10 % FCS zusätzlich mit 4 % Hühnerserum (Life Technologies) angereichert. Die Zelllinie MCF-7 wurde in 25 mM HEPES gepuffertem RPMI1640-Medium mit Glutamax I (Life Technologies) unter Zugabe von 10 % FCS kultiviert. Das Nährmedium wurde alle zwei bis vier Tage gewechselt. Waren die Zellen konfluent gewachsen, so wurde der Zellrasen einmal in PBS gewaschen und durch 5 min Inkubation mit 2-3 ml 37 °C warmer Trypsin-Lösung pro 250 cm² Kulturflasche (Greiner) gelöst. Die Zellen wurden mit einer Glaspipette homogenisiert, das Trypsin durch Zugabe von 37 °C warmem Medium inaktiviert und die Zellen in einer neuen Kulturflasche subkultiviert. Die Zelldichte wurde im Coulter Counter (Modell ZM, Coulter Electronics) ermittelt. Jede Zellzahlbestimmung wurde zwei- bis dreimal wiederholt und gemittelt.

Zur Kryokonservierung wurden subkonfluent gewachsene Zellen, die am Tag zuvor frisches Medium erhalten hatten, trypsiniert, erneut mit 30 ml Medium versetzt und für 3 min bei 1000 g zentrifugiert (Varifuge 3.0R, Heraeus). Das Zellpellet wurde dann in 4 ml zellspezifischem Kryo-Medium aufgenommen, resuspendiert und in Kryo-Röhrchen (Nunc) aliquotiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 2 h bei -20 °C und 16 h bei -80 °C eingefroren, bevor sie langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert wurde. Die Kryokonservierung der Zelllinien HEK293, NIH-3T3 und Tasp-7 erfolgte im jeweiligen Kulturmedium unter Zusatz von 10 % DMSO, die der Zelllinie MCF-7 unter Zusatz von 10 % Glycerin. Zur Wiederanzucht wurde die gefrorene Zellsuspension schnell aufgetaut und in eine mit Nährmedium versetzte Zellkulturflasche überführt. Sobald die Zellen angewachsen waren, üblicherweise nach einem Tag, wurde das Medium gewechselt.

2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte modifiziert nach einer von Hanahan (1983) beschriebenen Methode. 50 ml LB-Medium wurden mit dem jeweils geeigneten Antibiotikum versetzt (Tabelle 1) und mit dem gewünschten Bakterienstamm angeimpft.

Bakterienstamm	Antibiotikum
<i>E. coli</i> XL1-Blue	12,5 µg/ml Tetrazyklin
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	12,5 µg/ml Tetrazyklin
<i>E. coli</i> DH10B	50 µg/ml Streptomycin

Tabelle 1: Bakterienstämme und jeweilige Selektionsantibiotika

Die Bakterien wurden bis zu einer Zelldichte von $4 - 7 \times 10^7$ Zellen/ml bei 37 °C inkubiert (entsprechend $OD_{600nm} = 0,6$). Die Kultur wurde für 15 min auf Eis abgekühlt und bei 1000 g (Varifuge 3.0R, Heraeus) und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 16,7 ml kaltem RF I resuspendiert und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1000 g und 4 °C für 15 min wurde das Zellpellet in 4 ml kaltem RF II resuspendiert und wiederum für 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden in 200 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C

gelagert. Nur der *E. coli* Stamm DH10B wurde in einem Ethanol-Kochsalz-Eisbad (ca. -40 °C) schonender schockgefroren, anschließend auch bei -80 °C gelagert.

2.2.3 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei einem Doppelverdau wurde der Reaktionspuffer so gewählt, dass beide Enzyme mindestens 50 % ihrer maximalen Aktivitäten aufwiesen. Für den Fall, dass dies nicht möglich war, wurde die DNA mit beiden Enzymen nacheinander geschnitten. Das erste Enzym wurde nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert, bevor die zweite DNA-Spaltung durchgeführt wurde. Vektor-DNA, die für eine Klonierung geschnitten wurde, wurde zusätzlich mit CIAP dephosphoryliert (Ahmad und Huang, 1981). Es wurden 10 bis 40 µl Vektor-DNA mit 5 µl des 10x CIAP-Reaktionspuffers versetzt und mit H₂O auf 49 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µl CIAP (1 U/µl) hinzu gegeben und für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert. Die Hitzeinaktivierung der CIAP erfolgte bei 85 °C für 15 min.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von geschnittenen DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten wurde die horizontale Gelelektrophorese benutzt. Es wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 0,5x TBE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, mit 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in einen präparierten Gelträger gegossen. Nach vollständigem Aushärten des Gels wurde die Elektrophorese in einer mit 0,5x TBE gefüllten Gelkammer bei konstanter Spannung (6 - 8 V/cm) durchgeführt. Parallel zu den Proben wurde ein Längenstandard (DNA-Leiter-Mix) aufgetragen, um die spätere Größenbestimmung der DNA-Fragmente auf einem UV-Tisch zu ermöglichen.

2.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Gelen, sei es von enzymatisch geschnittenen oder PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten, erfolgte über eine Säule mit dem *NucleoSpin Extract Kit*. Die Fragmente wurden in einem 1 % Agarosegel nach Größe elektrophoretisch getrennt. Auf dem UV-Tisch wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß transferiert. Für große Ausbeuten an DNA sollte das Gelstück möglichst klein

sein. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer NT1 zugegeben. Die Agarose wurde 10 min bei 50 °C im Heizblock mit leichtem Vortexen zwischendurch gelöst. Die Lösung wurde auf eine *NucleoSpin*-Säule, in einem 2 ml Auffanggefäß stehend, pipettiert und 1 min bei 8.000 g zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Der Durchlauf wurde verworfen und 600 µl ethanolischer Puffer NT3 auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 1 min bei 11.000 g wurde der Durchlauf entfernt und die Säule erneut mit 200 µl Puffer NT3 beladen. Nach 2 min Zentrifugation bei 11.000 g wurde die Säule in ein neues Eppendorfgefäß gestellt. Zur Elution der DNA-Fragmente wurden 50 µl Puffer NE oder steriles H₂O auf die Säule pipettiert und für 1 min mit 11.000 g zentrifugiert. Die Reinheit der eluierten DNA wurde in einem Agarosegel überprüft.

2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente (Inserts) wurden in dreifach molarem Überschuss mit 50 ng linearisierter dephosphorylierter Vektor-DNA unter Verwendung von 1 µl (30 U) T4-DNA-Ligase in 1x Ligasepuffer in einem Endvolumen von 60 µl für 4 h oder über Nacht bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend direkt zur Transformation eingesetzt.

2.2.7 Transformation

Die Transformation der Bakterien erfolgte nach dem Verfahren von Hanahan (1983). 200 µl kompetente Bakterienzellen wurden bei RT aufgetaut und auf Eis gestellt. Der Ligationsansatz oder die Plasmid-DNA wurde zu den kompetenten Bakterien gegeben, kurz geschüttelt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Bakterien wieder auf Eis gestellt. Zu der Zellsuspension wurden 400 µl vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotika gegeben und für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden bei 7.000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Vom Überstand wurden 500 µl verworfen, die Bakterien im restlichen LB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht (ca. 15 h) bei 37 °C inkubiert.

2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präp)

Es wurde eine *Boiling Prep* basierend auf dem Protokoll von Holmes und Quigley (1981) verwandt. Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für viele *E. coli*-Laborstämme. Die Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (ca. 30 min) und in der hohen Qualität der gewonnenen DNA. Es wurden jeweils 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Kulturröhrchen geschüttelt. Je 1,5 ml der Übernachtskulturen wurden in Eppendorfgefäße überführt und bei 5.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 500 µl STET-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl Lysozym (10 mg/ml) wurde das Eppendorfgefäß mehrfach invertiert und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation für 90 sec im Heizblock bei 95 °C unter Schütteln fortgesetzt und für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Nach Zugabe von 50 µl 7,5 M Natriumacetat (pH 5,2) und 500 µl Isopropanol wurde die Lösung geschüttelt und die Plasmid-DNA durch 10 min Zentrifugation bei 14.000 rpm präzipitiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet nach Lufttrocknung in 50 µl H₂O aufgenommen. Typischerweise ließen sich auf diese Weise bis zu 20 µg Plasmid-DNA gewinnen, deren Reinheit ausreichend für die anschließende Restriktionsanalyse war.

2.2.9 Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung

Die Präparation von Plasmid-DNA zum Zwecke der Sequenzierung erfolgte mit dem *NucleoSpin Plasmid-Kit*. Es wurden 3 ml der Übernachtskultur wie in 2.2.8 beschrieben pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer A1 mit RNase durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurde 250 µl Lyse-Puffer A2 zupipettiert, das Eppendorfgefäß 8-mal invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl Neutralisationspuffer A3 wurde das Eppendorfgefäß erneut 8-mal invertiert und 10 min bei 11.000 g zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Der klare Überstand wurde auf eine *NucleoSpin*-Säule, in einem 2 ml Auffanggefäß stehend, pipettiert und 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 600 µl Waschpuffer A4 auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 1 min wurde der Durchlauf entfernt und erneut 2 min zentrifugiert. Zur Elution der Plasmid-DNA wurde die Säule in ein neues Eppendorfgefäß gestellt, 50 µl steriles H₂O auf die Säule pipettiert und für 1 min mit 11.000 g zentrifugiert. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen, wurde die

Elution mit dem Durchfluss einmal wiederholt. Die auf diese Weise gewonnene DNA war für die Sequenzierung (siehe 2.2.11) geeignet. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA einer optischen Dichte von 1,0.

2.2.10 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi-Präp)

Die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979). Für die Präparation wurde das *EndoFree Plasmid Maxi Kit* von Qiagen verwendet. Es wurden jeweils 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Tag bei 37 °C im Kulturröhrchen geschüttelt. Mit dieser Bakteriensuspension wurde anschließend eine 250 ml Übernachtskultur angeimpft. Die 250 ml Übernachtskultur wurde in einem GSA-Rotor (Sorvall) für 10 min bei 4 °C und 5.000 rpm in einer Sorvall-Zentrifuge (RC5B) pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml Qiagen P1 vollständig resuspendiert. Anschließend wurde die alkalische Lyse der Bakterien durch Zugabe von 10 ml Qiagen P2 durchgeführt, es wurde vorsichtig gemischt und bei RT für 5 min inkubiert. Zur Neutralisation wurden 10 ml kaltes Qiagen P3 zugegeben und es wurde sofort vorsichtig gemischt. Nach Inkubation für 10 min bei RT wurden die ausgefällten Proteine durch eine *QIAfilter Maxi Cartridge* Filtration von der gelösten Plasmid-DNA abgetrennt. Zu dem Filtrat wurden 2,5 ml Qiagen ER gegeben, es wurde durch 10-maliges Invertieren gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das klare Lysat wurde auf eine zuvor mit 10 ml Qiagen QBT äquilibrierte *Qiagen-tip-500*-Säule pipettiert. Nachdem das Lysat durchgeflossen war, wurde die Säule 2-mal mit je 30 ml Qiagen QC gewaschen, um Kohlenhydrate zu entfernen. Schließlich wurde die gebundene Plasmid-DNA mit 15 ml Qiagen QN eluiert. Die DNA im Eluat wurde mit 10,5 ml ungekühltem Isopropanol gefällt und für 30 min bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) im Kühlraum pelletiert. Das Pellet wurde mit 2,5 ml kaltem 70%igem endotoxinfreien Ethanol gewaschen und für 10 min zentrifugiert. Die gereinigte DNA wurde an der Luft getrocknet und in 200 - 1000 µl H₂O aufgenommen. Die auf diese Weise gewonnene endotoxinfreie DNA wurde für die Transfektion kultivierter Zellen (siehe 2.2.16) verwendet.

2.2.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung mit *BigDye*-Terminatoren basiert auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode (Sanger et al., 1977). Jede DNA-Probe wird nur einer einzigen Sequenzierungsreaktion unterworfen, die alle vier unmarkierten dNTPs enthält. Der Abbruch der enzymatischen Synthese erfolgt durch den Einbau eines der vier Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs), die unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind. Alle so entstandenen Oligonukleotide können in einem Sequenziergel anhand ihrer unterschiedlich Fluoreszenz identifiziert werden und die DNA-Sequenz kann direkt abgelesen werden.

Zur Sequenzierung wurde 200 ng Plasmid-DNA oder 100 bis 400 ng gereinigtes PCR-Produkt, 15 pmol Primer und 4 µl *BigDye-Terminator Ready Reaction Mix* eingesetzt. Der Ansatz wurde mit H₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem Thermozykler mit Heizdeckel (Mastercycler, Eppendorf) ohne Ölschicht durchgeführt, da *BigDye*-Fluorophore sich in Mineralöl lösen und so nicht mehr für die Sequenzierreaktion zur Verfügung stehen. Das Sequenzierprogramm sah wie folgt aus: Zunächst wurde 1 min bei 95 °C denaturiert, anschließend folgten 25 Sequenzierzyklen. Jeder Zyklus umfasste 30 sec Denaturierung bei 96 °C, 15 sec Annealing bei 50 °C und 4 min Elongation bei 60 °C. Danach wurde der Reaktionsansatz mit 80 µl 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 µl abs. Ethanol gemischt und mit 14.000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet luftgetrocknet und im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (UKE, Hamburg) analysiert. Die Detektion der vier unterschiedlich markierten Dye-Terminatoren erfolgte dort auf einem Applied Biosystems 377 *DNA-Sequencer*. Auf diese Weise wurde ein Bereich von bis zu 600 bp sequenziert. Die Sequenzdaten wurden in Textformat gespeichert und für Homologievergleiche in den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) und der Datenbank *Ensembl* des *Sanger Institute* und des *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ensembl.org>) verwendet.

2.2.12 Präparative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA im präparativen Maßstab wurde das *Expand Long Template PCR System* von Roche verwendet. Bei der verwendeten DNA-Polymerase handelte es sich um ein Gemisch aus zwei Enzymen (Taq- und Pwo-Polymerase) im Verhältnis 10:1. Dieses hat den

Vorteil, dass recht lange DNA-Fragmente mit hoher Genauigkeit amplifiziert werden können. Die Reaktionen wurden im Mastercycler (Eppendorf) oder im OmniGene Thermocycler (Hybaid) durchgeführt. Für die Amplifikation des Flag-markierten humanen *MECP2*-Gens und die Flankierung mit passenden Restriktionsschnittstellen wurden folgende Primer verwendet:

Forwardprimer CK01f: 5'-GAAGATCTGACTACAAGGACG-3'

Reverseprimer CK02r: 5'-AACTGCAGGCTAACTCTCTCG-3'.

Der Reaktionsansatz bestand aus 5 µl 10x Puffer 3, 25 µM dNTPs (10 mM), 1,5 µl je Primer (15 pM), 10 ng Matrizen-DNA und 2,6 U Enzym-Mix. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt und mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Das Temperaturprofil für die Amplifikation von Flag-hMECP2 sah wie folgt aus:

1x	2 min 94 °C	
5x	10 sec 94 °C, 30 sec 40 °C, 90 sec 68 °C	(Denaturierung, Annealing, Elongation)
35x	10 sec 94 °C, 30 sec 62 °C, 90 sec 68 °C	(Denaturierung, Annealing, Elongation)
1x	7 min 68 °C	

Die Annealingtemperatur richtete sich nach den eingesetzten Primern gemäß der Formel: Temperatur = 2 x (A + T) + 4 x (C + G). Die Buchstaben A, T, C und G stehen für die Anzahl der gleichnamigen Basen in den Primern. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des erwarteten PCR-Fragmentes und betrug 60 sec bei 1 Kb. Am Reaktionsanfang lag keine vollständige Paarung zwischen Primer und Matrizen-DNA vor, weil Restriktionsschnittstellen in die Primersequenz eingeführt wurden. Daher wurde eine niedrigere Annealingtemperatur in den ersten 5 Zyklen benutzt. Zum Schluss wurde der Ansatz bei 68 °C für 7 min inkubiert, damit alle PCR-Produkte vervollständigt werden konnten. Der PCR-Ansatz wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, das PCR-Produkt aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *NucleoSpin Extract Kit* (siehe 2.2.5) isoliert. Das gereinigte DNA-Fragment konnte aufgrund der eingeführten Restriktionsschnittstellen verdaut und in den entsprechend vorbereiteten Vektor eingebaut werden.

2.2.13 Expression von rekombinantem hMeCP2

Die Expression des humanen MeCP2 erfolgte im *E. coli* Stamm BL21(DE3)p(Lys)S. Der hMeCP2-kodierende Vektor lag bereits in der Arbeitsgruppe vor. Die Transformation wurde wie

in 2.2.7 beschrieben durchgeführt. Mit den transformierten Bakterien wurde eine LB-Übernachtskultur im 10 ml-Maßstab unter Zugabe von Ampicillin angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Zur weiteren Vermehrung wurde die komplette Bakteriensuspension in 490 ml LB-Amp-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm). Nun wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 ml 0,5 M IPTG induziert und die Kultur bei 35 °C weiter geschüttelt. Durch erneute Zugabe des Antibiotikums blieb gewährleistet, dass nur Transformanten wachsen konnten. Nach weiteren zwei Stunden wurden die Bakterien im GSA-Rotor (Sorvall) für 15 min mit 5.000 rpm bei 4 °C in einer Sorvall-Zentrifuge (RC5B) pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml PBS_{mn} gewaschen und erneut im GSA-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 14 ml PBS_{mn} resuspendiert, in flüssigem Stickstoff für 3 min schockgefroren und wieder aufgetaut bei RT. Zur Lyse wurden 750 µl 5 M Natriumchloridlösung sowie je 15 µl DNaseI (50 mg/ml), RNase (10 mg/ml) und Lysozym (10 mg/ml) zugegeben. Die Suspension wurde 30 min bei 37 °C geschüttelt, anschließend in ein Stahlgefäß überführt und bei 4 °C für 15 min mit 11.000 rpm im SS-34 Rotor (Sorvall) zentrifugiert (RC5B, Sorvall). Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.2.14 Aufreinigung des rekombinanten hMeCP2

MeCP2 verfügt über einen endogenen Histidinstretch, so dass eine Aufreinigung über Nickel-Agarose (Qiagen) im Batch-Verfahren möglich ist. Auf 30 ml proteinhaltigen Überstand nach der Expression (2.2.13) wurden 3 ml Nickel-Agarose-Matrix pipettiert und die Suspension wurde für 20 min bei 4 °C überkopf rotiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5.000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus) wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert und zur späteren Analyse im Gel bei -20 °C gelagert („Durchlauf“). Die Matrix wurde mit 5 ml Waschpuffer 1 für 20 min bei 4 °C überkopf rotiert und anschließend durch erneute Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde abpipettiert und wie beschrieben gelagert („W1“). Die Matrix wurde mit 5 ml Waschpuffer 2 für 20 min bei 4 °C überkopf rotiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand erneut abgenommen („W2-1“) und der Vorgang wiederholt („W2-2“). Schließlich wurde die Matrix mit 5 ml Waschpuffer 3 für 20 min bei 4 °C überkopf rotiert und die Proteine eluiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen („W3-1“) und auch dieser Vorgang wiederholt („W3-2“). W3-1 und W3-2 wurden vereinigt. Der vereinigte, vorgereinigte Proteinextrakt wurde durch einen 0,22 µm Spritzenaufsatz filtriert und in einem zweiten Schritt

über eine FPLC mit einer Mono-S-Säule gereinigt. Der Extrakt wurde auf die Mono-S-Säule der FPLC-Anlage (500-Serie, Pharmacia) aufgebracht, die Proteine wurden eluiert und in ca. 1 ml-Fraktionen aufgefangen.

	Puffer A	Puffer B
0 min	100 %	0 %
23 min	100 %	0 %
24 min	85 %	15 %
29 min	85 %	15 %
49 min	20 %	80 %
51 min	0 %	100 %
56 min	0 %	100 %
57 min	100 %	0 %

Tabelle 2: Gradient zur Elution von gereinigtem hMeCP2 von einer MonoS-Säule.

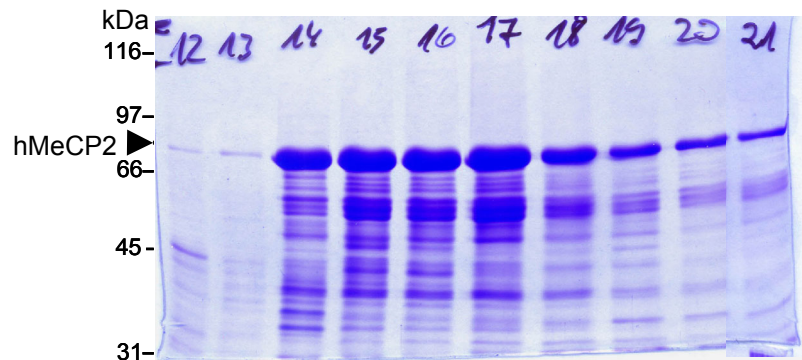


Abbildung 2: Fraktionen von FPLC-gereinigtem hMeCP2. Rekombinantes hMeCP2 wurde über eine Mono-S-Säule chromatographisch aufgetrennt. Die Fraktionen 12 bis 21 wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

Es wurden zwei Puffer (A: PBS, pH 7,7 / B: PBS pH 7,7 + 1 M NaCl) mit dem in Tabelle 2 beschriebenen Gradienten zur Elution eingesetzt. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Ab 20 min wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt. Aliquots dieser Fraktionen (Abbildung 2) sowie Aliquots der Waschfraktionen der Nickel-Agarose-Aufreinigung (nicht gezeigt) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbelösung gefärbt, um ihren MeCP2-Gehalt zu analysieren.

2.2.15 Produktion von Antikörpern gegen humanes MeCP2

Da es zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine verfügbaren Antikörper gegen hMeCP2 gab, musste ein Antikörper selbst produziert werden. Um einen Antikörper zu generieren, der möglichst hohe Spezifität hat, sollte man einen Organismus wählen, der das Antigen (Epitop bzw. Protein) möglichst nicht besitzt. Dies ist bei dem Repressorprotein MeCP2 kaum möglich, da es vom afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* über Huhn, Ratte, Maus bis hin zum Mensch ubiquitär vorhanden ist. Damit es überhaupt zu einer Immunantwort kommen kann, muss das applizierte Protein als körperfremd erkannt werden. Das Huhn wurde als Antikörperproduzierender Organismus ausgewählt, da es phylogenetisch vom Menschen weit entfernt ist. Zudem bietet es den Vorteil, dass der produzierte Antikörper aus dem Ei gewonnen werden kann. Die Tierhaltung erfolgte artgerecht im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Dr. J. Dimigen. Die Hennen wurden mit Pelletfutter für Legehennen (Plambeck) sowie Mais, getrockneten Garnelen und Kalk gefüttert. Sie hatten einen

geregelten 12 h Tag/Nacht-Rhythmus und ein Freilaufgehege. Es wurden zwei Strategien zur Produktion geeigneter Antikörper verfolgt.

2.2.15.1 Klassische Immunisierung

Bei der klassischen Immunisierung wird die Immunantwort durch Injektion einer immunogenen Lösung provoziert. Hierzu wurde das rekombinant hergestellte hMeCP2 als Antigen mit komplettem Freundschem Adjuvans zu einer homogenen Lösung vermengt. Die Homogenität wurde durch 20-minütiges Hin- und Herpumpen zwischen zwei über ein Ventil verbundene 2 ml Spritzen erreicht. Diese Lösung wurde drei Maraner-Hennen subkutan in der Brustregion injiziert (je 1 ml entsprechend 300 µg hMeCP2 pro Huhn), um die Immunantwort zu stimulieren. Die Immunantwort wurde durch Injektion von inkomplettem Freundschem Adjuvans und rekombinantem hMeCP2 sechsmal restimuliert. Diese Stimulationen fanden im Abstand von zwei Wochen bis drei Monaten statt – je nach Gesundheit der Tiere und deren Antikörperstatus. Die Hühnerantikörper (IgY) wurden durch Extraktion der Hühnereier gewonnen. Hierfür wurde das *EGGstract IgY Purification System* verwandt. Im Vergleich zu den Methoden von Lemamy et al. (1999) und Camenisch et al. (1999) erwiesen sich die auf diese Weise extrahierten Antikörper als qualitativ gleichwertig bei deutlich verkürztem Zeitaufwand.

Das Antikörper-enthaltende Eigelb wurde manuell vom Eiweiß separiert. Nach Verdünnung des Eigelbs mit Präzipitationslösung A wurden Lipide durch Zentrifugation im SS-34-Rotor (Sorvall) für 10 min bei 10.000 g und 4 °C präzipitiert (RC5B, Sorvall). Der Überstand wurde mit der Antikörper-präzipitierenden Lösung B verrührt und die Antikörper wurden durch erneute Zentrifugation für 10 min bei 10.000 g und 4 °C präzipitiert. Das Antikörperpellet wurde in IgY-Lagerpuffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Die Qualität der Antikörper wurde durch Detektion von rekombinantem hMeCP2 und MCF-7-Totallysaten im Westernblot analysiert. Als sekundärer Antikörper diente ein Meerrettichperoxidase-konjugierter Anti-IgY-Antikörper aus Kaninchen (Promega), die Detektion erfolgte mit dem ECL-System (siehe 2.2.23).

2.2.15.2 Genetische Immunisierung

Bei der genetischen Immunisierung produziert der immunisierte Organismus (hier: Huhn) das Antigen selbst. Das Antigen wird in diesem Fall dem Immunsystem nativ und unfragmentiert

präsentiert. Möglicherweise können so Antikörper erzeugt werden, die eine höhere Affinität zum Epitop – hier hMeCP2 – aufweisen.

Für die genetische Immunisierung wurde der Vektor *pDisplay* (Invitrogen), der eine PDGFR-Transmembrandomäne enthält, verwendet. In die multiple Klonierungsregion des Vektors wurde über die Restriktionsschnittstellen BglII und PstI ein Konstrukt aus dem Flag-Tag (Kodak) und dem hMeCP2 einkloniert (Abbildung 3). Auf diese Weise wird ein Fusionsprotein aus Flag-Tag, hMeCP2 und Transmembrandomäne exprimiert. Das gewünschte Protein ist somit membranständig und wird an der Zelloberfläche dem Immunsystem präsentiert. In Immunfluoreszenzexperimenten wurde die Expression des Fusionsproteins in NIH-3T3-Zellen mit Hilfe des Flag-Tags und der zugehörigen monoklonalen Anti-Flag-Antikörper (Sigma) und FITC-konjugierten Anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Parallel wurden nicht-transfizierte NIH-3T3-Zellen als Kontrolle verwendet.

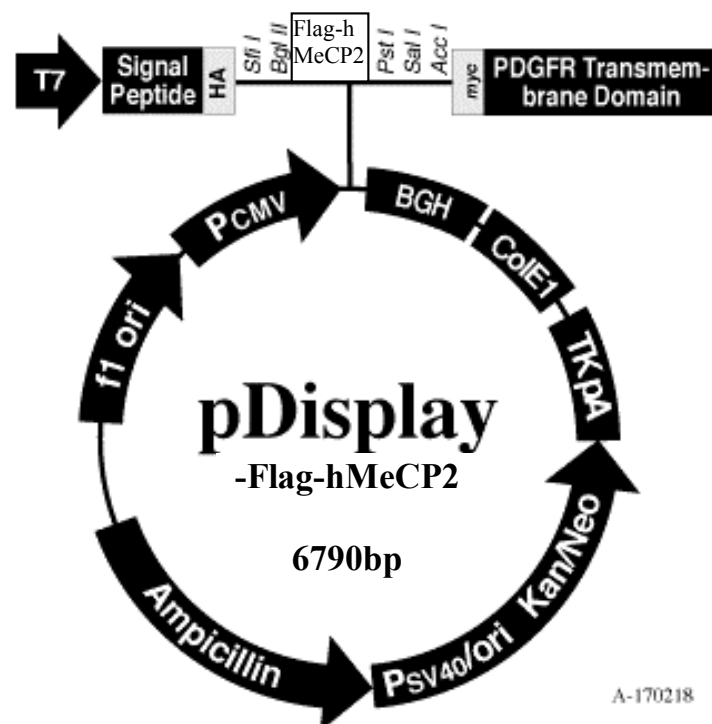


Abbildung 3: Karte des Expressionsvektors *pDisplay* (Invitrogen). *FLAG*- und humane *MECP2*-Sequenz wurden über BglII- und PstI-Schnittstellen einkloniert.

Nach der Maxi-Präp (siehe 2.2.10) wurde das Plasmid mit dem *Helios Gene Gun Optimization Kit* für die genetische Immunisierung präpariert. Hierfür wurden 50 mg Gold (1.0 Micron) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 100 µl 0,05 M wässriger Spermidinlösung gevortext und 5 sec im Becherresonator sonifiziert (Tip 7, Sonifier 450, Branson). Zu der Goldlösung wurden 100 µg Plasmid gegeben. Unter permanentem Vortexen wurden zusätzlich 100 µl 1 M CaCl₂-Lösung zugetropft. Nach 10-minütiger Ruhephase wurden die Goldpartikel durch Zentrifugation für 15 sec bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) pelletiert. Das Pellet wurde 3-mal mit je 1 ml abs. Ethanol gewaschen, in 200 µl Ethanol/Polyvinylpyrrolidon-Lösung (20 mg/ml) aufgenommen und in einem 15 ml Falcongefäß durch Vortexen gemischt. Die homogene Goldlösung wurde blasenfrei in einen zuvor in die Beladungsapparatur (*Tubing Prep Station*, Biorad) eingespannten, Ethanol-gespülten und Stickstoff-getrockneten Kunststoffschlauch überführt. Die Goldpartikel setzten sich für 4 min ab. Dann wurde mit einer Spritze innerhalb 45 sec das Ethanol vorsichtig aus dem Schlauch abgesogen und der Schlauch durch die Apparatur um 180° gedreht. Nach 4 sec ließ man die Apparatur mit Schlauch auf Stufe 1 rotieren, nach weiteren 25 sec wurde ein Stickstoffstrom von 0,35 bis 0,40 LPM (Skala des Gerätes) eingestellt und dadurch die Trocknung des DNA/Goldpartikel-beladenen Schlauches eingeleitet. Nach 5 min wurde der trockene Schlauch entnommen und mit dem Patronenschneider in für die Gene Gun passende Kapseln geschnitten. Diese wurden bei 4 °C gelagert. Es wurden 4-mal jeweils sechs Kapseln pro Huhn mit einem Druck von 400 Psi appliziert. Zwischen den einzelnen Applikationen lag ein Zeitintervall von 4 Wochen. Die Gewinnung der Antikörper erfolgte aus den Hühnereiern (s. 2.2.15.1), die Qualität der Antikörper wurde mittels Westernblot überprüft (s. 2.2.23).

2.2.16 Transfektion

Die Technik der Transfektion ermöglicht das Einbringen fremder DNA in Zellen und damit die Untersuchung überexprimierter Proteine unter zellulären Bedingungen. Das in Abschnitt 2.2.15.2 beschriebene Konstrukt aus dem Vektor *pDisplay*, der Flag-Domäne und dem hMeCP2-Gen wurde in HEK293-Zellen auf Funktionalität überprüft.

Zunächst wurde die älteste Transfektionsmethode mit Calciumphosphat (Graham und van der Eb, 1973) verwendet. Dabei wird ein Präzipitat aus DNA und Calciumphosphat erzeugt, das wahrscheinlich durch Phagozytose von Zellen aufgenommen wird. In der mitotischen Phase ist

die Kernmembran zeitweise aufgelöst, so dass die DNA in den Zellkern gelangen kann. Diese Methode wird oft verwendet, jedoch ist die Transfektionseffizienz meist sehr gering.

24 Stunden vor der Transfektion wurden 6×10^5 HEK293-Zellen in Ø 35 mm-Zellkulturschalen (Greiner) ausgesät, so dass sie für die Transfektion zu 50 – 80 % konfluent waren. Drei Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Für die Herstellung der DNA-Calciumphosphat-Komplexe wurden 3 µg Plasmid-DNA mit sterilem H₂O auf 153 µl Endvolumen aufgefüllt und mit 22 µl 2 M CaCl₂ in einem 12 ml Röhrchen (Greiner) gemischt. Unter Vortexen wurden 175 µl 2x HBS hinzu getropft. Die Lösung wurde 30 min bei RT inkubiert, kurz gevortext und zu den vorbereiteten Zellen getropft (100 µl pro Schale). Die entstandenen Mini-Kristalle aus DNA und Calciumphosphat waren anschließend im Mikroskop als feine Körnchen sichtbar. Die Schalen wurden im Brutschrank (Heraeus) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Für eine stabile Transfektion, d.h. eine dauerhafte Integration der fremden DNA in das zelluläre Genom, erfolgte eine Selektion mit 500 µg/ml G418 im Kulturmedium. Die Selektion dauerte an, bis in den Kontrollschalen alle nicht-transfizierten Zellen starben und sich in den behandelten Schalen Kolonien um transfigierte Zellen bildeten. Die Kolonien wurden vereinigt und die Überexpression des Zielproteins im Westernblot analysiert, oder es wurden Zellen auf Objektträger überführt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Darüber hinaus wurden NIH-3T3- und HEK293-Zellen mittels Lipofektion transfigiert, um eine höhere Transfektionseffizienz zu erreichen. Bei dieser Methode wird die DNA an ein kationisches Lipid gebunden. Dieser Lipidkomplex fusioniert mit der Zellmembran oder wandert durch die Zellmembran hindurch. Die DNA, die an dem Lipid haftet, gelangt so in das Cytoplasma der Zellen. Das Aussäen der Zellen erfolgte analog zur Calciumphosphat-Methode (siehe oben). In einem Eppendorfgefäß wurden 97 µl serumfreies Medium und 3 µl Fugene 6-Reagenz gegeben, durch Anschnippen vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. In ein zweites Gefäß wurde 1 µg Plasmid-DNA vorgelegt und dann mit dem Gemisch aus dem ersten Gefäß tropfenweise versetzt, durch Anschnippen vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das alte Zellkulturmedium gegen 800 µl frisches Medium getauscht, bevor die DNA-haltigen Liposomen tropfenweise auf die Zellen pipettiert wurden. Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wurde 1 ml frisches Medium hinzugefügt, nach

24 Stunden das Medium komplett erneuert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet oder für eine stabile Transfektion mit G418 selektiert (s. o.).

2.2.17 Präparation von Metaphasechromosomen und Zellkernen

Metaphasechromosomen wurden aus peripheren humanen Lymphozyten (mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Singh, Institut für Humangenetik, UKE), aus NIH-3T3-Mausfibroblasten und aus der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 präpariert. Periphere Lymphozyten aus humanem Blut wurden in Chromosomen Medium (Life Technologies) aufgenommen und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 71 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellkulturflasche (Greiner) wurde täglich einmal leicht geschüttelt. Anschließend wurde zum Medium 150 µl Colcemid (10µg/ml) zugegeben und für 20 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einem 15 ml Falconröhrchen für 5 min bei 800 g (Varifuge 3.0R, Heraeus) pelletiert und der Medienüberstand vorsichtig abgenommen. Durch Anschnippen des Röhrchens wurden die Zellen vereinzelt. Es wurde tropfenweise 10 ml 37 °C warme hypotone 0,07 M KCl-Lösung unter Schütteln zugegeben (Dauer 15 min). Die Zellen wurden nun erneut pelletiert, der Überstand abgenommen und die Zellen durch Vortexen vereinzelt. Durch tropfenweise Zugabe des Fixativs (Methanol/Essigsäure: 3:1) wurden die Zellen fixiert. Es wurden zunächst nur zwei Tropfen Fixativ zu den Zellen gegeben, das Röhrchen wurde angeschnippt, bis sich die Zellsuspension braun (Eisen) färbte, erst dann wurden unter Vortexen sehr langsam 10 ml Fixativ hinzugegeben. Die so fixierten Zellen wurden 20 min bei RT inkubiert, wiederum für 10 min bei 800 g pelletiert und der Überstand wurde abgenommen. Der Fixierungsschritt wurde 2-mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde 300 µl Fixativ auf dem Zellpellet gelassen, das durch Anschnippen des Röhrchens resuspendiert wurde. Mit einer Plastikpipette wurden 30 µl Zellsuspension aus ca. 30 cm Höhe auf leicht schräg gehaltene, zuvor mit Wasser befeuchtete Objektträger getropft. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und schnellstmöglich immunzytologisch untersucht.

MCF-7- und NIH-3T3-Zellen wurden für Metaphasepräparationen halbkonfluent kultiviert und dann mit Colcemid (Endkonzentration im Medium: 1 µg/ml) für 1 bis 6 h inkubiert. Für einfache Zellkernpräparationen wurde die Colcemid-Behandlung unterlassen. Nach Trypsinierung wurden diese Zellen ebenfalls bei 800 g für 5 min pelletiert. Die hypotone Behandlung und die Fixierung verlief analog derer der humanen Lymphozyten (s.o.).

2.2.18 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die zu untersuchenden Zellen wurden 24 Stunden vor der Mikroskopie so auf sterile Objektträger ausgesät, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung zu ca. 50 % konfluent waren. Die Zellen wurden für 10 min mit 1%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, einmal kurz mit PBS gewaschen, für weitere 10 min mit -20 °C kaltem Methanol permeabilisiert und anschließend für 10 min in PBS rehydratisiert. Zur Kontrolle wurde der Permeabilisierungsschritt bei den Zellen, die mit dem in Abschnitt 2.2.15.2 beschriebenen, hMeCP2-kodierenden Konstrukt transfiziert wurden, weggelassen, um zu überprüfen, ob das detektierte Protein tatsächlich membranständig vorliegt. Nach Absaugen der Flüssigkeit von dem Objektträger wurden 50 µl primärer Antikörper (1:50 verdünnt in PBS mit 3 % BSA) auf die Zellen pipettiert und für 20 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden 2-mal mit PBS für je 15 min gespült, luftgetrocknet und mit 50 µl FITC-konjugiertem sekundären Antikörper (1:50 verdünnt in PBS mit 3 % BSA) für 20 min bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit 0,0005 % DAPI in PBS gefärbt, anschließend 10 min in PBS bei leichtem Schwenken auf einem Schüttler gewaschen und in 30 µl Antifade für die Fluoreszenzmikroskopie eingebettet.

Objektträger mit Metaphasechromosomen oder mit Zellkernpräparationen wurden vor der Inkubation mit Antikörpern ca. 10 mm mit PBS überschichtet und für 16 h mit UV-Licht (UV-C 30 Watt, Phillips) im Abstand von 30 cm bestrahlt (Miller, 1974). Diese Bestrahlung diente der Auflockerung des Chromatins, damit der 5'-Methylcytosin-erkennende Antikörper seine Epitope binden konnte. Anschließend erfolgte direkt die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern analog der Zelluntersuchungen.

Für Kolokalisationsstudien wurden die zu untersuchenden Zellkernpräparationen mit beiden primären Antikörpern (Anti-MeCP2 und Anti-Methylcytosin) in PBS mit 3% BSA für 1 h inkubiert und anschließend mit PBS 2-mal für 15 min gewaschen. Die folgende Inkubation fand mit zwei sekundären Antikörpern (Rhodamin Red-konjugiertem Anti-Kaninchen, Cy2-konjugiertem Anti-Maus) in PBS mit 3 % BSA für 1 h statt. Hiernach wurden die Objektträger für 10 min in PBS bei leichtem Schwenken auf einem Schüttler gewaschen und in 30 µl Antifade für die Fluoreszenzmikroskopie eingebettet.

In dieser Arbeit wurden das Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Ortholux (Leica) mit einem FITC-Filter (Leitz), einem Rhodamin-Filter (Leitz) und einem DAPI-Filter (Leitz) unter Verwendung des Ektachrome P1600x Films (Kodak), sowie ein konfokales Lasermikroskop (CLSM, Leica) und ein konfokales Mehrfarbenlasermikroskop (TCS 4d, Leica) benutzt. Konfokale Aufnahmen wurden mit einem PL APO 63x1/1,40 Objektiv digital aufgenommen.

Primäre Antikörper:

Anti-Flag	Maus monoklonal, IgG, Klon M2 (Sigma), Verdünnung: 1:50
Anti-Methylcytosin	Maus monoklonal, Geschenk von Dr. Alain Niveleau, (Reynaud et al., 1991), Verdünnung: 1:7
Anti-MeCP2	Kaninchen polyklonal IgG (Upstate), Verdünnung: 1:50
Anti-MeCP2	Huhn polyklonal IgY (Box2 eigene Produktion), Verdünnung: 1:20

Sekundäre Antikörper:

Cy TM 2-konjugiertes AffiniPure Esel Anti-Maus IgG (H+L)	(Jackson ImmunoResearch), Verdünnung: 1:50
FITC-konjugiertes Schaf Anti-Maus IgG	(Jackson ImmunoResearch), Verdünnung: 1:40
FITC-konjugiertes Schaf Anti-Kaninchen IgG	(Jackson ImmunoResearch), Verdünnung: 1:40
FITC-konjugiertes Kaninchen Anti-Huhn-IgG	(Promega), Verdünnung 1:40
Rhodamine Red TM -X-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L)	(Molecular Probes), Verdünnung: 1:50

2.2.19 Vernetzung von zellulärer DNA und Proteinen mit cis-Platin (Walter et al., 1997)

Vernetzte zelluläre DNA-Proteinkomplexe dienen als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation, die nachfolgend die Analyse von Zielsequenzen DNA-bindender Proteine ermöglichen soll. Das Chemotherapeutikum cis-Platin (cis-Diammino-dichloro-platin II) sollte hier als vernetzende Brücke zwischen dem Protein MeCP2 und der zellulären DNA eingesetzt werden.

2.2.19.1 Inkubation mit cis-Platin

Da cis-Platin ein starkes Zellgift ist, wurden durch Zytotoxizitätsmessungen die Überlebensraten von Tasp-7-Hühnerfibroblastenzellen und von humanen MCF-7-Zellen zeit- und konzentrationsabhängig bestimmt (Samuel et al., 1998). Es wurden Überlebensraten in Phosphat- und Chlorid-armem Hank's Puffer mit cis-Platin Konzentrationen von 0 bis 1000 μM in hunderter Schritten gemessen. Es wurden Zeitintervalle bis zu 6 Stunden in 30 min bis 1 h Schritten untersucht. Die Zellen wurden in $\varnothing$ 35 mm Zellkulturschalen (Greiner) ausgesät. Die Zellzahlen wurden nach Trypsinierung mit einem automatischen Zellzähler (Coulter) oder nach Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Kammer ermittelt. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff und wird nur von toten Zellen aufgenommen, so dass eine Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen möglich ist. Die Trypanblau-Färbung erfolgte mit 50 μl Aliquots trypsinierter, mit PBS gewaschener Zellen unter Zugabe von 10 μl Trypanblaufärbelösung für 5 min im Eppendorfgefäß. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine Neubauerkammer aufgetragen und unter einem Lichtmikroskop (Zeiss) wurden die ungefärbten lebenden Zellen ausgezählt. Hiernach ergab sich für die Tasp-7-Zellen ein Inkubationsoptimum von 500 μM cis-Platin (Sigma) und 90 min, für die MCF-7-Zellen von 1 mM cis-Platin für 120 min unter Zellkulturbedingungen in Phosphat- und Chlorid-armem Hank's Puffer (Samuel et al., 1998; Mattia et al., 1998; Ferraro et al., 1995).

2.2.19.2 Aufarbeitung cis-Platin-vernetzter Proben (Bloom und Anderson, 1978)

Sämtliche zur Aufarbeitung verwendeten Lösungen wurden mit PMSF versetzt. Die mit cis-Platin in Chlorid- und Phosphat-armem Hank's Puffer inkubierten Zellen wurden 2-mal mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Gummispatel abgelöst und pelletiert. Die Zellpellets wurden in Lyse-Puffer resuspendiert. Diese Lysate wurden 2-mal für je 30 s im gekühlten Becherresonator sonifiziert (Tip7, B12, Branson). Diese Behandlung ergab DNA-Fragmente von ca. 700 bp Länge. Anschließend wurden 400 µl in Lysispuffer äquilibriertes Hydroxylapatit zugegeben und 1 h im Überkopfrötor bei 4 °C inkubiert. DNA bindet an das Hydroxylapatit mit hoher Affinität. Somit binden auch DNA-Protein-Komplexe an das Hydroxylapatit und können von freiem Protein und von RNA getrennt werden. Anschließend wurde das Hydroxylapatit bei 4 °C durch 10 min Zentrifugation (Tischzentrifuge, Eppendorf) bei 14.000 rpm pelletiert. Der RNA- und freie Proteine- enthaltende Überstand 1 (ÜS1) wurde abgenommen. Das Hydroxylapatit wurde anschließend 2-mal in 300 µl Lysispuffer gewaschen. Hiernach wurde das Pellet in Lysispuffer mit 1 M Thioharnstoff suspendiert und bei 4 °C für 2 h im Überkopfrötor inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min mit 10.000 rpm bei 4 °C wurde der Überstand 2 (ÜS2) abgenommen. Dieser Überstand enthielt Proteine, deren Vernetzung an DNA durch Thioharnstoff revertiert wurde (Filipski et al., 1979). Das verbliebene Pellet wurde noch 2-mal mit dem Thioharnstoff-haltigen Lysispuffer gewaschen. Die DNA wurde vom Hydroxylapatit durch Resuspension des Pellets mit 0,5 M Natriumphosphatlösung für 5 min unter Schütteln gelöst. Nach erneuter Zentrifugation wurde der DNA-haltige Überstand 3 (ÜS3) abgenommen. Die sehr salzhaltigen Überstände wurden in Dialyseschläuche (12 kDa *cut off*, Roth) verpackt und für 5 h gegen 4 l H₂O dialysiert. Anschließend wurden die Überstände lyophilisiert. Die lyophilisierten Überstände wurden in SDS-Gelladepuffer aufgenommen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Als Proteinkontrolle diente eine bereits vorliegende FPLC-gereinigte ARBP-Fraktion (F14) aus Hühnerovidukt. Die Proteine wurden mittels Westernblot auf Nitrozellulosemembranen überführt. Die Westernblot-Detektion wurde bei der Analyse des Hühnerproteins ARBP mit einem primären Antikörper aus Ratte und einem sekundären, HRP-konjugierten Antikörper aus Ziege (1:5000, Southern Biotechnology Associates Inc.) durchgeführt. Für die Detektion von humanem MeCP2 aus MCF-7-Zellen wurde als primärer Antikörper ein selbstproduzierter aus Huhn (Verdünnung 1: 500) und als sekundärer ein HRP-konjugierter Anti-IgY-Antikörper aus Kaninchen (1:5000, Promega) verwendet. Die eigentliche

Detektion erfolgte mit dem ECL-System und durch anschließende Exposition gegenüber Röntgenfilmen (X-OMAT, Kodak).

Als weitere Detektionsvariante von MeCP2 wurde das Fragment H1-HaeII (von Kries et al., 1991) im Southwesternblot eingesetzt. Es enthält eine Matrix-Anheftungsregion (MAR) und kann Matrix-bindende Proteine wie das untersuchte ARBP/MeCP2 detektieren.

2.2.19.3 Radioaktive Endmarkierung des Fragments H1-HaeII

Das Fragment H1-HaeII wurde aus dem Vektor pBluescript (Klon-Nr. 133) über die Restriktionsschnittstellen HindIII und BamHI herausgeschnitten. Es wurden 6,4 µg Vektor mit 5 Units HindIII und 5 Units BamHI im Puffer B (Roche) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dieser Reaktionsansatz wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und das das Fragment H1-HaeII enthaltende Gelstück herausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem *Qiagen Gel Extraction Kit* extrahiert.

30 µl des Fragments H1-HaeII (284 ng) wurden mit 6 µl 10x Klenow-Fragment-Puffer und 3 µl Klenow-Fragment-Polymerase I (5U, Boehringer) für 30 min bei 37 °C inkubiert (Exonuklease-Reaktion). Es wurden 5 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP und 2 µl 10 mM dNTP-Mix (ohne dATP) hinzupipettiert und für 60 min bei 25 °C inkubiert (Polymerase-Reaktion). Die Reaktion wurde mit 3 µl 0,5 M EDTA gestoppt und mit 80 µl TE versetzt. Diese Reaktionsmischung wurde auf eine Nick-Säule (Pharmacia) mittig aufgetragen. Nicht eingebaute Nukleotide wurden zunächst durch Elution der Säule mit 350 µl TE entfernt, die Sonde wurde mit weiteren 450 µl TE eluiert und in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Die Sonde wurde durch dünnschichtchromatographische Auftrennung mit 0,8 M Ammoniumsulfatlösung als Laufmittel und anschließender Analyse des radioaktiven Nukleotideinbaus im Szintillationszähler überprüft.

2.2.19.4 Southwesternblot Detektion

Die geblottete Membran wurde für 1 h mit 5 % Magermilch in DNA-Bindungspuffer blockiert. Anschließend wurde die Membran mit 225 µl radioaktivem H1-HaeII-Fragment (60.000 bis 150.000 cpm/µl) in 0,5 % Magermilch und 50 µg/ml *E. coli*-DNA in DNA-Bindungspuffer bei RT für mindestens 1 h oder über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde mit 0,5 % Magermilch in DNA-Bindungspuffer 2-mal gespült und 8-mal auf einem Schüttler

gewaschen, bis die gemessene Radioaktivität auf der Membran nur noch bei 50 bis 100 cpm lag. Die Membran wurde feucht in Klarsichtfolie verpackt. Die anschließende Autoradiographie erfolgte bei -80 °C auf einen Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak).

2.2.20 Vernetzung von zellulärer DNA und Protein mit Formaldehyd (Crosslink)

Zur Erstellung einer Bibliothek von MeCP2-gebundenen DNA-Sequenzen wurde *in vivo* zelluläre DNA mit den daran gebundenen Proteinen vernetzt. Die Experimente wurden mit der humanen Mammacarcinoma Zelllinie (MCF-7) durchgeführt. Die verwendete Methode mit Formaldehyd als *Crosslinker* beruht auf einem modifizierten Protokoll von Göhring und Fackelmayer (1997).

Zunächst wurde in einer Kinetik die Effektivität der Vernetzung von MeCP2 und DNA mit 1 % Formaldehyd im Zellkulturmedium untersucht. MCF-7-Zellen wurden in Ø 35 mm-Zellkulturschalen (Greiner) ausgesät, so dass sie am folgenden Tag fast konfluent waren. Das Zellkulturmedium wurde durch 1 ml neues und 100 µl 11 % gepufferte Formaldehydlösung ersetzt. Die Kontrollschalen wurden mit 1 ml Kulturmedium und 100 µl Formaldehyd-freiem Puffer inkubiert. Zunächst wurden die Zellen in 30 bis 60 min Abständen längstens nach 48 h geerntet. Die Vernetzung von MeCP2 mit Formaldehyd war jedoch nach kurzer Zeit schon fast quantitativ, so dass kürzere Inkubationszeiten gewählt wurden. So wurden die Zellen in 5 bis 15 min Abständen längstens nach 60 min geerntet. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 4 °C mit 14.000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) wurde das Zellpellet in 50 µl SDS-Gelladepuffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert. Jeweils 10 µl der so behandelten Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit Anti-MeCP2-IgY auf ihren relativen MeCP2-Gehalt untersucht. Die digitalisierten MeCP2-Banden wurden mit Hilfe des Programms Sigmaplot (SCSS Science) quantifiziert. Es wurde jeweils die Bandenintensität vermessen und mit der Intensität nicht Formaldehyd-vernetzter, parallel aufgearbeiteter Zellen (Scheininkubation) verglichen. Die Bandenintensität dieser scheininkubierten Zellen war jeweils der maximale Wert, auf den alle anderen normiert wurden.

Es zeigte sich, dass 5 min Inkubation mit 1 % Formaldehyd im Zellkulturmedium über 97 % des MeCP2 vernetzt. Daher wurden diese Bedingungen im Folgenden verwendet.

