

**Untersuchungen zur Repressoraktivität
des humanen Kernproteins MeCP2
(Methyl-CpG-Bindungsprotein 2)**

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Fang Yu

aus Shanghai

Hamburg, 2001


Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. G. Strätling

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Prof. Dr. H.-P. Mühlbach

Tag der Disputation: 04. Januar 2002

Hamburg, den 21. Dezember 2001




Professor Dr. U. Wienand
Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	4
1.1	Chromatinorganisation und MAR-bindende Proteine	4
1.2	DNA-Methylierung und Methyl-CpG bindende Proteine	6
1.3	Transkription und Transkriptionsfaktoren	10
1.4	Transposons	12
1.5	Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit	15
 2	 MATERIAL UND METHODEN	 17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	17
2.1.2	Lösungen	17
2.1.3	Antibiotika und Medium für Bakterienkultur	20
2.1.4	Zellkultur	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.2.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	22
2.2.3	Ligation	22
2.2.4	Herstellung kompetenter Bakterien	22
2.2.5	Transformation	23
2.2.6	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab („Mini-Prep“)	23
2.2.7	Präparation von Plasmid-DNA für Sequenzierung	24
2.2.8	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab („Maxi-Prep“)	24
2.2.9	Sequenzierung von DNA	25
2.2.10	Präparative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.2.11	Überlappungs-PCR	26
2.2.12	Durchmusterung der Bakterienkolonien	28
2.2.13	Western-Blot	29
2.2.14	Immunfluoreszenzmikroskopie	30
2.2.15	Transfektion	31

2.2.16	Reporter-gen-Assay	32
2.2.17	cDNA-Klonierung mittels RT-PCR	33
2.2.18	Isolierung der Gesamt-RNA	34
2.2.19	RNA-Dot-Blot	35
2.2.20	Gezielte <i>in vitro</i> Mutagenese	36
2.2.21	Immunpräzipitation	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Die Überexpression von MeCP2 in kultivierten Zellen	39
3.2	Die <i>in vivo</i> DNA-Bindung von MeCP2	40
3.3	Die transkriptionelle Repression von MeCP2	43
3.4	Die Mutationsstudie von miniTRD	48
3.5	Protein-Protein-Interaktionen von MeCP2	54
3.6	Repression der L1-Promotoren durch TRD _{MeCP2} und TRD _{MBD1}	58
3.7	Repression des methylierten L1-Promotors durch MeCP2	63
3.8	Expressionsanalyse von MeCP2 und L1	66
3.9	Keine L1-Expression in Leukozyten von Rett-Mädchen	68
3.10	Manipulation der endogenen L1-Expression	69
3.11	Keine Repression des Alu-Elementes durch TRD von MeCP2	71
3.12	Keine Repression des methylierten Alu-Elementes durch MeCP2	73
4	DISKUSSION	75
4.1	MeCP2/ARBP ist ein MAR bindendes Protein <i>in vivo</i> .	75
4.2	MeCP2 kann die Transkription über einem Histon-Deacetylase-unabhängigen Weg reprimieren.	78
4.3	MeCP2 reprimiert die LINE1-Transkription <i>in vivo</i> .	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	85

6	LITERATUR	88
7	ANHANG	100
7.1	Abkürzungen	100
7.2	Danksagung	102
7.3	Lebenslauf	103
7.4	Veröffentlichungen	104
7.5	Erklärung	105

1 Einleitung

Das Thema dieser Doktorarbeit ist die Funktionsanalyse des Kernproteins MeCP2 (Methyl-CpG-Bindungsprotein 2). MeCP2 besitzt unterschiedliche DNA-Bindungseigenschaften und kann an MARs (matrix attachment regions) und methylierter DNA binden. Die DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle in der Gen-Regulation und MeCP2 ist ein gut untersuchter Vermittler in der transkriptionellen Repression. Aufgrund einer Homologie in der DNA-Bindungsdomäne bildet MeCP2 mit vier weiteren Proteinen die MBD-Familie.

1.1 Chromatinorganisation und MAR-bindende Proteine

Eukaryotisches Chromatin in Interphasezellen und mitotische Chromosomen sind in funktionelle und topologische Einheiten, Domänen, gegliedert. Domänen enthalten Gene oder Gengruppen, einschließlich deren regulatorischen *cis*-Elemente. Nach einem viel diskutierten Modell heften sich die Domänen mittels spezifischer Sequenzen an ein Kern- beziehungsweise Chromosomgerüst aus Proteinen an und bilden Schleifen. Diese Schleifen, die jeweils separate Domänen darstellen, haben zum Beispiel in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* schätzungsweise eine Größe von fünf bis einigen Hundert Kilobasenpaaren (Benyajati und Worcel, 1976). Entfernt man in einem Metaphase-Chromosom die Histone durch Extraktion, so erhält man im Elektronenmikroskop das Bild eines zentralen Proteingerüsts, von dem die DNA in Form von zahlreichen Schleifen ausgeht (Paulson und Laemmli, 1977). Diese Chromatinorganisation ist nicht nur für die kompakte Verpackung eines circa 200 cm langen DNA-Fadens in einem Zellkern mit einem Durchmesser von einigen μm essentiell, sondern sie beeinflusst auch verschiedene DNA-Aktivitäten wie Transkription, Replikation und Rekombination.

Auf der Suche nach solchen für die Wechselwirkung zwischen DNA und Proteingerüst verantwortlichen DNA-Sequenzen wurden unter anderem MARs (matrix attachment region) beziehungsweise SARs (scaffold attachment region) identifiziert (Gasser und Laemmli, 1987; Phi-Van und Strätling, 1990). Die Bezeichnungen richten sich nach den biochemischen Präparationsverfahren (Cockerill und Garrard, 1986; Mirkovitch *et al.*, 1984) und können als äquivalente Begriffe betrachtet werden. MARs/SARs sind weit verbreitet und wurden in vielen höheren Organismen identifiziert, zum Beispiel Fruchtfliege, Huhn, Mensch, Soja und Tabak (Boulikas, 1995). Es handelt sich oft um AT-reiche Sequenzen mit einer Länge zwischen 250

und einigen Tausend Basenpaaren, die ansonst über keine Konsensus-Sequenzen verfügen (Gasser und Laemmli 1987; Boulikas, 1995). In der letzten Zeit gibt es zunehmend Ansätze, potentielle MARs/SARs nach einem statistischen Verfahren per Computer aus den immer umfangreicheren Genomdaten aufzuspüren (Singh *et al.*, 1997).

Die isolierende Wirkung von MARs wurde durch Versuche mit künstlichen Domänen entdeckt. In stabilen Transfektionen zeigten die durch MARs flankierte Reportergene eine verstärkte und positionsunabhängige Expression. Außerdem können MARs sogar in heterologen Systemen noch ihre Wirkungen entfalten, so zum Beispiel besitzt das 5'-Lysozymgen-MAR aus Huhn biologische Aktivitäten nicht nur in Monozyten aus Huhn (Stief *et al.*, 1989), sondern auch in transgenen Mäusen (McKnight *et al.*, 1992), Rattenzellen (Phi-Van *et al.*, 1990) und sogar Tabakpflanzen (Mlynarova *et al.*, 1994), was sehr für eine evolutionär konservierte Rolle von MARs spricht.

MARs üben ihre isolierende Wirkung wahrscheinlich nicht als nackte Nukleinsäure, sondern über gebundene Proteine als Nukleinsäure-Protein-Komplexe aus. Mit MARs als Sonde in Southwestern-Blots oder Gelverzögerungstests („band shift“) wurden bereits mehrere MAR-bindende Proteine identifiziert, zum Beispiel DNA Topoisomerase II (Berrios *et al.*, 1985), SATB1 (special AT-rich sequence binding protein) (Dickinson *et al.*, 1992), Histon H1 (Izaurrealde *et al.*, 1989), Lamin B1 (Ludérus *et al.*, 1992), p120/hnRNP U/SAF-A (von Kries *et al.*, 1994; Kiledjian und Dreyfuss, 1992; Fackelmayer *et al.*, 1994), Nukleolin (Dickinson und Kohwi-Shigematsu, 1995) und SAF-B (Renz und Fackelmayer, 1996).

Im Labor von Dr. Strätling wurde ARBP (attachment region binding protein) aus Huhn identifiziert. Es bindet an MARs/SARs aus verschiedenen Spezies in einer spezifischen und kooperativen Weise. Das Protein ist eine abundante Komponente der Kernmatrix (von Kries *et al.*, 1991) und bindet mit hoher Affinität von $K_D = 2 - 6 \times 10^{-10}$ M an ein spezifisches Sequenzmotiv in 5'-Lysozymgen-MAR, das aus der zentralen Sequenz 5'-GGTGT-3' und flankierenden AT-reichen Regionen besteht (Buhrmester *et al.*, 1995). Eine 125 Aminosäuren umfassende Region im N-terminalen Teil stellt die MAR-Bindungsdomäne dar (Weitzel *et al.*, 1997). Interessanterweise erwies sich das partiell klonierte ARBP aus Huhn als Homolog zu MeCP2 (Methyl-CpG-Binding Protein 2) aus Mensch und Ratte, einem an DNA mit methylierten CpG-Stellen bindenden Protein (Weitzel *et al.*, 1997). In der folgenden Arbeit werden daher ARBP und MeCP2 als Bezeichnungen für dasselbe Protein gleichgestellt.

1.2 DNA-Methylierung und Methyl-CpG bindende Proteine

Die Methylierung von Cytosin zu 5'-Methylcytosin (die sogenannte „fünfte“ Base) in Dinukleotiden CpG stellt eine folgenreiche epigenetische Modifikation des eukaryotischen Genoms dar. Sie ist wichtig für die negative Regulation der Gen-Expression, die X-Inaktivierung, die genomische Prägung (Imprinting), die negative Regulation der transponierbaren Elemente und die Krebs-Entstehung (Eden und Cedar, 1994; Bird, 1992). Da 5'-Methylcytosin spontan durch hydrolytische Deaminierung zu Thymin umgewandelt werden kann, sind die CpG-Dinukleotide häufiger von Mutation betroffen und somit seltener als die anderen fünfzehn Dinukleotide im Säuger genom anzutreffen. Darüber hinaus sind die CpG-Dinukleotide im Genom nicht zufällig verteilt, sondern in sogenannten CpG-Inseln gehäuft, die mit Promotoren assoziiert sind (Stout und Caskey, 1985). Vielfach ist eine negative Korrelation zwischen dem Methylierungsgrad und der Genaktivität beschrieben worden: aktiv exprimierte Gene sind in den Promotor-nahen Bereichen nicht oder weniger stark methyliert als der Rest des Genoms, während die Promotoren von nicht transkribierten Genen überdurchschnittlich viele 5'-Methylcytosin-Reste enthalten (Eden und Cedar, 1994; Saluz *et al.*, 1986). Bei weiblichen Säugetieren ist eines der beiden X-Chromosomen stark methyliert, transkriptionell inaktiv, äußerst kompakt und liegt als lichtmikroskopisch sichtbares Barrsches Körperchen in Zellkernen vor (Riggs und Pfeifer, 1992). In Maus-Fibroblastenzellen mit zerstörtem *DNMT1* (*de novo* Methyltransferase 1)-Gen wurde die Erhaltung des DNA-Methylierungszustandes stark beeinträchtigt und die Expression bei circa 10% aller untersuchten Gene nahm zu (Jackson-Grusby *et al.*, 2001).

Die DNA-Methylierung spielt auch eine wichtige Rolle in vielen normalen und pathologischen Entwicklungsprozessen. Die gezielte Zerstörung der Gene für eines der beiden DNA-Methyltransferasen, *DNMT1* oder *DNMT3A*, verursacht bei Mäusen die embryonale Letalität und der Ausfall des Gens für die dritte bekannte DNA-Methyltransferase, *DNMT3B*, führt zum frühzeitigen Tod kurz nach dem Geburt (Li *et al.*, 1992; Okano *et al.*, 1999). Bei Menschen führen die Mutationen im *DNMT3B*-Gen zum rezessiven, autosomalen ICF-Syndrom (immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies) (Xu *et al.*, 1999). In vielen Krebsfällen sind abnormale DNA-Methylierungsmuster für die Krebs-Entstehung direkt verantwortlich: die Aktivierung der Onkogene durch die DNA-Hypomethylierung und / oder die Reprimierung der Tumor-Supressor-Gene durch die DNA-Hypermethylierung tragen zur unkontrollierten Proliferation der Krebszellen bei (Robertson, 2001; Rountree, 2001). Aufgrund

dieser immensen Bedeutung der DNA-Methylierung wurde seit dem Jahr 1999 das Humane Epigenom Projekt, das in den nächsten Jahren die DNA-Methylierungsmuster des gesamten menschlichen Genoms abbilden soll, gestartet.

Die Wirkung von der DNA-Methylierung erfolgt entweder direkt oder indirekt. In einigen Fällen behindert die DNA-Methylierung direkt die Bindung der Transkriptionsfaktoren an ihre Zielsequenzen auf der DNA, zum Beispiel MLTF (major late transcription factor) bindet nur an nicht-methylierter DNA (Watt und Molloy, 1988). Andere Transkriptionsfaktoren können hingegen sowohl an methylierten, als auch an nicht-methylierten Zielsequenzen binden, zum Beispiel Sp1 (Holler *et al.*, 1988). Bezüglich der zuletzt genannten Situation wurde seit langer Zeit angenommen, dass methylierte DNA-Sequenzen alternativ durch spezifische Proteine erkannt werden, die Signale aus Methylierungsstellen weiterleiten. Einige solcher Proteine benötigen diese Methylierung in einem bestimmten Sequenz-Kontext und stellen Transkriptionsfaktoren dar (Tate und Bird, 1993). Darüber hinaus wurde MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2) als Prototyp einer Proteinfamilie identifiziert, deren Mitglieder einzelne symmetrische methylierte CpG-Stellen erkennen können (Lewis *et al.*, 1992; Hendrich und Bird, 1998).

MeCP2 aus Mensch besteht aus 486 Aminosäuren. Sein modularer Aufbau wird in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Seine Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) besteht aus 85 Aminosäuren (aa 78 – 162) und ist in einem dreisträngigen, antiparallelen β -Faltblatt sowie einem direkt folgenden α -Helix strukturiert (Nan *et al.*, 1993; Wakefield *et al.* 1999; Brunner *et al.*, 2000). Die MBD ist in die MAR-Bindungsdomäne (aa 71 – 195) eingebettet, die zusätzliche Motive für die Bindung an AT-reiche DNA, sogenannte AT-hooks, besitzt (Weitzel *et al.*, 1997; Aravind und Landsman, 1998). In der Mitte des Proteins befindet sich die 104 Aminosäuren lange transkriptionelle Repressor-Domäne (aa 207 – 310) (TRD), die den Co-Repressor-Komplex aus mSin3A und HDACs (Histon-Deacetylasen) rekrutiert (Nan *et al.*, 1997; Nan *et al.*, 1998). Die C-terminalen 63 Aminosäuren beteiligen sich an der Nucleosombindung (Chandler *et al.*, 1999). Dadurch verknüpft MeCP2 auf der molekularen Ebene drei bis vor kurzem noch separat betrachtete Themen: DNA-Methylierung, Histon-Acetylierung und Chromatin-Organisation (Razin, 1998).

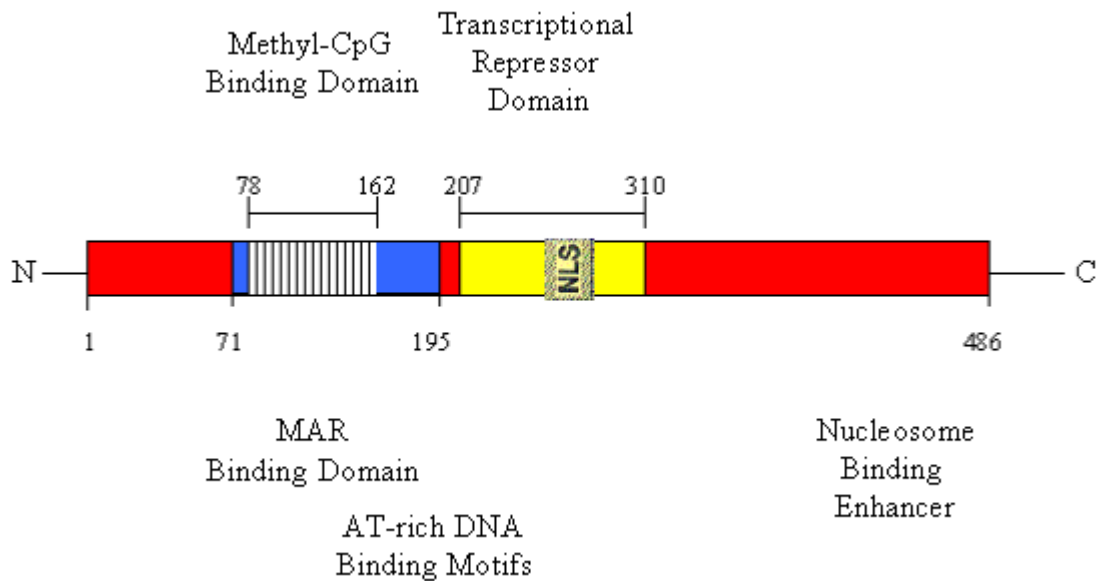


Abbildung 1: Die Domänenstruktur von MeCP2 aus Mensch. Der Aufbau von menschlichem MeCP2 (aa 1 – 486) ist schematisch dargestellt. Das weiß schraffierte Rechteck zeigt die Methyl-CpG-bindende Domäne (aa 78 - 162) (MBD), die innerhalb der MAR-Bindungsdomäne (aa 71 - 195) (blau hervorgehoben) liegt. Das gelbe Rechteck zeigt die transkriptionelle Repressordomäne (aa 207 - 310) (TRD), die zum größten Teil mit der mSin3A-Interaktionsdomäne überlappt. Das graue Rechteck zeigt das Kernlokalisierungssignal (aa 255 – 273) (NLS). Im extremen C-Terminus liegt die noch nicht genau kartierte Nucleosombindung stimulierende Domäne.

Das auf X-Chromosom (Xq28) liegende *MECP2*-Gen ist 76 kbp lang und enthält 4 Exons (Quaderi *et al.*, 1994; Vilain *et al.*, 1996; Reichwald *et al.*, 2000). Der Promotor und das erste, nicht kodierende Exon (69 bp) liegen innerhalb einer typischen CpG-Insel. Der Translationsstart liegt im zweiten Exon (124 bp). Im dritten und vierten Exon (351 bp und 9642 bp) liegen die kodierende DNA der beiden wichtigen Domänen von MeCP2: MBD und TRD. Das *MECP2*-Gen wird in allen untersuchten Geweben ubiquitär exprimiert. Durch den alternativen Gebrauch der beiden Polyadenylierungsstellen im vierten Exon entstehen zwei Transkripte von 1.9 kb und 10 kb, deren Verteilung und Abundanz gewebespezifisch sind (Reichwald *et al.*, 2000).

Die Entdeckung im Jahre 1999, dass Mutationen im *MECP2*-Gen die genetische Ursache des Rett-Syndroms darstellen, markiert den Beginn einer neuen Ära der MeCP2-Forschung (Amir *et al.*, 1999). Das Rett-Syndrom wurde nach dem Wiener Kinderarzt Dr. Andreas Rett, der im Jahre 1966 zum ersten Mal diese neurologische Störung beschrieb, benannt (Rett, 1966). Davon betroffen sind fast ausschließlich Mädchen mit einer Häufigkeit von etwa 1 unter 15,000 Neugeborenen und diese geschlechts-spezifische Dominanz wird durch *de novo* Mutationen von überwiegend paternalen Herkunft verursacht (Trappe *et al.*, 2001). Aus klinischer Sicht

entwickeln sich die Patientinnen in den ersten sechs bis achtzehn Monaten normal, erfahren dann aber eine rasch fortschreitende Rückentwicklung bereits erworbener Fähigkeiten, zum Beispiel Verlust von bereits gelernten Wörtern, gezielten Handbewegungen und sozial-kommunikativen Fähigkeiten. Zu den klinischen Diagnosekriterien gehören außerdem mentale Retardierung, stereotype Handbewegungen, Atemprobleme, Krämpfe, Skoliose und Wachstumsstillstand. Eine biochemische Diagnose ebenso wie eine kausale Therapie gibt es zur Zeit noch nicht.

Mehrere internationale Studien mit über 200 Probanden entdeckten bei bis zu 80% der Rett-Patienten Veränderungen in der kodierenden Region des *MECP2*-Gens. Auf MBD, TRD und C-Terminale Region entfallen jeweils 32%, 38% und 13% der berichteten Mutationsfälle (Dragich *et al.*, 2000). Obwohl fast alle Mutationen *de novo* entstanden sind, gibt es acht besonders häufige Mutationen durch die C→T-Transition, die circa 65% der gesamten bekannten Mutationsfälle ausmacht. Eine strikte Korrelation zwischen dem Mutationstyp und dem Krankheitsbild gibt es nicht, darüber hinaus führt die *MECP2*-Mutation nicht zwingend zum Rett-Syndrom: einige Frauen mit Mutationen im *MECP2*-Gen und gleichzeitiger, nicht-zufälliger X-Inaktivierung sind symptomfrei (Amir *et al.*, 2000; Bienvenu *et al.*, 2000). Mäuse mit zerstörtem *MECP2*-Gen zeigen mit menschlichem Rett-Syndrom vergleichbare Eigenschaften und verifizieren *MECP2*-Mutationen als genetische Ursache für das Rett-Syndrom (Guy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den rasanten Fortschritten in der Mutationsanalyse kann immer noch nicht erklärt werden, wie der Ausfall der MeCP2-Funktion zur Pathogenese des Rett-Syndroms führt.

Aufgrund einer Sequenzhomologie in der MBD von MeCP2 wurden vier weitere Proteine in der EST-Datenbank identifiziert und kloniert: MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 (Hendrich *et al.*, 1998). Außerhalb der MBD besitzen die fünf Proteine keine große Homologie. Mit der Ausnahme von MBD3 können MBD1, MBD2 und MBD4 alle *in vitro* an methylierte CpG-Stellen binden. MBD1 ist ein transkriptioneller Repressor, dessen Aktivität teilweise von einem noch unbekanntem Histon-Deacetylase-Komplex abhängig ist (Ng *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 1999). MBD2 ist auch ein transkriptioneller Repressor und eine Komponente vom Komplex MeCP1 (Ng *et al.*, 1999; Boeke *et al.*, 1999). MBD3 ist ein Bestandteil vom Co-Repressor-Komplex Mi-2/NuRD, der beim Nucleosom-Remodelling eine Rolle spielt (Zhang *et al.*, 1999). MBD2 und MBD3 zeigen innerhalb der MBD-Familie die höchste Homologie zueinander, sie können über ihre C-terminalen coil-and-coil-Motive dimerisieren und dadurch eine neue Bindungsspezifität für hemi-methylierte DNA erlangen (Tatematsu *et al.*, 2000). MBD4 ist an der DNA-Reparatur von TG-Mismatches beteiligt, welche durch spontane Deaminierung von

Methylcytosin zu Thymin entstehen (Hendrich *et al.*, 1999a). Die Gene für MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 liegen bei Menschen jeweils auf den Autosomen 18, 18, 19 und 3 (Hendrich *et al.*, 1999b). Dass die Mitglieder der MBD-Familie jeweils distinkte physiologische Funktionen ausüben, verdeutlichen die Experimente mit Knockout-Mäusen: MeCP2-defiziente Mäuse zeigen einen vergleichbaren Phänotyp wie die menschlichen Patienten mit dem Rett-Syndrom; MBD2-defiziente Mäuse sind defekt im maternalen Fütterungsverhalten; MBD3-defiziente Mäuse sterben in der frühen Embryogenese (Chen *et al.*, 2001; Guy *et al.*, 2001; Hendrich *et al.*, 2001).

1.3 Transkription und Transkriptionsfaktoren

Die Initiation der Transkription von Klasse II Genen in eukaryotischen Zellen ist ein hoch regulierter, komplexer Prozess unter Beteiligung zahlreicher Transkriptionsfaktoren. Die Transkription beginnt meistens mit der Bindung von TFIID (Transkriptionsfaktor IID) an die TATA-Box im Promotor, gefolgt von einer geordneten Anlagerung der anderen generellen Transkriptionsfaktoren wie TFIIA, TFIIB, TFIIF, RNA-Polymerase II, TFIIIE, TFIIF und TFIIF an die Promotor-Region (Conaway und Conaway, 1993; Buratowski, 1994; Roeder, 1996).

Der Protein-Komplex TFIID besteht aus TATA-Box-Bindungsprotein (TBP) und mehreren TBP-assoziierten Faktoren (TAFs). TAFs sind wichtig für die Aktivierung der Transkription (Dylacht *et al.*, 1991; Tanese *et al.*, 1991). Einer der Mechanismen für die Aktivierung ist die direkte Interaktion zwischen TAFs und spezifischen transkriptionellen Aktivatoren. Zum Beispiel bindet das menschliche hTAFII130 an die Glutamin-reichen Aktivierungsdomänen von Sp1 sowie CREB (cyclic AMP responsible element binding protein) und zwei TAFs aus Fruchtfliege (dTAFII110 und dTAFII40) interagieren mit den Aktivierungsdomänen von Sp1 sowie VP16 (Tanese *et al.*, 1996; Goodrich *et al.*, 1993; Hoey *et al.*, 1993). Ein anderer Mechanismus für die Aktivierung der Transkription ist die Generierung einer offenen Chromatin-Konfiguration in der Nähe der Promotor-Region mittels der endogenen Histon-Acetyltransferase-Aktivität von TAFII250 (Timmermann *et al.*, 2001).

Neben den ubiquitären, generellen Transkriptionsfaktoren gibt es eine wesentlich höhere Anzahl an Transkriptionsfaktoren, die sequenz-, entwicklungs- oder / und gewebe-spezifisch sind. Zum Beispiel Sp1, welcher an GC-Boxen innerhalb der SV40-Promotor-Region bindet, war einer der ersten eukaryotischen Transkriptionsfaktoren, der identifiziert und kloniert wurde (Dylan und Tjian, 1983). Sp1-DNA-Bindungsstellen kommen in vielen Promotoren sowie regulatorischen

Sequenzen von Genen vor und sind wichtig für die Beibehaltung des demethylierten Zustandes der CpG-Insel im *APRT*-Gen (Brandeis *et al.*, 1994).

Desweiteren wird die Transkription einer Reihe von Genen durch cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) reguliert. Durch cAMP kommt es zur Aktivierung von Mitgliedern der CREB-Familie, welche an die Sequenz CRE (cAMP responsible element) in der Promotor-Region binden. CREB aktiviert die Transkription durch Interaktion mit den generellen Transkriptionsfaktoren wie TBP und hTAFII110 (Ferrerri *et al.*, 1994; Xing *et al.*, 1995). Die phosphorylierte Form von CREB bindet ferner an CBP (CREB binding protein), ein Co-Aktivator mit endogener Histon-Acetyltransferase-Aktivität (Chrivia *et al.*, 1993). CBP bindet außer an CREB auch an andere aktivierenden Transkriptionsfaktoren, zum Beispiel an c-Jun und c-Fos (Bannister *et al.*, 1995). Das Heterodimer aus c-Jun und c-Fos wird auch als AP-1 (Aktivator Protein 1) bezeichnet. Die DNA-Bindungsstelle von AP-1 wird wegen der Induzierbarkeit durch Phorbolester auch TRE (TPA responsible element) genannt (Kvanta und Fredholm, 1993).

Im erweiterten Sinne können auch transkriptionelle Repressoren als Transkriptionsfaktoren betrachtet werden, und zwar als negative Regulatoren. Diese Betrachtungsweise wird unter anderem dadurch unterstützt, dass es eine Reihe von gut untersuchten Proteinen gibt, die unter bestimmten Bedingungen entweder als transkriptionelle Aktivatoren oder als transkriptionelle Repressoren fungieren können. Ein bekanntes Beispiel ist das Kernprotein YY1, das je nach der Verfügbarkeit bestimmter Hilfsproteine die Transkription stimuliert oder hemmt und daher nach dem alten chinesischen philosophischen Begriff Yin-Yang benannt wird (Park und Atchison, 1991; Shi *et al.*, 1991). Weitere Beispiele mit einer solchen dualen Rolle in der Regulation der Transkription sind p53 und GR (Koumenis *et al.*, 2001; Rogatsky *et al.*, 1999).

Die transkriptionellen Repressoren benutzen hauptsächlich vier verschiedene Repressionsmechanismen. Der erste Mechanismus ist die Konkurrenz der Repressoren mit den Aktivatoren um die DNA-Bindungsstellen, zum Beispiel induziert der Repressor YB-1 nach der DNA-Bindung eine lokale Veränderung der DNA-Doppelhelixstruktur und verhindert somit die Bindung der Aktivatoren in der benachbarten Region (MacDonald *et al.*, 1995). Der zweite Mechanismus ist die Inaktivierung der Aktivatoren durch eine Interaktion zwischen Aktivatoren und Repressoren, zum Beispiel hemmt GR die AP-1-abhängige Transkription vom Collagenase-Promotor (Heck *et al.*, 1994). Der dritte Mechanismus ist die Inhibition der generellen Transkriptionsmaschinerie, zum Beispiel interagiert der Co-Repressor N-CoR gleichzeitig mit

TFIIB, TAFII32 sowie TAFII70 und hemmt die Initiation der Transkription (Muscat *et al.*, 1998). Der vierte Mechanismus ist die Erzeugung einer für die Transkription schwer zugänglichen Chromatinstruktur, zum Beispiel wird die Repressor-Aktivität von Ikaros und Aiolos durch Histon-Deacetylase-Komplexe vermittelt (Koipally *et al.*, 1999). Es ist nicht selten, dass ein Repressor mehrere Repressionsmechanismen parallel benutzt. Beispielsweise reprimiert Rb die Transkription über zwei verschiedene Wege (Luo *et al.*, 1998).

1.4 Transposons

Die Mehrheit der menschlichen Wiederholungssequenzen stammt aus transponierbaren Elementen, die circa 45% des Genoms ausmachen. In Säugertieren lassen sich die meisten der transponierbaren Elemente in vier Klassen unterteilen: LINEs (long interspersed elements), SINEs (short interspersed elements), LTR-Retrotransposons und DNA-Transposons. Die ersten drei Klassen transponieren mit einer RNA-Zwischenstufe, während die letzte Klasse ohne eine solche RNA-Zwischenstufe transponiert. Ihre Anteile an dem menschlichen Genom betragen jeweils circa 21%, 13%, 8% und 3% (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

LINEs gehören zu den ältesten und erfolgreichsten „Erfindungen“ in eukaryotischen Genomen (Furano, 2000). Die vollständigen menschlichen LINEs sind circa 6 kbp lang. Sie beinhalten einen internen Promotor vom Typ Polymerase II und zwei offene Leseraster (ORF1 und ORF2): der erste kodiert das RNA-Bindungsprotein p40 und der zweite das Protein ORF1p mit einer Endonuklease-Aktivität sowie einer reversen Transkriptase-Aktivität (Abbildung 2). Nach der Transkription assembliert die LINE-RNA wahrscheinlich während der Translation mit p40 und wandert danach in den Zellkern, wo die Endonuklease-Aktivität von ORF1p einen Einzel-Strang-Bruch der genomischen DNA induziert und die reverse Transkriptase-Aktivität von ORF1p die geschnittene DNA als Primer für die reverse Transkription von dem 3'-Ende der LINE-RNA benutzt. Die reverse Transkription erfolgt häufig nicht vollständig bis zum 5'-Ende der LINE-RNA und resultiert in vielen gekürzten, nicht funktionsfähigen Insertionen. Die meisten Kopien von LINEs im menschlichen Genom sind daher kurz und haben eine mittlere Größe von 900 bis 1070 bp. Neue Insertionsstellen sind durch eine kleine Duplikation der Zielstellen von sieben bis zwanzig bp flankiert. Die LINE-Maschinerie ist vermutlich verantwortlich für die meisten reversen Transkriptionen im Genom, einschließlich die Retrotransposition der nicht-autonomen SINEs und die Erzeugung der prozessierten Pseudogene.

Drei verwandte LINE-Familien wurden im menschlichen Genom gefunden: LINE1, LINE2 und LINE3. Ihre Anteile an dem menschlichen Genom betragen jeweils circa 16.9%, 3.2% und 0.3% (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Nur LINE1 ist immer noch aktiv. Die jüngste Abzweigung in dem phylogenetischen Baum der menschlichen LINE1-Elemente nennt sich L1Hs, die sich weiter in Ta und prä-Ta unterteilen lassen. Sie sind für alle vierzehn bekannten Fälle der menschlichen Erbkrankheiten durch L1-Retrotransposition verantwortlich. Es gibt wahrscheinlich im menschlichen Genom einundsechzig potentielle retrotransposition-kompetente L1Hs, die sich durch vollständige Länge und intakte ORFs kennzeichnen. Bei acht L1Hs von der Unterklasse Ta konnte diese Kompetenz in einem Retrotranspositionstest auf Zellkulturbasis bereits direkt demonstriert werden.

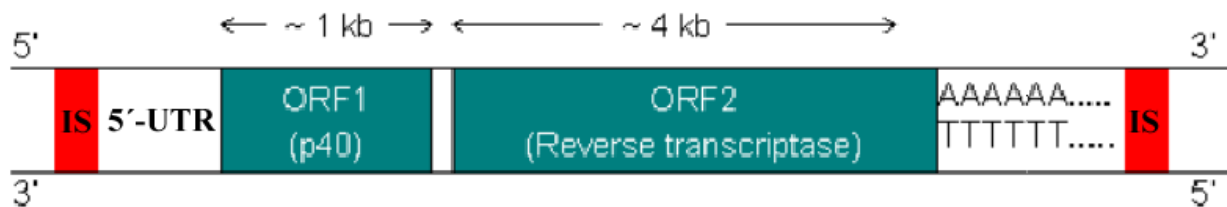


Abbildung 2 Schematische Darstellung eines vollständigen LINE-1-Elementes. Die beiden offenen Leseraster (ORF1 und ORF2) sind dunkel-grün markiert. Im 5'-Nichttranslatierten Bereich (5'-UTR) befindet sich der interne PolIII-Promotor und im 3'-Nichttranslatierten Bereich befindet sich der Poly-A-Schwanz (AAAAA.....). Die Insertionsstellen (IS) mit kurzer Sequenzduplikation sind rot markiert.

LINES sind an erster Stelle egoistische DNA-Elemente und molekulare Parasiten des Wirtsgenoms. Ihre Verbreitung könnte dem Wirtsgenom schaden, indem sie Wirtsgene durch Insertionen inaktivieren, Transkription benachbarter Gene negativ beeinflussen oder illegitime homologe DNA-Rekombinationen fördern. Dass menschliche Y- und X-Chromosomen jeweils neunmal oder dreimal soviel alte vollständige LINE-1-Elemente wie die anderen Autosomen besitzen, weist auf die schädliche Wirkung von LINES hin, weil fehlerhafte Loci auf dem Y- oder dem X-Chromosom in der männlichen Gametogenese nicht durch chromosomale Rekombinationen aussortiert werden können (Boissinot *et al.*, 2001). An zweiter Stelle könnten LINES im Lauf der Evolution dem Wirtsgenom gewisse Selektionsvorteile beschert haben, zum Beispiel Entstehung neuer Gene durch Exon-Reshuffling aufgrund der LINE-vermittelten Transduktion der 3'- flankierenden Sequenzen oder durch Bildung funktioneller Retrogene aufgrund der LINE-vermittelten reversen Transkription der zellulären mRNA.

SINES sind erfolgreiche Parasiten auf den Rücken von LINES. Sie sind kurz (circa 100 – 400 bp), beinhalten einen internen Promotor vom Type Polymerase III und verschlüsseln keine

Proteine. Solche nicht-autonomen Transposons transponieren vermutlich unter Gebrauch der LINE-Maschinerie. Die Promotor-Regionen fast aller bekannten SINEs stammen aus tRNA-Sequenzen, bis auf die Ausnahme einer einzigen monophyletischen Familie mit einem Ursprung aus der Komponente 7SL vom Signalerkennungspartikel. Diese Familie beinhaltet die einzigen noch aktiven SINEs im menschlichen Genom: die Alu-Elemente. Das menschliche Genom beinhaltet insgesamt drei Familien der SINEs: die noch aktiven Alus und die nicht mehr aktiven MIRs und Ther2s/MIR3s. Ihre Anteile an dem menschlichen Genom betragen jeweils 10.6%, 2.2% und 0.3% (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Alus verursachen in siebzehn bekannten Fällen menschliche Erbkrankheiten durch Retrotransposition. Anders als bei LINEs gibt es bei Alus scheinbar einen gewissen positiven Selektionsdruck in GC-reicher DNA mit höherer Gen-Dichte. Man vermutet physiologische Funktionen von Alus, weil Alu-RNA unter Stress-Bedingung vermehrt produziert wird und die Inhibition der Proteintranslation blockieren kann (Chu *et al.*, 1998).

