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.