MCF-7-Zellen wurden in Ø 145 mm-Zellkulturschalen (Greiner) ausgesät, so dass sie am folgenden Tag fast konfluent waren. Für jedes Experiment wurden mindestens 20 Schalen angesetzt. In das Medium einer Schale wurden 15 µCi [*Methyl*-³H]Thymidin (1 mCi/ml) gegeben. Der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin ermöglicht eine spätere Identifizierung DNA-haltiger Fraktionen mit Hilfe eines Szintillationszählers (Wacker). Der Einbau des [*Methyl*-³H]Thymidins erfolgte für 24 h. Hinterher wurden die Schalen für 5 min mit frisch angesetzter, gepufferter Formaldehydlösung versetzt (Endkonzentration im Medium: 1 %). Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gummispatel (Rubberpoliceman) in 10 ml PBS pro Schale gelöst und in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 5 min mit 900 g bei 4 °C (Varifuge 3.0R, Heraeus) wurde das Zellpellet in 10 ml RSB resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einen Glas-Dounce-Homogenisator (Wheaton) überführt und mit dem Stempel B 15-mal homogenisiert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation für 8 min mit 800 g bei 4 °C präzipitiert und 2-mal mit je 10 ml RSB gewaschen. Anschließend wurden die Kerne mit Puffer E1 extrahiert, um ungebundene Proteine zu entfernen. Mit Formaldehyd vernetzte Zellkerne überstehen diesen Schritt. Nach der Extraktion wurden die Kerne erneut pelletiert (s. o.) und in 2,7 ml Puffer E2 resuspendiert. Durch Zugabe von 0,3 ml einer 20 % Natriumsarcosyllösung wurden die vernetzten Kerne lysiert. Im Becherresonator wurde die DNA für 5 min bei 4 °C durch 50 % gepulste Sonifizierung (Tip 10, Sonifier 450, Branson) fragmentiert. Diese Lösung wurde auf vier Röhrchen mit 3,25 ml Cäsiumchloridlösung (Dichte 1,55 g/ml) verteilt und für mindestens 40 h mit 40.000 rpm bei 20 °C im Beckman-Rotor SW60 in der Ultrazentrifuge (Beckman HL60) zentrifugiert. Im Gradienten formten die gereinigten DNA-Proteinkomplexe eine weiße, etwas glibbrige Scheibe bei einer Dichte von 1,4 g/ml. Der entstandene Gradient wurde von oben in 0,25 ml-Fractionen abpipettiert. Sobald die DNA-Protein-Scheibe frei an der Oberfläche des Gradienten lag, wurde sie mit einer Pinzette entnommen und der entsprechenden Fraktion zugeordnet. Der relative DNA-Gehalt der Fraktionen wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers ermittelt. Die Dichte jeder einzelnen Fraktion wurde refraktometrisch bestimmt. Im Westernblot wurden Aliquots der Fraktionen nach 6 h thermischer Reversion der Vernetzung bei 65 °C auf den MeCP2-Gehalt analysiert. Es zeigte sich, dass die Fraktion bei einer Dichte von ca. 1,4 g/ml, sowohl die DNA-Protein-Scheibe als auch viel MeCP2 und DNA

enthielt. Die in dieser Fraktion enthaltene Scheibe wurde 3-mal jeweils 15 min in 50 ml TE gewaschen und in 3 ml TE aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung bei 0 °C ca. 30 bis 60 min sonifiziert (50 % gepulst, Tip 10, Sonifier 450, Branson) bis sich die Scheibe quasi aufgelöst hatte. Die sonifizierte Lösung, die nun die vernetzten Nukleoproteine von 20 Kulturschalen enthält, wurde in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und bei 14.000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Anschließend wurde der Überstand (*Crosslink*-Fraktion) abgenommen, in neue Eppendorfgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.21 Chromatinimmunpräzipitation

2.2.21.1 Protein-A-Sepharose-Slurry (50/50 v/v)

Protein-A bindet Antikörper der IgG-Klasse von Kaninchen und Maus. Durch die Kopplung an eine Sepharosematrix können direkt und indirekt an Protein-A gebundene Proteine in Präzipitate überführt werden. Es wurden 0,5 g Protein-A-Sepharose CL-4B in ein 50 ml-Falconröhrchen eingewogen und 50 ml kaltes PBS hinzugefügt. Die Sepharose wurde für mindestens zwei Stunden bei 4 °C quellen gelassen. Anschließend wurde bei 4 °C und 5 min mit 3.000 g zentrifugiert (Varifuge 3.0R Heraeus). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 4-mal mit kaltem PBS gewaschen. Die Protein-A-Sepharose wurde in ein 10 ml-Greiner-Röhrchen überführt, bei 4 °C für 5 min mit 3.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Volumen des Protein-A-Sepharosepellets wurde abgeschätzt (ca. 2 ml) und mit dem gleichen Volumen an 1x NP40-Puffer aufgefüllt. Dieser Protein-A-Sepharose-Slurry (50/50 v/v) war bei 4 °C bis zu sechs Monate haltbar.

2.2.21.2 Immunpräzipitation

Die folgenden Inkubationen im Überkopfroter wurden mit dem Gerät Reax2 der Firma Heidolf durchgeführt.

Zur Vorreinigung der *Crosslink*-Fraktion wurden 1 ml *Crosslink*-Fraktion mit 80 µl Lachssperma-DNA/Protein-A-Agarose versetzt und mindestens 30 min bei 4 °C überkopf rotiert. Anschließend wurde bei 4.000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge), der Überstand abgenommen, in neue Eppendorfgefäße überführt und direkt als *Crosslink*-Fraktion für die Immunpräzipitation eingesetzt.

Es wurden 50 µl Protein-A-Sepharose-Slurry in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß vorgelegt und 200 µl 2x NP40-Puffer, 188 µl H₂O, 2 µl PMSF (50 mM Stammlösung) und 10 µg Anti-MeCP2-IgG Antikörper (polyklonal aus Kaninchen, Upstate) zupipettiert. Parallel wurden Immunpräzipitationen mit 10 µg Anti-Sp1-Antikörpern (polyklonal aus Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology Inc.) oder 10 µg unspezifischen IgG-Antikörpern (aus Kaninchen, Dianova) durchgeführt, um die Effizienz der Methode zu kontrollieren. Dieser Mix wurde im Überkopfroter mindestens 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Protein-A-Sepharose für 5 min bei 4 °C mit 4.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 400 µl 1x NP40-Puffer versetzt und für 10 min bei 4 °C im Überkopfroter inkubiert. Dieser Waschschrift wurde 2-mal wiederholt.

Zu der pelletierten Protein-A-Sepharose wurden 200 µl 2x NP40-Puffer, 2 µl PMSF (50 mM Stammlösung) sowie 100-150 µl vorgereinigte *Crosslink*-Fraktion pipettiert und es wurde auf 400 µl mit H₂O aufgefüllt. Der Immunpräzipitationsansatz wurde über Nacht (12 - 16 h) bei 4 °C im Überkopfroter inkubiert. Im Anschluss wurde die Protein-A-Sepharose bei 4 °C für 8 min mit 4.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) pelletiert und der Überstand abpipettiert. Die Immunkomplexe wurden mit 400 µl 1x NP40-Puffer versetzt und für mindestens 15 min bei 4 °C im Überkopfroter gewaschen. Anschließend wurden die Immunkomplexe erneut bei 4 °C für 8 min mit 4.000 rpm pelletiert. Dieser Waschschrift wurde 2-mal wiederholt (Waschfraktionen 1-3). Das Pellet wurde mit 250 µl Elutionspuffer versetzt, bei RT mindestens 20 min im Überkopfroter inkubiert und für 2 min bei 3.300 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde abgenommen und das Pellet erneut mit 250 µl Elutionspuffer für 20 min im Überkopfroter inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die beiden Eluate vereinigt und mit 20 µl 5 M NaCl-Lösung versetzt. Zur thermischen Reversion des *Crosslinks* zwischen DNA und Protein wurden die Eluate für 6 h bei 65 °C im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) unter Schütteln (700 rpm) inkubiert (Solomon und Varshavsky, 1985).

2.2.21.3 Aufreinigung und Klonierung der DNA-Fragmente

Zur Aufreinigung und Klonierung von DNA-Fragmenten wurden die revertierten Eluate (s. 2.2.21.2) verwendet. Sie wurden mit 1 ml abs. Ethanol versetzt, geschüttelt und Proteine und DNA wurden über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Das Präzipitat wurde bei 4 °C für 30 min mit 14.000 rpm pelletiert, der Überstand abgenommen, die Präzipitate mit 200 µl -20 °C kaltem

70%igem Ethanol versetzt und bei 4 °C für 15 min mit 14.000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden luftgetrocknet, dann in 100 µl TE gelöst, mit 100 µl Roti-Phenol versetzt und bei RT für 15 min im Überkopffrotor bei Geschwindigkeit 0 inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 1 min bei 1.000 rpm. Die obere, DNA-haltige, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt, die untere organische Phase mit 100 µl TE für 15 min im Überkopffrotor rückextrahiert. Die Phasentrennung erfolgte erneut durch Zentrifugation. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit 200 µl Roti-Phenol wiederholt für 15 min im Überkopffrotor bei Geschwindigkeit 0 extrahiert. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurde die wässrige Phase (200 µl) abpipettiert und in einem neuen 1,5 ml-Eppendorfgefäß mit 1 ml abs. Ethanol, 30 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 µl Glycogen versetzt und geschüttelt. Die DNA wurde bei -20 °C über Nacht präzipitiert. Die DNA wurde aus der wässrigen Phase bei 4 °C für 30 min mit 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 µl -20 °C kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, bei 4 °C für 15 min mit 14.000 rpm zentrifugiert und luftgetrocknet, um die Phenolreste zu entfernen.

Die Pellets wurden in 24 µl H₂O und 3 µl 10x PCR-Puffer durch Vortexen gelöst. Anschließend wurde diese Lösung mit 2 µl 10 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas) und 1 µl Taq-Polymerase (MBI Fermentas) versetzt, gemischt und für 10 min bei 72 °C im Wasserbad inkubiert. In diesem Schritt wird an das 3'-Ende eines jeden DNA-Fragmentes ein Adenin angehängt, wodurch die DNA-Fragmente definierte, klonierbare Enden erhalten. Die Lösung wurde nach Zugabe von 250 µl 100 % Ethanol und 80 µl 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2) gemischt, 30 min bei -80 °C inkubiert und die DNA durch 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C mit 14.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 60 µl -20 °C kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde für 15 min bei 4 °C mit 14.000 rpm erneut pelletiert und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Klonierung mit dem *pGEM-T easy Vektor System I* nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 3,5 µl H₂O und 5 µl 2x Ligasepuffer aufgenommen und mit 0,5 µl Vektor (0,5 µg/µl) sowie 1 µl T4-DNA-Ligase (3 U/µl) versetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C (Thermomixer 5436, Eppendorf) im Kühlraum. Der gesamte Ligationsansatz (10 µl) wurde in 200 µl chemisch-kompetente *E. coli DH10B* Zellen (s. 2.2.2) transformiert. Zunächst wurden die auf Eis getauten *E. coli* zu dem Ligationsansatz pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 90 sec Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurde die Inkubation auf Eis für 2 min fortgesetzt. Nun wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf LBamp-

IPTG/X-Gal-Platten ausgetropft, unter der Sterilbank luftgetrocknet (ca. 30-60 min) und die LB-Platten über Nacht im 37 °C-Brutschrank (Heraeus) überkopf inkubiert.

2.2.21.4 Aufreinigung der Proteinfraktion

Die Aufreinigung der Proteinfraktion erfolgte aus den in 2.2.21.3 anfallenden Protein-haltigen organischen Phasen. Die organischen Phasen wurden vereinigt (300 µl), auf zwei 1,5 ml-Eppendorfgefäße verteilt und die Proteine mit 10 Volumina Aceton bei -20 °C über Nacht präzipitiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zentrifugation bei 4 °C für 30 min mit 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 µl -20 °C kaltem Aceton gewaschen, um Phenolreste zu entfernen, bei 4 °C für 15 min mit 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend luftgetrocknet. Die Proteinpellets wurden in 30 µl SDS-Gelladepuffer gelöst und im Westernblot analysiert (siehe 2.2.23). Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen Anti-MeCP2-IgG Antikörper (Upstate) in einer Verdünnung von 1:1.700 in 2,5 % Magermilch und einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc.) in einer Verdünnung von 1:5.000 in 2,5 % Magermilch.

2.2.22 Überprüfen von Bakterienkolonien

Zur schnellen Überprüfung von *pGEM-T easy* transformierten Klonen wurde ein PCR-basiertes Verfahren verwendet. Die zu untersuchende Bakterienkolonie wurde mit einer 10 µl-Pipettenspitze isoliert und in 10 µl sterilem H₂O in einem Eppendorfgefäß resuspendiert. Um den Klon nicht zu verlieren, wurde mit derselben Pipettenspitze eine neue LBamp-Platte angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 100 °C im Wasserbad lysiert. 2 µl des Lysates wurden mit 8 µl Master-Mix (Tabelle 3) einer PCR unterzogen. Als Primer wurden *T7-forward* und *Sp6-reverse* Primer eingesetzt, die die multiple Klonierungsregion umfassen.

10 µl	10x PCR-Puffer (MBI Fermentas)
2 µl	dNTPs (10 mM)
10 µl	<i>T7-forward</i> Primer (5 pmol/µl)
10 µl	<i>Sp6-reverse</i> Primer (5 pmol/µl)
47,5 µl	H ₂ O
0,5 µl	Taq-Polymerase (MBI Fermentas)
1x 96 °C 2 min	
40x (96 °C 10 sec, 52 °C 30 sec, 72 °C 25 sec)	
1x 72 °C 5 min.	

Tabelle 3: Master-Mix und Programm für die PCR-basierte Analyse von zehn Bakterienkolonien.

Eine funktionierende PCR lieferte bei dem *pGEM-T easy*-Vektor immer ein PCR-Produkt von 177 bp, dies ist die Länge zwischen den Hybridisierungsstellen der verwendeten Primern. Sobald ein Insert im Vektor enthalten war, wurde das Amplifikat größer als 177 bp und die entsprechenden Klone wurden als positiv klassifiziert. Die DNA positiver Klone wurde meist nach einer Mini-Präparation mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten, um den Klon erneut zu überprüfen.

2.2.23 Westernblot

Die diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen aufgrund unterschiedlicher Molekularmassen mit nachfolgender Identifikation der Proteine (Laemmli, 1970). Es wurde das Minigel-System PROTEAN II (Bio-Rad) verwendet. Die üblicherweise benutzten 8%igen Gele setzten sich wie folgt zusammen:

	Trenngel (8 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	2,3 ml	1,4 ml
Acrylamid-Mix (30 %)	1,3 ml	0,33 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	1,3 ml	-
1,0 M Tris, pH 6,8	-	0,25 ml
10 % SDS	50 µl	20 µl
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl

Tabelle 4: Zusammensetzung des 8%igen Trenngels und des 5%igen Sammelgels für SDS-PAGE.

Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese in 1x SDS-Gelladepuffer aufgenommen und bei 100 °C im Wasserbad für 10 min denaturiert. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurden 5 µl gefärbter Protein-Leiter-Mix in einer Spur neben den Proben aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V in 1x Glycin-Laufpuffer durchgeführt und beendet, sobald die Lauffront (Bromphenolblau) aus dem Gel austrat.

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Mini-Transblot-Systems (Bio-Rad) auf eine Nitrozellulosemembran (Protan BA85, Schleicher & Schuell) geblottet. Zuvor wurden die SDS-Polyacrylamidgele und die Nitrozellulosemembranen für 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte Eiswasserbad-gekühlt bei 110 V für 75 min. Die Effektivität des Transfers wurde anhand der Übertragung des gefärbten Proteinmarkers

überprüft. Die Membranen wurden anschließend für mindestens 1 h bei RT, oft auch über Nacht, in 25 ml Block-Puffer M auf einem Schüttler inkubiert. Durch diesen Schritt werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Die blockierten Membranen wurden mit primärem Antikörper (Verdünnung: 1:500 - 1:10.000) in Puffer MM für mindestens 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Die Membranen wurden dann 3-mal mit je 15 ml Puffer MM für je 10 min gewaschen. Zur Detektion der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurde für mindestens 1 h mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten sekundären Antikörper (Verdünnung: 1:5.000) in Puffer MM bei RT inkubiert. Durch mehrfaches Waschen mit je 15 ml Waschlösung auf einem Schüttler wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Es wurde 2-mal mit TBS gespült, 3-mal je 10 min, 2-mal je 15 min, 2-mal je 30 min mit TBS-T gewaschen und zum Abschluß 2-mal je 30 min mit TBS.

Vor der Detektion wurden je 1 ml ECL-Lösung 1 und 2 (Amersham) frisch gemischt. Die Nitrozellulosemembran wurde für 1 min unter Schwenken in der ECL-Lösung inkubiert, dann auf Filterpapier (Whatman) leicht getrocknet und in Klarsichtfolie eingeschlagen. Zur Aufnahme der Chemolumineszenzsignale wurden für 5 sec bis 2 h Röntgenfilme (X-OMAT, Kodak, Super RX, Fuji) aufgelegt und anschließend maschinell entwickelt.

2.2.24 Dotblot immunpräzipitierter DNA

Der *Dotblot* ermöglicht eine relative Quantifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Die immunpräzipitierte DNA wurde im Dot-Blot auf den Gehalt an Alu- und Line-Sequenzen untersucht.

2.2.24.1 Produktion radioaktiv markierter Sonden

Die Herstellung radioaktiver Sonden erfolgte durch das *Rediprime II Random Prime Labelling System* nach Herstellerangaben. Es wurde mittels PCR eine AluSx Sonde (282 bp) und eine 5'-LINE 1.3 Sonde (876 bp) wie in Tabelle 5 beschrieben amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über Agarosegele aufgetrennt und über eine Säule gereinigt (*NucleoSpin Extract*). Zur radioaktiven Markierung wurden 25 ng der gereinigten PCR-Produkte in 1,5 ml-Eppendorfgefäße mit TE-Puffer auf 45 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach Denaturierung für 5 min bei 100 °C im Wasserbad wurden die Gefäße für 5 min auf Eis gekühlt. Um die DNA am Boden des Gefäßes zu konzentrieren wurde kurz anzentrifugiert.

Plasmid	Forward-Primer	Reverse-Primer	PCR-Programm	
pNP-AluSx-TMBC1	Alu forward: 5'-GGCCGGGCGCGGTGGCTC-3'	Alu reverse: 5'-GAGACCGAGTCTCGCTCTGTC-3'	1x 39x 1x	3 min 96°C 15 sec 96°C 20 sec 63,9°C 20 sec 72°C 5 min 72°C
pGL3-L1.3	JW60: 5'-CAAGATGGCCGAATAGGAA-3'	CK-L1.887rev: 5'-GGTCTTTGATGATGGTGATG-3'	1x 39x 1x	3 min 96°C 15 sec 96°C 20 sec 55,8°C 20 sec 72°C 5 min 72°C

Tabelle 5: Primer und PCR-Programm zur Amplifikation der Alu- und Line-Sonde

Zu dem im Reaktionsgefäß befindlichen trockenen Pellet aus gepuffertem dATP, dGTP, dTTP, Exonuklease-freiem Klenowenzym und Randomprimer (Amersham) wurde die denaturierte DNA und 5 µl ³²P-dCTP (3000Ci/mmol) zugegeben. Durch mehrfaches Pipettieren im Reaktionsgefäß wurde das Gemisch homogenisiert. Nach Inkubation für 10 min bei 37 °C wurde die Lösung über Nacht bei RT stehen gelassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA-Lösung gestoppt. Die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide wurden durch Zentrifugation des gesamten Reaktionsansatzes über eine SephadexTM-Säule (Amersham) von der Sonde abgetrennt. Der in der SephadexTM-Säule befindliche Puffer wurde zuvor durch Zentrifugation mit 5.000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) entfernt. Die Qualität der Sonde wurde durch dünnschichtchromatographische Auftrennung mit 0,8 M Ammoniumsulfatlösung als Laufmittel und anschließender Analyse des radioaktiven Nukleotideinbaus im Szintillationszähler überprüft.

2.2.24.2 Dotblot

Die Menge immunpräzipitierter DNA war so gering, dass sie mit Träger-DNA zusammen geblottet wurde, um Verluste an Gefäßwänden gering zu halten. Als Träger-DNA wurde der pGL3-Vektor benutzt, da er keine Affinität zu Alu- und 5'-LINE-Sonden aufwies. Es wurden jeweils 50 ng DNA mit 1 µg Träger-DNA in TE aufgenommen. Zur Kontrolle wurde auch die Input-DNA der Immunpräzipitation sowie der Überstand des Präzipitats aufgetragen. Ein Ansatz für 6 „Dots“ enthielt 6 µg Träger-DNA und 300 ng zu untersuchende DNA in 30 µl TE. Es

wurde nach dem Protokoll für die Nylonmembran *GeneScreen Plus* (NEN Life Science Products) gearbeitet. Zu den 30 µl DNA wurden 370 µl DNA-Denaturierungspuffer pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Probe auf Eis mit 800 µl DNA-Verdünnungspuffer versetzt, so dass 6 Proben à 200 µl in die *Dotblot*-Apparatur (96 Well, BRL) eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle wurde immer 1 µg pGL3-Vektor-DNA, als Positivkontrolle je 5 ng der Sonden-enthaltenden Plasmide und 5 ng genomische DNA parallel aufgetragen. Die genomische DNA wurde aus MCF-7-Zellen mit dem *QIAamp DNA Mini Kit* isoliert.

Die positiv geladene Nylonmembran wurde auf die Größe der *Dotblot*-Apparatur zugeschnitten und in 0,4 M Tris-HCl (pH 7,5) für 5 min äquilibriert. Anschließend wurde die Membran in die *Dotblot*-Apparatur eingespannt. Das Gerät wurde mit den DNA-Proben befüllt (200 µl je Öffnung/Well) und für 30 min ruhen gelassen. Dann wurde mit einer Wasserstrahlpumpe für ca. 90 sec starker Unterdruck angelegt, bis die Probenflüssigkeit durch die Membran hindurch gesogen war. Nach vorsichtigem Lösen des Vakuums wurde die beladene Membran aus der *Dotblot*-Apparatur herausgenommen und in Neutralisationspuffer gewaschen. Auf eine Fixierung der Proben mit UV-Licht wurde verzichtet, da gezeigt werden konnte, dass diese bei der verwendeten Membran keine Vorteile zeigt.

Die beladene Membran wurde in einem 50 ml-Falconröhrchen mit 5 ml *ExpressHyb*-Hybridisierungslösung für 30 min bei 60 °C im rotierenden Hybridisierungssofen prähybridisiert. Parallel wurden 10 µl radioaktiver Sonde, entweder Alu-Sonde oder LINE 1.3-Sonde (s. 2.2.24.1) mit 5 ml *ExpressHyb*-Hybridisierungslösung vermischt. Die Prähybridisierungslösung wurde dekantiert und durch die radioaktive Hybridisierungslösung ersetzt. Die Inkubation der Membran mit dieser Hybridisierungslösung erfolgte für mindestens 1 h oder über Nacht ebenfalls bei 60 °C im rotierenden Hybridisierungssofen. Anschließend wurde die Membran für 5 min mit 10 ml 2x SSC bei RT und 2-mal 30 min mit 20 ml 2x SSC/1 % SDS bei 50 °C gewaschen. Zum Abschluss wurde bei RT mit 0,1x SSC gewaschen, bis die mit einem Handgeigerzähler messbare Radioaktivität unter 10 cpm fiel. Die Membran wurde feucht in Klarsichtfolie verpackt. Die anschließende Autoradiographie erfolgte bei -80 °C mit 800-fachem Verstärkerschirm auf einem Röntgenfilm (Medical X Ray Film Super RX, Fuji).

3 Ergebnisse

3.1 Produktion von Antikörpern im Huhn

Für die Erstellung einer Bibliothek, in der MeCP2-gebundene DNA-Sequenzen angereichert sind, war ein Anti-MeCP2-Antikörper für die Chromatin-Immunpräzipitation von großer Wichtigkeit. Da es zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine verfügbaren Antikörper gegen MeCP2 gab, mussten diese zunächst selbst produziert werden. Als Organismus für die Antikörperproduktion wurde das Huhn ausgewählt. Es ist vom Menschen phylogenetisch weit entfernt, was bei der Produktion eines Antikörpers gegen ein ubiquitär in vielen Organismen vorkommenden Proteins wichtig ist. Das Hühner-MeCP2 (ARBP) und das des Menschen besitzen im N-terminalen Bereich eine Sequenzidentität von 66,8 %, wobei vier Sequenzblöcke mit Wiederholungen einer Aminosäure im Hühnerprotein ausgelassen wurden (Weitzel et al., 1997).

3.1.1 Produktion von Antikörpern durch klassische Immunisierung

Es wurden zwei Strategien zur Produktion von Antikörpern verfolgt. Einerseits wurde ein klassischer Ansatz gewählt. Die Immunantwort wurde durch primäre Injektion von rekombinant hergestelltem hMeCP2 in komplettem Freundschem Adjuvans induziert. Das komplette Freundsches Adjuvans enthält *Mycobacterium tuberculosis*, das Makrophagen und andere Zellen zu der Einstichstelle lockt und so die Immunantwort verstärkt. Um die Nebenwirkungen der Behandlung zu verringern, erfolgten weitere Stimulationen mit einer Emulsion aus hMeCP2 und inkomplettem Freundschem Adjuvans ohne Mycobakterien. Es wurden drei Hühner immunisiert, die mit „Box1“, „Box2“ und „Box3“ bezeichnet wurden.

Es wurden keine Antikörperextrakte aus Eiern gewonnen, die vor der Erstimmunisierung gelegt wurden. Daher gelten die aus den jeweils zuerst gelegten Eiern gewonnenen Antikörperextrakte als „Null“-Extrakte. Nach der Erstimmunisierung wurden die gelegten Eier von drei immunisierten Hühnern über acht Monate gesammelt (Abbildung 4). Die Antikörper wurden aus den Eidottern extrahiert. Die Legetätigkeit der Hennen war insbesondere nach Restimulation der

Immunantwort nicht kontinuierlich, so dass der Antikörperstatus der Tiere nur in unregelmäßigen Abständen untersucht werden konnte. Die aufgereinigten Antikörper wurden

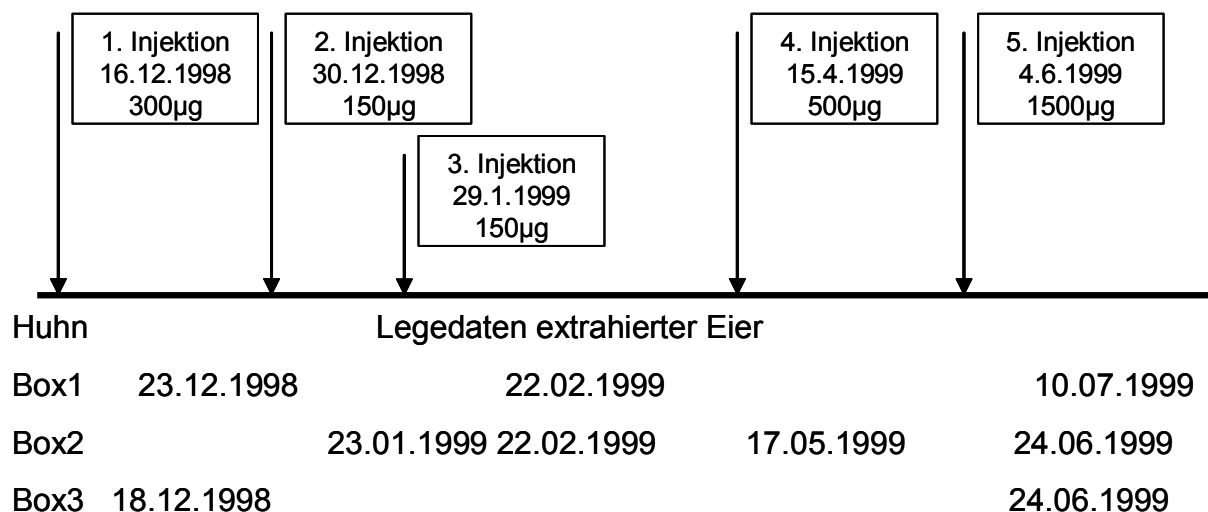


Abbildung 4: Zeitschema der klassischen Immunisierung. Es wurden drei Hühner („Box1“, „Box2“, „Box3“) immunisiert. Die Erstinjektion erfolgte mit hMeCP2 und komplettem Freundschem Adjuvans, weitere Injektionen mit hMeCP2 und inkomplettem Adjuvans. Die Zeitpunkte der Injektionen und die Menge des injizierten Proteins sind angegeben. Die Antikörperextrakte wurden kontinuierlich analysiert, nur die Zeitpunkte der in Abbildung 5 überprüften ausgewählten Antikörperextrakte wurden dargestellt.

gegen MCF-7-Totallysat und gegen rekombinantes hMeCP2 im Westernblot analysiert, eine Auswahl der getesteten Antikörperextrakte ist in Abbildung 5 dargestellt. Es wurde ein starkes Signal bei ca. 80 kDa detektiert. Diese Größe ist identisch mit der apparenten Größe von endogenem rMeCP2 (Lewis et al., 1992). MeCP2 ist Proteolyse-empfindlich (Lewis et al., 1992). Niedermolekulare Banden unterhalb der 80 kDa-Bande von MeCP2 deuten dies an. Es könnte sich auch um Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen Proteinen handeln, jedoch erscheint dies unwahrscheinlich vor dem Hintergrund, dass FPLC-aufgereinigtes rekombinantes hMeCP2 ebenfalls diese Abbaubanden unterhalb von 80 kDa zeigt (Spur 10). Die wenige Tage nach der ersten Injektion extrahierten Antikörper können als „Null“-Extrakte gelten, dort wurde jeweils keine Affinität zu hMeCP2 detektiert (Spuren 1 und 8). Eine Ausnahme bildet das Huhn „Box2“, welches erst vier Wochen nach der Erstimmunisierung mit hMeCP2 ein Ei legte. Aus diesem Ei wurden Antikörper gewonnen, die bereits Titer zu rekombinantem hMeCP2 aufwiesen, nicht jedoch zu nativem hMeCP2 aus dem Totallysat von MCF-7-Zellen (Spuren 4). Nach ca. zwei Monaten wiesen die Antikörperextrakte der Hühner „Box 1“ und „Box 2“ deutliche Titer zu nativem und rekombinantem hMeCP2 auf (Spuren 2 und 5), die Titer blieben bis zum sechsten Monat nach Erstimmunisierung erhalten (Spuren 3 und 6). Das Huhn „Box3“

zeigte kaum eine Immunantwort (Spur 9). Die Antikörper der Hühner „Box1“ und „Box2“ zeigten etwa gleichen Titer gegen hMeCP2, doch wies der Antikörper des Huhns „Box2“ weniger unspezifische Nebenbanden auf (nicht gezeigt). Für die weiteren Arbeiten wurde der Antikörper des Huhns „Box2“ vom 24.06.99 eingesetzt (Spur 7), da er am wenigsten unspezifische Banden bei gleichzeitig bester Affinität zu hMeCP2 zeigte.

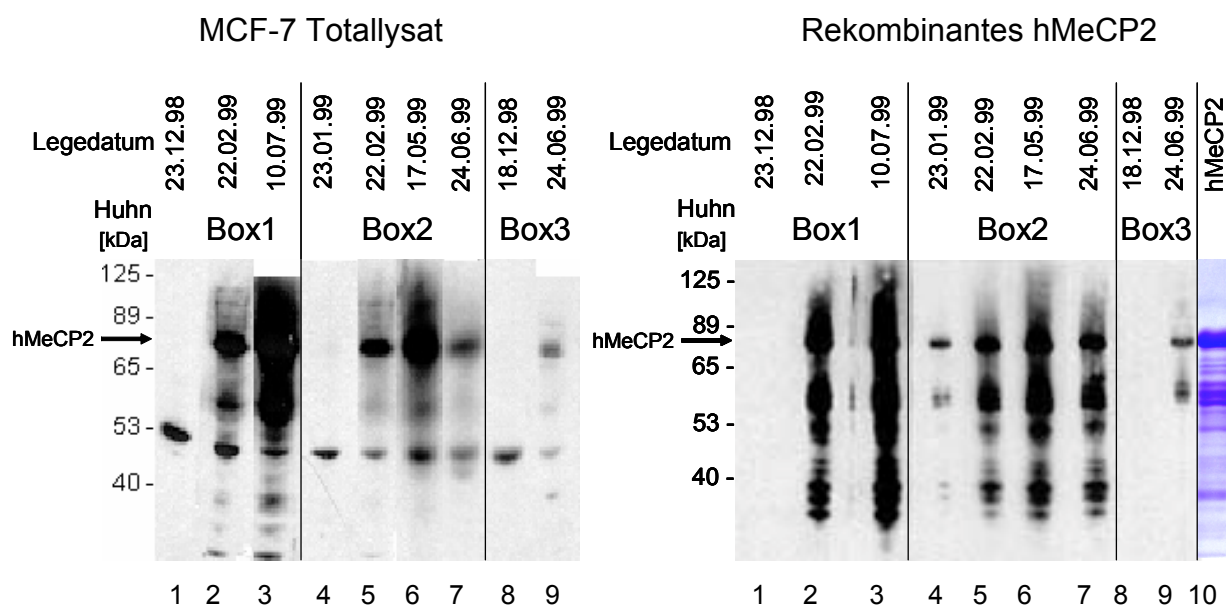


Abbildung 5: Analyse von Antikörperextrakten. Westernblots von MCF-7-Totallysaten (links) und rekombinatem hMeCP2 (rechts) wurden mit aus Eidottern extrahierten Antikörpern inkubiert, anschließend mit einem sekundären HRP-konjugierten Anti-IgY-IgG (Promega). Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System. FPLC-gereinigtes rekombinantes hMeCP2 wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt (Spur 10). Die Legedaten der verwendeten Eier der Hühner „Box 1“, „Box2“ und „Box 3“ sind angegeben.

Um die Antikörperextrakte zu konzentrieren und um die affinsten Antikörper anzureichern, wurde eine Affinitätsreinigung mit immobilisiertem Zielprotein probiert. Die Aufreinigung des polyklonalen Antikörpers des Huhns „Box2“ vom 24.06.1999 wurde durch Bindung an immobilisiertes rekombinantes hMeCP2 versucht. Das Protein wurde an eine Nitrozellulosemembran gebunden und mit der Antikörperlösung inkubiert. Nach Waschen der Membran sollten die affinen Antikörper von dem Protein mit unterschiedlichen Puffern eluiert werden. Es konnten jedoch im Eluat keine Antikörper nachgewiesen werden. Die Aufreinigung durch einen kommerziellen Anbieter (Davids Biotechnologie) blieb ebenfalls erfolglos.

Um den Antikörper ohne vorherige Affinitätsreinigung für die Immunpräzipitation einsetzen zu können, muss der Antikörper an eine sedimentierbare Matrix gebunden werden. Bei Antikörpern aus Kaninchen und Maus wird das an Sepharose gekoppelte Protein-A verwendet, da es

Antikörper dieser Spezies stark bindet. Antikörper aus Huhn (IgY) haben jedoch eine verkürzte Fc-Domäne und werden von Protein-A nicht gebunden. Daher wurde versucht, den Antikörper an eine Matrix zu koppeln. Aktivierte Sepharose (Pharmacia) wurde nach Herstellerangaben mit der Antikörperlösung von Huhn „Box2“ inkubiert. Es konnte jedoch nur eine geringe Kopplung des Antikörpers an die Sepharose festgestellt werden, da viel Protein im Eluat der Sepharose detektiert wurde. Es wurde vermutet, dass der Hühnerantikörper (IgY) aufgrund seiner verkürzten Fc-Domäne nicht mit Standardmethoden an eine Matrix konjugiert werden kann.

3.1.2 Produktion von Antikörpern durch genetische Immunisierung

Des Weiteren wurde ein genetischer Ansatz zur Produktion von Antikörpern verfolgt. Bei der genetischen Immunisierung wird das Antigen vom Tier selbst hergestellt. Diese Methode verspricht qualitativ bessere Antikörper, da das Antigen nativ und unfragmentiert präsentiert wird. Für die genetische Immunisierung wurde die humane cDNA für MeCP2 und als *Tag* die Sequenz für das Flag-Epitop (DYKDDDDK) in das Plasmid *pDisplay* einkloniert. Mit Hilfe des Flag-Epitops wurde die Funktionalität des Konstrukts in Transfektionsexperimenten überprüft. Der Vektor *pDisplay* bietet den Vorteil, dass das einklonierte Gen als Fusionsprotein mit der PDGFR-(*Platelet-derived Growth Factor Receptor*)-Transmembrandomäne exprimiert wird. Die Transmembrandomäne stellt sicher, dass das Kernprotein MeCP2 an der Oberfläche von Zellen lokalisiert wird.

3.1.2.1 Funktionalität des hMECP2-kodierenden Vektors

Zunächst wurde versucht, den klonierten Vektor durch Calciumphosphatkopräzipitation (Graham et al., 1977) in HEK293- und NIH-3T3-Zellen zu transfizieren. Die Effizienz dieser weit verbreiteten Methode erwies sich jedoch als zu gering, so dass stattdessen eine Transfektionsmethode mit einem kationischen Lipid verwendet wurde. Das Konstrukt wurde komplexiert mit Fugene 6 in NIH-3T3-Zellen transfiziert. Nach drei Tagen Zellkultivation wurden die transfizierten Zellen auf einem Polylysin-beschichteten Objektträger (Sigma) über Nacht subkultiviert. Das exprimierte Fusionsprotein wurde mit monoklonalem Anti-Flag-Antikörper und sekundärem FITC-konjugierten Anti-Maus-Antikörper detektiert. In konfokalen lasermikroskopischen Aufnahmen wurde das Immunfluoreszenzsignal und somit das Fusionsprotein an der Zellmembran lokalisiert (Abbildung 6).

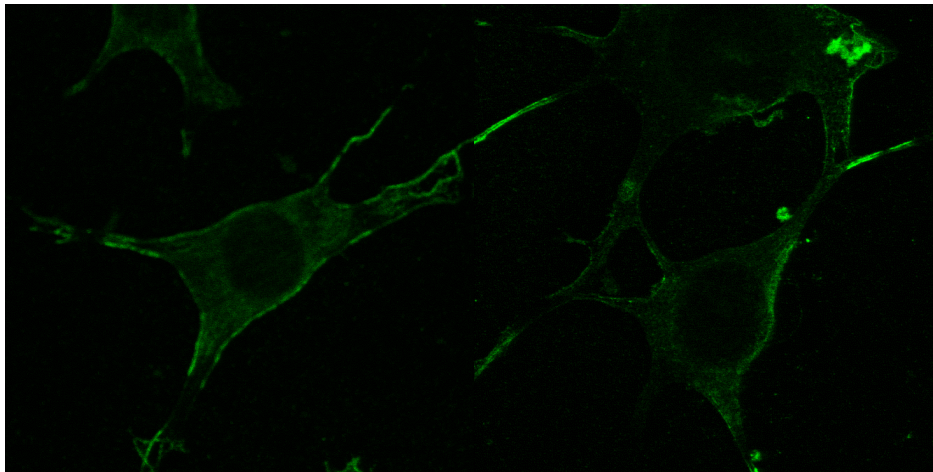


Abbildung 6: Membranständige Expression des Fusionsproteins FLAG-hMeCP2-PDGFR-Membrandomäne. NIH-3T3-Zellen wurden mit dem Konstrukt *pDisplay*-Flag-hMeCP2 transfiziert. Nach Paraformaldehyd-Fixierung wurden die Zellen mit Anti-Flag-Antikörpern (Sigma) und FITC-konjugierten Anti-Maus-Antikörpern (Dianova) inkubiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte am konfokalen Lasermikroskop (CLMS, Leica).

Abbildung 6 zeigt die Akkumulation exprimierter Flag-hMeCP2-Transmembrandomänen-Proteine an der Zellmembran. Die Fluoreszenz verteilte sich entlang der Membranausläufer der Zellen. Parallel behandelte, nicht-transfizierte NIH-3T3-Zellen zeigten unter gleichen Bedingungen keine Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Damit wurde die Funktionalität des Konstrukts im Zellkulturmodell bewiesen.

3.1.2.2 Genetische Immunisierung

Für die genetische Immunisierung wurde das DNA-Konstrukt an Goldpartikel geheftet, in einen Kunststoffschlauch eingebracht und an dessen Innenwand abgelagert. Der beladene Schlauch wurde in kurze Stücke („Patronen“) geschnitten und die Goldpartikel mit der *Gene Gun* mittels Luftdruck subkutan in die Brusthaut von drei Hennen („Braun“, „Weiß“, „Grün“) geschossen. Die Immunantwort der Hennen wurde alle vier Wochen durch erneute Verwendung der *Gene Gun* restimuliert.

Die erzeugten Antikörper wurden ebenfalls im Westernblot analysiert (Abbildung 7). Es wurde erwartet, dass die genetisch erzeugten Antikörper besser an hMeCP2 binden als die durch klassische Immunisierung induzierten. Es zeigte sich jedoch, dass die Antikörper aus den Eiern genetisch immunisierter Hühner diesen Erwartungen nicht entsprachen.

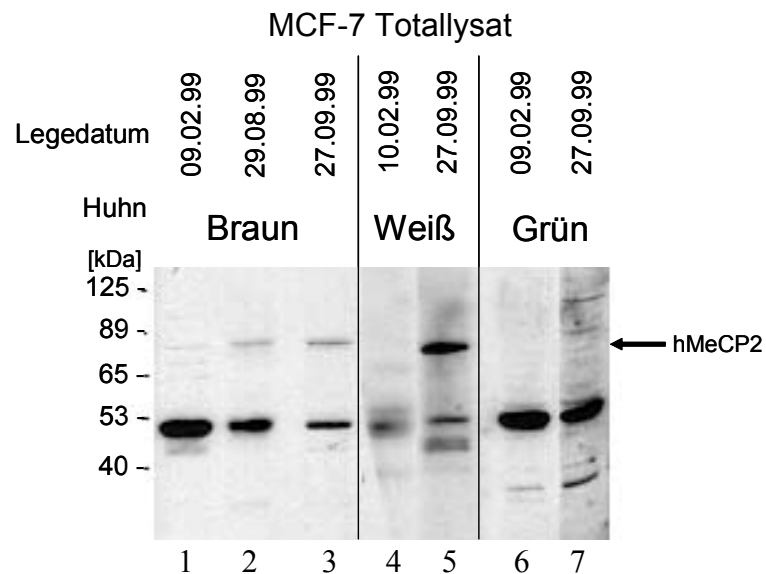


Abbildung 7: Analyse von Antikörperextrakten. Westernblots von MCF-7-Totallysaten wurden mit Antikörpern aus Eidottern genetisch immunisierter Hennen inkubiert, anschließend mit einem sekundären HRP-konjugierten Anti-IgY-IgG (Promega). Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System. Die Legedaten der extrahierten Eier verschiedener Hennen („Braun“, „Weiß“, „Grün“) sind angegeben.

Vor Beginn der genetischen Immunisierung wurde von jedem der drei verwendeten Hühner ein Ei extrahiert. Diese Antikörperextrakte der Hühner „Braun“ und „Grün“ vom 09.02.99 und „Weiß“ vom 10.02.99 waren die „Null“-Extrakte und wurden in Spur 1, 4 und 6 (Abbildung 7) analysiert. Nur das Huhn „Weiß“ entwickelte nach der Immunisierung Antikörper mit Titer gegen hMeCP2 aus MCF-7-Totallysat (Spur 5). Leider verstarb dieses Tier kurz darauf an einer Eierstockzyste, so dass der erfolgversprechendste Antikörperlieferant der genetischen Immunisierungsstrategie ausfiel. Die anderen beiden Hühner („Grün“ und „Braun“) lieferten Antikörper, die hMeCP2 nicht (Spur 7) bzw. nicht als prominenteste Bande (Spuren 2 und 3) im Westernblot detektierten. Während die Antikörper des Huhns „Braun“ zumindest auch auf der Höhe des hMeCP2 eine schwache Bande erkannten (Spuren 2 und 3), wurde mit den Antikörpern des Huhns „Grün“ gar kein hMeCP2 in der erwarteten Größe detektiert (Spur 7). Auffallend ist, dass keiner der genetisch erzeugten Antikörper das rekombinante hMeCP2 detektieren konnte (nicht gezeigt).

3.2 Immunzytologische Untersuchungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sind die DNA-Zielsequenzen von MeCP2. Zunächst stellte sich die Frage, ob hMeCP2 in bestimmten chromosomalen Bereichen akkumuliert vorliegt. Lewis et

al. (1992) zeigten, dass mit einem polyklonalen Serum gegen MeCP2 pericentromeres Heterochromatin von Metaphasechromosomen der Maus stark angefärbt wird. Die MeCP2-Verteilung auf humanen Metaphasechromosomen war jedoch bislang unbekannt. Um diese zu analysieren, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

3.2.1 Lokalisation von hMeCP2 und 5'-Methylcytosin

Zunächst wurden Metaphasechromosomen von humanen peripheren Lymphozyten untersucht. Durch die Verwendung von Anti-MeCP2-Antikörpern und Anti-5'-Methylcytosin-Antikörpern (Anti-5-MeC) wurde die Verteilung von MeCP2 bzw. die Verteilung methylierter Cytosine auf Metaphasechromosomen dargestellt. Die Analyse humaner Metaphasechromosomen erfolgte mit Anti-MeCP2-IgY aus Huhn („Box2“, 24.06.99) und sekundärem FITC-konjugiertem Anti-IgY-IgG aus Kaninchen. Die Anti-MeCP2-Antikörper dekorierten humane Metaphasechromosomen in einer uniformen Weise (Abbildung 8 A).

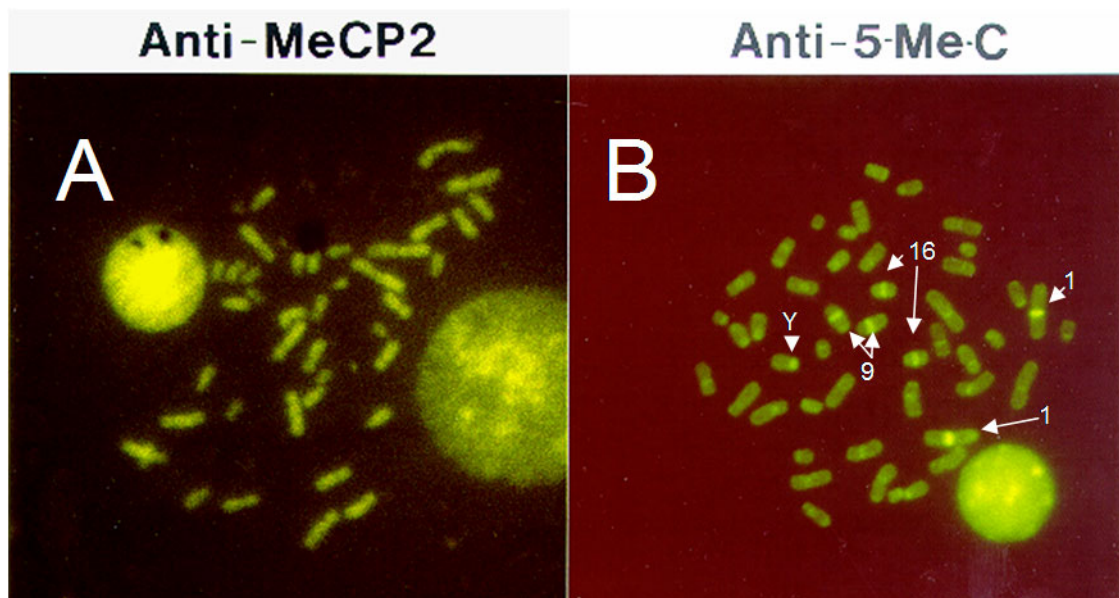


Abbildung 8: Lokalisierung von MeCP2 (A) und methylierter DNA (B) auf humanen Metaphasechromosomen. Immunfluoreszenzmikroskopie von Anti-MeCP2-IgY (A) und Anti-5-MeC (B) dekorierten Metaphasechromosomen. Jeweils sichtbar gemacht durch FITC-markierte sekundäre Antikörper. Die Färbung mit Anti-MeCP2-IgY zeigt eine homogene Verteilung von MeCP2 auf humanen Metaphasechromosomen. Die Färbung mit Anti-5-MeC ergab eine homogene Verteilung mit starker Ansammlung methylierter DNA in den Juxtacentromeren der Chromosome 1, 9 und 16 sowie des langen Arms des Y-Chromosoms.

Für murines MeCP2 wurde zuvor gezeigt, dass es speziell an methylierte Cytosine bindet (Lewis et al., 1992). Deshalb wurde in der vorliegenden Studie auch ein monoklonaler Antikörper

eingesetzt, der methylierte Cytosine spezifisch erkennt (Reynaud et al., 1991). Metaphasechromosomen humaner peripherer Lymphozyten wurden mit monoklonalem Anti-5-MeC (Reynaud et al., 1991) und sekundärem FITC-konjugiertem Anti-Maus-IgG aus Schaf dekoriert. Das Chromatin der Metaphasechromosomen wurde vor der Anfärbung durch UV-Bestrahlung aufgelockert, um die DNA für den Antikörper zugänglich zu machen. Der Anti-5-MeC-Antikörper bindet erwartungsgemäß an die stark methylierten Regionen im juxtacentromeren Heterochromatin der Chromosomen 1, 9 und 16 und im langen Arm von Chromosom Y (Abbildung 8 B, Miller et al., 1974). *In situ* Hybridisierungen zeigten, dass im juxtacentromeren Heterochromatin der Chromosomen 1 und 16 die klassische Satelliten-DNA 2 liegt (Jones und Corneo, 1971). In den 5'-Methylcytosin-positiven Regionen des Chromosoms 9 wurden ebenfalls durch *in situ* Hybridisierungen die Satelliten-DNAs 2 und 3 detektiert (Jones et al., 1973). In den Centromeren weiterer Chromosomen wurde ebenfalls methylierte DNA gefunden, jedoch nicht so stark wie in denen der Chromosome 1, 9 und 16. MeCP2 kommt in den hoch methylierten Bereichen humaner Metaphasechromosomen nicht akkumuliert vor.

Um die im Fluoreszenzmikroskop erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen, wurden darüber hinaus konfokale Untersuchungen von MCF-7-Zellkernen durchgeführt. Die Verwendung von vollständigen Zellen war in diesem Fall nicht möglich, da der Anti-5-MeC-Antikörper starke unspezifische Signale in der gesamten Zelle zeigte. Es handelte sich dabei vermutlich um methylierte RNAs, die ebenfalls von dem Antikörper detektiert wurden. Die Experimente wurden mit einem polyklonalen Anti-MeCP2-Antikörper aus Kaninchen fortgeführt, der zwischenzeitlich kommerziell verfügbar geworden war und eine bessere Qualität als die eigenen produzierten aufwies. Dieser neue Anti-MeCP2-Antikörper wurde mit einem Rhodamin-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege detektiert, der monoklonale Anti-5-MeC-Antikörper wurde mit einem Cy2-konjugierten Anti-Maus-Antikörper detektiert.