LTR-Retrotransposons sind durch lange, terminale direkte Wiederholungen flankiert, die alle notwendigen transkriptionellen regulatorischen Elemente enthalten. Die autonomen Elemente enthalten Gene für gag und pol, die Enzymaktivitäten für Protease, Reverstranskriptase, RNase H und Integrase verschlüsseln. Exogene Retroviren könnten aus endogenen Retrotransposons nach dem Erwerb eines zellulären Gens zur Bildung der Hülle stammen. Die Transposition findet über einem retroviralen Mechanismus mit der reversen Transkription in cytoplasmatischen, virus-ähnlichen Partikeln unter Gebrauch von tRNA als Primer statt. Unter den existierenden LTR-Retrotransposons sind nur die vertebraten-spezifischen endogenen Retroviren ERV noch aktiv.

Menschliche DNA-Transposons ähneln bakteriellen Transposons. Sie besitzen terminale invertierte Wiederholungen und verschlüsseln eine Transposase, die in der Nähe der invertierten Wiederholungen bindet und eine Mobilität nach dem „Ausschneiden-und-Einfügen“-Mechanismus vermittelt. Das menschliche Genom enthält mindestens sieben große Familien der DNA-Transposons. DNA-Transposons nutzen häufig den horizontalen Transfer, um ihr evolutionäres Überleben zu sichern. Dagegen nutzen LINEs und SINEs fast ausschließlich die vertikale Transmission innerhalb des Wirtsgenoms. LTR-Retrotransposons können sich mit beiden Strategien verbreiten.

1.5 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

Das Protein MeCP2 wurde aufgrund der *in vitro* DNA-Bidnungstests (Southwestern-Blot, Gelretardierungs-Test und DNA-Footprinting) entdeckt. So bindet MeCP2 einerseits an MARs, methylierte und nicht-methylierte Maus-Satelliten-DNA, andererseits bindet es nur an methylierte Oligonukleotide (von Kries *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1992). MeCP2 ist nach immunocytologischer Untersuchung eine Komponente des pericentromeren Heterochromatins von Maus-Chromosomen, wo hauptsächlich die methylierte Maus-Satelliten-DNA lokalisiert ist (Lewis *et al.*, 1992). Daher erkennt MeCP2 methylierte Sequenzen wahrscheinlich auch *in vivo*. Meine erste Zielsetzung ist die Untersuchung in einem transienten Transfektionssystem, ob MeCP2 *in vivo* auch an nicht methylierte Sequenzen wie MAR und Maus-Satelliten-DNA binden kann.

MeCP2 enthält eine Repressor-Domäne (TRD), die Transkription *in vitro* und *in vivo* reprimiert (Nan *et al.*, 1997). Eine Analyse von Deletionsmutanten lokalisierte die TRD zwischen Aminosäureresten 207 und 310. Über dieser Domäne interagiert MeCP2 mit dem Co-Repressor mSin3A, der seinerseits einen großen Co-Repressorkomplex aus Histon-Deacetylase 1, 2 und anderen Proteinen rekrutiert (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Die Repression durch MeCP2 wird teilweise durch Trichostatin A (TSA), einen spezifischen Inhibitor gegen alle bekannten Histon-Deacetylasen, aufgehoben. Daher scheint es plausibel zu sein, dass die langzeitige Reprimierung der methylierten Sequenzen durch die Erzeugung einer deacetylierten, inaktiven Chromatinstruktur verursacht wird. Allerdings zeigen einige Beobachtungen, dass die Repression durch MeCP2 auch über andere alternative Mechanismen erfolgen könnten. Erstens, MeCP2 kann die Transkription von nackter DNA in einem *in vitro* System hemmen, wobei keine Rekonstruktion der Nucleosomen erfolgt ist (Nan *et al.*, 1997). Zweitens, die transkriptionelle Repression des menschlichen β -Actin-Promotors wird nur teilweise durch TSA aufgehoben (Nan *et al.*, 1997). Drittens, die durch Methylierung von CpG-Inseln ausgeschalteten endogenen Sequenzen können ohne eine vorherige partielle Demethylierung nicht durch TSA allein reaktiviert werden (Cameron *et al.*, 1999). Viertens, Demethylierung des inaktiven FMR1-Promotors in Zellen aus Patienten mit dem Fragile-X-Syndrom resultierte in einer transkriptionellen Aktivierung und eine Assoziation von acetylierten Histonen H3 sowie H4 mit dem *FMRI*-Gen (Coffee *et al.*, 1999). TSA allein führte zwar zu einer Acetylierung von H3 und H4, aber zu keiner detektierbaren Transkription von FMR1. Diese berichteten Befunde haben mich veranlasst, als meine zweite Zielsetzung nach einem alternativen Histon-Deacetylase-

unabhängigen Repressionsweg für MeCP2 zu suchen und die für die transkriptionelle Repression besonders wichtigen Aminosäurereste in MeCP2 zu identifizieren.

Parasitäre DNA-Elemente (Retrotransposons [LINEs, Alus] und endogene Retroviren) stellen die überwiegende Mehrheit der methylierten Sequenzen im menschlichen Genom dar. Vermutlich verhindert diese energie-aufwendige kovalente epigenomische Modifikation, dass sich solche Elemente unkontrolliert ausbreiten und so die Integrität des Wirtsgenoms beschädigen können (Yoder *et al.*, 1997). Konsistente Beobachtungen mit diesem Modell sind zum Beispiel, dass es eine negative Korrelation zwischen der *in vivo* LINE-1-Expression und dem Methylierungsgrad der Promotor-Region gibt und dass die *in vitro* Alu-Expression durch die DNA-Methylierung hemmbar ist (Thayer *et al.*, 1993; Liu und Schmid, 1993). Unklar ist aber die Identität der daran beteiligten Repressoren. MeCP2, MBD1 und MBD2 sind gute Kandidaten für solche negativen Regulatoren, weil sie alle an methylierte DNA binden und die Transkription reprimieren können. Meine dritte Zielsetzung ist daher, diese hypothetischen Funktionen von MeCP2, MBD1 und MBD2 unter Zellkulturbedingung experimentell zu überprüfen.

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. Restriktionsenzyme wurden von Roche (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot) oder Pharmacia (München) bezogen. Alle konjugierten Antikörper wurden von Dianova (Hamburg) bezogen.

[γ - ³² P]ATP	Hartmann, Braunschweig
Acrylamid-Mix (30%)	Bio-Rad, München
Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit, USA
Magermilchpulver	Uelzena Milchwerke e.G., Uelzen
Nitrocellulose, 0.45 μ m, BA85	Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.2 Lösungen

Anti-Fading-Medium	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
Coomassie-Färbelösung	0.5 g 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
Denhardt's-Lösung (50x)	1% Ficoll 400 1% Polyvinylpyrrolidon 1% BSA steril filtrieren und bei -20°C lagern

Glycin-Laufpuffer (5x)	15.1 g Tris-Base 94 g Glycin 5 g SDS mit H ₂ O auf 1 Liter, pH 8.3
HBS (2x)	50 mM HEPES, pH 7.1 280 mM NaCl 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ steril filtrieren, bei -20°C lagern
Hybridisierungspuffer	2 ml Denhardt's-Lösung (50x) 150 µl Lachs-Spermien-DNA (10 mg/ml) 3 ml SSC-Puffer (20x) 4.9 ml H ₂ O
Lyse-Puffer	20 mM HEPES, pH 7.9 150 mM NaCl 0.5 mM EDTA 1 mM DTT 10% Glycerin 0.1% Triton X-100 bei 4°C lagern 1 mM PMSF (vor Verwendung frisch zugeben)
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
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 PE	keine Herstellerangabe über die Zusammensetzung
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

Qiagen QF	1.25 M NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 15% Ethanol
Qiagen QX1	keine Herstellerangabe über die Zusammensetzung
Reaction Buffer (10x)	100 mM KCl 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM Tris-HCl, pH 8.8 20 mM MgSO ₄ 1% Triton X-100 1 mg/ml Nuklease-freies BSA
RFI	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
RFII	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15% Glycerin pH 6.8, mit Essigsäure einstellen, bei 4°C lagern
Roche Lyse-/Bindepuffer	4.5 M Guanidiniumchlorid 50 mM Tris-HCl, pH 6.6 30% Triton X-100 (w/v)
Roche DNase I	10 KU lyophilisierte DNase I 550 µl Nuclease-freiem, sterilem H ₂ O, bei -20°C lagern
Roche DNase Inkubationspuffer	1 M NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 10 mM MnCl ₂
Roche Waschpuffer I	5 M Guanidiniumchlorid 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 37.7% Ethanol (v/v)
Roche Waschpuffer II	20 mM NaCl 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 80% Ethanol (v/v)
SDS-Gelladepuffer (1x)	50 mM Tris-HCl, pH 6.8 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol 2% SDS 0.1% Bromphenolblau 10% Glycerin

TBE-Puffer (5x)	445 mM Tris-HCl, pH 8.0 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
TBS-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl
Transfer-Puffer	14.4 g Glycin 3.0 g Tris 0.1 g SDS 200 ml Methanol auf 1 Liter, ohne pH-Wert-Einstellung frisch ansetzen
TTBS-Puffer 1	0.5% Tween-20 in TBS-Puffer
TTBS-Puffer 2	3.0% Tween-20 in TBS-Puffer
SSC-Puffer (20x)	175.3 g NaCl 88.2 g Na ₃ -Citrat, pH 7.0 auf 1 Liter plus 1 ml DEPC kräftig schütteln, über Nacht bei Raumtemperatur einwirken lassen und autoklavieren

2.1.3 Antibiotika und Medium für Bakterienkultur

Ampicilin	Stammlösung: 50 mg/ml in Ethanol, bei -20°C lagern Endkonzentration: 50 µg/ml
Tetrazyklin	Stammlösung: 50 mg/ml in Ethanol, bei -20°C lagern Endkonzentration: 12.5 µg/ml
LB-Agarplatten	10 g Bacto-Tryptone 5 g Bacto-Yeast-Extract 10 g NaCl 15 g Agar auf 1 Liter mit H ₂ O, pH 7.0, nach dem Autoklavieren auf 50°C abkühlen, bei Bedarf Antibiotika zugeben, in sterile Ø10cm-Platten gießen, circa 20 ml á Platte, erstarren lassen und bei 4°C lagern
LB-IX-Agarplatten	20 µl 500 mM IPTG 50 µl 20 mg/ml X-Gal 100 µl LB-Medium auf eine LB-Agarplatte ausplattieren, 30 min bei 37°C inkubieren, frisch verwenden für die Blau-Weiß-Selektion

LB-Medium	10 g Bacto-Tryptone 5 g Bacto-Yeast-Extract 10 g NaCl auf 1 Liter mit H ₂ O, pH 7.0 nach Autoklavieren abkühlen, bei Bedarf Antibiotika zugeben, bei 4°C lagern
-----------	---

2.1.4 Zellkultur

Zelllinie	Herkunft
HEK293	Adenovirus-transformierte menschliche embryonale Nierenzellen
NIH3T3	Mausfibroblasten
HeLa	Menschliches Gebärmutterhalskarzinom
H1299	Menschliches Lungenkarzinom
NT2	Menschliches Keimzellkarzinom aus Hoden
MCF7	Menschliches Mamakarzinom
PA-1	Menschliches Chondriomkarzinom
JEG-3	Menschliches Keimzellkarzinom aus Eierstock
Huh7	Menschliches Leberkarzinom

Tabelle 1 Die verwendeten Zelllinien und deren Herkunft.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und unter 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank (Heraeus). Das Medium für HEK293, NIH3T3, HeLa, H1299, MCF7, PA-1, JEG-3 und Huh7 war DMEM (Invitrogen) mit 10% FCS (Invitrogen). Das Medium für NT2 war OPTIMEM (Invitrogen) mit 5% FCS (Linaris GmbH). Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte unter einer Clean-Bench (Hera Safe, Heraeus). Ein Mediumwechsel wurde jeden dritten oder vierten Tag durchgeführt. Zur Subkultivierung von allen neun adhärent wachsenden Zellen wurden diese einmal kurz in steriler PBS gewaschen und durch Zugabe von 2 ml auf 37°C vorgewärmter Trypsin-Lösung (0.05% Trypsin und 0.02% EDTA in PBS) pro 250 cm² Kulturflasche (Greiner) abgelöst. Nach circa 5 min Inkubation wurden die Zellen mit einer Glaspipette resuspendiert. Durch die Zugabe von auf 37°C vorgewärmtem Medium wurde die Trypsinierung gestoppt und die Zellen in einer neuen Kulturflasche subkultiviert. Für die Bestimmung der Zelldichte wurden 500 µl Zellsuspension in 20 ml isotoner Flüssigkeit suspendiert und im Coulter Counter (Modell ZM, Coulter Electronics) gezählt. Jede Zellzahlbestimmung wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert wurde berechnet. Zur Langzeit-Aufbewahrung wurden die Zellen mit 90% Medium plus 10% DMSO versetzt und in Kryo-Röhrchen (Nunc) überführt, 2 h bei -20°C und 16 h bei -80°C eingefroren, bevor sie im flüssigen Stickstoff gelagert wurden. Das anschließende Auftauen der Zellen erfolgte rasch bei 37°C im Wasserbad.

2.2 Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Horizontale Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von restriktionsverdauten DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten verwendet. Dazu wurde 0.5 g Agarose in 49.5 ml 0.5x TBE-Puffer durch Kochen gelöst, auf 60°C abgekühlt, mit 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und dann in den vorgefertigten Gelträger gegossen. Nach vollständiger Verfestigung 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-Ladder-Mix, MBI Fermentas) aufgetragen. Durch den Vergleich mit diesem Standard konnte die Größe der DNA-Fragmente auf einem UV-Bildschirm bestimmt werden.

2.2.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Reaktionen erfolgten unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen (Dauer, Temperatur, Enzymmenge und Puffer). Bei einer Doppelverdauung wurde der Reaktionspuffer gewählt, in dem beide Enzyme mindestens 50% ihrer maximalen Aktivitäten aufwiesen. War das nicht möglich, wurde die DNA mit beiden Enzymen separat hintereinander verdaut. Wurde die Vektor-DNA für ein Klonierungsvorhaben verdaut, erfolgte zum Schluss noch die Dephosphorylierung mit CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) (MBI Fermentas) in dem Verdauungspuffer für 30 min bei 37°C, um die Selbst-Ligation des Vektors zu verhindern.

2.2.3 Ligation

Ein dreifacher molarer Überschuss an DNA-Fragmenten (Insert) wurde mit 50 ng geschnittener, dephosphorylierter Vektor-DNA unter Verwendung von 1 µl T4-DNA-Ligase (30 u/µl) (MBI Fermentas) in 1x Ligasepuffer (MBI Fermentas) in einem Endvolumen von 60 µl für 4 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz konnte danach direkt für die Transformation verwendet werden.

2.2.4 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung lagerfähiger, kompetenter Bakterienzellen wurde ein modifiziertes Verfahren nach Hanahan (1983) benutzt. 50 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum (für *Escherichia*

coli XL1-Blue: 12.5 µg/ml Tetrazyklin) wurden mit dem gewünschten Bakterienstamm angeimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer Zelldichte von $4 - 7 \times 10^7$ Zellen/ml bei 37°C aufgezogen (entspricht $OD_{600nm} = 0.6$). Nach dem Abkühlen der Kultur auf Eis für 12 - 15 min erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 g (2000 rpm, Hereaus-Zentrifuge) und 4°C für 12 - 15 min. Das Zellpellet wurde in 1/3 Ausgangsvolumen (16.7 ml) kaltem RFI vorsichtig resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 1000 g und 4°C für 12 - 15 min wurde das Zellpellet in 1/12.5 Ausgangsvolumen (4 ml) kaltem RFII resuspendiert und für 12 - 15 min auf Eis inkubiert. In Portionen von 200 µl wurden die nun kompetenten Zellen in 1.5ml-Eppendorfgefäßen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Transformation

Die Transformation der Bakterien erfolgte nach dem Verfahren von Hanahan (1983). 200 µl kompetente Bakterienzellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und dann auf Eis gestellt. Der Ligationsansatz oder die zu vervielfachende Plasmid-DNA wurde zur Suspension gegeben, kurz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer 90 sec langen Inkubation bei 42°C wurden die Zellen kurz auf Eis gestellt. Zu der Zellsuspension wurden 400 µl 37°C warmes LB-Medium ohne Antibiotika gegeben und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 7000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge) 2 min abzentrifugiert. Nach dem Abnehmen von 500 µl Überstand wurden die Zellen im restlichen LB-Medium resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die Platte wurde dann entweder 16 h über Nacht bei 37°C oder über Wochenende bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Vorschrift ergab circa 10^7 Transformanten pro µg Plasmid-DNA.

2.2.6 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab („Mini-Prep“)

Die Arbeit orientierte sich nach der Methode von Birnboim und Doly (1979). Es wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer *E. coli*-Kolonie von der Transformationsplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C im Kulturröhrchen geschüttelt. Davon wurden 1.5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 2 min in der Eppendorf-Zentrifuge mit der Hälfte der maximalen Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteur-Pipette abgesaugt und das Pellet in 100 µl Qiagen P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Qiagen P2 wurde das Eppendorfgefäß invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Qiagen P3 zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation in einer Eppendorf-

Zentrifuge (14000 rpm, 10 min) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführt, mit 1 ml kaltem absolutem Ethanol gemischt und erneut für 30 min bei 14000 rpm im Kühlraum zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation wie oben wurde das Pellet an der Luft 15 min getrocknet und in 50 - 100 µl H₂O aufgenommen. Typischerweise ließen sich auf diese Weise bis circa 20 µg Plasmid-DNA gewinnen, deren Reinheit ausreichend für die anschließende Restriktionsanalyse war.

2.2.7 Präparation von Plasmid-DNA für Sequenzierung

Es wurden 3 ml der Übernachtskultur wie in 2.2.6 pelletiert und in 300 µl Qiagen P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Qiagen P2 wurde der Ansatz vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl kalter Qiagen P3 zugegeben, durch Invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge bei 14000 rpm für 15 min wurde der Überstand in eine zuvor mit 1 ml Qiagen QBT äquilibrierte QIAGEN-tip-20-Säule überführt. Nachdem die Probe durch die Säule geflossen war, wurde die Säule 4-mal mit 1 ml Qiagen QC gewaschen. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 800 µl Qiagen QF eluiert. Die DNA im Eluat wurde durch Zugabe von 560 µl Isopropanol bei Raumtemperatur und eine 30-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C gefällt und pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, noch mal zentrifugiert und dann an der Luft getrocknet. Die nunmehr reine DNA wurde in 15 - 20 µl H₂O aufgenommen. Die auf diese Weise gewonnene DNA war für die DNA-Sequenzierung (2.2.9) geeignet.

2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab („Maxi-Prep“)

Das Pellet aus 250 ml Übernachtskultur wurde in 10 ml Qiagen P1 vollständig resuspendiert. Zu dem Ansatz wurden 10 ml Qiagen P2 gegeben, vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Danach wurden 10 ml kalter Qiagen P3 zugegeben, sofort vorsichtig gemischt. Das Lysat wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit einem QIAfilter-Maxi-Catridge pressfiltriert. Zu dem filtrierten Lysat wurden 2.5 ml Qiagen ER gegeben, per 10-mal Invertieren durchgemischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Das geklärte Lysat wurde in eine zuvor mit 10 ml Qiagen QBT äquilibrierte Qiagen-tip-500-Säule geschickt und mittels der Schwerkraft durchfließen gelassen. Die Säule wurde 2-mal mit je 30 ml Qiagen QC gewaschen, bevor die Plasmid-DNA mit 15 ml Qiagen QN eluiert wurde. Die DNA im Eluat wurde mit 10.5

ml ungekühltem Isopropanol gefällt und bei der maximalen Drehzahl einer Eppendorf-Zentrifuge im Kühlraum für 30 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 2.5 ml kaltem 70%igem endotoxinfreiem 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 der kultivierten Zellen (2.2.15) verwendet.

2.2.9 Sequenzierung von DNA

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

Ein typischer Sequenzierungsreaktionsansatz aus meiner Arbeit bestand aus 500 ng Plasmid-DNA oder 100 ng gereinigtem PCR-Produkt, 15 pmol Sequenzierungsprimer, 4 µl Big-Dye Reagenz (Applied Biosystems) und wurde mit H₂O auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Diese Reaktion wurde in einem Thermozykler mit Heizdeckel (Mastercycler, Eppendorf) ohne Ölschicht durchgeführt, weil Big-Dye mit Mineralöl nicht kompatibel ist. Das verwendete Temperaturprofil lautete: 1x {95°C 1 min}; 25x {96°C 30 sec, 50°C 15 sec, 60°C 4 min}. Danach wurde der Reaktionsansatz mit 0.3 M Natriumacetat (pH 5.2) auf 100 µl aufgefüllt, mit 250 µl Ethanol (96%) gemischt und 30 min per Zentrifugation im Kühlraum präzipitiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und dem Servicelabor im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (UKE, Hamburg) weitergegeben. Die Detektion der vier unterschiedlich markierten DyeTerminatoren erfolgte dort auf einem Applied Biosystems 377 DNA Sequencer. Im Normalfall konnte ich auf diese Weise eine Länge von bis zu 600 bp sequenzieren. Die ermittelten Sequenzdaten wurden im Textformat gespeichert und für die durch Computer unterstützte Alignments unter der Internet-Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> verwendet.

2.2.10 Präparative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA wurde mit dem Expand Long Template PCR System (Roche) unter Gebrauch eines OmniGene Thermocyclers (Hybaid) durchgeführt. Bei der verwendeten DNA-Polymerase handelte es sich um ein Gemisch aus Taq- und Pwo-Polymerase im Verhältnis 10:1. Dieses hat den Vorteil, dass recht lange DNA-Fragmente (bis zu 27 kbp) mit hoher Genauigkeit amplifiziert werden können. Für die Reaktionen wurde immer der mitgelieferte 10x Puffer 3 (22.5 mM MgCl₂ und Detergenz) verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz aus meiner Arbeit bestand aus 1x Puffer 3, 500 µM dNTPs (MBI Fermentas), 300 nM je Primer (MWG-Biotech), 10 ng DNA-Template und 2.6 u Enzymmischung. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt und mit 30 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet. Das Temperaturprofil wurde für jede PCR individuell entworfen. Am Anfang der Reaktion wurde der Ansatz für 2 min bei 96°C vollständig denaturiert. Es folgten 30 – 40 Zyklen aus Denaturierung bei 96°C für 10 sec, Annealing für 30 sec und Elongation bei 68°C. Die Annealingtemperatur richtete sich nach den eingesetzten Primern gemäß der Formel: $T = 2 \times (A + T) + 4 \times (C + G)$, wobei die Buchstaben A, T, C und G jeweils für die Anzahl der gleichnamigen Basen im Primer stehen. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des erwarteten PCR-Fragmentes und betrug 60 sec bei 1 kbp für das verwendete Enzymgemisch aus Taq- und Pwo-Polymerase. Wenn Restriktionsschnittstellen, Epitop, Translationsinitiations- beziehungsweise stopsignal in die Primersequenz eingeführt waren, wurde eine niedrigere Annealingtemperatur in den ersten 5 Zyklen benutzt, weil es am Reaktionsanfang keine vollständige Hybridisierung zwischen Primer und Matrizen-DNA vorlag. Zum Schluss wurde der Ansatz bei 68°C für 7 min inkubiert, damit alle PCR-Produkte vervollständigt wurden. Nach abgeschlossener Reaktion wurde der PCR-Ansatz in einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das PCR-Produkt der erwarteten Größe wurde aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel) isoliert. Das gereinigte DNA-Fragment konnte verdaut werden und in den entsprechend vorbereiteten Vektor eingebaut werden. Alternativ konnte das PCR-Fragment auch mit dem pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) direkt kloniert werden.

2.2.11 Überlappungs-PCR

Die Überlappungs-PCR basierte auf der Methode von Diviacco *et al.* (1992) und ihr Prinzip ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Für jede Überlappungs-PCR brauchte ich vier spezifische Primer: zwei externe und zwei interne. Die externen Primer waren völlig komplementär zu den Zielregionen. Die internen Primer waren nur in ihren 3'-Hälften

komplementär zu den Zielregionen. Ihre 20 bis 30 nt langen 5'-Hälften waren komplementär zueinander und beinhalteten Mutationsstellen, neue Epitope oder Ähnliches (Schritt a). Dann wurden zwei getrennte PCRs mit einem externen Primer und dem dazugehörigen internen Primer ausgeführt (Schritte b und b'). Beide Zwischenprodukte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und äquimolar gemischt. Sie stellten jeweils die linke Hälfte und die rechte Hälfte des Endproduktes dar. Die Überlappungsregion enthielt die Mutationsstelle. Ein kleines Aliquot (1%) dieses Gemisches wurde in die dritte PCR mit den beiden externen Primer geschickt. Damit eine Heteroduplex aufgrund der Anlagerung der komplementären 3'-Teile der beiden Zwischenprodukte entstand, wurde der Ansatz bei 94°C für 1 min denaturiert, dann innerhalb 10 min gleichmäßig auf 50°C abgekühlt (Schritt c). Nach weiteren 2 min bei 50°C wurde der Ansatz bei 68°C für 5 min zur Elongation der Heteroduplex inkubiert (Schritt d). Abschließend wurde dieses chimäre DNA-Molekül über 30 bis 40 konventionelle PCR-Zyklen amplifiziert. Mit Hilfe dieser Methode konnte ich gezielt kurze DNA-Sequenzen einbauen, kleine DNA-Regionen austauschen oder zwei kurze cDNA-Fragmente zu einem längeren Fragment zusammenfügen.

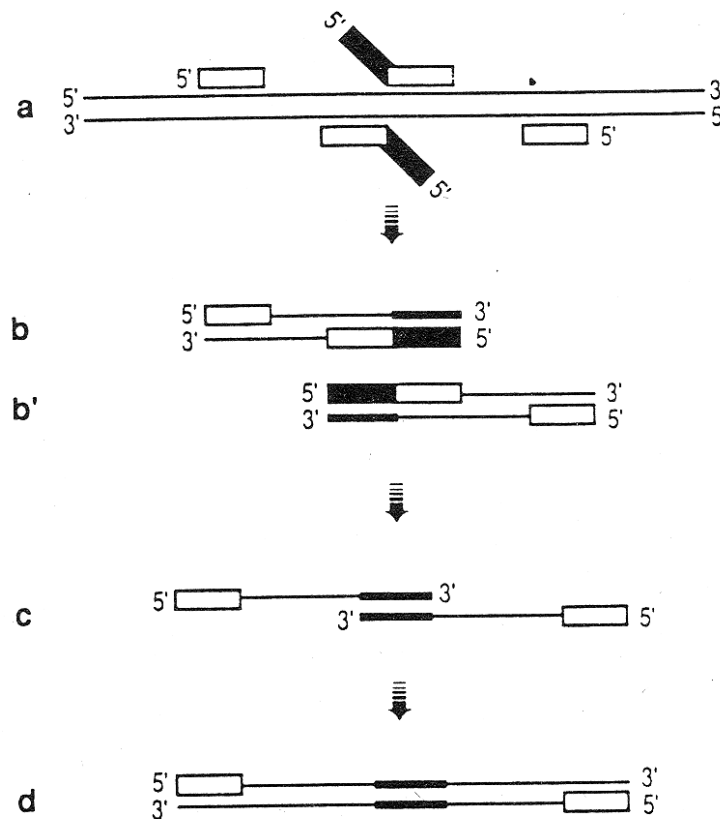


Abbildung 3 Das Prinzip von der Überlappungs-PCR. (a) Die Matrizen-DNA, die beiden externen Primer (Links und Rechts) und die beiden internen Primer (Mitte) sind geordnet dargestellt. Die 3'-Hälften der internen Primer enthalten eine Mutation und sind schwarz gefüllt.

(b)(b') Die beiden Zwischenprodukte und die Lage der vier Primer sind dargestellt. (c) Die komplementären 3'-Enden der Zwischenprodukte lagern sich aneinander und bilden eine Heteroduplex. (d) Die Heteroduplex wird durch Taq-Polymerase zur doppelsträngigen DNA vervollständigt und vervielfacht. (nach Diviacco *et al.*, 1992)

2.2.12 Durchmusterung der Bakterienkolonien

Zur Durchmusterung der Kolonien nach der Transformation braucht man normalerweise zwei Labortage für die folgenden Arbeitsschritte: Animpfung einer Flüssigkeitskultur, Inkubation der Bakterienkultur über Nacht, Isolierung der Plasmid-DNA und analytische Verdauung mit Restriktionsenzymen. Eine schnellere Alternative stellt die folgende PCR-Durchmusterung dar, die noch an demselben Labortag die Information über die Kolonien liefern kann.

Jede zu untersuchende Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen 10µl-Pipettenspitze herausgepickt und in 10 µl steriles H₂O in einem Eppendorfgemäß resuspendiert. Mit derselben Pipettenspitze wurde ein Strich auf eine neue LB-Platte mit Antibiotika gezogen und nummeriert. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt und 1 µl des geklärten Lysates wurde zusammen mit 9 µl Master-Mix (Zusammensetzung in Tabelle 2) in der PCR verwendet. Ein typisches Temperaturprofil mit dem Primerpaar T7-Promotor und Sp6-Promotor zur Überprüfung des Inserteinbaus in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega) lautete: 1x {96°C 2 min}; 40x {96°C 10 sec, 50°C 30 sec, 72°C n sec}; 1x {72°C 5 min}. Die Elongationszeit n richtete sich nach der Größe des erwarteten PCR-Fragmentes und betrug 25 sec bei 1 kbp für die Taq-Polymerase.

10 µl	PCR-Puffer minus Magnesium (Invitrogen)
3 µl	MgCl ₂ (50 mM)
2 µl	dNTPs (10 mM)
10 µl	Vorwärtsprimer (5 pmol / µl)
10 µl	Rückwärtsprimer (5 pmol / µl)
54.5 µl	H ₂ O
0.5 µl	Taq-Polymerase (Invitrogen)

Tabelle 2 Zusammensetzung von Master-Mix für die PCR-Durchmusterung von zehn Bakterienkolonien.

Wenn man die die Einbaustelle des Inserts flankierenden Primer einsetzte, bestätigte ein positives PCR-Signal die Existenz des Inserts in dem Plasmid. Wenn man einen flankierenden Primer mit einem Insert-internen Primer kombinierte, konnte man zusätzlich die Orientierung des Inserts bestimmen.

2.2.13 Western-Blot

Die diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Trennung von Proteingemischen aufgrund unterschiedlicher Molekularmassen und zur Identifikation von Proteinen (Laemmli, 1970). Ich benutzte in meiner Arbeit das Minigel-System (Bio-Rad). Die Zusammensetzung für das am häufigsten benutzte 10%ige Gel sieht folgendermaßen aus:

	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	1900 µl	1400 µl
Acrylamid-Mix (30%)	1700 µl	330 µl
1.5 M Tris, pH 8.8	1300 µl	-
1.0 M Tris, pH 6.8	-	250 µl
10% SDS	50 µl	20 µl
10% Ammoniumpersulfat	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl

Tabelle 3 Die Zusammensetzung des 10%igen Trenngels und des Sammelgels für SDS-PAGE mit Minigel-System (Bio-Rad).

Die Proteinprobe wurde vor der Elektrophorese in 1x SDS-Gelladepuffer aufgenommen und bei 95°C für 10 min erhitzt. Zur späteren Bestimmung der Molekularmassen der Proteinbanden wurden 5 µl Prestained Protein-Ladder-Mix (Invitrogen) zusammen mit den Proben aufgetragen. Die Elektrophorese fand in 1x Glycin-Laufpuffer bei 130 V statt. Die Elektrophorese wurde nach dem Auslaufen des Bromphenolblaus aus dem Gel gestoppt.

Die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Mini-Transblot-Systems (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulose-Membran (5.5 cm x 8.5 cm, Schleich & Schuell), die zuvor für 20 min in Transferpuffer benetzt wurde, elektrisch transferiert. Der Transfer erfolgte im gekühlten Transferpuffer bei 100 V für 1.25 h. Anhand des Transfers des farbigen Proteinmarkers konnte die Effektivität der Übertragung verifiziert werden. Zur Absättigung unspezifischer Bindungskapazitäten der Nitrocellulose-Membran wurde diese für 1 h bei Raumtemperatur in 10 ml Block-Puffer unter Schütteln inkubiert. Die blockierte Nitrocellulose-Membran wurde dann mit primärem Antikörper (1:1000 - 1:10000 verdünnt, Tabelle 4) über Nacht im Kühlraum unter Schwenken inkubiert und danach 2-mal mit 10 ml TBS-Puffer für je 10 min gewaschen. Die Markierung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte während einer 2-stündigen Inkubation mit einem Peroxidase(HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper (1:5000 verdünnt) bei Raumtemperatur. Nicht komplexierte Antikörper wurden 2-mal mit 10 ml TTBS-Puffer 1 für je 10 min, 1-mal mit 10 ml TTBS-Puffer 2 für je 10 min, 2-mal mit 10 ml TTBS-

Puffer 1 für je 15 min, 2-mal mit 10 ml TTBS-Puffer 1 für je 30 min und 2-mal mit 10 ml TBS-Puffer für je 30 min gewaschen.

Primärer Antikörper	Herkunft	Anbieter	Verdünnung im Western-Blot
anti-mSin3A (K-20)	Kaninchen	Santa Cruz	1:10000
anti-FLAG (M2)	Maus	Sigma	1:5000
anti-MeCP2	Kaninchen	Upstate Biotechnology	1:1000
anti-MeCP2 (Box 2)	Huhn	Christoph Koch	1:1000
anti-p40	Kaninchen	Dr. Schumann	1:1000
anti-Gal4BD	Maus	Clontech	1:10000

Tabelle 4 Liste der verwendeten primären Antikörper im Western-Blot.

Vor der Detektion wurden je 1 ml ECL-Lösung 1 und 2 (Amersham) frisch gemischt. Die Nitrocellulose-Membran wurde 1 min unter Schwenken im ECL-Lösungsgemisch inkubiert, dann auf Filterpapier leicht getrocknet und in Durchsichtsfolien eingewickelt. Röntgenfilme (Kodak oder Fuji Photo Film) wurden für 10 sec bis 30 min zur Registrierung der Chemolumineszenzsignale aufgelegt und anschließend maschinell entwickelt.

2.2.14 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die zu untersuchenden Zellen wurden 24 h vor der Mikroskopie auf sterile Deckgläschen so ausgesät, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung ein Konfluenzgrad von circa 50% erreichten. Die Zellen wurden dann für 10 min mit 1%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, einmal kurz mit PBS gewaschen, für 10 min mit kaltem Methanol (-20°C) permeabilisiert und sofort anschließend für 10 min in PBS rehydratisiert. Nach Absaugen der Flüssigkeit auf dem Deckgläschen wurden 50 µl primäre Antikörper (1:50 verdünnt in PBS plus 3% BSA) auf die Zellen pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur in einer geschlossenen Petrischale inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS für je 15 min gewaschen und luftgetrocknet. Dann wurden 50 µl FITC-konjugierte sekundäre Antikörper (1:50 verdünnt in PBS plus 3% BSA) auf die Zellen pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur in einer geschlossenen Petrischale inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS plus 0.05% DAPI für die DNA-Färbung und zweimal mit PBS für je 10 min bei leichtem Schwenken auf einem Schüttler gewaschen, bevor sie in 10 µl Anti-Fading-Medium zur Fluoreszenzmikroskopie eingebettet wurden. Ich benutzte in meiner Arbeit das Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop Ortholux mit dem FITC-Filter I2 und dem DAPI-Filter A (Leitz).

Grün-Fluoreszenz-Protein (GFP) innerhalb der Zellen konnte mit dem FITC-Filter I2 ohne die Immunfärbung direkt gesehen werden und diente in meiner Arbeit als Indikator für die Transfektionseffizienz (2.2.15).

