

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 Schlaufen 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 unbekanntem 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 an 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.