In den Zellkernen zeigte MeCP2 eine gleichmäßig gesprenkelte Verteilung (Abbildung 9, links). Bei Detektion mit Anti-5-MeC wurden die Zellkerne fein gesprenkelt mit Cy2 gefärbt (Abbildung 9, Mitte). Darüber hinaus waren mindestens sieben intensiv grün fluoreszierende Spots zu sehen. Diese stammen wahrscheinlich von den stark methylierten, heterochromatischen Bereichen der Pericentromere der Chromosomen 1, 9 und 16 sowie des langen Arms des Y-Chromosoms. Wie bereits erwähnt, liegen in diesen Regionen die Satelliten DNAs 2 und 3 akkumuliert vor. Um kolokalisierte Fluoreszenzbereiche zu detektieren, wurden die einzelnen

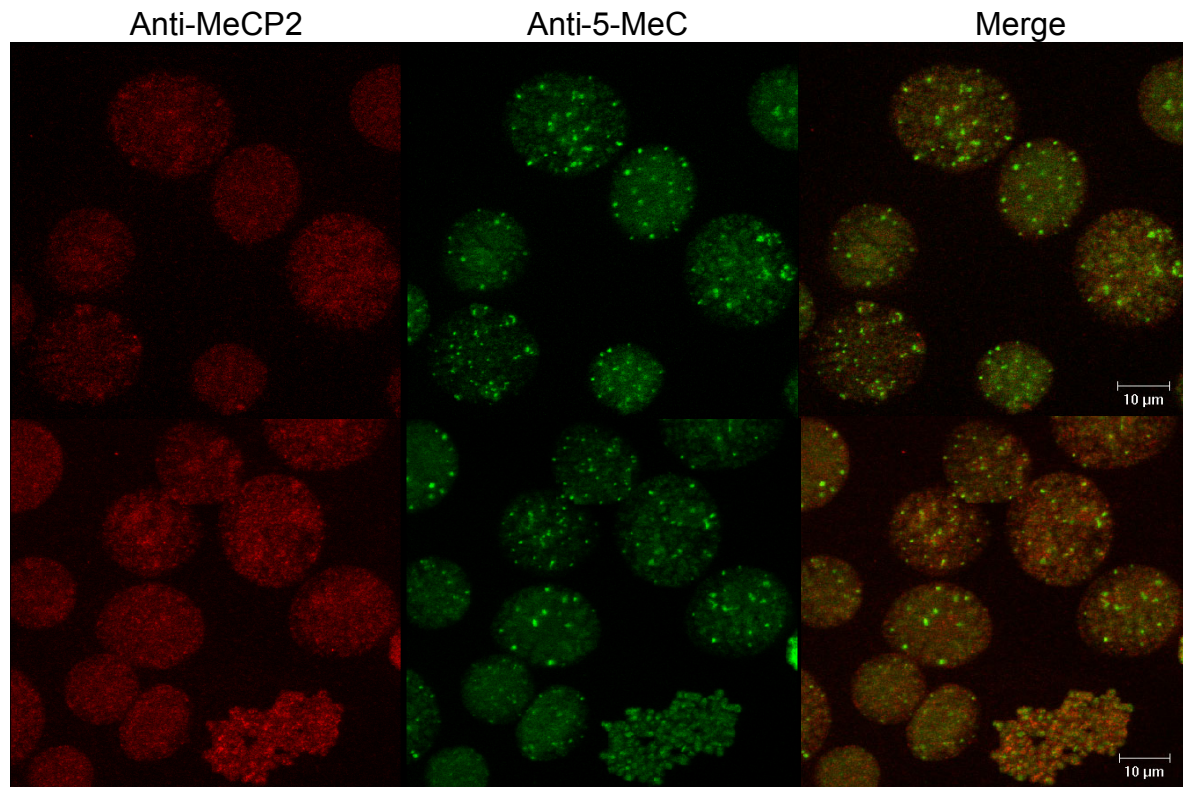


Abbildung 9: Laserkonfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von MCF-7-Zellkernen. Präparierte und UV-bestrahlte Zellkerne wurden mit zwei primären Antikörpern, einem polyklonalen Anti-MeCP2-Antikörper aus Kaninchen und einem monoklonalen Anti-5-MeC inkubiert. Zur Detektion wurden zwei sekundäre Antikörper, ein Rhodamin-konjugierter Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege und ein Cy2-konjugierter Anti-Maus-Antikörper verwendet. Die Methylcytosinverteilung der Zellkerne (grün, Mitte) wurde mit der MeCP2-Verteilung (rot, links) im jeweils rechten Bild (Merge) überlagert.

aufgenommenen Bilder überlagert (Abbildung 9, rechts). Die Überlagerung zeigte rote und grüne Bereiche nebeneinander. Es wurde keine Kolokalisation festgestellt, diese hätte gelb erscheinen müssen. Zusätzlich wurden Metaphasechromosomen von MCF-7-Zellen präpariert und mit den bereits genannten Antikörpern inkubiert. Auch bei den Chromosomen war keine Kolokalisation von MeCP2 und 5'-Methylcytosin zu detektieren (nicht gezeigt). Die Verteilung von MeCP2 folgt demnach nicht der Verteilung methylierter Cytosine. Offenbar ist MeCP2 nicht in den am stärksten methylierten Bereichen der DNA konzentriert.

3.2.2 Lokalisation von hMeCP2 verglichen mit murinem MeCP2

Die im vorangegangenen Abschnitt beobachtete gleichmäßige Lokalisation von hMeCP2 steht im Kontrast zu der Lokalisation von MeCP2 an murinen Metaphasechromosomen (Lewis et al., 1992). Daher wurden die immunzytologischen Untersuchungen an humanen Zellen (MCF-7) und an Mauszellen (NIH-3T3) parallel durchgeführt. Fixierte Zellen wurden mit Anti-MeCP2 und

einem sekundären Rhodamin-markierten Antikörper inkubiert. In beiden Spezies wurde spezifisch der Zellkern angefärbt. Es zeigten sich jedoch starke Unterschiede in der Verteilung von MeCP2 in den Zellkernen beider Spezies (Abbildung 10). In Zellkernen von humanen MCF-7-Zellen wies die Immunfluoreszenz ein fein gesprenkeltes Muster auf, wobei die Nukleoli ausgespart blieben (Abbildung 10, links). Die DNA wurde mit DAPI gefärbt, um kompaktes

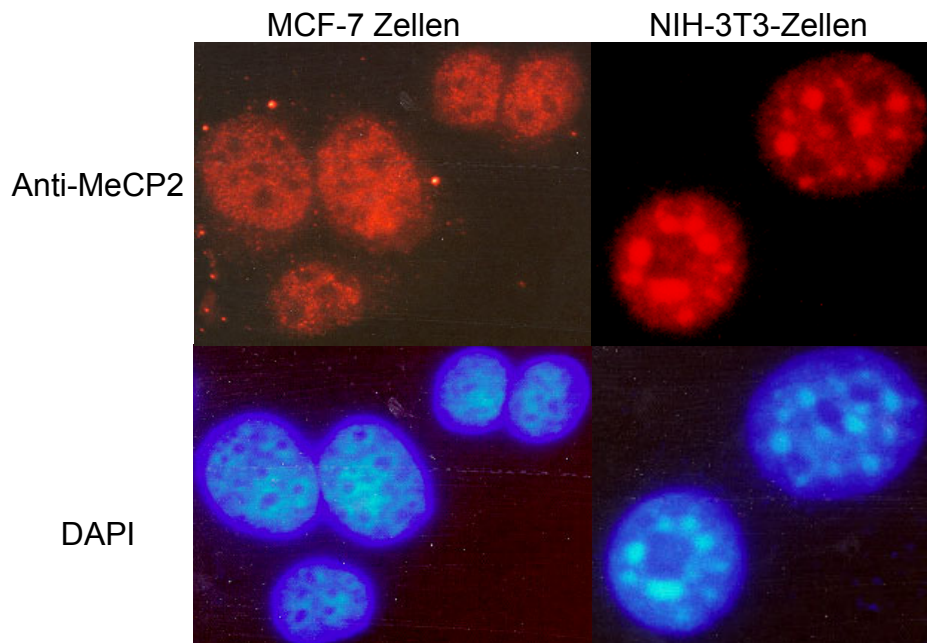


Abbildung 10: Vergleich der Lokalisation von MeCP2 und der DNA in humanen und murinen Zellen. MCF-7- und NIH-3T3-Zellen wurden mit Anti-MeCP2-IgG (Upstate) und Rhodamin Red-konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG (Molecular Probes) inkubiert. Die DNA-Färbung wurde mit DAPI (Sigma) durchgeführt.

Heterochromatin zu detektieren. DAPI ist ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der in kompaktem Heterochromatin heller fluoresziert als in lockerer gepacktem Chromatin. Die DAPI-Färbung zeigte Schalen von Heterochromatin um die Nukleoli herum. Die Verteilung von hMeCP2 wies hingegen keine ähnliche Lokalisierung des Proteins um die Nukleoli herum auf. Folglich scheint MeCP2 im Heterochromatin von MCF-7-Zellen nicht akkumuliert vorzuliegen, obwohl diese Bereiche stark methyliert sind. Murine Zellkerne wiesen hingegen akkumulierte Fluoreszenzbereiche auf (Abbildung 10, rechts), in denen MeCP2 konzentriert vorlag. Diese Bereiche hoben sich deutlich vom Hintergrund ab, der homogen und fein gesprenkelt gefärbt war, ähnlich dem Muster in humanen Zellkernen. Die Nukleoli blieben ausgespart. Die DAPI-Färbung zeigte eine Fluoreszenzverteilung, die der der MeCP2-Fluoreszenzverteilung glich. Mit DAPI wurden in murinen Zellkernen ebenfalls akkumulierte Fluoreszenzbereiche detektiert, die exakt mit denen der MeCP2-Färbung übereinstimmten. Bei Mauszellen liegt MeCP2 demnach in

centromeren Heterochromatin akkumuliert vor. Diese Akkumulationen stellen wahrscheinlich Bereiche stark methylierter Maus-Satelliten-DNA dar, die von MeCP2 gebunden werden, wie zuvor von Lewis et al. (1992) beschrieben. Das Heterochromatin humaner MCF-7-Zellen bildet Schalen um die Nukleoli. Dort wurde keine Akkumulation von MeCP2 detektiert. MeCP2 bindet also nicht an das Heterochromatin. Hier zeigt sich ein Unterschied zwischen Mensch und Maus. MeCP2 erkennt folglich beim Menschen nur eine spezifische Untergruppe methylierter DNA-Sequenzen oder nicht nur methylierte DNA.

3.3 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) von MeCP2

3.3.1 Studien zur Vernetzung von MeCP2 und DNA

3.3.1.1 Studien mit cis-Platin

Es wurde zunächst cis-Platin als Crosslink-Reagenz eingesetzt, weil MeCP2 als Matrix-bindendes Protein beschrieben wurde und mit cis-Platin bereits mehrere Matrix-bindende Proteine erfolgreich untersucht wurden. Für das *Crosslink*-Reagenz cis-Platin wurde beschrieben, dass es insbesondere nicht-Histon-Proteine mit der DNA komplexiert und daher ein relativ spezifischer *Crosslinker* ist (Wedrychowski et al., 1986). Cis-Platin wird in der Chemotherapie wegen seiner überragenden Antitumoraktivität seit Jahren eingesetzt, und seine Zytotoxizität für Zellen ist bekannt. Daher wurden zunächst Zytotoxizitätsstudien an zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Bei der einen Zelllinie handelt es sich um eine humane Mammacarcinoma Zelllinie (MCF-7), bei der anderen um eine Fibroblastenzelllinie aus Huhn (Tasp-7). Die Zytotoxizitätsstudien wurden sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig durchgeführt. Cis-Platin wurde in Konzentrationen von 100 μM bis 1000 μM eingesetzt, die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bis maximal 6 Stunden. Die Überlebensrate der Zellen wurde einerseits mit einem automatischen Zellzähler (Coulter Counter), andererseits nach Trypanblau-Färbung durch Zellzählung am Mikroskop bestimmt. Bei der letzteren Methode wurde das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen ermittelt. Das Inkubationsmedium wurde Chlorid- und Phosphat-arm gewählt, da diese beiden Anionen die Aktivität von cis-Platin stark negativ beeinflussen. Als Inkubationsoptimum wurde eine möglichst hohe cis-Platin-Konzentration angestrebt, bei gleichzeitiger Überlebensrate von mindestens 50 %. Es zeigte sich, dass die als aggressiv bekannten Brustkrebszellen (MCF-7) wesentlich robuster gegenüber Behandlung mit

cis-Platin waren als die Hühnerfibroblasten (Tasp-7). So konnte für die Zelllinie MCF-7 ein Inkubationsoptimum von 1000 μ M cis-Platin für 120 Minuten und für die Zelllinie Tasp-7 ein Optimum von 500 μ M cis-Platin für 90 Minuten festgestellt werden.

Nach Inkubation der Zellen mit den ermittelten optimalen Bedingungen wurden die Tasp-7-Zellen parallel mit und ohne cis-Platin inkubiert, anschließend pelletiert und lysiert. Um die DNA zu fragmentieren, wurden die Zelllysate sonifiziert. Die derart behandelten Lysate wurden mittels Hydroxylapatit in drei Fraktionen separiert. Die erste Fraktion (Überstand 1) enthält sämtliche nicht an DNA gebundene Proteine sowie RNA. Die zweite Fraktion (Überstand 2) enthält alle an DNA gebundene Proteine. Die Verbindungen zwischen DNA und Protein wurde durch den Einsatz von Thioharnstoff gelöst. Die letzte Fraktion (Überstand 3) enthält schließlich die vom Hydroxylapatit gelöste DNA. Die Proteine, RNA und DNA lagen jeweils in hochmolaren Salzpuffern vor, so dass sie zunächst gegen Wasser dialysiert wurden.

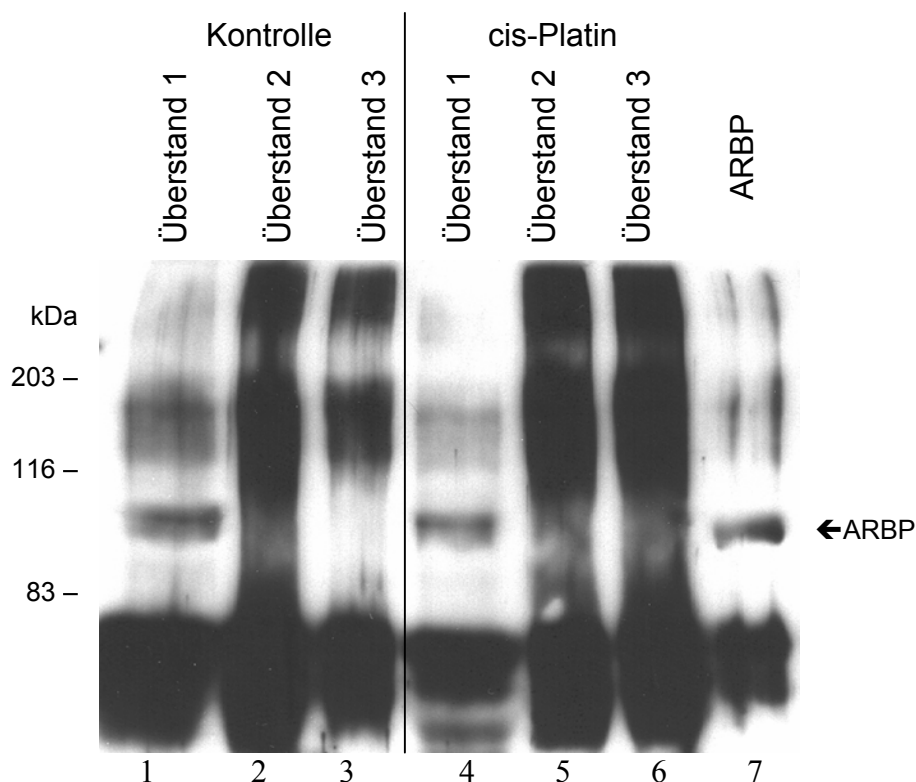


Abbildung 11: Westernblot cis-Platin-inkubierter Tasp-7-Zellen. Tasp-7-Zellen wurden mit oder ohne cis-Platin (Kontrolle) inkubiert, aufgereinigt und fraktioniert von einer Hydroxylapatitmatrix eluiert. In den Spuren 1 und 4 sind die Überstände 1, die RNA und unvernetzte Proteine enthalten, in den Spuren 2 und 5 die Überstände 2, die vernetzte Proteine enthalten, in den Spuren 3 und 6 die DNA-enhaltenden Überstände 3 und in Spur 7 FPLC-gereinigtes ARBP aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Anti-cMeCP2-Antikörpern aus Ratte, sekundärem HRP-konjugiertem Anti-Ratten-IgG aus Ziege und dem ECL-System.

Anschließend wurden die Fraktionen lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in SDS-Ladepuffer gelöst und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen geblottet, anschließend entweder einer Westernblot-Detektion (Abbildung 11) oder einer Southwestern-Detektion (Abbildung 12) unterzogen. In den Überständen 1 (Spuren 1 und 4) wurde unvernetztes ARBP stark detektiert. Im direkten Vergleich ist kein quantitativer Unterschied zwischen den Überständen 1 unvernetzter Kontrollzellen (Spur 1) und cis-Platin-inkubierter Zellen (Spur 4) sichtbar. Der aus unvernetzten Kontrollzellen stammende Überstand 2 zeigt erwartungsgemäß keine ARBP-Bande (Spur 2). Doch auch der Überstand 2 cis-Platin-vernetzter Zellen (Spur 5) enthielt keine ARBP-Bande, obwohl in dieser Fraktion die vernetzten ARBP-Proteine zu erwarten waren. In den DNA-haltigen Überständen 3 (Spuren 3 und 6) wurden ebenfalls keine ARBP-Banden detektiert. Als

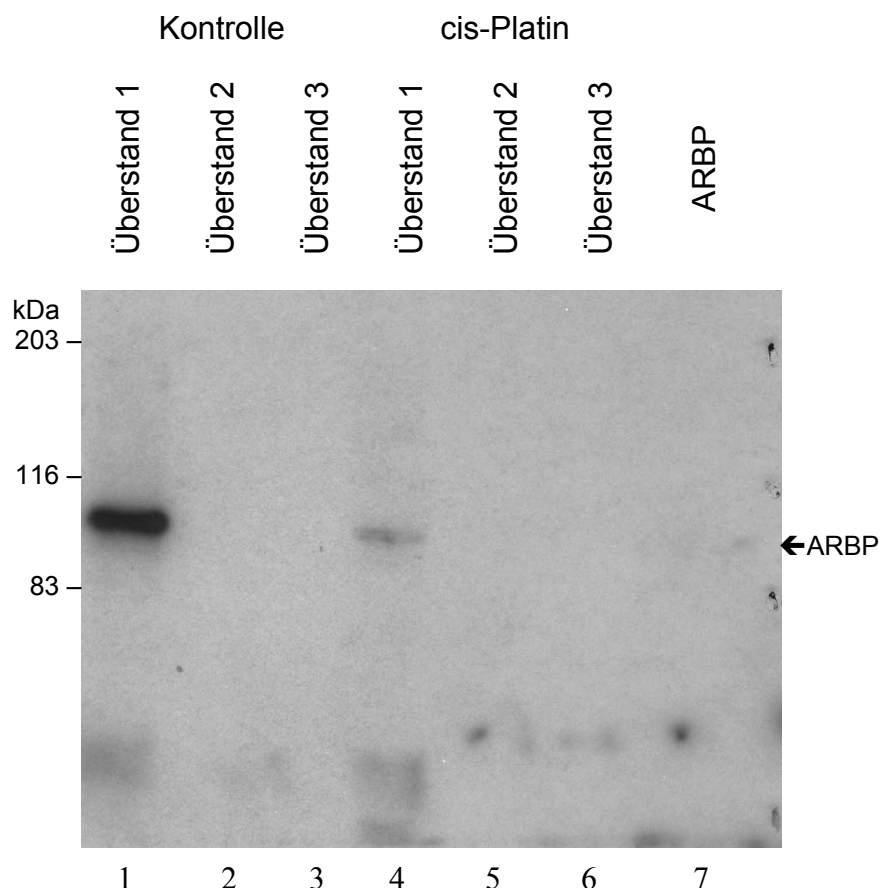


Abbildung 12: Southwesternblot cis-Platin-inkubierter Tasp-7-Zellen. Tasp-7-Zellen wurden mit oder ohne cis-Platin (Kontrolle) inkubiert, aufgereinigt und fraktioniert von einer Hydroxylapatitmatrix eluiert. In den Spuren 1 und 4 sind die Überstände 1, die RNA und unvernetzte Proteine enthalten, in den Spuren 2 und 5 die Überstände 2, die vernetzte Proteine enthalten, in den Spuren 3 und 6 die DNA-enthaltenden Überstände 3 und in Spur 7 FPLC-gereinigtes ARBP aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einer α - ^{32}P radioaktiv-markierten H1-HaeII-Sonde und anschließender Autoradiographie.

Blotkontrolle wurde FPLC-gereinigtes ARBP (Spur 7) aufgetragen. Die Southwesternblot-Analyse erfolgte mit einer radioaktiv-markierten H1-HaeII-Sonde, die eine Matrix-Anheftungs-Region enthält und daher das Matrix-assoziierte Protein MeCP2 detektieren kann. Im Southwesternblot wurde ARBP nur in den Überständen 1 detektiert, die unvernetztes Protein enthalten (Spuren 1 und 4). Der Überstand 1 aus unvernetzten Zellen (Spur 1) wies jedoch ein wesentlich stärkeres ARBP-Signal auf als der Überstand 1 der cis-Platin-inkubierten Zellen (Spur 4). Der Überstand 2 der unvernetzten Kontrollzellen zeigte erwartungsgemäß keine ARBP-Bande (Spur 2). Gleiches gilt jedoch auch für den Überstand 2 der cis-Platin-vernetzten Zellen (Spur 5), obwohl in dieser Fraktion vernetztes ARBP vorliegen sollte. Die DNA-haltigen Überstände 3 (Spuren 3 und 6) zeigten keine ARBP-Banden. Der Proteinstandard aus FPLC-gereinigtem ARBP (Spur 7) zeigt nur sehr schwach die Größe des ARBP an.

Im Southwesternblot wurde deutlich, dass die Behandlung mit cis-Platin zu einem Verlust an freiem ARBP im Überstand 1 führt. Die fehlende Proteinmenge hätte eigentlich im Überstand 2 detektierbar sein müssen, da hier die vernetzten Protein erscheinen. Es wurde keine Vernetzung von MeCP2 mit der DNA nachgewiesen. Weder im Western- noch im Southwesternblot wurde MeCP2 im Überstand 2 detektiert. Hieraus folgt, dass der *Crosslink* zwischen MeCP2 und DNA unterhalb des Detektionslimits lag oder nicht stattfand. Das *Crosslink*-Reagenz cis-Platin erwies sich somit als ungeeignet für die Verbindung von DNA mit dem hier untersuchten Protein MeCP2.

3.3.1.2 Vernetzung mit Formaldehyd

Als weiteres *Crosslink*-Reagenz kam Formaldehyd in Frage. Es vernetzt sowohl DNA und Proteine als auch nur DNA oder nur Proteine untereinander. In der Literatur werden *Crosslink*-Zeiten von vier Minuten bis vier Tagen beschrieben (Göhring und Fackelmayer, 1997; Orlando et al., 1997; Solomon et al., 1988). Daher wurde die Rate der Vernetzung von MeCP2 mit DNA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. MCF-7-Zellen wurden mit 1 % Formaldehyd im Zellkulturmedium bis zu zwei Tage lang inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Proteine der Lysate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Westernblot auf ihren relativen MeCP2-Gehalt untersucht. Im Westernblot zeigte sich bereits nach fünf Minuten eine sehr schnelle Abnahme

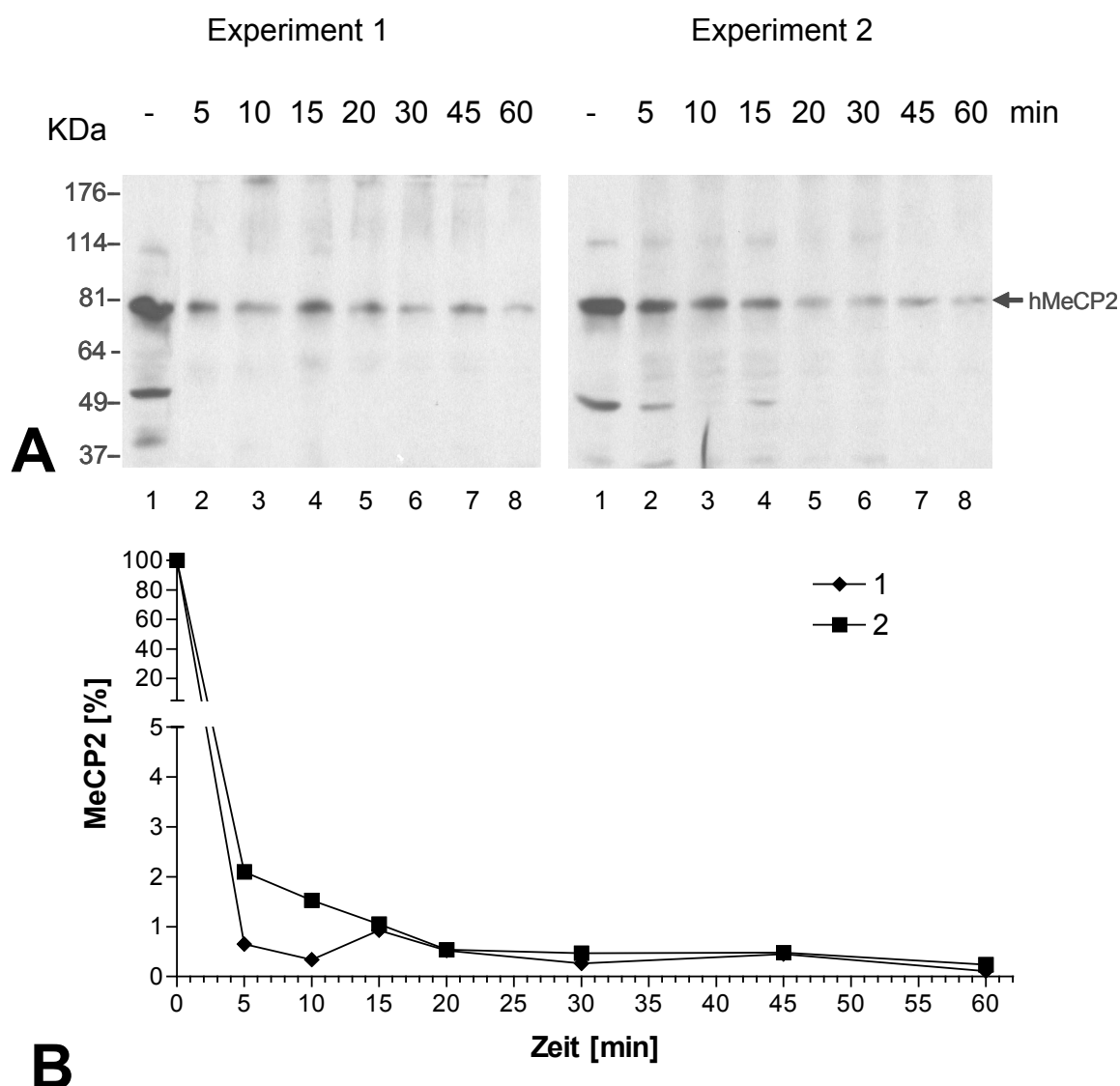


Abbildung 13: Kinetik der *Crosslink*-Reaktion. A: MCF-7-Zellen wurden nicht behandelt (Spuren 1) bzw. mit 1 % Formaldehyd für 5 bis 60 min (Spuren 2 bis 8) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und deren Proteine im Westernblot mit Anti-MeCP2-IgY detektiert. B: Quantifizierung der gezeigten Westernblots mit Hilfe von SigmaPlot. Die Signale un behandelter MCF-7-Zellen wurden jeweils als 100 % MeCP2-Menge definiert. Es wurde die MeCP2-Menge in % in Abhängigkeit der Inkubationsdauer dargestellt. Die aufgetragenen Daten repräsentieren zwei unabhängige Experimente (1 und 2).

des unvernetzten MeCP2 (Abbildung 13 A, Spuren 1 und 2). Mit DNA vernetztes MeCP2 kann nicht in SDS-Polyacrylamid-Gele einwandern, daher wurde davon ausgegangen, dass die Vernetzung von MeCP2 mit DNA bereits nach fünf Minuten fast komplett war. Nach zehn bis 60 Minuten war MeCP2 nur noch schwach detektierbar (Spuren 3 bis 8). Nach zwei Tagen war MeCP2 kaum mehr nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Um die Vernetzung von MeCP2 mit

DNA in MCF-7-Zellen zu quantifizieren, wurden die Westernblots digitalisiert. Die einzelnen Bandenintensitäten wurden mit SigmaPlot analysiert und jeweils auf die Intensität des MeCP2-Signals unbehandelter MCF-7-Zellen normiert (Abbildung 13B). In zwei Experimenten wurde eine schnelle Abnahme des freien MeCP2 deutlich, so dass bereits nach fünfminütiger Inkubation mit 1 % Formaldehyd 98 % (Experiment 1) und über 99 % (Experiment 2) des MeCP2 vernetzt waren. Längere Inkubationszeiten bis zu 60 Minuten führten kaum zu stärkerer Vernetzung von MeCP2. Um die Revertierungsreaktion nicht zu sehr zu „belasten“, wurde die Inkubation mit Formaldehyd künftig auf fünf Minuten begrenzt. MCF-7-Zellen wurden fünf Minuten mit 1 % Formaldehyd inkubiert, die vernetzten Zellkerne präpariert, freie Proteine mit 1 M NaCl extrahiert und die Kerne durch 2 % Sarcosyl in 0,1 M NaCl lysiert. Die Lösung wurde kurz sonifiziert und durch Zentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Gleichgewichtsdichtegradienten aufgetrennt. Protein bandet bei einer Dichte von 1,2 g/ml, DNA-Protein-Komplexe bei ca. 1,4 g/ml und DNA bei 1,55 g/ml, daher ist eine Trennung gut möglich. Die DNA war vor der Vernetzung mit Formaldehyd durch 24-stündigen Einbau von radioaktivem [*Methyl*- ^3H]Thymidin markiert worden. Nach der Fraktionierung des CsCl-Gradienten wurde der relative DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen im Szintillationszähler und der relative MeCP2-Gehalt im Westernblot gemessen (Abbildung 14).

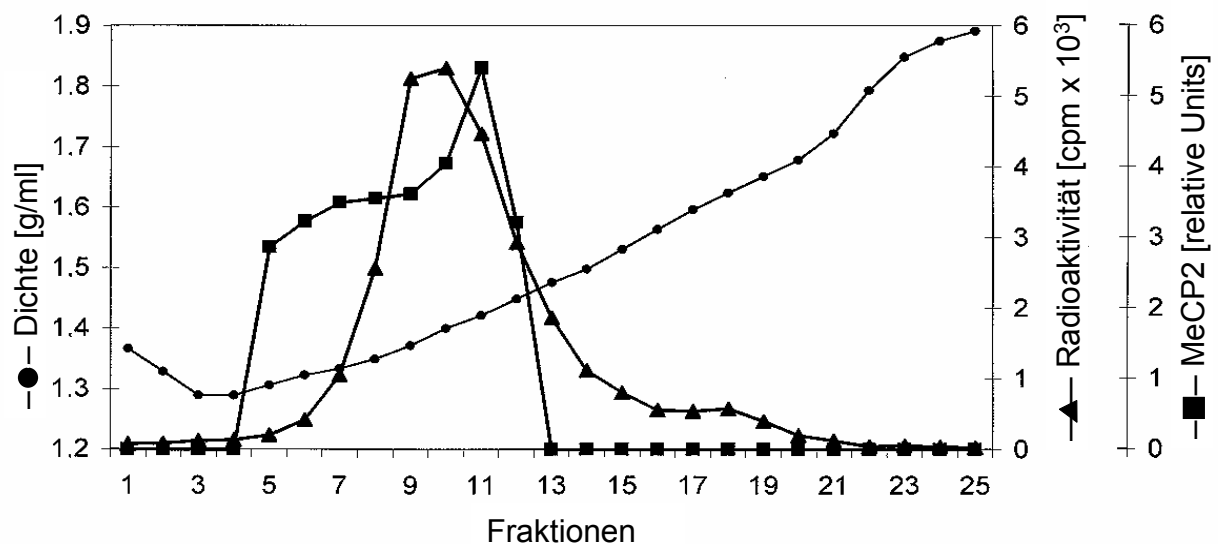


Abbildung 14: Dichtegradientenzentrifugation von Formaldehyd-vernetztem Chromatin. Von Formaldehyd-inkubierten MCF-7-Zellen wurden Kerne präpariert, lysiert und DNA-Protein-Komplexe über einen CsCl-Dichtegradienten gereinigt. Der Gradient wurde von oben fraktioniert. Die Dichte (●) wurde refraktrometrisch gemessen. Der MeCP2-Gehalt (■) wurde aus Westernblots mit Hilfe des Programms SigmaPlot ermittelt, der DNA-Gehalt (▲) durch Flüssigszintillationszählung gemessen.

Nach thermischer Reversion der Formaldehydvernetzung wurde MeCP2 in den Fraktionen fünf bis zwölf gefunden. Das detektierte MeCP2 kann nur von DNA-Protein-Komplexen stammen, da ungebundene Proteine zuvor entfernt wurden. Der MeCP2-Gehalt stieg bis zur Fraktion 11 bei einer Dichte von ca. 1,4 g/ml an, um im weiteren Verlauf des Gradienten stark abzunehmen. Bei dieser Dichte war in den präparativen Gradienten eine gallertartige Scheibe sichtbar, die aus konzentrierten DNA-Protein-Komplexen besteht. Da sich die Dichte der MeCP2-DNA-Komplexe je nach DNA-Protein-Verhältnis unterscheidet, wurde MeCP2 auch in Fraktionen geringerer Dichte nachgewiesen. Die DNA-Menge stieg ab Fraktion 6 an, erreichte ein Maximum in den Fraktionen 9 und 10, um sodann kontinuierlich abzunehmen. Im Dichtebereich von 1,5 bis 1,7 g/ml lagen in den Fraktionen 15 bis 21 geringe Mengen freier DNA vor. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurde die Fraktion 11 ausgewählt, die die gallertartige Scheibe umfasste und in der sowohl der Gehalt an MeCP2 als auch der an DNA hoch war. Die Scheibe wurde in TE durch Sonifikation gelöst, unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der klare Überstand dieser Zentrifugation wird im Folgenden *Crosslink*-Fraktion genannt.

3.3.2 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation von MeCP2-DNA-Komplexen wurde mit einem polyklonalen Antikörper aus Kaninchen (Upstate) durchgeführt. Der selbst hergestellte Antikörper aus Huhn ließ sich nicht an eine Matrix koppeln (siehe 3.1.1) und konnte daher für die Immunpräzipitation nicht eingesetzt werden. Für die Immunpräzipitation von DNA-MeCP2-Komplexen wurde die mit Lachssperma-DNA/Protein-A-Agarose vorgereinigte *Crosslink*-Fraktion eingesetzt. Nach Waschen und Eluieren der immunpräzipitierten DNA-Protein-Komplexe wurde die Vernetzung zwischen DNA und Protein durch thermische Behandlung revertiert (Solomon und Varshavsky, 1985).

Um die Effizienz und Spezifität der Immunpräzipitation zu analysieren, wurden die Präzipitate sowie deren Überstände auf ihren MeCP2-Gehalt untersucht. Die Proteine wurde durch eine Phenol-Extraktion von der DNA getrennt, mit Aceton aus der organischen Phase präzipitiert (Kuo und Allis, 1999) und im Westernblot analysiert. Die Immunpräzipitation wurde zur Kontrolle auch mit einem unspezifischen Antikörper (IgG) aus Kaninchen oder einem Anti-Sp1-Antikörper anstelle des Anti-MeCP2-Antikörpers durchgeführt. Die entsprechenden

Immunpräzipitate bzw. Überstände wurden analog aufgearbeitet und ebenfalls im Westernblot analysiert. Zusätzlich wurde die *Crosslink*-Fraktion (Input) und ein Totallysat aus vernetzten MCF-7-Zellen aufgetragen (Abbildung 15).

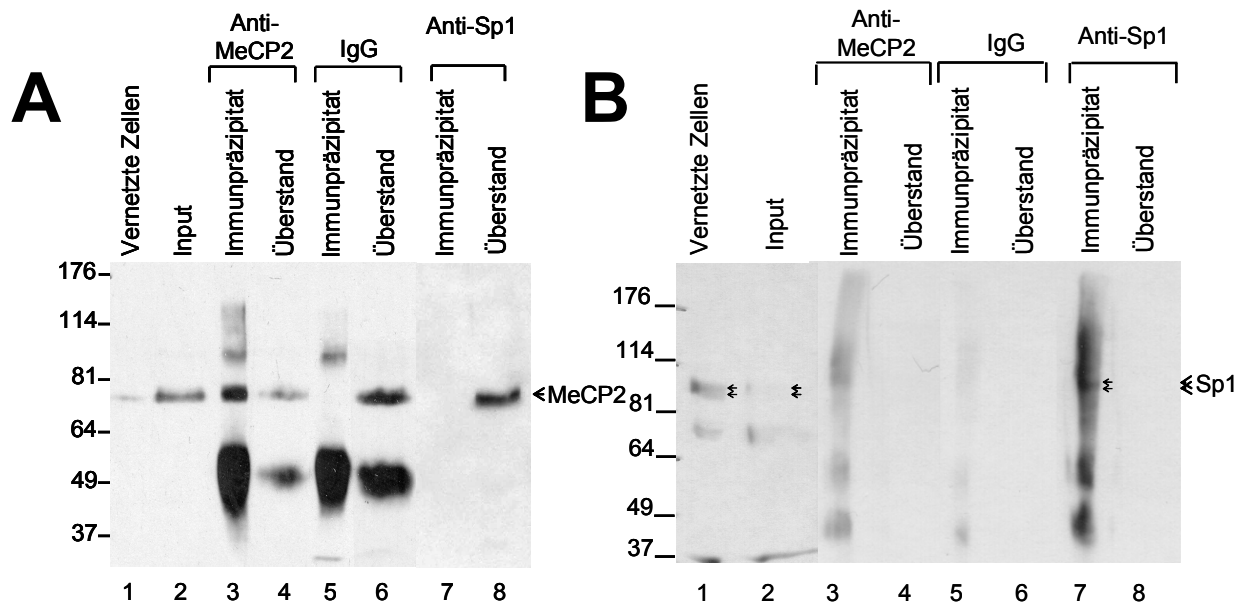


Abbildung 15A: Effizienz und Spezifität der Chromatin-Immunpräzipitation. In Spur 1 sind Formaldehyd-vernetzte MCF-7-Zellen, in Spur 2 die *Crosslink*-Fraktion als Input der Immunpräzipitation, in Spur 3 die Proteine des Anti-MeCP2-Präzipitats, in Spur 5 die Proteine des unspezifischen IgG-Präzipitats und in Spur 7 die Proteine des Anti-Sp1-Präzipitats aufgetragen. In den Spuren 4, 6 und 8 sind die Überstände der jeweiligen Immunpräzipitation aufgetragen. Die Detektion des Westernblots 17A erfolgte mit Anti-MeCP2-Antikörpern, die des Westernblots 17B mit Anti-Sp1-Antikörpern, HRP-konjugiertem sekundärem Antikörper und dem ECL-System.

Die mit dem Anti-MeCP2-Antikörper erzeugten Immunpräzipitate (Spur 3) wiesen eine starke Anreicherung von MeCP2 bei 79 kDa auf (Abbildung 15A). In demselben Bereich wurde MeCP2 in der *Crosslink*-Fraktion (Input, Spur 2) und in den vernetzten Zellen (Spur 1) detektiert. Im Überstand des Anti-MeCP2-Präzipitats (Spur 4) wurde nur eine sehr geringe Menge MeCP2 detektiert. Der Anti-MeCP2-Antikörper detektiert das C-terminale Epitop der Aminosäuren 465 bis 478. Dieses Epitop steht also trotz Formaldehydvernetzung bei der Chromatin-Immunpräzipitation überwiegend zur Verfügung. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es für den Antikörper unzugängliche C-terminale Epitope gibt. Solche Epitope können naturgemäß nicht präzipitiert werden. Erst nach der Reversion der

Vernetzung würden diese wieder zugänglich und dann im Überstand detektierbar. Der verwendete Antikörper ist ein polyklonaler, der unterschiedliche Affinitäten zu MeCP2 aufweisen kann. Dies könnte ein weiterer Grund für die nicht ganz quantitative Chromatin-Immunpräzipitation von MeCP2 sein. Der Vergleich von Spur 3 mit Spur 4 zeigt, dass die Chromatin-Immunpräzipitation von MeCP2 sehr effizient war. Nach Immunpräzipitation mit einem unspezifischen Antikörper (IgG) (Spur 5) bzw. mit Anti-Sp1-Antikörpern (Spur 7) wurde im Präzipitat erwartungsgemäß kein MeCP2 detektiert. MeCP2 befindet sich bei diesen Immunpräzipitationen im Überstand, dementsprechend wurden in den entsprechenden Spuren (6 und 8) starke Banden bei 79 kDa nachgewiesen. Dies zeigt, dass die Immunpräzipitation eine hohe Spezifität aufwies. Die höher molekularen Banden in Spur 3 und 5 sowie die niedermolekularen Banden um 50 kDa in den Spuren 3 bis 6 sind wahrscheinlich Antikörperbanden der für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper.

Zur Kontrolle, ob die ChIP mit Anti-Sp1-Antikörpern ebenfalls funktioniert, wurden die Westernblots auch mit Anti-Sp1-Antikörpern detektiert (Abbildung 15 B). Das mit dem Anti-Sp1-Antikörper erzeugte Präzipitat zeigt auf der Höhe von 95 und 106 kDa schwache Sp1-Banden (Spur 7). In dem dazugehörigen Überstand wurden keine Sp1-Banden detektiert. In dem Anti-MeCP2-Immunpräzipitat (Spur 3) und dem Immunpräzipitat des unspezifischen Antikörpers (IgG) (Spur 5) wurde kein Sp1 nachgewiesen. In den Überständen der beiden Immunpräzipitationen (Spuren 4 und 6) wurde Sp1 allerdings auch nicht detektiert. Das Lysat vernetzter Zellen (Spur 1) und die *Crosslink*-Fraktion (Input, Spur 2) zeigten auf der Höhe von 95 und 106 kDa nur schwache Sp1-Doppelbanden. Diese schwache Detektion von Sp1 in der *Crosslink*-Fraktion zeigt, dass Sp1 in Zellen wesentlich seltener vorkommt als MeCP2, und es daher nur akkumuliert nach der Immunpräzipitation (Spur 7) nachweisbar ist. Im Überstand liegen die Proteine sehr viel verdünnter als im Input vor, so dass bei der Acetonpräzipitation möglicherweise Protein verloren geht. Durch die alleinige Detektion von Sp1 in dem entsprechenden Immunpräzipitat (Spur 7) wurde die Kontrolle dennoch als positiv bewertet. Die fehlenden Sp1-Banden im Überstand der Chromatin-Immunpräzipitation mit Anti-MeCP2- und mit unspezifischem Antikörper waren offensichtlich auf ein Quantitätsproblem zurückzuführen. Das belegte auch eine einfache Immunpräzipitation von MCF-7-Totallysaten im Vergleich zur Chromatin-Immunpräzipitation aus der *Crosslink*-Fraktion. Unter den gegebenen Bedingungen liessen sich sowohl MeCP2 als auch Sp1 präzipitieren (Daten nicht gezeigt).

Die immunpräzipitierte DNA wurde nach Trennung von den Proteinen mittels Ethanolpräzipitation aus der wässrigen Phase pelletiert (Kuo und Allis, 1999). Diese mehrfach sonifizierte DNA hatte keine definierten Enden, die leicht klonierbar gewesen wären. Daher wurde hier die Eigenschaft der Taq-Polymerase ausgenutzt, an 3'-Enden ein Adeninnukleotid anzuhängen. Dadurch wurden definierte klonierbare DNA-Enden erzeugt. Die mit Taq-Polymerase inkubierten DNA-Fragmente wurden in den *T/A-Cloning-Vektor pGEM-T easy* kloniert, der wiederum 3'-Thyminüberhänge bietet. Der Ligationsansatz wurde in chemisch-kompetente *E. coli* Zellen des Stammes DH10B transformiert. Der gewählte *E. coli* Stamm musste möglichst tolerant gegenüber putativen Zielsequenzen von MeCP2 sein. Der *E. coli* Stamm DH10B wurde gewählt, da er für die Klonierung repetitiver und GC-reicher Sequenzen und für die Blau-Weiß-Selektion geeignet ist (Woodcock et al., 1989). Die transformierten *E. coli* wurden auf LBamp-Platten mit IPTG/X-Gal inkubiert. Kolonien, die ein Insert im Plasmid enthielten, blieben weiß. Optisch positive Kolonien wurden mittels PCR-Screening auf tatsächlich vorhandene Plasmidinserts untersucht. Falsch positive Kolonien, in denen das Plasmid ohne Einbau eines Inserts ligiert wurde, ergaben ein PCR-Produkt von 177 bp. Sobald ein PCR-Produkt im Agarosegel eine Länge von mehr als 177 bp aufwies, galt diese Kolonie als positiv (Abbildung 16). Mit den positiven Klonen wurden DNA-Präparationen im kleinen Maßstab durchgeführt und diese mit EcoRI-Restriktionsanalysen erneut auf enthaltene Inserts untersucht. War diese Kontrolle ebenfalls positiv, wurde eine Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung durchgeführt und diese anschließend sequenziert.

PCR-Produkte von Bakterienklonen

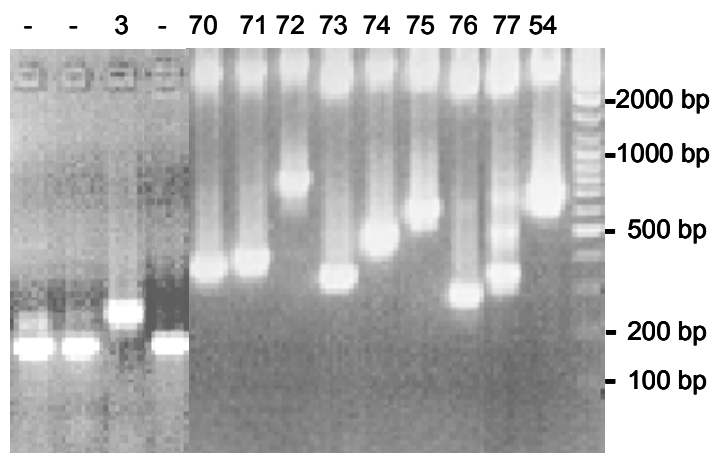


Abbildung 16: PCR-Analyse ausgewählter Bakterienklone: DNA-Fragmente einer ChIP von MeCP2 wurden in den *T/A-Cloning-Vektor pGEM-T easy* ligiert und in *E. coli* transformiert. Die MCS des Vektors wurde mit T7- und SP6-Primern amplifiziert.

3.4 Analyse sequenzierter Klone

Es ist bekannt, dass MeCP2 ein Repressor ist, der an methylierte DNA bindet. Bislang war jedoch unklar, welche Zielsequenzen MeCP2 *in vivo* bindet bzw. welche Gene durch MeCP2 negativ reguliert werden. Die Chromatin-Immunpräzipitation mit Anti-MeCP2-Antikörpern lieferte eine Bibliothek, die mit MeCP2-gebundenen Sequenzen angereichert war. Von dieser Bibliothek wurden 155 Klone mit einer Gesamtlänge von knapp 61 Kb sequenziert (siehe Tabelle 6 und siehe Abschnitt 3.5, Tabelle 11). Die sequenzierten Klone wiesen eine durchschnittliche Fragmentlänge von 393 Bp bei einer Varianz von 35 bis 1346 Bp auf. Zunächst wurde die Anzahl an CpG-Stellen in den sequenzierten Klonen untersucht. Es wurde festgestellt, dass 141 Klone (91 %) mindestens eine CpG-Stelle enthielten (Tabelle 6). Damit war ein *in vitro* bereits definiertes Ziel von MeCP2, methylierte CpG-Stellen, in einem großen Teil der Klone vorhanden. Die bakterielle Klonierung der DNA-Fragmente führt jedoch zum Verlust der Methylierung. In den sequenzierten Klonen waren 2,52 % aller Dinukleotide CpGs, im humanen Genom ist dieses Dinukleotid hingegen unterrepräsentiert und nur mit einer Häufigkeit von etwa 0,8 % vorhanden (Lander et al., 2001).

Anzahl sequenzierter Klone		155
Fragmentlänge	Gesamt	60.958 bp
	Durchschnitt	393 bp (35 bis 1346 bp)
CpG-Stellen	Anzahl der Klone mit CpG-Stelle(n)	141 (91,0 %)
	CpG-Dichte	1,26 CpG / 100 bp (0 bis 5,8 CpG / 100 bp)
GC-Gehalt	Durchschnitt	43,1 % (29,3 bis 63,6 %)
	Anzahl der Klone über 41 % ^a	93 (60,0 %)
	Anzahl der Klone unter 41 % ^a	62 (40,0 %)
Anzahl von Klonen mit repetitiven Elementen		94 (60,6 %)
Anzahl der im humanen Genom lokalisierten Klone		117 (75,5 %)
	Anzahl intergenisch lokalisierter Klone	83 (53,5 %)
	Anzahl intragenisch lokalisierter Klone	34 (21,9 %)

^a 41 % ist der durchschnittliche GC-Gehalt des humanen Genoms (Lander et al., 2001)

Tabelle 6: Allgemeine Charakteristika sequenzierter Klone.

Weiterhin wurde der GC-Gehalt der klonierten Fragmente bestimmt. Der durchschnittliche GC-Gehalt der 155 sequenzierten Klone lag bei 43,1 %. In Abbildung 17 wurde die Anzahl der

Klone gegen den GC-Gehalt aufgetragen. Im humanen Genom liegt der durchschnittlichen GC-Gehalt bei 41 % (Lander et al., 2001). 62 Klone verfügen über einen GC-Gehalt unterhalb des humanen Durchschnittswertes, 93 Klone einen GC-Gehalt oberhalb dessen (Tabelle 6). In der Verteilung der sequenzierten Klone zeigte sich ein Trend zu GC-reichen Fragmenten.

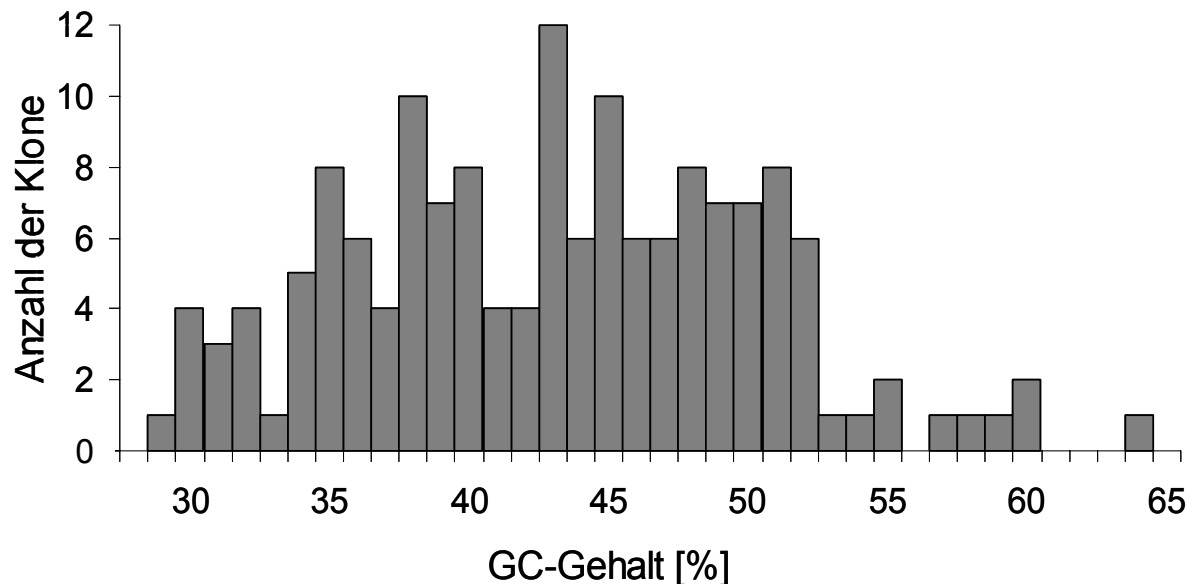


Abbildung 17: Histogramm des GC-Gehaltes der sequenzierten Klone.