2.2.15 Transfektion

Unter der Transfektion versteht man die Einbringung fremder DNA in die Zellen. Diese Technik ermöglicht die Untersuchung überexprimierter Proteine unter einer Natur-ähnlichen, zellulären Bedingung.

Die Calciumphosphat-Methode ist die älteste und bekannteste Transfektionsmethode (Graham und van der Eb, 1973). Dabei erzeugt man einen Co-Komplex aus DNA und Calciumphosphat, der wahrscheinlich als Mini-Kristalle durch die Zellen phagocytotisch ins Cytoplasma aufgenommen wird. In den Zellkern gelangt die DNA vermutlich während der Mitose, wenn die Kernmembran zeitweise aufgelöst ist. Da diese Methode sehr billig ist, wird sie häufig verwendet. Allerdings ist die erreichbare Transfektionseffizienz vergleichbar gering und das Problem der Cytotoxizität bei Zelllinien wie NT2 beträchtlich.

6×10^5 Zellen (HEK293, NIH3T3 und H1299) wurden ein Tag vor der Transfektion in Ø35mm-Gewebekulturschälchen (Greiner) ausgesät. Am Tag der Transfektion waren die Schälchen zu 50 – 80% konfluent. Drei Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Für die Herstellung der Mini-Kristalle wurde 1 – 2 µg Plasmid-DNA mit sterilem H₂O auf 153 µl Endvolumen aufgefüllt und mit 22 µl 2 M CaCl₂ in einem Röhrchen (12.0/75mm, Greiner) gemischt. Bei gleichzeitigem Vortexen mit der halben maximalen Stärke wurde 175 µl 2x HBS tropfenweise dazu pipettiert. Das Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitat wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, nochmals kurz gevortext und dann tropfenweise zu den Zellen pipettiert (100 µl pro Schälchen). Die Mini-Kristalle konnten anschließend unter dem Lichtmikroskop als feine Körnchen gesehen werden. Die Schälchen wurden zur gleichmäßigen Verteilung der Kristalle noch leicht horizontal geschwenkt, bevor sie im Brutschrank inkubiert wurden. Der nächste Mediumwechsel erfolgte 24 h später. Handelte es sich um eine transiente Transfektion, so wurden die Zellen 24 h (insgesamt 48 h nach der Transfektion) später lysiert. Das Lysat konnte für Reporter-Gen-Test, RNA-Dot-Blot oder Western-Blot eingesetzt werden. Handelte es sich um eine stabile Transfektion, d.h. die fremde DNA wurde ins zelluläre Genom eingebaut, so wurden die Zellen im Medium mit 500 µg/ml G418 so lange selektioniert, bis alle nicht-transfizierten Zellen im Kontrollschälchen starben und sich Kolonien um die transfizierten

Zellen bildeten. Die Kolonien wurden zur Massenkultur vereinigt und die Überexpression des Zielproteins wurde anhand Western-Blots verifiziert.

NT2- und HeLa-Zellen wurden mit LipofectaminePlus-Reagent (Invitrogen) transfiziert. Bei dieser Methode wird die DNA in Liposomen verpackt. Die Liposomen fusionieren mit der Zellmembran und entleeren deren Inhalt in das Cytoplasma. Das Aussäen der Zellen erfolgte wie bei der Calciumphosphat-Methode (siehe oben). 100 μ l Medium ohne FCS wurden zuerst mit 1 – 2 μ g Plasmid-DNA und dann mit 6 μ l PLUS-Reagenz gemischt. Das Gemisch wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Separat wurden 100 μ l Medium ohne FCS mit 4 μ l Lipofectamine gemischt. Beide Mischungen wurden dann vereinigt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das alte Medium auf den Zellen wurde entfernt und gegen 800 μ l frisches Medium getauscht, bevor die DNA-haltige Mischung tropfenweise auf die Zellen pipettiert wurde. Die Zellen wurden 3 h im Brutschrank inkubiert und danach mit 1000 μ l frischem Medium ergänzt. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium erneuert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit 1 μ g pEGFP-N1 (Clontech, Geschenk von Dr. Bertsch), einem Expressionsplasmid für das Grün-Fluoreszenzprotein (GFP), transfiziert. Die Zellen, die DNA aufgenommen haben, leuchteten nach 24 – 48 h grün in der Fluoreszenzmikroskopie. Der Quotient aus grün leuchtenden Zellen und nicht-leuchtenden Zellen ist gleich der Transfektionseffizienz. Dieser Wert liegt bei der Calciumphosphat-Methode zwischen 5% und 15% und bei der Transfektion mit LipofectaminePlus Reagent zwischen 20% und 60% in HEK293-Zellen.

2.2.16 Reportergen-Assay

Zur Bestimmung von hemmenden oder aktivierenden Effekten von Proteinen auf die Gen-Expression in menschlichen Zellen wurde in dieser Arbeit das Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) verwendet. Die beiden Luciferasen sind besonders häufig verwendete Reporter Gene und zeichnen sich durch Schnelligkeit, hohe Empfindlichkeit und einen breiten linearen Meßbereich über sieben Größenordnungen aus. Dabei wurden die Zellen mit einem Reporter-Plasmid (enthält das Firefly-Luciferase-Gen), einem Referenz-Plasmid (enthält das Renilla-Luciferase-Gen) und einem Effektor-Plasmid (enthält zum Beispiel die cDNA von MeCP2) ko-transfiziert. Da die Firefly-Luciferase und die Renilla-Luciferase unterschiedliche Substrate für die lumineszente Reaktion benötigen, kann in einem Ansatz die Expression des

Reporters (Firefly-Luciferase) und der Referenz (Renilla-Luciferase) hintereinander gemessen werden. In meiner Arbeit diente die Firefly-Luciferase-Aktivität als Indikator für die Transkriptions-Aktivität unter dem Einfluß von Effektoren, während die Renilla-Luciferase-Aktivität zur Normalisierung der Firefly-Luciferase-Aktivität und zur Kontrolle der Transfektionseffizienz verwendet wurde.

Zellen in Ø35mm-Gewebekulturschälchen (Greiner) wurden mit 1 µg Firefly-Luciferase-Reporter-Plasmid, 0.05 µg Renilla-Luciferase-Referenz-Plasmid (pRL-TK, Promega, Geschenk von Dr. Pillar) und 0.1 µg Effektor-Plasmid transient ko-transfiziert (2.2.15). 48 h nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in der Schale wurden mit 200 µl 1x PLB (Passive Lysis Buffer, Promega) bei Raumtemperatur lysiert. Die Bestimmung der Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität erfolgte im Luminometer (Lumat LB 9504, Berthold). Dazu wurde in einem 5ml-Röhrchen 20 µl Luciferase Assay Reagenz II (Promega) vorgelegt und mit 3 µl des Zelllysates versetzt und mit der Pipette gemischt. Die Firefly-Luciferase-Aktivität wurde für 10 sec lang gemessen. Anschließend wurden 20 µl Stop & Glo Reagenz (Promega) zu dem Ansatz gegeben und mit Vortexer gemischt. Die Aktivität der Renilla-Luciferase wurde für ebenfalls 10 sec lang gemessen. Die Firefly-Luciferase-Aktivität in den einzelnen Zelllysaten wurde anschließend gegen die entsprechende Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert, so dass die Wirkung des Effektors auf die Expression von Firefly-Luciferase bestimmt werden konnte. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Hilfe vom Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft).

2.2.17 cDNA-Klonierung mittels RT-PCR

In allen Zellen findet der normale Informationsfluß der folgenden Richtung statt: DNA → RNA [prä-mRNA → reife mRNA] → Protein. Die Retroviren können aber dank ihrer reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, den Informationsfluß umkehren. Die Molekularbiologen benutzen dieses Enzym zur Synthese von cDNA aus mRNA. Die reverse Transkription mit der anschließenden Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht eine einfachere cDNA-Klonierung im Vergleich zur konventionellen Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek. In dieser Arbeit wurden die humanen cDNAs von MBD1v3 und MBD2b mittels RT-PCR kloniert.

Zuerst wurde die Gesamt-RNA aus kultivierten HEK293- oder HeLa-Zellen mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) gereinigt (2.2.18). Die erforderlichen Primer-Sequenzen für RT-PCR

wurden anhand der publizierten Sequenzen in der öffentlichen Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) entworfen. In meiner Arbeit wurde das Titan One Tube RT-PCR System (Roche) benutzt, das die cDNA-Synthese mit der reversen Transkriptase AMV und die anschließende cDNA-Vervielfachung mit Taq-/Pwo-Polymerasen in einem einzigen PCR-Gefäß durchführt. Im Vergleich zur konventionellen RT-PCR in zwei Reaktionsgefäßen ist die verwendete Ein-Gefäß-Methode schneller in der Durchführung und besser geschützt gegen Kontaminationen. Ein typischer RT-PCR-Ansatz in meiner Arbeit bestand aus: 1 µl 10 mM dNTPs, 4 µl 5 pmol / µl Vorwärtsprimer, 4 µl 5 pmol / µl Rückwärtsprimer, 2,5 µl 100 mM DTT, 10 µl 5x RT-PCR-Puffer, 5 µl Gesamt-RNA, 22,5 µl H₂O und 1 µl Titan-Enzymgemisch. Ein typisches Temperaturprofil lautete: 1x {50°C 30 min, 96°C 2 min}; 35x {96°C 10 sec, 60°C 30 sec, 68°C n sec}; 1x {68°C 7 min}. Die Elongationszeit n betrug 60 sec pro kbp. Das RT-PCR-Produkt wurde anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Stimmt die Größe des RT-PCR-Produktes mit dem berechneten Wert aufgrund der publizierten Sequenz überein, dann wurde das Fragment aus dem Gel eluiert und unter Ausnutzung der 3'-Adenin-Überhänge des RT-PCR-Produktes in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega), einen speziellen TA-Klonierungsvektor, eingebaut. Ein Ligationsansatz aus 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer, 0,5 µl pGEM-T-Easy, 1 µl T4-DNA-Ligase (alle Promega) und 3,5 µl RT-PCR-Produkt-Eluat wurde bei Raumtemperatur 3 h inkubiert, dann in *E. coli* XL1-Blue transformiert und auf LB-XI-Agarplatten ausplattiert. Aus farblosen Kolonien wurde Plasmid-DNA präpariert und zur Verifizierung des Inserts sequenziert.

2.2.18 Isolierung der Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde aus Zellen mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) isoliert. Sterile Einweg-Polypropylen Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden verwendet, um eine RNase-Kontamination zu vermeiden. Bei der Versuchsdurchführung wurden durchgehend Handschuhe getragen. Zellen von einem konfluenten Ø35mm-Gewebekulturschälchen (circa 1×10^6 Zellen) wurden in 200 µl PBS resuspendiert und dann mit 400 µl Lyse-/Bindepuffer gut gemischt. Dieses Gemisch wurde in ein High Pure Filter Tube mit einem Auffanggefäß pipettiert und für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Pro Reinigung wurden 90 µl DNase- Inkubationspuffer mit 10 µl DNase I gemischt, in das obere Reservoir des Filter Tubes pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Das Filter wurde dreimal jeweils mit 500 µl Waschpuffer I, 500 µl Waschpuffer II und 200 µl Waschpuffer II gewaschen, wobei die Waschfraktion der ersten zwei Waschgänge über Zentrifugation für 15 s bei 8000 g und die des letzten Waschganges

für 2 min bei 13000 g entfernt wurde. Die reine RNA wurde mit 100 µl Nuclease-freiem, sterilem H₂O unter Zentrifugation für 1 min bei 8000 g eluiert. 1 µl der RNA-Lösung wurde zur Kontrolle der Qualität mittels RT-PCR verwendet. Als Primer wurden E3-DBD-F und E4-TRD-F (Geschenke von Buschdorf) gewählt, die Exon 3 und Exon 4 vom menschlichen *MECP2*-Gen überspannen. Bei Verwendung von intakter Gesamt-RNA erhielt man ein 840 bp langes RT-PCR-Produkt. Wenn der RNA-Präparat durch genomische DNA kontaminiert war, erhielt man dagegen ein zweites 1596 bp langes Produkt, das Intron 3 vom *MECP2*-Gen enthielt. Nur intakte, DNA-freie Gesamt-RNA wurde für RNA-Dot-Blot (2.2.19) verwendet.

2.2.19 RNA-Dot-Blot

Während die eukaryotische PolIII-Promotor-Aktivität indirekt anhand des Translationsproduktes via Enzymtest oder Proteinbestimmung gemessen werden kann, muß die eukaryotische PolIII-Promotor-Aktivität, zum Beispiel die Transkriptionsaktivität von Alu-Elementen, direkt anhand des Transkriptionsproduktes gemessen werden. Zur Unterscheidung der endogenen und der exogenen Alu-Expression in transfizierten menschlichen Zellen wurde in meiner Arbeit das Reporterplasmid p^{7SL}AluSx^{TMBC1} (Geschenk von Dr. Deininger) verwendet, das eine chimäre RNA aus Alu und BC1, einer neuronenspezifischen RNA aus Nagertieren, exprimiert. Somit konnte ich die exogene Alu-Expression mit einer Sonde (5'-TGTGTGTGCCAGTTACCTTG-3', MWG Biotech) gegen die BC1-Region eindeutig detektieren.

Die Gesamt-RNA wurde aus transfizierten Zellen mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) isoliert. 1 µl RNA-Lösung wurde auf Nitrocellulose-Membran punktförmig aufgetragen und luftgetrocknet. Die beladene Membran wurde 2 h bei 80°C zwischen Filterpapier und Glasplatten in einem Vakuumofen gebacken, damit die RNA auf der Membran fixiert wurde. Nach der Abkühlung wurde die Membran in 20 ml Hybridisierungspuffer für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln blockiert. Die Herstellung der Sonde erfolgte durch die End-Markierung des DNA-Oligonukleotides. Ein solcher Markierungsansatz bestand aus 20 pmol Oligonukleotid, 20 pmol [γ -³²P]ATP (Hartmann), 2 µl Puffer A und 1 µl Polynukleotid-Kinase (beide MBI-Fermentas) und wurde mit H₂O auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 0.5 M EDTA wurde die Reaktion gestoppt. Die Inkubation der Membran mit der radioaktiven Sonde in 20 ml Hybridisierungspuffer erfolgte über Nacht bei 42°C auf einem Schüttler. Als Kontrolle wurde die Antisense-Sonde eingesetzt, damit das Falschsignal durch die Plasmid-DNA-Kontamination unterschieden werden konnte. Am nächsten Tag wurde die Membran mit 200 ml 6x SSC, 5x SSC und 4x SSC für je 15 min bei

42°C gewaschen, luftgetrocknet und in Durchsichtsfolie verpackt. Es folgte die Autoradiographie mit Röntgenfilm (Fuji Photo Film) plus 800-fachem Verstärker. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit Bio-Imaging Analyzer BAS-2000 (Fuji Photo Film).

2.2.20 Gezielte *in vitro* Mutagenese

Die gezielte *in vitro* Mutagenese stellt eine wichtige molekularbiologische Methode bei der Charakterisierung der funktionellen Aminosäurereste in Proteinen dar. In meiner Arbeit wurde die transkriptionelle Repressordomäne (TRD) von MeCP2 mittels Mutationsstudie detailliert untersucht.

In der ersten Phase wurde die grobe Substitution von neun Aminosäuren gegen Valin plus FLAG-Epitop mittels Überlappungs-PCR durchgeführt (2.2.11).

In der zweiten Phase wurde die feinere Substitution von zwei basischen Aminosäuren gegen zwei saure Aminosäuren mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Der Ablauf dieses Systems ist in Abbildung 4 graphisch dargestellt. Die beiden mutagenen Primer A und B wurden als 5'-phosphorylierte Oligonukleotide (MWG Biotech) bestellt. Sie enthielten die gewünschte(n) Mutation(en) in der Mitte und waren komplementär zueinander. Ihre Länge N variierte zwischen 25 und 45 nt. Ihre Schmelztemperatur T_m sollte höher als 78°C betragen und wurde nach der folgenden Formel ermittelt: $T_m = 81.5 + 0.41 \times (\text{GC}\%) - 675 / N - \text{Mismatch}\%$, wobei die Werte für GC% und Mismatch% jeweils ganze Zahlen waren. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 µl 10x Reaction Buffer, 1 µl 10 ng / µl Plasmid-DNA, 1 µl 125 ng / µl Primer A, 1 µl 125 ng / µl Primer B, 1 µl 10 mM dNTPs, 41 µl H₂O und 1 µl 2.5 U / µl PfuTurbo-DNA-Polymerase. Das verwendete Temperaturprofil in einem Thermocycler lautete: 1x {95°C 30 sec}; 18x {95°C 30 sec, 55°C 1 min, 68°C t min}. Die Elongationszeit t betrug 2 min pro kbp. Die als Vorlage benutzte Plasmid-DNA wurde denaturiert, die mutagenen Primer A und B hybridisierten sich mit der Plasmid-DNA und die Pfu-DNA-Polymerase verlängerte die Primer zu offener circulaner DNA. Trotz der großen Ähnlichkeit zur PCR handelte es sich hier allerdings um eine lineare Vervielfachung von DNA, denn nur die geschlossene Plasmid-DNA, nicht aber die offene circulaner DNA, konnte als Substrat für die Pfu-DNA-Polymerase dienen. Daher reduzierte das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit im Vergleich zu einem auf PCR basierenden Mutagenese-System erheblich das Risiko, zusätzliche, unerwünschte Mutationen einzuführen. Nach dem Ablauf der Reaktion wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor der mit 1 µl 10 U / µl Dpn I versetzt wurde.

Das Restriktionsenzym Dpn I erkennt die methylierte DNA-Sequenz 5'-G^MATC-3' und verdaut spezifisch die Plasmid-DNA, die aus DAM⁺ *E. coli* (zum Beispiel XL1-Blue) präpariert wurde. Die neu gebildete, offene circulaire DNA enthielt dagegen nur die nicht-methylierte DNA-Sequenz 5'-GATC-3' und blieb unverdaut. Nach der Verdauung bei 37°C für 1 h wurde 1 µl des Ansatzes für die Transformation verwendet. In transformierten Bakterien verknüpfte sich die offene circulaire DNA zur geschlossenen Plasmid-DNA durch die Aktivität der bakteriellen DNA-Reparaturmaschinerie. Dank der hohen Effizienz von QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (> 90%) reichte es im Normalfall aus, DNA aus zwei Bakteriekolonien zu isolieren und diese zur Verifizierung der eingeführten Mutationsstellen zu sequenzieren.

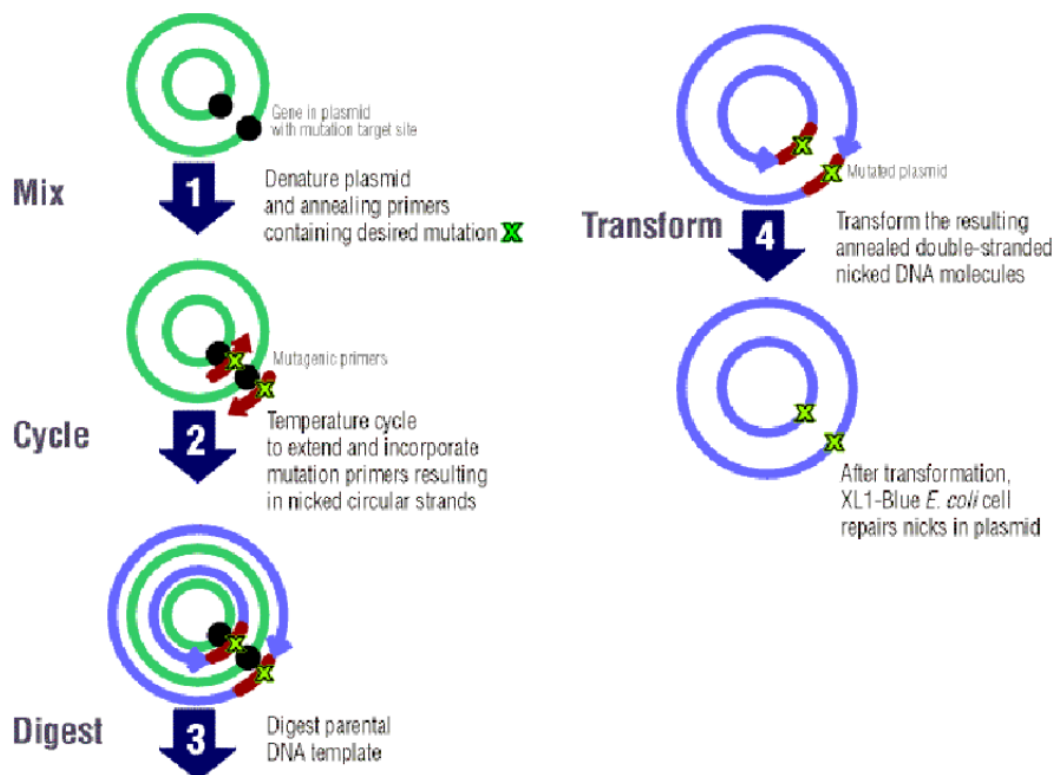


Abbildung 4 *In vitro* Mutagenese mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Schritt 1: Die zu mutierende, parentale Plasmid-DNA (grüner Doppelkreis) wurde denaturiert, bevor sich die beiden gegenläufigen, Mutationsstellen (grüne Kreuze) enthaltenden Primer (braune Pfeile) an die zu mutierenden Stellen (schwarze Punkte) auf der Plasmid-DNA anlagern. Schritt 2: Bei zyklischen Abläufen wurden die beiden Primer zur offenen, circulaire DNA (blaue Pfeile) verlängert. Schritt 3: Die parentale Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Dpn I abgebaut. Schritt 4: Für die Transformation wurde die neu synthetisierte, doppelsträngige, offene, ring-förmige DNA mit eingebauter Mutation verwendet, die innerhalb der Bakterienzellen durch die DNA-Reparaturmaschinerie zur geschlossenen Plasmid-DNA umgewandelt wurde. (nach Stratagene)

2.2.21 Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation ist eine wichtige biochemische Methode bei der Untersuchung der Protein-Protein-Wechselwirkungen unter *in vivo* Bedingungen. Dabei wird das zu untersuchende Protein aus einem komplexen Lysat mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert. Die mit diesem Protein interagierenden Proteine können dabei ko-präzipitiert werden und ihre Identitäten lassen sich durch anschließende Western-Blots oder Protein-Sequenzierungen klären.

Circa 1×10^7 HEK293-Zellen auf einer konfluenten Ø10cm-Gewebekulturschale (Greiner) wurden in 2 ml PBS durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 7000 rpm in einem Eppendorf-Zentrifuge pelletiert. Das Sediment wurde in 1500 µl kaltem Lyse-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zusammensetzung des Lyse-Puffers orientierte sich nach dem Buffer A von Nan *et al.* (1998). Das entstandene Zelllysat wurde für 30 min bei 14000 rpm in einem Eppendorf-Zentrifuge im Kühlraum zentrifugiert. Je 200 µl klarer Überstand wurde mit 5 µl diversem Antikörper aus Kaninchen (anti-mSin3A, anti-TFIIB, anti-c-Fos, anti-c-Jun, anti-Oct1 und anti-AP2α, alle von Santa Cruz) versetzt und für 2 h im Kühlraum unter Schwenken inkubiert. Danach wurden 10 µl Protein-A/G-Sepharose-Suspension (Santa Cruz) dazu pipettiert und über Nacht im Kühlraum unter Schwenken inkubiert. Protein A und Protein G binden spezifisch an Immunglobuline G aus Kaninchen und einigen anderen Säugetieren. Durch ihre Kopplung an Sepharose-Kügelchen können die direkt und indirekt an Protein A oder Protein G gebundenen Proteine aus einer löslichen Phase in Präzipitate überführt werden. Am nächsten Tag wurden die Immunpräzipitationsansätze für 2 min bei 7000 rpm in einem Eppendorf-Zentrifuge im Kühlraum zentrifugiert. Das Präzipitat wurde dreimal in 1000 µl kaltem Lyse-Puffer resuspendiert und wie oben zentrifugiert, bevor das gewaschene Präzipitat in 20 µl SDS-Gelladepuffer für Western-Blot (2.2.13) zur Detektion von MeCP2 aufgenommen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Die Überexpression von MeCP2 in kultivierten Zellen

Die Überexpression eines zu untersuchenden Proteins in kultivierten Zellen und die anschließende Messung dessen biologische Aktivität *in vivo* sind vorteilhaft gegenüber den *in vitro* Experimenten mit gereinigtem Protein oder Extrakten, weil das Protein im ersten Fall in seiner natürlichen Umgebung vorliegt und die Resultate daraus eher den wirklichen zellulären Situationen entsprechen. Um die Frage zu klären, ob MeCP2 im Zellkern auch an bestimmte nicht-methylierte DNA-Sequenzen bindet, sind Versuche mit überexprimiertem MeCP2 in kultivierten Zellen ein geeigneter Weg.

Als Expressionsvektor wurde pcDNA1.1/Amp (Invitrogen) gewählt, das eine starke Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors in Säugerzellen ermöglicht (Abbildung 5A). Die vollständige cDNA von hMeCP2 (Geschenk von Dr. Thiesen; Thiesen, 2001) wurde zwischen den BamHI- und EcoRV-Schnittstellen in die MCS von pcDNA1.1/Amp eingebaut. Da spezifischer Antikörper gegen hMeCP2 zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhanden war, konnte die Funktionalität dieses ersten Konstruktes, pcDNA1.1/Amp-hMeCP2, in transfizierten Zellen nicht überprüft werden. Eine geeignete Lösung dieses Problems war, dem zu exprimierenden Protein ein kleines Peptid anzuhängen, das aufgrund seiner geringen Größe keine biologische Aktivität des Zielproteins stört und leicht detektierbar ist. In meinem Experiment wurde ein Markierungspeptid aus Valin und FLAG-Epitop (VDYKDDDDK) eingesetzt, das im Western-Blot mit dem monoklonalen Antikörper anti-FLAG M2 (Sigma) leicht nachgewiesen werden kann. Der Einbau der Markierungspeptid kodierenden Nukleotidsequenzen (27 bp) zwischen dem ersten und dem zweiten Codon von hMeCP2-cDNA auf pcDNA1.1/Amp-hMeCP2 geschah durch Überlappungs-PCR (2.2.11). Das neue Konstrukt pcDNA1.1/Amp-FLAG-hMeCP2 wurde mit der Calciumphosphat-Methode in HEK293-Zellen transfiziert (Graham *et al.*, 1977). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in SDS-Gelladepuffer lysiert und das Gesamtlysate wurde im Western-Blot analysiert. Im Lysat aus schein-transfizierten Zellen gab es keine Signale, was das Fehlen von dem FLAG-Epitop oder ähnlichen Epitopen in natürlich vorkommenden humanen Proteinen und die hohe Spezifität des Antikörpers anti-FLAG M2 bewies. Im Lysat aus mit pcDNA1.1/Amp-FLAG-hMeCP2 transfizierten Zellen gab es dagegen ein starkes Signal bei circa 80 kDa (Abbildung 5B). Diese apparente Größe ist identisch mit der

apparenten Größe von endogenem hMeCP2. Dieses Ergebnis ist zu erwarten, weil das Markierungspeptid (9 aa) im Vergleich zu Gesamt-hMeCP2 (486 aa) verhältnismäßig klein ist. Daraus schlussfolgerte ich, dass das Konstrukt pcDNA1.1/Amp-FLAG-hMeCP2 für die Überexpression von hMeCP2 in kultivierten Zellen geeignet war.

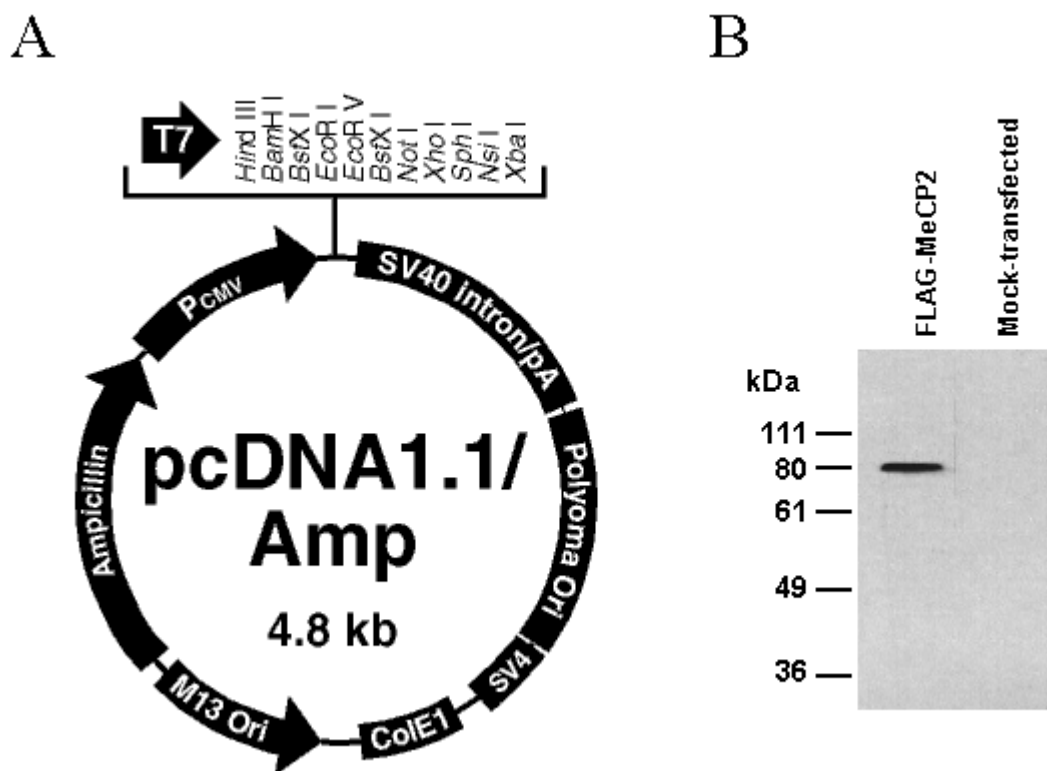


Abbildung 5: (A) Schematische Darstellung des Expressionsvektors pcDNA1.1/Amp (Invitrogen). (B) 1×10^6 HEK293-Zellen wurden mit oder ohne 100 ng pcDNA1.1/Amp-FLAG-hMeCP2 mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert und 48 h später in 100 μ l SDS-Gelladepuffer lysiert. 20 μ l Lysat wurde in Western-Blot mit dem Antikörper anti-FLAG M2 eingesetzt. Nur im Lysat aus mit pcDNA1.1/Amp-FLAG-hMeCP2 transfizierten Zellen (FLAG-MeCP2), nicht aber im Lysat aus schein-transfizierten Zellen (Mock-transfected) gibt es ein Signal bei circa 80 kDa.

3.2 Die *in vivo* DNA-Bindung von MeCP2

MeCP2 aus Rattengehirn wurde ursprünglich aufgrund seiner hohen Affinität zu methylierten Oligonukleotiden unter der Bedingung des Southwestern-Blots isoliert (Lewis *et al.*, 1992). Später konnte diese Eigenschaft auch in DNA-Footprinting und Gelretadierungstest demonstriert werden (Nan *et al.*, 1993). MeCP2 bindet nicht nur an nackte methylierte DNA, sondern auch an die *in vitro* in Nucleosomen verpackte methylierte DNA (Chandler *et al.*, 1999). Dass MeCP2 in Mauszellen hauptsächlich in pericentromerem Heterochromatin, Regionen mit einer hohen

Dichte an methylierten Maus-Satelliten-DNA, lokalisiert ist, wurde als Indiz bewertet, dass MeCP2 auch *in vivo* an methylierte DNA bindet (Lewis *et al.*, 1992). Im scheinbaren Gegensatz standen die Daten, dass MeCP2 in drei unterschiedlichen *in vitro* Experimenten (Southwestern-Blot, DNA-Footprinting und Gelretardierungstest) an unmethylierte Hühner-Lysozymgen-MAR und Maussatelliten-DNA spezifisch bindet und dass die Methylierung der Maussatelliten-DNA die Bindung von MeCP2 an die Maussatelliten-DNA nur um bis zu fünffach erhöhen konnte (von Kries *et al.*, 1991; Weitzel *et al.*, 1997). Eine Überprüfung dieser berichteten *in vitro* Bindungsaktivitäten von MeCP2 unter *in vivo* Bedingungen war daher zwingend notwendig.

Mein Testsystem benutzte das Reporterplasmid pAGLu (Geschenk von Dr. Bode), das Firefly-Luciferase unter der Kontrolle von SV40-Enhancer/Promotor in Säugerzellen exprimieren kann. Zwei Derivate von pAGLu, nämlich pMAR-AGLu und pSat-AGLu, wurden konstruiert, indem das 5'-Hühner-Lysozymgen-MAR-Fragment P1-P2 (1455 bp) (Phi-Van und Strätling, 1998) und die klonierte Wiederholungseinheit der Maus-Satelliten-DNA (243 bp) (Weitzel *et al.*, 1997) jeweils in die 27 bp vor SV40-Enhancer/Promotor liegende BamHI-Stelle eingefügt wurden. Die Reporterplasmide pAGLu, pMAR-AGLu und pSat-AGLu (1000 ng) wurden jeweils zusammen mit dem Expressionsplasmid pcDNA1.1/Amp-FLAG-hMeCP2 (100 ng) in die HEK293-Zellen mit der Calciumphosphat-Methode ko-transfiziert. Zur Normalisierung der Firefly-Luciferase-Meßwerte wurde zusätzlich 50 ng pRL-TK (Promega, Geschenk von Dr. Pillar), das Renilla-Luciferase unter der Kontrolle vom Thymidin-Kinase-Promotor in Säugerzellen exprimieren kann, ko-transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Aktivitäten von Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase mit Dual-Luciferase Assay Kit (Promega) gemessen. Die relativen normalisierten Firefly-Luciferasewerte von den drei Transfektionsansätzen wurden miteinander verglichen und in Abbildung 6A graphisch dargestellt. Wenn das gut charakterisierte Fragment von 5'-Hühner-Lysozymgen-MAR P1-P2 (1455 bp) stromaufwärts vor SV40-Enhancer/Promotor kloniert wurde und exogene hMeCP2 in HEK293-Zellen co-exprimiert war, nahm die Transkription von SV40-Enhancer/Promotor stark ab (durchschnittlich um 68%). Wenn die nicht-methylierte Wiederholungseinheit der Maussatelliten-DNA (243 bp) stromaufwärts vor SV40-Enhancer/Promotor kloniert wurde und exogene hMeCP2 ko-exprimiert war, nahm die Transkription von SV40-Enhancer/Promotor zwar signifikant, aber weniger stark ab (durchschnittlich um 32%).

Zur Klärung der Promotorabhängigkeit der oben gewonnenen Daten wurde eine neue Reihe von Reporterplasmiden konstruiert, indem das SV40-Enhancer/Promotor enthaltende HindIII-Fragment auf pAGLu, pMAR-AGLu und pSat-AGLu gegen ein Fragment, das den adenoviralen

Major-Late-Promotor (Geschenk von Dr. Schnieders) enthält, ausgetauscht. Die drei neuen Reporterplasmide, pMLP-AGLu, pMAR-MLP-AGLu und pSat-MLP-AGLu (1000 ng), wurden dann jeweils zusammen mit dem Expressionsplasmid pcDNA1.1/Amp-FLAG-hMeCP2 (100 ng) und dem Referenzplasmid pRL-TK (50 ng) in HEK-293-Zellen ko-transfiziert. Die damit gewonnenen Daten wurden in Abbildung 6B graphisch dargestellt. Das Vorhandensein von 5'-Hühner-Lysozymgen-MAR und Maussatelliten-DNA stromaufwärts vor dem adenoviralen Major-Late-Promotor führte in Anwesenheit von exogenem überexprimiertem hMeCP2 zur transkriptionellen Repression von jeweils durchschnittlich 69% und 29%. Dieses Ergebnis war fast identisch wie das vorherige Resultat mit den auf SV40-Enhancer/Promotor basierenden Reporterplasmiden. Offensichtlich war die transkriptionelle Repression hier nicht vom Promotortyp, sondern von Inserts stromaufwärts vor dem Promotor abhängig.

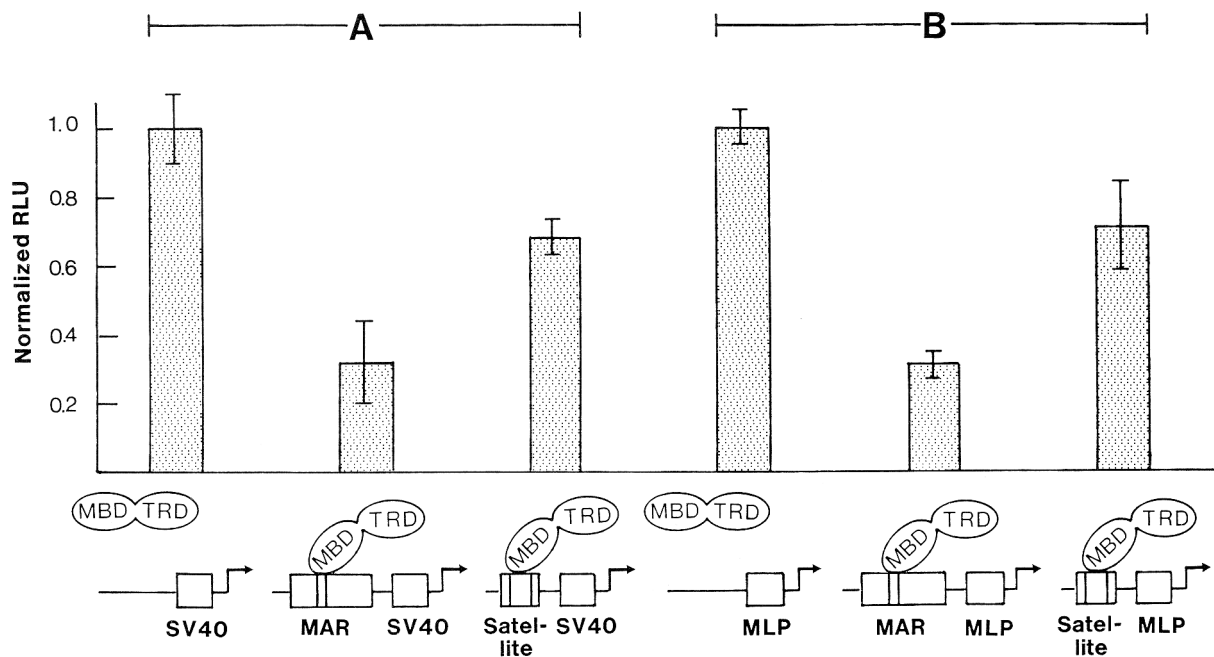


Abbildung 6 Überexprimiertes MeCP2 bindet an 5'-Hühner-Lysozymgen-MAR und Maussatelliten-DNA *in vivo*. HEK293-Zellen wurden mit einem hMeCP2 (MBD-TRD) überexprimierendem Plasmid und den angezeigten Reporterplasmiden ko-transfiziert, die entweder mit (A) SV40-Enhancer/Promotor (SV40) oder (B) adenoviralen Major-Late-Promotor (MLP) Firefly-Luciferase exprimieren. Einige Reporterplasmide enthalten zusätzlich, wie gezeigt, ein Hühner-Lysozymgen-MAR-Fragment (MAR) oder eine Maussatelliten-DNA-Einheit (Satellite). Die dortigen senkrechten Streifen in den Rechtecken zeigen die hoch-affinen MeCP2-Bindungsstellen (Buhrmester *et al.*, 1995; Weitzel *et al.*, 1997). Normalisierte relative Luciferase-Aktivitäten (RLU) in der Abwesenheit eines stromaufwärts liegenden MeCP2-Bindungselementes (Kontrolle) wurden als 1.0 gesetzt. Ergebnisse waren repräsentativ für vier separate Experimente in Triplikaten (+/- Standardabweichung).

Die Daten in Abbildung 6 deuteten zusammen darauf hin, dass 5'-Hühner-Lysozymgen-MAR und Maussatelliten-DNA die DNA-Bindungsdomäne (MBD) des Repressors MeCP2 zu beiden Reporter-Promotoren, nämlich SV40-Enhancer/Promotor und adenoviralem Major-Late-Promotor, dirigierten und dass der in der Nähe der Promotoren bindende Repressor MeCP2 dann die Firefly-Luciferase-Expression durch die transkriptionelle Repressordomäne (TRD) hemmte. Ich schlussfolgerte, dass überexprimiertes MeCP2 an 5'-Hühner-Lysozymgen-MAR und Maussatelliten-DNA *in vivo* binden kann. Meine Beobachtung unterstützte das Modell, nach dem MeCP2 nicht strikt an methylierte CpG-Stellen bindet, sondern auch an ausgewählte, nicht-methylierte DNA bindet.

Die hier beobachtete Repression mit Maussatelliten-DNA stromaufwärts vor beiden Promotoren war weniger stark als die mit 5'-Hühner-Lysozymgen-MAR. Diese herabgesetzte Repression widerspiegelte die vergleichsweise niedrigere Bindungsaffinität zu MeCP2 von Maussatelliten-DNA, was durch den nicht-methylierten Status erklärt werden könnte. *In vivo* ist Maussatelliten-DNA stark methyliert und *in vitro* bindet MeCP2 an die nicht-methylierte Version mit einer drei- bis fünffach reduzierten Affinität als an die methylierte Version (Weitzel *et al.*, 1997).

3.3 Die transkriptionelle Repression von MeCP2

Die meisten eukaryotischen Transkriptionsfaktoren sind modular aufgebaut und enthalten separate funktionelle Untereinheiten wie DNA-Bindungsdomänen, RNA-Bindungsdomänen, transkriptionelle Aktivator-domänen, transkriptionelle Repressordomänen und / oder Liganden-Bindungsdomänen. Eine solche Domäne funktioniert meistens nicht nur in ihrem natürlichen Protein-Kontext, sondern auch nach der kovalenten Kopplung an fremden Domänen in einem heterologen System. Mit Hilfe solcher Fusionsproteine wird in der Molekularbiologie gezielt eine bestimmte funktionelle Domäne ohne den Rest des Proteins analysiert.

In meiner Arbeit benutzte ich das bekannte, auf Gal4BD basierte Fusionssystem. Gal4 ist ein transkriptioneller Aktivator aus Bäcker-Hefe und spielt eine wichtige Rolle im Galactose-Stoffwechsel. Seine 147 Aminosäuren lange, N-terminale DNA-Bindungsdomäne (Gal4BD) mit dem Zinkfinger-Motiv erkennt eine 17 bp lange, symmetrische Konsensus-Sequenz. Ein häufig verwendetes System in der molekularbiologischen Laborpraxis benutzt die Herstellung eines Fusionsproteins aus Gal4BD und dem zu untersuchenden Peptid X sowie die Konstruktion eines Reporterplasmids mit eingebauter Gal4-Konsensus-Sequenz stromaufwärts vor dem Promotor. In transfizierten Zellen dirigiert dann Gal4BD das kovalent gekoppelte Peptid X zur Gal4-

Konsensus-Sequenz in der Nähe des Promotors auf dem Reporterplasmid und die biologische Aktivität des Peptides X (Aktivator beziehungsweise Repressor) kann anhand der Veränderung der Reporter-Expression indirekt gemessen werden. Unter Gebrauch dieses Testsystems konnte gezeigt werden, dass die TRD (aa 207 – 310) von MeCP2 aus Maus die transkriptionelle Aktivität von humanem β -Actin Promotor reprimiert und dass diese transkriptionelle Repression teilweise durch die Zugabe eines spezifischen Inhibitors der Histon-Deacetylasen, TSA, aufgehoben werden kann (Nan *et al.*, 1997; Nan *et al.*, 1998).

Ich wollte wissen, ob die TRD von hMeCP2 auch den viralen SV40-Enhancer/Promotor auf dieselbe Weise reprimieren kann. Dazu wurde die cDNA von hMeCP2 (aa 190 – 486), die die transkriptionelle Repressordomäne enthält, mittels PCR amplifiziert und in die KpnI- und BamHI-Schnittstellen von pcDNA3-Gal4BD (Geschenk von Dr. Han; Han *et al.*, 1997) eingebaut. Das neue Konstrukt pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} exprimiert ein Fusionsprotein aus Fragmenten von Gal4 (aa 1 – 147) und hMeCP2 (aa 196 – 486) unter Gebrauch des starken CMV-Promotors. Dann wurde das BamHI-Fragment aus pFR-Luc (Stratagene), das fünf Kopien der Konsensus-Erkennungssequenz von Gal4 enthält, mit der ursprünglichen Orientierung in die BamHI-Schnittstelle von pAGLu eingebaut. Das neue Reporterplasmid pG5AGLu enthält somit fünf Gal4-Bindungsstellen 27 bp unmittelbar stromaufwärts vor dem SV40-Enhancer/Promotor. 1000 ng Reporterplasmid pAGLu oder pG5AGLu wurden zusammen mit 100 ng Effektorplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} und 50 ng Referenzplasmid pRL-TK in HEK293-Zellen transient transfiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 7A graphisch dargestellt. Wenn Gal4-Bindungsstellen vor dem SV40-Enhancer/Promotor kloniert waren und ein Fusionsprotein aus Gal4-DNA-Bindungsdomäne und der C-terminalen Hälfte von hMeCP2 (aa 196 – 486, einschließlich TRD) (Gal4-TRD) in HEK293-Zellen ko-exprimiert wurde, wurde die transkriptionelle Aktivität vom SV40-Enhancer/Promotor durchschnittlich um 85% dramatisch gehemmt. Erstaunlicherweise konnte der spezifische Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA, 100 ng / ml) diese Repression nicht aufheben.

Anschließend wurden die beiden Subfragmente von hMeCP2 (aa 196 – 486) hinsichtlich ihrer Repressionseigenschaften analysiert. Dazu wurden die beiden cDNAs von hMeCP2 (aa 196 – 310; aa 311 – 486), die jeweils die zentrale minimale transkriptionelle Repressordomäne (miniTRD) und die stark konservierte C-terminale Domäne (CD) enthalten, mittels PCR amplifiziert und in die KpnI- und BamHI-Schnittstellen von pcDNA3-Gal4BD eingebaut. Die Ergebnisse mit den neuen Expressionsplasmiden pcDNA3-Gal4BD-miniTRD_{MeCP2} und

pcDNA3-Gal4BD-CD_{MeCP2} sind in Abbildung 7B/C graphisch dargestellt. Wenn das Fusionsprotein miniTRD (aa 196 – 310) enthielt, war wie im Fall von TRD (aa 196 – 486) eine gleich starke Repression, die durch TSA nicht aufhebbar war, zu beobachten. Die C-terminalen 176 Aminosäuren (CD) zeigten hingegen eine schwächere Hemmung der SV40-Enhancer/Promotor-Aktivität, aber auch diese Repression konnte nicht durch TSA aufgehoben werden. Zusammengefasst zeigten die oben dargestellten Ergebnisse, dass die Repression der Transkription vom SV40-Enhancer/Promotor durch TRD von hMeCP2 über einem neuartigen, Histon-Deacetylase-unabhängigen Mechanismus erfolgt.

In der nächsten Phase wollte ich wissen, ob und wie hMeCP2 einen anderen Promotor reprimiert. Dazu wurden die SV40-Enhancer/Promotor enthaltenden HindIII-Fragmente in Reporterplasmiden pAGLu und pG5AGLu gegen ein 409 bp langes Fragment aus der genomischen DNA vom Adenovirus Typ 5 (Geschenk von Dr. Schnieders), das Major-Late-Promotor (MLP) enthält, ausgetauscht. 1000 ng der neuen Reporterplasmide pAGLu-MLP und pG5AGLu-MLP wurden jeweils zusammen mit 100 ng Effektorplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} und 50 ng Referenzplasmid pRL-TK in HEK293-Zellen transient transfiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 7D graphisch dargestellt. Wenn SV40-Enhancer/Promotor gegen adenoviralen Major-Late(AdML)-Promotor ersetzt wurde, reprimiert TRD in Gal4-TRD diese Promotor-Aktivität in HEK293-Zellen nur noch um 25% und TSA konnte diese Repression vollständig aufheben. Dieses Ergebnis war vergleichbar mit der früheren Beobachtung, dass MeCP2 die Transkription vom humanen β -Actin-Promotor in einer TSA-sensitiven Weise hemmt (Nan *et al.*, 1997).

Zusammengefasst aus den jetzigen und den früheren *in vivo* Experimenten wurde gezeigt, dass die Funktionsweise der TRD von MeCP2 abhängig von dem Promotor-Kontext ist. Innerhalb desselben Zelltyps (HEK293) konnten zwei verschiedene Repressionswege unterschieden werden: ein bekannter Histon-Deacetylase-abhängiger Weg und ein neuer, unbekannter Histon-Deacetylase-unabhängiger Weg.

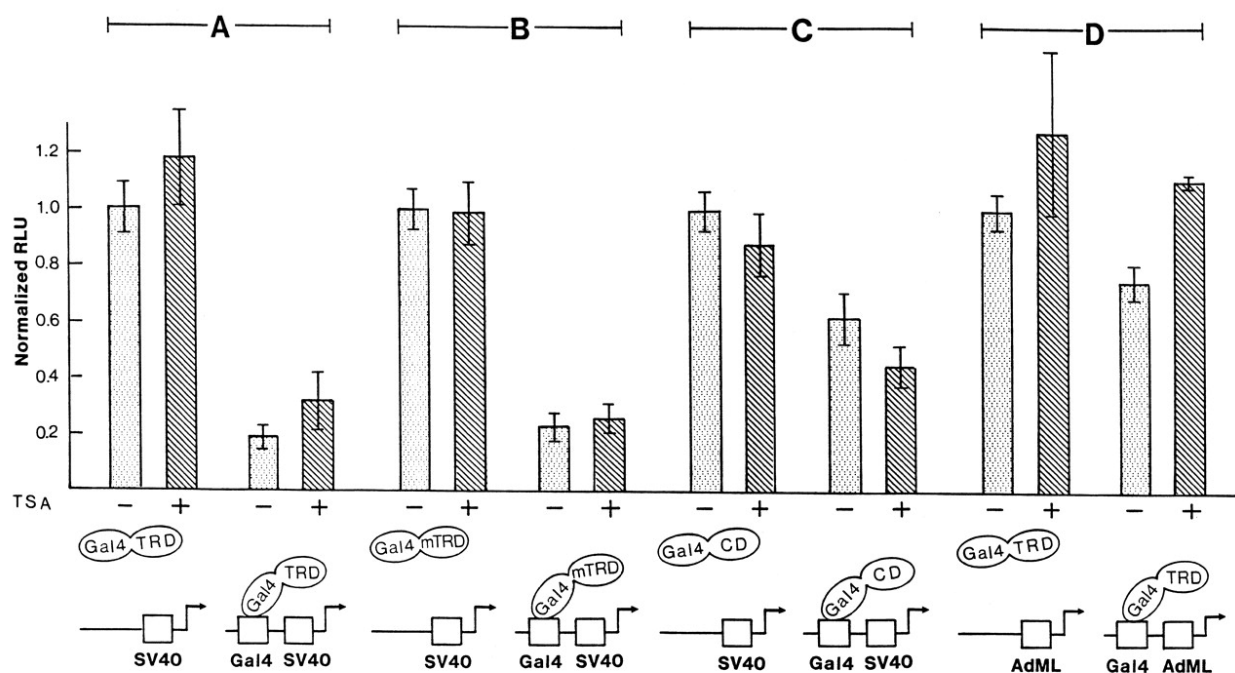


Abbildung 7 Die TRD von hMeCP2 kann die Transkription durch einen Histon-Deacetylase-unabhängigen Weg reprimieren. Die Expressionsplasmide kodieren Gal4BD-Fusionsproteine mit der C-terminalen Hälfte (TRD, aa 196 – 486) (A) und (D), der miniTRD (mTRD, aa 196 – 310) (B) oder der C-terminalen Domäne (CD, aa 311 – 486) (C) von hMeCP2. Sie wurden mit Reporterplasmiden pAGLu (SV40), pG5AGLu (Gal4-SV40), pMLP-AGLu (AdML) oder pG5MLP-AGLu (Gal4-AdML) in HEK293-Zellen ko-transfiziert. TSA (100 ng / ml) wurde 24 h nach der Transfektion in die Ansätze dazugegeben, die mit dem Pluszeichen gekennzeichnet sind. Normalisierte relative Luciferase-Aktivität (RLU) in der Abwesenheit von Gal4-Bindungsstellen und TSA wurde als 1.0 gesetzt. Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens fünf separate Experimente, jeweils in Triplikaten (+/- Standardabweichung).

Ich wiederholte die vorherigen transienten Transfektionen in NIH3T3-Zellen, um die Möglichkeit zu überprüfen, ob die transkriptionelle Repression in den durch adenovirale DNA transformierten HEK293-Zellen durch die Wechselwirkungen zwischen viralem Onkoprotein E1A und zellulären transkriptionellen Aktivatoren oder Co-Aktivatoren vermittelt sein könnte (Graham *et al.*, 1977; Eckner *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1996). In Abbildung 8A/B ist graphisch dargestellt, dass sowohl die TRD (aa 196 – 486), als auch die miniTRD (aa 196 – 310) die transkriptionelle Aktivität vom SV40-Enhancer/Promotor in NIH3T3-Zellen signifikant reprimierten und dass TSA die Repression durch miniTRD gar nicht und die durch TRD nur sehr leicht aufhob. Diese leichte Aufhebung lag wahrscheinlich an einem allgemeinen, Transkription stimulierenden Effekt von TSA, der auch in dem Vergleichsansatz mit dem Reporterplasmid ohne Gal4-Bindungsstellen beobachtet wurde. Zusammengefasst heißt es, dass der Histon-Deacetylase-unabhängige Repressionsweg von MeCP2 Zelltyp-unabhängig ist.

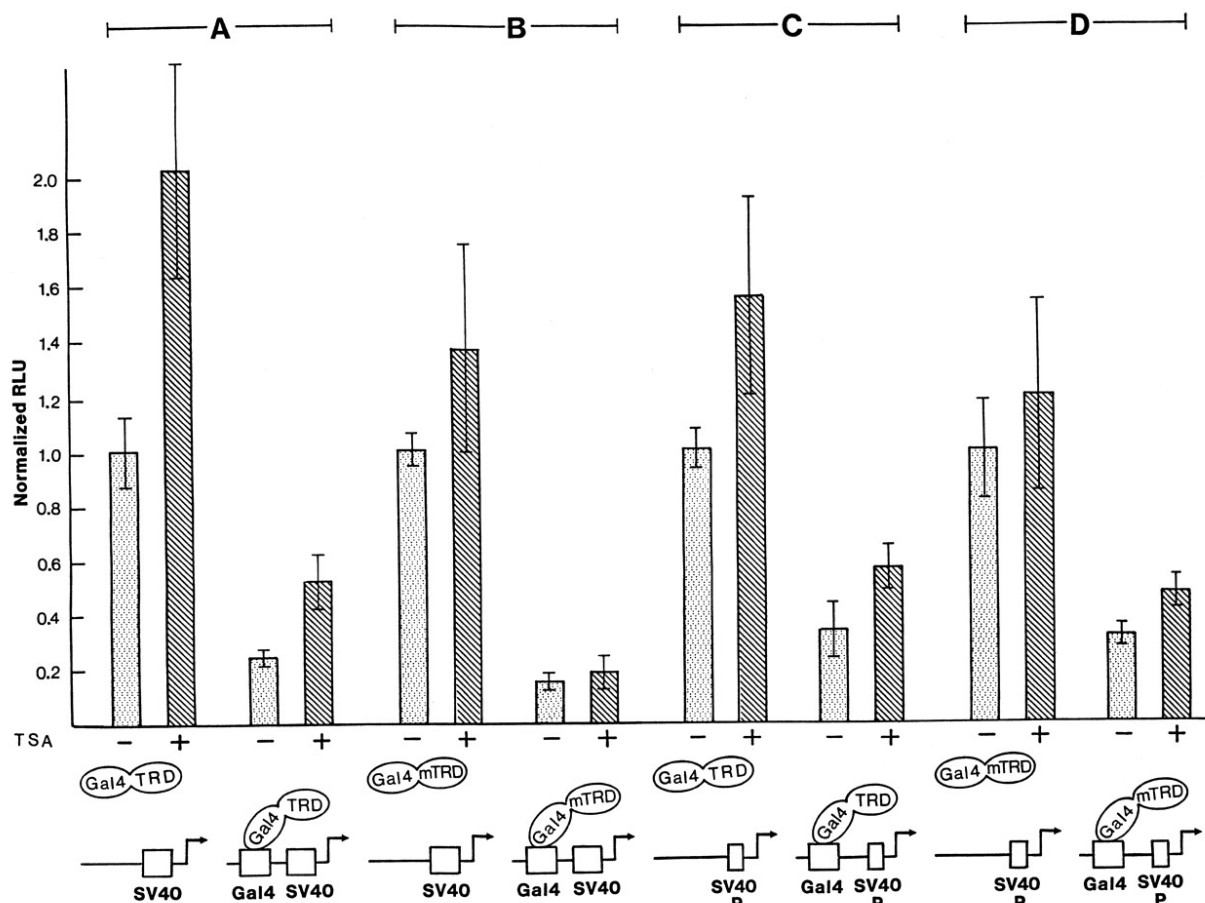


Abbildung 8 Die Repression der SV40-Enhancer/Promotor-Aktivität durch TRD in NIH3T3-Zellen und die Repression der SV40-Promotor-Aktivität durch TRD in HEK293-Zellen. (A) und (B) Histon-Deacetylase-unabhängige Repression durch TRD in NIH3T3-Zellen. NIH3T3-Zellen wurden mit Reporter- und Expressionsplasmiden wie in Abbildung 7A/B transfiziert. (C) und (D) Die Repression des SV40-Promotors. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} oder pcDNA3-Gal4BD-miniTRD_{MeCP2} zusammen mit dem Reporterplasmid pGL3-Promotor (SV40P) oder pG5GL3-Promotor (Gal4-SV40P) ko-transfiziert. Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei separate Experimente, jeweils in Triplikaten (+/- Standardabweichung).

Darüber hinaus wollte ich untersuchen, ob die Repression durch TRD vom SV40-Enhancer abhängig sein könnte. Hierfür benutzte ich das Reporterplasmid pGL3-Promotor (Promega, Geschenk von Dr. Fang), das Firefly-Luciferase unter Gebrauch vom SV40-Promotor aus drei 21bp-Wiederholungen und der Promotor-nahen AP-1-Bindungsstelle exprimieren kann. Sein Derivat für den Gal4BD-Versuch, pG5GL3-Promotor, wurde generiert, indem das BamHI-Fragment aus pFR-Luc in die BamHI-Schnittstelle vor SV40-Promotor auf pGL3-Promotor eingebaut wurde. 1000 ng Reporterplasmid pGL3-Promotor oder pG5GL3-Promotor wurden zusammen mit 100 ng Effektorplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} oder pcDNA3-Gal4BD-miniTRD_{MeCP2} und 50 ng Referenzplasmid pRL-TK in HEK293-Zellen transient ko-transfiziert.

Das Ergebnis ist in Abbildung 8C/D graphisch dargestellt. Die TRD und die miniTRD von MeCP2 reprimierten den SV40-Promotor genauso effizient wie den vollständigen SV40-Enhancer/Promotor. Das deutete darauf hin, dass die transkriptionelle Repression durch TRD nicht vom vollständigen SV40-Enhancer abhängig war. TSA erhöhte die Promotor-Aktivität sowohl in der Kontrolle, als auch im reprimierten Zustand, was möglicherweise wieder den allgemeinen Transkription-stimulierenden Effekt von TSA widerspiegelte. Dennoch hob TSA die TRD-vermittelte Repression des SV40-Promotors nicht auf.

3.4 Die Mutationsstudie von miniTRD

Die Ergebnisse in Abbildung 7A/B/C und Abbildung 8A/B zeigen auch, dass miniTRD in der Repressionsstärke von TRD nicht zu unterscheiden ist, während CD eine deutlich schwächere, aber signifikante Repression vorzeigt. Daraus wurde geschlossen, dass die wesentlichen Repressor-Aktivitäten von hMeCP2 in miniTRD (aa 196 – 310) lokalisiert sind und CD (aa 311 – 486) wahrscheinlich eine redundante oder akzessorische Rolle in der Repression spielt. In der folgenden Studie konzentrierte ich mich auf die Identifizierung der wichtigsten Aminosäurereste innerhalb miniTRD.

Die besonders kritischen Aminosäurereste in einem Protein unterliegen normalerweise einem höheren Selektionsdruck als die weniger essentiellen Aminosäurereste. Weil das Auffinden solcher evolutionär stark konservierten Aminosäurereste oft den ersten Hinweis auf ihre biologische Funktion liefert, wird ein Sequenzvergleich von miniTRDs aus Mensch (*Homo sapiens*), Ratte (*Rattus norvegicus*), afrikanischem Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und Huhn (*Gallus gallus*) mit der Computerunterstützung durchgeführt (Abbildung 9). Die vermutlich auf die Trinukleotid-Amplifikation zurückzuführenden Poly-Prolin- und Poly-Glycin-Regionen in MeCP2/ARBP aus Huhn wurden als Pn und Gn zusammengefasst (Weitzel *et al.*, 1997). Sie könnten möglicherweise die Grenzen der Subdomänen innerhalb TRD darstellen. Sechs 9-aa-Segmente wurden für die folgende Mutationsstudie ausgesucht, wobei die Sequenzen der Segmente A und C signifikant divergieren und die Sequenzen der Segmente B, D, E und F von Amphibien bis Säugetiere relativ stark konserviert sind.

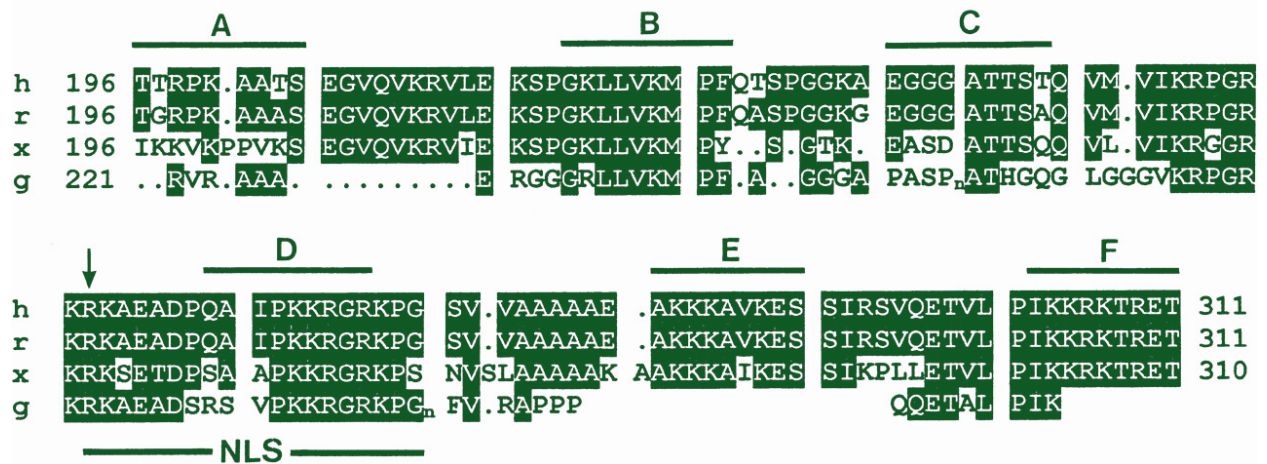


Abbildung 9 Sequenzvergleich zwischen miniTRDs von MeCP2 aus Mensch (h), Ratte (r), Krallenfrosch (x) und Huhn (g) (Genbank-Zugangsnummer Y12643, M94064, AF051768 und Y14166). Nur das MeCP2 aus Huhn enthält eine Kette aus fast ausschließlich Glycin-Resten (Gn) und eine Kette aus fast ausschließlich Prolin-Resten (Pn), die vermutlich durch die Trinukleotidamplifikation entstanden sind (Weitzel *et al.*, 1997). Lücken in den Sequenzen werden durch Punkte markiert. Sechs 9-aa-Segmente (A – F), die durch Balken oberhalb der menschlichen Sequenz gekennzeichnet sind, wurden durch Austausch gegen die Sequenz VDYKDDDDK mutiert. Der Pfeil zeigt den Ort einer Unsinnmutation (R255X) bei einer Rett-Patientin (Amir *et al.*, 1999). Das Kernlokalisierungssignal (NLS) ist durch einen Balken unterhalb den Sequenzen markiert (Nan *et al.*, 1996).

Die Region auf dem Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2}, die das Segment A, B, C, D, E oder F kodiert, wurde mittels Überlappungs-PCR (2.2.11) in ein FLAG-Epitop mit einer zusätzlichen N-terminalen Valin (VDYKDDDDK) mutiert. Die hier benutzte Strategie, neun Aminosäuren auszutauschen, statt sie zu deletieren, ermöglicht die künstliche Mutation einer ausgesuchten Stelle ohne den unspezifischen Mutationseffekt durch grobe Proteinstruktur-Veränderungen. Das eingefügte FLAG-Epitop ermöglicht darüber hinaus gleichzeitig immunologische Untersuchungen der überexprimierten, mutierten Fusionsproteine Gal4BD-TRD_{MeCP2} (Mutanten A bis F) in Zellen mit monoklonalem Antikörper M2 gegen FLAG-Epitop (Sigma).

Das Segment D befindet sich innerhalb des Kernlokalisierungssignals (NLS) (Nan *et al.*, 1996). Es stellte sich die Frage, ob die Mutation im Segment D oder in benachbarten Segmenten die Kernlokalisierung des Fusionsproteins Gal4BD-TRD_{MeCP2} beeinträchtigen könnte. Dazu wurden NIH3T3-Zellen mit Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} (Mutanten A – F) transfiziert und mit Antikörper gegen FLAG-Epitop immunocytochemisch untersucht. HEK293-Zellen wurden dafür nicht verwendet, weil sie sich bei der Fixierung und der Permeabilisierung stark abkugeln und somit die Unterscheidung zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasmasaum

erschweren. NIH3T3-Zellen bleiben dagegen nach solchen Behandlungen im ursprünglichen ausgestreckten beziehungsweise ausgebreiteten Zustand. Das Untersuchungsergebnis in Abbildung 10 zeigt eine eindeutige Ko-Lokalisation zwischen mutierten Fusionsproteinen Gal4BD-TRD_{MeCP2} (Mutanten A bis F) (grün gefärbt) und DNA (blau gefärbt). Das heißt, alle Mutanten (A bis F) sind korrekt in Zellkernen akkumuliert. Für dieses Phänomen gibt es wahrscheinlich zwei Ursachen. Einerseits beherbergt die Gal4-DNA-Bindungsdomäne ein internes Kernlokalisierungssignal, das auch in Säugerzellen funktionsfähig ist und somit Gal4BD-Fusionsproteine in Zellkerne leitet. Andererseits wurde das zweiteilige basische Kernlokalisierungssignal von MeCP2 durch Mutation D nicht vollständig gelöscht und könnte noch ausreichende Restaktivität besitzen.

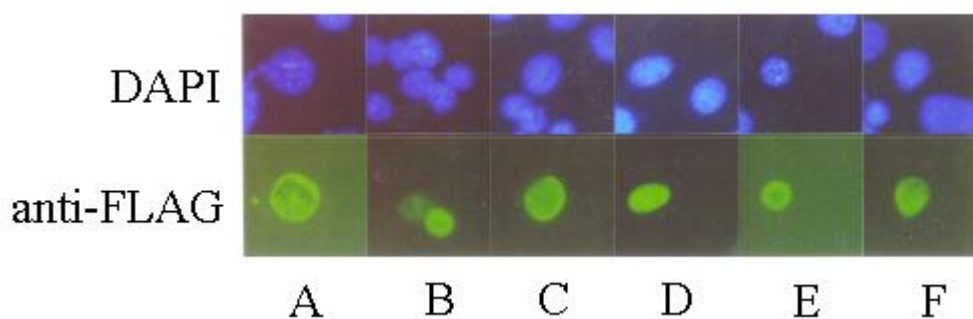


Abbildung 10 Kernlokalisierung der Gal4BD-TRD_{MeCP2} (Mutanten A – F). Expressionsplasmide pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} (Mutanten A – F) wurden in NIH3T3-Zellen transient transfiziert. Die auf Deckgläschen fixierten Zellen wurden einer DNA-Färbung mit DAPI (blaue Färbung) und einer Detektion der mutierten Fusionsproteine Gal4BD-TRD_{MeCP2} (Mutanten A – F) mit monoklonalem Antikörper gegen FLAG-Epitop (anti-FLAG) (Sigma) und an FITC gekoppeltem sekundärem Antikörper gegen Maus IgG (Dianova) unterzogen (grüne Färbung). Die DNA-Färbung dient als positive Kontrolle für die Zellkernfärbung.

Reporterplasmide pG5AGLu (1000 ng) wurden mit Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} (Wildtyp oder Mutanten A bis F, 100 ng) und Referenzplasmid pRL-TK (50 ng) in HEK293-Zellen transient ko-transfiziert. Die Repressoreigenschaft dieser sechs neu generierten Mutanten wurden mit der vom Wildtyp verglichen (Abbildung 11, linke Hälfte). Beim Messen der SV40-Enhancer/Promotor-Aktivität stellte ich fest, dass die Repressionsfähigkeit der Wildtyp-TRD durch die Mutation D vollständig gelöscht war und durch die Mutation E stark reduziert wurde. Andere vier Mutanten verhielten sich ähnlich wie die TRD vom Wildtyp. Das zeigt, dass die Repression des SV40-Enhancer/Promotors von distinkten Aminosäuresequenzen innerhalb TRD von MeCP2 abhängig ist. Mit pG5MLP-AGLu als Reporterplasmid wurde der Vergleichsversuch noch mal durchgeführt. In der rechten Hälfte der Abbildung 11 wird gezeigt,

dass die Repression des adenoviralen Major-Late-Promotors durch die Wildtyp-TRD nur bei den Mutationen D und E zwar nicht stark, aber signifikant reduziert wurde. Zusammengefasst zeigen die Daten aus der Mutationsstudie, dass die stark konservierten Segmente D und E besonders wichtig für die transkriptionelle Repression sind und die weniger konservierten Segment A, C und die stark konservierten Segmente B, F hingegen nicht essentiell darstellen. Da das Segment D außerdem mit dem Kernlokalisierungssignal (NLS) überlappt, ist dieses Segment offensichtlich bifunktionell: es fungiert im Cytoplasma als Kernlokalisierungssignal und im Zellkern als Bindungsstelle für den Co-Repressor mSin3A (Nan *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2000).

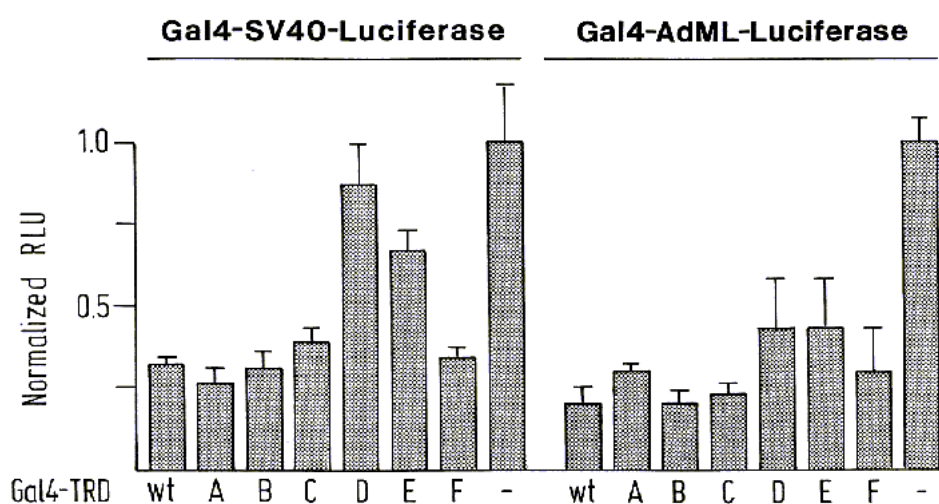


Abbildung 11 Die Mutationsanalyse der Repressor-Aktivität der miniTRD von MeCP2. Das Reporterplasmid pG5AGLu (Gal4-SV40-Luciferase, linke Hälfte) oder pG5MLP-AGLu (Gal4-AdML-Luciferase, rechte Hälfte) wurde allein transfiziert (-) oder mit Expressionsplasmiden für Gal4BD-TRD_{MECP2-Wildtyp} (wt) oder Gal4BD-TRD_{MECP2-Mutanten} (A bis F) in HEK293-Zellen ko-transfiziert. Resultate repräsentieren normalisierte Firefly-Luciferase-Werte aus mindestens vier unabhängigen Experimenten im Triplikat (+/- Standardabweichung).