In 94 Klonen (60,6 %) wurden repetitive Elemente mit dem RepeatMasker Programm (<http://repeatmasker.genome.washington.edu>) detektiert. Diese Klone werden im Folgenden eingehender betrachtet. Es wurden 117 Klone (75,5 %) im humanen Genom lokalisiert. Die weiteren Klone konnten aufgrund ihres großen Anteils repetitiver Sequenzen oder da sie zu kurz waren nicht im humanen Genom lokalisiert werden. Von den lokalisierten Klonen wurden 83 (53,5 %) intergenisch und 34 (21,9 %) intragenisch im Genom detektiert. Auch diese Klone werden nachfolgend detailliert analysiert.

3.4.1 Klassifizierung und Anteile repetitiver Elemente in sequenzierten Klonen

Über 90 % der 5'-Methylcytosine im humanen Genom liegen in Retrotransposons, ein kleiner Prozentsatz findet sich in Satelliten-DNA, noch weniger in Exons und regulatorischen Sequenzen (Riggs und Porter, 1996; Strätling und Yu, 1999; Wade, 2001). Somit ist denkbar, dass das abundante Kernprotein MeCP2 hauptsächlich ein Repressor der zahlreichen Retrotransposons ist und nur zweitrangig die Expression wirtseigener Gene negativ reguliert.

Daher wurde untersucht, ob die Klone repetitive DNA-Elemente enthielten. Die sequenzierten Klone wurden drei Klassen zugeordnet. Die Klasse I beinhaltet alle Klone ohne Transposons und Satelliten-DNA. Die Klasse II umfasst Klone, die Transposons enthalten und die Klasse III Klone mit α -Satelliten-DNA. Der ersten Klasse wurden 61 Klone (39,4 %) zugeordnet, die keine repetitiven Elemente enthielten. Innerhalb der Klasse I wurden zwei Kategorien unterschieden: diejenigen Klone, die einen überdurchschnittlichen GC-Gehalt aufwiesen (23,9 %) wurden der Unterklasse IA zugeordnet, diejenigen, deren GC-Gehalt unter dem Schnitt des humanen Genoms lag (15,5 %) der Unterklasse IB. Die Fragmente mit überdurchschnittlichem GC-Gehalt, aber ohne repetitive Sequenzen könnten aufgrund ihres GC-Reichtums möglicherweise zu CpG-Inseln gehören. Es wurden Klone, die eine hohe Dichte an CpG-Stellen aufwiesen daraufhin analysiert, ob sie Teil einer CpG-Insel sind. Zwei Klone wurden mit Hilfe der *Ensembl*-Datenbank (www.ensembl.org) in bzw. an der Flanke von CpG-Inseln gefunden. Der Klon 76 liegt angrenzend zu einer CpG-Insel. Im humanen Genom wurde der Klon 76 im zweiten Exon des PRAM-1 Proteins lokalisiert. Er ist daher kein Teil der vor dem PRAM-1-Gen liegenden CpG-Insel. Der Klon 111 liegt 93 Kb von einem vorhergesagtem und 41 Kb von dem Gen für das Oasis-Protein (BBF-2 Drosophila Homolog) und damit jeweils sehr weit entfernt. Da aber CpG-Inseln Indikatoren für 5'-Enden von Genen sind (Cross und Bird, 1995), wurde nach ESTs gesucht, die in der unmittelbaren Nähe des Klons liegen. So wurde 1,1 Kb angrenzend zu dem Klon 111 ein EST lokalisiert (ENS ESTG 00000010647). Dieses EST wurde noch nicht charakterisiert. Darüber hinaus wurde der Klon 154 als weiteres, ausgedehntes CpG-Cluster identifiziert. Dieser Klon konnte jedoch nicht im Genom lokalisiert werden, so dass keine Aussage über die genetische Umgebung des Klons möglich ist.

Die Fragmente der Unterklasse IB waren teilweise sehr AT-reich und könnten zu MAR-Regionen gehören. MAR-Sequenzen knüpfen die DNA an ein Kerngerüst aus Proteinen und bilden dadurch DNA-Schleifen, die jeweils separate Domänen darstellen (Stief et al., 1989; Phi-Van und Strätling, 1996). Es wurde noch keine MAR-Konsensussequenz gefunden, doch wurden MAR-Sequenzen neben strukturellen Eigenschaften auch durch AT-Reichtum charakterisiert (Boulikas, 1995). Da MeCP2 auch als MAR-bindendes Protein identifiziert wurde, wurden die gefundenen AT-reichen Klone mit dem S/MAR-Test (Genomatix) und dem MAR-Wiz1.5 (Futuresoft) auf mögliche MAR-Sequenzen untersucht. Dabei werden die Sequenzen hinsichtlich

Klassifizierung sequenzierter Klone

Klasse	Charakterisierung	Zahl der Klone (% aller Klone)
Klasse I	Klone ohne Transposons und α -Satelliten DNA	61 (39,4 %)
I A	GC-Gehalt über Durchschnitt von 41 %	37 (23,9 %)
I B	GC-Gehalt unter Durchschnitt von 41 %	24 (15,5 %)
Klasse II	Klone, die Transposons enthalten	92 (59,4 %)
II A	Klone, die SINE-Elemente enthalten	60 (38,7 %)
	Klone, die Alu-Elemente enthalten	50 (32,3 %)
	AluJ	18 (11,6 %)
	AluS	22 (14,2 %)
	AluY	17 (11,0 %)
	Klone, die MIR-Elemente enthalten	10 (6,5 %)
II B	Klone, die LINE-Elemente enthalten	28 (18,1 %)
	LINE-1	19 (12,3 %)
	LINE-2	8 (5,2 %)
	LINE-3	1 (0,7 %)
II C	Klone, die LTR-Retrotransposons enthalten	13 (8,4 %)
II D	Klone, die DNA-Transposons enthalten	11 (7,1 %)
Klasse III	Klone, die α -Satelliten-DNA enthalten	4 (2,6 %)

Tabelle 7: Klassifizierung der sequenzierten Klone. Die Untergruppen der Klasse II und die Klasse III überlappen partiell miteinander, da manche Fragmente mehr als ein repetitives Element enthalten.

verschiedener Kriterien bewertet. Zu diesen Kriterien zählen der Reichtum an TG- und AT-Dinukleotiden, das Topoisomerase II-Muster, die Ähnlichkeit zu einer pflanzlichen MAR-Konsensussequenz, der Startpunkt der Replikation, die ATC-Regel und die vorhergesagte dreidimensionale Struktur der DNA, insbesondere die Krümmung und der Knick. Es wurden jeweils 2 Kb-Fragmente aus dem humanen Genom, die den zu untersuchenden Klon mittig enthielten, mit den MAR-Suchmaschinen analysiert. Vier Klone (2, 49, 91 und 97) wurden so identifiziert, die in oder angrenzend zu putativen MARs liegen. Die Klone 49 und 91 liegen mit Teilen ihrer Sequenz in vorhergesagten MAR-Regionen. Die Klone 2 und 91 liegen nur wenige 100 Basenpaare von putativen MAR-Regionen entfernt. Da MAR-Regionen unzureichend definiert sind, können MAR-Suchmaschinen nur ungefähre Vorhersagen treffen. Genaue MAR-Analysen können bisher nur experimentell durchgeführt werden. Die Klone 2, 49 und 91 sind sehr AT-reich mit AT-Gehalten von 70 %, der Klon 97 ist mit 65 % etwas weniger AT-reich. Da das MeCP2-Homologe des Huhns *in vitro* innerhalb der 5'-gelegenen MAR-Region des

Hühnerlysozymgens das Motiv 5'-GGTGT-3' flankiert mit AT-reichen Sequenzen bindet (Buhrmeister et al., 1995), wurde untersucht, ob dieses Sequenzmotiv in den putativen MAR-Klonen enthalten ist. Nur der Klon 91 enthält das beidseitig von AT-reichen Sequenzen flankierte Motiv 5'-GGTGT-3'. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Klon Teil einer MAR-Region ist.

Anteil repetitiver Elemente in sequenzierten Klonen

	Länge (bp)	Anteil (%)	Anteil am Genom (%)
Sequenzierte Klone (total)	60.958	(100)	
Repetitive Elemente (total)	25.817	42,35	44,83
SINEs	10.370	17,01	13,14
Alu	9.082	14,90*	10,60
MIR	1.288	2,11	2,20
LINEs	7.489	12,29	20,42
LINE L1	5.042	8,27*	16,89
LINE L2	2.171	3,56	3,22
LINE L3	276	0,45	0,31
LTR-Elemente	2.987	4,90*	8,29
DNA-Elemente	1.574	2,58	2,84
α -Satelliten	1.823	2,99	-

* Statistisch signifikante Unterschiede (χ^2 -Test: $p < 0,00001$) zwischen Anteil der Klone und dem im humanen Genom.

Tabelle 8: Anteil repetitiver Sequenzen der sequenzierten Klone verglichen mit dem des humanen Genoms. Die Daten für das humane Genom stammen von Lander et al. (2001).

In die Klasse II wurden 92 Klone (59,4 %) eingeordnet, die Transposons enthielten (Tabelle 7). In die Klasse III fielen 4 Klone (2,6 %) mit α -Satelliten-DNA (Tabelle 7). Der repetitive Nukleotidanteil aller Klone wurde mit dem Anteil der repetitiven Elemente im humanen Genom verglichen (Tabelle 8). Insgesamt ist der Anteil repetitiver Sequenzen in den sequenzierten Klonen ähnlich groß wie im humanen Genom (42,4 % versus 44,8 %).

Bei der Einordnung der Klone in die verschiedenen Klassen repetitiver Elemente fiel auf, dass 60 Klone (38,7 %) *Short Interspersed Nuclear Repeats* (SINEs) enthielten, die die Klasse IIA bilden (Tabelle 7). Diese Klasse setzt sich zusammen aus 50 Klonen (32,3 %) mit Alu-Elementen und 10 Klonen (6,5 %) mit MIR-Elementen. Der Nukleotidanteil von Alu-Elementen ist in der erstellten Bibliothek gegenüber dem humanen Genom um 4,3 % erhöht (Tabelle 8). Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant (χ^2 -Test: $p < 0,00001$). Der recht große Anteil an Klonen mit Alu-Sequenzen lässt vermuten, dass MeCP2 *in vivo* bevorzugt an genomische

Alu-DNA bindet. Shiraishi et al. (1999b) haben *in vitro* gezeigt, dass eine derartige Präferenz besteht. So wurden unterschiedlich methylierte DNA-Fragmente oder fragmentierte genomische DNA über eine Säule mit immobilisierter, rekombinant hergestellter MBD von MeCP2 fraktioniert. Die anschließende Analyse mittels Southernblot und Alu-Sonden ergab, dass Fragmente, die Alu-Sequenzen enthielten und stark methyliert waren, am besten gebunden wurden. Der überwiegende Teil der von Shiraishi et al. (1999b) untersuchten Klone enthielt Alu-Sequenzen (28 von 39).

Die Alu-Elemente werden nach evolutionärem Alter in drei Subgruppen, AluY, AluS und AluJ aufgeteilt. Von den 50 Klonen, die teilweise auch mehrere Alu-Elemente enthielten, wurden 17 (30 %) den AluY-Elementen und 40 (70 %) den AluJ- und AluS-Elementen zugeordnet. Im humanen Genom zählen etwa 83 % aller Alu-Elemente zu der Gruppe der AluJ- und AluS-, 17 % sind der jüngeren und noch aktiven Gruppe der AluY-Elemente zugeordnet (Roy-Engel et al., 2001). Damit sind in der erstellten Bibliothek im Vergleich zum humanen Genom jüngere AluY-Elemente angereichert. Die große Zahl von Klonen mit Alu-Elementen (32,3 %) (Tabelle 7) und der große Anteil an Alu-Sequenzen, der auf Nukleotidebene hoch signifikant über dem Anteil im humanen Genom lag (Tabelle 8), deuten darauf hin, dass Alu-Sequenzen offenbar ein wichtiges Ziel von MeCP2 sind.

In die Subklasse der *Mammalian-wide Interspersed Repeats* (MIRs) wurden zehn der sequenzierten Klone (6,5 %) eingeordnet. Der Nukleotidanteil dieser Transposons innerhalb der Bibliothek ist mit 2,1 % mit dem des humanen Genom (2,2 %) identisch (Tabelle 8). Bei den MIRs handelt es sich um inaktive nicht-autonome Transposons, die früher mittels der LINE-2-Maschinerie innerhalb des Genoms transponierten (Smit und Riggs, 1995).

Die größte Klasse repetitiver Sequenzen im humanen Genom ist die Klasse der *Long Interspersed Nuclear Elements* (LINEs). Sie gliedert sich in drei Unterklassen, bestehend aus LINE-1, LINE-2 und LINE-3. Insgesamt enthielten 28 Klone (18,1 %) LINE-Sequenzen. Den größten Anteil machten 19 Klone (12,3 %) mit Teilen von LINE-1-Sequenzen aus, nur acht Klone (5,2 %) enthielten Teile von LINE-2-Sequenzen und nur ein einziger Klon (0,7 %) ein Stück einer LINE-3-Sequenz. Der Nukleotidanteil von LINE-1-Sequenzen ist in der Bibliothek gegenüber dem im humanen Genom etwa halbiert (8,28 % versus 16,89 %). Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant (χ^2 -Test: $p < 0,00001$). Der Nukleotidanteil von LINE-2-

Sequenzen in der Bibliothek beträgt 3,56 % und stimmt mit dem des humanen Genoms überein (3,22 %) (Tabelle 8). Es wurden nur kurze Fragmente älterer, nicht mehr aktiver LINE-Familien in der erstellten Bibliothek detektiert. Es handelt sich dabei um fossile LINE-Fragmente ohne Retrotranspositionsaktivität, vollständige LINE-Elemente waren nicht dabei.

Um mögliche Bindungs-Präferenzen von MeCP2 innerhalb der LINE-Sequenzen zu detektieren, wurden alle in den sequenzierten Klonen gefundenen LINE-Fragmente mit Hilfe des RepeatMasker Programms (<http://repeatmasker.genome.washington.edu>) einer bekannten LINE-Konsensussequenz zugeordnet (Abbildung 18). Die LINE-Nomenklatur wurde von Smit et al. (1995) übernommen. Auf den Namen des repetitiven Elements (L1) folgt der Buchstabe, der die Spezifität bestimmt. H steht für *Human*, P für *Primat* und M für *Mammalian*. Der Buchstabe an vierter Position gibt eine weitere Unterteilung der Subfamilie basierend auf der globalen 3'-UTR-Sequenzstruktur an. Subfamilien innerhalb dieser Gruppen werden nummeriert, beginnend bei der Subfamilie, die zuletzt aktiv war. Einige Subfamilien werden noch mit einem zusätzlichen kleinen Buchstaben charakterisiert, was darauf hinweist, dass die jeweilige Subfamilie eine Verzweigung von der evolutionären Hauptachse darstellt (Smit et al., 1995). Es wurde festgestellt, dass in der Bibliothek LINE-Fragmente aus bestimmten Bereichen der LINE-Konsensussequenz akkumuliert vorlagen. Der größte Teil der sequenzierten LINE-1-Fragmente konnte dem 3'-Bereich der Konsensussequenz zugeordnet werden. Vier dieser LINE-1-Fragmente, die der Klon 86, 157, 80 und 113, enden mit vier bis sechs Adenosinen, dem wahrscheinlichen Poly-A-Schwanz des Elements. Aufgrund des *Target Primed Reverse Transcription* Mechanismus (TPRT) der LINE-Retrotransposition hybridisiert und inseriert prinzipiell das 3'-Ende der LINE-RNA zuerst an die geschnittene chromosomale DNA. Bei einem Abbruch der Retrotransposition ist daher die Wahrscheinlichkeit am größten, dass das 3'-Ende eines LINE-Elements in das Genom integriert wird. So kam es wahrscheinlich zu einer Akkumulation unvollständiger, 5'-trunkierter LINE-Kopien im humanen Genom, wie sie auch in der erzeugten Bibliothek gefunden wurden. Ein Großteil der sequenzierten LINE-1-Fragmente wurde innerhalb der letzten 1.000 Basen des 3'-Bereichs zugeordnet. Drei der gefundenen LINE-1- und fast alle LINE-2-Fragmente liegen im 5'-Bereich des zweiten offenen Leserahmens (ORF2) der LINE-Konsensussequenz. Des Weiteren finden sich LINE-Fragmente nur dreier Klone in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) der LINE-Konsensussequenz. Eigene Analysen eines 0,5 Mb großen Bereichs des Chromosoms 1 ergaben ebenfalls eine

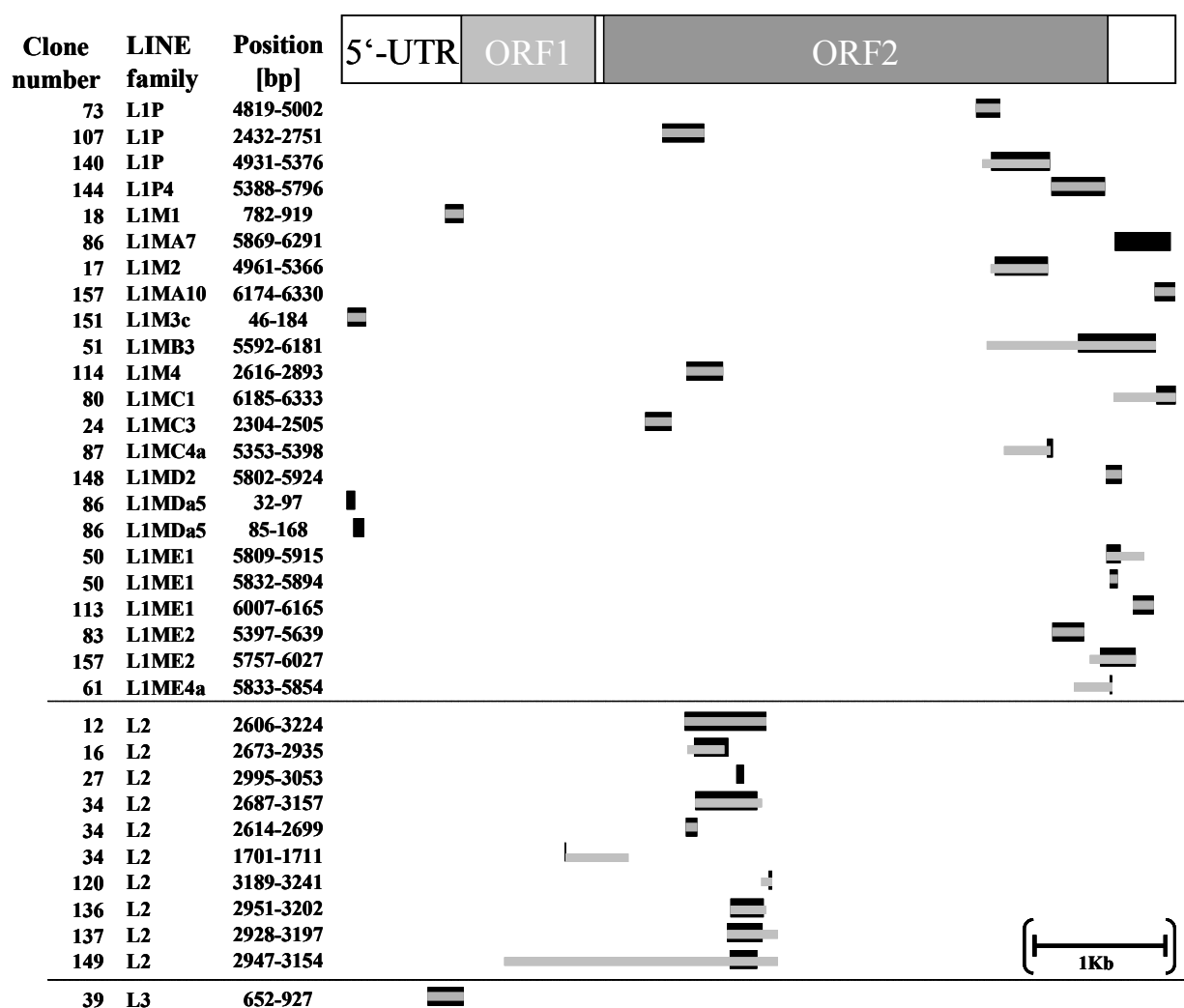


Abbildung 18: Zuordnung der LINE-Fragmente (schwarze Balken) der Bibliothek zu einer schematischen LINE-1-Konsensussequenz. Die LINE-Fragmente stammen aus den angegebenen sequenzierten Klonen der Chromatin-Immunpräzipitation mit Anti-MeCP2-Antikörpern. Die Größe der korrespondierenden, im humanen Genom tatsächlich vorliegenden LINE-Fragmente ist mit grauen Balken dargestellt. Die LINE-1-Fragmente sind nach evolutionärem Alter aufgetragen. Die jeweilige Position der LINE-Fragmente innerhalb der Konsensussequenz ist angegeben.

Verteilung 5'-trunkierter LINE-Fragmente. Es wurden jedoch mehr vollständige 3'-Enden der LINE-Fragmente gefunden. Die erstellte Bibliothek spiegelt somit nur teilweise die genomische LINE-Verteilung wider. Eine Anreicherung bestimmter LINE-Fragmente ist nicht erkennbar.

Darüber hinaus wurden 13 Klone (8,4 %) gefunden, die *Long Terminal Repeat*-Retrotransposons (LTR) enthielten (Klasse II C, Tabelle 7). Der Nukleotidanteil von LTR-Retrotransposons ist in der Bibliothek gegenüber dem des humanen Genoms fast halbiert (4,9 % versus 8,3 %; Tabelle 8). Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant (χ^2 -Test: $p < 0,00001$). Die Bibliothek

umfasst zehn Klone (6,5 %), die nur *Long Terminal Repeats* ohne kodierende Sequenz und drei Klone (1,9 %), die Fragmente kodierender Sequenz enthielten. LTR-Retrotransposons des humanen Genoms werden als Fossile betrachtet, da sie meist nur noch aus *Long Terminal Repeats* ohne kodierende Sequenz bestehen.

In elf Klonen (7,1 %) wurden Sequenzen von DNA-Transposons gefunden (Klasse II D, Tabelle 7). Die DNA-Transposons haben in der Bibliothek einen ähnlichen Nukleotidanteil (2,58 %) wie im humanen Genom (2,84 %) (Tabelle 8). DNA-Transposons sind im humanen Genom nicht mehr aktiv. Sie sind ebenfalls nur noch fossile DNA-Fragmente, die ihre Transpositions kompetenz verloren haben. Diese Sequenzklasse ist in der erstellten Bibliothek nicht angereichert.

Der Klasse III wurden vier Klone (2,6 %) mit α -Satelliten-DNA zugeordnet (Tabelle 7). Die Bibliothek enthält damit 2,99 % α -Satelliten-DNA (Tabelle 8), im humanen Genom ist der Anteil an α -Satelliten-DNA noch unklar. α -Satelliten-DNA befindet sich in den Centromeren humaner Chromosomen, ist hoch repetitiv und stark methyliert (Miniou et al., 1997). In immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit Anti-MeCP2-Antikörpern wurden diese stark methylierten centromeren Bereiche nicht bevorzugt dekoriert. Da nur vier Klone α -Satelliten-DNA enthielten, und die Immunfluoreszenzmikroskopie keine Hinweise auf bevorzugte Lokalisation von MeCP2 in Centromerregionen gab, ist α -Satelliten-DNA mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Hauptziel von MeCP2. Interessanterweise wurden keine klassischen Satelliten-DNAs in der Bibliothek gefunden. Sowohl die Chromatin-Immunpräzipitation als auch die Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe Abbildung 8) zeigten folglich keine Affinität von MeCP2 zu klassischer Satelliten-DNA. Trotz starker Methylierung sind diese Sequenzen offenbar kein Ziel von MeCP2 (Miller et al., 1974).

3.4.2 Quantifizierung präzipitierter Alu- und LINE-Sequenzen

Alu- und LINE-1-Sequenzen sind die beiden wichtigsten repetitiven Elemente, die in der erstellten Bibliothek auftreten, da sie im humanen Genom noch aktiv sind. Um die Menge der tatsächlich im Immunpräzipitat angereicherten Alu- und LINE-Sequenzen zu quantifizieren, wurde eine *Dotblot*-Hybridisierung mit der DNA des Präzipitats durchgeführt. Eine derartige Quantifizierung ist sinnvoll, um die Daten der erstellten Sequenzbibliothek zu stützen. Es

wurden zwei Sonden zur Detektion der entsprechenden Sequenzen konstruiert. Für die Quantifizierung von immunpräzipitierter LINE-DNA wurde eine Sonde aus der 5'-untranslatierten Region des noch aktiven LINE-1-Elements (L1.3) gewählt, da diese Region eine potentielle Zielsequenz von MeCP2 darstellt. In dieser Region befindet sich der interne RNA-Polymerase-II-Promotor in einer methylierten CpG-Insel (Woodcock et al., 1997). Die Alu-Sonde umfasste fast die komplette AluSx-Sequenz ohne Poly-A-Sequenz. Jede Probe wurde dreifach aufgetragen. Neben der DNA des Präzipitates und des Überstandes der Präzipitation wurde auch die DNA der *Crosslink*-Fraktion (Input) eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde jeweils das Sonden-enthaltende Plasmid und genomische DNA von MCF-7-Zellen verwendet. Da nur sehr wenig immunpräzipitierte DNA zur Verfügung stand, wurden alle verwendeten DNA-Proben mit jeweils 1 µg Träger-DNA (Vektor-DNA: pGL3basic) versetzt, um Verluste an Gefäßwänden etc. gering zu halten. Als Negativkontrolle diente jeweils 1 µg der eingesetzten Träger-DNA. Das mit einer AluSx-Sonde detektierte Autoradiogramm zeigte nur schwache Signale bei den Dots der *Crosslink*-Fraktion (Input, Spur 2, Abbildung 19). Die Dots der genomischen MCF-7-DNA (Spur 7) zeigten dagegen wesentlich stärkere Signale. Die Dots der *Crosslink*-Fraktion enthielten bereits die 10fache Menge an DNA im Vergleich zu den Dots der MCF-7-DNA. Daher war die Hybridisierung Formaldehyd-behandelter, revertierter DNA nicht mit der Hybridisierung unbehandelter DNA vergleichbar. Die Dots der Immunpräzipitate (Spuren 3, 5) und deren Überstände (Spuren 4, 6) zeigten ebenfalls deutlich geringere Hybridisierungssignale im Vergleich zu denen der MCF-7-DNA, obwohl sie die 10fache DNA-Menge enthielten. Die weitere Positivkontrolle mit Alu-enthaltendem Plasmid zeigte ebenfalls stärkere Hybridisierungssignale (Spur 8) als all diejenigen DNA-Proben, die mit Formaldehyd vernetzt worden waren (Spuren 2 bis 6). Die „raue“ Behandlung der DNA von der Vernetzung mit Formaldehyd bis zur thermischen Reversion führt dazu, dass die Hybridisierung mit einer DNA-Sonde nicht funktioniert und daher eine Quantifizierung nicht möglich ist. Die recht lange thermische Reversion der Vernetzung von DNA und Protein kann zur Hydrolyse von einzelnen Nukleotiden führen. Möglicherweise werden einzelne Basen durch Schiff'sche Reaktion mit Formaldehyd abgespalten, da Formaldehyd mit Zuckern zu Schiff'schen Basen reagieren. In beiden Fällen wäre kein gegen eine Sonde hybridisierbarer vollständiger DNA-Strang mehr vorhanden. Klonierte DNA-Fragmente wurden demgegenüber durch bakterielle DNA-Reparaturenzyme wieder vervollständigt und daher sequenzierbar.

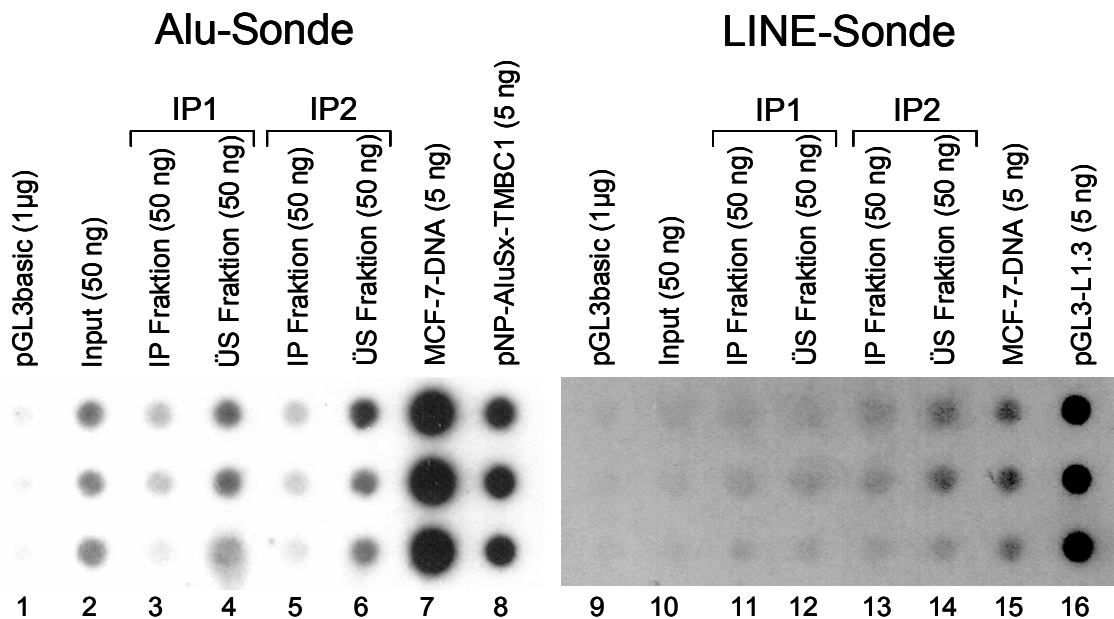


Abbildung 19: Hybridisierung immunpräzipitierter DNA mit einer Alu- bzw. LINE-Sonde. Die DNA des Inputs (Spuren 2 und 10), des Präzipitats (Spuren 3, 5, 11, 13) der Chromatin-Immunpräzipitationen mit Anti-MeCP2-Antikörpern und deren Überstände (Spuren 4, 6, 12, 14) wurden analysiert. Pro Dot wurden 50 ng DNA mit 1 µg des Plasmids pGL3basic als Träger-DNA eingesetzt. Die Negativkontrolle bestand aus 1 µg Träger-DNA (Spuren 1, 9), die Hybridisierungskontrollen aus 5 ng genomischer DNA aus MCF-7-Zellen (Spuren 7, 15) und jeweils 5 ng des Sonden-enthaltenden Plasmids (Spuren 8, 16), ebenfalls mit 1 µg Träger-DNA versetzt. Die Hybridisierung wurde mit radioaktiv markierten Sonden gegen AluSx (Spuren 1 bis 8) und den 5'-untranslatierten Bereich von LINE-1.3 (Spuren 9 bis 16) durchgeführt. Die Autoradiogramme stellen die Ergebnisse von jeweils zwei unabhängigen Chromatin-Immunpräzipitationen (IP1 und IP2) dar.

Die Hybridisierung der LINE-Sonde mit der DNA der *Crosslink*-Fraktion (Input, Spur 10, Abbildung 19) ergab ebenfalls fast keine Signale. Die Dots der genomischen MCF-7-DNA (Spur 15) zeigten dagegen schwache Signale im Autoradiogramm (Abbildung 19). Die ehemals Formaldehyd-vernetzten Proben wurden erneut in 10fachem Überschuss im Vergleich zur genomischen MCF-7-DNA eingesetzt, dennoch wurden kaum Signale erkennbar (Spuren 11 bis 14). Nur die Positivkontrollen mit dem Sonden-enthaltenden Plasmid zeigten starke Signale (Spur 16). Die sehr schwachen Signale der vormals mit Formaldehyd vernetzten DNA-Proben sind vermutlich ebenfalls auf die „raue“ Behandlung der DNA zurückzuführen. Auch hier macht die Formaldehydbehandlung den Vergleich zu Kontroll-DNA unmöglich. Die Quantifizierung der repetitiven Elemente Alu und LINE durch einen *Dotblot* immunpräzipitierter DNA war daher nicht möglich.

3.4.3 Einordnung sequenzierter Klone in das humane Genom

Um die jeweilige genetische Umgebung der einzelnen sequenzierten Klone zu analysieren, wurde versucht, sämtliche gefundene Fragmente in das humane Genom einzuordnen. Hierzu wurde die Blast-Funktion der *Ensembl*-Datenbank (www.ensembl.org) verwendet. Von 155 Klonen wurden 117 in das humane Genom eingeordnet (siehe 3.5, Tabelle 11, Stand 28.02.03). Nur 34 Klone konnten nicht eingeordnet werden. Für diese Klone lagen teilweise mehrere gleich wahrscheinliche Loci im Genom vor. Sie enthielten einen sehr hohen repetitiven Sequenzanteil oder waren zu kurz.

Von den 117 auf chromosomaler Ebene lokalisierten Klonen waren 83 zwischen Genen (intergenisch) und 34 in Genen (intragenisch) gelegen. Von MeCP2 ist bekannt, dass es über Distanzen von mindesten 1,8 Kb die Transkription von Genen reprimieren kann (Nan et al., 1997). Daher wurden die 83 intergenischen Fragmente analysiert, um mögliche regulative Sequenzen von Genen, z. B. Promotorregionen, zu detektieren. Der analysierte Bereich wurde mit einem Abstand von maximal 2 Kb zu Genen festgelegt. Eine darüber hinausgehende Entfernung macht eine Repression des jeweiligen Gens über die Bindung von MeCP2 unwahrscheinlich. Nach dieser Einschränkung verblieben die drei Sequenzen der Klone 80, 84 und 130, die innerhalb des 2 Kb-Bereichs *upstream* zu Genen lagen (Tabelle 9). Über diese Sequenzen könnte eine Repression der jeweils angrenzenden Gene durch MeCP2 erfolgen. Der Klon 84 liegt vor dem Gen für die Gamma-2-Untereinheit des GABA-(A)-Rezeptors. Der Rezeptor ist ein integrales Membranprotein, das aus einem Pentamer von fünf GABA-(A)-Rezeptorketten besteht: Alpha, Beta, Gamma, Delta und Rho. Die Gamma-Untereinheit enthält die GABA/Benzodiazepin-Bindungsstelle des Rezeptors (Pritchett et al., 1989). Der am meisten vorkommende inhibitorische Neurotransmitter in Hirnen von Vertebraten ist GABA. Durch die Bindung an den Rezeptor wird ein integraler Chlorid-Kanal geöffnet und eine neuronale Inhibition ausgelöst. Mutationen der Gamma-Untereinheit sind der Auslöser für idiopathische Epilepsie, Myoklonus-Epilepsie und fiebrige Anfälle (Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001). MeCP2 könnte durch die Repression dieses wichtigen Gens eine Rolle bei epileptischen Erkrankungen spielen. Die Klone 80 und 130 liegen nah an vorhergesagten Genen, über deren Funktion bisher nichts bekannt ist.

Analyse immunpräzipitierter Fragmente in putativen Promotorbereichen

Klon.-Nr.	Genbeschreibung	Entfernung [bp]
80	vorhergesagtes Gen	1995
84	Gamma-2-Untereinheit des GABA-(A)-Rezeptors	1475
130	vorhergesagtes Gene ähnlich zu Phospholipase C delta	1902

Tabelle 9: Intergenische Klone im Promotorbereich von Genen. Dargestellt wurden nur Klone, die innerhalb eines 2 Kb-Bereiches *upstream* von Genen lokalisiert wurden.

Von den 155 sequenzierten Klonen wurden 34 im humanen Genom intragenisch lokalisiert (Tabelle 10). Transkriptionelle Repressoren beeinflussen die Genexpression über die Bindung an den Promotorbereich. Es wird jedoch diskutiert, dass MeCP2 über die klassische Repression von Promotoren hinaus weitere Funktionen haben könnte. Durch *Expressions-Screening* und *Far-Western*-Experimente wurde MeCP2 als Bindungspartner der WW-Domänen des Spleißfaktors *Formin Binding Protein 11* (FBP11) identifiziert (Bedford et al., 1997). FBP 11 ist mit dem *Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle* (snRNP) U1 assoziiert und an der Brückenbildung zwischen den Donor- und Akzeptor-Spleißstellen beteiligt (Koa und Siliciano, 1996; Abovich und Rosbash, 1997). Über die Funktion der Interaktion von MeCP2 mit FBP11 ist jedoch noch nichts bekannt. Daher wurde in der Nähe der intragenisch lokalisierten Klone nach Spleißstellen gesucht. Bei 16 Klonen wurde in einem Bereich von maximal 2 Kb eine Spleißstelle lokalisiert. Von sechs Klonen war die Spleißstelle weniger als 200 bp entfernt (Klon Nr. 20, 78, 79, 99, 112, 145). Vier dieser Klone liegen in Exons bzw. teilweise in Exons. Eine funktionelle Bindung von MeCP2 in Exons wurde bisher nicht beschrieben. Nguyen et al. (2001) zeigten in humanen Krebszelllinien, dass MeCP2 an methylierte CpG-Inseln in Exons binden kann. Diese Bindung von MeCP2 in Exons interferierte jedoch nicht mit der Transkription des entsprechenden Gens. Zwei der Klone sind in Introns lokalisiert, jedoch handelt es sich um kleine bis sehr kleine Introns, so dass eine Funktion von MeCP2 beim Spleißen von RNA eher unwahrscheinlich erscheint.

Analyse sequenzierter Klone in intragenischen Bereichen

Klon-Nr.	Donor-Spleißstelle (Kb)	Akzeptor-Spleißstelle (Kb)	Intron	Exon
3	130	48	2	
6	13,5	4,1	4	
9	1,2	6,6	8	-
19	21,8	10,7	2	
20	0	0,2	-	6
23	32,1	1,1	10	-
25	54,9	95,4	1	
35	1,2	2,2	4/5	5
36	12,6	27,1		
37	1,6	2,0	6	-
43	6,7	7,0	1	
49	13,0	11,9	3	
58	11,0	1,3	1	-
71	3,6	6,1	5	
76	0,7	0,5	-	2
78	0,3	0,04	5	6
79	3,4	0,02	1	-
81	26,1	6,1	4	
87	17,1	18,7	2	
98	1,6	10,5	5 oder 6	-
99	-	0,2	-	12
103	7,5	2,4	1	
112	0,9	0,2	4	-
119	227,3	56,2	16	
125	1,1	4,4	9	-
132	14,6	8,0	1	
133	4,5	3,9	1	
138	1,2	3,9	4	-
145	0,1	0,1	5	5
146	111,8	28,1	1	
152	1,6	3,6	1	-
155	9,2	10,7	3	
156	57,9	169,2	2	
158	4,7	15,5	1	

Tabelle 10: Analyse intragenischer Klone. Die Abstände der sequenzierte Klone zu Donor- bzw. Akzeptorspleißstellen wurde mittels der *Ensembl*-Datenbank analysiert (www.ensembl.org).

[illegible]

						AGAAGAAGGAAAAATAGCTGACTAAATACAGACTTTCATCCCACCTGCTTGGTGCCAGAGT TAGAAGGATAGAGTTGACTGCCAGAGCCCATCTGGGCTGATTGCATTTACAGCTTAGGAGAG AAGGAGCCAACTCTGGGCTGGGGGTGGGGCACCAGGGTCTGAGGGAAGCAGCAGTGTCT TTAAGCATTTTACCATCTGTTTCTCGGGTGTAGTGGGATGCGGGGAGGAACATCTTAGTGCA TGCTGCCCTCCCCACCTCCTCTTTGCAGAAATTGAAAGTAACACT
13	1279	47.46	20	12q24.32	MER20 (MER1 Type) 294-479 MER91B (MER1 Type) 1176-1232 (102-158)	Telomeric region
						ACCATCTGATATAATAACCTATGCAATTTTCTCTT CG AATAGCAATGAAAAATAATGATTA CAATAGTGGATAATGTCATTATCCTGTAGCATCCATGCCATGGTGTAGAAAGCATGAGTGCAG CG ATAGAAAGGAGTGGGGTGGGTTCCTCCCA CG CACTGAGAAGAACTGGTGGGGGAGG AC GTCTGCTTGGCCCTTA CG CTGACATTTTGTATGGATAAAAGGGCA AC GTCTCCCTTCCCT TGGTACATTCACGT CG CTCAGCAAAATTTAGAGCTATTGTGACCAAGGATTTCTCAGTCTC AGCACTATTGATATT TC CG GGGG CG GGGTGGGGATATTTGTGGTGGGGAGTTCTGT CG GT TTTGGGATGTTTGTGGTGGTCCCTGCATTTCTGCCATTTAGGTGCCATTTCCCTGCCCTGAAA ACTGACAAACCAATGTCTCAAGACACTGC CG ATGTGCCCTGGGCTGGAAGCCTTGGTCTA GAATAAGCAGATCAAGATCTGTGTAAACCCCATTAGGAAGGAACACAGTGAACACTTT CG AA ACCAATAGTCTTGGCTTCCATGCCTAGGGCCCTGCAGAAAGGGCTCTGTCTTCTGCTCACT TTGCCCAAAAGTCACTGAGTCTTTTCTTTGCAAGGTCTGGGCCCTGCTATTTTTGTAGCA ATGATGTCACTTTCAGGGTGGGGCTAAGTGTAGTGTAGTGTCTTACTATTTTCTTCTTCT TTACTCATATTGTTTTTAAACCCCTGTGGACCTTAGAACCTGACATTTATATGGGTCTTGCA AAAGTCATAATGGAGTTTTCATCCATGATAGGGTCAGGGAAGGGTGCATGGGGGTTTGGGG TGGCTACAGCAGAGGAGCACCTTGGGCAGGCACTCCCAAGAGGAAGAGAACTGAAGACCA TGGATGTCCCCCACTCTGTGAAGCTTGAGAGTTCT CG CCCATGAGTGACCCAGCCAATAT CCACCTGAACAC CG CAC CG GGAGGTGCTAATATGATGCCATAGATTGTGCTTTATACAGATGC AC CG TGATCAAGATGGTGTGTTCCTCAT CG TAGATGGTGTAGCTTTGAGTGTCTAGTAAAGC AGCTTAGTAGAGGTGGCAAGACAGTGTCTGTCT CG TATATCAGCAGATGATTTGTCTTG CTAACAGATGG CG TAAAGATTTTGCAGAAAGGGGTCCCTTTGTCTAATTCATAGTTGTAAAT AGACAGGGTAGTAATGGCCAC CG GTCACTGAATGTATT
14	669	47.23	10	12q24.33	Charlie (MER1 Type) 302-512 (46-283)	Intergenic telomeric: (61 kb) predicted gene
						ATGCTCAGATG CG GTGTTTATAGCATCTGCTGGAAATACAGGAG CG CTGTG CG ATGTGCTCT GTTTAGGAGGGCT CG GTGTTGTTGAAATAGGGGCGAGCTGAGTCTTTGAAACAGCTGGCTCTC TTTCTAGTCCCTCCAAAGAGGCACAGT CG AGTCTCCAGACAGCTGTTTGTGCTGCAACCTC TGTACCTGGACAATACAGCAATCAACCTCTCAAGAAACAGGCATTTATTGTACCTCAAC AGGCCACTTTTGCACATGATTTACTTCTGATGAACAATTTTCTTGAACAATATAT CG TTTT GTTTGTATTGTCACAGGGATTTTAAACATCCCAAGCAAAATGTTAAAAAATTTGAAGAGTTTCTGG ATTTTTCAGCAGGTCTAGAAAAATCCAGAGATCTGGCACTGACAGC CG GCATTTCCCACTGG GAAGGCTCTAGAGCCTAAGAAATGGATGTGTCTCTGAGAGGGTGCAGC CG CCACCTCC CG CTCTCACAGCTGCAGGGCATGGTCTTCCAC CG CTTCTTACCACCTCTCTCTCTTCT ACCTGCTCTTGCATTT CG CACTCTGTTTAAATGGCTCAGAAATTTACATGGATGGCTCTG AGTCCAGCTAGCTTTGCAGCTCTCAGCATTTCACTCTCAATTTACAAG
16	546	44.32	4	8q22.1	LINE-2 85-346 (2673-2935), MIR 455-546 (35-133)	Intergenic centromeric: (426 kb) predicted gene telomeric: (450 kb) predicted gene
						AATACATTTAGGATTTCTTAAACAAGGAAGAA CG GGAAAAATTAACAATCTTGCAGTGTCTT GCTACAGAGGGCATGAGACACTCAGGAATTTCAAAATATTCAGTATGTTTGAATATAAAGA AGAAGATTGGAATGAAGTGAATGGAATTAAGGTCAAGCCAGATCTTGTATGGGCTTTTAA AGTCACCACTGAGTTTGAATTTCTCTCTGAAGCAATGGGAAGCTATTGTACCAATTTGTA GCAGGGAATGACACAAT CG ACTGGAAATAAAGTCTGGATTATTTATGAAGAATGAATGG ATGGGACAAAGATTAAAGACAGAGGGCATAGGAACATAGGCATGCTCTCAAGTAAATCA GATGGTTTCCACATGACTTGCAAATAATATATACTAGCTAACTTTACT CG AATTAGCTCA TGCACCTTCA CG ATAACCTGGTGAGGAACTGAGACACAGAGGTTAAGTAACCTGCCCAAA GTTTAAAGTTATGCGAGAGTTGGGGCTGAAACTCAGGAAGTCTGTCTCTC
17	743	39.43	3	18q12.1	LINE-1MA4 1-403 (4961-5366), AluJo 408-708 (6-305)	Intergenic telomeric: (150 kb) NEURAL- CADHERIN PRECURSOR (N- CADHERIN).
						CCTATCTATTACACACACAAAAGTCAGATAAAATGGATTAAAGACTTGAATCTAGGATCT GAACTATGAACTACTGGAGAAACATTTGGGAAATACTCCAGGACATTGTAGTGCA AGATTCTTGTGTAGAGCTCAAAAGCACAGGTAAACAAAGCAAAAATAAACAACTTGAATTT ATATCAAGCTAAACAGCTTCTGCACAGCAAGGAAACAAATCAACAAAGTGAACAGATAACCC ACAGAAATGGGAGAAATATTGCAAACTATCCATCACAAGAGATTAAATAAACAAGATTGACA AGGAGCTCAAGTAATCAATAGCAAGAAATAGATAAATCTGGTTTAAAAATGTTGCAAAAGAT TGAAGAAGACATTTATCAAAAGAAGACATACAGGCTGGCATGGTTGCTCATGCTCTGAATCCC AGCACTTTGGGAGGCTGAGGTGACAGGATCACTTGAGCTCAGAGTTTGAACACAGCTGGG ATGGAGTGTGACCTGTCTCTACAAAAATTTAAAAATTAAC CG AGGCAAGTACATCA GTCTGTGCTTCTAGCTACTCAGGAAGCTGAGGTGGGAGGAT CG CTTGAAGCCAGGAGTTCAA GTCTGCAGTAAGCCATAACTGCAACACTGCACTTCAAGCTTGGGTGACAGAGTGAAGTCTGT CTCAAAAAAAGGGTTCAATGAATGAGGCATCTCACTCAAGTTGG
18	169	47.93	0	-	LINE-1M1 32-169 (782-919)	-
						GTTTAAATTTGCTTCACTGCTTGCATTTTGGCTCATCAGTTAGCAGGTGATGAATGCTGC CAGGACTGCATTTCTTCTTCAAGCCAGCAGGTCTCTCTTCTGGCCAGGGTGATCTAGAAA TATCATCTAGAGCTAGTGCCTGGAAAGGAGTCTCATGATTCTG
19	319	49.22	5	20q13.32	AluSx 45-319 (1-275)	In intron 2 of RAS-RELATED PROTEIN RAB-22A. Size of intron: 33 kb
						AATGATACAGCATCTTTAAACATAGTTTAAAAATATATATATAGG CG GGGTGTGGTGGCTC ACACCTGTGATCCCAAGTACTTCTGGAGGCCAAGGCAAGTGGATCACTTGAGGTCAAGGATTTC AAGACCCAGCTGGCCAAATATGGTAAACCTGTCTTACTTAAATAACAAAATTAAGCAGG GTGTGGTGG CG GGTAT CG GTAAATGCCAGTACTTGGGAGGCTGAGGAGGAGTCACTTGA ACCCAGGAG CG GGTGTGAGTGAGCAAGATCATGCCATTGCATCCAGCTGGG CG ACAG AGTGAGACT
20	631	37.40	5	10q21.1	-	In exon 6 of predicted gene with homology to INOSITOL POLYPHOSPHATE MULTIKINASE. Size of exon: 0.8 kb
						AGAGGATTCAATTTGTCTAAAAATACT CG AAGTACAGAAATTAATGCTTTAGCCCATAAACA TATCCCTCATCTATTGTGTGTAGGGAACACATGAGCAAAATCTATCATTT CG CACTTCTAC TTCAGCAATCTTTGGCAACAGTGGGAAGATGGTAGAAAATTTTTCAGTTGGGAAAGTA CATTTCCAAATTAATGTCTGTGACATGCTTTTCCACCAATTTGCTTGTCTCCAGATTTTCA ACTTTCAATGAAGTCTGACTGTGATGCTTTTGTATATATTTTCTGTGA CG GCATACAT CTTGACAAAGCTTTTGGCCACTGAAGACTCTATTTTCCATTAGCTGTGGAATTTAACACAT GAAAGTTATTTGTACTCTAGTACTTCTGTGCTGACAGTTTGTCTTTGGCAAAAATTTT TCTGCCAAAGTCTGTCTCATTTCAATTTTGTAGTGGTTGGCTGAGATGAACCTTCATAAACAAA GAGTAATGAACTT CG TAAAAATTAAGTGTCTTGTGGTTTCAACCACTGCAGAAATTTTCT CAATCTCTGAATCTGGCAGCAACAGCATCTTTTCTTAAGCAGTACCAATTTATGAAAAAT CTGGAGACTCC
21	359	51.25	10	-	AluSg/x 29-257 (307-83), AluY 258-359 (249-148)	-
						TATTCATGGTGTATATATATATACACTTTCCTTTCTTCTTCCCTTTTCTTGTAGT CG G AGTCTCTCTCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCATGATCTTGGCTCACTGCAACCTCTG CTCTCTCAGTT CG AGCAATTTCTCTGCTCAGCTCCCAAGTAGTGGGATTACAGGTGTGT GCCACCA CG CCAGCTAATTAATTAATTTTCTTTTGGTGGAGTCTCACTCTGT CG C CCAGGCTGGAATGAGTGAC CG CACTCT CG GCTCACTGCAACCTCCATCTCC CG GGTTCA CG C CATCTCTGCTCAGCTCC CG AGTAGCTGGGACTACAGGTGCCACC
22	282	52.13	2	-	LTR52 (LTR/ERV.L) 27-274 (3-291)	-
						ACTCCTCTGAAAGGGATTACAGACCAATAATAGAGAGTCTGGCTCCAGTTCTGATGATTGACT CTTG CG TTTGTAGTCCCTACCCATTTCTTTTCCCTTGTGTGGCAGCACTAGCCAAGCTCAT CTGAAAGCC CG AGTTTCCCTCTTAGGCTCCAGTGGAGATTCAAACCTCAGCCCTCAACCA CAGTAAAAACCCAGAGCTAGTCTTCTTCTTCTGCTCATCAAGTCATTTTGGCCCTGTCTGGA GGGGCTGCTTGTCTCTCACCAGAGACTGTGTC
23	561	41.89	3	14q23.2	AluSq 1-243 (59-300)	In intron 10 of predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> POTASSIUM CHANNEL EAG2 (FRAGMENT). Size of intron: 33 kb
						GATCACCTGAAGTCAGGAGTTCAAGACAGCTGGCCACATGGTGAAGACCCATCTCTACT AAAAATACAAAAATCAGCTGGG CG TGGTGGTGCCCACTGTAAATCCAGCTACTCAGGAGG CCAAGGCAAGAAAT CG CTTGAAT CG GTAGGTAGAGATTGAGTGAAGTGAAGTGTGTTGCCA TTGCACTCCAGCTGGGCAACAGAGTGAAACTTTGTCTCAAAAGAAAAAAGAAAGCAAA CTCAGCTCTTAATTTACAAAAATTAAGTGGTTTAACTAAGCAAGATTTGGCAAGCTCTTTG CCATTTTCCCAATGCTTCCCTGAGTGTCTCCCATTAACGGAACTATTTGTATAATAAC