Im folgenden wurde das Segment D näher untersucht. Es fiel auf, dass es im Segment D ein vom Krallenfrosch bis zum Menschen hoch konserviertes Peptid aus sechs mehrheitlich basischen Aminosäuren PKKRGK (aa 265 – 270) gibt, während das in der vorherigen Mutationsstudie benutzte Peptid (VDYKDDDDK) überwiegend saure Aminosäuren enthielt. Aminosäuren mit sehr polaren Seitenketten befinden sich häufig auf der Protein-Oberfläche und bilden die intermolekularen Kontaktstellen. Vermutlich führte hauptsächlich die Substitution der basischen Aminosäuren durch saure Aminosäuren direkt zu einer gestörten Repressor-Co-Repressor-Interaktion und indirekt zu der beobachteten Derepression in Abbildung 11. Um dieser Hypothese nachzugehen und die wichtigsten Aminosäuren zu identifizieren, untersuchte ich das Segment D mittels drei 2-aa-Mutationen M1 bis M3 und einer 4-aa-Mutation M4, wobei jeweils die ursprünglichen Aminosäuren in saure Aminosäuren mutiert wurden (Abbildung 12A). Der

Austausch entsprechender Nukleotide auf dem Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} wurde unter Benutzung von QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) durchgeführt (2.2.20). Die Repressionsfähigkeit von den vier feineren Mutanten M1 bis M4 wurde in Abbildung 12B mit der vom Wildtyp verglichen. Der Austausch der zentralen basischen KR267/268 gegen saure EE in der Mutante M2 bewirkte eine Abnahme in der Repressionsstärke der Wildtyp-TRD um 23.3%. Der Austausch von insgesamt vier basischen Aminosäuren gegen saure EEEE in der Mutante M4 schwächte die Repressionsstärke der Wildtyp-TRD sogar um 55.3% ab. Mutanten M1 (PK265/266 -> DE) und M3 (GR268/269 -> DE) hingegen reprimierten die SV40-Enhancer/Promotor-Aktivität normal im Vergleich zum Wildtyp. Zusammengefasst heißt es, dass meine Mutationsanalyse den Kern der TRD von MeCP2 in eine 30 Aminosäuren lange Region mit zwei Gruppen basischer Reste (Segmente D und E) eingegrenzt hat. Diese Region zeigt keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen bekannten Repressordomänen (Kadosh *et al.*, 1997; Eilers *et al.*, 1999). Die genauere Mutationsanalyse im Segment D unterstützte die Vermutung, dass drei distinkte basische Aminosäuren (K267, R268 und K271) eine besonders kritische Rolle in der transkriptionellen Repression spielen.

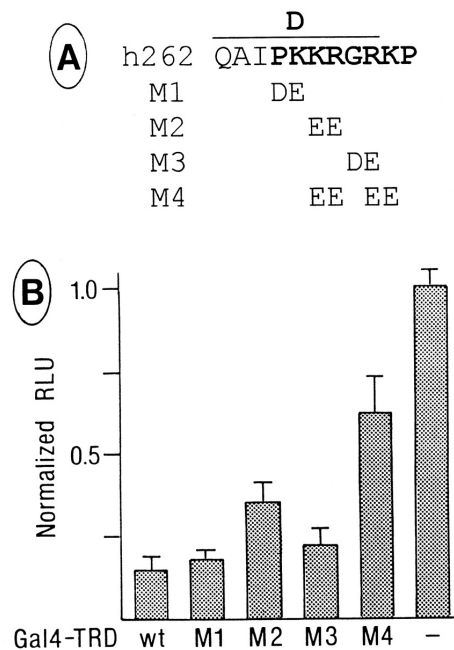


Abbildung 12 Die Mutationsanalyse des Segmentes D aus der TRD von MeCP2. (A) Austausch der konservierten Aminosäuren (fett) im Segment D gegen saure Aminosäuren in Mutanten M1 bis M4. (B) Das Reporterplasmid pG5AGLU wurde allein transfiziert (-) oder mit dem Expressionsplasmid für Gal4BD-TRD_{MeCP2}-Wildtyp (wt) oder Gal4BD-TRD_{MeCP2}-Mutanten (M1 bis M4) in HEK293-Zellen ko-transfiziert. Resultate repräsentieren normalisierte Firefly-Luciferase-Werte von mindestens vier unabhängigen Experimenten im Triplikate (+/- Standardabweichung).

Nachdem sich der TRD-Kern um die Segmente D und E als notwendig für die Repression erwiesen hatte, wollte ich testen, ob er für die Repression auch ausreichend ist. Zuerst wurde die cDNA von dem putativen TRD-Kern (aa 249 – 294) mittels PCR amplifiziert und in die KpnI- und BamHI-Schnittstellen von pcDNA3-Gal4BD eingebaut. Das neue Konstrukt pcDNA3-Gal4BD-DE_{MeCP2} (100 ng) wurde jeweils mit Reporterplasmid pAGLu oder pG5AGLu (1000 ng) in HEK293-Zellen transfiziert. Allerdings ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Firefly-Luciferase-Aktivität zwischen beiden Transfektionsansätzen feststellen, was gegen einen vermuteten Repressor-Effekt von dem Peptid DE (aa 249 – 294) sprach. Alternativ könnte das Ausbleiben vom Repressor-Effekt durch das Fehlen stabilisierender, flankierender Sequenzen zustande gekommen sein, weil das Peptid DE im natürlichen Fall in der Mitte des Proteins MeCP2 vorliegt, während es sich im Fusionsprotein Gal4BD-DE_{MeCP2} am frei beweglichen C-Terminus befindet. Aus dieser Überlegung testete ich anschließend den putativen Repressor-Effekt vom Peptid DE in einem neu konzipiertem Reportersystem. Als Reporter wurde das Plasmid pFR-Luc (Stratagene) benutzt, das mit seinem Minimal-Promotor aus einer TATA-Box bei alleiniger Transfektion *de facto* transkriptionell inaktiv ist (Tabelle 5). Wenn aber das Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-VP16AD (Geschenk von Dr. Thiesen; Thiesen, 2001) ko-transfiziert wurde, konnte die Aktivierungsdomäne von VP16 dank der Kopplung mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne zu Gal4-Bindungsstellen direkt stromaufwärts vor dem Minimal-Promotor rekrutiert werden und die Transkription um vier Größenordnungen drastisch erhöhen (Tabelle 5). Man kann zwischen Gal4BD und VP16AD ein zusätzliches Peptid einschieben, das dann auf diese Weise auf beiden Seiten flankiert ist und hinsichtlich seiner Repressor-Aktivität analysiert werden kann. Deshalb wurde die cDNA von der miniTRD (aa 196 – 310) und von dem Peptid DE (aa 249 – 294) mittels PCR amplifiziert und in die KpnI- und BamHI-Schnittstellen von pcDNA3-Gal4BD-VP16AD eingebaut. Das Reporterplasmid pFR-Luc (1000 ng) wurde zusammen mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-miniTRD_{MeCP2}-VP16AD oder pcDNA3-Gal4BD-DE_{MeCP2}-VP16AD (100 ng) in HEK293-Zellen transient ko-transfiziert. Das Ergebnis ist in Tabelle 5 dargestellt. Wenn die miniTRD von MeCP2 zwischen der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und der VP16-Aktivierungsdomäne eingefügt wurde, erlöschte sich die VP16-stimulierte Transkription fast vollständig. Das 46 Aminosäuren lange Peptid DE konnte in demselben Fusionskontext die VP16-stimulierte Transkription ebenfalls sehr stark reduzieren. Diese Daten weisen darauf hin, dass das Peptid DE unter Einbindung in eine geeignete Proteinumgebung tatsächlich als TRD-Kern ausreichen kann. Dass das Peptid miniTRD in diesem Test die Transkription 10-mal so stark wie das Peptid DE reprimierte, deutet

möglicherweise auf eine optimierte Umgebung von DE innerhalb miniTRD beziehungsweise multiple unabhängige Bindungsstellen für Co-Repressoren innerhalb miniTRD hin.

Fusionsprotein	Normalisierte Firefly-Luciferase-Aktivität (\pm Standardabweichung)	Prozentsatz (\pm Standardabweichung)
keins	75 ± 40	0.0 ± 0.0
Gal4BD-VP16AD	962620 ± 306030	100 ± 31.8
Gal4BD-miniTRD _{MeCP2} -VP16AD	9450 ± 5230	0.9 ± 0.5
Gal4BD-DE _{MeCP2} -VP16AD	145970 ± 72450	15.1 ± 7.5

Tabelle 5 Die Repression der VP16-aktivierten Transkription durch miniTRD und DE aus TRD von hMeCP2. Das Reporterplasmid pFR-Luc (1000 ng) wurde mit Expressionsplasmiden für Fusionsproteine Gal4BD-VP16AD, Gal4BD-miniTRD_{MeCP2}-VP16AD oder Gal4BD-DE_{MeCP2}-VP16AD (100 ng) in HEK293-Zellen ko-transfiziert. Normalisierte relative Luciferase-Aktivität bei der Ko-Transfektion von pFR-Luc und pGal4BD-VP16AD wurde als 100% gesetzt. Die Resultate sind Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten im Triplikat (\pm Standardabweichung).

3.5 Protein-Protein-Interaktionen von MeCP2

Proteine kommen *in vivo* meistens nicht einzeln vor, sondern treten mit anderen Proteinen in Wechselwirkung und bilden zusammen ein komplexes funktionelles Netzwerk in Zellen. Die Identifizierung der Protein-Protein-Interaktionspartner kann dabei helfen, die biologische(n) Funktion(en) und die darunter liegenden molekularen Mechanismen eines Proteins abzuleiten. Bei MeCP2 ist die Bindung an den mSin3A-Co-Repressorkomplex aus sieben Proteinen [mSin3A, HDAC1, HDAC2, RbAp48, RbAp46, SAP30 und SAP18] für seine Repressor-Aktivität wichtig, weil die transkriptionelle Repressordomäne mit der mSin3A-Interaktionsdomäne zum großen Teil überlappt und die transkriptionelle Repression teilweise durch den spezifischen Inhibitor der Histon-Deacetylase, TSA, aufgehoben werden kann (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite zeigen meine Daten in 3.3 die Existenz eines zusätzlichen Histon-Deacetylase-unabhängigen Repressionsweges von MeCP2, was darauf hinweist, dass MeCP2 außer dem mSin3A/HDAC-Komplex noch weitere Protein-Protein-Interaktionspartner haben könnte, zum Beispiel generelle Transkriptionsfaktoren und / oder spezifische transkriptionelle Aktivatoren. Tatsächlich wurden in GST-Pulldownassays CBP, TBP, c-Jun und c-Fos als *in vitro* Interaktionspartner von MeCP2 identifiziert (Thiesen, 2001). Parallel dazu wollte ich mittels Immunpräzipitation die *in vivo* Interaktionspartner von MeCP2 identifizieren. Das Prinzip der Immunpräzipitation besteht darin, dass man mittels eines spezifischen Antikörpers gegen Protein X nicht nur Protein X selbst, sondern auch die *in vivo*

mit Protein X assoziierenden Proteine aus einem komplexen Zellextrakt präzipitieren kann. Die Voraussetzung für die Immunpräzipitation ist demnach die Verfügbarkeit eines geeigneten spezifischen Antikörpers.

Unter den kommerziell verfügbaren Kaninchen-Antikörpern wurden anti-mSin3A (K-20, Santa Cruz), anti-TFIIB (C-18, Santa Cruz), anti-c-Fos (4, Santa Cruz), anti-c-Jun (H-79, Santa Cruz), anti-Oct-1 (C-21, Santa Cruz) und anti-AP2 α (C-18, Santa Cruz) ausgewählt. TFIIB gehört zu den generellen Transkriptionsfaktoren und ist an der Initialisierung der Transkription beteiligt. AP-1 (Heterodimer aus c-Jun und c-Fos), AP-2 (Heterotrimer aus AP2 α , AP2 β und AP2 γ), und Oct-1 zählen zu den spezifischen aktivierenden Transkriptionsfaktoren vom SV40-Enhancer/Promotor. Das Gesamtlysat aus HEK293-Zellen wurde in separaten Ansätzen mit einem der oben genannten Antikörper immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend einer Western-Blot-Analyse mit polyklonalem Hühner-Antikörper gegen hMeCP2 unterzogen (Box 2, Geschenk von Koch). Das Ergebnis wird in Abbildung 13 gezeigt. Das Anti-mSin3A-Präzipitat zeigte ein schwach-positives Signal auf der Höhe von hMeCP2. Dieses Resultat bestätigte einerseits die *in vivo* Interaktion zwischen MeCP2 und mSin3A (Nan *et al.*, 1998), andererseits war es auch konsistent mit der frühen Beobachtung aus GST-Pulldownassays, dass die Bindung zwischen MeCP2 und mSin3A nicht besonders hoch effizient war (Yu *et al.*, 2000; Thiesen, 2001). Das Anti-TFIIB-Präzipitat zeigte ebenfalls ein schwach-positives Signal und unterstützt das Modell, dass MeCP2 über Kontakt mit der generellen Transkriptionsmaschinerie die Initialisierung der Transkription hemmt (Kaludov und Wollfe, 2000). Das Anti-c-Jun-Präzipitat zeigte ein stark positives Signal von hMeCP2, diese Beobachtung weist auf eine Wechselwirkung zwischen MeCP2 und AP-1 (Heterodimer von c-Jun und c-Fos) hin. Dass das Anti-c-Fos-Präzipitat hingegen ein negatives Signal für hMeCP2 zeigte, könnte an der Natur des Antikörpers gegen c-Fos liegen, zum Beispiel er könnte mit MeCP2 um dieselbe Bindungsstelle auf c-Fos konkurrieren. In den anderen beiden Immunpräzipitaten (anti-Oct-1 und anti-AP2 α) war das hMeCP2-Signal ebenfalls negativ. Ein reziproker Immunpräzipitationsversuch mit Antikörper gegen hMeCP2 wurde nicht erfolgreich durchgeführt, weil sich die eingesetzten Hühner-Antikörper (Box 2) als nicht geeignet für die Immunpräzipitation erwiesen. Zusammengefasst weisen meine vorläufigen Daten darauf hin, dass TFIIB und c-Jun (AP-1) neue *in vivo* Interaktionspartner von MeCP2 sein könnten. Diese beiden potentiellen Protein-Protein-Interaktionen könnten eine wichtige Rolle in der Histon-Deacetylase-unabhängigen, transkriptionellen Repression von MeCP2 spielen.

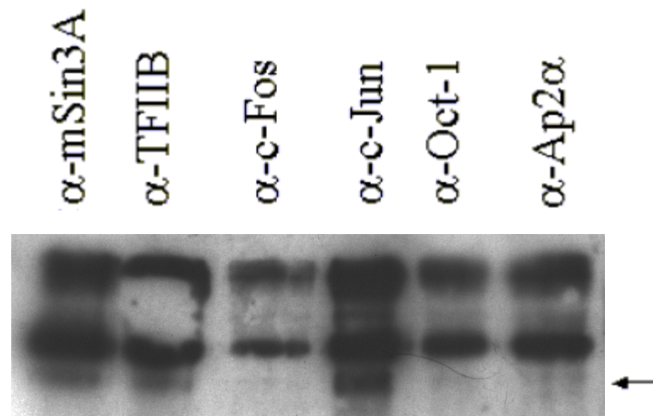


Abbildung 13 Identifizierung der Protein-Protein-Interaktionspartner von MeCP2 mittels Immunpräzipitation. Mit dem Gesamtlysate aus HEK293-Zellen wurde Immunpräzipitation mit angezeigten Antikörpern durchgeführt. Die Detektion von hMeCP2 in Immunpräzipitaten erfolgte mit primärem polyklonalem Hühner-Antikörper gegen MeCP2 (Box 2, Geschenk von Koch) und sekundärem HRP-konjugiertem Antikörper gegen Hühner IgY (Dianova). Der Pfeil zeigt die Höhe von hMeCP2 bei circa 80 kDa. Nur im Immunpräzipitat mit Antikörper gegen mSin3A, TFIIB oder c-Jun war hMeCP2-Signal zu detektieren. Die zwei höher liegenden Banden, die in allen sechs Immunpräzipitaten vorkamen, waren hingegen Artefakte.

Eine alternative Möglichkeit, *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen zu verifizieren, ist der Zwei-Hybrid-Versuch (Fields und Song, 1989). Dabei überexprimiert man ein erstes Fusionsprotein aus Gal4BD und Protein X sowie ein zweites Fusionsprotein aus VP16AD und Protein Y zusammen in Zellen. Kommt es zu einer *in vivo* Interaktion zwischen Protein X und Protein Y, wird ein artifizieller Transkriptionsfaktor Gal4BD-X••Y-VP16AD rekonstruiert, der dann die Expression eines Reportergens auf einem ko-transfizierten Indikatorplasmid stimuliert.

Ich überprüfte die Interaktion zwischen MeCP2 und c-Jun unter Gebrauch von einigen Komponenten aus Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit (Clontech). Zur Expression des ersten Fusionsproteins Gal4BD-TRD_{MeCP2} verwendete ich das Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} (3.3), weil die TRD von MeCP2 (aa 190 – 486) mit c-Jun in GST-Pulldownassays stark interagiert (Thiesen, 2001). Zur Expression des zweiten Fusionsproteins VP16AD-c-Jun konstruierte ich ein neues Expressionsplasmid pVP16-c-Jun, indem ich die vollständige cDNA von c-Jun (Geschenk von Dr. Angel) per PCR amplifizierte und in die EcoRI- und BamHI-Schnittstellen von pVP16 (Clontech) einbaute. Da dieses Expressionskonstrukt pVP16-c-Jun leider keine in Western-Blot detektierbare Expression des Fusionsproteins schaffte, wurde das Fusionsprotein VP16AD-c-Jun kodierende BgIII-BamHI-Fragment aus pVP16-c-Jun herausgeschnitten und in die BamHI-Schnittstelle von pcDNA1.1/Amp (Invitrogen) eingebaut. Das neue Konstrukt pcDNA1.1/Amp-VP16-c-Jun

bewirkte eine starke Expression des Fusionsproteins. Drittens benutzte ich pFR-Luc (Stratagene) als Indikatorplasmid. Wenn alle drei Plasmide pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2}, pcDNA1.1/Amp-VP16-c-Jun und pFR-Luc in HEK293-Zellen transient ko-transfiziert wurden, ergab sich überraschenderweise eine Firefly-Luciferase-Aktivität, die sich kaum von der Firefly-Luciferase-Aktivität bei der Ko-Transfektion von nur pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} und pFR-Luc unterschied (Tabelle 6, Zeilen 6 und 7). Die Verwendung einer anderen Zelllinie, Huh7-Zellen, brachte ebenfalls keine erwartete Aktivierung der Firefly-Luciferase-Expression, sondern eher eine Abschwächung (Tabelle 6, Zeilen 8 und 9). Bei einer vorhergesagten Interaktion zwischen MeCP2 und c-Jun hätte man aber eine mindestens 10-fach höhere Firefly-Luciferase-Expression erwartet. Das Ausbleiben einer solchen höheren Reporter-Expression lag nicht an einer ausgebliebenen Expression beider Fusionsproteine, weil die Expression beider Peptide jeweils mit Antikörper gegen Gal4BD (Clontech) beziehungsweise gegen VP16AD (Santa Cruz) in Western-Blots nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Wenn aber die Expressionsplasmide pM-53 (zur Expression des Fusionsproteins aus Gal4BD und p53, Clontech), pVP16-T (zur Expression des Fusionsproteins aus VP16AD und dem großen T-Antigen, Clontech) und pFR-Luc in HEK293-Zellen transient ko-transfiziert wurden, ergab sich eine deutlich höhere Firefly-Luciferase-Aktivität als die bei der Ko-Transfektion von nur pM-53 und pFR-Luc sowohl in HEK293-Zellen, als auch in Huh7-Zellen (Tabelle 6, Zeilen 2 bis 5). Da dieses positive Ergebnis die bekannte Interaktion zwischen p53 und dem großen T-Antigen reproduzierte, zeigte es, dass mein Testsystem im Prinzip korrekt aufgebaut war.

Es gab zwei Möglichkeiten, das negative Ergebnis aus meinem Zwei-Hybrid-Versuch von oben zu interpretieren. Die erste Möglichkeit war, dass es keine *in vivo* Interaktion zwischen MeCP2 und c-Jun gibt, obwohl Ergebnisse aus GST-Pulldownassay und Immunpräzipitation dagegen sprechen. Die zweite Möglichkeit war, dass der reprimierende Einfluss von TRD_{MeCP2} den stimulierenden Einfluss des rekonstruierten Aktivators Gal4BD-TRD_{MeCP2}••c-Jun-VP16AD überstieg. Wenn TRD_{MeCP2} beispielsweise zwischen Gal4BD und VP16AD eingefügt wurde, erniedrigte sich die VP16AD-stimulierende Transkription um mehr als 100-fach (Tabelle 5). Dass kein einziger Interaktionspartner von MeCP2 bisher in der Fachliteratur mittels der gebräuchlichen Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung aufgefunden wurde, unterstützt ebenfalls die zuletzt genannte Möglichkeit.

Zelllinie	Expressionsplasmid 1	Expressionsplasmid 2	Firefly-Luciferase-Aktivität (\pm Standardabweichung)	Relative Stimulierung (%)
HEK293	pM-53	Kein	1675 \pm 838	100%
HEK293	pM-53	pVP16-T	33032 \pm 2016	1972%
Huh7	pM-53	Kein	324 \pm 35	100%
Huh7	pM-53	pVP16-T	49975 \pm 20101	15424%
HEK293	pcDNA3-Gal4BD-TRD _{MeCP2}	Kein	490 \pm 98	100%
HEK293	pcDNA3-Gal4BD-TRD _{MeCP2}	pcDNA1.1/Amp-VP16-c-Jun	506 \pm 119	103%
Huh7	pcDNA3-Gal4BD-TRD _{MeCP2}	Kein	1472 \pm 664	100%
Huh7	pcDNA3-Gal4BD-TRD _{MeCP2}	pcDNA1.1/Amp-VP16-c-Jun	407 \pm 90	28%

Tabelle 6 Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion mit Zwei-Hybrid-Versuchen in Säugerzellen. 1000 ng Reporterplasmid pFR-Luc (Stratagene) wurde mit 100 ng angegebenen Expressionsplasmiden in HEK293-Zellen oder Huh7-Zellen transient ko-transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen lysiert. Die Firefly-Luciferase-Aktivität in Lysaten wurde gemessen. Die jeweiligen Firefly-Luciferase-Aktivitäten in der Abwesenheit des Expressionsplasmides 2 wurden als 100% gesetzt. Die Resultate sind durchschnittliche Firefly-Luciferase-Werte aus drei unabhängigen Versuchsreihen (\pm Standardabweichung).

3.6 Repression der L1-Promotoren durch TRD_{MeCP2} und TRD_{MBD1}

Dass MeCP2 ein transkriptioneller Repressor ist, wurde durch die Daten aus verschiedenen Labors gut untermauert (Nan *et al.*, 1997; Nan *et al.*, 1998; Kaludov und Wolffe, 2000; Yu *et al.*, 2000). Aber es ist bis jetzt absolut unbekannt, welche endogenen Gen-Expressionen tatsächlich durch MeCP2 negativ reguliert werden. Ein Hinweis auf die mögliche Antwort liefert die Verteilung der 5'-Methylcytosine im menschlichen Genom: mehr als 90% davon liegen in Retrotransposons, nur ein kleiner Prozentsatz liegt in Satelliten-Sequenzen und schließlich eine geringe Minderheit ist verteilt in Exons und regulatorischen Sequenzen. Somit ist es wahrscheinlich, dass das abundante Kernprotein MeCP2 hauptsächlich ein Repressor der zahlreichen Retrotransposons ist und nur in seltenen Fällen, zum Beispiel Krebs, die Expression der wirtseigenen Gene negativ reguliert. In der folgenden Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht, ob LINE-1 und Alu, die zwei einzigen noch aktiven Nicht-LTR-Retrotransposons, Repressionsziele von MeCP2 sein könnten.

LINE-1(L1) machen mit ungefähr 516,000 Kopien 16.9% des menschlichen Genoms aus. Sie enthalten einen internen PolIII-Promotor und zwei lange offene Leseraster. Die überwiegende Mehrheit der L1s ist defekt in der Retrotransposition, weil sie am 5'-Ende gekürzt, intern umgeordnet oder mutiert sind (Kazazian *et al.*, 1998). Nur eine Untergruppe von circa 60 vollständigen L1s bleiben retrotransposition-kompetent (Sassaman *et al.*, 1997; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Beweise für die Aktivität dieser Untergruppe werden durch vierzehn bekannte Fälle von menschlichen Krankheiten, die durch neue L1-Retrotranspositionen verursacht wurden, dokumentiert. Der Vorgang Retrotransposition beinhaltet die Entstehung eines vollständigen Transkriptes, Translation der beiden offenen Leseraster, reverse Transkription und Insertion in neue genomische Loci (Boeke 1997). Der interne 5'-PolIII-Promotor enthält eine CpG-Insel, die sehr stark methyliert ist (Woodcock *et al.*, 1997). Die Methylierung beinhaltet sowohl symmetrische und nicht-symmetrische Methylierungen in CpG-Dinucleotiden, als auch Methylierungen an Nicht-CpG-Stellen. Man glaubt, dass die Hypermethylierung der L1-Promotor-Region einen wesentlichen Abwehrmechanismus gegen diese genomischen Parasiten darstellt (Woodcock *et al.*, 1997; Yoder *et al.*, 1997).

Die durch die DNA-Methylierung verursachte transkriptionelle Repression wird dem Modell zufolge hauptsächlich durch die Bindung der MBD-Proteine, die Rekrutierung der Histon-Deacetylasen und die Erzeugung einer transkriptionell inaktiven Chromatinstruktur verursacht (Hendrich und Bird 1998; Bird und Wolffe 1999). Neben MeCP2, dem ersten klonierten Mitglied der MBD-Familie, sind zwei weitere Mitglieder, MBD1 und MBD2, bekannt für ihre Eigenschaft als Methyl-CpG bindende Repressoren und werden daher auch in meiner Retrotransposonsstudie analysiert.

MBD1, das größte Mitglied der MBD-Familie, wird entweder als 605 Aminosäuren lange Isoform (MBD1v1) exprimiert, oder als eine der mehreren kürzeren Isoformen (MBD1v2, MBD1v3, MBD1v4 und PCM1) durch alternative Spleiß-Vorgänge exprimiert (Cross *et al.*, 1997; Hendrich und Bird, 1998; Fujita *et al.*, 2000). Alle Isoformen verfügen über eine MBD im N-Terminus sowie eine TRD im C-Terminus und sie unterscheiden sich durch die Anzahl der zentral liegenden CxxC-Motive und die kurzen Verbindungsregionen. Die physiologische Rolle dieser Varianten ist weitgehend unbekannt. MBD1 lokalisiert sich hauptsächlich in stark methylierten Satelliten 2 und 3 in pericentromerischem Heterochromatin auf Chromosomen 1, 9, 15 und 16 (Ng *et al.*, 2000).

MBD2 kommt durch alternativen Gebrauch des Start-Codons in zwei Isoformen vor: MBD2a und MBD2b (Hendrich und Bird, 1998). MBD2 ist eine integrale Komponente des Komplexes MeCP1, das unter anderem mSin3A, HDAC1, HDAC2, RbAp46 und RbAp48 enthält (Ng *et al.*, 1999). MBD2 kann außerdem mit MBD3 heterodimerisieren und den Nucleosom-Remodelling-Komplex NuRD rekrutieren (Zhang *et al.*, 1999; Tatematsu *et al.*, 2000). Die MBD von dem kürzeren MBD2b liegt am N-Terminus und überlappt partiell mit der TRD (Boeke *et al.*, 2000).

Für meine Untersuchung der möglichen Repression des L1-Promotors durch TRD von MBD-Proteinen wurden zuerst Reporterplasmide konstruiert. Die Promotor-Region von dem Element L1.3 (nt 1 – 909) (Geschenk von Dr. Schumann) wurde mittels PCR-amplifiziert und in die HindIII-Stelle von pGL3-Basic (Promega, Geschenk von Dr. Fang) eingebaut. Das daraus resultierte Reporterplasmid pGL3-L1.3 exprimiert Firefly-Luciferase unter Gebrauch des internen L1.3-Promotors. Weiter durch den Einbau des BamHI-Fragmentes von pFR-Luc in die BglII-Stelle wurde pGL3-L1.3 zu pG5GL3-L1.3 umgewandelt, das stromaufwärts vor dem L1.3-Promotor zusätzlich fünf Kopien der Gal4-Bindungsstelle enthielt (Abbildung 14A). Auf dieselbe Weise wurden zwei weitere Reporterplasmide mit der Promotor-Region von dem Element L1_{RP} (nt 1 – 905) (Geschenk von Dr. Schumann) konstruiert: pGL3-L1_{RP} und pG5GL3-L1_{RP}. Die beiden L1-Elemente L1.3 und L1_{RP} können unter Laborbedingung in kultivierten HeLa-Zellen aktiv retrotransponieren (Moran *et al.*, 1999; Kimberland *et al.*, 1999). Die Integration eines retrotransponierten L1_{RP}-Elementes in ein Intron des Gene *RP2* verursachte bei einem Patienten die Augenkrankheit Retinitis pigmentosa Typ 2 (Schwahn *et al.*, 1998).

Danach wurden die Expressionsplasmide für die TRDs von MBD1 und MBD2 konstruiert. Da die entsprechenden cDNAs nicht zur Verfügung standen, wurden sie von mir selbst kloniert. Die Gesamt-RNA aus HEK293-Zellen wurde mit High Pure RNA Isolation Kit (Roche) isoliert und als Ausgangsmaterial für RT-PCR verwendet. Das Design der Primersequenz basierte auf die publizierten Nukleotidsequenzen von MBD1 (aa 383 – 605, TRD befindet sich zwischen aa 506 und 538, Ng *et al.*, 2000) und MBD2b (aa 45 – 262, TRD befindet sich zwischen aa 45 und 82, Boeke *et al.*, 2000) in der öffentlichen Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>). Die gewonnenen cDNA-PCR-Fragmente wurden zuerst in pGEM-T-Easy (Promega) als Zwischenstufe kloniert und nach der Verifizierung der Sequenzen in die KpnI- und BamHI-Stellen von pcDNA3-Gal4BD umklont. Die beiden neuen Plasmide pcDNA3-Gal4BD-hMBD1v1(aa 383 – 605) und pcDNA3-Gal4BD-hMBD2b(aa 45 – 262) exprimieren jeweils Fusionsproteine aus Gal4BD und TRD enthaltenden C-Termini von MBD1 und MBD2.

Um die Wirkung von MeCP2 auf die L1-Transkription zu untersuchen, transfizierte ich das Reporterplasmid pGL3-L1.3 oder pG5GL3-L1.3 zusammen mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} in HEK293-Zellen. Das Western-Blot mit dem monoklonalen Antikörper gegen Gal4BD (Clontech) bewies eine effiziente Expression des Fusionsproteins Gal4BD-TRD_{MeCP2} (Abbildung 14B). Die Transkription vom L1.3-Promotor ist 1.5-fach so effektiv wie die vom SV40-Promotor (Daten nicht gezeigt). Nach der Einfügung der Gal4-Bindungssequenzen stromaufwärts vor dem L1.3-Promotor reduzierte sich die Firefly-Luciferase-Expression, je nach der verwendeten Menge des Effektorplasmides pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2}, signifikanterweise um 63 – 72% (Abbildung 14C). Identische Resultate wurden auch in HeLa-Zellen erzielt. In Anwesenheit von Trichostatin A (TSA), einem spezifischem Histon-Deacetylase-Inhibitor, betrug die TRD_{MeCP2}-vermittelte Repression 57%, was auf eine transkriptionelle Repression unabhängig von Histon-Deacetylase-Aktivität hindeutet (Abbildung 14D). Ich untersuchte auch die Reprimierbarkeit der Promotor-Region eines anderen L1-Elementes, L1_{RP}, das aus einem Patienten mit X-linked Retinitis pigmentosa 2 isoliert wurde (Kimerland *et al.*, 1999; Schwahn *et al.*, 1998). Der L1_{RP}-Promotor ist 2.1-fach so effektiv wie der SV40-Promotor und wurde in Anwesenheit der Gal4-Bindungsstellen stromaufwärts vor dem Promotor durch das Fusionsprotein Gal4BD-TRD_{MeCP2} um 69% reprimiert, fast genauso effizient wie der L1.3-Promotor (Abbildung 14C). Identische Resultate wurden auch mit dem L1_{RP}-Promotor in HeLa-Zellen erzielt.

Neben MeCP2 sind MBD1 und MBD2 weitere potentielle transkriptionelle Repressoren des L1-Promotors, obwohl ihre TRDs keine offensichtliche Ähnlichkeit zu der von MeCP2 vorweisen. Ich untersuchte daher, ob die TRDs von MBD1 und MBD2 die L1-Expression beeinflussen könnten. Unter derselben Versuchsbedingung reprimierte das Fusionsprotein Gal4BD-TRD_{MBD1} die L1.3-Promotor-Aktivität um 70%, während das Fusionsprotein Gal4BD-TRD_{MBD2} keine signifikante Repression vorzeigte (Abbildung 14E). Diese Daten weisen darauf hin, dass nur die TRDs von MeCP2 und MBD1, nicht aber die von MBD2, die Transkription vom L1-Promotor spezifisch reprimieren können.

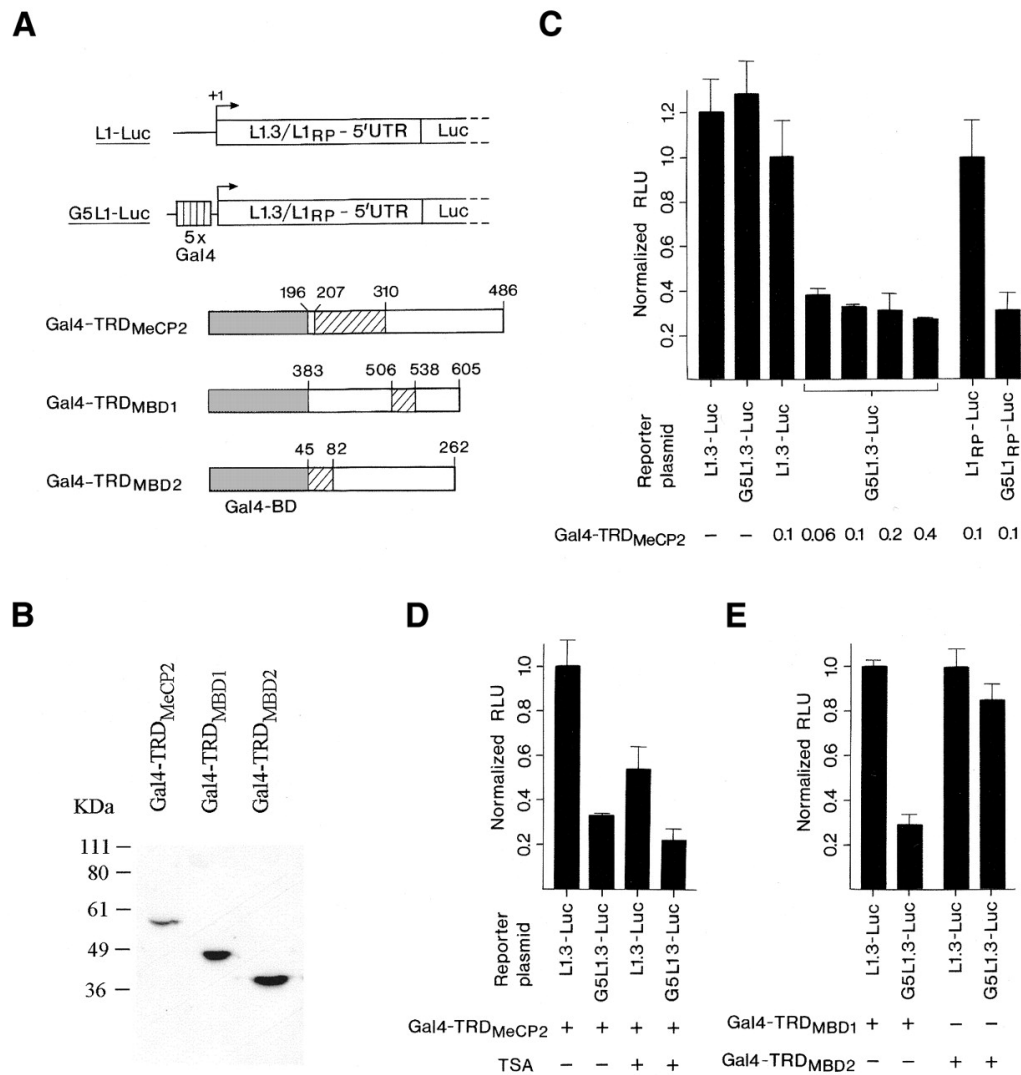


Abbildung 14 Die TRDs von MeCP2 und MBD1 reprimieren die L1-Transkription. (A) Schematische Karten der Reporterkonstrukte L1.3/L1_{RP}-Luc und G5L1.3/L1_{RP}-Luc sowie der Expressionskonstrukte für Gal4BD-TRD_{MeCP2}, Gal4BD-TRD_{MBD1} und Gal4BD-TRD_{MBD2}. Die TRDs der MBD-Peptide sind als mit Schrägstrichen gefüllte Rechtecke gekennzeichnet. (B) Western-Blot-Analyse der Gesamtlisate aus mit pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2}, pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MBD1} oder pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MBD2} transfizierten HEK293-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper gegen Gal4BD (Clontech). Die Fusionsproteine zeigten ein apparentes Molekulargewicht von jeweils 57, 46 und 42 kDa. (C) HEK293-Zellen wurden mit 1000 ng Reporterkonstrukt L1.3-Luc, G5L1.3-Luc, L1_{RP}-Luc oder G5L1_{RP}-Luc allein (-) oder zusammen mit der dargestellten Menge (60 – 400 ng) an Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} ko-transfiziert. Relative normalisierte Firefly-Luciferase-Aktivität (RLU) vom Reporterkonstrukt L1.3-Luc allein wurde als 1.0 gesetzt. Das Histogramm zeigt die Durchschnittswerte der relativen normalisierten Firefly-Luciferasewerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (+/- Standardabweichung). (D) HEK293-Zellen wurden mit 1000 ng Reporterplasmid L1.3-Luc oder G5L1.3-Luc zusammen mit 100 ng pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2} ko-transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit oder ohne TSA (100 ng / ml) 24 h lang inkubiert. (E) HEK293-Zellen wurden mit 1000 ng Reporterplasmid L1.3-Luc oder G5L1.3-Luc zusammen mit 100 ng pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MBD1} oder pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MBD2} ko-transfiziert.

3.7 Repression des methylierten L1-Promotors durch MeCP2

Mehrere Beobachtungen weisen auf eine Schlüsselrolle der DNA-Methylierung bei der Ausschaltung von L1-Elementen hin (Woodcock *et al.*, 1997; Thayer *et al.*, 1993). Nachdem die Reprimierbarkeit der L1-Promotoren durch die TRDs von MeCP2 und MBD1 in Versuchen mit Fusionsproteinen gezeigt werden konnte, musste geklärt werden, ob MeCP2 und MBD1 über ihre eigenen MBDs an methylierte LINEs binden und ihre Repressor-Aktivitäten dort entfalten könnten. Allerdings war eine exakte Reproduktion des Methylierungsmusters in der L1-Promotor-Region (insbesondere Hemi-Methylierung und Nicht-CpG-Methylierung) auf einem Reporterplasmid noch nicht möglich. Auf der anderen Seite korreliert der Methylierungsstatus in Positionen nt 36 und 304 in der L1-Promotor-Region umgekehrt mit der L1-Expression in kultivierten Zellen, so dass die von mir in der folgenden Arbeit gewählte *in vitro* Methylierung des Reporterplasmides mit der M.HpaII-Methyltransferase (MBI Fermentas), die den L1.3-Promotor in vier Positionen (nt 36, 101, 304, 481) methyliert, eine akzeptable funktionelle Annäherung zu dem *in vivo* Zustand darstellt (Thayer *et al.*, 1993; Abbildung 15A).

Ich untersuchte zuerst mittels transienter Transfektion die Wirkung von ko-exprimierter FLAG-epitopierter MeCP2 auf die Transkription vom L1.3-Promotor auf dem Reporterkonstrukt pGL3-L1.3, das mit M.HpaII-Methyltransferase *in vitro* vollständig methyliert war. Das Ergebnis wird in Abbildung 15B gezeigt. Die Methylierung vom Reporterplasmid pGL3-L1.3 ohne exogene überexprimierte MeCP2 führte zu einer schwachen Reduktion der Expression, wahrscheinlich durch endogene MeCP2 und andere ähnliche zelluläre Faktoren. Darüber hinaus reduzierte exogene überexprimierte MeCP2 die Transkription von nicht-methyliertem Reporterkonstrukt pGL3-L1.3 im geringen Maße, vermutlich aufgrund der zuvor berichteten Affinität von MeCP2 zu nicht-methylierter DNA (Weitzel *et al.*, 1997). Jedoch wurde die Transkription vom methylierten L1.3-Promotor durch exogene überexprimierte MeCP2 sehr stark (circa 5-fach) reduziert. Ich schlussfolgerte, dass MeCP2 *in vivo* an methyliertem L1-Promotor binden und dessen Transkription negativ regulieren kann.

Im analogen Versuch mit MBD1 wurde die MBD1-Spleißvariante 3 (MBD1v3) gewählt, weil es MBD1v3 das dritte CxxC-Motiv und die damit verbundene Eigenschaft fehlt, unspezifisch an nicht-methylierte DNA zu binden (Fujita *et al.*, 2000). Die Einschnitt-Isolierung der cDNA von MBD1v3 (1650 bp) mittels RT-PCR war jedoch gescheitert, vermutlich überstieg die Länge der herzustellenden cDNA die Prozessivität der verwendeten reversen Transkriptase in Titan One

Tube RT-PCR System (Roche). Daraufhin wurden zuerst zwei kleinere Fragmente der cDNA von MBD1v3 mittels RT-PCR generiert, die sich dann mittels Überlappungs-PCR zu der kompletten cDNA von MBD1v3 vervollständigen ließen. Die cDNA von MBD1v3 wurde in einem PCR-Ansatz mit FLAG-Epitop kodierendem langem Primer am 5'-Ende verlängert und in das Expressionsplasmid pcDNA1.1/Amp kloniert. Wenn HEK293-Zellen mit nicht-methyliertem oder M.HpaII-methyliertem Reporterplasmid pGL3-L1.3 und dem neuen Expressionskonstrukt pcDNA1.1/Amp-FLAG-MBD1v3 ko-transfiziert wurden, ergab sich anders als bei MeCP2 gar kein signifikanter Unterschied in der Firefly-Luciferase-Aktivität zwischen beiden Ansätzen, obwohl MBD1v3 genügend überexprimiert war (Abbildung 15B/C). Dies weist darauf hin, dass die MBD von MBD1v3 nicht an M.HpaII-methylierten L1.3-Promotor binden kann, weil die TRD von MBD1v3 nach der erfolgreichen Bindung in der Nähe des L1.3-Promotors die L1.3-Transkription hemmen kann (3.6).

MBD2b besitzt alle drei bisher bekannten funktionellen Domänen von MBD2: MBD, TRD und Dimerisierungsdomäne. MBD2a besitzt am N-Terminus ein zusätzliches Glycin/Arginin-reiches 152-aa-Segment, das vermutlich auf Trinukleotidamplifikation zurückgeht und eine Klonierung mittels RT-PCR erschweren könnte. Im analogen Versuch mit MBD2 wurde deshalb die kürzere Variante MBD2b gewählt. Die cDNA von MBD2b wurde ebenfalls in einem PCR-Ansatz mit FLAG-Epitop kodierendem langem Primer am 5'-Ende verlängert und in Expressionsplasmid pcDNA1.1/Amp kloniert. Wenn HEK293-Zellen mit nicht-methyliertem oder M.HpaII-methyliertem Reporterplasmid pGL3-L1.3 und dem neuen Expressionskonstrukt pcDNA1.1/Amp-FLAG-MBD2b ko-transfiziert wurden, ergab sich genauso wie bei MBD1v3 kein signifikanter Unterschied in der Firefly-Luciferase-Aktivität zwischen beiden Ansätzen, obwohl MBD2b genügend überexprimiert war (Abbildung 15B/C). Dass MBD2b die Transkription vom M.HpaII-methylierten L1.3-Promotor nicht hemmte, war konsistent mit der früheren Beobachtung, dass die TRD von MBD2 auch nach der Bindung in der Nähe des L1.3-Promotors dessen Transkription nicht reprimierte (3.6). Ob die MBD von MBD2b *in vivo* an M.HpaII-methylierten L1.3-Promotor bindet, konnte nicht aus diesen Versuchsdaten abgeleitet werden.

Zusammengefasst ergibt sich, dass MBD1v3 die Transkription vom L1.3-Promotor nach der M.HpaII-Methylierung nicht hemmen konnte, obwohl die TRD von MBD1 die Transkription vom L1.3-Promotor nach einer Gal4BD-vermittelten DNA-Bindung reprimieren konnte. MBD2b konnte unter beiden Versuchsbedingungen die Aktivität vom L1.3-Promotor nicht inhibieren. Ich schlussfolgerte, dass nur MeCP2 die Transkription von einem M.HpaII-

methyliertem L1-Promotor reprimieren kann und hinsichtlich dieser biologischen Funktion durch seine Homologen MBD1 und MBD2 nicht ersetzbar ist.

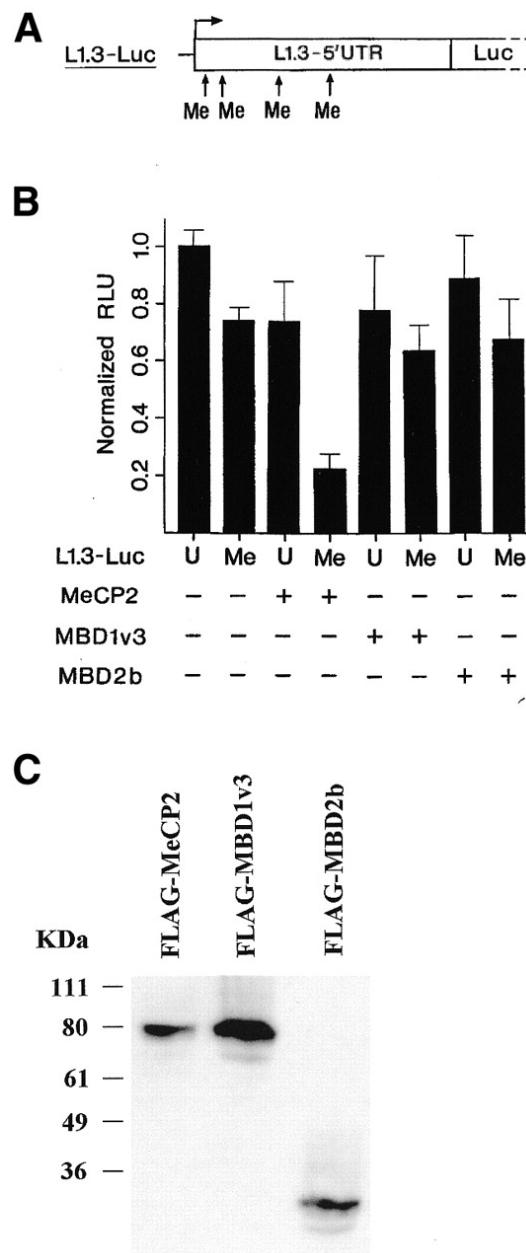


Abbildung 15 MeCP2 reprimiert die Transkription von methyliertem L1-Promotor. (A) Schematische Darstellung der Stellen (nt 36, 101, 304, und 481) im L1.3-Promotor, die durch M.HpaII-Methyltransferase methyliert sind. (B) HEK293-Zellen wurden transfiziert mit nicht-methyliertem (U) oder vollständig M.HpaII-methyliertem (Me) Reporterplasmid pGL3-L1.3 allein oder zusätzlich mit Expressionsplasmid pcDNA1.1/Amp-FLAG-MeCP2, pcDNA1.1/Amp-FLAG-MBD1v3 oder pcDNA1.1/Amp-FLAG-MBD2b. Relative Luciferaseaktivität von nicht-methyliertem Reporter ohne Expressionsplasmid für Fusionsproteine wurde als 1.0 gesetzt. Das Histogramm zeigt die relativen normalisierten Firefly-Luciferasewerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen (+/- Standardabweichung). (C) Die Expression von FLAG-epitopiertem hMeCP2, hMBD1v3 und hMBD2b in transfizierten HEK293-Zellen wurde in Western-Blot mit dem monoklonalen Antikörper gegen FLAG M2 (Sigma) verifiziert. Die

FLAG-Fusionsproteine zeigen ein apparentes Molekulargewicht von jeweils 81, 81 und 29 kDa. Dieses Ergebnis schloß aus, dass MBD1v3 und MBD2b aufgrund geringer Expression keinen Repressionseffekt zeigten.

3.8 Expressionsanalyse von MeCP2 und L1

Meine Studie mit transienter Transfektion in 3.6 und 3.7 belegte, dass MeCP2 als das einzige Mitglied der MBD-Familie das Potential hat, die exogene L1-Expression in Zellen zu reprimieren. Eine neue Fragestellung an dieser Studie war logischerweise, ob die endogene L1-Expression ebenfalls der negativen Regulation von MeCP2 unterliegen könnte. Deshalb untersuchte ich, ob es eine inverse Korrelation zwischen der L1- und der MeCP2-Expression in verschiedenen Zelllinien gibt. Die Detektion der L1-Expression kann auf der RNA-Ebene geschehen, zum Beispiel Northern-Blot und quantitative RT-PCR (Woodcock *et al.*, 1997). Ein großer Nachteil dieser Wege ist die geringe Spezifität, weil L1-Fragmente auch als Bestandteile von Introns, 5'- oder 3'-nicht-translatierte Regionen anderer Gene passiv transkribiert werden können. Deshalb entschied ich mich für die Detektion der von L1-ORF1 kodierten p40 mit einem spezifischen Antikörper auf der Proteinebene (Thayer *et al.*, 1993). Das RNA-bindende Protein p40 kann nur synthetisiert werden, wenn Promotor und ORF1 (beide liegen im 5'-Teil des L1-Elementes) beide funktionell intakt sind. Die meisten im menschlichen Genom vorliegenden L1-Elemente sind jedoch am 5'-Ende gekürzte Bruchstücke und werden somit in diesem Proteinassay nicht unspezifisch erfasst. In der folgenden Arbeit wurde deshalb die experimentell ermittelte p40-Expression der *in vivo* L1-Expression gleich gesetzt.

Lysate aus sieben menschlichen Zelllinien (HEK293, HeLa, H1299, NT2, MCF-7, PA-1 und JEG-3) und einer Maus-Zelllinie (NIH3T3) wurden präpariert und in Western-Blot mit Antikörper gegen p40 (Geschenk von Dr. Schumann), MeCP2 (Upstate Biotechnology) und mSin3A (Santa Cruz) analysiert. Das Ergebnis wird in Abbildung 16 gezeigt. Jede Gel-Spur entsprach dem Lysat aus 2×10^5 Zellen. Die Signale von mSin3A waren sehr stark und zeigten vergleichbare Intensitäten bei allen acht untersuchten Proben. Dieses Ergebnis war konsistent mit der allgemeinen Vorstellung, dass mSin3A als Co-Repressor von verschiedenen Repressoren rekrutiert werden kann und somit für alle Zellen ein essentielles Haushaltsprotein darstellt. Das Expressionsmuster von p40 und MeCP2 war jedoch sehr heterogen bei den untersuchten acht Zelllinien. NT2 und JEG-3 exprimieren p40, aber kein oder kaum MeCP2. HeLa und H1299 exprimieren kein p40, aber MeCP2. MCF-7, HEK293 und PA-1 exprimieren sowohl p40, als auch MeCP2. NIH3T3 exprimiert MeCP2. Ob NIH3T3 p40 exprimiert, ist noch unbekannt, weil

p40 von Maus nicht auf der Gesamtlänge homolog zu p40 von Mensch ist und möglicherweise nicht an den verwendeten Antikörper binden kann (Furano, 2000).

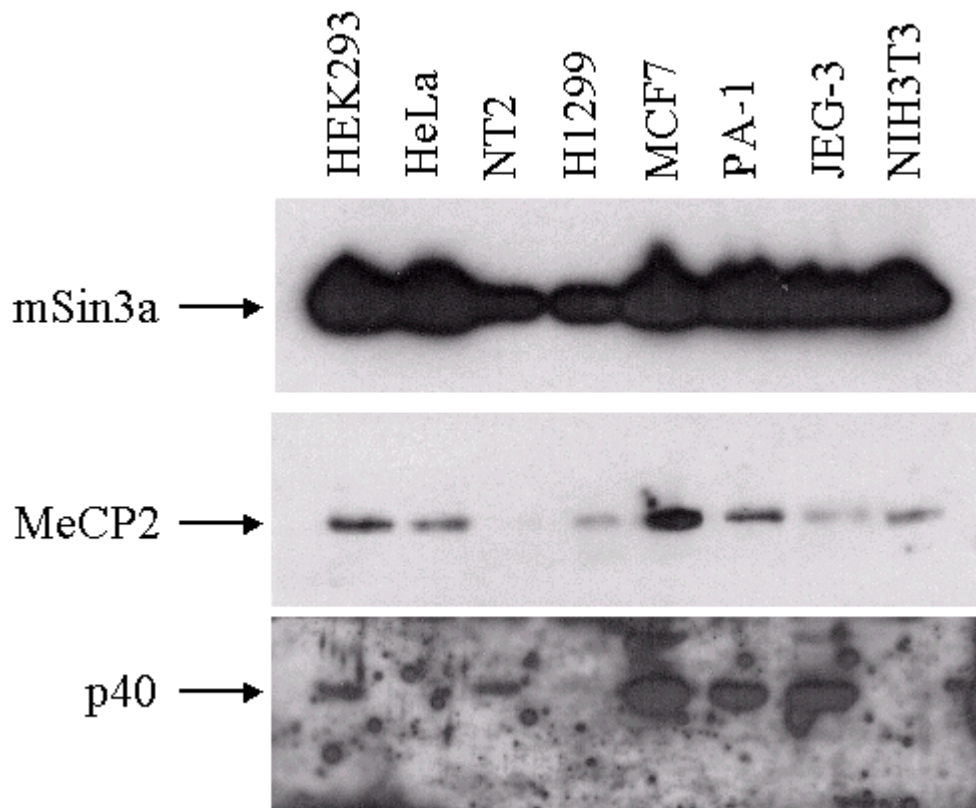


Abbildung 16 Untersuchung der Expression von MeCP2 und p40 in acht Zelllinien. Jeweils 10^6 Zellen aus sieben menschlichen Zelllinien (HEK293, HeLa, H1299, NT2, MCF-7, PA-1 und JEG-3) und einer Maus-Zelllinie (NIH3T3) wurden in $100 \mu\text{l}$ 1x SDS-Gelladepuffer lysiert. $20 \mu\text{l}$ Lysat davon wurden in SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran geblottet. Anhand des Pretained Proteinmarkers (Invitrogen) wurde die Membran auf der Höhe von 111 kDa und 61 kDa durchgeschnitten. Der obere Streifen wurde für die Detektion mit Antikörper gegen mSin3A (Santa Cruz) verwendet. Der mittlere Streifen wurde für die Detektion mit Antikörper gegen MeCP2 (Upstate Biotechnology) verwendet. Der untere Streifen wurde für die Detektion mit Antikörper gegen p40 (Geschenk von Dr. Schumann) verwendet. Die Pfeile zeigen die Positionen der drei untersuchten Proteine. Weitere zwei Wiederholungen dieses Experimentes führten zum gleichen Resultat.

Meine Untersuchung deutete darauf hin, dass es keine einfache umgekehrte Korrelation zwischen der L1- und der MeCP2-Expression gibt. In drei untersuchten Zelllinien sind L1 und MeCP2 nebeneinander exprimiert. Vermutlich sind die L1-Promotoren dort ähnlich wie bei NT2-Zellen hypomethyliert und unterliegen nicht mehr der Repression durch die DNA-Methylierung (Thayer *et al.*, 1993). HeLa- und H1299-Zellen passen zu einer Modellvorstellung, dass die Expressierung von MeCP2 die Expression von L1 hemmt. Besonders interessant war die Feststellung, dass MeCP2 in NT2-Zellen fehlt und daher kein strikt ubiquitäres Haushaltsprotein

sein muß. Dieser Befund war konsistent mit den Daten aus den Versuchen mit Knock-out-Mäusen, wonach Mäuse mit zerstörtem *MECP2*-Gen durchaus überlebensfähig sind (Guy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001). Darüber hinaus lieferte meine Beobachtung eine interessante Parallele zu dem Befund, dass MeCP2 in Vorläuferzellen der männlichen Gameten bei Mäusen nicht exprimiert ist, weil NT2-Zelllinie aus einem menschlichen Keimzell-Teratokarzinom in Hoden abstammt (Müller *et al.*, 2000; Andrews *et al.*, 1984). Für künftige funktionelle MeCP2-Studien, zum Beispiel differentielle Gen-Expression-Display, wird NT2 aufgrund ihres MeCP2-freien Hintergrundes sicherlich eine nutzvollere Zelllinie sein.

3.9 Keine L1-Expression in Leukozyten von Rett-Mädchen

Die Diagnose der fast nur bei Mädchen anzutreffenden neurologischen Störung, Rett-Syndrom, erfolgte in der Vergangenheit ausschließlich nach klinischen Kriterien, bis Mutationen im *MECP2*-Gen als Ursache für diese genetische Krankheit im Jahre 1999 erkannt wurden (Amir *et al.*, 1999). Seitdem wird die Sequenzierung des *MECP2*-Gens als ergänzende Methode bei der Diagnose eingeführt. Allerdings ist dieses Hilfsmittel noch relativ teuer und kann nicht in der Massendiagnose angewendet werden. Aufgrund der derzeit unzureichenden klinischen Untersuchung wird ein Teil der Rett-Mädchen als Autisten usw. falsch diagnostiziert. Ich untersuchte deshalb in meiner Arbeit die Möglichkeit, ob eine ergänzende, biochemische diagnostische Methode eingeführt werden könnte.

Weil MeCP2 unter der Zellkulturbedingung die L1-Transkription unterdrücken kann (3.6, 3.7), vermutete ich eine pathologische Reaktivierung von L1-Elementen bei Rett-Mädchen mit Mutationen im *MECP2*-Gen. Deshalb wollte ich untersuchen, ob es eine vermehrte L1-Expression in peripheren Leukozyten von Rett-Mädchen gibt. Für diese Studie wurden Leukozyten aus sechs Mädchen ohne Rett-Syndrom und zwei Mädchen mit Rett-Syndrom verwendet (präpariert von Jan Buschdorf). Die Leukozyten-Lysate wurden einer Western-Blot-Analyse mit Antikörper gegen p40 unterzogen. Das Untersuchungsergebnis wird in Abbildung 17 gezeigt. Weder bei den sechs gesunden Mädchen, noch bei den zwei Rett-Patientinnen ließ sich das Signal von p40 feststellen. Offensichtlich reicht allein der funktionelle Ausfall von MeCP2 nicht, um die L1-Expression in Leukozyten zu reaktivieren. Für die L1-Expression sind vermutlich zusätzliche gewebe-spezifische Transkriptionsfaktoren notwendig, zum Beispiel Sox11 (Tchénio *et al.*, 2000; Jay *et al.*, 1995). Weil Sox11 während der neuronalen Differenzierung hochreguliert wird, könnten Gehirn-Neuronen das Potential besitzen, L1 zu

exprimieren. Ein Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese vom Rett-Syndrom wäre, zu untersuchen, ob Gehirnproben von verstorbenen Rett-Patienten eine erhöhte L1-Expression zeigen.

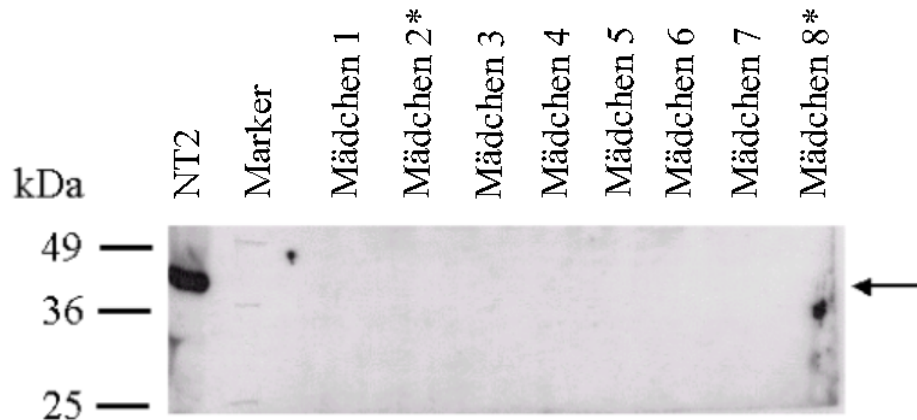


Abbildung 17 Keine L1-Expression in Leukozyten von Rett-Mädchen. 1×10^6 Leukozyten von zwei Rett-Mädchen (mit Sternchen gekennzeichnet) und sechs Mädchen frei vom Rett-Syndrom wurden in 100 μ l SDS-Gelladepuffer lysiert und 20 μ l Lysat wurden im Western-Blot mit Antikörper gegen p40 untersucht. Das Lysat aus NT2-Zellen wurde als positive Kontrolle für p40 verwendet (Thayer *et al.*, 1993; Abbildung 16). Der Pfeil zeigt die Position von p40.

3.10 Manipulation der endogenen L1-Expression

In diesem Abschnitt meiner Arbeit wurde probiert, ob man die endogene L1-Expression durch die Überexpression von MeCP2 hemmen kann und ob man die L1-Expression durch die Überexpression von dominant-negativer MeCP2-Mutante reaktivieren kann.

Für den ersten Teil des Experimentes wurden NT2- und JEG-3-Zellen verwendet, weil beide Zelllinien p40 exprimieren, aber kein beziehungsweise wenig MeCP2 exprimieren (Abbildung 16). HEK293-Zellen wurden wegen leichter Transfizierbarkeit auch herangezogen. Versuche mit JEG-3-Zellen wurden vorzeitig abgebrochen, weil sie durch keine der drei verwendeten Reagenzien (Calciumphosphat, FuGENE6 [Roche] und LipofectaminePLUS [Invitrogen]) zu transfizieren waren. Das Expressionsplasmid pcDNA1.1/Amp-FLAG-MeCP2 wurde in NT2- und HEK293-Zellen mit LipofectaminePLUS transient transfiziert. Lysate der transfizierten und nicht-transfizierten Zellen wurden der Western-Blot-Analyse mit Antikörper gegen p40 und FLAG-Epitop unterzogen. Keine Abnahme der p40-Expression wurde als Konsequenz der korrekten Überexpression von FLAG-MeCP2 in beiden Zelllinien festgestellt. Das deutete darauf hin, dass die relativ starke, endogene p40-Expression in den beiden Zelllinien nicht auf funktionell defektes MeCP2 (bei HEK293-Zellen) oder MeCP2-Mangel (bei NT2-Zellen)

zurückgeht. Wahrscheinlich ist die Hypomethylierung der L1-Promotor-Region hauptsächlich verantwortlich für die verstärkte L1-Expression und die Unempfindlichkeit gegenüber exogenem MeCP2 (Thayer *et al.*, 1993)

Für den zweiten Teil des Experimentes wurden HeLa- und H1299-Zellen verwendet, weil beide Zelllinien MeCP2 exprimieren, aber kein p40 exprimieren (Abbildung 16). HEK293-Zellen wurden wie im ersten Teil auch herangezogen. Zwei MeCP2-Mutanten wurden konstruiert, die mit endogenem Wildtyp-MeCP2 um die genomischen Bindungsstellen konkurrieren und transkriptionelle Aktivierung statt Repression ermöglichen sollten. Dazu wurde der die MeCP2-DNA-Bindungsdomäne (MBD, aa 1 - 195) kodierende cDNA-Teil in einem PCR-Ansatz amplifiziert und am 5'-Ende zusätzlich mit einer NLS vom T-Antigen und FLAG-Epitop kodierenden Sequenz verlängert, bevor der in die HindIII- und BamHI-Stellen von pcDNA3-Gal4BD-VP16AD eingebaut wurde. Das führte zum ersten Expressionskonstrukt pcDNA3-NLS-FLAG-MBD-VP16AD, das ein rekombinantes, im Zellkern lokalisiertes Protein mit der N-terminalen DNA-Bindungsdomäne von MeCP2 und der C-terminalen Aktivator-domäne von VP16 exprimiert. Parallel dazu wurde die cDNA von MeCP2 (aa 1 - 195) per PCR amplifiziert und in die EcoRI- und XbaI-Stellen von pVP16 (Clontech) eingebaut. Aus diesem Zwischenprodukt wurde das BglII-XbaI-Fragment herausgeschnitten und in die BamHI- und XbaI-Stellen von pcDNA1.1/Amp (Invitrogen) eingebaut. Das führte zum zweiten Expressionskonstrukt pcDNA1.1/Amp-NLS-VP16AD-MBD, das ein rekombinantes Kernprotein mit der Aktivator-domäne von VP16 am N-Terminus und der DNA-Bindungsdomäne von MeCP2 am C-Terminus exprimiert. Beide Expressionskonstrukte für putative dominant-negative MeCP2-Mutanten wurden mit LipofecaminePLUS separat in HeLa-, H1299- oder HEK293-Zellen transient transfiziert. Obwohl die korrekte Überexpression beider Fusionsproteine anhand Western-Blots mit dem Antikörper gegen VP16AD (Santa Cruz) verifiziert werden konnte, wurde keine Reaktivierung von p40 in HeLa- oder H1299-Zellen sowie keine Stimulierung der p40-Expression in HEK293-Zellen festgestellt. Bei HEK293-Zellen könnten die L1-Promotor-Regionen hypomethyliert und daher unempfindlich gegenüber MeCP2 sein. Die Situation in HeLa- und H1299-Zellen könnte durch das Vorhandensein weiterer unbekannter L1-Repressoren oder das Fehlen essentieller L1-Aktivatoren erklärt werden. Alternativ zu dieser Vermutung könnten beide putative dominant-negative Mutanten nicht effektiv an endogene L1-Promotoren binden, weil das für die Nucleosomen-Bindung wichtige C-Terminus von MeCP2 bei ihnen fehlte (Chandler *et al.*, 1999).

3.11 Keine Repression des Alu-Elementes durch TRD von MeCP2

Neben LINE1 macht die Alu-Familie, eine aus dem menschlichen 7SL-Gen abstammende Retrotransposonsgruppe, 10.6% des menschlichen Genoms aus (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Alu unterscheidet sich von L1 sowohl in der Größe (~ 400 bp versus ~ 6000 bp), als auch in dem internen Promotor (PolIII versus PolII). Aufgrund der fehlenden kodierenden Kapazität für Proteine ist Alu in seiner Verbreitung vermutlich auf die Retrotranspositionsmaschinerie von L1 angewiesen (Boeke, 1997). Alu ist normalerweise stark methyliert und die DNA-Methylierung hemmt die Alu-Transkription *in vitro* über einem noch unbekanntem, limitierenden Faktor (Liu und Schmid, 1993). Interessanterweise bindet MeCP2 *in vitro* bevorzugt an genomische Alu-DNA (Shiraishi *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang war es interessant, zu untersuchen, ob MeCP2 und andere Repressoren der MBD-Proteinfamilie in der Alu-Regulation eine Rolle spielen könnten.

Aufgrund der Besonderheit des Alu-Promotors (PolIII) gestaltete sich die Detektion der Transkriptionsaktivität von Alu anders als in den vorhergehenden Reporterassays mit Firefly-Luciferase, weil das Stoppsignal der Elongation für RNA-Polymerase-III aus vier hintereinander liegenden Thyminen besteht und diese Sequenz (TTTT) in der kodierenden Region von Firefly-Luciferase zwölfmal vorkommt. Eine direkte Detektion der exogenen Alu-Transkripte ist wegen des hohen unspezifischen zellulären Hintergrundes ebenfalls nicht geeignet. In meiner folgenden Studie benutzte ich das Reporterplasmid p^{7SL}AluSx^{TMBC1} (Geschenk von Dr. Deininger; Roy *et al.*, 2000), in dem das AluSx-Element am 3'-Ende mit der cDNA von BC1, einer neuronenspezifischen RNA aus Nagetieren, gekoppelt ist. Am 5'-Ende ist das AluSx-Element mit der 7SL-RNA 5'-Upstreamsequenz gekoppelt, die die ansonst schwache Alu-Expression verstärkt. Dieses Konstrukt ermöglicht die eindeutige Detektion der Alu-BC1-Fusionstranskripte mit der Hilfe des spezifischen Antisense-BC1-Oligonukleotides als Sonde auf der RNA-Ebene. Für meine Gal4BD-Versuche wurde das Derivat pG5-^{7SL}AluSx^{TMBC1} konstruiert, indem das BamHI-Fragment von pFR-Luc in die BamHI-Stelle vor der 7SL-Upstreamsequenz auf p^{7SL}AluSx^{TMBC1} eingebaut wurde. Beide Konstrukte werden in der Abbildung 18A schematisch dargestellt.

1000 ng Reporterplasmid p^{7SL}AluSx^{TMBC1} oder pG5-^{7SL}AluSx^{TMBC1} wurde zusammen mit 100 ng Expressionsplasmid pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2}, pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MBD1} oder pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MBD2} in HEK293-Zellen ko-transfiziert. Die Gesamt-RNA aus den transfizierten

Zellen wurde isoliert und der RNA-Dot-Blot-Analyse mit radioaktiv markiertem Antisense-BC1-Oligonukleotid unterzogen. Das Blot-Ergebnis wird in Abbildung 18B gezeigt. Das Einfügen der Gal4-Bindungssequenz vor der ^{7SL}AluSx-Sequenz bewirkte eine unerwartete Stimulierung der Alu-Expression [$+ 55.0\% \pm 7.9\%$] bei der Ko-Expressierung vom Fusionsprotein Gal4BD-TRD_{MeCP2}. Das steht im scharfen Gegensatz zu der Reprimierbarkeit des L1-Promotors durch die TRD von MeCP2 (Abbildung 14).

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass das Einfügen der Gal4-Bindungssequenz vor der ^{7SL}AluSx-Sequenz keine signifikante Veränderung der Alu-Expression [$+ 5.0\% \pm 3.6\%$] bei der Ko-Expressierung vom Fusionsprotein Gal4BD-TRD_{MBD1} und eine leichte Stimulierung der Alu-Expression [$+ 34.6\% \pm 24.2\%$] bei der Ko-Expressierung vom Fusionsprotein Gal4BD-TRD_{MBD2} bewirkte (Abbildung 18B). Der Kontrollversuch ohne Ko-Transfektion eines Expressionsplasmides zeigt, dass das Einfügen der Gal4-Bindungssequenz keinen Einfluß auf die Alu-Transkription [$+ 3.3\% \pm 4.9\%$] ausübte (Abbildung 18B). Nach dieser Untersuchung haben MeCP2, MBD1 und MBD2 alle nicht das Potential, die Alu-Transkription zu reprimieren.