							TCTATTTCATATAGCCACAAAGGCATGGTTATAAGGACAGTATCTCAGCAGATAGCAGGGTTCTCAGCCAAATGATAGATATAATTCAGGATGAGCTTAGAACCTGTAGTTAAAGTGCAAGCTTTAGGTCAAGTTAAATCAACTAATGCTAATCTCAGCACATGCAGCAAAACAGTACAGAAGTCTGTTC
24	431	39.91	8	-	-	AluSp 1-233 (80-313), LINE-1MC3 234-429 (2304-2505)	CAAGACCAGCCTGACCAACATGGAGAAACCCCGCTCTCTACTAAAAATACAAAATTGGCCGGGGTGTGGCCATGCGCTGTAATCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCCCTTGAAACCGGGAGACCGAGGTTGCAGTGAGCCAGATTTCGCCATTCGACTCCAGCCTGGGCACAAAGAGTAAACTCTGTCTCAAAAAAAGAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAATTGATAAAATTAAAGGGGCTTAACATAAGATGAGACTTCAGTTAATTACAATGATTAACCTTCACTTAAACCGTAACAAATATCTATACCAAGTGAAGATGTTAATAAAGGGGGAAATGGTACAGGATATATGAGAAATCTTACTGTCTTAACAATTTTCTGTAAATTTAAAAACATTTGT
25	158	43.04	1	4q23	-	In intron 1 of TRANSMEMBRANE 4 SUPERFAMILY, MEMBER 8 (TETRASPANIN 5). Size of intron 150 kb	TAGAACCACATAGTAACAGTGGTGGCAAGGAGATGTCATTTGTAGACTGCATATCGGCATCTGTACTACAGTAAGCTCTCTAATCATTTTACCTACTAGTTTCTTTAGACTCCCCCTACCAGGACATTTTGCTTTACAGCTTTGTCAATCTTAGGAACA
26	304	46.71	7	10q26.2	-	Intergenic centromeric: (422 kb) DEDICATOR OF CYTO-KINESIS 1 telomeric: (33 kb) PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASE EPSILON PRECURSOR.	CTGGTGACCAAGGCGCTGGTTTACTACCGCTGCAGCTGGAGAAGGACCTGAGGCATAGGGATGTCTGTGAAACCTGAAATGCCCATGTGGGGTAGCAGTGAGGAGCGCGTGGATACACAGGTATATTTTCCCGCTGTGTAGGGCGCGCAATTTCTGTGTTTGTATACCGCTTGCTGACATATGTCTTCACACTGCCAAAGACCTGAAAAATAATGACAGCACTGATTAGAAATTTTCAGACAAATGTCTTAGTTTAAAGCAAAAAGAAATTTGTTTGTAGTGACAGGTTTCAGACCATGAAGTT
27	573	51.83	3	15q24.3	-	LINE-2 9-118 (2995-3053)	CACTCCCTGTGTGTTCCCTCACTAACCCAAAGTTCCCTTAAAGGCAGAGACAGACCTGCTGGTCTCAATACCGATCCAGATGTCTTGACAGCTGCTGAAATTAACACTCAAAATATCTGACTCATTCCTCTCATGTTCAATTTGTCTACTTCCCTCAATCTGCTGAAATCCAGGTCAAATATGTGCACCAATCCCAATATGAGACCAAGCTGAACATCTTTGGAAGCCATTTGTAGTTCTCTACATGGTCGATGAACCGTCTGGTGAGGGAGAGGGGCAGACAAGGATTGGGTGGGCACAATTTCTACATGACAGCCATCTGCTGCCCTTTGGGGGCCAAGACATGAGGCACAGCTCGAGAGAATAAAGCAAGCCATTCACATTTCTGCTTGAGGTGGAAATGCAGTCTTTGACAGCTGGCTGAGAAGTACCATGTGATGCCCAAGCTGCTCCCAAGCTGCTGTCGCCAGGTCCTCAGTAGCTCAAAACCCAGAGCCCACTCTTGTTGTGAGACAGGCCCTGGCCACTGTTCTCTCTTGGGGCCAGAGACTCCCTCAGCCTCCC
28	493	37.73	5	-	-	MER69 (MER 1 Type) 27-206 (2505-2309), AluJ 219-377 (159-2), MER69 (MER 1 Type) 379-488 (2337-2222)	CAGGCGAGGGGCTCGAAATATGTGGGTGAGGCTCAAGACTCATACACTGGAGTGCTCTGTAAAGAGACGATAGAAAAATCAACAAGTAAAAATAGAAATCAAGCAGATAATTCAATGGAAAAATCATTTAGAAAAATATAAGTATTAAAGTTTGACAAATACCAAAATATCACAAAATTCACAAAAAGATATATCTTTTAAATTTATCTTTTAAATAGTTTTCATTTTGTAGAGGTGAGATCTGTGCTCTGTGCCAGGCTGGAGTGCACTGGCATGACCGTAGCTCACTGCAGCCTTGAATCTCTTAGGCTGTGTGGATCCTCCCACTTTGGCCTCCAAAGAGCTTAGGATTACAGACCGTAGCACTGCACTGGTCAGAAAAATAATAATATTTTGTGTAGTTAACTCCCTGCCATACCTCTGTAAATGGCTTCTTAAATGGTAGGGCGCATACTTTAGGAATGCTGATTTATTTGATAACAATTTTCAGAT
29	852	47.65	7	4p14	-	MER91A (MER1 Type) 65-111	CTAAGGCAGCATCTGACAAATGGAATAGACGGGAATGGTGCAAGGGTTTGTAGGTGACTATGTTAAGGCCCCCAGTAAAGGTCTTGGGTTGTGTACTGCACAAGAGCGCATATATTAACCTTATCCAGAAATGTGAAGGCCAGAATCTCTGGTTCACAGAAAGCAGAAAAATATACTCTCTCTGAAATATAAGCCACAGTATACATAAGGCCATGCGTATACTTGGAAAAAGTATGTGCTGTGTGAATCACTTCCCAAGCATCCCTGAAAGTTACTGCTCCCACTCAGAGGTCTGACTCATGTCTACAGACTCCAAACCTTGCTTCTTTTCCCTGTGGCAGGAGGGTACAGATAGCAGACAGTATATCAAGCTACTGACACTGTGAAACCAACCGTTGGGGAGGGGGCAGGTTGTTACAATGTGGGACAGAAATGTGTGATAAGAAATGTGTGTGCAGCCCAAGGAAGCTTCCCAAGGACCTGGAAATCCCCCCAATTTCCCTTACCGCAAGGTACAGAGCTGTCTAGATTAGGCCACAATATCATATAATACTAAATGGTGGAGGGGCACTTTTGGCCAATCTCAGGGCCCCCTGAGAGTTGTAAGGATTGAAATGATCACTGAAGGGAATGGGAGAGCTGTCCAGCATGTGCATGCTGTGCATCTGAGGGGATATAGCTGGGACTGCAGCCCATGAATTTTTCATGGGCCAATCTGCAGGATTGAGTGATGTCTGTGACCGCATCTGGAACCTCAGAGGTAGAAATGGAGAAGGCAGTTTAGGAATAAGATCCATGGTTAGGGTTTTCAGGAAGGAGCCTGATATTTAGAGGCTTTTC
30	647	43.28	12	2q32.3	-	AluSg 164-463 (298-1), AluJ 478-607 (133-1)	GGGGTAAAGTAGCCTTAGCTTTTGTATGCAATCTTAACCTGTAATATTTTCAATGAATTTAGTTCAGTTTGAATAGAAAAACAATTAAGCAGCTGCTCAGACTACATACCTTTGAAAACTTTGCCAAATTAACCTTACCCTAATTTACATTTTGAATTTTACTTTGCAATTTTCTTTTCTTTTGTAGTCTGGAGTCTCGCTCTCGCTCTGCGCCAGGCTGGAGTGCAATGGCGCGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCACCTCCAGGTTCAAGCAATCTTCCCTGCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGTGCTCCCGCCACGCGTCTGGCTAATTTTGTATTTTGTATTTTGTAGTAGACAGGTTTTCACCAATTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCTGACCTCATGATCTACCTCCCTCCACCTCCCAAGTGTGEGATTACAGGTGTGACACTGTGCGCAGCCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTAAAGAGATGAGGTCTTGCTATGTGTCCAGGCTGGTTCAACTCTCTGGGCTCAAGAGATCTTCCCTACTCTGATGAGGTAGGTGGGACATAGGGACATGTCACTGCACCTGGCTTACATTTGGAATTTAATTTGAGCTGTGTTCACTGTTAGT
31	740	45.95	10	6q23.2	-	AluJo 1-126 (127-1)	TTTTTTTTTAAAGGCAGAAATTTCACTATGTGTCAGGCTGGTCTCAAACTCTGGGTTCAACGAATTTGGCCTGCCTCAGCCTCCCGAAGTGTCTGGGTAACAGGCATGAGCCGACGCGCCTGGATTTTACTTGTATGGGAATCTTACAAGGATGGGAAGGAGAGAATAGTATATGAAGCAATGAAGTACATTTTCCAGCTTGGCATCTCCAGATTTCAAATAAGTACTTACACAATCTCTGTAGATGTCAAGATTTAGAGTGTTTTATCGGCTGACTTGTCTGGCTTTCCCTATAAACCAACTGACCTACATATAAAATGTGTTTAAAGTGCCATTAAGATTTAATCTCTCTGAGTGAGTCAAGATGAACCTCAAGGTTATTCAACTCTAAAGAGACATAGGGCACCTGAGAACAGGGAATAGCTTCGATGAACCAAGCAGATGCAATCAACACACATCAAAATGAGAAACACCTATGAGCCATGAGAGAGGACAGTCAAGTTTCTTCCCTTGAGAAGGCTGGATGACATCCCGCTGTGTGCTTTTCTGGTCCAGAGAAGAGCGTCTATATCCAGAGTACAGGAGATGAGTGTCTCAGAAAGCTCAGGCTGGTGTCTATTGACTCGTGGGTCCAGCCAGCAAGTGTCTTAGGCATCTTTGCTGAGCTTCTGTGCACCAAGTGCTATGCTCCAAGTTGGAGATTCAAGATGAGCAAAACAGATGT
32	928	48.81	21	20q13.13	-	LTR45b (LTR/ERV1) 3-135 (461-331), MER72 (LTR/ERV1) 351-434 (479-398)	CACTGACTGATGCACTGGAACCAATACTATAACACAGGGTTTGTAGAAAAAGAAAGCTTTTCTATTGTCAATTTAACCAGCAAGGACACAGGAGTCCAGCTCAAAATTCGTCTCTGTGCTGGCTTTTAGGAGCAGTCATTTCTATCAAAATAGAAATTAAGTCTTGAAGAGGACCGCCCTCCCAAGACCCCACTTACTGTGTTTTCCTTCAACACAGCCCACTGAGCGCGGTTAGGGGGTGGATTCTGGGATTAGAAAGGTGATTGGTGGAGGAAAGGAGAGGGCTGGAAGTCTGTTGGCATCGCGAGTTACCCCTTCACTGCGCCTATGGGTTCCATATACAAATTCGAGGAGAGTTAGCGTGAACCGTGGCTGGGAATTCGCTGTGACATCAGCAAGCTCATCTGTGCAAACTCCAGGTGGCCATATCGGTCCAAACCGATTTACGCCAATTTAATCTCGCAAGCAAGGGAGTTCTGCCATCTGTAACCTGAATTTGTGTAGTTATTTGTTTCTTAACTCTTTTGGGCAAGGTTTCATTCGTGACTTCAACACAGGAGTGGGAGGCAATCCCATTTGATGCACTCTGGAAAGCTGTGTGGGGTGAGCCATGSCACAGGCTGGACGCTCCAGGACCTTGGTCCCATGACACATGAGGTCTGTTCTCGGAAGGCCCCAGCGTGGGCCCTGTCCAGGCCCGCCACTGTGTGTGGCGTTTATTGTCAAGCTGTCTTCTATCAAGGTTCTTATTTGATTTGGCCAGGCACTGGCAGCTCCGAGAACACATGGGATTTTTCAAATTTGTTTGTATTCTATCAACAAAGCTGGATTCAGACTGAGAT
33	342	45.32	7	2p25.2	-	Intergenic telomeric: (342 kb) SIPL PROTEIN	AAACACTAGTTTACATTTGAGCCAGTGAACGCTCTTCTTACAGAAAAAGGCACTTTGGAGCTTAAGATCAGGAAGCTCTTTGCTTTTGTAGTGGTCACTCGTTGATGACCTTGGCTCTGGTTG

[illegible]

46	186	41.94	4	-	Alpha Satellite 1-185	-	CGTTCAGTTCACAGAGTTTCACCTTTCTCTTCATAGAGCAGTTTGGAAGACTCTGCTGTGA AAGTCTGCAAGTGATTAGTTAGACCCCTTTGAC CG CTTCGTGTGGAAG CG GGATTTCTCATTT ATCGCTAGACAGAGAATATCTCAGTAAATCCTTTGTGTGTGTATTCAACTCACAGAGTGC
47	151	34.44	0	2p21	-	Intergenic telomeric: (8 kb) predicted gene centromeric: (1 kb) CALMODULIN.	AATGGGCGAGTAACCTGCCAAAATAATGAATTAACCCCTGGGAATTAAGACCTCTGTAGCTAT AATAACCAAGGTAACAATTAACACTCAATGTTTTAATCTTGGCTCTGTTTGCATATGGAATCTT TCATTAAGCATTTAAAGGTACTTTAA
48	89	40.45	0	Xp22.11	-	Intergenic telomeric: (56 kb) predicted gene centromeric: (34 kb) predicted gene with homology to <i>Fugu rubripes</i> LINE 1 REVERSE TRANSCRIPTASE HOMOLOG.	ATCCCTTATCTCTACTCCTGCTGAAAAACAAGTGATACAGTAAACTGCAGCTGTGTCAAGCAG AATTTCTTCTCCCTCTTCAAAGAAGAC
49	226	30.09	2	12q21.2	-	In intron 3 of predicted gene; at the border of a MAR. Size of intron: 25 kb	ATTATGTGCAACCATGACCTATGTTCTATTAAAGCCCCACTGTTAC CG ATAACAAAAAGAGGG CCTTTATAAATCAATATCATAGCTTTAATTATTTATAGCAATTAAACATAC CG TAAAAACACAT AGACTGTTATAGCTTTATAATAAACACAAATATCTTTTCTTGACCATAGCATAATAGAAACT AAGCTCAGAAGGATTTATCTAGGAACA AAAGAAGGAAATT
50	209	41.15	3	7p22.2	LINE-1ME1 1-105 (5915-5809), LINE-1ME1 106-166 (5894-5832)	Intergenic telomeric: (113 kb) predicted gene centromeric: (195 kb) predicted gene.	TTATTTTCAGAAATACACATAAATGGCTACATGCAGTATGGAGCTTTTGAACCTGAGTCCC TTAC CG TGGTATAGTGCATCTGCACATGCATGTGTTGTCATGTTTGAATCTGACTCCTTT CACATGGCATAGT CG CTGTGACACATGCATGTTGTTGCATGTTTGAATCTGACTCAATGG CATAGCAC CG TGTGACACATGTAT
51	694	38.33	8	2p25.3	LINE-1MB3 1-568 (5592-6181)	Intergenic telomeric: (83 kb) RED CELL ACID PHOSPHATASE 1, ISOZYME F (LOW MOLECULAR WEIGHT PHOSPHOTYROSINE PROTEIN PHOSPHATASE) centromeric: (66 kb) predicted gene.	AGAAAACATAACATAGAAATCCCCACAC CG ATCCAGTAGTGCCACTTCTGGTTATATACTGAAA ATAATTGGAAGCAGGAACCTTGAACAGATGTGTGCCAACACAGTGTCTCAAAACACATATTTTACA TGGTATTTAAGGGTAGAAACCACTTAAATGCTCATCTCAAC CG AATGAACAGATAAACCAACA TGGTGTTATACACACAGGGAATATTATTACAGCTTTTAGAAAAATGAAGCTGTGATACATACT CAACATGGATGAATCTTGAAGAG CG CTACATTACGTGTAAGAAGCCAGGCATAACATATGTGA TT CG TGCAAGATTCTCCATAGAGGAGTCAAAATCACAGACAGAGAAAGTAGAATGAAGGGCTG CAGGGGTTGGGGAGTGGGGAGAGTGTGATGGTTTACAGATACAGAGTTGTACTT CG GAA AGATGAAA CG CCCTGGGGGTGATAGTGGGGCTGATTGCACAGCAATGTGAATGAACTTAA TGCTGCTGAAGTGCACACCTAAAAATGGTTACAATGATAAATATTATGTAATATCTATTATT ACAGTAAAAATGAGGGCTTTCTCAAAATACTATCAAACTACTCTGAAGGTATTTTCCACATT GCACATACATAAAGTGTGTGTTTAAAC CG TACAATATTATGTGACAGACATTTTGGCAAT TCTTCTCGTAT
52	222	36.04	4	8q24.21	AluY 185-222 (308-271)	Intergenic centromeric: (143 kb) predicted gene telomeric: (165 kb) predicted gene.	ACTGGGAGCTGAGCTGCTGTTTAGTAATTTAAATCCTTTCCATTGTTTAGAGCTCAGCACCT TTTGTCATCTCATATTAGCACTTCATTTT CG TATCATTTGTAATTTCTCACTCTCTGCTACT GCAATGTATGTCTACAGCTGACAAAGTCTTCTCTGGGAGCCCTAC CG TAGCTCTTTTTTTCTT TTCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGAC CG GAA
53	336	42.86	5	16p13.2	-	Intergenic centromeric 303.7 kb ATAXIN 2-BINDING PROTEIN.	AAAAGACCCCTCTCTCATTAATGCAGGTGTGCAAGAGATACCTGAATGCCAC CG TAGAAGG AACAGACCCCTGCTCCCACTTAAGCTCCTCAAGAACAAAGTCTCTTAAGCAGACAGACAGAT ACAGAAAGCAC CG TCACTCTAGAACAACATAAAGACCAAC CG CTGTCTAAGAGAACAGCAG GAGCCATCCACAGATTAAAGGTCAAGCTTTAGACTGTAC CG AAACCAAGAGGAAG CG CTCCTGG CATCAAGAACACAAATTTTAGACTCAGACCCCTCTGATCTACCTTTCTCATATGTAATAATG ACATAATAAAAGCATTTATTAAAT
54	596	45.13	22	-	-	-	TCCAACACATCAGCTCCT CG TAGTATAGTGGTGAATATCCCGCCTGTCA CGCG GGAGAC CG GGGTTCAATTCC CG ACGGGAGAAAGCACTGCTTTTTTTAGGGTGAAAAATGTAGCTATGA GCCCAACAAAG CG AAAAATATGCTTTGGAGATGAAGCTTTATGATAC CG ATTTCCAGCCTCTCT CTGTATTCCAAGGCATTGGTTGTTTCAGTGGTAGAATTTCT CG CTGCC CGCG GGAGGCC CG CTT CG ATTCC CG GCCAATGCAGGATGTTTGAACATGTAATTT CG AGAAGATGCAAACTCC TGAGGAATAAATCTATGTT CG ATTGCCAGGCCAACAGAAATCTCTGATCTTGGT CG AAATCT CAAC CG ACTCTTGATAAATCAGACTTTGCTTCACTTTTCAGTTTGGACATTTACTCATTTCTC AGGAGACTTTGGTGAATCCATTGTAGATGTCCAGTGTGAGGTGATTTACTTTTGTGAAGG CTTTAGTTGTTAAATGGGAA CG AGAAACCAACTGTGCTATTGACAATGCTCTGAGTTTGAC ATTGTGTGACAATGTCTCGGCATCCCAACACT CG TC
55	277	42.96	6	7p14.1	-	Intergenic telomeric: (81 kb) INHIBIN BETA A CHAIN PRECURSOR (ACTIVIN BETA-A CHAIN) centromeric: (179 kb) ZINC FINGER PROTEIN GLI3.	GGTAGGGAAAAGGTGGCTCTGTCTCAATCTTTGCCATCAACAAGTATTTTAAATTCATGT CG CTAAATGTATAAAAAGGACAGCAGCTCTCGGGCTCAATGTGCTGCTGCTCATTTTATTTATG AGAGTTAGCATTTCTTTGTCTAGAGAAAGGGGAACATGGGAAGGAAATGA ACCG CTTTTGG CG CT GTGTGGGCCATT CG TGGGCATTGCCATGACAGGCTTGCATGG CG AAT CG TGAGACTTTAATA ACAAGAGCTTTGATTTGGATTTTAATTTT
56	361	42.94	3	14q13.1	HERV16 (LTR/ERV) 252-361 (1-109)	Intergenic centromeric: (80 kb) BASIC-HELIX-LOOP-HELIX-PAS PROTEIN telomeric: (43 kb) EGL NINE (<i>C.ELEGANS</i>) HOMOLOG 3.	ACACTACATTCAAGTCCCTGATAGACAGAGAATGGAATCTGACACTTGGGGTGGGGATATC TGAGTAGATACACTTGAAACCAATGTAATCCACAAATTTCACTGAAATCTTTGAGTCTGTAAA AGTTTCCCTCTATTAGAAGAAACACTCAACCTTCACT CG AGAACATGCGAATCTTCAAT GGAGGCAGGTACCTTATAGGACAATGCTGTGCT CG CTCAGAAATCTGTTCCACATCTCATTT GAACCAAGACTAGGTGCAAACTCAGCTGAGCTGGCC CG ACTACAGAGTTTAGATCTACTAAG GGATGAGAGGGTTGAACATTGAAGAAGCTGCAGGAGCTGGCCAAAGGTGTAC
57	145	48.97	1	6q23.3	-	Intergenic centromeric: (26 kb) INTERFERON-GAMMA RECEPTOR ALPHA CHAIN PRECURSOR Telomeric: (248 kb) predicted gene.	CCAAACTGAGCCACAGAAGTGTCTAGTGTGAAAAGAAAGTGSATGATGGATCAGGACATAAGA CTCTGAGAAACCCCTAGTCAAGATAAAAAGACCTGTATCCAGGGTTGGAGCAGAAGAGACCA CAGGTGCAGCAGG CG GGGATG
58	261	50.96	2	8q22.2	AluSx 56-260 (1-205)	In intron 1 of RING FINGER PROTEIN 19 (DORFIN) (DOUBLE RING-FINGER PROTEIN). Size of intron: 13 kb.	ACTGGGGAGGGGAAAGAGTGGGGGGAAGTACATGTGATTATAAGAGACAAACACAGGCCAGG CATGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGACACTTTTGTGGGG CG AGGTGGGCAGATCACTTTGAG TCTCAGGAGTTCAAGACCGCTGCTCAACATGATATATGTTGGAGAAATGCAATGAATCTTTAACT AAAAATTAGC CG GGAGTGGTGGCACACACCTTTAATCCCACTACTTTGGGTGGCTGAGGCAG AATGCTTGAAC CT
59	143	34.27	3	-	-	-	TTCTAGTTC CG ACAATCTAGTAATGACCAATGAGTAATCTAACTTAACTTCCAAACTAC TACCTTATACACACACAAGTSTAAGGGGATAAAGATATGTACATAAAGATATATGAATGAG TGAC CG TACAGAA CG GCAT
60	271	31.37	1	4q24	MIR 1-63 (138-201)	Intergenic centromeric: (141 kb) predicted gene telomeric: (48 kb) UP-REGULATED BY BCG-CWS.	CCCTTCTACCGAAATACCCCTACTATTTTCTGCAGAGTCATGTGTATAGTTTTCCTATAT TAAGAAACCATTAATCTGGAAGGTAAATAGTGGAGACATCAGTATAAAAATATAAACACAGG TAACCTTGTGTAAGAACTGTAATCAAAATATATATGTTGGAGAAATGCAATGAATCTTTAACT TGAAATGGGGATGTGAAAATTAC CG TGTTATTCCTTTTATATTACAGCAATGCTATGAAGCA GATGCTATTATCCTATTTTGT
61	624	60.42	15	4p16.2	MLT2E (LTR/ERV) 151-624 (16-473), LINE-1ME4a 604-624 (5833-5854)	Intergenic telomeric: (210 kb) SYNTAXIN 18 centromeric: (108 kb) HOMEOBOX PROTEIN MSX-1 (HOX-7).	GGAGGCTGAGGCATTGTATC CG GATGATCA CG TTGCCACACTTGGTGCGAGACTCAGAGG TGTGTGGTGGGCTT CG CGCTGTCCTTACTGTCTGCTCTCTGCATCTAGCTCATCTTCCCA GTGACAGCCGCTTCTGGCAAAACATCAGCCCAAGCTGCCACTAGGAGCTTGGTT CG GGGAGC TTGGAAGGGGGACAGCTCCCAAGAGGAGCCAGGTTCTCCAGGCTCTCAGCCCTCAGGTGCGCTT CTCCAGAC CG CTAC CG CTTCTTGGATTGTTCTGCAAACTT CG CTCTGTCTGGCCCTGTGGT GCC CG GACTCTGTGTGGCAGG CG CTGAGTGATGTCCTCTCAGGTCTCAGGGTGCTCTCCCA GACCTCCCTTCCAGGTGGGCCCTCATCTGAG CG TGAGGCTAATTCCTGTAAGAAATTCCTCT

[illegible]

						METHYLTRANSFERASE).	
75	471	38.43	1	-	MER61 (LTR/ERV1) 1-151 (4956-5106), MER61 (LTR/ERV1) 152-470 (3605-3935)	-	TGGCTTCATACCTTATCAACACAGTCACTGTACAGGGTTCCTAACCTGTGGTGTAGTAAGGAA TGTCACTTTCTAACAGGCCCAGCAGCCCCATGCTATCTTGAGACCACAAGATGAGAGAATTT TACCCAACTCATAGGTATTTGAGGGTATTTGTTGATAAAAAAGAGGACTGGAGGGAGAAAA ATTATGTTTCAAAATCTTATCATATACTTGAATTAATTCCTAGTTTCTATTAGTTGTTTTAA GTTTTTGCCTACCTTTTAACTAACCTTGGCTTATTCTGTGAACCAACCACTGATCTCTGGC TGTAGTTTCAGAGAAACAAAGGGATGGGTAAATGTAATAATCTAGATCAATATTTCTCATCT GGCAATTATCTGCAAACTCTGCCAGGTAGGGTGTCTATAATCCAGAGGTTTCTTTGTTTG GAAAAATAGACCAACGAGCTAACCAAGTCAAGCC
76	121	63.64	7	19p13.2	-	In exon 2 of PRAM-1 PROTEIN; PML-RARA TARGET GENE ENCODING AN ADAPTOR MOLECULE-1 Size of exon: 1.3 kb.	AGGTCCTGGTGAGGTCCCCAAGCTCAGGCTCGGAGGCTTCTTGGGAAAGTCACTCAGCGGA GGCTGGGAGGCTTTTGGGAAAGCGCTGGAGTCCGCTTCTGCTCGCTCGCTCGCTCGCTCGG
77	182	46.15	5	2q21.1	AluSg/x 134-182 (308-260)	Intergenic centromeric: (49 kb) predicted gene telomeric: (25 kb) predicted gene with homology to <i>Fugu rubripes</i> CYTOCHROME P450 MITOCHONDRIAL PRECURSOR.	CGCGTGGCTTAACAGGGTGGGAGTCAGGAGGCTCACTGCTAGCGCCAGCTGTGTCACTCATC AGCAGGTTGGCCACGCCACCACCTGGTCTCAGGTTGGTGTCCACAACAGAAGCATCTCTAG TAAAAATTTATTTTAAATTTATTTATTTATTTATTTGTTTGGAGACGGCATCTTGCTCT
78	360	48.61	2	6q22.31	-	In intron 5 (322 bp) and exon 6 (38 bp) of CGI-130 PROTEIN Size of intron 5: kb Size of exon 6: kb.	GAAACAAGCTGGACTATCTCAGGGTGATTGAATTTTCTGCAAGCAAAAGAACAGGGAAAA ATACATTTCCCATATTGACAAGAGATATATTCAATTTCCCAAGCTTGATCCCAAGGTTCACTG GGGCTCTAGTCTACGATCTGACCCACATTCATTCAAAGCAGAAAGAGATTCAGGTCCT GGGAAGGGGCTGAAGGGGACCACTTGGCATTTCAGCTCTGTCACCCAGGTCGAACCTGAGA TAAGGATGAGACTCAGGCAAGGAATCATCAATTAGCAGAGGTAGGGGAAACTTCACCAAGC TCTCAGTGGCTCTACCAAGAACTATGGGAAACTCAGGTGTGAGAGCC
79	214	34.58	1	12q23.3	MIR 96-208 (64-198)	In intron 1 of PR-DOMAIN ZINC FINGER PROTEIN 4 Size of intron: 3.6 kb.	ACAACCTAGTTATGCAAAAAATTTACTCCAATGACTCTGTATTAGATCAAGAAACTGAA ACAGTGGGGATGGGAAATGGGACTTGGCCCACTATTTAGTTCACTTTTACGCTCAACAATTC TCTTAGATAGCTAGTGCCATATTTCTTCTACTGATAAGAAACTGAGATTGAGACATTTAAA ACTCAATTTCAATGTACATAGCAGAAAT
80	333	45.35	5	1q21.2	AluJo 19-144 (177-125), LINE-1MC1 193-333 (6333-6185)	Intergenic centromeric: (9 kb) U4/U6- ASSOCIATED RNA SPLICING FACTOR telomeric: (2 kb) predicted gene.	AAAAACAACAACAACATTTTGTGAGAGGGGAGTCTCCCTATGTTGCCAGGCTGGTCT CAAACTCTAGCCTCAAGCAGTCTCTGCTTTTTCAGCTCTCCGAAGTGTCTAAGTATAAG TTGAGCCTGCGCATGCTGTGCTGACCCACATTTTCTTTTCTGTAACTCTAGCCAAAGA CCCCTTTTATAGACTATTTTAGAGCAGTTTATAGATTACAGGCAATTTGTGGAAAGCA CAAGGAATTCATATACCACCTGCCCCACACATGAATACCCTCCCCCATTTATCATATGTAC GCACAGAACGATACATCTGTTA
81	330	43.94	2	7q21.12	MER5A (MER1 Type) 43-215 (1-189), MIR 260-319 (105-167)	In intron 4 of ADAM 22 PRECURSOR (A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE DOMAIN 22) (METALLOPROTEINASE-LIKE, DISINTEGRIN-LIKE, AND CYSTEINE-RICH PROTEIN 2) Size of intron: 32 kb.	GCAGTGAGGAGCTTCAGAAATCAGAAACAGGAGTAGTGTAAAGCAGTTGTTCTCAAACCTT AATGCAGTAAAAACCTGAAAGTTTGGCTGAATCACAGGTGGGTAGGCTGCATCTCCGAG CTTCTGAGGAGAGCTATAGGGAGGCTTGAGAAATTTGCAATTTCTAACAGCTGATGCTTTT GTCTGCAAAACCATCTTTGAGAACCATGTGTAAATTAACCTTGACTTTGTAGCAGGCATAC GTGGGTGTGGATGATCTCTCTCAGTCTATGTTTCTCACTTGTAAAGGGGGGAAATAATAC TCACCTCATCAGTCATCATG
82	610	37.05	3	10q26.3	MLT1D (LTR/MaLR) 426-548 (332-453)	Intergenic centromeric: (364 kb) BA442O18.2 (NOVEL PROTEIN) (FRAGMENT) telomeric: (232 kb) predicted gene.	CACCCATTTTCATCCCAATGTGATATATATTCATAACCACATGTAAATAAATAAATAAGTGC CATGATTAGGAGAGCGTTATATACAGATAAACACAGGGGAAATTTATGTTACCAAGGGGACT TCAGTCACAGCAATTTGGGCCATCGGATCAAGGCTCTGGGAGGGCAGGAGGGATCTTCACT TGCTGCAAGCATATGTGGATACAAACAGTTCTTTGCTTCCAAGGATCTGTCACTGGCATTTG CAGTGATACTAAACAAAGTTATTTATTTCTTTCTTTCTGTTTCTTTAGAAAATATTT ATACAAAATGTTTCTCCATCCAAATGAGCTTTGGATATTTATGCTCATCTGCATCAGAC ATAAGTCCGATTTCAATCAGTGAATGTAATGTGCAAGATGTATATTTCTCTGATTCGCT CTTAGAGCCCTAGAAGGGAACATTTTCTGCCAGTACCTTGAGTTTGGCCAGTGAGACCC ATTTCTGATTTCTGACCTCTAGGACTAAATAATTTGTTGTGTGTGTTGTTTAAAGTACCT AATATCAATGGACAGTTTATTTATTTATTTGCTGTAAGTTAAATCAAGATTCTT
83	265	30.57	0	-	LINE-1ME2 27-265 (5397-5639)	-	AGGAATTAGCAACTGAAGGGTTCAAAACTTTTATAGTCATTAGAAAAGTACAGTTTAAAA CACACAATAATACCCTACATACATCTGGAATAGCTAAACTAAAGACTGACAAACCAAG TGTTGGTAAGGATGTGGAGCACTAAACTCTCATACACAGATGTTAGAAAATAAAATAGT ATAGTCATTTAGAAAAGTTGAGCAATTTCTTATAAAGTTAAACATACACTGATCATGATGAC CTAGCAATTTCTACTCT
84	456	37.72	3	5q34	AluJo 160-340 (1-311)	Intergenic centromeric: (168 kb) GAMMA- AMINOBUTYRIC-ACID RECEPTOR ALPHA-1 SUBUNIT PRECURSOR (GABA(A) RECEPTOR) telomeric: (2 kb) GAMMA- AMINOBUTYRIC-ACID RECEPTOR GAMMA-2 SUBUNIT PRECURSOR (GABA(A) RECEPTOR).	CTTAAGGCATTTAGACAAAAATCCAATGAAACACATTCAAATGCAGTTTGTACTTCTTTC CATTTGTGACTAAATGGAGGCAGAGCAACATATCCCTTTTATATAAGTCTCTTGTCTT TTGCTGCACCTGAGGATTTTCCCTCTCTTGTATTTTACTATTTTGTATTTATTTAA TTTAGTGACAGGCTTCTGCTCTGTGACCCAGCTGGAGTACAGTGGGACATCATAGTCTAC TGCAGCTCTGAACCTCGTGGCTGAAGCAATCTCTACTTCAACCTCTTAAGTAGTGGGAC TATAGGACTACATCACTATGACTGTCTAATGTGATGCCCCCTCTTATGTTCAAAATTTTAT TCCAAAGAGCTAGTTTGTATTATAGCTCTATATTTTCTTAGTGAATTTTCAATACAC TTTGTAGGCTAAGATGTGTGT
85	290	48.97	3	-	AluJo 1-237 (49-290), AluJ 253-290 (5-42)	-	GAGGTAGGAGGATGCTTCAGCCTAAGAATTCAGGACCAGCCTGAGCAACATAGCGAGACCT CGTCTCTACAAAAAATAAATTTGCTGGATATGGTGGCATTAGCTAGTAGTCCAGCTGCTC CAGAGGCTGAAGTGTGAGGATCACTTGAGTCCAGGAGTGCAAGGCTGCACCTGAGCCTGATC ACACCCTGTAGTGAGCCTGGGCAATAGAGCAAGACTGTCTCAATAAAAAATTTTGTCTTA GGTGGGACAGTGGCTTACGCTGTAATCCAGCACTTTGG
86	886	39.50	2	14q32.32	LINE-1MDa5 1-62 (32-97), LINE-1MA7 86-499 (6291-5869), LINE-1MDa5 501-581 (85-168), AluJ 806-882 (2-78)	Intergenic centromeric: (14 kb) EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 5 (EIF-5) telomeric: (28 kb) PUTATIVE SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE P78.	SGAAGTGGAGATGTCTTTTCCCTATTCTCTCTGGTAAAGTACAGATAAATACCTGGATGTT TTTCAATTTTCAAGTTTAAATTTTATTTTAAACGATGAATAATTGTACATATTATAGG GTCCAATCTGATCTTTGATATACATTTGAGAATGAGTATCTAGCTAATTAATGTGTCCA TCACTTCAATGTGATTTCTTTGTTGGTGAAGACATTTAAATGATTTTGTAGAAATCTG AAATATACATGATTATTAATATGGTACCAGTGTGTGCAATAGATCTTGAAAAACGATTTT AAGATCTATTACTAAGTAACTAGTACCTCTGCTCAACATCTCCCCATCTGCACTACCC CATCCCCAAGCCCTGACAAACCACTTCTACTCTCTATTCTTAAAGTTGACATTTTAAAG ATTCTGCAAAATCAGTGAGATAATACAGATGTGTCTTTCTGTGTCTGCTTACTTCACTTAG CATTAAGCTTGCACATTTTATAGAAAGCAACATGAGACTCTGAAGGGTGAAGAAAGAGG GAGGCTGACTAGAGAGCTCAAGATGACTCTTAGAGGGCTCTCTTCTGGCTGTCTGTCTT CTTCTGTGACCCCCACAGGGGACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGAG AGAAGAGAAAG GAG CTAAGTGTGGTGGCTAATACCTGTAATCCCTGCTCTTTGGGAACCTGAGGCAGGAGGATTC TTGAATCCAGGAGTCAAG
87	204	50.98	10	Xp11.22	AluY 2-157 (156-1).	In intron 2 of predicted gene Size of intron: 36 kb.	CGCGCCCGCCACCAACCGCTGGCTAAATTTTGTATTTTACTAGAGACGAGTTTCAACCATG TTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCTGATCTCATGATCCGCTGCTCGGCTCCCAAGTGC

					LINE-1MC4a 193-204 (5353-5398)		TGGGATTACAGGCATGAGCCAC CG CACC CG GCCTGCTTTAGCTGCATTTCTTTAACTATTAG TAAGCTTGGGCATATTTT
88	344	42.15	4	-	-	-	CCACCTCTGCACCCCTGCTTCCCTGAGGGTGGCTTGTGGACTGCTTGTGTAAG CG TGGGATT AGCAGCTTTTCTCTGCCTCCTGAAAAACAGTCCCTGACCAGCTGCCAGCAAT CG GGGCCCT AGGGAGCCAGGGCCTAGAGCAATTGATCCTGTGTGTCAGATCCAGATGGTAACCTCAGTATTT ACCAGGTGAGCTTTGACAGGTGGGTGGAGTGGG CG GG CG GTGGGAGGACCTGCCTAGCCT CATCTAGTGCTCAGTAGTCTGGTGTGGTATGGTTCACAGGCCTCATATGTTTCAAGCTT CCAGGAAATTTAGGCTTTCAGCCTTCTCTGTATG
89	348	37.93	3	-	Alpha Satellite 1-348	-	CTGTGACTTGAAGGCAAAATCACAAGAAAGTTCTCTGAGAATGCTTCTCTCTAGGTTTATA TGTAACTCC CG TTTCCA CG AAATCCTCAAAGCTATCCAAATATCCACTTTCAGATTCCACAA AAAGAGTGTTCAAAACCTGCTCTGTAAAAAGAAAGTTTATCTCTGTGTTAGTTGAATACACAC ATCACAACAAAGTTTCTGAGAATGCTTCTGTCTAGTTTTTATGGGAAGATATTTCTTTTTC AACATAGGCCCTAAAG CG CTCCAAATGTCACCTTCCAGGTAGTGCAGAAAGAGTGTTCAAA CCTGCTCTATAAAAGGGAATATTCAACTCTGTGACTTG
90	268	51.59	8	-	AluSp 1-192 (193-1), MER2 (MER2 Type) 194-262 (70- 2)	-	CTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGAATTACAGGCATGTGCCATCA CG CC CG ACTAATT TTGTATTTTGTAGTAGAG CG GGGTTTCTCCATGTTGGTCAGGCTGGTCT CG AACTCCCGACC TCAGTGAT CG CCCTCCTCATCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGG CG GTGCCAC CG CAC CCAGCCAAATTTGTATATTTTGGTATCTGCAAGGGCTCCTGGAACCAATCCTCAGTTGAT ACTAAGGGATGACTATCTC
91	592	30.07	3	5q11.2	-	Intergenic centromeric: (13 kb) HEAT- SHOCK PROTEIN, BETA-3 (HSPB3) telomeric: (47 kb) SORTING NEXIN 18; within a MAR.	AGAAGAAAGAAAGAAATCACCAAGCCTCATGCTTGTGATGACCGAATCTGCAGTATTAC AGGTCACCTTTGAGGCAGAGATTCTAAAACTCT CAAGTTAAAGCTAGAGCAAAGTTAAACA GCAATCCTCTAGATAGGGAAGGTGATTTAGGGATAGAGGGAAGATAACAACTACTGT TTCAACAAAAACAGCCTGAAACCAAAATTTCCAAAGTACTTCAAAAACCTTAATGCTAAGA AAATCAAAGTAGTCCATCTTTGAACCTGAATTTCTCTCCAGATAAAATTAATATATAGAACA ATCCAATAAAGACTTTGAAAATAATATGTTTGAAGATGCTCAAGAAATTTATGCTAATTTAAA AAGAATAAGAAATGTAACAATTAGAAGAAATCTTATAGCTGTATAAATAATAGCCCGAGACT TATAGAAACATCAATGGATAGAGGTGTCTACATCTGATATAT CG TAAATCACCCCTGAAAG ATAAAATTAATAATAAT CG ACTTAATTGCTGCAAAATATTAAACAAAGTCAATAGATTA TTGTGATTAGAGGAAATTTCAATGTATCTGTTTT
92	329	29.79	1	1q31.1	-	Intergenic	CAACCAAAGTGTTCCTTTTGTCTGATTTATAAACTCAGAATCCCTCAAGAATTCAGTTAGG AAATCTTT CG GAAACTATACTATATTATGGTATCTTAGCTTTACAAATTAGATTATCTCTTA TAAAAATTTCTAATGGCCTATTACTTAATACCTTTGCACTGAAATGTTGACTCAGTACTTA AAGTACATTTCAATATGCTTTCAATTTCCAGTGAATAATCAGCATTTGATATATATAAAGAA AGAGAACACATAGTAAGAAGAAATGGTCTTCAGTCTTTACCTTTCTACTTACTAATCTGTGA ACTTAACATCATATGCTCTA
93	172	50.58	1	-	AluSg/x 1-172 (112-283)	-	CTCTACTAAAAATACAGAAAAATTTGGCCAGGTGT CG TGGTGCATGACTGTCATCTCAGCTATT CAGGAGGCTAGGCATGACAGTCAATTGAACCCAGGAGGCAGAGGCTCAAGCTGAGCCAAGA TCATACCCTGCCTCCAGCCTGGGTGACAGAGGAAGGCTGTCTCAA
94	236	43.22	4	4q24	AluSg/x 2-108 (195-302)	Intergenic centromeric: (498 kb) SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2B CATALYTIC SUBUNIT, ALPHA ISOFORM (CALMODULIN-DEPENDENT CALCINEURIN A SUBUNIT, ALPHA ISOFORM) telomeric: (135 kb) predicted gene.	TGCTTGAACCCAGGAGG CG AGGTTGCAGAGAGCAGAGGT CG CACCATTGCACACCCAGCTGG GCAACAGAG CG GGACTTTGTCTCAAAAAATAAATAAAAAAGAAACCAAGGCAAAACAAAT TAGAGGTGGATTTTCCACAAACTACCCAAATACTTAGATGTTTGAAGTTT CG GAGAAAAGG GAAAGCAGGAGAAAGGAAGAAATATTCACCTTGAGTGGTTCAGCTTTTGCTA
95	584	58.56	5	-	-	-	CATTGAATTTCCCATTTCCAACTCATCCCCCAGTTCTTCCCTGAGCCCTCTTCCATCCCC CG GCCTCAGCTGTCCCTTTCTTCCACACCCCTCTCCTGCCTCATCTGCCC CG GAGCCTTTTCCA TTGCC CG CAGTCTCCTTCTCCTCCTCACCCCATTTTGTCTGAAGCAGTGGCAGAGATACCCCAAGCC TTTGGGGACTGATGAAGGGAGAACATCTTTTGGGGCTAGAGGAAGTGAAGTGGCTCCTGAT GGGACAAGGGGAAGTGAGGGGAGAGAGTCAAGGGGACAGGGC CG AAAGATGGTAACCCCTACCC TAGGGAGGGGTGGCCACAGCCATCAACAAAGGATTTAGTGTCCAGGCCCTGGTGAGCAAGC CAGCACTGCCTGTCTCTCCCAAACTGCCCCCTTCCCAT CG CTCTAACTCAGCCTC TGGGAACAGAGCCCTGAGGGCCCCCATCTTGATAGGGAATCCCCACCCCAACCCCAAGA AAATGGGACCAAGGCAGCAAGTAACCCAAGAGGCTACAGAATGTCTGATGGCAGAGGG GGAGGGTAACTGTCTCAGGATGGG
96	629	46.90	11	-	-	-	AGAGAGGTAGGGTATGAGAAGGAAGACAGACAGAGAGGTAGGGTAGGAGAGGGAAGACAGAA AGAGAGGTAGGGTAGGAGAGGGAAGACAGAGAGAGAGGTAGGGTAGGAGAGGGAAGACAGAC AGAGAGGTAGGGTATGAGAGGTTGTAACATATCTTAGTACATTTGCAGGAGGTTGTATTGA CATGTGTAACAGGAGCACACAGCCAGGAATACAGCCTGTTTGGACCTGGGTCAAAATACTA TTCAACATCTTTCAGATACTTTGAAGTTTGTCTGGAGTGC CG ATGGGTGGGGTTTGTACTTT TTCCTAATATGACATAGGGTTTGTGCAACAGCAAAAGCTCAATCAAGTATGACCAAAAAAT AC CGTATTGTAAATGATT CG AAACATGTTTGAATCAGG CG GTGCTGCCTGCCT CG GT TC CG TGCCCTGGCTGGCTGCCT CG GTGACAGGATGACCTGAGAGGTGAGGTTAGG CG TAACCTGTG CAGAGGGTTATTATG CG AGACTTGTTCAGAG CG GGGTGACAGTATCAGTCACTCAGACTACAG AGGAAGACAGGAGATTGAGTTGATGATAG CG TGTGTTGAGACTCATGTACCTAAAGGGG AAACAGTGA
97	277	35.02	3	6q16.3	-	Intergenic on the flank of a MAR.	AAAAACACGCAAGGAGGAATGAAAGTAAAAATCAAGAGAC CG GTCAATTCTAATTTTCATGAAA TTAGTATAAAACCAAGAGTTAGCTCCTTATAGGGATTTTGTGAATCTATAAACTCTGTAAA CTCATTTTGTGCAAGGCTCCACCA CG TTGTGTGAGAATCAAGGGCATAAAGGTAATTTAAA TTTCATCATGGCTCAAATCCAAATCCAGTTATTTAAATGATGTGCC CG GTAACCAACAGT GATCTTTTAAACCTTAAAGAAAAGCTG
98	176	43.18	2	3q26.1	LTR12C (LTR/ERV1) 1-105 (1306-1203)	In intron 5 or 6 of SERPIN I2 PRECURSOR (MYOEPIITHELIUM-DERIVED SERINE PROTEASE INHIBITOR) Size of intron: 125 kb.	CAGGAGTGAAGCTGCAAACTT TC CG CG TTGAGTGTACAGCTCATAAAGGCACTGTGACCCC AAAGAGTGAGCAGCAGCAAGACTTACTGGAAAGAGAGAAAGAAATAAGTCAGTAGTGTCTCG GGGACTAAAGGAAGAAAGCTTTTCCAGAAAAAAGGGATGGTTAATAATACT
99	123	45.53	1	7q34	-	In exon 12 of predicted gene Size of intron: 2 kb.	ATCTTGGATTGTGAGG CG TTCTCTCAACACTGCCAGCCACCTGAGATGCTGACCAGCAGTGAA GGCTGCACTAGTTTCTACACTACAGGAATTACTGTTGATGATTTTGTCTGTGTTTCATG
100	161	48.45	0	-	-	-	AGTCTCCCTAGTGTGAGAGCCTCATCACTACAGTCTCCTAGTGGTAAAGCCTCATCACTACAG TTTCTAGTGGTAGAGCCTCATCACTACAGTATCCTTAGTGGTGGAGCCTCATCACTACAGTCT TCCATGTTAGAGCCTCATCACTACAGTCTCCTAGT
101	176	52.84	3	17p12	-	Intergenic telomeric: (2 kb) predicted gene centromeric: (20 kb) predicted gene.	CAAGGGGCACTGCCAGGGCCACTGCCTGCCT CG GTGAGAAGTTCTTTAGCAGCAGTCACA GGGCAATGCTTAGAAAGGCAATGCCACAGTGAATAAGGGGGATTAACCTTGGAATCCAAAGGT TAGGATAATGCCCAAGAA CG C CG GGTGGCTCCATCTCTCTCCAGTCTT
102	386	49.48	17	3q25.31	AluY 114-386 (22-289)	Intergenic centromeric: (17 kb) predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> 1 PHOSPHATIDYLINOSITOL 4 5 BISPHOSPHATE	AACAGATGAGT CG AGACTATATTTCTAATCTTATACATAGCTAGAGTTTAAACTCTTA ATAGAGTCCCAT CG ATAAAAGAAAAGGCATAAATGTTGGTCTACAGGCTCTTTTTTTAG AC CGAGTCT CG CTCTGTAGCCAGGCTGGAGTGCAGTGG CG TGATCT CG GTCACTGCAAGC TCCGCTCCCGGGT TC CG C CG CAATCTCCTGCCTCAGCCT CG AGTAGCTGGGACTACAGGC AC CG CCACCA CG CC CG CCAATTTTGTGATTTTGTAGTAGAGACAGGGTTTCACT CG GT