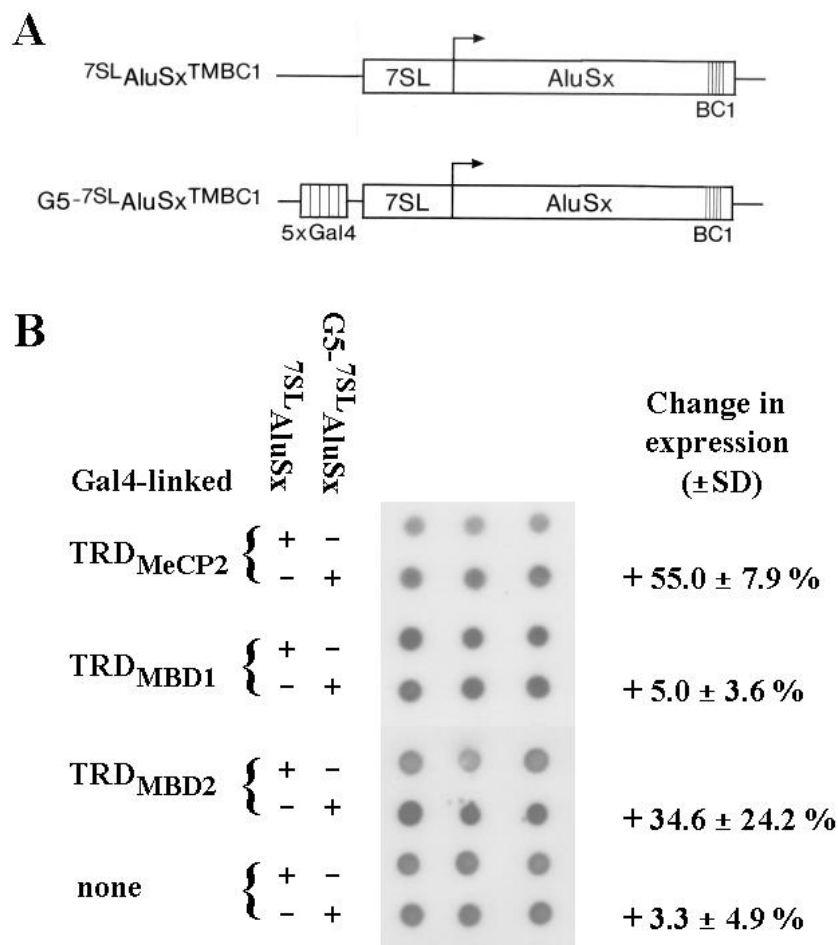


Abbildung 18 Der Einfluß der TRDs von MeCP2, MBD1 und MBD2 auf die Alu-Expression. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Reporter-Konstrukte. (B) HEK293-Zellen

wurden jeweils mit dem Reporterplasmid $p^{7SL}AluSx^{TMBC1}$ oder $pG5-^{7SL}AluSx^{TMBC1}$ zusammen mit dem Expressionsplasmid $pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MeCP2}$, $pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MBD1}$ beziehungsweise $pcDNA3-Gal4BD-TRD_{MBD2}$ oder mit keinem Expressionsplasmid (none) ko-transfiziert. Die Gesamt-RNA aus den transfizierten Zellen wurde isoliert und der RNA-Dot-Blot-Analyse mit radioaktiv markiertem Antisense-BC1-Oligonukleotid unterzogen. Jeder Spot repräsentiert die RNA-Probe aus einer unabhängigen transienten Transfektion.

3.12 Keine Repression des methylierten Alu-Elementes durch MeCP2

Das Methylierungsmuster der Alu-Elemente *in vivo* ist noch nicht bekannt. In den bisherigen *in vitro* Untersuchungen über den Effekt der DNA-Methylierung auf die Alu-Expression verwendete man überwiegend die *in vitro* Methylierung mit M.SssI-Methyltransferase, das alle CpG-Stellen symmetrisch methyliert. In meiner Untersuchung wurde ebenfalls M.SssI-Methyltransferase (MBI Fermentas) zur Methylierung des Reporterplasmides verwendet, um zu beobachten, ob MeCP2, MBD1 und MBD2 die Transkription von einem vollständig methylierten Alu-Element hemmen könnten.

Schein-methyliertes oder M.SssI-methyliertes Reporterplasmid $p^{7SL}AluSx^{TMBC1}$ (1000 ng) wurde mit oder ohne Expressionskonstrukt für FLAG-MeCP2, FLAG-MBD1v3 oder FLAG-MBD2b (100 ng) in HEK293-Zellen transient ko-transfiziert. Die Gesamt-RNA aus transfizierten Zellen wurde isoliert und im RNA-Dot-Blot mit Antisense-BC1-Oligonukleotid als Sonde analysiert. Das Ergebnis wird in Abbildung 19 gezeigt. Die vollständige M.SssI-Methylierung von $p^{7SL}AluSx^{TMBC1}$ führte im Vergleich zur Schein-Methylierung des Reporterplasmides zu einer starken Reduktion der Alu-Expression $[- 78.5\% \pm 1.3\%]$. Dieses *in vivo* Ergebnis deckte sich mit der beschriebenen Repression der Alu-Transkription durch die DNA-Methylierung *in vitro* (Liu und Schmid, 1993). In Anwesenheit von exogen überexprimiertem FLAG-MeCP2 führte die DNA-Methylierung jedoch nicht zu einer weiteren Reduktion der Alu-Expression, sondern im Gegenteil zu einer schwachen Stimulierung $[+ 32.4\% \pm 11.2\%]$. Dieses überraschende Ergebnis deutet darauf hin, dass MeCP2 nicht jener unbekannte, limitierende Faktor sein könnte, der für die Repression der Alu-Expression durch die DNA-Methylierung verantwortlich ist (Liu und Schmid, 1993). Da die TRD von MeCP2 nach der Bindung in der Nähe des Alu-Elementes ebenfalls die Alu-Expression leicht stimulierte (Abbildung 18), könnte man annehmen, dass MeCP2 an methylierte Alu-Sequenzen binden kann. Möglicherweise könnte überexprimierte MeCP2 dort mit einem noch nicht bekannten Methyl-Alu-Repressor um DNA-Bindungsstellen

und / oder Co-Faktoren konkurrieren und somit indirekt zu einer scheinbaren Aufhebung der Repression der Alu-Expression aufgrund der DNA-Methylierung führen.

In Anwesenheit von exogen überexprimiertem MBD1v3 oder MBD2b führte die M.SssI-Methylierung des Reporterplasmides jeweils zu einer Stimulierung [$+ 135.7\% \pm 10.2\%$] und einer Abschwächung [$- 47.4\% \pm 7.6\%$] der Alu-Transkription (Abbildung 19). Das deutete darauf hin, dass weder MBD1v3, noch MBD2b der gesuchte, unbekannte Repressor von Alu im methylierten Zustand sein könnte, weil die Überexpression eines echten Alu-Repressors im Vergleich zur Ausgangssituation ohne Ko-Expression eines Repressors zu einer wesentlich höheren transkriptionellen Repression eines methylierten Alu-Elementes führen müsste.

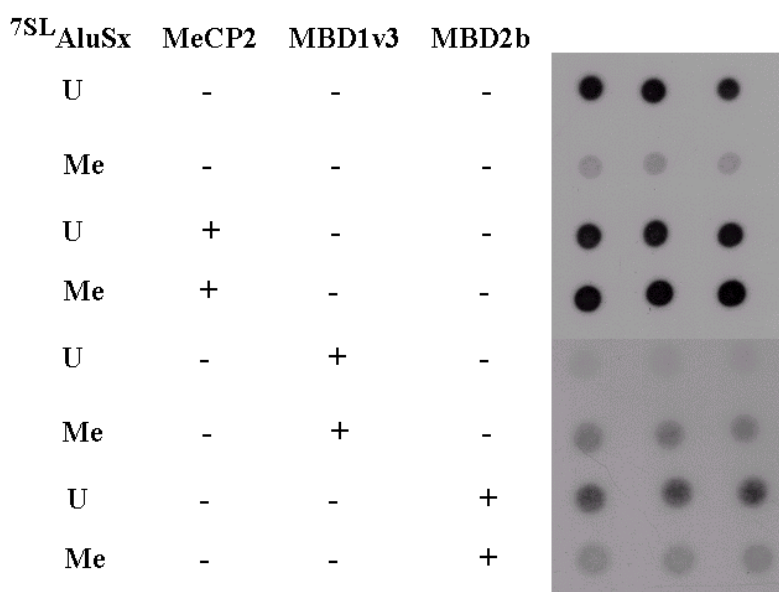


Abbildung 19 Der Einfluß von MeCP2, MBD1v3 und MBD2b auf die Transkription von einem M.SssI-methylierten Alu-Element. HEK293-Zellen wurden jeweils mit dem schein-methylierten (U) oder M.SssI-methyliertem Reporterplasmid p⁷⁵L_{AluSx}^{TMBC1} (Me) allein oder zusammen mit dem Expressionsplasmid pcDNA1.1/Amp-FLAG-MeCP2, pcDNA1.1/Amp-FLAG-MBD1v3 oder pcDNA1.1/Amp-FLAG-MBD2b ko-transfiziert. Die Gesamt-RNA aus den transfizierten Zellen wurde isoliert und der RNA-Dot-Blot-Analyse mit radioaktiv markierter Oligosonde gegen BC1-Region unterzogen. Jeder Spot repräsentiert die RNA-Probe aus einer unabhängigen transienten Transfektion.

Zusammengefasst aus den Ergebnissen in 3.11 und 3.12 ergibt sich, dass alle drei Repressoren aus der MBD-Proteinfamilie (MeCP2, MBD1 und MBD2) keine negativen Regulatoren der Alu-Transkription sind. Wahrscheinlich könnte MeCP2 nur spezifisch PolII-Promotor, nicht aber PolIII-Promotor reprimieren.

4 Diskussion

4.1 MeCP2/ARBP ist ein MAR bindendes Protein *in vivo*.

In eukaryotischem Zellkern besitzen Chromosomen individuelle, nicht-überlappende Territorien. Die wichtigen biologischen Vorgänge wie Replikation, Rekombination, Transkription und Spleißen finden auf diskrete Strukturen innerhalb des Zellkerns statt (Nickerson *et al.*, 1995). Trotz vieler Anstrengungen bei der Aufklärung der molekularen Basis für die Kernarchitektur gibt es zur Zeit noch kein klares Konzept über die höhere Strukturordnung im Zellkern. Ein viel diskutiertes Modell ist, dass die Struktur und die Funktion vom Zellkern durch ein Skelett aus Proteinen, das sogenannte Kernmatrix oder Kerngerüst, und seine Wechselwirkung mit architektonischen DNA-Elementen im Genom bestimmt sind (Gasser *et al.*, 1987). Die Anbindung vom Chromatin an den Kernmatrix scheint über spezialisierte AT-reiche DNA-Elemente zu erfolgen, die in allen untersuchten eukaryotischen Organismen gefunden wurden und vermutlich das Genom in getrennte, topologisch unabhängige Schlaufen von unterschiedlicher Größe unterteilen (Laemmli *et al.*, 1992). Solche als MARs beziehungsweise SARs bezeichneten DNA-Elemente sind in einer evolutionär konservierten Weise an Kernmatrix gebunden, vermutlich durch ein oder mehrere konservierte Bindungsproteine im Kernmatrix (Cockerill *et al.*, 1986). Die Erkennung von MARs durch Bindungsproteine ist auf der molekularen Ebene noch nicht gut verstanden, aber sie scheint nicht von einer exakten Erkennungssequenz abhängig zu sein, weil eine Konsensus-Sequenz für MAR nicht identifiziert werden konnte. Stattdessen könnten MARs durch Struktureigenschaften und / oder Anhäufung von kurzen Sequenzmotiven erkannt werden. Tatsächlich enthalten viele charakterisierte MARs A/T-Homopolymere, die zu einer engeren Kleingrube der DNA-Doppelhelix führen (Boulikas 1995). Seine Wichtigkeit kann durch Distamycin demonstriert werden, das als Antibiotika an die Kleingrube von DNA bindet und die Wechselwirkung zwischen MAR und Kernmatrix unterdrückt (Käs *et al.*, 1989). Außer den AT-reichen Sequenzmotiven kommen noch Elemente wie unwinding elements und matrix attachment region recognition signature bei natürlichen MARs vor, die meistens zwischen 600 und 3000 bp lang sind (Bode *et al.*, 1992; van Drunen *et al.*, 1999).

MARs spielen nicht nur eine Rolle in der Kernarchitektur, sondern auch in der Regulation der Gen-Expression. Zum Beispiel können MARs die Gen-Expression eines heterologen

Reportergens nach dessen genomischen Intergration stimulieren und die Chromatin-Konfiguration benachbarter Regionen regulieren (Stief *et al.*, 1989; Jenuwein *et al.*, 1997). Funktionell ähneln MARs den Insulator-Sequenzen, die eine Intergrationsort-unabhängige Expression des Transgens ermöglichen (Phi-Van *et al.*, 1990).

Verschiedene MAR bindende Proteine wurden in den letzten Jahren identifiziert und charakterisiert. Die meisten sind ubiquitäre, abundante Kernproteine, z.B. Topoisomerase II, Histon H1, Lamin B1, HMG I/Y, Nucleolin, SAF-A, SAF-B, MeCP2/ARBP. SATB1 und p114 sind hingegen gewebe-spezifisch exprimiert. Zur Zeit ist aber noch wenig über ihre Bindungsspezifitäten und ihre Rolle in der Kernarchitektur *in vivo* bekannt.

ARBP wurde ursprünglich anhand seiner Bindungsaffinität zu 5'-Lysozymgen-MAR aus Huhn in Southwestern-Blot identifiziert. Das gereinigte Protein erwies sich auch als positiv in Southwestern-Blot mit verschiedenen MARs aus Mensch, Maus und Fruchtfliege als Sonde (von Kries *et al.*, 1991). Mit Southwestern-Blot wurde auch die MAR-Bindungsdomäne in einer N-terminalen Region aus 125 Aminosäuren lokalisiert (Weitzel *et al.*, 1997). Die exakte ARBP-Bindungsstellen innerhalb 5'-Lysozymgen-MAR und Maussatelliten-DNA konnten in DNase-Footprinting-Assay ermittelt werden, es handelte sich um ein zentrales 5'-GGTGT-3'-Motiv, das durch AT-reiche Sequenzen flankiert ist. Dass ARBP an beiden DNA-Elementen binden kann, ließ sich auch in Gel-Verzögerungstest („Band-Shift“) quantitativ analysieren; danach beträgt die Dissoziationskonstante des Komplexes aus ARBP und 5'-Lysozymgen-MAR $2 - 6 \times 10^{-10}$ M. Obwohl diese drei verschiedenen DNA-Bindungstests jeweils wertvolle Informationen über ARBP geliefert haben, können sie aufgrund ihres *in vitro* Charakters nicht über die *in vivo* Bindung von ARBP aussagen.

Meine transienten Transfektionsversuche stellen einen *in vivo* Protein-DNA-Bindungsassay dar. Die transfizierte Plasmid-DNA liegt im Zellkern nicht nackt vor, sondern assoziiert mit Chromatinproteinen. Unter dieser Bedingung dirigieren MAR und Satelliten-DNA das Repressorprotein MeCP2 zu beiden Reporter-Promotoren, SV40-Enhancer/Promotor und adenoviralem Major-Late-Promotor, und hemmen ihre Aktivitäten durch die transkriptionelle Repressordomäne (TRD). Das bewies, dass überexprimiertes MeCP2 an Hühner-Lysozymgen-MAR und Maus-Satelliten-DNA *in vivo* binden kann. Diese Daten unterstützen die früheren *in vitro* Beobachtungen, dass MeCP2 ein MAR bindendes Protein ist. Sie weisen außerdem darauf hin, dass MeCP2 kein striktes Methyl-CpG bindendes Protein ist, sondern auch an ausgewählte nicht methylierte DNA *in vivo* binden kann, zum Beispiel MARs. Das ist konsistent mit der

vorläufigen Beobachtung aus immunocytoologischen Untersuchungen, dass die nukleäre Verteilung von 5'-Methylcytosin und die von MeCP2 nicht völlig identisch sind (persönliche Mitteilung von Koch).

Interessanterweise ist MeCP2/ARBP nicht der einziger transkriptionelle Repressor unter MAR bindenden Proteinen. Einige bekannten Beispiele sind: SAF-A, SAF-B und SATB1 (Kim *et al.*, 1999; Nayler *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). Dagegen kennt man bisher noch kein einziges MAR bindendes Protein, das transkriptioneller Aktivator ist. Das steht gewissermaßen im Kontrast zur MAR-vermittelten Stimulierung der Gen-Expression eines heterologen Reportergens nach der genomischen Intergration. Das könnte bedeuten, dass es noch weitere unkannte MAR bindende Proteine gibt, die transkriptionelle Aktivatoren sind und die reprimierenden Effekte von MeCP2, SAF-A, SAF-B und SATB1 mehr als kompensieren könnten. Alternativ könnten die an Gengrenzen oder in Introns liegenden MARs eine Falle beziehungsweise ein Speicher für freie transkriptionelle Repressoren darstellen und somit die in der Mitte der Chromatinschleifen liegenden Promotoren in ein relativ Repressor-armes Milieu und daher einen transkriptionell aktiven Zustand versetzen.

Ein Arbeitsmodell für die physiologische Rolle von MeCP2 in der Bindung an MAR an Chromatindomäne-Grenzen wird in Abbildung 20 graphisch dargestellt (Strätling und Yu, 1999). MeCP2 bindet an MARs, rekrutiert Co-Repressor-Komplex und dirigiert Histon-Deacetylase an MARs. Durch die Histon-Deacetylase-Aktivität wird eine regionale repressive Chromatin-Konfiguration erzeugt. Konsistent mit dieser Annahme wurde Histon-Deacetylase in Kernmatrix-Präparaten gefunden (Hendzel *et al.*, 1991). Im fakultativen Heterochromatin des inaktiven X-Chromosoms in Zellen aus weiblichen Säugern sind die Histone H3 und H4 unteracetyliert. Darüber hinaus ist Histon H4 im konstitutiven, pericentromerischen Heterochromatin an allen vier Lysin-Resten unteracetyliert (Turner 1993). Dagegen rekrutiert Promotor-Regionen Histon-Acetyltransferase-Aktivitäten, z.B. TAFII250, p300/CBP und PCAF. Solche Aktivitäten führen zu einer Acetylierung der N-Termini von Histonen H3 sowie H4 und befördern eine offene, aktive Chromatinstruktur. Die örtlich lokalisierte inaktive Struktur in der Nähe von MARs und eine offene Organisation in der Nähe der Promotoren führen zu einer erhöhten Konzentration an Transkriptionsfaktoren in der Nähe der Promotoren und könnten möglicherweise die oft beschriebene Transkription-stimulierende Wirkung von MARs erklären (Bode *et al.*, 1995; Phi-Van und Strätling, 1996).

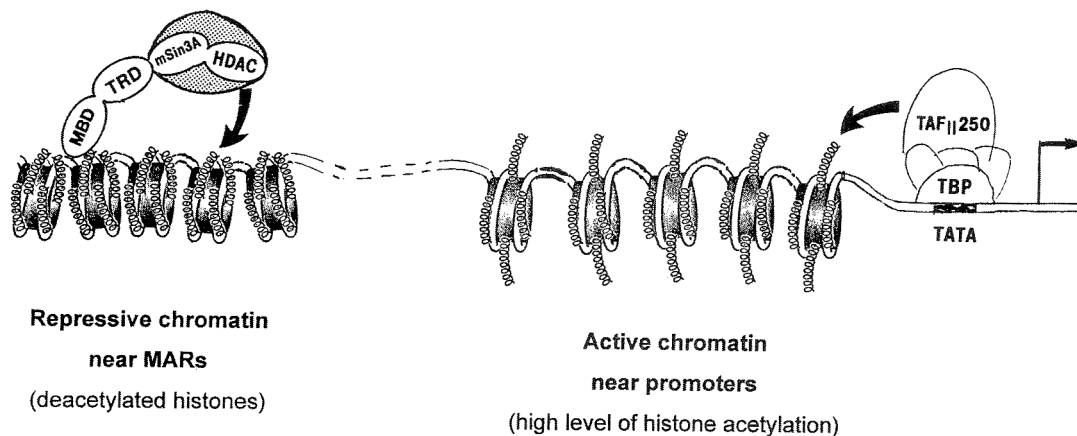


Abbildung 20 Modell einer hypothetischen Chromatindomäne mit Hervorhebung deren Grenze und Promotor. MeCP2 (MBD-TRD) bindet an MARs und rekrutiert einen großen Co-Repressor-Komplex, der Histon-Deacetylasen HDAC1 und HDAC2 enthält. Diese Enzyme deacetylieren die N-Termini von den Histonen H3 sowie H4 und generieren eine lokale repressive Chromatin-Konfiguration. Dagegen dirigieren generelle Transkriptionsfaktoren und transkriptionelle Aktivatoren (zum Beispiel TAFII250, p300/CBP, PCAF) Histon-Acetyltransferasen an den Promotor und generieren dort eine aktive Chromatin-Konfiguration.

Obwohl die transiente Transfektion eine leistungsvolle Methode zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion *in vivo* ist, hat sie auch ihre Einschränkungen. Sie kann zwar eine vermutete Protein-DNA-Interaktion verifizieren oder verwerfen, kann aber nicht beantworten, an welche unbekannte DNA-Sequenzen das Protein *in vivo* noch bindet. Eine klassische Methode dazu ist das Formaldehyd-Crosslinking, mit dem zum Beispiel die an SATB1 bindenden DNA-Fragmente erfolgreich kloniert werden konnten (de Belle *et al.*, 1998). Besonders elegant ist das vor kurzem eingeführte Chromatin-Profiling mittels DNA-Adenin-Methyltransferase aus *E. coli*, das in Kombination mit DNA-Chips mit hohem Durchsatz die genomischen Bindungsstellen eines DNA-bindenden Proteins aufspüren kann (van Steensel *et al.*, 2001). Die Information über die gesamten genomischen Bindungsstellen von MeCP2 wird sicherlich zu einem besseren Verständnis über seine physiologischen Funktionen beitragen.

4.2 MeCP2 kann die Transkription über einem Histon-Deacetylase-unabhängigen Weg reprimieren.

Die besondere Bedeutung meiner Studie liegt an der Identifizierung eines neuen, Histon-Deacetylase-unabhängigen Weges für die transkriptionelle Repression von MeCP2. Dieser Weg wird bei SV40-Enhancer/Promotor und SV40-Promotor in HEK293-Zellen besprochen, aber nicht bei adenoviralem Major-Late-Promotor in demselben Zelltyp. Die starke Repression des

SV40-Promotors durch TRD von MeCP2 wurde durch TSA, einen spezifischen Inhibitor gegen alle bekannten Histon-Deacetylasen, nicht aufgehoben (Grozinger *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wurde die schwache Repression des adenoviralen Major-Late-Promotors in demselben Zelltyp durch TSA aufgehoben. Frühe Transfektionsstudien demonstrierten überzeugende Beweise für einen Histon-Deacetylase-abhängigen Weg durch TRD von MeCP2 (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Welcher Repressionsweg gewählt wird, hängt offensichtlich vom Promotorkontext ab. Der Histon-Deacetylase-unabhängige Modus funktioniert bei SV40-Promotor und der Histon-Deacetylase-abhängige Weg bei adenoviralem Major-Late-Promotor. Der partielle Aufhebungseffekt von TSA bei der transkriptionellen Repression des menschlichen β -Actin-Promotors durch MeCP2 weist darauf hin, dass die Repression dieses Promotors über beide Wege ablaufen könnte (Nan *et al.*, 1998). Die transkriptionelle Repressor-Aktivität wurde ursprünglich in *in vitro* Experimenten identifiziert, in denen nackte DNA mit MeCP2 beziehungsweise Extrakten aus HeLa-Zellen oder Rattenleber inkubiert wurde (Nan *et al.*, 1997). Weil sich Nucleosomen unter dieser Bedingung vermutlich nicht assemblieren können, wurde spekuliert, dass die transkriptionelle Repression auch über einem Histon-Deacetylase-unabhängigen Weg geschehen könnte. Darüber hinaus könnte ein Histon-Deacetylase-unabhängiger Weg teilweise erklären, warum TSA die durch CpG-Methylierung ausgeschalteten endogenen Gene oder das *FMRI*-Gen aus Fragile-X-Patienten nicht reaktivieren kann (Cameron *et al.*, 1999; Coffee *et al.*, 1999). MeCP2 ist das zuerst bekannt gewordene Mitglied einer Familie von Proteinen, die alle über eine Methyl-CpG bindende Domäne verfügen (Hendrich *et al.*, 1998). Ein anderes Mitglied der Familie, MBD2, besitzt interessanterweise auch Repressor-Aktivität und reprimiert den menschlichen β -Actin-Promotor durch einen Histon-Deacetylase-unabhängigen Mechanismus (Ng *et al.*, 1999). Ein anderes vergleichbares Beispiel mit dualen Repressionswegen ist Retinoblastomprotein, Rb (Luo *et al.*, 1998). Rb kann sowohl mit Histon-Deacetylase zur transkriptionellen Repression interagieren, als auch über Wechselwirkungen mit am Promotor bindenden Transkriptionsfaktoren (z.B. das ETS-Familienmitglied PU.1) die Transkription direkt reprimieren.

Die TRD (aa 196 – 310) des Histon-Deacetylase-unabhängigen Weges deckt sich übereinstimmend mit der TRD (aa 207 – 310) des Histon-Deacetylase-abhängigen Weges (Abbildung 8B; Nan *et al.*, 1998). Dennoch bleibt ein Teil der Repressor-Aktivität in den C-Terminalen 176 Aminosäureresten erhalten. In einer regionalen Mutationsanalyse detektiere ich zwei benachbarte Segmente (D und E), deren Mutation die transkriptionelle Repressor-Aktivität von MeCP2 auf SV40-Enhancer/Promotor auslöschen. Die Mutation der ersten dieser beiden

Segmente (D) hemmt die *in vitro* Interaktionen MeCP2-mSin3A und MeCP2-c-Jun (Yu *et al.*, 2000; Thiesen, 2001). Darüber hinaus ist eine die Segmente D und E enthaltende Region aus 46 Aminosäuren für die Repression der VP16-stimulierten Transkription ausreichend. Das Segment D beinhaltet eine Gruppe basischer Aminosäuren, die vom Frosch bis zum Menschen konserviert sind. Eine Substitution von vier basischen Aminosäuren gegen vier saure Aminosäuren innerhalb des Segmentes D reduziert zum großen Teil die Repressor-Aktivität von TRD. Daher repräsentiert dieses zentrale Peptid (aa 249 – 294) den funktionellen Kern von TRD. Vor kurzem wurde berichtet, dass Mutationen im *MECP2*-Gen die neurologische Störung, Rett-Syndrom, verursachen (Amir *et al.*, 1999). Eine der identifizierten Mutation verursacht ein Translations-Stop im Codon 255 (markiert durch einen Pfeil in Abbildung 9) und vermutlich die Produktion eines gekürzten Proteins ohne Segmente D und E. Diese Daten unterstützen meinen Befund, dass die Segmente D und E für die transkriptionelle Repression der SV40-Enhancer/Promotor essentiell sind. Im Gegensatz heben dieselben Mutationen D und E die Repressor-Aktivität von TRD auf adenoviralen Major-Late-Promotor nur wenig auf. Das könnte daran liegen, dass die Segmente D/E betroffene Interaktion zur Repression des adenoviralen Major-Late-Promotors durch andere redundante Protein-Protein-Interaktionen kompensiert wird.

Die aktuellen Daten weisen auf eine Beteiligung von mSin3A, aber keine Beteiligung von TSA-hemmbarer Histon-Deacetylase, in dem Histon-Deacetylase-unabhängigen Mechanismus hin. Der Co-Repressor mSin3A kann sowohl HDAC1, HDAC2 und HDAC7 rekrutieren, als auch direkt mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIB interagieren, um die Transkription zu reprimieren (Wong und Privalsky 1998; Kao *et al.*, 2000). Alternativ kann MeCP2 auch direkt an TFIIB binden und so die generelle Transkriptionsmaschinerie bei der Initialisierung der Transkription hemmen (Kaludov und Wolffe 2000). Meine Daten, dass MeCP2 und TFIIB mit Antikörper gegen TFIIB ko-präzipitierbar sind, unterstützen beide Szenarien. Die TRD von MeCP2 bindet an c-Jun *in vitro* und diese Interaktion wird durch die Mutation im Segment D geschwächt (Thiesen, 2001). Meine Daten aus dem Immunpräzipitationsversuch zeigen, dass diese Wechselwirkung zwischen MeCP2 und c-Jun auch *in vivo* existiert. Die Interaktion mit c-Jun, einer Untereinheit des dimeren Aktivators AP-1, stellt somit eine zusätzliche, mögliche Komponente im Histon-Deacetylase-unabhängigen Mechanismus dar (Franklin *et al.*, 1995). Die schematische Darstellung in Abbildung 21 gibt einen zusammenfassenden Überblick der drei oben diskutierten Repressionswege von MeCP2. Nach dem Abschluss meiner Doktorarbeit wurde bekannt, dass MeCP2 darüber hinaus zwei weitere Co-Repressoren, nämlich N-CoR und c-Ski, rekrutieren kann (Kokura *et al.*, 2001).

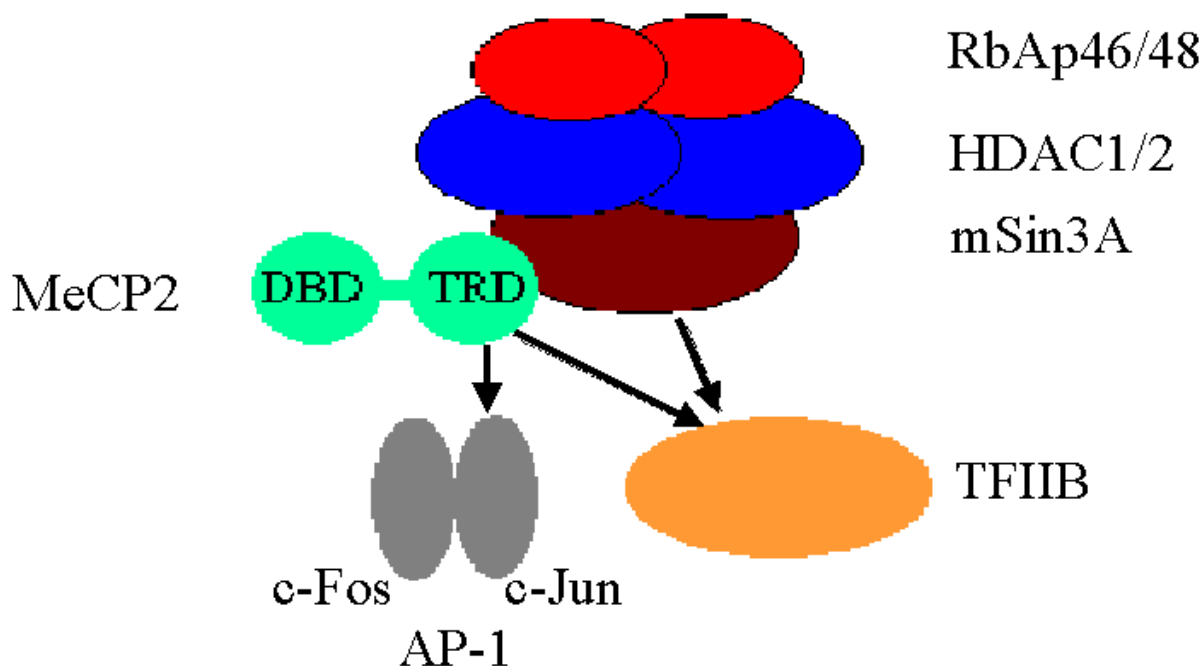


Abbildung 21 Modell über parallele Repressionswege von MeCP2. MeCP2 (grün) besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) und einer transkriptionellen Repressordomäne (TRD). Der Co-Repressor mSin3A (braun) verbindet TRD von MeCP2 mit dem Kern des Histon-Deacetylase-Komplexes aus HDAC1/2 (blau) und RbAp46/48 (rot). RbAp46/48 stimulieren die Bindung des Komplexes an Histonen, HDAC1/2 entfernen Acetylgruppen aus den N-Termini von Histon H3/H4 und machen das Chromatin kompakter und unzugänglich für Transkriptionsfaktoren. Der generelle Transkriptionsfaktor TFIIB (orange), der an der Initiierung der Transkription beteiligt ist, kann direkt durch MeCP2 oder indirekt über mSin3A gehemmt werden. Der dimere Aktivator AP-1 (grau) kann über seine Untereinheit c-Jun an MeCP2 binden und auf diese Weise in seiner transaktivierenden Funktion blockiert werden.

Mein Versuch, die *in vivo* Interaktion zwischen MeCP2 und c-Jun im Zwei-Hybrid-Test in kultivierten menschlichen Zellen zu demonstrieren, war nicht erfolgreich. Die mögliche Ursache war, dass MeCP2 über multiple Repressionsmechanismen verfügt und somit die Expression des Indikatorgens effektiv hemmt. Dass bisher keine Durchmusterung nach einem Interaktionspartner von MeCP2 im Zwei-Hybrid-Test in Hefe beschrieben wurde, unterstützt meine Vermutung. Um weitere unbekannte Interaktionspartner von MeCP2 identifizieren und somit die biologischen Funktionen von MeCP2 vollständig aufklären zu können, muß man andere experimentelle Wege gehen. Die erste Möglichkeit ist die biochemische Isolierung der MeCP2 enthaltenden Komplexe aus Zellen, insbesondere aus Neuronen im Gehirn, weil Mutationen im *MECP2*-Gen die neurologische Störung, Rett-Syndrom, verursachen. Die zweite Möglichkeit bietet das relativ robuste pJuFo-Phagen-Display-System an, wobei die reprimierende Eigenschaft von MeCP2 keinen nachteiligen Einfluß mehr auf diese nicht auf die

Transkription eines Indikatorgens basierende Durchmusterung ausüben kann (Cramer und Suter, 1993).

4.3 MeCP2 reprimiert die LINE1-Transkription *in vivo*.

Zwei Experimente von mir zeigen, dass MeCP2 die L1-Transkription effizient reprimiert. Erstens, Bindung des Fusionsproteins Gal4-TRD_{MeCP2} an die Gal4-Bindungssequenz vor dem L1-Luciferase-Reporterkonstrukt reprimiert die Expression von zwei aktiven L1-Promotoren, L1.3 und L1_{RP}, um 70%. Zweitens, MeCP2 reprimiert einen methylierten L1.3-Reporter um 77%. Frühere Ergebnisse zeigten, dass die Repression der endogenen L1-Elemente in somatischem Gewebe durch Übermethylierung der internen Promotorsequenzen erfolgt (Woodcock *et al.*, 1997; Thayer *et al.*, 1993). Darüber hinaus bewirkte die Cre-vermittelte Deletion des Gens für die Erhaltungsmethyltransferase Dnmt1 eine genom-weite DNA-Demethylierung und Zunahme der Expression von L1 und retroviralen Elementen in kultivierten Maus-Fibroblasten (Jackson-Grusby *et al.*, 2001). Passend zu dieser Modellvorstellung deuten meine Resultate auf eine direkte Vermittlung von MeCP2 in der Repression der endogenen L1-Elemente hin. Im Gegensatz zu den beiden bekannten positiven Regulatoren der L1-Transkription, YY1 und SOX11, bewirkt MeCP2 eine Repression der L1-Transkription (Tchénio *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 1993). Es bleibt zu klären, ob MeCP2 mit YY1 oder SOX11 interagiert, oder mit diesen Faktoren um die Bindungsstelle konkurriert. Die Repression der endogenen L1-Elemente durch MeCP2 könnte für das Verständnis der zum Rett-Syndrom führenden molekularen Ereignisse relevant sein, weil Mutationen des *MECP2*-Gens diese neurologische Störung verursachen (Amir *et al.*, 1999). Während die genauen molekularen Konsequenzen eines nicht-funktionsfähigen MeCP2 in der neuronalen Gen-Expression zur Zeit nicht bekannt sind, werden zwei einander nicht ausschließende Hypothesen vorgeschlagen: Rett-Syndrom könnte durch eine fehlerhafte Regulation einiger wichtigen Gene für die neuronale Physiologie oder alternativ durch ein übermäßiges transkriptionelles „Hintergrundgeräusch“ verursacht werden (Van den Veyver *et al.*, 2000). Die Unterdrückung der endogenen L1-Expression durch MeCP2 wäre konsistent mit der letzten Hypothese. Eine direkte Überprüfung dieses Modells ist, zu untersuchen, ob die Gehirneuronen von Rett-Mädchen und *MECP2*-defizienten Mäusen eine erhöhte Expression von L1-Elementen zeigen. Interessant ist auch eine experimentelle Überprüfung, ob transgene Mäuse mit einer Überexpression von L1-Elementen in Gehirneuronen an Rett-Syndrom erkranken.