						PHOSPHODIESTERASE 1 PLC 1 PHOSPHOLIPASE C 1 PLC telomeric: (108 kb) ACETYL- COENZYME A TRANSPORTER.	TTAGCCAGTATGGTCTTGACCTCCTGACCT CG TGATCCACC CG CCTTGGCCCTCCCAAGTGC TGGGATTACAGG CG
103	187	35.29	2	11p13	AluYc2 1-68 (212-281)	In intron 1 of predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> ELONGATION PROTEIN 4 HOMOLOG (S. CEREVISIAE) Size of intron: 10 kb.	AGGGAGCTGAGAT CGCG CCACTGCACCTCCAGCCTAGGTGACAGAGTGAGACTCCATTAAAAA AAAAAATTACTCAAAGTTGTTGGACAACCTGGAGTCAATGTTAATGTTGTTTGTATATAC AAATCTGAAAGAAATATTAGAACACTAATAAGAACTTCCACAAAAAGTTTGTAGTCA C
104	238	59.66	13	19p13.3	AluY 1-21 (21-1)	Intergenic telomeric: (32 kb) PROTEIN SCK (FRAGMENT) centromeric: (3 kb) MUCOSAL VASCULAR ADDRESSIN CELL ADHESION MOLECULE 1, ISOFORM B PRECURSOR.	ACCCAGACCTGAGGGT CG CAAGGAGAGTGGGGAGGAATGAGATTGATGGAGGCTGCAGGA GGGGTTCAATAAGTAGCCATGTGCATGCATGTGTGTGTGTGCAT CG TCTGTGTG CG TGCA TG CG TGTGTG CG TGTGTA CG TGTGGAGTTGTAGCCATGAAGCCCA CG ATGGGGGTGGCCCTG GCTCC CG CATCAGGTTTAAGGAGGAAGGAT CG ACCGGG CGCG GTGGCTCA CG
105	417	45.32	1	5q11.2	-	Intergenic centromeric: (144 kb) PHOSPHATIDYLINOSITOL 3- KINASE REGULATORY ALPHA SUBUNIT (PI3-KINASE P85- ALPHA SUBUNIT).	CTGAGGATTGGATATCAGAACAGTGAGATATTTGGTCTCTAACATGAGAACATAGCTTTGG GAATTATCTTCACAAAAGTCCACATGTCTCGCCAGTTACCTAATATTACAGCTTTCTCCCA GGTTTCTCTCTCCCCAGATGTCTGGAGCTCCCCAGATGTCTGGAGCACCCAGAGCAATGGC CTTGGGTCTGATAGTCCCTATAGTTCCAGGTCCTTCAAGGTCCTCCAGAACCTCAGATGTCT TTCTCTGCCCATTTCTCTCTACCCACTTACTGTAAGACTACAGTACACTCTTTTAAAGTG TTCATGTGTGTATCTCTCAATGTTCTTCTGTCTATTTCCCAAATGCCCAAACCT TACATGT CG GACTGACTCCATTTGGTGAAGCCACTGAATTCCTA
106	472	44.28	2	15q22.31	MSTC (LTR/MaLR) 127-472 (2-341)	Intergenic centromeric: (24 kb) PH DOMAIN CONTAINING PROTEIN telomeric: (24 kb) predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> ANKYRIN.	CTATAAAAAATGCTGTAATGTATTTCTTAACAGGAAGTGAGGGCTTTTTCACCTTTGAGTTGAC AACCACAGCAGCTAC CAGTTAAAGTTTAAATATCTGTCCCTCTGAAACTCATGTTGAAACTTATTTCCCAATGTGG CAGTAGTGAAAGTGGGATCTTCAAGAGGTGATGGGGCATGAGGACTCTGCCCTCATGAAT AGATTAACTATTCATTCGATTAATGGATTATGGGTTCATGGATTAAATGGGTTATCACGGGA ATTGGAGCTGTGGCTTTATAATAAGAGGAAGAGACTGTAGCTAACATGCTCAACCCCTC ACCATGTGATGCCCTTTCAGGGCTCAGGACT CG CAGAGTCCCCACCACCAAGAGGACCTC ACAAGGTGCAGCCCTTCAACCTTGGACTTCTCATTTCTC
107	320	39.06	1	-	LINE-1P 1-320 (2751-2432)	-	GAGGAGAGCTTTATTTCTACTATGTGGTCAATTTTGGAAATAGGTGTGGTGTGGTGTGCT GA AGAAATGATATTTCTGTTGATTGGGGTGAGAGTTCTGTAGATGTCTATTAGGTCCACT CG TGACAGAGCTGAGTTCATTTCTGGATATCTCTGTAACTTTCTGTCTCATTAATCTTTCTAA TGTTTTCAGTTGGGTGTTAAAGTCTCCCATTTGTTATGTGTGGAGTCTAAGTCTCTTTGTA GGTCTCTAAGAGCTTGCTTTATGAATCTGGGTACTCTGTATTGGGTGCATATATATTTAGG ATAGTTAGCT
108	137	45.26	0	12p11.22	-	Intergenic telomeric: (60 kb) CDA14 centromeric: (75 kb) predicted gene.	ATAAAAAAGACAGCAGTTTAGCAATTTGGCTTTTATACCACTCTGAGAGGACCTACCTGCA TGGAGAGTGACATCTGTATCTGGGCCCTTCTTAGGAAGGCAAGGCCAGCAAAAAGCCATAC ATCTCTTTCTCT
109	284	54.93	4	8q22.1	-	Intergenic telomeric: (211 kb) predicted gene.	GAGGCTTGAGG CGCG CATCCATACAGCTGTGGAAGAGATGCTGCTCTCATTTGGCCAAAACCA GCC CG GAGACAGCATGATCCTGTCTTGTCTACAGTGAGAAAACCCCTTGTGTGCTTCCAT GATCCTGGCTGCT CG TGGTGATAGGGCTTTGGGTAGCTGCTCTTAGGAGACTCTGCCAGGC AGAGAGGGAAGTAGGAGAAGAAATGGGAAGTGTGGGCTCCACCTTGTGTAGAGTGCCAG GACAGGTGGTGAATTTGGTGGCACCCAGAGATAGAG
110	308	37.66	8	-	-	-	GTATT CG CCCTCTCTGAACCTTT CG CACTTTTGCCACATTTTCAGGCTTCAACATATAAGATA TAAACTGTATTTTTTTTGTGAGGAATCAACAAGGTGGGACACATCAATGAAGTGGAA CG ACATTTATTTGGATATTTCAAACTTTTAAACAAATCAAAACTGAAATATTGGG CG TGCAAA ATTATCTAGCCCCCTTAAGTTAATACTTTGTAG CG CCACTTTTGTCTGATTACAGCTGTGA AGT CG CTTGGGTATGTCTCTATCAGTTT CG CACT CG AGAGACTGACATTTTTCCTCAT
111	516	51.55	11	11p11.2	-	Intergenic telomeric: (93 kb) predicted gene centromeric: (41 kb) OASIS PROTEIN; BBF-2 (DROSOPHILA) HOMOLOG.	CAAAGAC CG TGGCTAGGGGAGGGGAGGACACAGAAATAGTGATTATATATATTT CG CTAT AGTTTTTGGTATGCTTTAAATTTTTTGAATTGCACTTTGACCTATTAAAG CG AATTTCA CTGAGTTGGGGTGGGTGGGTGAGGGAAGGCTTCTCAGAC CG AATTGAGTCTTACTTAAGATG ACAGCTGAAATTTGAGTAGAAGAGGAAGG CG CGAAGGTGTTTTCAGGCAGAGAGGCTT CG CG TAAGAGGCTGGACTGGGAAGGTGAGGTAGGGGCCAGGGACTGAGACCCCTGTGTGGCCAGA GCAGGGGAAGAAAGGAGCTGATGTTGAGGGGAGGGGAGG CG AAGGGGGTGTGCACAGACAT GCAGGACCCACAGGCCATCTCTGAAGGCTCAAGCTCTCTCCCTTAAATATGACAAATCAGCA GG CG CCCGAGGACACTTCACT CG CCAGATAC CG GAACAGGAGGG CG TCTTTGAAAGGT GACTCACATCTTGAGTTCTG
112	262	37.79	2	Xp11.23	MIR 6-221 (33-241)	In intron 4 of GRIP-ASSOCIATED PROTEIN 1; LIKELY HOMOLOG OF RAT GRIP-ASSOCIATED PROTEIN 1 Size of intron: 1 kb.	ACAGGCTGGAGCCAGTTGTTTGTCTAGGTTTGAATCCTGGCTGGGCCATTTCTCTAGCTGTGT GACCTTGGGCAAGTTATCTGACCTCTCTGTGGCTGTTTTCATCAATGGTAAAAAGGGGTA ACAAATAATCTACCATCTAGGTATTA CG GAGGATATAGAAAAATGAGTTAATATATGTA AACTCTTAGAACATCTTGGCATGTAGTAAG CG CTATGTTTGTATAAATAAAATAAATGTA AATGCAAACTAAG
113	942	36.31	12	-	LINE-1ME1 23-169 (6007-6165), Alpha Satellite 171- 942	-	AAGACAGTCAGTGGTTAATGTTTGCAAAATGGGAACATAAGAAATTTTGGGGTGAT CG AATAT TCTATTTGTTGTGTTCTTTGTA CG ACTACACATTTGCAAAACTCATCAAACTCTGCATT TAAAGTAGATTAAATTTTGCTATATGTTTATTTCCAAAATAAATAAAGAGGGTTTCCAACT GCTCTATGAAAGAAAGGTTAAACTCTGTGAGTTGA CG CACACATCACAAGTAGCTTCTG AGAATGATACTGTCTAGTTTAT CG AAGATATTTCTTTCTACCATTTGG CG TCAAAG CG C TAGAATTTCCACTTGCAAAATCCCAAAAGAGGTGTTTCCAATCTGCTCTGTCTCAAGGA GGTTCACTCTGTAGTTGAATACACACACACAAGAGCTACTGAGAATTTCTTTGTCA AATTATAAGAAGAAATCC CG TTTCCA CG AAGGCTCAAAGAGTTCCAAATATCCACTTGCA CACTGCACAACTAAGTCTTTCCAACTGCTCTATGCAAGAAAGTTGTTCAACTCTGTGAGTT TAATACACACATCACAAGCAGTTTCTGAGAATGATACTGTCTAGTTTATTA CG AAGATAT TTCTTTTGTACCATTTGGCCCTCACTGTAGAATTTTCCACTTGCAAAATCCCAAAAAGA GTGTTTCCAAT CG CTCTGTCTAAAGGAAGTTCACTCTCTGATTGAATACATACATCCC AAAAGAGTTACTGAGAATTTCTGTCTAGCATTATGTGAAGAAATCC CG TTTCCA CG A AGCTCAAAGAGGTCCAATATCCAGTTGAGAAATTTACAACCTGACTGTTTCCAACCTCAT CTATGAAAGAAAGGTTAAACTCTGTAGTTGAATGCATATACAAAGTAGTTCCTGAGA ATGATTCTGTCT
114	593	34.23	3	13q14.2	LINE-1M4 19-288 (2616-2893)	Intergenic centromeric: (31 kb) ESTERASE D telomeric: (5 kb) 5-HYDROXYTRYPTAMINE 2A RECEPTOR.	AAATTCTAGACTAAAAGTTCAACACTTCACCAATTAGACCTAATAGTCATCTACAGAATATCTC CATCTAGCAACCCAGAAATATATATCTTCTCATTTGACACAGAAATTAATCAAGAG CG GA CCACATCTTGATCATAAAGCAGCTCTCAATAAATTTTCAAAACTGAACCTCATCTTATCT CAGACCATAGTGGAAATAAATAAATAAATCAATACCAAGAGAGTCTCTCAAAACACACAAAT ACATAGAAATTAACAACCTTGCTGTTCAATTAACCTTAGGGATGGAATTAATCTTTTAAAAA ACTTGAATAAGATACTGGGTGGGGAGATTATCTACCTCTTTTACAAATGTTTGTATTATTTT ATTGAGCCTACCAACTTTGTCAAAATTAGCCTAAGTAATATAGGATAACTTAACA CG CTTA CCAGAGATGCCATGCTGCATATGATAAGATATCCCTCAAGGCATTGCCACCC CG AGTCTG GATGTTTCAGCCACTTTAGACACTGGTGAAAGCAAGTTGTGTGGGCCAATGGCAAAAGTG TTAAGAATATAGAAATTTTAAATTAGATTATGAG
115	842	41.09	9	-	AluSx 11-322 (313-1), HUERS-P1	-	ATAGAAGGAATATTTTATTTTATTTTGTGTTTATTTTATTTTATTTGATATGGAGTCTTGCTGTGC ATCCAGGCTGGAGTGCACTGGCACCATCTTGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCTGGGCTCAA GTGATTCTCTGTCTCAGCCTACCAAGTAGCTGGGATTATAGGTGTCACCACTGACCCAG CTAATTTTGTATTTTATGATAGAGATGGGGTTTACCATGTTGGTCAAGCTGGTCT CG AAC

					(LTR/ERV1) 24-842 (3143-2623)		CCTGACCTCAGACAATCCGCTGCCTTGGCTCCCAAGTCTGAAATTACAGGCATGCACC ATCGCCCTGGCCATAATGTTTACATTTTAAAGACATTTTATTTTACCAATAGCTTTAAAC TGCTTTTATTTTAAAGATTAAGTGAAGTCTGTGAACAAAAGCGTTAAAGTGTCTATTT TTCTGACAAAATTTTATTTAAAGCGCTTACTTTTAAAGCCAATTAATTAGAGCTCTTTTAC ATATAAACATACACACATATAAATACACAGACAGAAAGATTAGCACTTGTAAAGATTTTCT ATTTGCCAGTTTAACTGGATTACTGGCTTCAGGGCGAGGCCCTTGGAGGAACAGGGCCA GGAAGCGTTCGTTTCTAAGGCCAAATAGCAGCAATTAAGCAGCTGAAAGCAAGACAGAT CCCCACAGTTAAGGTGCCATTTTATCTGTTTCTGGAGTCCAAAGGAAGAAATTA CGGGAGCGGCTGCAGTCTTCTACTCTGCATTTTCAAGGCAACACAAAGCCAAATC AGCCATTTTATAATCAGCCCATTCCTCATGGGAGT
116	232	29.31	1	-	AluYc5 1-46 (248-293)	-	CAACAGAGTGAGACTCCGCTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCTTTCTGTCTTGA AATTTCAAACTAGACAGGATAGACAGGCAATTTTAACTGAAGCTGTTCTCACAACCTGT TTTTCAGCTATTATAAGTTTGTAAATGGACAAACATGTTCAACTGAAATTTAAAAATTAC ATAAAGATATAATTCTATAACCTGCAGAACTAACATTTGATGCATT
117	163	50.31	5	2q33.3	AluSq/x 1-120 (120-1), AluY 150-163 (276-263)	Intergenic centromeric 80.1 kb HEPATOCELLULAR CARCINOMA-ASSOCIATED ANTIGEN HCA557B telomeric 19.3 kb predicted gene.	AGTAGAGATGGGGTTTACCATATTTGGTCAGGCTCGTCTCGAACTCCTGACCTCAATTGATC CAGCAGCTCTGCCTCCCAAAGTGTGGAATTACAGGCATGAGCCACCGCAGCCAGCCATGA ATGCTCTTATTAATAAAAAATTTCTGCCAGCAGCTTTGGG
118	304	33.88	0	14q12	-	Intergenic centromeric: (284 kb) PROTEIN KINASE C, MU TYPE E telomeric: (347 kb) predicted gene.	GAAATGAAAAATCACTCTGAGGTAGAAATTTCTAAACTGTCTTTATTCAGTTTATAATTA AAGTTAGAGTCAATGGAAATTTGGAACCAACCAAGGAAAAATTTAAATCTTGTGTGAGAA TATTTTAAATCACTAATGTTCCCTGCTATGTTGGTGTACAAATTCCTCAATAGAAAAATGATT CAGAATTCCTTCTAAGCCTTTATGTTGGGGCCACAGAATTTGGAAATCTTCTGCTTTCCCTC AGGCAAGAGACTAAGAGATCAAAAGTCCAAAGTCAATTCATAAGAGACCAGAGATC
119	517	50.10	7	17q23.2	AluSg/x 1-102 (187-288)	In intron 16 of predicted gene Size of intron: 284 kb.	AGGAGAACTCTTGAACCTGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGTTGAGATCAGCTACTGCACCT CCAGCTGGGTGACAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAGCATATATATACAGCAAGG ATCTTGGCCCTCTGTTTGAAGAAGATACTTTTAAAGTCAAAATGTGAGGTAAAGTGAAGTGC CCACATCTCAACCTCATCAGGCTGTACTTCTGCAGATTTGTTGGGCTCTGGGTGTCTCTATT AGAAACAAGCAGGAGGGGAGAAATCGTTTGTATCTCTTGCTCTTAAATGTGGGCCCTAGGC GTGAGTAAGAGGTACTGGCCCTTGCAGGATCCAGTGTCTTCCCTCATCCCTCCCTAGGTG ACAGTGGATCCAATCTCCATAAGCAAGTCTGGGATCTGCATGTTGTGCTTTATTTGCTCTC TGTGGAGGCTGTGTAGACAGGTCTCTCAAGGAAGGGGAGGAGCAAGAGTGGGGGAG GGTATCAGCTCAGAGGGGCTA
120	318	50.94	6	4p15.32	LINE-2 1-52 (3241-3189)	Intergenic telomeric: (48 kb) PROMININ- LIKE PROTEIN 1 PRECURSOR (ANTIGEN AC133) (CD133 ANTIGEN) centromeric: (39 kb) predicted gene.	TAGGGAATGAAACCTGGATGTCCGAGCAATCTTCTGACCTGGAATTTTCTCTCTCGCTTTGC TGCTCTTGGGAAAAGCCTGTTCCGCAACAAGCTGGCAAGGTACTGTGGTCCGATCAGACCTG CCTTGTAGCCTCAGGGCATGTGGTCTTGGGGCATCTGACATAGGAGCACCTGATTTCGTT TCAACACTTTTGAAGAACCAAAATTTGGTAAGGCAGCTTAAGGACACTCAGAGGAGACACCTC CAGATGGTGTAGAAAGGCTGGTTCATGATTACATCTTCCACCGCTTCTCAGTGCAACACAG CAAGTGCT
121	430	30.93	3	4q25	-	Intergenic centromeric: (37 kb) MYOPODIN PROTEIN (FRAGMENT) telomeric: (64 kb) CALCINEURIN- BINDING PROTEIN CALSCARIN-1.	AGAGTAATGATAAAATAGGAACATGTTACAAATTCATATAAGACTTATTTTGGAAAAAAT ATTTATTCATACTGTAAAAAGTGAAAGCTAAATGTAATGTTTGTGGCAACCTCCTCGGGCA AAGTATCTATAAAATCTGTTCCTATCTGTCTTAAATCTGCTTTTTCCTACATGATAGCA TTTTTGAACCTGAACAGTTAATCTTATTCATTTCTCAGTCTTCTTTGTATACAAATGAG AAATTCAGATACATTTGCTTATTCAAATGTAATGTAGAGAACACAGATGAGTTTCATTTCGAAA TATGAAAATTTTAAACATCAACACAGAGAACATGCGCGACATGAAATTTCTGCCACTCTT TTTTGTGATTTCTTTATCAAGTTCATGCTGAACATGGGGTTTATCTAGCTGGGAT
122	349	42.69	1	14q22.2	-	Intergenic telomeric: (59 kb) BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 4 PRECURSOR.	GGTTGAGCAATGCTGGCTGGTGAGATTTGCTTTTGGGAACAGCAGTATCCAGGCGAGGCA TTCACACAAGTGCCACAGCATTTCTGCAATTTTGGGAAGGACCACATCTCCAGGAATGG ATGGCTTTGTTATGCTTATCTCTTAATCTGCAGTTGGAGATTTTCTCTCTTTTGCAGGTG CTCTCATTTCTCTTATTTGTTTATTAAGAAATCTTGTGGGCTTCCAAAGTTATTTCTTAT GCTAAGGAAGGTGCAATGTGATAACATATTTGTTTGGCAAGAGTGAAGGACATGAGCAACA CTGAGAGTCACATAATCATGAGTATAACTGAAAGTGGT
124	222	36.04	4	8q24.21	AluY 185-222 (293-256)	Intergenic centromeric (44 kb) predicted gene telomeric: (165 kb) predicted gene.	ACTGGAGCTGAGCTGCTGTTTGTATTAATTAATAATCTTTCCATTTGTTAGAGCTCAGCACC TTTGTGATTCATATTAAGCAATTTTCTGATATGTTGTAATTTCTCACTTCTGCTACT GCAATGTATGTCTACAGCTGACAAGTCTTCTTGGGAGCCCTACGAGCTCTTTTTTTCTT TTCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGCGGAA
125	428	42.99	1	2p25.3	-	In intron 9 of predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> SH3 DOMAIN YSC-LIKE 1 Size of intron 6 kb.	CAGCTCTTTTTCAGCCAGCTTCCCTCAGCTCTGTCTCTCTGTAGGAGTCCCTCCCTTCCCA AGCAAGTGCAGCCAGTCACTGAGCTTGTCAAGTTTGGAGGACCTTTAAACAACGATACCT AAGTCTAAGTCTAATCTTGAAGTCTTAAAGTGAAGAGCTGTGTAAGATAAAATCTAGGTG TTTACCGCTGTCTTGGTGCAACATTTATACCTTAAACCACTTTTGGCTTACAGGATGTGAT CCAAAGGCCAAACTTTTCATGCTCTTTTAAATCAGCCTGTAATGTGGGTGTGAACCTGATGT CTCTTTAATATGGCTGTACATGGGTGTGAACCAAGAGGTTGAACACATTTTAAACCC TCTCAGAGCTTCTCTGCATACCTAAGACCATGGCAGCATCTTCTGTAGGTGAG
126	305	39.02	5	-	-	-	GGTCAAAAGTAATGCACAAGACAGGGATCAATTTGGGATCAGATGCAATTTGTAAGACGAGT AAAGTTAAAGGCTGGAATTTCAATCTTGGAGTATAACTGTCACTGTAGAAGGACGATTTTA GACAAACATGCCCAATAATTTCCCTCAATTTCCACTAACAAAGAGTCTTAACTGTCCAAA TAAATCATTTTGTATCGTTCTCAACAAAGTTGAATCTTTCGCGCAAAATCAAGTGGCAAA GAAGGACATTTGCTGCATATAAACACCCAAATGATGGTGGTTTCAGACCAAGTTT
127	229	37.55	1	7q35	THE1A (LTR/MaLR) 1-75 (280-75)	Intergenic centromeric: (30 kb) predicted gene.	TCCCAACCCCTGGGAATTTCTGGAAGCTACAATTCAGTTTGAATTTGGGTGGGGACAGAC CCAAACCACATCAGTAAATTAACAACTACTGATGTTTTCATTTACACTGTGATTTCTCTC TTTATTTACACCGTAAATGGTTTCAATACAGAAGATAATTTGATTATATTCACATGGGGATT TTTTAAAAATTTTTTGTGGGGTGAATCTGGCTGTGTATGCC
128	430	35.12	2	2q12.3	-	Intergenic centromeric: (63 kb) SOLUTE CARRIER FAMILY 5 (CHOLINE TRANSPORTER), MEMBER 7; HIGH AFFINITY CHOLINE TRANSPORTER telomeric: (170 kb) predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> SULFOTRANSFERASE, PHENOL PREFERRING 2.	CTCTAGTTTCTAGTTAATTAAGATCCAGCTTTGAATGCTACTCAATTAGGTATTTCCCTCG TGATGTGGATCTGTAGTCTGAAAAAGCAACAATCAATGGTGTCCACTTTTAAACAACAATC AGGACTAAATGAGTTTAAATGATGAGTTGGTTAAATAATACGTTTCAGTGGGAATATTTGTG TTTATCAGTCTTCTGTTTAAAGTTTGAACCTAAGGTGATTTTAAATCATTTATTTCTTTC CCAAAGGTTTATGCCCCCTTTAAGTAACACGAGAAATTTAATCAGAGATTTAGATGAGC AATTTCTCTCTTGAAGCTTGCACAGTATTGAACCTCATCGGTTTTCAGAGTTACAAAATGC AGTCTGTTTCAATGCTCTCATATTTCTAGATATGCCCTTAGGTAAATCATTTGATCTTC
129	444	43.24	1	13q33.2	-	Intergenic telomeric: (39 kb) predicted gene.	TTTCCCTCTCTGGGCTTCAATATCTCTTTCATGAAGGGGTATCCCTATGCCACTAACAG GCAGCTCTCTGTATGCCAGCAGCAGTAGATGACAGCAGCACTCATCTACAACAGACAG CAAATGTAGACTAGGACTTTTTTGTGTTTTTCTTAATATGAGGTGAAAGATTTTTCCTCC AGCTAAAGAAAGGATTTGGGGTGGAGTTCCCATGACGCCAACACTACATTTAGGAAGCTG TTTCCGAGTCTCTCATGAGGAGGAGTCCCAAAATGAGAAATTTTCAAGAGTATTTCCCT GAAATGGTGTCTTCCAAACAATGAACCATGAACCCCTTGCACCTTTCAGAGCTTGCATCTATT TTCTTAAAGGACACTGAGAAATACAGTTTCTATGGAGAGGAGGAGTTGAGGCTTTAGACTT TTAATTTTTTA
130	273	47.25	1	17q21.31	AluJb 116-273 (150-306)	Intergenic centromeric: (12 kb) predicted gene telomeric: (2 kb) SIMILAR TO	AAACAACCTGGGTGGACCTTTCTAGGTAGAAGTCCAGGTGCCTGAGACTTGGGTGCTTTTGT AGGTATGGCAATGAGAATGATATGACTTAGGACTGGAGCTGAGAAATGAGGAGGTGTGGCC TGTGTTCCAGCTATTCTAGTGGGAGGCTGAGATGGGAGGATCACTTGAGCTTGGGAGGAG

						PHOSPHOLIPASE C, DELTA.	GGTCACAGTGAGCCAAGAT CG TGCCACTGCCTAACCTGGGTAACAGAGTGAGACCTGTCTCAAAAAATAAAATAAAATAAAATAA
131	244	56.97	4	16q24.1	AluJ 101-152 (52-1), LTR32 (LTR/ERV1) 153-244 (291-382)	Intergenic centromeric: (185 kb) predicted gene telomeric: (168 kb) predicted gene.	CAGGGAGCTGTGGGGAGGGGAGGAGCCTAGGGCAGAGTTCAAGTGTAGAACACTGGGGC CGCG GGGGTTCTGGCTCCACTAGGGG CG GGGCAGCTGACCTCACCTTCCAAAGTCTGGGAATTACAGG CG TGAGCCACCATGCCTGGCCAGCTGCTGCTTTTGGCAAGCAATTGTAGTTCTCTGTCTAGCCACAGTCACTGGAGCTGTCCCTGTATGTAAAGTTCCCTTAAATAAAACC
132	321	47.04	2	2q37.2	AluY 250-321 (119-192)	In intron 1 of predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> ANKYRIN REPEAT AND SOCS BOX CONTAINING ASB Size of intron: 23 kb.	AGCATCACTTAGTGTATCTGGCATCACACTGAGGATGTGAAGGGTCTGTACAGATTGTGCACAGCCTATTCACACTCTTCACTTCCATTCTGTCTCTGTGTACAGCCATGGAATCTCTCCCTTTTCTTTCACAAAAAATATACAGGTGACATAATCAGGATGCAACTGGGAAGTCCCAGGCACAGCTGCCCTGTGGGCAGGGGATAATCCCCCAAAAAATACAAAAAATAAAAAATAAAGCTGAAGCAATTAGCTGGGCTTGGTGG CGCG GGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGTATGGAGGCTGATGCAGGAG
133	180	48.89	2	6p21.31	AluY 108-180 (119-192)	In intron 1 of predicted gene Size of intron: 9 kb.	ACAAAAAATAGACAGGTGACATAATCCAGGATGCACTGGGAAAGTCCCAGGCACAGCTGCCCTGTGGGCAGGGGATAATCCCCCAAAAAATACAAAAAATAAAAAAATAGCTGGGCTTGGTGG CGCG GGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAG
134	361	45.34	1	8p12	AluSx 81-360 (11-290)	Intergenic centromeric: (245 kb) predicted gene.	TGTCTTCTCCAAAAGACCCCTTCATCACAGGTATTTTGCAGATTAAAGTGGAGACATTACAGATCCACCTCAATAAAGAAAAGGTAGCACATGCCTGTAATCCCAGCAATTTGGGAGGCCAAGGTAAGGAGATCACTTGAAGTTCAGGAGTTCAAGACCAGCCAGACCAAGGTAAGAACCCCACTCTACTAAAAAATAAAAAATTAGTGGTGTGGTGGTGGCACCTGTATATCCCACTTTTGGGAGGCTGAGGAGGAATTTTGAACCTAGGAG CG GAGGTCTCAGTGAGCCCAAGGTCATGCCATGCCCTATGTGCAAAAGTAGACTCTGTCTCAAAAAAAG
135	385	39.22	1	1q21.1	MIR 4-176 (8-191), MIR 187-343 (216-56)	Intergenic centromeric: (63 kb) NOTCH HOMOLOG 2 (DROSOPHILA) telomeric: (27 kb) VESICLE TRAFFICKING PROTEIN SEC22B.	CTCAATGGTGGGCGAGCAAGTACTGTGGATATGGAGCTGGGAGGCTGAGCTAAATCCTAGCTATCTTACTAACCAATTGTATGACTAGCCCTTAAACTCTCTGAGCTTAAATTTCTCATCTGTAAATGGGAATGATAAATGCCCTCCAGAACTATTACAAATTTCAACATTTGTGTAGTTTCTCAATGTGATATACATGTATCATGAAATCCTCATGACAAAAATATGAGGTGGAGCTATTATTTGGCCCTTTTGCAAATGTGGAACTAAGTTTATAGTAGGTAATCTGCCTACAAATTTACACAGCTAGAAATGTGCAGAGATGGGATTTCTGAGGCTGTGCTCAACTCTGAAGCAATGTCTTACC CG CTCTA
136	326	40.80	0	Xq26.2	LINE-2 1-248 (3202-2951)	Intergenic centromeric: (264 kb) GLYPICAN-3 PRECURSOR (INTESTINAL PROTEIN OCI-5) telomeric: (123 kb) predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> ZINC FINGER NY REN 34 ANTIGEN.	GAAATCAAAGGGTTTATGAATAAGACAAGTCTCTGACCTCAAGGAGCTTACTTATGCAATTAATTAACCAATGTGGTAAGAGCTATACCCCAATGCTAATAAAGTCTGTGGGAGCATAAAGGAGATCAATTAATTCGCCCTGTGGGACTGGGAACACTTTGTAAGGAGGTGACATTTGAGCTGGCCCTTGAAAGATATGAAGGATTTTTCAGACAAGCATGGGAGTAGGAGCAGGACGACATTTCTGGAATGTGAATATGAAGGTTTATTTGGCTTCAAAGAGGACTCAGCAGCAATGAAATGAGCACTGGTATG
137	283	38.87	1	12q23.1	LINE-2 1-242 (3197-2928)	Intergenic telomeric: (158 kb) predicted gene.	ATTCATATGAGTAAAAAGATTAGATAAATAAATAACAGGAATTTTCAGAGAGCAGTAAGTGCATGAATACAAATAAACAAGGTGATGGGGTGGAGAGTGAGTTGGGAGCTGTCAATTTTATTTAGTCTCCAGGGAAGAGATTTCTGAGTGGATAATTTTGTATCTCAAACTAAAAATCAAGACAGATTACGCCATGTAAGGATCAGAAAGTTCAGGGGAGAAAGCTGAGCAAGTACCCCTGATATTCAATACTAT CG CTCTCAAAAGCCCTAGTTTCAGATGC
138	335	52.08	9	18p11.21	AluSp 1-273 (271-1)	In intron 4 of predicted gene Size of intron 5 kb.	CACCTCTTGTTCAGGCTGGAGTACAATGG CGCG ATCT CG GGCTCAC CG CAACCTCTGCCCT CGCG GTTCAGAGCAATTTCTCTGCTTTTGGCTTCCCAAGTAGTGGGATTACAGGCATGFGCCAATATGCCCTGGCTAATTTTGTATTTTGTAGTAGAG CGCG GGTTTCTCCATTTGTGTGAGGCTGTCTCAAACTCTTGACCTCAGTGATCTGCC CG CCCTCTCAAACTGCTGGGATTCAGATGAGACCCACTGCAAG CG GGCTGACAGCATCATCTTGATAGCTTCTATGCCATGGGTTCTTTATTTTGGAAAGGAAGACTCACT
139	519	43.55	11	-	AluY 281-519 (1-236)	-	TCAGTCAAAACACACACCATCTCGGGTATAAGTCTTGGTGGGTCTAAAAATACAAAAATCCCAAGAATACAAATTTAAACTTTTCAATTTTAAATTTGACTGATTAAGTGTCCAAAAATACCCATGTCAAGGAATGTGACTGTAGTTCTAGAAAGTAAATT CG TATCTATGAATGCATGAATAATTAAATTCATGATACCCAAATAAAAACTAGGAACAATAGGTCAAACCTCTCTGGATTATAGGCAGAAAGTTACATGTTTTTAAAAAATGGTCTCTCGGGCC CG TT CG GGGGCTCATGCCCTGTAATCCAGCAGCTCTGGGAGGCC CG AGGC CG CGCAGGCAGATCA CG AGGTGAGGAGATTGAGACCATCCCTGGCAACACAGTGAAACCCCTTCTCTTCAAAAAATACAAAAAATAGCC CG CGATGGTGG CG GGCACCTATAATCCAGCTATG CG GGAGGCTGAGGCAGGAGAAAT CG CTTGAACCCAGGAGAGAGGTTGCACTGAGC CG AGATC
140	618	35.44	1	6q22.31	LINE-1P 173-618 (5376-4931)	Intergenic centromeric: (65 kb) predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> CELLULAR RETINALDEHYDE BINDING CRALBP Telomeric: (89 kb) TRIADIN.	CACAATAATAATATTCCTTGATAATATATTGCAGAATAAGATTCTCAAAATGTCAATAGCAAAATGGACCTACAGTGAGTGTGGGTAAGAGTGTGTTCAGTTTGGAGGCAATTAAGTAGGTTGTCTCATCTGTAATTAAGAGTCTTTGGGCTGAAGAGAAATCTCCCTTTATCTGCATATAAGTCTTCTTGGAGAGGTCTGTCTCATGTCCCTTCATCCACTTTTGTAGAGATTGTTTGTCTTTTCTTGTAAATTTGTTTCAGTTCAATTT CG ATCTCTGGAATATAGCTTTTGTGCAGATAGATATGGCAAAAAATTTCTCCCATCTCTGTAGTTGCTGTTCTACTCTGATGTTCTTCTGTGCAGAGCTCTTAGTTTAAATTTGGATCCCATTTGTTTATTTTGGCTTTTGTGTGCAATTGCTTTTGTAGTCATGAAGTCTTGGCCATGCCATGTCTCTGAATGGTAATGCCATGGTTTCTTAGGGTTTTATGGTTTTAAGTCTAACATTTAAGTCTTTAATCCATCTTGAAATTAATTTGTATAAGGTGCAAGGAAGGATCCAGTTTCTGCTTTCTACATATGGCTA
141	512	39.65	5	6p21.1	AluSp/q 1-102 (194-295), MER94 (MER1 Type) 173-309 (134-3), AluJ 433-512 (293-215)	Intergenic telomeric: (355 kb) TRANSCRIPTION INITIATION PROTEIN SPT3 HOMOLOG centromeric: (47 kb) RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 2 (CORE-BINDING FACTOR, ALPHA 1 SUBUNIT) (ACUTE MYELOID LEUKEMIA 3 PROTEIN) (ONCOGENE AML-3) (POLYOMAVIRUS ENHANCER BINDING PROTEIN 2 ALPHA A SUBUNIT).	AAT CG CTTGAACCCAGGAGGGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGAT CG CACCATTGTACTCCAATCTGGGCAACAAGAGTGAAACTCCATCTCAAAAAATAAAGATATTTCTGATATTGCAATGTGTTAATCATCTCAAACTATATATACAAAGTCCCAACAAGGCTAACAGTAGGGTGACATTAATGATGTGGTCCCAAT CG AACATTTTGATAGTGAAGGGGTTCTATTAATAAATAAATTTGTGCTGGAACAATCAGGCTTTTACTACT CG ACTGTCTCAGAAAAATTAAGATACTATAGTCACCCAATAAAGCACCCCATTTCTGATTTGTATATTATGAGCTATTTCTCCATCTGATTTGAACT CG GTGAGCTTAAAGTATTGCTCCAGATCTAACAAATTATCTCAGCCTTAAGACCAAGAGCATCATTTTTTTTTTAAAGAGACAAGGTCTCCCTCTGCAGCCAGGCTGGAAGCCTGGCCTGACCATGATTCAGCTGCAGCCTTG
142	177	50.28	2	9q21.33	LTR16C (LTR/ERV1) 1-122, AluJ 124-175 (1-52)	Intergenic centromeric: (205 kb) BDNF/NT-3 GROWTH FACTORS RECEPTOR PRECURSOR (TRKB TYROSINE KINASE) telomeric: (320 kb) predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> NUCLEAR ATP/GTP-BINDING PROTEIN.	CACAGGGAAGCTGGGTATTTATCCATCCCACTAACAAACCTTTATCTGTTAAGGAT CG TGGTAACTCCCTTAACCTTTCTGGCTGGCCCTTTCTGTGGCAATGCAACCCCTTAAGACAGAGGATGGTCAATGATGGTGGCTCA CG CTTATAATCCAGCACTTTGGAAGCCTGAGGAG
143	224	36.16	1	-	-	-	CACCTATCAATACTTCACTTTTTTCCATATATACTCAAGGAACAAGTGTCTATTTAAAGTGTTTCACTCCACTGTGCTAGGTGCAAGACTATAAAGAGGTGTGAGGATCAACACTTTTATGAAAAACAGTGTCACTTGGATATAGTTTTCAGATGCTAGTGCAAGGAAGCTCTGGTATAT CG GAAAAGGTATTCAACAATAAATTAGGCATGGTTGCTTCCATT
144	393	36.39	2	-	LINE-1P4	-	CATGGTGTATAGGTACCACTTTTCTTTATCCAGCTATCATTTGATGGGAATTTAGGTTGAT

					1-393 (5796-5388)		TGCAATGCTTTGCTATTGTGAATAGTGTGCCATGAACATATATGGGCATTATCTTTATGCTAGAAATGATTCTTATCTCTTTGGATATATACCCGCTAATGGGATGCTGGGTCCAATGGTAGTTTGTCTTTAGGTCTATGACGAAATTCAGTGGCTGAACATTTGACTCTCTCCCAACAGTGTACAAATCTTCTCTTTTCTCCCAACCTCACTCTCATCTATTATTTTGTGACTTTTAAATAAAGCCATTCTGACTAGTATGAAATGGCCTCACATTGTGTTTGTATTGCAATTTCTCCAATGATCAGTATGATTTGTGCTTTT
145	171	43.27	2	5q32	-	In exon 5 and intron 5 of TRANSCRIPTION FACTOR CA150 Size of exon 5: 0.2 kb Size of intron 5: 4.5 kb.	CAGTACCTCAGCCCAACACAGCAATACCTGCTTTTCCACCAGTAATGGTACCTCCTGTTTCTGTTCCCTTCTCTGGCATGCCAATTCACCTTCCAGGTAAACCAACAGATTATAATGGTCTTTTCAGCTATGTTTTCATATTGTGCTAGTTAGTTGTTCTCATGTGCTGTTT
146	178	34.27	0	2q33.3	-	In intron 2 of PARTITIONING-DEFECTIVE 3-LIKE Size of intron: 140 kb.	GCACATTTGTCTTTTCTGACCTGATAGGCTTAGATCATGTCTAAGTCACAATCATCTCATTTACAGCTTTCTAGCACAGGGCTTTGCAGCTAAGAGTGTGAGTAAATACCTTGAACAGATAAACATAGAATATATGAAGATCAAAATGTGTATACATATTACTAAAAAGTTCTTACT
147	192	34.90	0	4q25	-	Intergenic centromeric: (449 kb) PITUITARY HOMEOBOX 2 (RIG BICOID-RELATED HOMEOBOX TRANSCRIPTION FACTOR).	CCAGCATTTCTTTTGCACAAATTAATGCCACACAGTTCCTAGTCACCATCAACTGAGGAAAGTAAATTCATTCTCTCTCTAGTTGATTCATTCTCAATAAATAAAATTTATAAGATTTCACACAAATGGCCTAGCATTTTGTGTTCTGTTCAAAATGCTTCTCTCTCTCTTTCTTTCTACTGCAAGTTGTACCC
148	225	48.44	3	-	LINE-1MD2 6-119 (5924-5802)	-	GTTCAATGAATGGAATCTCTGTATGGCTGAGATGAGTGTCTTTTCATGCGCATGACACCCCTTGAGGCTGTGCAAGCTGATGGCATGTCAACAGTTAGTGTGTTCTCATTTAGGCAATTTGGTCTGTCTATGTTTATTTCAGCCATGTGGTGGATGGTACTTGTCTCTATGCCACTTGTCTTCTGATTGCTGGACTGACTCTCTCGCCCTCTCTGGTG
149	208	50.00	2	12q12	LINE-2 1-208 (2947-3154)	Intergenic centromeric: (83 kb) predicted gene telomeric: (256 kb) CONTACTIN PRECURSOR (GLYCOPROTEIN GP135).	AAGAAATAGCACATGATAGAGTAGGAGGGCTGGGGACAGTCATGAGGTATTGAGGCTTCTTAATACTAGGTCAGGGAGGGCTTTGCCAGTGAAGGCACACATGGGCAATGACCTGGAGGGAAGTACGAGGCACACATGGACAATCACCTGGAGGAAGTGAGGAAGGAGCCGTAGAACTCAGGCTAAACATTTAGGCGGAGAAACT
150	915	49.40	12	12q24.31	MIR 1-165 (12-175), AluJ 322-479 (134-291), Charlie (MER1 Type) 610-700 (90-180), MIR 704-750 (99-145)	Intergenic centromeric: (49 kb) predicted gene with homology to <i>Mus musculus</i> (ACETOACETYL-COENZYME A SYNTHETASE) telomeric: (157 kb) predicted gene.	ACAACCTTAATGGGGTAGGGACTTCTGTTTGTGCCATTTTACAGATACGCAAACTGAGGCCCCAGAGAGGCAATGTGAGGTTTGCAGAGTGCACAGCCAAATAGTATGGGGTGCAAGTGTGAAACCTGGTGTCTGCTGCCAGAGTTGTTCTTAGCTACTACATTCACTTCATGGGCATGAGTTTGTGTGCAATTTATTTGAGTTTGTGAGGCTGATTTGCACCAAGGGATTAAGGATGTGTCTTGAGTCAAGGGAGAGTTGGGTTTGTGAGAAACAGAGTTTGAGAAATTTCCCTCCCAACCCCATTTTATTTAGAAATGAGGCTTGTCTGTTTCCAGGCTGGAGTGCATTTGGCTCAGTCATAGCACACTGCAGCTCAGACTCCCGGCTGAAGACATTTCTTTGCTTGGCCTCTCAAGTGCTGGGATTATAGGTGTTGAGCCACCATGCCTGGCTGAAACCTGTCCCTTCTAAAATGCACCTCTCATTTCCGGAGGCCCGGCTGCTTCCGAGGAGGAGCTTGGCTTTGTGGAAACAGCAGATGTGGAAGGCCCTGGAAGCGGATGGCTGCAAACTTCTCTTTAGTACCCAGGATTTACAAATTCAGAGATGTCAGTGTGCAAAATCCAGTTTCTGCTTTTGTCTCAATAAATTTGGGAGATCTTTGGAATAGTGGTTTGTAGCCCTTGGCTCTGTGAGACTCAGTTTTCACATCTGTAAATGGGCGCGAAATTTCTCCCTGGCTGTCTCATTAACAGGCTGGGTGGTTCAGCAAGAAAGAGGTTTGTAAACAACAACCGCGTGTCTGATGCCATTGTTGTGCTAACACAACAGCCTAACAGCCCTGAGGCTGTAGCACAGGGCACAGTCCAGGACAGGAAAGGAG
151	170	32.94	1	-	LINE-1M3c 3-140 (46-184)	-	TACTTCCATGAAACATCAATTTTGACAAACCATCCATGGACAAGAGAGTACCTCAAGTAGGAAACAGGAGTCCAGTGAAGCAATATAGAATCTGTTTAAAGCCAAAAAATAAATAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAACAACTAAGACTAGATGCGTTGAT
152	732	37.02	7	3q21.3	AluSp/q 332-419 (221-308)	In intron 1 of DOLICHYL-DIPHOSPHOOLIGOSACCHARID E-PROTEIN GLYCOSYLTRANSFERASE 67 KDA SUBUNIT PRECURSOR Size of intron: 6 kb.	CCCTTACATGCGCTTACAGTGCAGAGTAAGTCAGGCTTCAGCTTATTTCCGTAAGTTGTGTGTTCTCACACTGTATAATGTTGCTCTTCTGGCTTTATGGCTGTGAGATAGGATTTGATTTGGGTATAAGACTTGCAGTCACATTAACAGATTTATTTAAATCATTTTCAATTTTGTAGTCCAAAGACACAGTTAAATGGATATATGTGCTATTTTGTACTCTATCCCAAGTGGAACAACTCGATGATAAATTAACAAGGAGATGATATTTTCCCAAGTTGTGTTGAAATCATGATGAGGTTGCTGAAATGTTTTCAGTGGTCTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTGAGACGAGTTTCACTCTCGTTGCCATGCTGGAGTGCAATGGCGCTATCTTGCTCACTGCACAAGTAATGTCAAAATGACAAAATCTTTAGCTATTGTACTAGTTTCAAAAGAAATGCAATGTGTGTATGTGCTGTGATATGTACGCTCCATGAGTATGCTTACGATCACATATTCAAGACCAGAAATCTTTAATCTGAAAGGATTTCCAGGTGAAATTTTTCAGTGTGACACATCAGTAAGAGGAAATATAATCTAAGATCTGGAGTTCTTATCTCATCAGACATTTGCTGTGACCAATAAATCTTTGTCTTTAACTCTCTCTTAATAGAGATTAACTAAAGGCAAGTAGCTAATCTGATTTA
153	483	44.72	6	-	Alpha Satellite 2-274 AluSp 275-483 (20-229)	-	CTCACACAACCTCTCTCTCCCGGTTCAAATGATTCTCCTGTCTCAGCCTCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCATGCACCACCACCTGGCTAATTTTGTATTTTATAGTAGAGACAGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGGCTGGTCTCAAACCTCCCAACCTCAGGTGATCCTCCACCATAGGCTCTCAAGTACTGGGATTACAGGCGAAGGCTCAAGAGAGTCTGAATATCCACTTGCAGCTTTACAAACAGAGTGTTCCTAACTGCTCTATGAAAGAAAGGTTAACTCTGTGAGTTGAACACACACACACAAAGGAGTTTCTGAGAATTATCTGTCTAGCTTTCTTACGAGGATATTTCCCTTTCTACTACTGACCTCAAAAGCGGCTGAATCTCCACTTGCAAATTCACAAAAGAGTGTTCAGAGTCTGCTGTGTAAAGGATCGTTCAACTCTGTGATTTGAATACAC
154	1079	51.99	45	-	-	-	CTGTTGTGACCAAGAGGTTCCCTTGTCTGTTGAAAGAGGAGTGGAGGATCGAAAAAGGCTTTAGCACTCGGTGGTCTGCTGCTGATGAGTATGAGCTGTTACGACTCTCTGGCATGTGATATATTTAGGCGCTAATGCGCAGACAGGGGTACGCTGGGTGCGGTACAGAGGTAAGCCAGGCACTGTGTTATGATAAGAGAGGTATCTCTGACATGCTGGTTGTAATGGGTGAGGTCACTCATGTGTGGAGGTGTACAGAGGTATCTCAGAGGTATGAAGAGTGGAACTGAGGCTCATTTGTAACCAAAACATGATAAATTAACCTGAACACAGTATACAGGCATATTGCAATTTGAGAGACACACGAGCATAAAGTAATCGCAGGTGTTGATTGGGAGAGCTTGCTTAAACAACAGGTGAGACAACAACAGCTAATCAGCTACCACAACAACAGGCTATGACTAGGCAGAGAGGTCGAGTTAACTACACACAGACCTGAGTTCCGCGCTGGGGCCGACAGATAAAAAATAAATAAACAAGATGGAGTACCGTGATTAAATGGACAGTCCAGAGGCATCAGCTATGATGCCAAGTGATCATAGTGTCCAGAGGCGCAGTATGATGGAACAGGACCGCGCCACTACGCTATCACGCGGCACACAGCGTTTAAAGTTAGTAGCTTCCGACAGAGGCGGTTGAAAGGCACAGGTGATGAGTATTCGTTGGCAGACCACTGCTGTTGTTGCGCGGGGGCGGTGTGACACAGAGTCCAAAGCCAGTGGCGAAGAGGTATTGTAGAATTTAGTTTGTAGTCCGAGAGATCGCGCTGGCTACCGCTAACTGGTGTAGCTTCTGTCAGTGGCATTAGCCACTATAGCCAAATCGGTAGCAGCGGTGAACCGGTGCCAAGGTCCAGAGTTTACAGCAAGGATCGGTGGAGTATTTGGGCTCTAGCCATGTATGAGTGGTGTTCGGGTGAACAGCTGAGTAGGCAGGAGGTGGGTCTCAGGGATAGCTTCGCTGCTGGTGCCACGGTG
155	164	31.71	1	6p12.1	MIR 43-99 (199-256)	In intron 3 of BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 5 PRECURSOR Size of Intron: 20 kb.	ATTTACTCGTGTACAAAATGGGTTAAGAAGAAGTAGATATTTCAATTTAAAGAGCTTAGCAAAATGCTTTAACACTGAGTAAGCTCTCAGCAATGTTAGTTTCCACTAATGTTATTTATTTGATTTTCACTTGTCCATCAGGAAATGATGTTTAAATTTTAC
156	377	44.03	3	3q23	MIR58A (MER1 Type) 1-39 (186-224), MIR 320-377 (224-377)	In intron 2 of CALSYNTENIN-2 Size of intron: 227 kb.	ATCTCTCATCCCTTAACAAAAATAGGTTGCTGATACCTGCTCTAGAGCTTTGTTTCATGAGCATCTGGGCCAATCAGCCCTGTGCTGCTGAGATTCAAAATGCAAGGCATAACCCAGAGAAAGGTCACAGTCACAAAATCCAAATTTCCATGGCTGAAGGCATTTCTAATACCTTTCTTTTGATAAAGCTTTATGTTTGTGAAGTACTTTCATGTTTCATTAAGGAAAGATCTTCAAAATCAAAATCCACTGCTTGAAGTGTGCTGCTGCTGCCAGCTGCTGCTGTGACAGCACTCTGAGTATCCAGGCCATTGAGGTTAGGCTCTGGAAATCCCACTGCTGTGCTTAAATTTGGTCCACTGCTTACC

					(18-74)		
157	528	31.63	2	11p12	LINE-1ME2 1-270 (5757-6027), LINE-1MA10 277-430 (6174-6330)	Intergenic	GGAAATGAATAAATGCATTGTTGTATACCTTTCAATGAAATACTACTCAGCAGTAGAAATGGAA ATTCCTATTGTAATTTGCAAGAAAAATAGTTACATCTCACAGTATTTATATGGACTGAATGAA GCCTAGGGGAAGGAAAAAGTATATTGAGTATGACTCCACATATGCAAGTTCAAGAAAACGCT AACTATTTAATTGTGACAAAGAATGTGGCGCTTTCCTTGTACAGAAAGAGTGGGTGATACAA GAAGGGCCATAAGGAAGGTTTATAAGCAGCAGCATGAAAAACTTTGGGGAGTCATTGATAGT TGCATTACCTTGATTGTAGAAGTTCCTCTCAAAGGTGGCATACAAGTGATAAAACTTATCAAA TGTATACATGTTGGTACATACCACCTATTATATTTTAATTATAGTAAAGTGTTAAAAATACA ATATTAGAAAGTTATCTCTATTATGAAGAAAAATAGCACAGTATAAGGAAATAAAGTGGAAT TATGGATGAAAGTAGTTTTTTTGGTAAATATCT
158	372	31.72	5	5q14.1	-	In intron 1 of predicted gene Size of intron: 26 kb.	CGAAGCCATTAAACTGAGCTCAGGATTTGGCTCACTTGTGCTGGCTGGGCCTATTCCACAGG GACTGCCATAAGCATGTGCCACCGGCCAGCTGCCTGCTATCTCCAGTCTTCCCTTTATGCT GGGCTGGCTCTCACACCCCTACTCCCTCCAGCCCTCTGCCTGCATGGGTCTCAGTCCAGCAGG ACAGCCTTAGCAAGCTGCCCCACCACTCTGACCATAGATTGCCCTGGGGCTGAACCCCTGC CTCTGCAGGGCTGGGGTGAAGGCTGTGTGGTCGTGGGAATCGCTGGCAGTGGCGGTGAAG GGCCTGGTGTATGCAGGCTCAGCCTTCTTGGAAAGTGAGCAATGATTGAGGGTGAAGAGGAC
159	599	44.91	5	5q23.2	-	Intergenic Telomeric: (112 kb) predicted gene.	AGCCAGAGGCTTTCTCATATTTCATTAGGGCAGTGCCAGACCTGCAGGGGAGCTACCTGCT GCTTCATCTCTGCTGCCTTTATCAGCTCTGGTGGAGGGAGTCATAGCAGAAAGTGAAGTCAAG AGACCTCTCTGGTGGCCAGAAAGAGAGTCACTCATTTGTTCTTGTAGTGGAGAAAGTCGTGC ACCGCTCAGAAAGTACAGTTGTAATGGCATACTGCTTTCGGGCTTGTATGGGCTTCAGTCT TAGCCCATGTCAAAGTCTGGTGACTTTTCCAAACCGAGTAGTCACACTGAGGTTAAAAAGCA GAGAAAAATACAAAGGGAGCCTTCACAGCCCTTTGGAAACCCACCATACCAACTGTTTGGCC TATGTTCTTGAAGTTTTCATGGAAGAGATTCCAGAAAGAGAGTACTACAGCAATAGACTT CTCTCATTTTCAAATTCGGTGTGGTCTTGAATCTTCTTGTCAACAGGAGAACTCACTCT TTCAAATGGGAAATAAGCTCTTTTCTGATCTTTCTTAATAGAAAGTAGGCCAAAGGTTTCTC TAGGACAGCAATGTCAATTTGAATTTTCATGGTTACCCATGG
160	241	39.83	3	12p12.1	-	Intergenic telomeric: (70 kb) TRANSFORMING PROTEIN P21A centromeric: (198 kb) predicted gene.	GAATTTGCAAGTCTAATTAATAAATCCCCAGAGTCGGTCTTTAAGTCTCAGCCCTAATTCAT TTCAGAAAGCCCTGTGGTTTAAAGTGATTATATTTGCTTCTGCAAGAGCTGTGAGAAAG CTCTTGGCAATCACATGCTTGTACAAATACAATTTACAGATCAATCAGAGAAAAAGTACCG GTAGCAACTCTGGGGGAAGAAACCATGAAATGTCCCAACCCCATACCGTTCTCTA

^a (bp). ^b (%). ^c Number of CpGs. ^d Genomic localization, a dash indicates the failure to localize the clone. ^e The type of repetitive element, its location within the clone and the portion of the consensus sequence represented (in parentheses) are indicated, a dash indicates the absence of repetitive elements. ^f The genomic position of the clone. For clones with intergenic positions, centromerically and telomerically located gene with the distances is given. The location of predicted MAR sequences are indicated, distances larger than 500 kb are not described. ^g Sequences of the clones, CpG-sites and MAR-sequences are shown in bold, repetitive sequences are underlined.

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung sequenzierter Klone. Angegeben wurden Fragmentlänge, GC-Gehalt, Anzahl der CpG-Stellen, chromosomale Lage, Typ und Lage von repetitiven Sequenzen. Die Daten wurden mittels der *Ensembl*-Datenbank, dem Repeatmasker Programm (Smit 1999), dem S/MAR Test (Genomatix) und dem MAR Wiz 1.5 (Futuresoft) erhoben.

4 Diskussion

MeCP2/ARBP gehören zu einer Proteinfamilie mit konservierter DNA-Bindungsdomäne. Das nukleäre Repressorprotein ARBP wurde in einem *Southwesternblotting-Assay* aufgrund seiner Bindung an die 5'-gelegene MAR-Region des Hühnerlysozymgens identifiziert (von Kries et al., 1991). Zelluläre Extrakte wurde in weiteren *Southwesternblotting-Assays* mit MAR-enhaltenden Sonden aus Maus, Mensch und *Drosophila* inkubiert. ARBP wies dabei eine starke Affinität zu den untersuchten MAR-Regionen auf (von Kries et al., 1991). Mit DNase-I-*Footprinting*-Analysen wurde in der MAR-Region des Hühnerlysozymgens die von ARBP gebundene Sequenz lokalisiert. Diese Sequenz besteht aus einem zentralen 5'-GGTGT-3'-Motiv, das von AT-reichen Sequenzen flankiert ist (Buhrmester et al., 1995). Die Bindung von ARBP an das 5'-Lysozymgen-MAR des Huhns wurde in Gel-Verzögerungstests durch Mutationen im zentralen 5'-GGTGT-3'-Motiv bestätigt (Buhrmester et al., 1995). Durch Analyse von Deletionsmutanten wurde die MAR-Bindungsdomäne auf den N-terminalen Bereich von Aminosäure 71 - 195 eingegrenzt (Weitzel et al., 1997).

Zeitgleich wurde das Ratten-Homologe von ARBP beschrieben. Es wurde anhand seiner Bindungsaffinität zu methylierter DNA ebenfalls im *Southwesternblotting-Assay* identifiziert (Lewis et al., 1992). Es wurde Methylcytosin-bindendes Protein 2 (MeCP2) genannt und nachfolgend aus diversen Vertebraten wie Maus, Mensch und *Xenopus laevis* kloniert (Meehan et al., 1992). Es wurde gezeigt, dass MeCP2 an Sequenzen mit einer einzigen symmetrisch methylierten CpG-Stelle binden kann. Das ARBP des Huhns und das homologe MeCP2 des Menschen besitzen im N-terminalen Bereich eine Sequenzidentität von 66,8 %, wenn vier Sequenzblöcke mit Wiederholungen einer Aminosäure im Hühnerprotein ausgespart wurden (Weitzel et al., 1997). Die Methyl-CpG-bindende Domäne des Proteins wurde auf die Aminosäuren 78 - 162 eingegrenzt. Sie liegt damit innerhalb der für ARBP beschriebenen MAR-bindenden Domäne.

4.1 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von MeCP2

Immunfluoreszenzuntersuchungen von murinen Metaphasechromosomen mit Antikörpern gegen MeCP2 zeigten eine starke Akkumulation des Proteins im pericentromeren Heterochromatin

(Lewis et al., 1992). Dort wurde mit einem Methylcytosin-erkennenden Antikörper ebenfalls eine starke Akkumulation von methylierten Cytosinen detektiert (Miller et al., 1974). In der Maus kolokalisiert MeCP2 folglich mit Methylcytosin *in vivo*. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Deletion der Methyl-CpG-bindenden Domäne von MeCP2 die Lokalisation des Repressors an Heterochromatin unterbindet (Nan et al., 1996). Die Methyl-CpG-bindende Domäne von MeCP2 ist somit für die Lokalisation des Proteins entscheidend. Analysen im humanen System standen jedoch bislang aus.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht, wie MeCP2 in Relation zu methylierten Cytosinen in humanen Interphasekernen und auf Metaphasechromosomen verteilt ist. Hierfür wurde ein selbst generierter Antikörper gegen MeCP2 aus Huhn verwendet. Die Immunfluoreszenzmikroskopie von humanen Metaphasechromosomen ergab eine uniforme Verteilung von MeCP2 über die Chromosomenarme (Abbildung 8). Methylierte DNA wurde hingegen konzentriert im juxtacentromeren Heterochromatin von Chromosom 1, 9 und 16 sowie dem langen Arm des Y-Chromosoms nachgewiesen. Das juxtacentromere Heterochromatin enthält klassische Satelliten-DNA, die hoch methyliert ist (Miller et al., 1974). Daher ist bemerkenswert, dass MeCP2 keine Bindungspräferenz für diese Bereiche aufwies. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden die Analysen an humanen Interphasekernen mit konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie wiederholt. Nach Detektion mit Antikörpern gegen MeCP2 bestätigte sich die uniforme Verteilung des Proteins, die bereits auf den Metaphasechromosomen beobachtet wurde. Die Fluoreszenzsignale wiesen ein fein gesprenkeltes, über den Kern verteiltes Muster auf. Nach Detektion mit Anti-Methylcytosin-Antikörpern wurden erneut Bereiche mit stark akkumulierter, methylierter DNA sichtbar. Die akkumulierten Fluoreszenzsignale repräsentieren wahrscheinlich juxtacentromere Bereiche, die aufgrund der starken Methylierung klassischer Satelliten-DNAs von den gegen Methylcytosin gerichteten Antikörpern bevorzugt dekoriert werden (Abbildung 9). Humane Zellen wiesen somit eine gänzlich andere MeCP2-Verteilung im Zellkern auf als von Lewis et al. (1992) untersuchte Mauszellkerne.

Um einen direkten Vergleich der Verteilung von MeCP2 in humanen und murinen Zellkernen zu ermöglichen, wurden humane MCF-7-Zellen und murine NIH-3T3-Zellen parallel mit Anti-MeCP2-Antikörpern gefärbt. Die Gegenfärbung der DNA erfolgte mit DAPI. In humanen Zellen war erneut eine fein gesprenkelte, gleichmäßige Verteilung von MeCP2 im gesamten Kern unter

Aussparung der Nukleoli sichtbar (Abbildung 10). Die DNA-Färbung mit DAPI zeigte um die Nukleoli stärker fluoreszierende Schalen von Heterochromatin. Das heller fluoreszierende Heterochromatin umfasst in erster Linie methylierte DNA. Da diese Bereiche mit Anti-MeCP2-Antikörpern nicht stärker gefärbt wurden, lässt sich erneut folgern, dass humanes MeCP2 nicht bevorzugt im Heterochromatin von MCF-7-Zellen bindet.

Nach Immunfluoreszenzfärbung von murinen Zellen mit Anti-MeCP2-Antikörpern wurden hingegen starke Fluoreszenzsignale meist angrenzend an den Nukleoli detektiert. Die Nukleoli selbst blieben ausgespart. Der übrige Kern zeigte eine ebenfalls fein gesprenkelte, gleichmäßige Verteilung von MeCP2. Mit DAPI wurde in murinen Zellkernen wiederum Akkumulationen starker Fluoreszenz detektiert, die kompaktes centromeres Heterochromatin darstellen. Diese Akkumulationen starker DAPI-Fluoreszenz deckten sich mit den Bereichen, in denen murines MeCP2 ebenfalls akkumuliert nachgewiesen wurde. Es handelt sich um centromere Bereiche stark methylierter Maus-Satelliten-DNA, die Miller et al. (1974) bereits auf murinen Metaphasechromosomen beschrieben haben und an die murines MeCP2 bevorzugt bindet (Akhmanova et al., 2000). Die Untersuchungen von Lewis et al. (1992) zur Kollokalisierung von murinem MeCP2 mit methylierter DNA konnten somit betätigt werden. Akhmanova et al. (2000) stellten in murinen Neuronen keine Kollokalisierung von MeCP2 und ribosomaler DNA fest. Die Bereiche hoher MeCP2-Konzentration grenzten ebenfalls nur direkt an die Nukleoli, die ribosomale DNA enthalten, an. Akhmanova et al. (2000) bewiesen mit einer Kombination aus Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und Immunfluoreszenz, dass methylierte Cytosine in centromerer DNA muriner Neuronen lokalisiert sind. In Kollokalisierungsstudien von MeCP2 und Maus-Satelliten-DNA wurde festgestellt, dass MeCP2 und die centromere Satelliten-DNA weitestgehend kollokalisieren (Akhmanova et al., 2000). Ausgenommen von dieser Kollokalisierung war ein perinukleolärer Heterochromatinring, in dem MeCP2, jedoch keine Satelliten-DNA detektiert wurde (Akhmanova et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde in NIH-3T3 Mausfibroblasten kein perinukleolärer Heterochromatinring, sondern nur centromeres Heterochromatin detektiert, das ebenfalls mit MeCP2 kollokalisierte.

Demgegenüber ist die nukleäre Verteilung von MeCP2 und methylierter DNA in humanen MCF-7-Zellen nicht analog. Humanes MeCP2 bindet nicht an stark methylierter klassischer Satelliten-DNA des juxtacentromeren Heterochromatins und auch nicht bevorzugt an kompaktes Heterochromatin, das in Schalen um die Nukleoli herum detektiert wurde. Diese Ergebnisse sind

direkte cytologische Beweise für eine gezielte Verteilung von MeCP2. MeCP2 erkennt folglich beim Menschen nur eine spezifische Untergruppe methylierter DNA-Sequenzen oder nicht nur methylierte DNA.

4.2 Chromatin-Immunpräzipitation von MeCP2

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) von MeCP2 eine Bibliothek zu erstellen, in der MeCP2-gebundene DNA-Sequenzen angereichert sind. Die Methode der Chromatin-Immunpräzipitation wurde bisher in erster Linie zur Untersuchung einzelner Promotorbereiche eingesetzt. So zeigten Nguyen et al. (2001) am Beispiel dreier CpG-Inseln in humanen Krebszelllinien, dass MeCP2 an methylierte CpG-Inseln sowohl in Promotoren als auch in Exons bindet. Die Bindung von MeCP2 in Exons interferierte jedoch nicht mit der Transkription des entsprechenden Gens. MeCP2 ist an der Regulation von *imprinted* Genen beteiligt. Gregory et al. (2001) wiesen mittels Chromatin-Immunpräzipitation nach, dass MeCP2 exklusiv mit dem methylierten maternalen Allel des *imprinted* Gens *U2af1-rs1* assoziiert ist, jedoch nicht mit dem nicht-methylierten paternalen Allel. Drewell et al. (2001) zeigten, dass MeCP2 selektiv an die differentiell methylierte Domäne (DMD) des paternalen Allels des *imprinted* Gens *H19* bindet. In Reporter-gen-Assays erfolgte die Bindung an die DMD des *H19* Gens methylierungsabhängig, die Repression des Reporters Histondeacetylase-abhängig (Drewell et al., 2001). In der Dickdarmkrebszelllinie HCT-15 wurden die Promotorregionen der inaktiven Gene *p14* und *p16* untersucht (Magdinier und Wolffe, 2001). Beide Promotoren sind in vielen malignen Geweben hypermethyliert. ChIP-Analysen mit Antikörpern gegen MeCP2 und MBD2 zeigten, dass in diesem Fall nur MBD2 mit den methylierten Promotoren von *p14* und *p16* assoziiert ist und die Gene inaktiviert. MeCP2 band nicht an diese Promotoren. El-Osta und Wolffe (2001) wiesen mit ChIP-Experimenten nach, dass methyliertes Chromatin des *Multi-Drogen-Resistenz-Gens 1 (MDR1)* mit MeCP2 stark angereichert ist. Im Gegensatz dazu wurde in Zellen, in denen *MDR1* aktiv ist, keine Assoziation von MeCP2 mit dem Promotor dieses Gens gefunden. Untersuchungen von MBD2- und MBD3-defizienten und gleichzeitig Drogen-sensitiven Zellen zeigten, dass der Promotor des *MDR1*-Gens hypermethyliert und mit MeCP2 und deacetylierten Histonen assoziiert ist (El-Osta et al., 2002). Eine Behandlung der Zellen mit dem Histondeacetylase-Inhibitor TSA induzierte die Acetylierung der Histone H3 und H4, die Transkription des *MDR1*-Gens hingegen wurde erst

nach zusätzlicher Behandlung mit dem Demethylierungsreagenz 5-Azacytidin aktiviert. Der Promotor des *MDR1*-Gens Drogen-resistenter Zellen ist hingegen hypomethyliert, transkriptionell aktiv und relativ frei von MeCP2 (El-Osta et al., 2002). Ghoshal et al. (2002) zeigten in murinen Lymphosarcomazellen durch ChIP-Assays mit Antikörpern gegen MBD-Proteine, dass nur MeCP2 mit dem methylierten Promoter des reprimierten *Metallothionein-I*-Gens (*MT-I*) assoziiert ist. Durch TSA-Behandlung wurde die Bindung von MeCP2 an den Promotor signifikant erhöht, die Expression des Gens wurde hingegen nur durch Inkubation mit dem Demethylierungsreagenz 5-Azacytidin erhöht (Ghoshal et al., 2002). Majumder et al. (2002) führten die Studien des *MT-I*-Gens in Lebertumoren der Ratte fort. In diesen Tumoren war die Expression der mRNA von MeCP2 achtfach, von DNMT1 fünffach, von DNMT3a zehnfach und von DNMT3b vierfach erhöht gegenüber dem normalen Lebergewebe. Majumder et al. (2002) konnten analog der Arbeiten mit murinen Lymphosarcomazellen durch ChIP-Assays mit Antikörpern gegen MBD-Proteine zeigen, dass auch in Lebertumoren der Ratte nur MeCP2 mit dem methylierten Promoter des reprimierten *MT-I*-Gens assoziiert ist. In den genannten Arbeiten wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitation die Bindung von MBD-Proteinen an spezifische Sequenzen analysiert. Meist wurde eine direkte Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus eines Promotors, der Bindung von MeCP2 daran und der Repression des zugehörigen Gens gefunden. Die erwähnten Arbeiten deuten jedoch auch darauf hin, dass MeCP2 nicht immer an der Repression von Genen mit methyliertem Promotor beteiligt ist. Spezifische DNA-Sequenzen oder unbekannte Kofaktoren scheinen für die Bindung von MeCP2 an methylierte DNA benötigt zu werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode erstmals zur Erstellung einer Bibliothek benutzt, mit deren Hilfe ein Überblick über mögliche DNA-Bindungssequenzen von humanem MeCP2 geschaffen wurde.

In der Literatur ist beschrieben, dass cis-Platin in Zellkulturen Kernmatrixproteine mit der DNA vernetzt (Samuel et al., 1998; Ferraro et al., 1995). Da das Hühnerhomologe von MeCP2 als Matrix-bindendes Protein identifiziert wurde (von Kries et al., 1991), schien cis-Platin als *Crosslink*-Reagenz für das vorliegende Projekt besonders geeignet zu sein. Insbesondere vernetzt cis-Platin keine Histone, so dass die Vernetzung recht selektiv zu sein versprach. Die für spätere Sequenzanalysen äußerst wichtige Reversion der Verbindung zwischen DNA und Protein ist mit dieser Methode ebenfalls möglich. Die Versuche mit dem *Crosslink*-Reagenz cis-Platin wurden jedoch nach zeitaufwändigen Zytotoxizitätstests an zwei Zelllinien eingestellt, da keine Vernetzung von MeCP2 mit DNA durch cis-Platin festgestellt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde daraufhin statt cis-Platin das *Crosslink*-Reagenz Formaldehyd verwendet, das schon oft für die Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen eingesetzt wurde. So wurde beispielsweise SATB1, ein kernlokalisierter transkriptioneller Repressor (Kohwi-Shigematsu et al., 1997; Liu et al., 1997; de Belle et al., 1998), das *Scaffold/Matrix Attachment Region Binding Protein* SAF-A (Göhring und Fackelmayer, 1997), Polycomp-Gruppen-Proteine (Orlando und Paro, 1993), das Hitzeschock-Protein hsp70 (Solomon et al., 1988) und viele weitere Proteine mit dieser Technik erfolgreich an DNA gebunden und mittels Immunpräzipitation untersucht. Der Einsatz von Formaldehyd als *Crosslinker* erwies sich auch in der vorliegenden Arbeit als erfolgreich. Formaldehyd vernetzt sowohl DNA und Protein miteinander als auch DNA mit DNA sowie Protein mit Protein (Orlando et al., 1997). Werden Zellen zu lang mit Formaldehyd inkubiert, so wird die Vernetzung zu stark und die Reversion schwierig. Selbiges gilt für den Einsatz hoher Konzentrationen an Formaldehyd. Die Vernetzung von MeCP2 mit DNA wurde mit der in der Literatur beschriebenen Endkonzentration von 1% Formaldehyd im Zellkulturmedium durchgeführt (Orlando und Paro, 1993; Göhring und Fackelmayer, 1997; Kohwi-Shigematsu et al., 1997; de Belle et al., 1998). Die kinetischen Experimente zeigten, dass bereits nach einer Inkubationsdauer von nur fünf Minuten fast 99 % des detektierbaren MeCP2 vernetzt war. Somit wurde diese Inkubationsdauer für alle weiteren Experimente verwendet.

Aus den Formaldehyd-vernetzten Zellen wurden die DNA-Protein-Komplexe extrahiert und durch eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Die DNA-Protein-Komplexe wurden aufgrund ihrer Dichte von reinen DNA- bzw. reinen Protein-Komplexen getrennt. Durch die Verwendung aufgereinigter DNA-Protein-Komplexe in der anschließenden Immunpräzipitation wurden keine Antikörper mit freiem MeCP2 abgesättigt, folglich war eine hohe Effizienz der Chromatin-Immunpräzipitation gegeben. Nach Reversion der Vernetzung zwischen DNA und Protein wurde die DNA kloniert und sequenziert. Die Proteinfraction des Immunpräzipitats und des nicht präzipitierten Überstandes wurden im Westernblot analysiert. Im Präzipitat wurde erwartungsgemäß eine starke Akkumulation von MeCP2 detektiert, im Überstand des Präzipitats wurde hingegen eine deutlich schwächere MeCP2-Bande sichtbar. Die ChIP von MeCP2 verlief folglich effizient. Es ist möglich, dass Formaldehyd-vernetzte MeCP2-DNA-Komplexe teilweise nicht von dem zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper, der gegen ein C-terminales Peptid von MeCP2 gerichtet ist, gebunden werden konnten. Diese Epitope des Proteins werden jedoch nach Reversion der Formaldehyd-Vernetzung wieder frei und können im Westernblot im

Überstand des Immunpräzipitats detektiert werden. Die möglicherweise daran gebundenen DNA-Fragmente gingen zwangsläufig für die folgende Klonierung verloren. Da ein polyklonaler Antikörper verwendet wurde, war jedoch generell eine quantitative ChIP nicht möglich.

Die Immunpräzipitate der unspezifischen Antikörper und Anti-Sp1-Antikörper zeigten im Westernblot keine MeCP2-Bande. Erwartungsgemäß wurde nur im Überstand des Präzipitats der unspezifischen Antikörper und der Anti-Sp1-Antikörper MeCP2 detektiert. Die Bedingungen der Immunpräzipitation waren folglich hoch spezifisch für MeCP2. Als Positivkontrolle wurde unter den gleichen Bedingungen der Transkriptionsfaktor Sp1 präzipitiert. Sp1 war im Präzipitat gerade eben nachweisbar, während im Überstand keine Sp1-Bande detektiert wurde (Abbildung 15B). Die Sp1-Bande der *Crosslink*-Fraktion (Input) war sehr schwach, so dass die Konzentrierung des Proteins im Immunpräzipitat offensichtlich war. Dies ist ein weiterer Beleg für die hohe Stringenz der in dieser Arbeit gewählten Bedingungen.

Um von MeCP2 gebundene DNA-Sequenzen zu selektionieren, ist die Spezifität der Immunpräzipitation entscheidend. Deshalb wurde nicht nur auf Proteinebene die Stringenz des Verfahrens kontrolliert, sondern zusätzlich auch auf DNA-Ebene. So wurde überprüft, ob bei Präzipitation mit einem unspezifischen Antikörper ebenfalls DNA-Fragmente kloniert werden können. Es wurde jedoch bei paralleler Behandlung von Anti-MeCP2- und unspezifischen Antikörper-Präzipitat nur Klone aus dem Anti-MeCP2-Präzipitat erhalten. Hierdurch wurde deutlich, dass es unter den gewählten Bedingungen keine unspezifische DNA-Bindung – weder an die Protein-A-Sepharose, noch an den Antikörper – gab. Die Immunpräzipitation mit Anti-MeCP2-Antikörpern war somit sehr stringent.

Die erstellte Bibliothek der mit Anti-MeCP2-Antikörpern präzipitierten und sequenzierten Klone ist als eine Anreicherung von MeCP2-gebundenen DNA-Fragmenten zu bewerten. MeCP2 ist ein sehr abundantes Kernprotein, Schätzungen gehen von etwa 100.000 bis 500.000 Molekülen pro Zellkern aus (von Kries et al., 1991; Lewis et al., 1992). Es ist daher gut möglich, dass MeCP2 durch Formaldehyd auch „unspezifisch“ mit DNA vernetzt wurde, die sich in räumlicher Nähe befand. Diese „unspezifisch“ gebundene DNA kann im Verlauf des Experiments nicht von der durch MeCP2 spezifisch gebundenen DNA unterschieden werden. Es gibt jedoch keine geeignetere Möglichkeit, um Protein-DNA-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen. Die Bibliothek wurde mit Hilfe der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 erstellt. Tumorzelllinien haben ein von

normalen Zellen abweichendes Methylierungsmuster. Daher sind die Ergebnisse spezifisch für diese Zellen zu werten.

4.3 Charakteristika sequenzierter Klone

Nach der Sequenzierung der Klone wurden Charakteristika wie GC-Gehalt, CpG-Dichte und Gehalt an repetitiven Sequenzen untersucht. Es wurde festgestellt, dass der GC-Gehalt der Fragmente zwischen 29 % und 64 % variierte. Aufgrund der Variabilität dieses Parameters kann vermutet werden, dass MeCP2 an sehr heterogene Sequenzen bindet. Der GC-Gehalt aller Fragmente lag im Durchschnitt bei 43,1 % und damit etwa 2 % über dem Durchschnitt des humanen Genoms (Lander et al., 2001). Dies zeigt eine mögliche Präferenz von MeCP2 für GC-reichere Sequenzen. Simulationen zeigten, dass der erhöhte GC-Gehalt nicht statistisch signifikant ist (Volker Schoder, pers. Mitteilung). Eine biologische Bedeutung wird dennoch nicht ausgeschlossen.

MeCP2 bindet an methylierte DNA *in vitro* (Meehan et al., 1992). Im humanen Genom sind CpG-Stellen meist methyliert (Yoder et al., 1997). Die Ausnahme sind CpG-Inseln, die Bereiche erhöhter CpG-Dichte vor Genen darstellen (Bird, 1992). CpG-Dinukleotide sind im Genom unterrepräsentiert. Aufgrund des GC-Gehaltes des humanen Genoms sollten etwa 4 % aller Dinukleotide CpGs sein, tatsächlich sind es jedoch nur 0,8 %. Vermutlich sind CpG-Dinukleotide unterrepräsentiert, weil methylierte CpG-Stellen Hotspots für Mutationen darstellen (Rideout et al., 1990). Sie können durch spontane Desaminierung zu TpG-Stellen mutieren (Frederico et al., 1990). Mit einer Säule, an die die MBD von MeCP2 gebunden war, wurde gezeigt, dass DNA-Fragmente methylierter und unmethylierter CpG-Inseln voneinander getrennt werden können, da die methylierten Fragmente stärker gebunden werden (Shiraishi et al., 1999a). Aus diesem Grund ist eine hohe Affinität von MeCP2 zu CpG-reichen Sequenzen auch *in vivo* denkbar. In den sequenzierten Klonen waren 2,52 % aller Dinukleotide CpGs, dieser Anteil ist somit im Vergleich zum Genom stark erhöht. Insgesamt wiesen 91 % der Klone mindestens eine CpG-Stelle auf. Dies ist konsistent mit früheren Beobachtungen: MeCP2 wurde durch die Eigenschaft an methylierte DNA zu binden charakterisiert und benannt (Lewis et al., 1992).

Es wurden 14 Klone sequenziert, die keine CpG-Stelle enthielten. Die Bindung von weiteren Sequenzen durch MeCP2 ist nach den eingangs geschilderten immunzytologischen Ergebnissen durchaus möglich. Schließlich ist die nukleäre Verteilung von 5'-Methylcytosin nicht mit der von MeCP2 identisch (Abbildung 8). Wie bereits erwähnt, kann generell nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der immunpräzipitierten, klonierten DNA-Fragmente falsch positiv ist und nur durch räumliche Nähe zwischen MeCP2 und DNA vernetzt wurde. Die Klone ohne CpG-Stellen könnten solche unspezifischen DNA-Fragmente darstellen.

4.3.1 Repetitive Elemente in den sequenzierten Klonen

Die sequenzierten Klone wurden mit dem RepeatMasker-Programm (<http://repeatmasker.genome.washington.edu>) auf den Gehalt an repetitiven Elementen untersucht, da 60 - 90 % aller methylierten CpG-Stellen in repetitiven Elementen liegen (Lander et al., 2001). Es wurden in 94 Klonen (60,6 %) repetitive Sequenzen gefunden. Das häufigste repetitive Element innerhalb der erstellten Bibliothek ist das Alu-Element. 50 Klone (32,3 %) enthielten Alu-Sequenzen. Teilweise enthielt ein Klon auch mehrere Alu-Elemente. Alu-Elemente akkumulieren in Gen-reichen Regionen (Smit, 1999) und haben möglicherweise physiologische Funktionen. So wird unter zellulären Stressbedingungen vermehrt Alu-RNA produziert, die die Interferon-induzierbare RNA-abhängige Proteinkinase (PKR) inhibiert und infolgedessen die Proteintranslation induziert (Chu et al., 1998). Die Insertion von Alu-Elementen in das humane Genom und die durch homologe Rekombination zwischen Alu-Elementen entstehenden Deletionen im humanen Genom verursachen schwere Erkrankungen (Deininger und Batzer, 1999). Es wurde postuliert, dass Methylierung ein Abwehrsystem des Genoms gegen transposable Elemente ist (Yoder et al., 1997). Diese Theorie passt zu den hier gefundenen Ergebnissen der Alu-Elemente. In der Mehrheit der immunpräzipitierten Fragmente wurden repetitive transposable Elemente detektiert. Die Bindung von MeCP2 an methylierte DNA kann über die Rekrutierung des Ko-Repressorkomplexes um mSin3A zur lokalen Repression von Genen führen (Bird und Wolffe, 1999; Strätling und Yu, 1999). Schon 1993 wurde *in vitro* gezeigt, dass die Expression von Alu-Elementen durch DNA-Methylierung reprimierbar ist (Liu und Schmid, 1993). Die Transfektion der transkriptionellen Repressordomäne von MeCP2 allein führt jedoch nicht zur Repression der Alu-Transkription (Yu et al., 2001). Ein Konstrukt aus der 7SL-Aktivator-domäne und der AluSx-Sequenz wurde methyliert und unmethyliert in 293HEK-Zellen transfiziert. Die Expression des methylierten

Konstrukts wurde gegenüber dem unmethylierten stark reprimiert. Bei Kotransfektion eines MeCP2-kodierenden Vektors wurde die Expression des unmethylierten Alu-Konstrukts leicht reduziert, die Repression des methylierten Alu-Konstrukts jedoch vollständig aufgehoben (Yu et al., 2001). In diesen Experimenten reprimierte das überexprimierte MeCP2 möglicherweise weitere transkriptionelle Repressoren, so dass es zu der Aufhebung der Repression der Alu-Expression kam. Das überexprimierte MeCP2 könnte auch mit einem unbekannten Repressormolekül um methylierte Bindungsstellen konkurrieren und so die Repression der Expression aufheben. Die 7SL-Aktivator-domäne des Reporterkonstrukts könnte in diesen Experimenten ebenfalls eine aktivierende Rolle gespielt haben. Aus den Transfektionsexperimenten wurde deutlich, dass MeCP2 die Alu-Expression beeinflussen kann. Eine direkte Bindung von MeCP2 an methylierte Alu-Elemente wurde nicht gezeigt. Die an eine feste Matrix gebundene Methyl-CpG-bindende Domäne von MeCP2 bindet *in vitro* Alu-haltige DNA-Fragmente besonders fest (Shiraishi et al., 1999b). Mit der hier verwendeten Chromatin-Immunpräzipitation wurde offensichtlich, dass MeCP2 bevorzugt Sequenzen mit Alu-Elementen bindet. Der Anteil an Nukleotiden, die den Alu-Sequenzen zuzuordnen sind, liegt in den katalogisierten Klonen um über 4 % höher als im humanen Genom. Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant ($p < 0.00001$). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass MeCP2 *in vivo* an Alu-Elemente bindet und an der Regulation dieser Elemente beteiligt ist.

Es wurden zehn Klone (6,5 %) mit Sequenzen der inaktiven *Mammalian-wide Interspersed Repeats* (MIRs) detektiert. Die nicht autonomen MIR-Elemente stammen von tRNAs ab (Smit und Riggs, 1995) und waren perfekt an die reverse Transkriptionsmaschinerie von LINE-2-Elementen angepasst (Smit, 1996). Die MIRs hatten die gleiche 50 bp-Sequenz am 3'-Ende (Smit et al., 1995). Als die LINE-2-Elemente vor ca. 80 Millionen Jahren ausstarben, wurden die MIR-Elemente ebenfalls inaktiv (Lander et al., 2001). Der Klon 16 zeigt diese Verbindung auf: Er enthält sowohl einen Teil einer LINE-2-Sequenz als auch ein MIR-Fragment. MIR-Sequenzen sind heute nur noch als fossile DNA-Fragmente im humanen Genom zu bewerten. Sie liegen in der erstellten Bibliothek im Vergleich zum humanen Genom nicht angereichert vor, stellen daher mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Ziel von MeCP2 dar.

In 28 sequenzierten Klonen (18,1 %) wurden LINE-Sequenzen gefunden, hauptsächlich aus der LINE-1-Familie stammend. LINE-Elemente sind autonome Retrotransposons (Smit, 1996), die als „erfolgreichste Erfindung“ im eukaryotischen Genom gelten (Furano, 2000). Sie stellen über

20 % des humanen Genoms (Lander et al., 2001). Nur der LINE-1H-Elemente sind im humanen Genom noch aktiv, dabei handelt es sich um eine Subgruppe der LINE-1-Familie. Es wurde jedoch kein LINE-1H-Element detektiert. Aktive LINE-1H-Elemente sind höchst selten im Genom (Gesamtanzahl etwa 60 bis 100), so dass die Wahrscheinlichkeit sehr gering war, in 155 untersuchten Klonen ein solches zu finden. Bei den detektierten LINE-Fragmenten handelte es sich um kurze Fragmente, die auch im humanen Genom kaum wesentlich länger vorliegen. Es wurde in der erstellten Bibliothek kein vollständiges LINE-Element gefunden, alle stammen von evolutionär alten, retrotranspositionsinaktiven LINE-Elementen. 16 LINE-Fragmente stammen aus dem 3'-Bereich der LINE-Konsensussequenz (Abbildung 18). Vier LINE-Fragmente enden mit vier bis sechs Adenosinen, dem wahrscheinlichen Poly-A-Schwanz des Elements. Aufgrund des TPRT-Mechanismus der Transposition von LINE-Elementen liegen im Genom wesentlich mehr LINE-Kopien des 3'-Bereichs vor. Nur zwei Klone enthielten LINE-Fragmente des 5'-untranslatierten Promotorbereichs, der in einer stark methylierten CpG-Insel liegt (Woodcock et al., 1997).

Der Anteil an Nukleotiden, die der letzten zumindest noch teilweise aktiven LINE-1-Familie zuzuordnen sind, ist in der Bibliothek gegenüber dem humanen Genom halbiert. Dieser Unterschied ist ebenfalls statistisch hoch signifikant ($p < 0,00001$). Es wurde bereits gezeigt, dass der LINE-1-Promotor, so er methyliert vorliegt, durch MeCP2 reprimiert wird (Yu et al., 2001). Wegen seines hohen Gehalts an meist methylierten CpG-Stellen ist dieser Bereich ein mögliches Ziel für die MeCP2-vermittelte transkriptionelle Repression. Die ebenfalls untersuchten MBD-Proteine MBD1v1 und MBD2b konnten die Expression des LINE-1.2-Reporterkonstrukts weder unmethyliert noch methyliert signifikant reprimieren (Yu et al., 2001). In Retrotranspositionsexperimenten wurde hingegen gezeigt, dass die transkriptionelle Repressordomäne (TRD) von MeCP2 die Retrotransposition von LINE-1.2 reprimiert. Daher wurde die TRD von MeCP2 mit Gal4 fusioniert und dadurch zu dem Gal4-LINE-1.2-Reporterkonstrukt dirigiert (Yu et al., 2001). In der erstellten Bibliothek gibt es jedoch keine Anzeichen für eine spezifische Anreicherung von LINE-Sequenzen, daher besteht offenbar kein Zusammenhang zwischen MeCP2 und LINE-Elementen *in vivo*. Es ist denkbar, dass die hier erstellte Bibliothek die native Zellsituation wesentlich besser widerspiegelt, als die in der Literatur beschriebenen Transfektionsexperimente. Die in der vorliegenden Arbeit und in den Transfektionsexperimenten jeweils verwendeten unterschiedlichen Zelllinien könnten ebenfalls

die konträren Ergebnisse erklären. Eine spezifische Regulation der LINE-Retrotransposons durch MeCP2 wird zumindest für die hier verwendete MCF-7-Zelllinie ausgeschlossen.

Die erstellte Bibliothek enthält 13 Klone (8,4 %) mit Sequenzen von LTR-Retrotransposons. Im humanen Genom werden LTR-Elemente heute nur noch als evolutionäre Fossile betrachtet, da bei den meisten die Gene durch Rekombination zwischen den *Long Terminal Repeats* verloren gegangen sind. Der Nukleotidanteil der LTR-Retrotransposons in der Bibliothek ist gegenüber dem des humanen Genoms um 40 % reduziert. Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant ($p < 0,00001$). Die Sequenzen der LTR-Retrotransposons liegen nach der Chromatin-Immunpräzipitation folglich stark unterrepräsentiert vor und stellen daher kein Bindungsziel von MeCP2 dar.

In der Bibliothek sind außerdem elf Klone (7,1 %) mit Sequenzen von DNA-Transposons enthalten. Der Nukleotidanteil der DNA-Transposons in der Bibliothek ist gegen über dem des humanen Genoms nur geringfügig reduziert. Die sehr geringe Anzahl von Klonen mit Sequenzen von DNA-Transposons und die Inaktivität dieser Elemente lässt die gefundenen Klone nicht als Zielsequenzen von MeCP2 erscheinen. Eine spezifische Repression dieser fossilen Elemente durch MeCP2 ist daher unwahrscheinlich.

Darüber hinaus wurden vier Klone (2,6 %) sequenziert, die α -Satelliten-DNA enthielten. α -Satelliten-DNA ist allgemein in den Centromerregionen der Chromosomen lokalisiert (Manuelidis, 1976; Willard und Waye 1987a, 1987b). Die gefundenen Klone konnten nicht in das Genom eingeordnet werden, da die Sequenzierung dieser hoch repetitiven Bereiche äußerst schwierig und noch nicht abgeschlossen ist. Hypomethylierte α -Satelliten-DNA wurde mit dem ICF-Syndrom (*Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies*) assoziiert (Miniou et al., 1994). In der erstellten Bibliothek sind keine klassischen Satelliten-DNAs 2 und 3 enthalten. Gerade diese Satelliten-DNAs sind stark methyliert und liegen in den juxtacentromeren Regionen von Chromosomen 1, 9 und 16 sowie dem langen Arm des Y-Chromosoms akkumuliert vor. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit Anti-MeCP2-Antikörpern ergaben jedoch in diesen Bereichen keine starken Signale. Mit beiden verwendeten Methoden – Chromatin-Immunpräzipitation und Immunfluoreszenzmikroskopie – konnte folglich keine Affinität von MeCP2 zu klassischer Satelliten-DNA detektiert werden. Diese hoch methylierte Sequenzklasse scheint somit kein Bindungsziel von MeCP2 zu sein.

In fötalen Geweben wurde eine asynchrone Methylierung von klassischer Satelliten-DNA und α -Satelliten-DNA gefunden (Miniou et al., 1997). Es wird angenommen, dass diese asynchrone Methylierung der klassischen und α -Satelliten-DNAs das asynchrone Timing der Methylierung während der Embryogenese widerspiegelt (Miniou et al., 1997). Während dieser Phase der asynchronen Methylierung der beiden Satelliten-DNA-Klassen ist es möglich, dass MeCP2 die jeweils methylierte Satelliten-DNA bindet und dadurch die centromere Chromatinstruktur beeinflusst. In ausdifferenzierten Zellen besteht jedoch offensichtlich keine derartige Bindungsaffinität zwischen klassischer Satelliten-DNA und MeCP2. Möglicherweise besteht nur eine geringe Affinität zu α -Satelliten-DNA. Eine bevorzugte Bindung von MeCP2 an α -Satelliten-DNA konnte in den immunzytologischen Analysen jedoch ebenfalls nicht gezeigt werden und ist vor dem Hintergrund von nur vier Klonen mit α -Satelliten-DNA in der angereicherten Bibliothek Anti-MeCP2-präzipitierter DNA nicht wahrscheinlich.

Es stellt sich die Frage, warum MeCP2 methylierte Maus-Satelliten-DNA spezifisch bindet, humane, ebenfalls methylierte Satelliten-DNAs 2 und 3 jedoch nicht. Bei dem Vergleich der den CpG-Stellen direkt benachbarten Nukleotide fällt auf, dass nur in Maus-Satelliten-DNA an der zweiten Position vor der CpG-Stelle meist ein Guanin liegt. Bei den humanen Satelliten-DNAs 2 und 3 wurde hingegen oft ein Thymin, jedoch kaum ein Guanin gefunden. An der zweiten Position hinter den CpG-Stellen liegt in Maus-Satelliten-DNA erneut bevorzugt Guanin. In humanen Satelliten-DNAs 2 und 3 sind an dieser Position hingegen sämtliche Nukleotide mit erhöhter Häufigkeit von Thymin vorhanden. Das Motiv 5'-GXCG-3' trat in 90 Klonen (58 %) auf, so dass eine Präferenz von humanem MeCP2 zu dieser Sequenz besteht, die in muriner, jedoch nicht in humaner Satelliten-DNA zu finden ist (X: beliebiges Nukleotid). Die dem CpG-Dinukleotid benachbarten Nukleotide scheinen folglich für die Bindung von hMeCP2 an DNA eine Rolle zu spielen. Die Interaktion zwischen der Methyl-CpG-bindenden Domäne von MBD1 und einem gebundenen methylierten Oligonukleotid wurde mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie aufgeklärt (Ohki et al., 2001). Demnach erfolgen die Wechselwirkungen zwischen MBD1 und den Guanin-Basen der CpG-Stelle über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren Arginin-22 und -44 und den Guaninbasen. Das Arginin-22 interagiert mit seiner Guanidiniumgruppe zusätzlich mit der zwischen Methylcytosin und Guanin liegenden Phosphatgruppe (Ohki et al., 2001). Wechselwirkungen der vor bzw. nach der methylierten CpG-Stelle liegenden Nukleotide mit MBD1 wurden nicht nachgewiesen (Ohki et

al., 2001). Die DNA-Bindungsdomäne ist zwischen MBD1 und MeCP2 zwar konserviert, jedoch sind einzelne Positionen unterschiedlich. Beispielsweise ist das basische Arginin-51 von MBD1 in MeCP2 durch ein aliphatisches Alanin-140 ersetzt. Ebenso ist in der charakteristischen Schlaufe zwischen den β -Faltblättern das Alanin-26 von MBD1 in MeCP2 durch Arginin-115 ersetzt (Ohki et al., 2001). Fujita et al. (1999) vermuten, dass MBD1 und MeCP2 verschiedene Rollen bei der Interaktion mit methylierter DNA spielen. So wurde der Repressor hMBD1 in HeLa-Zellen akkumuliert in diskreten Foci nachgewiesen, im Gegensatz zu der homogenen Verteilung des hMeCP2 im Nukleus (Fujita et al., 1999). Daher ist denkbar, dass bei der Bindung von MeCP2 an methylierte DNA weitere Nukleotide eine Rolle spielen. Aus den Ergebnissen der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und der ChIP von MeCP2 lässt sich schließen, dass humanes MeCP2 spezifisch an die methylierte Sequenz 5'-GXCG-3' bindet. Das von Lewis et al. (1992) verwendete Oligonukleotid, mit dem die Bindung von MeCP2 an ein symmetrisch methyliertes CpG gezeigt wurde, enthielt ebenfalls das Motiv 5'-GXCG-3'. Lewis et al. (1992) verwendeten ebenfalls ein Oligonukleotid, bei dem das Motiv 5'-GXCGXG-3' methyliert neben noch vier weiteren methylierten CpG-Stellen vorlag. Dieses Oligonukleotid wurde von MeCP2 wesentlich stärker gebunden. Ungeklärt ist, ob die höhere Affinität von MeCP2 zu dem stärker methylierten Oligonukleotid aus der größeren Anzahl an methylierten CpG-Stellen oder aus dem methylierten Motiv 5'-GXCGXG-3' resultierte. In Maus-Satelliten-DNA ist das Motiv 5'-GXCGXG-3' vielfach vorhanden und es wurde in 45 Klonen (29 %) der hier erstellten Bibliothek detektiert. Weitzel et al. (1997) zeigten, dass MeCP2 in Maus-Satelliten-DNA auch Sequenzen mit 5'-TGTG-3'-Motiven erkennt. Offensichtlich kann MeCP2 auch andere, nicht-methylierte DNA-Sequenzen binden.

Im humanen Genom dürften von den repetitiven Sequenzen nur Alu-Elemente ein bedeutendes Ziel von MeCP2 darstellen. Die weiteren detektierten repetitiven Elemente wie LINE-1 und LTR-Retrotransposons sind in der Bibliothek gegenüber dem humanen Genom unterrepräsentiert und stellen darüber hinaus fossile Fragmente dar. Eine spezifische Interaktion von MeCP2 mit Alu-Elementen erscheint hingegen sehr wahrscheinlich, da Klone mit Alu-Sequenzen in der Bibliothek akkumuliert wurden. Möglicherweise kann das native MeCP2 diese noch teilweise aktive Gruppe der SINEs *in vivo* reprimieren.

4.3.2 Lokalisierung sequenzierter Klone im humanen Genom

Von 155 sequenzierten Klonen wurden 119 im humanen Genom lokalisiert (Tabelle 11). Nur knapp ein Viertel der Klone konnte nicht lokalisiert werden, teilweise aufgrund der Kürze der Fragmente, teilweise aufgrund des hohen Anteils repetitiver Sequenzen im humanen Genom. So konnten Klone, die nur aus einem repetitiven Element bestanden, nicht eindeutig im humanen Genom lokalisiert werden. In diesen Fällen gab es im Genom sehr viele gleich wahrscheinliche Bereiche, die nicht sicher unterschieden werden konnten.

Durch die Lokalisation sequenzierter Klone und die Analyse der genomischen Umgebung wurden vier Klone detektiert, die in der unmittelbaren Nähe von MARs liegen bzw. Teil einer MAR sind (Klone: 2, 49, 91, 97; Tabelle 11). Da MeCP2 *in vitro* auch als MAR-bindendes Protein charakterisiert wurde (von Kries et al., 1991), können diese vier Klone als Hinweis für eine mögliche *in vivo* Bindung von MeCP2 an MARs gewertet werden. Ein Klon (Nr. 91) enthält das bereits von Buhrmeister et al. (1995) für das Hühnerhomologe von MeCP2 charakterisierte MAR-Bindungsmotiv 5'-GGTGT-3' mit flankierenden AT-reichen Sequenzen, so dass möglicherweise hier eine von MeCP2 erkannte MAR-Region gefunden wurde. MARs dienen der Strukturierung des Genoms. Möglicherweise hat MeCP2 bei MARs und α -Satelliten-DNAs eine strukturgebende Funktion. Das Chromatin wird durch diese spezialisierten, AT-reichen DNA-Elemente in topologisch unabhängige Schleifen getrennt (Laemmli et al., 1992) und vermutlich über konservierte Bindungsproteine an die Kernmatrix gebunden (Cockerill et al., 1986). Eine Konsensus-Sequenz konnte für MARs bisher nicht identifiziert werden, vielmehr werden MARs aufgrund von Struktureigenschaften und Anhäufung kurzer Sequenz-Motive erkannt. Interessanterweise stimulieren flankierende MARs die Genexpression von Reportergen nach genomischer Integration (McKnight et al., 1992). Es ist jedoch noch kein MAR-bindender transkriptioneller Aktivator gefunden worden, lediglich transkriptionelle Repressoren. Neben MeCP2 wurden SATB1, SAF-A und SAF-B als MAR-bindend identifiziert (Liu et al., 1999; Kim und Nikodem, 1999; Nayler et al., 1998). Möglicherweise führt die Lokalisierung der genannten Proteine an MARs zu einer relativen Abnahme der Repressoraktivität in Regionen aktiver Gene und folglich damit indirekt zur Stimulation der Genexpression. Denkbar ist jedoch ebenso, dass unbekannte MAR-bindende transkriptionelle Aktivatoren für die Stimulation der Genexpression verantwortlich sind.

MeCP2 ist in der Lage, über die Bindung an Promotoren die Genexpression zu reprimieren. Daher wurde analysiert, ob sequenzierte Klone aus Promotorregionen von Genen bzw. vorhergesagten Genen stammen. Es wurden 83 Klone zwischen Genen, davon drei in einem 2 Kb-Bereich vor einem Gen lokalisiert (Tabelle 9). Für MeCP2 wurde mit Reportergenanalysen gezeigt, dass es über einen Bereich von 1,8 Kb hinweg transkriptionell reprimierend wirkt (Nan et al., 1997). Der Klon 84 liegt in diesem Kb-Bereich direkt vor dem Gen für die Gamma-2-Untereinheit des GABA-(A)-Rezeptors. Die Gamma-Untereinheit enthält die GABA/Benzodiazepin-Bindungsstelle des Rezeptors (Pritchett et al., 1989). Mutationen der Gamma-Untereinheit sind der Auslöser für idiopathische Epilepsie, Myoklonus-Epilepsie und fiebrige Anfälle (Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001). MeCP2 könnte eine Rolle bei epileptischen Erkrankungen spielen. Rett-Patienten mit Mutationen im Gen von MeCP2 leiden mitunter auch an krampfartigen Zuständen. Eine Regulation des Gens der Gamma-2-Untereinheit des GABA-(A)-Rezeptors durch MeCP2 scheint daher möglich. Durch Chromatin-Immunpräzipitation wurde bereits der Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus des Promotors des humanen *MDR1*-Gens und dessen erhöhte Expression in Leukämien analysiert (El-Osta et al., 2002). Bei Repression des *MDR1*-Gens ist der Promotor methyliert und mit deacetylierten Histonen und MeCP2-angereichertem Chromatin assoziiert (El-Osta und Wolffe, 2001). Eine Analyse des Methylierungsstatus des Promotors des Gens der Gamma-2-Untereinheit des GABA-(A)-Rezeptors bei Rett-Patienten könnte auch hier mögliche Interaktionen aufdecken.

Neben den intergenisch lokalisierten Klonen wurden auch 34 Klone gefunden, die innerhalb von Genen liegen (Tabelle 10). Diese Klone wurden auf Nähe zu Spleißstellen untersucht. 16 Fragmente wurden in einem Bereich von maximal 2 Kb, davon sechs Fragmente in einem Bereich von maximal 200 bp von einer Spleißstelle entfernt lokalisiert. Diese gefundenen Sequenzen liegen in sehr kleinen Introns, teilweise sogar in Exons. Nguyen et al. (2001) zeigten ebenfalls in humanen Krebszelllinien, dass MeCP2 an methylierte CpG-Inseln in Exons binden kann. Diese Bindung von MeCP2 in Exons interferierte jedoch nicht mit der Transkription des entsprechenden Gens. Eine funktionelle Bindung von MeCP2 in Exons wurde bisher nicht beschrieben und lässt sich aus den sequenzierten Klonen auch nicht ableiten.

4.4 Die Rolle von MeCP2 beim Rett-Syndrom

Amir et al. (1999) identifizierten Mutationen im *MECP2*-Gen als Ursache für das Rett-Syndrom. Das Rett-Syndrom ist eine dominante, neuronale Erkrankung, von der vor allem Mädchen betroffen sind (Amir et al., 1999). In ungefähr 80 % aller untersuchten Patientinnen mit Rett-Syndrom wurden Mutationen im *MECP2*-Gen detektiert. Meist wurde nur der für MeCP2 kodierende Sequenzbereich auf Mutationen untersucht. Daher ist nicht ausgeschlossen, dass Mutationen in untranslatierten Bereichen des *MECP2*-Gens ebenfalls zum Rett-Syndrom führen. So wurden Mutationen von Spleißstellen im *MECP2*-Gen bei Rett-Patienten bereits beschrieben. Der molekulare Zusammenhang zwischen der Funktion von MeCP2 und der Pathogenese der Patienten wurde noch nicht geklärt. Offenbar ist das neuronale System besonders anfällig für Mutationen im *MECP2*-Gen. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass die konditionale Deletion der Methyl-CpG-bindenden Domäne von MeCP2 in postnatalen neuronalen Zellen ausreicht, um den Phänotyp des Rett-Syndroms zu erhalten (Chen et al., 2001). Ungeklärt bleibt jedoch, ob die Krankheit durch die Fehlfunktion postnataler Neuronen zum Zeitpunkt, wenn die Symptome sichtbar werden, ausgelöst wird, oder ob es sich um eine pränatale Entwicklungsstörung mit postnataler phänotypischer Ausprägung im zentralen Nervensystem handelt. Da *MECP2*-Mutationen einen neurologischen Phänotyp zeigen, scheint MeCP2 nur für die Regulation einer bestimmten Gruppe methylierter Gene essentiell zu sein und nicht die Funktion eines globalen Repressors zu erfüllen. So zeigen Genexpressionsanalysen des Hirngewebes von Rett-Patienten eine Abnahme der Expression vieler Neuronen-spezifischer mRNAs und eine dramatische Abnahme der Expression präsynaptischer Marker (Colantuoni et al., 2001). Eine erhöhte Expression wurde dagegen bei Glia-Transkripten beobachtet (Colantuoni et al., 2001). Der Ausfall eines generellen Repressors müsste eher zu allgemein erhöhter Expression führen denn zur Abnahme einzelner Transkripte.