Parallel zu meinen *in vivo* Transkriptionstesten konnten Nora Zingler und Gerald Schumann in einem analogen, genetischen Retrotranspositionstest mit HeLa-Zellen zeigen, dass die TRD von MeCP2 die Retrotranspositionshäufigkeit eines Gesamt-L1-Reporter-Konstruktes um 82% reduziert (Yu *et al.*, 2001). Die Retrotranspositionshäufigkeit eines Gesamt-L1-Reporter-Konstruktes nahm nach der *in vitro* M.HpaII-Methylierung ab und reduzierte sich bei einer gleichzeitigen Ko-Expression von MeCP2 noch weiter (Yu *et al.*, 2001). Interessanterweise wurden die Transkription und die Retrotransposition von L1 in zwei solchen unterschiedlichen Experimenten in demselben Maße reprimiert, was auf die Transkription von L1 als den die Geschwindigkeit bestimmenden Schritt des gesamten Retrotranspositionsvorgangs hindeutet. Die Evolutionsgenetik von L1 erfordert seine Expression und Retrotransposition in der Keimbahn. Daher ist es höchstens interessant, dass MeCP2 zwar ubiquitär exprimiert wird, männliche Keimzellen aus Maus aber eine wichtige Ausnahme darstellen (Reichwald *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2000). Daher könnte MeCP2 in der Repression der Expression und der Retrotransposition von L1 in den meisten somatischen Zellen der Maus beteiligt sein. In männlichen Keimzellen kommt aber MeCP2 nicht vor, wo die Retrotransposition stattfindet. In der Tat konnte die L1-Expression im Gametenzyklus der Maus nachgewiesen werden (Branciforte und Martin, 1994; Trelogan und Martin, 1995). Neben MeCP2 können Keimzell-spezifische Faktoren in der Bestimmung eines eingeschränkten Expressionsmusters von L1 beteiligt sein.

Obwohl MBD1v3 und MBD2b *in vitro* auch eine einzelne symmetrisch methylierte CpG-Stellen erkennen, können beide ein methyliertes L1-Konstrukt nicht reprimieren (Hendrich und Bird, 1998; Yu *et al.*, 2001). Da die TRD von MBD2 auch keine L1-Promotor-reprimierende Aktivität im Versuch mit Gal4-Fusionsprotein zeigt, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass L1 kein Zielmolekül des Repressors MBD2 ist. Die Situation von MBD1 ist dagegen anders: seine TRD zeigt durchaus die L1-Promotor-reprimierende Aktivität im Versuch mit Gal4-Fusionsprotein. Das deutet auf eine nicht effiziente Bindung an *in vitro* M.HpaII-methylierten L1-Promotor durch MBD1 hin. Zusammengefasst besitzt MeCP2 allein die Fähigkeit, die Transkription von einem moderat methylierten L1-Promotor zu reprimieren. Meinem Wissen nach ist das die erste Studie, die die selektive Repression eines MBD-Familiemitgliedes demonstriert. Als Erweiterung zu diesem Befund postuliere ich, dass die MBD-Proteine MeCP2, MBD1 und MBD2 unterschiedliche, mindestens teilweise nicht überlappende Funktionen erfüllen und in ihrer Bindung an methylierte DNA-Sequenzen spezifisch sind. Dass MeCP2, MBD1 und MBD2 in unterschiedlichen Repressor-Komplexen vorkommen, unterstützt dieses Modell (Ballestar und Wolffe, 2001).

Die Rolle der DNA-Methylierung in Gewebe-spezifische Gen-Expression während der Entwicklung und der Differenzierung wird viel diskutiert. Eine Korrelation zwischen der DNA-Methylierung und der Gen-Expression wurde für einige Gene beobachtet, während wiederum keine solche Korrelation für einige anderen Gene gefunden werden konnte (Jackson-Grusby, *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2000). Dies könnte bedeuten, dass die DNA-Methylierung nicht für die Repression aller Gene nötig ist. Darüber hinaus wurde postuliert, dass sich die DNA-Methylierung primär aus einem Verteidigungsmechanismus gegen transponierbare Elemente entwickelte (Yoder *et al.*, 1997). Obwohl meine Studie mit transienter Transfektion in kultivierten Zellen diese Kontroverse nicht lösen kann, belegt sie, dass die Rekrutierung von MeCP2 zu methylierten L1-Elementen das Potential hat, L1-Expression in somatischen Zellen zu reprimieren. Interessanterweise wurde seit kurzem bekannt, dass MeCP2 auch an der transkriptionellen Ausschaltung von einer weiteren Retrotransposongruppe, nämlich methylierten LTR-Elementen, beteiligt ist (Lorincz *et al.*, 2001).

Meine Daten weisen darauf hin, dass Alu-Elemente im Gegensatz zu L1-Elementen nicht durch MeCP2 reprimiert werden. Das zeigt, dass die transkriptionelle Aktivität von Alu-Elementen wahrscheinlich einem anderen Regulationsmechanismus unterliegt. Konsistent mit dieser Vermutung ist der experimenteller Befund, dass die Alu-Transkription durch verschiedene Stressfaktoren stimuliert wird (Chu *et al.*, 1998). Da Alu-Elemente als kleine Retrotransposons ohne eigene kodierende Kapazität die Retrotranspositionsmaschinerie von L1 für ihre eigene Verbreitung benutzen, könnte eine negative Regulation der L1-Elemente durch MeCP2 indirekt auch die Ausbreitung von Alu-Elementen reprimieren (Boeke, 1997).

5 Zusammenfassung

DNA-Methylierung ist eine epigenetische Modifikation, die eine wichtige Rolle in der Gen-Regulation, der Embryogenese, der Inaktivierung des X-Chromosoms, der genomischen Prägung (Imprinting), der Inaktivierung von genomischen parasitären Elementen und der Tumorgenese spielt. MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) ist das erste identifizierte Protein, das *in vitro* an methylierte DNA bindet. Durch seine Wechselwirkung mit dem Co-Repressor-Komplex aus mSin3A und HDAC1/2 (histone deacetylase 1/2) stellt es ein Bindeglied zwischen der DNA-Methylierung, der Repression der Gen-Expression und der Chromatinorganisation dar. Dass Mutationen des *MECP2*-Gens bei Mädchen Rett-Syndrom, eine neurologische Störung, verursachen, unterstreicht die große biologische Bedeutung von MeCP2.

Weil MeCP2 *in vitro* an MAR (matrix attachment region) bindet, wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst untersucht, ob MeCP2 *in vivo* an bestimmte, nicht-methylierte DNA binden kann. Dazu wurden HEK293-Zellen mit einem Expressionsplasmid für Gesamt-MeCP2 (1 – 486 aa) und einem Luciferase-Reporterplasmid transient ko-transfiziert. Wenn das 5'-Lysozymgen-MAR aus Huhn beziehungsweise Satelliten-DNA aus Maus stromaufwärts des Reporterpromotors inseriert wurde, reduzierte sich die Luciferase-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Das weist darauf hin, dass der transkriptionelle Repressor MeCP2 an diese beiden nicht-methylierten DNA-Elementen auch unter *in vivo*-Bedingung binden kann.

Durch transiente Transfektion wurde auch die Fragestellung überprüft, ob die Repression von MeCP2 ausschließlich über HDAC erfolgt. HEK293-Zellen wurden mit einem durch Adenovirus Major-Late-Promotor (AdMLP) getriebenen Luciferase-Reporterplasmid und einem Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus der Repressordomäne von MeCP2 (196 – 486 aa) und der Gal4-DNA-Bindungsdomäne ko-transfiziert. Nach Insertion der Gal4-Erkennungssequenz stromaufwärts des AdMLP verminderte sich die Luciferase-Expression. Dass diese Repression durch Zugabe des Histon-Deacetylase-Hemmstoffs Trichostatin A aufgehoben werden konnte, wies auf eine Beteiligung von HDAC hin. Wenn AdMLP durch SV40-Enhancer/Promotor (SV40EP) ersetzt wurde, beobachtete ich in transienten Transfektionsexperimenten eine wesentlich stärkere Repression, die allerdings durch Trichostatin A nicht mehr aufgehoben werden konnte. Ähnliche Versuchsergebnisse mit der minimalen Repressordomäne (196 – 310 aa) und der C-terminalen Region (311 – 486 aa) von MeCP2 erhärteten den Befund, dass die Repression von SV40EP durch MeCP2 nicht durch

Trichostatin A aufgehoben werden konnte. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass MeCP2 auch über einen Histon-Deacetylase-unabhängigen Weg Gen-Expression reprimieren kann.

Um die kritischen Aminosäurereste für die Repressor-Aktivität zu detektieren, wurden sechs Regionen aus neun Aminosäureresten (A bis F) innerhalb der minimalen Repressordomäne gegen die Sequenz des FLAG-Epitops zuzüglich eines Valins ausgetauscht. Die Repressionseigenschaft der sechs Mutanten wurde mit der vom Wildtyp verglichen: die Mutante D verlor fast vollständig die Fähigkeit, SV40EP zu reprimieren; die Mutante E war in seiner Repressorfunktion stark beeinträchtigt; die anderen vier Mutanten reprimierten den SV40EP ungehindert. Zusätzlich konnte der Bereich um die Regionen D und E (249 – 294 aa) die durch die VP16-Aktivierungsdomäne stimulierte Transkription eines Minimal-Promotors unterdrücken, wenn dieser Bereich zwischen der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und der VP16-Aktivierungsdomäne eingebaut wurde. Das zeigt, dass der Bereich um die Regionen D und E das zentrale Kernstück für die Repressor-Aktivität von MeCP2 darstellt.

Die Region D enthält eine hohe Dichte an konservierten basischen Aminosäuren. Zur Untersuchung ihrer Relevanz für die Repression wurden sie paarweise in saure Aminosäuren mutiert. Die basischen Reste K267, R268 und K271 erwiesen sich als essentiell, weil entsprechende Mutanten eine verminderte Repressor-Aktivität zeigten. Die Reste K266 und R270 waren hingegen nicht essentiell.

Um zu untersuchen, ob MeCP2 neben mSin3A noch andere Interaktionspartner hat, wurde das Lysat von HEK293-Zellen separat mit Antikörper gegen fünf verschiedene Transkriptionsfaktoren immunpräzipitiert. Die Anwesenheit von MeCP2 im Immunpräzipitat wurde im Western-Blot überprüft. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass TFIIB, ein genereller Transkriptionsfaktor, und c-Jun, eine Komponente von dem Aktivator AP-1, mit MeCP2 in Wechselwirkung treten. Diese beiden Interaktionen spielen wahrscheinlich eine Rolle bei dem Histon-Deacetylase-unabhängigen Repressionsmechanismus.

Wie die Mutationen im *MECP2*-Gen zum Rett-Syndrom führen, ist zur Zeit in Details noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass einige Gene beziehungsweise Elemente beim Ausfall vom Repressorprotein MeCP2 nicht mehr korrekt reprimiert sind. Einen potentiellen Hinweis auf die Identität solcher Repressionsziele von MeCP2 liefert der Befund, dass die überwiegende Mehrheit der 5'-Methylcytosine in der genomischen DNA bei Säugetieren in den endogenen

transponierbaren Elementen lokalisiert ist und mit der transkriptionellen Abschaltung dieser parasitären Elemente assoziiert ist. Im weiteren Teil meiner Arbeit wurde deshalb untersucht, ob MeCP2 an der negativen Regulation von LINE-1 und Alu, zwei immer noch aktiven Gruppen der Retrotransposons im menschlichen Genom, beteiligt sein könnte.

Die internen PolIII-Promotoren von zwei aktiven LINE-1-Elementen, L1.3 und L1_{RP}, wurden hinter die Gal4-Bindungsstelle und vor das Reporter-gen Luciferase positioniert. Nach einem „Targeting“ der Repressordomäne (TRD) von MeCP2 über Gal4-DNA-Bindungsdomäne an die LINE-1-Promotoren verminderte sich die Luciferase-Expression in transfizierten Zellen. Wenn *in vitro* methylierte L1.3-Reporterkonstrukte mit dem MeCP2-Überexpressionsplasmid ko-transfiziert wurden, ließ sich ebenfalls eine Reduktion der Luciferase-Expression feststellen. Aus diesen beiden Ergebnissen konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Repressordomäne (TRD) von MeCP2 LINE-1-Promotoren transkriptionell reprimieren kann und die DNA-Bindungsdomäne (MBD) von MeCP2 an methylierte LINE-1-Promotoren binden kann. Somit ist LINE-1 ein wahrscheinliches Ziel von MeCP2 *in vivo*.

Um die Spezifität der transkriptionellen Repressoren zu untersuchen, wurden zwei weitere Methyl-CpG bindende Proteine zum Vergleich mit MeCP2 herangezogen. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus HEK293-Zellen isoliert und als Matrize für die RT-PCR Klonierung der cDNAs von MBD1v3 und MBD2b verwendet. In transienten Transfektionsexperimenten unter Benutzung des Reporters Gal4-L1.3-Luciferase konnte nur die Repressordomäne (TRD) von MBD1, nicht aber die von MBD2, den L1.3-Promotor reprimieren. *In vitro* methylierter L1.3-Promotor wurde hingegen weder durch MBD1v3, noch durch MBD2b reprimiert. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass MBD-Proteine funktionell nicht redundant sind und die Repression von LINE-1 durch MeCP2 sehr spezifisch ist.

Der interne PolIII-Promotor von AluSx wurde hingegen durch MeCP2 nicht reprimiert, egal ob der Repressor indirekt über Gal4BD und direkt über die DNA-Methylierung an den Alu-Promotor bindet. Auch MBD1 und MBD2 konnten sich hier nicht als Alu-Repressoren erweisen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die durch die DNA-Methylierung vermittelte Repression der Alu-Expression nicht über MBD-Proteine erfolgt.

6 Literatur

1. 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: 185-8.
2. 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., Lichtarge, O., Smith, E.O., Glaze, D.G. und Zoghbi, H.Y. (2000) Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol* 47: 670-9.
3. Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C. und Fogh, J. (1984) Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest* 50: 147-62.
4. Aravind, L. und Landsman, D. (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 26: 4413-21.
5. Ballestar, E. und Wolffe, A.P. (2001) Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem* 268: 1-6.
6. Bannister, A.J., Oehler, T., Wilhelm, D., Angel, P. und Kouzarides, T. (1995) Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene* 11: 2509-14.
7. Becker, K.G., Swergold, G.D., Ozato, K. und Thayer, R.E. (1993) Binding of the ubiquitous nuclear transcription factor YY1 to a cis regulatory sequence in the human LINE-1 transposable element. *Hum Mol Genet* 2: 1697-702.
8. Benyajati, C. und Worcel, A. (1976) Isolation, characterization und structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 9: 393-407.
9. Berrios, M., Osheroff, N. und Fisher, P.A. (1985) In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4142-6.
10. Bienvenu, T., Carrie, A., de Roux, N., Vinet, M.C., Jonveaux, P., Couvert, P., Villard, L., Arzimanoglou, A., Beldjord, C., Fontes, M., Tardieu, M. und Chelly, J. (2000) MECP2 mutations account for most cases of typical forms of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 1377-84.
11. Bird, A.P. (1992) The essentials of DNA methylation. *Cell* 70: 5-8.
12. Bird, A.P. und Wolffe, A.P. (1999) Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* 99: 451-4.
13. Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction hier procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23.
14. Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C. und Kohwi-Shigematsu, T.

- (1992) Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* 255: 195-7.
15. Bode, J., Schlake, T., Rios-Ramirez, M., Mielke, C., Stengert, M., Kay, V. und Klehr-Wirth, D. (1995) Scaffold/matrix-associated regions: structural properties creating transcriptionally active loci. *Int Rev Cytol* 162A: 389-454.
 16. 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: 34963-7.
 17. Boeke, J.D. (1997) LINEs and Alus – the polyA connection. *Nat Genet* 16: 6-7.
 18. Boissinot, S., Entezam, A. und Furano, A.V. (2001) Selection against deleterious line-1-containing loci in the human lineage. *Mol Biol Evol* 18: 926-35.
 19. Boulikas, T. (1995) Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol* 162A: 279-388.
 20. Branciforte, D. und Martin, S.L. (1994) Developmental and cell type specificity of LINE-1 expression in mouse testis: Implications for transposition. *Mol Cell Biol* 14: 2584-92.
 21. Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. und Cedar, H. (1994) Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371: 435-8.
 22. Brunner, E., Weitzel, J., Heitmann, B., Maurer, T., Strätling, W.H. und Kalbitzer, H.R. (2000) Sequence-specific ¹H, ¹³C, and ¹⁵N assignments of the MAR-binding domain of chicken MeCP2/ARBP. *J Biomol NMR* 17: 175-6.
 23. Buratowski, S. (1994) The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77: 1-3.
 24. Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myöhänen, S., Herman, J.G. und Baylin, S.B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21: 103-7.
 25. Chandler, S.P., Guschin, D., Landsberger, N. und Wolffe, A.P. (1999) The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry* 38: 7008-18.
 26. 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: 327-31.
 27. Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R. und Goodman, R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365: 855-9.
 28. 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.

29. 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: 273-82.
30. Coffee, B., Zhang, F., Warren, S.T. und Reines, D. (1999) Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat Genet* 22: 98-101.
31. Conaway, R.C. und Conaway, J.W. (1993) General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 62: 161-90.
32. Cramer, R. und Suter, M. (1993) Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* 137: 69-75.
33. 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: 256-9.
34. 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. *J Cell Biol* 141: 335-48.
35. Dickinson, L.A. und Kohwi-Shigematsu, T. (1995) Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol Cell Biol* 15: 456-65.
36. Dickinson, L.A., Joh, T., Kohwi, Y. und Kohwi-Shigematsu, T. (1992). A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* 70: 631-45.
37. Diviacco, S., Norio, P., Zentilin, L., Menzo, S., Clementi, M., Biamonti, G., Riva, S., Falaschi, A. und Giacca, M. (1992). A novel procedure for quantitative polymerase chain reactio by coamplification of competitive templates. *Gene* 122: 313-20.
38. Dragich, J., Houwink-Manville, I. und Schanen, C. (2000) Rett syndrome: a surprising result of mutation in MECP2. *Human Molecular Genetics* 9: 2365-75.
39. Dynan, W.S. und Tjian, R. (1983) Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell* 32: 669-80.
40. Dynlacht, B.D., Hoey, T. und Tjian, R. (1991) Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66: 563-76.
41. Eckner, R., Ewen, M.E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J.A., Lawrence, J.B. und Livingston, D.M. (1994) Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* 8: 869-84.
42. Eden, S. und Cedar, H. (1994) Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev* 4: 255-9.
43. Eilers, A.L., Billin, A.N., Liu, J. und Ayer, D.E. (1999) A 13-amino acid amphipathic alpha-

- helix is required for the functional interaction between the transcriptional repressor Mad1 and mSin3A. *J Biol Chem* 274: 32750–6.
44. Fackelmayer, F.O., K. Dahm, A. Renz, U. Ramsperger, und A. Richter. (1994) Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur J Biochem* 221: 749–57.
 45. Ferreri, K., Gill, G. und Montminy, M. (1994) The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1210-3.
 46. Fields, S. und Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-7.
 47. Franklin, C.C., McCulloch, A.V. und Kraft, A.S. (1995) In vitro association between the Jun protein family and the general transcription factors, TBP and TFIIB. *Biochem J* 305: 967-74.
 48. Fujita, N., Shimotake, N., Ohki, I., Chiba, T., Saya, H., Shirakawa, M. und Nakao, M. (2000) Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20: 5107-18.
 49. 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: 6415-26.
 50. Furano, A.V. (2000) The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64: 255-94.
 51. Gasser, S.M. und Laemmli, U.K. (1987) A glimpse at chromosomal order. *Trends Genet* 3: 16-22.
 52. Gasser, S.M., Laroche, T., Falquet, J., Boy de la Tour, E. und Laemmli, U.K. (1986) Metaphase chromosome structure: involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol* 188: 613-29.
 53. Goodrich, J.A., Hoey, T., Thut, C.J., Admon, A. und Tjian, R. (1993) Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell* 75: 519-30.
 54. 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: 456-67.
 55. 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.
 56. Grozinger, C.M., Hassig, C.A. und Schreiber, S.L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96: 4868–73.
 57. 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: 322-6.
 58. Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V.V. und Ulevitch, R.J. (1997) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386: 296-9.

59. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80.
60. Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P. und Cato, A.C. (1994) A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* 13: 4087-95.
61. Hendrich, B. und Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18: 6538-47.
62. Hendrich, B., Abbott, C., McQueen, H., Chambers, D., Cross, S. und Bird, A. (1999b) Genomic structure and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18: 6538-47.
63. 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: 301-4.
64. 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: 710-23.
65. Hendzel, M.J., Delcuve, G.P. und Davie, J.R. (1991) Histone deacetylase is a component of the internal nuclear matrix. *J Biol Chem* 266: 21936-42.
66. Hoey, T., Weinzierl, R.O., Gill, G., Chen, J.L., Dynlacht, B.D. und Tjian, R. (1993) Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 72: 247-60.
67. Holler, M., Westin, G., Jiricny, J. und Schaffner, W. (1988) Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev* 2: 1127-35.
68. International Human Genome Sequencing Consortium. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
69. Izaurralde, E., Käs, E. und Laemmli, U.K. (1989) Highly preferential nucleation of histone H1 assembly on scaffold-associated regions. *J Mol Biol* 210: 573-85.
70. Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E. und Jaenisch, R. (2001) Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* 27: 31-9.
71. Jay, P., Goze, C., Marsollier, C., Taviaux, S., Hardelin, J.P., Koopman, P. und Berta, P. (1995) The human SOX11 gene: cloning, chromosomal assignment and tissue expression. *Genomics* 29: 541-5.
72. Jenuwein, T., Forrester, W.C., Fernandez-Herrero, L.A., Laible, G., Dull, M. und Grosschedl, R. (1997) Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* 385: 269-72.
73. 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: 187-91.
74. Kadosh, D. und Struhl, K. (1997) Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* 89: 365-71.
75. 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: 1921-8.
76. Kao, H.-Y., Downes, M., Ordentlich, P. und Evans, R.M. (2000) Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev* 14: 55-66.
77. Kazazian, H.H. und Moran, J.V. (1998) The impact of L1 retrotransposition on the human genome. *Nat Genet* 19: 19-24.
78. Kiledjian, M. und Dreyfuss, G. (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* 11: 2655-64.
79. 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: 6833-44.
80. Kimberland, M.L., Divoky, V., Prchal, J., Schwahn, U., Berger, W. und Kazazian, H.H. (1999) Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum Mol Genet* 8: 1557-60.
81. Koipally, J., Renold, A., Kim, J. und Georgopoulos, K. (1999) Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J* 18: 3090-100.
82. Kokura, K., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Nomura, T., Khan, M.M., Shinagawa, T., Yasukawa, T., Colmanares, C. und Ishii, S. (2001) The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* 276: 34115-21.
83. Koumenis, C., Alarcon, R., Hammond, E., Sutphin, P., Hoffman, W., Murphy, M., Derr, J., Taya, Y., Lowe, S.W., Kastan, M. und Giaccia, A. (2001) Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol* 21: 1297-310.
84. Kvanta, A. und Fredholm, B.B. (1993) Synergistic effects between protein kinase C and cAMP on activator protein-1 activity and differentiation of PC-12 pheochromocytoma cells. *J Mol Neurosci* 4: 205-14.
85. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
86. Laemmli, U. K., Käs, E., Poljak, L. und Adachi, Y. (1992) Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev* 2: 275-85.

87. Lewis, C.D. und Laemmli, U.K. (1982) Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell* 29: 171-81.
88. 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: 905-14.
89. Li, E., Bestor, T.H. und Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-26.
90. Liu, W.-M. und Schmid, C.W. (1993) Proposed roles for DNA methylation in Alu transcriptional repression and mutational inactivation. *Nucleic Acids Res* 21: 1351-9.
91. 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: 4918-26.
92. Lorincz, M.C., Schübeler, D. und Groudine, M. (2001) Methylation-mediated proviral silencing is associated with MeCP2 recruitment and localized Histone H3 deacetylation. *Mol Cell Biol* 21: 7913-22.
93. Ludérus, M.E., de Graaf, A., Mattia, E., den Blaauwen, J.L, Grande, M.A., de Jong, L. und van Driel, R. (1992) Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* 70: 949-59.
94. Luo, R.X., Postigo, A.A. und Dean, D.C. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92: 463-73.
95. MacDonald, G.H., Itoh-Lindstrom, Y. und Ting, J.P. (1995) The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *J Biol Chem* 270: 3527-33.
96. 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: 6943-7.
97. 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: 5085-92.
98. Mirkovitch, J., Mirault, M. und Laemmli, U.K. (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* 39: 223-32.
99. Mlynarova, 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: 417-26.
100. Moran, J.V., DeBerardinis, R.J. und Kazazian, H.H. (1999) Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 283: 1530-4.
101. Moran, J.V., Holmes, S.E., Naas, T.P., DeBerardinis, R.J., Boeke, J.D. und Kazazian, H.H. (1996) High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* 87: 917-27.
102. Müller, C., Readhead, C., Diederichs, S., Idos, G., Yang, R., Tidow, N., Serve, H., Berdel, W.E. und Koeffler, H.P. (2000) Methylation of the cyclin A1 promoter correlates with gene

- silencing in somatic cell lines, while tissue-specific expression of cyclin A1 is methylation independent. *Mol Cell Biol* 20: 3316-29.
103. Muscat, G.E., Burke, L.J. und Downes, M. (1998) The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70. *Nucleic Acids Res* 26: 2899-907.
104. Nan, X., Campoy, F.J. und Bird, A. (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88: 471-81.
105. 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: 4886-92.
106. 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: 386-9.
107. Nan, X., Tate, P., Li, E. und Bird, A. (1996) DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol* 16: 414-21.
108. Naylor, 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: 3542-9.
109. Ng, H.-H. und Bird, A. (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 9: 158-63.
110. Ng, H.-H., Jeppesen, P. und Bird, A. (2000) Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20: 1394-406.
111. 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.
112. Nickerson, J.A., Blencowe, B.J. und Penman, S. (1995) The architectural organization of nuclear metabolism. *Int Rev Cytol* 162A: 67-123.
113. 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: 247-57.
114. Ostertag, E.M., Luning Prak, E.T., DeBerardinis, R.J., Moran, J.V. und Kazazian, H.H. (2000) Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic Acids Res.* 28: 1418-23.
115. Park, K. und Atchison, M.L. (1991) Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3-prime enhancer and the immunoglobulin heavy-chain micro-E1 site. *Proc Nat Acad Sci* 88: 9804-8.
116. Paulson, J.R. und Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12: 817-28.
117. Phi-Van, L. und Strätling, W.H. (1988) The matrix attachment regions of the chicken

- lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *EMBO J* 7: 655-64.
118. Phi-Van, L. und Strätling, W.H. (1990) *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 11: 1-11.
119. 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. *Biochemistry* 35: 10735-42.
120. 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: 2302-7.
121. 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: 648-51.
122. Razin, A. (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J* 17: 4905-8.
123. Reichwald, K., Thiesen, J., Wiehe, T., Weitzel, J., Poustka, W.A., Rosenthal, A., Platzer, M., Strätling, W.H. und Kioschis, P. (2000) Comparative sequence analysis of the *MECP2*-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mamm Genome* 11: 182-90.
124. Renz, A. und Fackelmayer, F.O. (1996) Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic Acids Res.* 24: 843-9.
125. Rett, A. (1966) Über ein zerebral-atrophisches Syndrom bei Hyperammonämie. Bruder Hollinek, Wien.
126. Riggs, A.D. und Pfeifer, G.P. (1992) X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet* 8: 169-74.
127. Robertson, K.D. (2001) DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 20: 3139-55.
128. Roeder, R.G. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21: 327-35.
129. Rogatsky, I., Hittelman, A.B., Pearce, D. und Garabedian, M.J. (1999) Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 19: 5036-49.
130. Rountree, M.R. (2001) DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20: 3156-65.
131. Roy, A.M., West, N.C., Rao, A., Adhikari, P., Aleman, C., Barnes, A.P. und Deininger, P.L. (2000) Upstream flanking sequences and transcription of SINES. *J Mol Biol* 302: 17-25.
132. Saluz, H.P., Jiricny, J. und Jost, J.P. (1986) Genomic sequencing reveals a positive

- correlation of strand-specific DNA demethylation of the overlapping estradiol / glucocorticoid receptor binding sites and the rates of avian vitellogenin mRNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7167-71.
133. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-7.
134. 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. (1997) Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* 16: 37-43.
135. Schwahn, U., Lenzner, S., Dong, J., S. Feil, S., Hinzmann, B., van Duijnhoven, G., Kirschner, R., Hemberger, M., Bergen, A.A., Rosenberg, T., Pinckers, A.J., Fundele, R., Rosenthal, A., Cremers, F.P., Ropers, H.H. und Berger, W. (1998) Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nat Genet* 19: 327-32.
136. Shi, Y., Seto, E., Chang, L.-S. und Shenk, T. (1991) Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 67: 377-88.
137. Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Chuu, Y.H. und Sekiya, T. (1999) 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: 1127-31.
138. Singh, G.B., Kramer, J.A. und Krawetz, S.A. (1997) Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res* 25: 1419-25.
139. 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: 343-5.
140. Stout, J.T. und Caskey, C.T. (1985) HPRT: Gen structure. Expression and Mutation, *Ann Rev Genet* 19: 127-48.
141. 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: 311-8.
142. Tanese, N., Pugh, B.F. und Tjian, R. (1991) Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex. *Genes Dev* 5: 2212-24.
143. Tanese, N., Saluja, D., Vassallo, M.F., Chen, J.L. und Admon, A. (1996) Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13611-6.
144. Tate, P.H. und Bird, A.P. (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3: 226-31.
145. Tatematsu, K., Yamazaki, T. und Ishikawa, F. (2000) MBD2-MBD3 complex binds to hemimethylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes to Cells* 5: 677-88.
146. Tchénio, T., Casella, J.-F. und Heidmann, T. (2000) Members of the SRY family regulate the

- human LINE retrotransposons. *Nucleic Acids Res* 28: 411-5.
147. Thayer, R.E., Singer, M.F. und Fanning, T.G. (1993) Undermethylation of specific LINE-1 sequences in human cells producing a LINE-1-encoded protein. *Gene* 133: 273-7.
148. Thiesen, J. (2001) Expressions- und Funktionsanalyse des Kernproteins MeCP2. Dissertation an der Universität Hamburg.
149. Timmermann, S., Lehrmann, H., Polesskaya, A. und Harel-Bellan, A. (2001) Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* 58: 728-36.
150. 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: 1093-101.
151. 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: 1520-24.
152. Turner, B.M. (1993) Decoding the nucleosome. *Cell* 75: 5-8.
153. Van den Veyver, I.B. und Zoghbi, H.Y. (2000) Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 10: 275-9.
154. van Drunen, C.M., Sewalt, R.G., Oosterling, R.W., Weisbeek, P.J., Smeekens, S.C. und van Driel, R. (1999) A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. *Nucleic Acids Res* 27: 2924-30.
155. van Steensel, B., Delrow, J. und Henikoff, S. (2001) Chromatin profiling using targeted DNA adenine methyltransferase. *Nat Genet* 27: 304-8.
156. 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: 293-4.
157. von Kries, J.P., Buck, F. und Strätling, W.H. (1994) Chicken MAR binding protein p120 is identical to human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) U. *Nucleic Acids Res* 22: 1215-20.
158. 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: 123-35.
159. 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: 1055-65.
160. Watt, F. und Molloy, P.L. (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* 2: 1136-43.
161. Wei, W., Morrish, T.A., Alisch, R.S. und Moran, J.V. (2000) A transient assay reveals that cultured human cells can accommodate multiple LINE-1 retrotransposition events. *Anal*

Biochem 284: 435-8.

162. 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: 5656-66.
163. Wong, C.W. und Privalsky, M.L. (1998) Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor: multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB. *Mol Cell Biol* 18: 5500-10.
164. 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: 7810-6.
165. Xing, L., Gopal, V.K. und Quinn, P.G. (1995) cAMP response element-binding protein (CREB) interacts with transcription factors IIB and IID. *J Biol Chem* 270: 17488-93.
166. 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: 187-91.
167. Yang, X.-J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. und Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382: 319-24.
168. Yoder, J.A., Walsh, C.P. und Bestor, T.H. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335-9.
169. Yoshida, M., Horinouchi, S. und Beppu, T. (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* 17: 423-30.
170. Yu, F., Thiesen, J. und Strätling, W.H. (2000) Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res* 28: 2201-6.
171. 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: 4493-501.
172. Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Reinberg, D. (1997) Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 89: 357-64.
173. 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: 1924-35.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

aa	amino acids
bp	base pairs
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
chARBP	chicken attachment region binding protein
Ci	Curie
CD	C-terminale Domäne
CMV	Cytomegalovirus
cpm	counts per minute
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desxyribonuklease
DNMT	<i>de novo</i> Methyltransferase
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	1, 4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	expressed sequence tags
FCS	fötales Kalbsserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
Gal4BD	Gal4 DNA binding domain
GR	glucocorticoid receptor
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde(n)
HDAC	histone deacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hMeCP2	human methyl-CpG-binding protein 2
HRP	horseradish peroxidase
MBD	Methyl-CpG bindende Domäne
mSin3A	mamalian SWI INdependent
N-CoR	nuclear corepressor
hnRNP	heterogeneous nuclear riboneoprotein
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

LB	Luria-Bertani
LINE	long interspersed element
LTR	long terminal repeat
M	Molar
MAR	matrix attachment region
MBD	methyl CpG binding domain
mCi	Millicurie
MCS	multiple cloning site
min	Minute(n)
MLP	major late promotor
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NLS	nuclear localisation signal
nt	Nukleotide
ORF	open reading frame
p. A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PolII	RNA-Polymerase II
PolIII	RNA-Polymerase III
Rb	Retinoblastomaprotein
RLU	relative light units
RNase	Ribonuklease
RP	retinitis pigmentosa
rpm	rounds per minute
RT-PCR	reverse transkription polymerase chain reaction
SAF	scaffold attachment factor
SAR	scaffold attachment region
SATB	specific AT-rich DNA binding protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SINE	short interspersed element
TAF	TBP associated factor(s)
TBP	TATA-box binding protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRD	transkriptionelle repressor domain
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Trichostatin A
U	Units
UKE	Universitäts-Klinikum Eppendorf
UV	ultraviolettes Licht
VP16AD	virus protein 16 activation domain
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl- β -D-galactopyranosid
YB-1	Y box binding protein 1
YY1	Yin-Yang 1

7.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 1997 bis Juli 2001 am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion der Universität Hamburg unter Leitung von meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Wolf H. Strätling, angefertigt.

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Wolf H. Strätling für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und wertvolles Betreuen im Verlauf der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach für die Vertretung meiner Arbeit gegenüber dem Fachbereich Biologie.

Dr. Joachim Weitzel, Dr. Stefan Hamann, Dr. Jens Thiesen, Christoph Koch, Jan Buschdorf und Olaf Frese für ihre kollegiale Unterstützung im Labor und das Schaffen einer stimulierenden Forschungsatmosphäre.

Dr. Gerald Schumann und Nora Zingler für ihre produktive Diskussion und die erfolgreiche Kooperation, die zu einer gemeinsamen Veröffentlichung führten.

Allen Kollegen in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion für die schöne Zeit im Keller des unter Denkmalschutz stehenden Hauses 72.

Meinen Eltern, meiner Freundin Yi und meiner Hamburger Gastfamilie Joos für ihre verständnisvollen Unterstützungen.

7.3 Lebenslauf

Familienname: Yu

Vorname: Fang

Geburtsdatum: 5.4.1971

Geburtsort: Shanghai, China

September 1978 - August 1983

Besuch der Grundschule Jiujianglu in Shanghai

September 1983 - August 1989

Besuch des Gymnasiums Waiyu in Shanghai und Erwerb des chinesischen Abiturabschlusses

September 1989 - Juli 1990

Biologiestudium an der Universität Fudan in Shanghai

August 1990 - September 1991

Besuch des Studienkollegs an der Universität Hamburg und Erwerb der deutschen Hochschulreife

Oktober 1991- Juli 1997

Biologiestudium an der Universität Hamburg als Stipendiat der Friedrich-Ebert-Stiftung und Erwerb des Diplomabschlusses im Hauptfach Biochemie sowie in den Nebenfächern Genetik und Informatik

Oktober 1997 - Juli 2001

Naturwissenschaftliche Promotion im Labor von Prof. Dr. Wolf H. Strätling im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie am UKE in Hamburg

August 2001 -

Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Labor von Dr. Dietmar Kuhl im Zentrum für Molekulare Neurobiologie (ZMNH) in Hamburg

7.4 Veröffentlichungen

1. 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 - 8.
2. **Yu, F.**, Thiesen, J. und Strätling, W.H. (2000) Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res* 28: 2201-6.
3. **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: 4493-501.

Abstract

1. **Yu, F.** und Strätling W.H. MeCP2 can repress transcription by an alternative, HDAC-independent pathway. Fall Meeting of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Hamburg, *Biol Chem*, 380, 1999, Special Supplement, 209.

7.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe 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

.....

(Fang Yu)