Sofern MeCP2 an der Regulation der Expression von Alu-Elementen beteiligt ist, und die Akkumulation von Alu-Elementen durch die ChIP von MeCP2 sprechen dafür, ist diese aufgrund von mutiertem MeCP2 bei Rett-Patienten gestört. Die folglich höhere Anzahl von Alu-Transkripten könnte durch die Inhibition der Interferon-induzierbaren RNA-abhängigen Proteinkinase (PKR) wiederum zu einer allgemein gestörten Expression führen. Die Expression von Alu-Elementen in Neuronen von Rett-Patienten sollte daher näher analysiert werden.

In der Literatur wurde ein Alu-verwandtes Gen (*BC200*) entdeckt, das in Primaten Neuronen-spezifisch exprimiert wird. Das *BC200*-Gen stammt von einem monomeren Alu-Element (Martignetti und Brosius, 1993; Skryabin et al., 1998) und es wäre denkbar, dass MeCP2 die Expression dieses Alu-Monomers reguliert. Die Expression von *BC200* wurde außer in Neuronen in mehreren humanen Tumoren nachgewiesen (Chen et al., 1997). Es ist daher ein Zusammenhang von Methylierung, MeCP2 und der Expression von *BC200* möglich. Die *BC200*-RNA ist Teil eines Ribonukleoprotein-Partikels (Cheng et al., 1997; Kremerskothen et al., 1998) und wurde nicht nur in den Zellkörpern von Neuronen, sondern auch in den distalen Regionen dendritischer Fortsätze lokalisiert (Tiedge et al., 1991). Das Poly-(A)-bindungs-Protein (PABP), ein Regulator der Translationsinitiation, bindet *BC200*-RNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und koloalisiert mit *BC200*-RNA in neuronalen Dendriten (Muddashetty et al., 2002). So ist denkbar, dass die *BC200*-RNA in die Proteintranslation in neuronalen Dendriten involviert ist. Sofern bei einem Rett-Patienten durch Mutation des *MECP2* die Regulation der *BC200*-RNA unterbliebe, würde es insbesondere in neuronalen Zellen zu Störungen kommen. Kremerskothen et al. (1998) diskutieren, dass die lokale Translation dendritischer mRNAs an postsynaptischen Orten ein wichtiger molekularer Mechanismus sein kann, der zur „Wartung“ und Modulation synaptischer Strukturen und Funktionen beiträgt. Dies könnte relevant für Prozesse wie das Lernen und das Gedächtnis sein. Der Phänotyp von Rett-Patienten, der mit Mutationen im *MECP2*-Gen einhergeht, spiegelt sehr exakt die Inhibition von Lernprozessen wider. Eine dramatische Abnahme der Expression präsynaptischer Marker bei Rett-Patienten deutet ebenfalls auf ein spezifisches Defizit der präsynaptischen Entwicklung hin (Colantuoni et al., 2001). Bei Rett-Patienten wurde bereits in vielen Hirnregionen eine geringere Anzahl an Dendriten und Verzweigungen gefunden (Belichenko et al., 1994; Armstrong et al., 1995, 1998), daher scheint eine Verbindung zu der Neuronen-spezifischen *BC200*-RNA vorstellbar.

Die Familie der MBD-Proteine besteht neben MeCP2 noch aus den Proteinen MBD 1 bis 4. Diese Proteine enthalten alle hoch konserviert die Methyl-CpG-bindende Domäne (MBD). Neben MeCP2 sind MBD1 und MBD2 auch transkriptionelle Repressoren, MBD3 ist eine Komponente des NuRD-Komplexes, einem *Histondeacetylase-Remodeling*-Komplex (Cross et al., 1997; Nan et al., 1997; Hendrich et al., 1999b). Die Repressoren MeCP2, MBD1 und MBD2 kommen in verschiedenen Repressor-Komplexen vor, so dass sie wahrscheinlich verschiedene Funktionen wahrnehmen (Ballestar und Wolffe, 2001). Die Proteine weisen innerhalb der hoch konservierten Domäne MBD geringe Unterschiede in möglicherweise für die verschiedenen

Funktionen der Proteine entscheidenden Aminosäureresten auf. Fujita et al. (1999) vermuten, dass die Rolle von MeCP2 bei der Bindung methylierter DNA von der des MBD1 verschieden ist, da die beiden Proteine im Nukleus ungleich verteilt sind. Die Repressoraktivitäten der MBD-Proteine sind offenbar nicht redundant, sonst würde eine Krankheit wie das Rett-Syndrom nicht existieren. Offensichtlich kann keines der drei anderen MBD-Proteine die Funktion von MeCP2 übernehmen.

5 Zusammenfassung

Das Kernprotein MeCP2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression und ist essentiell für die Erhaltung funktioneller Neuronen in höheren Säugern. MeCP2 gehört zu einer Familie von fünf Proteinen, die durch eine evolutionär konservierte Methyl-CpG-bindende Domäne (MBD) charakterisiert sind. Humanes MeCP2 besteht aus 486 Aminosäuren, enthält im N-terminalen Bereich die MBD und daran anschließend eine Transkription-reprimierende Domäne. MeCP2 kann an ein einzelnes symmetrisch methyliertes CpG binden. Es vermittelt seine Wirkung über die Bindung an methylierte DNA und die Rekrutierung eines Ko-Repressor-komplexes, der die Histondeacetylasen 1 und 2 enthält. Die Deacetylierung von Histonen führt lokal zu einer kompakten, inaktivierten Chromatinstruktur. Damit verbindet MeCP2 zwei grundlegende Mechanismen der Genregulation, DNA-Methylierung und Histondeacetylierung.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Zielsequenzen des humanen MeCP2. Zunächst wurde mit indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie die MeCP2-Verteilung mit derjenigen von 5'-Methylcytosin verglichen. Auf Metaphasechromosomen aus peripheren Lymphozyten war MeCP2 gleichmäßig verteilt. Demgegenüber wurde methylierte DNA erwartungsgemäß vorwiegend in den juxtacentromeren Regionen der Chromosomen 1, 9, 16 und auf dem langen Arm des Y-Chromosoms detektiert. In Zellkernen aus humanen MCF-7-Zellen zeigte MeCP2 eine fein granuläre Verteilung, während Anti-Methylcytosin-Antikörper mehrere Flecken stark und weitere Flecken schwach färbten. In murinen Fibroblasten hingegen werden von Anti-MeCP2-Antikörpern heterochromatische Regionen angefärbt, die vermutlich juxtacentromerem Heterochromatin entsprechen, das stark methylierte Satelliten-DNA enthält. Aus diesen Befunden wird geschlossen, dass in humanen Zellen MeCP2 nicht an den stark methylierten klassischen Satelliten-DNAs 2 und 3 gehäuft vorkommt. Die Ursache ist vermutlich eine Präferenz des MeCP2 für Guanine in der Nachbarschaft des methylierten CpGs.

Um die von humanem MeCP2 gebundenen DNA-Sequenzen zu analysieren, wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitation eine Bibliothek erstellt, in der MeCP2 gebundene DNA-Sequenzen angereichert sind. Es wurden 155 Klone mit einer Gesamtlänge von über 60 Kb sequenziert. Der mittlere GC-Gehalt (43,1 %) der Klone liegt insgesamt etwas über dem Durchschnitt des humanen Genoms. In 91 % der Klone wurde mindestens eine CpG-Stelle gefunden, alle klonierten Fragmente zusammen enthielten 3-mal soviel CpG-Stellen wie der genomische Durchschnitt.

Im humanen Genom sind repetitive Sequenzen, insbesondere Alu-Elemente, α - und klassische Satelliten-DNA stark methyliert. In 62 % der Klone wurden repetitive Sequenzen detektiert, wobei die Gruppe der Alu-Elemente den größten Anteil (32,3 %) ausmachte. Der Anteil an Alu-Elementen ist in der Bibliothek signifikant höher als im humanen Genom. Folglich hat MeCP2 eine Bindungspräferenz für Alu-Elemente. Alu-Elemente zählen zu den aktiven Retrotransposons und sind für eine Reihe von Erkrankungen verantwortlich. Es wird diskutiert, dass MeCP2 *in vivo* methylierte Alu-Elemente bindet und reprimiert. Die Klone enthielten darüber hinaus auch *Long Interspersed Nuclear Elements* (LINEs, 18 %), wobei lediglich kurze, nicht retrotranspositions-kompetente Fragmente nachgewiesen wurden. Der Anteil an LINE-1-Elementen ist signifikant reduziert gegenüber dem humanen Genom. MeCP2 bindet folglich nicht bevorzugt an LINEs. Gleiches gilt für eine weitere Klasse repetitiver Sequenzen, die *Long Terminal Repeat* Retrotransposons (LTR). Der Anteil dieser inaktiven Sequenzklasse (8 %) ist in der Bibliothek im Vergleich zum humanen Genom ebenfalls signifikant reduziert.

Weiterhin enthielten vier Klone α -Satelliten-DNA, jedoch kein einziger klassische Satelliten-DNAs 2 oder 3. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass humane klassische Satelliten-DNA das von MeCP2 präferierte Bindungsmotiv 5'-GXCG-3' nicht enthält. So sind klassische Satelliten-DNAs trotz ihres Reichtums an methylierten CpG-Dinukleotiden keine Zielsequenz von MeCP2. Die Bedeutung der Bindung von MeCP2 an α -Satelliten-DNA ist unklar. Vier AT-reiche Klone wurden in oder angrenzend zu putativen Matrix-Anheftungs-Regionen (MAR) eingeordnet. MAR dienen der Strukturierung des Chromatins: Das Chromatin wird durch diese AT-reichen Sequenzen in topologisch unabhängige Schleifen getrennt, die vermutlich Transkriptionseinheiten darstellen. Die Lokalisierung von MeCP2 und weiteren Repressoren an MAR führt möglicherweise zu einer Abnahme der Repressoraktivität in Regionen aktiver Gene und damit indirekt zur Stimulation der Genexpression.

Ein Klon wurde in einer CpG-Insel lokalisiert, in deren Nähe ein *Expressed Sequence Tag* identifiziert wurde. Drei Klone wurden in einer Entfernung von maximal 2 Kb zu Promotoren eingeordnet. Einer liegt vor dem Gen für die Gamma-2-Untereinheit des GABA-(A)-Rezeptors, die weiteren vor unbekannten Genen. Möglicherweise werden diese angrenzenden Gene durch MeCP2 reprimiert.

6 Summary

The nuclear protein MeCP2 plays an important role in the regulation of gene expression and is essential for maintaining functional neurons in higher mammals. MeCP2 belongs to a family of five proteins characterized by the evolutionary conserved methyl CpG binding domain (MBD). Human MeCP2 consists of 486 amino acid residues with the MBD in the N-terminal half followed by a transcriptional repression domain. MeCP2 is able to bind to a single methylated CpG. MeCP2 once bound to methylated DNA is thought to silence transcription by recruiting a corepressor complex. This complex contains histone deacetylases 1 and 2. The deacetylation of histone proteins is thought to lead to a local compact, transcriptionally inactive chromatin structure. Thus MeCP2 connects two fundamental mechanisms of gene regulation: DNA methylation and histone deacetylation.

The aim of this work was the analysis of sequences bound by human MeCP2. In metaphase chromosomes of peripheral lymphocytes MeCP2 is evenly dispersed. In contrast an anti-methylcytosine antibody stained the juxtacentromeric regions of chromosomes 1, 9, 16 and the heterochromatic long arm of the Y chromosome. In nuclei from human MCF-7 cells MeCP2 staining exhibited a granular pattern throughout the nucleus. Contrary the methylcytosine staining showed a dotted appearance, with a few bright dots and some weaker dots. The bright dots likely represent juxtacentromeric heterochromatin. These results show that in human cells MeCP2 is not concentrated on classical satellite DNAs 2 and 3 despite their high degree of methylation. The reason is likely a preference of MeCP2 for guanines adjacent to methylated CpGs.

In order to characterize DNA sequences bound by human MeCP2, a chromatin immunoprecipitation strategy was employed. This provided a library, in which MeCP2 bound DNA sequences were enriched. The library contains 155 clones with an overall length of more than 60 kb. The average GC content (43,1 %) of the library was slightly increased compared to the average of the human genome. In 91 % of the clones at least one CpG was found. The average CpG density of all clones was increased threefold.

Repetitive sequences like Alu elements, α - and classic satellite DNA are strongly methylated in the human genome. Repetitive sequences were detected in 62 % of the clones, the Alu group being the largest portion (32,3 %). The portion of Alu elements is significantly increased in the

library compared to the human genome. Therefore MeCP2 binds preferentially to Alu elements. Alu elements are still active retrotransposons which are responsible for a couple of diseases. It is discussed that MeCP2 binds to and represses methylated Alu elements *in vivo*. Clones with long interspersed nuclear elements (LINEs, 18 %) were also found in the library. However, only short fragments of evolutionary old LINE families were detected; full-length retrotransposition competent LINE elements were not found. The portion of LINE-1 elements was significantly reduced compared to the human genome. Therefore LINEs are not a preferred target of MeCP2. There were also clones found with sequences of long terminal repeat retrotransposons (LTR, 8 %). The portion of nucleotides, which were assigned to this inactive sequence class, is also significantly reduced compared to the human genome.

Moreover four clones containing α -satellite-DNA were found, but no clone with classic satellites 2 or 3. This is likely due to the lack of the preferred motive 5'-GXCG-3' of MeCP2 in human classic satellites. Although human satellite DNA contains abundant methylated CpG-dinucleotides it is not a target of MeCP2. The role of MeCP2 binding to α -satellite-DNA is unclear. Four clones with abundant AT-dinucleotides were located in or adjacent to putative matrix attachment regions (MARs). MARs are thought to organize the chromatin in topologically independent loops. The localization of MeCP2 and other repressors at MARs leads probably to a decreased repressor activity in regions of transcribed genes and indirectly to a stimulation of gene expression.

One clone was found in a CpG island close to which an expressed sequence tag was identified. Three clones were located in a maximum distance of 2 kb to promoters. One is positioned beneath the gamma-2-subunit of the GABA-(A)-receptor gene. The others are situated close to unknown genes. The corresponding genes might be repressed by MeCP2.

7 Literatur

1. Abovich, N. und Rosbash, M. (1997) Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals. *Cell* 89: 403-412.
2. Ahmad, Z. und Huang, K.P. (1981) Dephosphorylation of rabbit skeletal muscle glycogen synthase (phosphorylated by cyclic AMP-independent synthase kinase 1) by phosphatases. *J Biol Chem* 256: 757-760.
3. Akhmanova, A., Verkerk, T., Langefeld, A., Grosveld, F. und Galjart, N. (2000) Characterisation of transcriptionally active and inactive chromatin domains in neurons. *J Cell Sci* 113: 4463-4474.
4. Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U. und Zoghbi, H.Y. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23: 185-188.
5. Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Schultz, R., Malicki, D.M., Tran, C.Q., Dahle, E.J., Philippi, A., Timar, L., Percy, A.K., Motil, K.J., et al. (2000) Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol* 47: 670-679.
6. Antequera, F. und Bird, A. (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11995-11999.
7. Armstrong, D., Dunn, J.K., Antalffy, B. und Trivedi R. (1995) Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 195-201.
8. Armstrong, D.D., Dunn, J.K. und Antalffy, B. (1998) Decreased dendritic branching in frontal motor limbic cortex in Rett syndrome compared with trisomy 21. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 1013-1017.
9. Ballestar, E., Yusufzai, T.M. und Wolffe, A.P. (2000) Effects of Rett syndrome mutations of the methyl-CpG binding domain of the transcriptional repressor MeCP2 on selectivity for association with methylated DNA. *Biochem* 39: 7100-7106.
10. Ballestar, E. und Wolffe, A.P. (2001) Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem* 268: 1-6.
11. Baulac, S., Huberfeld, G., Gourfinkel-An, I., Mitropoulou, G., Beranger, A., Prud'homme, J.-F., Baulac, M., Brice, A., Bruzzone, R. und LeGuern, E. (2001) First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 28: 46-48.
12. Baumann, M.L., Kemper, T.L. und Arin, D.M. (1995) Microscopic observations of the brain in Rett syndrome. *Neuropediatrics* 26: 105-108.
13. Bedford, M.T., Chan, D.C. und Leder, P. (1997) FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *EMBO J* 16: 2376-2383.

14. Belichenko, P.V., Oldfors, A., Hagberg, B. und Dahlström, A. (1994) Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. *NeuroReport* 5: 1509-1513.
15. Bienvenu, T., Carrie, A., de Roux, N., Vinet, M.C., Jonveaux, P., Couvert, P., Villard, L., Arzimanoglou, A., Beldjord, C., Fontes, et al. (2000) MECP2 mutations account for most cases of typical forms of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 1377–1384.
16. Bird, A.P. (1986) CpG rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213.
17. Bird, A.P. (1992) The essentials of DNA methylation. *Cell* 70: 5-8.
18. Bird, A.P. und Wolffe, A.P. (1999) Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* 99: 451-454.
19. Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
20. Bloom, K.S. und Anderson, J.N. (1978) Fractionation and characterisation of chromosomal proteins by the hydroxyapatite dissociation method. *J Biol Chem* 253: 4446-4450
21. Boeke, J., Ammerpohl, O., Kegel, S., Moehren, U. und Renkawitz, R. (2000) The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG binding domain and binds directly to Sin3A. *J Biol Chem* 275: 34963-34967.
22. Bode, J., Schlake, T., Rios-Ramirez, M., Mielke, C., Stengardt, M., Kay, V. und Klehr-Wirth, D. (1995) Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally inactive loci. *Int Rev Cytol* 162A: 389-545.
23. Boeke, J.D. (1997) LINEs and Alus – the polyA connection. *Nat Genet* 16: 6-7.
24. Boissinot, S., Entezam, A. und Furano, A.V. (2001) Selection against deleterious LINE-1-containing loci in the human lineage. *Mol Biol Evol* 18: 926-935.
25. Boulikas, T. (1995) Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol* 162A: 279-388.
26. Brunner, E., Weitzel, J., Heitmann, B., Maurer, T., Strätling, W.H. und Kalbitzer, H.R. (2000) Sequence-specific ^1H , ^{13}C , and ^{15}N assignments of the MAR-binding domain of chicken MeCP2/ARBP. *J Biomol NMR* 17: 175-176.
27. Buhrmester, H., von Kries, J.P. und Strätling, W.H. (1995). Nuclear matrix protein ARBP recognizes a novel DNA sequence motif with high affinity. *Biochem* 34: 4108-4117.
28. Camenisch, G., Tini, M., Chilov, D., Kvietikova, I., Srinivas, V., Caro, J., Spielmann, P., Wenger, R.H. und Gassmann, M. (1999) General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1alpha. *FASEB J* 13: 81-88.

29. Carter, A.R. und Segal, R.A. (2001) Rett syndrome model suggests MeCP2 gives neurons the quiet they need to think. *Nat Neurosci* 4: 342-343.
30. Cheadle, P.C., Gill, H., Fleming, N., Maynard, J., Kerr, A., Leonard, H., Krawczak, M., Cooper, D.N., Lynch, S., Thomas, N., et al. (2000) Long-read sequence analysis of the *MECP2* gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. *Hum Mol Genet* 9: 1119-1129.
31. Chandler, S.P., Guschin, D., Landsberger, N. und Wolffe, A.P. (1999) The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochem* 38: 7008-7018.
32. Chen, R.Z., Akbarian, S., Tudor, M. und Jaenisch, R. (2001) Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27: 327-331.
33. Chen, W., Böcker, W., Brosius, J. und Tiedge, H. (1997) Expression of neural BC200 RNA in human tumours. *J Pathol* 183: 345-351.
34. Cheng, J.G., Tiedge, H. und Brosius, J. (1997) Expression of dendritic BC200 RNA, component of a 11.4S ribonucleoprotein particle, is conserved in humans and simians. *Neurosci Lett* 224: 206-210.
35. Chu, W.M., Ballard, R., Carpick, B.W., Williams, B.R. und Schmid, C.W. (1998) Potential Alu function: regulation of the activity of double-stranded RNA-activated kinase PKR. *Mol Cell Biol* 18: 58-68.
36. Clayton-Smith, J., Watson, P., Ramsden, S. und Black, G.C.M. (2000) Somatic mutations in MeCP2 as a non fatal neurodevelopmental disorder in males. *Lancet* 356: 830-832.
37. Cockerill, P.N. und Garrard, W.T. (1986) Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44: 273-282.
38. Colantuoni, C., Jeon, O.-H., Hyder, K., Chenckik, A., Khimani, A.H., Narayanan, V., Hoffman, E.P., Kaufmann, W.E., Naidu, S. und Pevsner, J. (2001) Gene expression profiling in postmortem Rett syndrome brain: differential gene expression and patient classification. *Neurobiol Dis* 8: 847-865.
39. Cost, J.G. und Boeke, J.D. (1998) Targeting of human retrotransposon integration is directed by the specificity of the L1 endonuclease for regions of unusual DNA structure. *Biochem* 37: 18081-18093.
40. Cox, R.P. und Gesner, B.M. (1967) Comparison of effects of simple sugars on 3T3 mouse fibroblasts and 3T3 cells transformed by infection with oncogenic viruses. *Cancer Res* 27: 974-979.
41. Cross, S.H. und Bird, A.P. (1995) CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev* 5: 309-314.

42. Cross, S.H., Meehan, R.R., Nan, X. und Bird, A. (1997) A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet* 16: 256-259.
43. de Belle, I., Cai, S. und Kohwi-Shigematsu, T. (1998) The genomic sequences bound to special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) in vivo in jurkat T cells are tightly associated with the nuclear matrix at the bases of the chromatin loops. *JCB* 141: 335-348.
44. Deininger, P.L. und Batzer, M.A. (1999) Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 67: 183-193.
45. Di Cristofano, A., Strazzullo, M., Parisi, T. und La Mantia, G. (1995) Mobilization of an ERV9 human endogenous retroviral element during primate evolution. *Virology* 213: 271-275.
46. Dragich, J., Houwink-Manville, I. und Schanen, C. (2000) Rett syndrome: a surprising result of mutation in MECP2. *Hum Mol Genet* 9: 2365-2375.
47. Drewell, R.A., Goddard, C.J., Thomas, J.O. und Surani, M.A. (2002). Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res* 30: 1139-1144.
48. Eden, S. und Cedar, H. (1994) Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev* 4: 255-259.
49. El-Osta, A. und Wolffe, A.P. (2001) Analysis of chromatin-immunopurified MeCP2-associated fragments. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 733-737.
50. El-Osta, A., Kantharidis, P., Zalcberg, J.R. und Wolffe, A.P. (2002) Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol Cell Biol* 22: 1844-1857.
51. Esnault, C., Maestre, J. und Heidmann, T. (2000) Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet* 24: 363-367.
52. Feng, Q., Moran, J.V., Kazazian, H.H. und Boeke, J.D. (1996) Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87: 905-916.
53. Feng, Q. und Zhang, Y. (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 15: 827-832.
54. Ferraro, A., Eufemi, M., Cervoni, L., Altieri, F. und Turano, C. (1995) DNA-nuclear matrix interactions analysed by cross-linking reactions in intact nuclei of avian liver. *Acta Biochim Pol* 42: 145-152.
55. Filipski, J., Kohn, K.W., Prather, R. und Bonner, W.M. (1979) Thiourea reverses cross-links and restores biological activity in DNA treated with dichlorodiamminoplatinum (II). *Science* 204: 181-183.

56. Frederico, L.A., Kunkel, T.A. und Shaw, B.R. (1990) A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochem* 29: 2523-2537.
57. Free, A., Wakefield, R.I., Smith, B.O., Dryden, D.T., Barlow, P.N. und Bird, A.P. (2001) DNA recognition by the methyl-CpG binding domain of MeCP2. *J Biol Chem* 276: 3353-3360.
58. Fujita, N., Takebayashi, S.I., Okumura, K., Kudo, S., Chiba, T., Saya, H. und Nakao, M. (1999) Methylation-mediated transcriptional silencing in euchromatin by methyl-CpG binding protein MBD1 isoforms. *Mol Cell Biol* 19: 6415-6426.
59. Furano, A.V. (2000) The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64: 255-294.
60. Gasser, S.M. und Laemmli, U.K. (1987) A glimpse at chromosomal order. *Trends Genet* 3: 16-22.
61. Ghoshal, K., Datta, J., Majumder, S., Bai, S., Dong, X., Parthun, M. und Jacob, S.T. (2002) Inhibitors of histone deacetylase and DNA methyltransferase synergistically activate the methylated metallothionein I promoter by activating the transcription factor MTF-1 and forming an open chromatin structure. *Mol Cell Biol* 22: 8302-8319.
62. Girard, M., Couvert, P., Carrie, A., Tardieu, M., Celly, J., Beldjord, C. und Bienvenu, T. (2001) Parental origin of de novo *MECP2* mutations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 9: 231-236.
63. Göhring, F. und Fackelmayer, F.O. (1997) The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA *in vivo*: A cross-linking study. *Biochem* 36: 8276-8283.
64. Goodchild, N.L., Wilkinson, D.A. und Mager, D.L. (1993) Recent evolutionary expansion of a subfamily of RTVL-H human endogenous retrovirus-like elements. *Virology* 196: 778-788.
65. Goodier, J.L., Ostertag, E.M. und Kazazian, H.H. Jr. (2000) Transduction of 3'-flanking sequences is common in L1 retrotransposition. *Hum Mol Genet* 9: 653-657.
66. Graham, F.L. und van der Eb, A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467.
67. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. und Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.
68. Gregory, R.I., Randall, T.E., Johnson, C.A., Khosla, S., Hatada, I., O'Neill, L.P., Turner, B.M. und Feil, R. (2001) DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes *Snrpn* and *U2af1-rs1*. *Mol Cell Biol* 21: 5426-5436.
69. Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J.E. und Bird, A. (2001) A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27: 322-326.

70. Hagberg, B. (1985) Rett's syndrome: prevalence and impact on progressive severe mental retardation in girls. *Acta Paediatr Scand* 74: 405-408.
71. Hagberg, G., Stenbom, Y. und Witt Engerstrom, I. (2000) Head growth in Rett syndrome. *Acta Paediatr* 89: 198-200.
72. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80.
73. Haring, E., Hagemann, S. und Pinsker, W. (2000) Ancient and recent horizontal invasions of *Drosophilids* by P elements. *J Mol Evol* 51: 577-586.
74. Hecht, A., Strahl-Bohlsinger, S. und Grunstein, M. (1996) Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 383: 92-96.
75. Hendrich, B. und Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18: 6538-47.
76. Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J. und Bird, A. (1999a) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401: 301-304.
77. Hendrich, B., Abbott, C., McQueen, H., Chambers, D., Cross, S. und Bird, A. (1999b) Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human Mbd1, Mbd2, Mbd3, and Mbd4 genes. *Mamm Genome* 10: 906-912.
78. Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A. und Bird, A. (2001) Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* 15: 710-723.
79. Holmes, D.S. und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197.
80. Huppke, P., Laccone, F., Krämer, N., Engel, W., und Hanefeld, F. (2000) Rett syndrome: analysis of *MECP2* and clinical characterization of 31 patients. *Hum Mol Genet* 9: 1369-1375.
81. Jones, K.W. und Corneo, G. (1971) Location of satellite and homogeneous DNA sequences on human chromosomes. *Nat New Biol* 233: 268-271.
82. Jones, K.W., Prosser, J., Corneo, G. und Ginelli, E. (1973) The chromosomal location of human satellite DNA 3. *Chromosoma* 42: 445-451.
83. Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. und Wolffe, A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19: 187-191.
84. Kaludov, N.K. und Wolffe, A.P. (2000) MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res* 28: 1921-1928.

- 85.Kazazian, H.H. und Moran, J.V. (1998) The impact of L1 retrotransposition on the human genome. *Nat Genet* 19: 19-24.
- 86.Kerr, A.M. und Stephenson, J.B. (1985) Rett's syndrome in the west of scotland. *Br Med J* 291: 579-582.
- 87.Kim, M.K. und Nikodem, V.M. (1999) hnRNP U inhibits carboxy-terminal domain phosphorylation by TFIIF and represses RNA polymerase II elongation. *Mol Cell Biol* 19: 6833-6844.
- 88.Koa, H.-Y. und Siliciano, P.G. (1996) Identification of Prp40, a novel essential yeast splicing factor associated with U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Mol Cell Biol* 16: 960-967.
- 89.Kohwi-Shigematsu, T., Maass, K. und Bode, J. (1997) A thymocyte factor SATB1 suppresses transcription of stably integrated MAR-linked reporter genes. *Biochem* 36: 12005-12010.
- 90.Kremerskothen, J., Zopf, D., Walter, P., Cheng, J.G., Nettermann, M., Niewerth, U., Maraia, R.J. und Brosius, J. (1998) Heterodimer SRP9/14 is an integral part of the neural BC200 RNP in primate brain. *Neurosci Lett* 245: 123-126.
- 91.Kuo, M.-H. und Allis, C.D. (1999) In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19: 425-433.
- 92.Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 93.Laemmli, U.K., Kas, E., Poljak, L. und Adachi, Y. (1992) Scaffold-associated regions in cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev* 2: 275-285.
- 94.Lander, E.S., Linton, M.L., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- 95.LaSalle, J.M., Goldstine, J., Balmer, D. und Greco, C.M. (2001) Quantitative localization of heterogeneous methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) expression phenotypes in normal and Rett syndrome brain by laser scanning cytometry. *Hum Mol Genet* 10: 1729-1740.
- 96.Lemamy, G.-J., Roger, P., Mani, J.-C., Robert, M., Rochefort, H. und Brouillet, J.-P. (1999) High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphat/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterisation and potential use in clinical cancer studies. *Int J Cancer* 80: 896-902.
- 97.Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F. und Bird, A. (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69: 905-914.

- 98.Li, E., Bestor, T.H. und Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926.
- 99.Liu, W.-M. und Schmid, C.W. (1993) Proposed roles for DNA methylation in Alu transcriptional repression and mutational inactivation. *Nucleic Acids Res* 21: 1351-1359.
- 100.Liu, J., Bramblett, D., Zhu, M., Lozano, R., Kobayashi, R., Ross, S.R. und Dudley, J.P. (1997) The matrix attachment region-binding protein SATB1 participates in negative regulation of tissue-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 17: 5275-5287.
- 101.Liu, J., Barnett, A., Neufeld, E.J. und Dudley, J.P. (1999) Homeoproteins CDP and SATB1 interact: potential tissue-specific regulation. *Mol Cell Biol* 19: 4918-4926.
- 102.Lorincz, M.C., Schubeler, D. und Groudine, M. (2001) Methylation-mediated proviral silencing is associated with MeCP2 recruitment and localized histone H3 deacetylation. *Mol Cell Biol* 21: 7913-7922.
- 103.Luckow, B. und Schütz, G. (1989) Cell-type specificity of regulatory elements identified by linker scanning mutagenesis in the promoter of the chicken lysozyme gene. *Nucleic Acids Res* 17: 8451-8462.
- 104.Magdinier, F. und Wolffe, A.P. (2001) Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14y p16 locus in human neoplasia. *PNAS* 98: 4990-4995.
- 105.Majumder, S., Ghoshal, K., Datta, J., Bai, S., Dong, X., Quan, N., Plass, C. und Jacob, S.T. (2002) Role of de novo DNA methyltransferases and methyl CpG-binding proteins in gene silencing in a rat hepatoma. *JBC* 18: 16048-16058.
- 106.Malik, H. S., Henikoff, S. und Eickbush, T. H. (2000) Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Res* 10: 1307-1318.
- 107.Manuelidis, L. (1976) Repeating restriction fragments of human DNA. *Nucleic Acids Res* 3: 3063-3076.
- 108.Martignetti, J.A. und Brosius, J. (1993) BC200 RNA: a neural RNA polymerase III product encoded by a monomeric Alu element. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11563-11567.
- 109.Mattia, E., Eufemi, M., Chichiarelli, S., Ceridono, M. und Ferraro, A. (1998) Differentiation-specific nuclear matrix proteins cross-linked to DNA by *cis*-diammine dichloroplatinum. *Exp Cell Res* 238: 216-219.
- 110.McKnight, R.A., Shamay, A., Sankaran, L., Wall, R.J. und Hennighausen, L. (1992) Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6943-6947.
- 111.Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L., und Bird, A.P. (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58: 499-507.

112. Meehan, R.R., Lewis, J.D. und Bird, A.P. (1992) Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 20: 5085-5092.
113. Miller, O.J., Schnedl, W., Allen, J. und Erlanger, B.F. (1974) 5-Methylcytosin localised in mammalian constitutive heterochromatin. *Nature* 251: 636-637.
114. Miniou, P., Jeanpierre, M., Blanquet, V., Sibella, V., Bonneau, D., Herbelin, C., Fischer, A., Niveleau, A. und Viegas-Péquignot, E. (1994) Abnormal methylation pattern in constitutive and facultative (X inactive chromosome) heterochromatin of ICF patients. *Hum Mol Genet* 3: 2093-2102.
115. Miniou, P., Jeanpierre M., Bourc'his, D., Barbosa, A.A.C., Blanquet, V. und Viegas-Péquignot, E. (1997) Satellite DNA methylation in normal individuals and in ICF patients: heterogeneous methylation of constitutive heterochromatin in adult and fetal tissues. *Hum Genet* 99: 738-745.
116. Mlynárová, L., Loonen, A., Heldens, J., Jansen, R.C., Keizer, P., Stiekema, W.J. und Nap, J.P. (1994) Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. *Plant Cell* 6: 417-426.
117. Muddashetty, R.S., Khanam, T., Kondrachov, A., Bundman, M., Iacoangeli, A., Kremerskothen, J., Duning, K., Barnekow, A., Huttenhofer, A., Tiedge, H., et al. (2002) Poly(A) binding protein is associated with neuronal BC1 and BC200 ribonucleoprotein particles. *J Mol Biol* 321: 433-445.
118. Nan, X., Campoy, F.J. und Bird, A. (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88: 471-481.
119. Nan, X., Meehan, R.R. und Bird, A. (1993) Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 21: 4886-4892.
120. Nan, X., Ng, H.-H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. und Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389.
121. Nan, X., Tate, P., Li, E. und Bird, A. (1996) DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol* 16: 414-421.
122. Nayler, O., Strätling, W.H., Bourquin, J.P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A.M., Fackelmayer, F.O., Ullrich, A. und Stamm, U. (1998) SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res* 26: 3542-3549.
123. Ng, H.-H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. und Bird, A. (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 23: 58-61.
124. Ng, H.-H., Jeppesen, P. und Bird, A. (2000) Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20: 1394-1406.

125. Nguyen, C.T., Gonzales, F.A. und Jones, P.A. (2001) Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res* 29: 4598-4606.
126. Ohki, I., Shimontake, N., Fujita, N., Nakao, M. und Shirakawa, M. (1999) Solution structure of the methyl-CpG-binding domain of the methylation-dependent transcriptional repressor MBD1. *EMBO J* 19: 6653-6661.
127. Ohki, I., Shimontake, N., Fujita, N., Jee, J.-G., Ikegami, T., Nakao, M. und Shirakawa, M. (2001) Solution structure of the methyl-CpG-binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. *Cell* 105: 487-497.
128. Okada, N., Hamada, M., Ogiwara, I. und Ohshima, K. (1997) SINEs and LINEs share common 39 sequences: a review. *Gene* 205: 229-243.
129. Okano, M., Xie, S. und Li, E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19: 219-220.
130. Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. und Li, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247-257.
131. Orrico, A., Lam, C.-W., Galli, L., Dotti, M.T., Hayek, G., Tong, S.-F., Poon, P.M.K., Zappella, M., Federico, A., und Sorrentino, V. (2000) *MECP2* mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Letters* 481: 285-288.
132. Orlando, V. und Paro, R. (1993) Mapping polycomp-repressed domains in the bithorax complex by *in vivo* formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 75: 1187-1198.
133. Orlando, V., Strutt, H. und Paro, R. (1997) Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. *Methods* 11: 205-214.
134. Ostertag, E.M. und Kazazian, H.H. Jr. (2001) Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* 35: 501-538.
135. Paulson, J.R. und Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12: 817-828.
136. Phi-Van, L. und Strätling, W.H. (1990) *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 11: 1-11.
137. Phi-Van, L., von Kries, J.P., Ostertag, W. und Strätling, W.H. (1990). The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol Cell Biol* 10: 2302-2307.
138. Phi-Van, L. und Strätling, W.H. (1996) Dissection of the ability of the chicken lysozyme gene 5' matrix attachment region to stimulate transgene expression and to dampen position effects. *Biochem* 35: 10735-10742.

- 139.Pritchett, D.B., Sontheimer, H., Shivers, B.D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P.R. und Seeburg, P.H. (1989) Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 338: 582-585.
- 140.Prosser, J., Frommer, M., Paul, C. und Vincent, P.C. (1986) Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J Mol Biol* 187: 145-155.
- 141.Quaderi, N.A., Meehan, R.R., Tate, P.H., Cross, S.H., Bird, A.P., Chatterjee, A., Herman, G.E. und Brown, S.D. (1994) Genetic and physical mapping of a gene encoding a methyl CpG binding protein, Mecp2, to the mouse X chromosome. *Genomics* 22: 648-651.
- 142.Quentin, Y. (1994) Emergence of master sequences in families of retroposons derived from 7sl RNA. *Genetica* 93: 203-215.
- 143.Razin, A. (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing: a three-way connection. *EMBO J* 17: 4905-4908.
- 144.Reichwald, K., Thiesen, J., Wiehe, T., Weitzel, J., Strätling, W.H., Kioschis, P., Poustka, A., Rosenthal, A., und Platzer, M. (2000) Comparative sequence analysis of the *MECP2*-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mamm Genome* 11: 182-190.
- 145.Rett, A. (1966) Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. *Wien Med Wsch* 116: 723-726.
- 146.Reynaud, C., Bruno, P., Boullanger, P., Grange, J., Barbesti, S. und Niveleau, A. (1991) Monitoring of urinary excretion of modified nucleosids in cancer patients using a set of six monoclonal antibodies. *Cancer letters* 61: 255-262.
- 147.Rideout, W.M.I., Coetzee, G.A., Olumi, A.F. und Jones, P.A. (1990) 5-methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 249: 1288-1290.
- 148.Riggs, A.D. und Pfeifer, G.P. (1992) X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet* 8: 169-174.
- 149.Riggs, A.D. und Porter, T.N. (1996) in *Epigenetic mechanisms of gene regulation* (Russo, X., Martienssen, R.A. und Riggs, A.D.) pp. 29-45, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- 150.Robertson, K.D. (2001) DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 20: 3139-3155.
- 151.Rosenblum, B.B., Lee, L.G., Spurgeon, S.L., Khan, S.H., Menchen, S.M., Heiner, C.R. und Chen, S.M. (1997). New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res* 25: 4500-4504.
- 152.Rountree, M.R. (2001) DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20: 3156-3165.
- 153.Roy-Engel, A.M., Carrol, M.L., Vogel, E., Garber, R.K., Nguyen, S.V., Salem, A.-H., Batzer, M.A. und Deininger, P.L. (2001) Alu insertion polymorphisms for the study of human genomic diversity. *Genetics* 159: 279-290.

154. Samuel, S.K., Spencer, V.A., Bajno, L., Sun, J.M., Holth, L.T., Oesterreich, S. und Davie, J.R. (1998) In situ cross-linking by cisplatin of nuclear matrix-bound transcription factors to nuclear DNA of human breast cancer cells. *Cancer Res* 58, 3004-3008.
155. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
156. Sassaman, D.M., Dombroski, B.A., Moran, J.V., Kimberland, M.L., Nass, T.P., DeBerardinis, R.J., Gabriel, A., Swergold, G.D. und Kazazian, H.H. Jr. (1997) Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* 16: 37-43.
157. Skryabin, B.V., Kremerskothen, J., Vassilacopoulou, D., Disotell, T.R., Kapitonov, V.V., Jurka, J. und Brosius, J. (1998) The BC200 RNA gene and its neural expression are conserved in *Anthropoidea* (primates). *J Mol Evol* 47: 677-685.
158. Shabazian, M.D., Antalffy, B.A., Armstrong, D.L. und Zoghbi, H.Y. (2002) Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 11: 115-124.
159. Shiraishi, M., Chuu, Y.H. und Sekiya, T. (1999a) Isolation of DNA fragments associated with methylated CpG islands in human adenocarcinomas of the lung using a methylated DNA binding column and denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2913-2918.
160. Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Chuu, Y.H. und Sekiya, T. (1999b) Tight interaction between densely methylated DNA fragments and the methyl-CpG binding domain of the rat MeCP2 protein attached to a solid support. *Biol Chem* 380: 1127-1131.
161. Siegfried, Z. und Cedar, H. (1997) DNA methylation: a molecular lock. *Curr Biol* 7: 305-307.
162. Smit, A.F. und Riggs, A.D. (1995) MIRs are classic, tRNA-derived SINEs that amplified before the mammalian radiation. *Nucleic Acids Res* 23: 98-102.
163. Smit, A.F., Toth, G., Riggs, A. D. und Jurka J. (1995) Ancestral, mammalian-wide subfamilies of LINE-1 repetitive sequences. *J Mol Biol* 246, 401-417.
164. Smit, A.F. (1996) The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr Opin Genet Dev* 6: 743-748.
165. Smit, A.F. (1999) Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9: 657-663.
166. Solomon, M.J. und Varshavsky, A. (1985) Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for *in vivo* chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6470-6474.
167. Solomon, M.J., Larsen, L.P. und Varshavsky, A. (1988) Mapping Protein-DNA interactions *in vivo* with formaldehyde: Evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* 53: 937-947.

- 168.Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. und Brennan, M.J. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51: 1409-1416.
- 169.Stief, A., Winter, D.M., Strätling, W.H. und Sippel, A.E. (1989) A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* 341: 343-345.
- 170.Strätling, W.H. und Yu, F. (1999) Origin and roles of nuclear matrix proteins. Specific functions of the MAR-binding protein MeCP2/ARBP. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9: 311-318.
- 171.Tatematsu, K., Yamazaki, T. und Ishikawa, F. (2000) MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes Cells* 5: 677-688.
- 172.Tiedge, H., Freneau, R.T. Jr., Weinstock, P.H., Arancio, O. und Brosius, J. (1991) Dendritic location of neural BC1 RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2093-2097.
- 173.Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., und Schreiber, S.L. (1998) Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodeling complex. *Nature* 395: 917-921.
- 174.Trappe, R., Laccone, F., Cobilanschi, J., Meins, M., Huppke, P., Hanefeld, F. und Engel, W. (2001) *MECP2* mutations in sporadic cases of rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet* 68: 1093-1101.
- 175.Trelogan, S.A. und Martin, S.L. (1995) Tightly regulated, developmentally specific expression of the first open reading frame from LINE-1 during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1520-1524.
- 176.Van den Veyver, I.B. und Zoghbi, H.Y. (2000) Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 10: 275-279.
- 177.Vilain, A., Apiou, F., Vogt, N., Dutrillaux, B. und Malfoy, B. (1996) Assignment of the gene for methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) to human chromosome band Xq28 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 74: 293-294.
- 178.Villard, L., Kpebe, A., Cardoso, C., Chelly, J., Tardieu, M., und Fontes, M. (2000) Two affected boys in a Rett syndrome family. *Neurology* 55: 1188-1193.
- 179.Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 615-619.
- 180.von Kries, J.P., Buhrmester, H. und Strätling, W.H. (1991) A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification and mode of binding. *Cell* 64: 123-135.
- 181.Wade, P.A., Jones, P.L., Vermaak, D. und Wolffe, A.P. (1998) A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr Biol* 8: 843-846.

182. Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F. und Wolffe, A.P. (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodeling and histone deacetylase activity. *Nat Genet* 23: 62-66.
183. Wade, P.A. (2001) Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 23:1131-1137.
184. Wakefield, R.I., Smith, B.O., Nan, X., Free, A., Soteriou, A., Uhrin, D., Bird, A.P. und Barlow, P.N. (1999) The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA. *J Mol Biol* 291: 1055-1065.
185. Wallace, R.H., Marini, C., Petrou, S., Harkin, L.A., Bowser, D.N., Panchal, R.G., Williams, D.A., Sutherland, G.R., Mulley, J.C., Scheffer, I.E. et al. (2001) Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet* 28: 49-52.
186. Walter, Z., Wozniak, K. und Kowalik, J. (1997) Cross-linking of nuclear proteins to DNA by platinum compounds. *Cell Mol Biol Lett* 2: 371-378.
187. Wan, M., Lee, S.S.J., Zhang, X., Houwink-Manville, I., Song, H.-R., Amir, R.E., Budden, S., Naidu, S., Pereira, J.L.P., Lo, I.F.M. et al. (1999) Rett syndrome and beyond: Recurrent spontaneous and familial *MECP2* mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 65: 1520-1529.
188. Waye, J.S. und Willard, H.F. (1987) Nucleotide sequence heterogeneity of alpha satellite repetitive DNA: a survey of alphoid sequences from different human chromosomes. *Nucleic Acids Res* 15: 7549-7552.
189. Weitzel, J.M., Buhrmester, H. und Strätling, W.H. (1997) Chicken MAR-binding protein ARBP is homologous to rat methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Mol Cell Biol* 17: 5656-5666.
190. Willard, H.F. und Waye, J.S. (1987a) Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. *J Mol Evol* 25: 207-214.
191. Willard, H.F. und Waye, J.S. (1987b) Hierarchical order in chromosome specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet* 3: 192-198.
192. Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17: 3469-3478.
193. Woodcock, D.M., Lawler, C.B., Linsenmeyer, M.E., Doherty, J.P. und Warren, W.D. (1997) Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J Biol Chem* 272: 7810-7816.

194. Wedrychowski, A., Schmidt, W.N. und Hnilica, N.S. (1986) The in vivo cross-linking of proteins and DNA by heavy metals. *J Biol Chem* 261: 3370-3376.
195. Xu, G.-L., Bestor, T.H., Bourc'his, D., Hsieh, C.-L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J.J. und Viegas-Péquignot, E. (1999) Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402: 187-191.
196. Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Gote, J., und Wang, W. (1998) NuRD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* 2: 851-861.
197. Yoder J.A., Walsh, C.P. und Bestor, T.H. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335-339.
198. Yu, F., Thiesen, J. und Strätling, W.H. (2000) Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res* 28: 2201-2206.
199. Yu, F., Zingler, N., Schumann, G. und Strätling, W.H. (2001) Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res* 29: 4493-4501.
200. Zhang, Y., Ng, H.-H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. und Reinberg, D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13: 1924-1935.

8 Anhang

8.1 Allgemeine Abkürzungen

Abs.	absolut
Anti-5-MeC	Anti-5'-Methylcytosin-Antikörper
ARBP	Attachment region binding protein
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Ci	Curie
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase
cMeCP2	Hühner MeCP2
CpG	Cytidin-Guanosin-Dinukleotid
cpm	Counts per minute
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMD	differentiell methylierte Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz
ERV	Vertebraten-spezifische endogene Retroviren
EST	Expressed sequence tag
FBP11	Formin bindendes Protein 11
FCS	Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLAM	Free left Alu monomer
FPLC	Fast protein liquid chromatographie
FRAM	Free right Alu monomer
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GST	Glutathion S-Transferase

h	Stunde(n)
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hMeCP2	Humanes Methyl-CpG-bindungs Protein 2
HRP	Horseradish peroxidase
ICF syndrome	Immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies syndrome
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
Kb / kb	Kilobasenpaare / kilobasepairs
kDa	Kilodalton
KU	Kilounits
LB	Luria-Bertani
LINE	Long interspersed nuclear repeat
LTR	Long terminal repeat
M	Molar
MAR	Matrix attachment region
Mb	Megabase
MBD	Methyl-CpG-bindungsdomäne
mCi	Millicurie
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MDR1	Multidrug resistance Gen 1
MeCP2	Methyl-CpG-bindungsprotein 2
min	Minute
MIR	Mammalian-wide interspersed repeat
mM	Millimolar
MT-1	Metallothionein Gen 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLS	Nuclear localisation signal
NMR	Kernmagnetische Resonanz
ORF	Open reading frame
p. A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAPP	Poly-A-bindungs-Protein
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PKR	Interferon-induzierbare RNA-abhängige Proteinkinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PR	Prolin-reiche Region
rMeCP2	MeCP2 aus Ratte
RbAp	Retinoblastoma protein associated protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAF	Scaffold attachment factor
SAP	Silencer associated protein
SAR	Scaffold attachment region

SATB	specific AT-rich DNA binding protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SINE	Short interspersed nuclear element
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein particle
SV	Sarkom Virus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPRT	Target primed reverse transcription
TRD	Transkriptionelle Repressor Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
U	Units
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolettes Licht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl- β -D-galactopyranosid

8.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juli 1998 bis Mai 2003 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Leitung von meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Wolf H. Strätling, angefertigt.

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Wolf H. Strätling für die intensive Betreuung der Arbeit. Viele anregende Diskussionen haben die wissenschaftliche Arbeit begleitet und mir fortlaufend neue Aspekte aufgezeigt.

Herrn Prof. Dr. Hans Marquardt möchte ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die Vertretung meiner Arbeit gegenüber dem Fachbereich Chemie danken.

Herrn Prof. Dr. Singh danke ich für die Einführung in die Technik der Metaphasenpräparation.

Ich danke Volker Schoder für die statistischen Analysen, Dr. Oliver Klotsche und Dr. Michaela Schweizer für die Unterstützung am konfokalen Lasermikroskop.

Dr. Joachim Weitzel, Dr. Stefan Hamann, Dr. Jens Thiesen, Dr. Fang Yu, Dr. Jan Buschdorf, Olaf Friese und Susanne Giehler danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre kollegiale Unterstützung im Labor. Ebenso danke ich allen Kollegen der Zellulären Signaltransduktion und allen Mitarbeitern des Instituts für den fortwährenden wissenschaftlichen Austausch und das kollegiale Miteinander.

Ich danke meiner Freundin Kerstin Büttner.

Ich danke meinen Eltern.

Ich danke der Universität Hamburg für das zeitweise gewährte Stipendium.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname: Koch
Vorname: Christoph Matthias
Geburtsdatum: 5. Mai 1971
Geburtsort: Hamburg

Schulbildung

1978 – 1988 Besuch der Grundschule Groß Borstel
1988 – 1991 Besuch des Heilwig Gymnasiums in Hamburg

Wehrdienst

1990 – 1991 Grundwehrdienst in der Röttiger Kaserne, Hamburg

Universitätsausbildung

1991 – 1998 Studium der Chemie an der Universität Hamburg
Schwerpunkt: Biochemie mit dem Abschluss als
Diplom-Chemiker
1995 Chemieauslandsemester an der Universität in
Rennes, Frankreich als Erasmusstudent
Thema der Diplomarbeit: Studien zum
Metabolismus des Lebensmittelmutagens 2-Amino-
3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indol
seit Juli 1998 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer.
nat. Wolf H. Strätling, Institut für Medizinische
Biochemie und Molekularbiologie des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.
Thema: DNA-Zielsequenzen des humanen
Repressors Methyl-CpG-bindendes Proteins 2
(MeCP2)

8.4 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Hamburg, den

.....

Christoph Koch