

# **Proteininteraktionspartner des humanen Methyl-CpG-Bindungsproteins 2 (MeCP2)**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jan Paul Buschdorf

Hamburg, 2003

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. H. STRÄTLING

Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. H. BRETTING

Tag der Disputation: 13. Dezember 2002

Hamburg, den 29. November 2002



A handwritten signature in dark ink, appearing to read "U. Wienand".

Professor Dr. U. Wienand  
Dekan

# INHALTSVERZEICHNIS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>   | <b>13</b> |
| 2.1 Primer   | 13        |
| 2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung   | 14        |
| 2.3 Agarose-Gelelektrophorese  | 14        |
| 2.4 DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen  | 14        |
| 2.5 Ligation von DNA   | 15        |
| 2.6 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Stamm XL1-Blue)                             | 15        |
| 2.7 Präparation von Plasmid-DNA  | 17        |
| 2.8 DNA-Sequenzierung  | 18        |
| 2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)  | 18        |
| 2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)   | 19        |
| 2.11 Western-Blotting  | 20        |
| 2.12 Das MATCHMAKER two-hybrid-System 2 der Firma Clontech   | 21        |
| 2.13 Hefemedium  | 24        |
| 2.14 Lagerung von Hefen  | 25        |
| 2.15 Phänotyp-Test   | 25        |
| 2.16 Transformation von Hefezellen mit der Lithium Acetat/<br>einzelsträngige Träger-DNA/Polyethylenglykol-Methode | 25        |
| 2.16.1 Standard Transformation von Hefe  | 26        |
| 2.16.2 “Quick and easy“ Transformation   | 27        |
| 2.17 Proteinextraktion aus Hefen durch die Harnstoff/SDS-Methode oder<br>durch alkalische Lyse                     | 27        |
| 2.18 Durchführung eines Hefe two-hybrid-assays   | 29        |

|   |    |
|---|----|
| 2.18.1 Colony-lift filter-assay zum Test der Aktivierung des <i>lacZ</i> -Reportergens  | 30 |
| 2.18.2 Test auf Aktivierung des <i>HIS3</i> -Reportergens   | 30 |
| 2.19 Vorbereitung und Durchführung des Hefe two-hybrid-Screenings   | 31 |
| 2.19.1 Konstruktion des Bait-Plasmids   | 31 |
| 2.19.2 Bestätigung der Expression des Bait-Proteins   | 31 |
| 2.19.3 Test auf Selbstaktivierung und Bestimmung der optimalen 3-AT-Konzentration   | 31 |
| 2.19.4 Amplifikation der HeLa-cDNA-Bibliothek   | 32 |
| 2.19.5 Transformation des Bait-Plasmides und der cDNA-Bibliothek  | 32 |
| 2.19.6 Selektion zweifach positiver Klone und Eliminierung „falsch Positiver“   | 33 |
| 2.20 Plasmidisolation aus Hefen, Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen (Stamm HB101) und Elektroporation von <i>E. coli</i> (Stamm HB101) | 34 |
| 2.20.1 Plasmidisolation aus Hefen   | 34 |
| 2.20.2 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen (Stamm HB101)  | 35 |
| 2.20.3 Elektroporation von <i>E. coli</i> (Stamm HB101)   | 35 |
| 2.21 Isolierung von genomischer DNA aus Menschenblut  | 36 |
| 2.22 PCR zur Amplifikation von Teilen des humanen <i>MECP2</i> -Gens  | 37 |
| 2.23 Kultur humaner Krebszellen   | 38 |
| 2.24 Mammalian two-hybrid-assay   | 39 |
| 2.24.1 Plasmide   | 39 |
| 2.24.2 Transiente Transfektion und Analyse  | 39 |
| 2.25 Immunocytoologische Untersuchungen   | 40 |
| 2.26 GST pull down-assay  | 42 |
| 2.27 Coimmunpräzipitation   | 44 |

|  |    |
|--|----|
| <b>3 ERGEBNISSE</b>  | 48 |
| 3.1 Hefe two-hybrid-Screens  | 48 |
| 3.2 Hefe two-hybrid-assays   | 50 |
| 3.3 Mammalian two-hybrid-assays  | 53 |
| 3.4 Immunocytoologische Untersuchungen                                 | 53 |
| 3.5 MeCP2 bindet an die WW-Domänen von FBP11 und HYPIC <i>in vitro</i> | 57 |
| 3.6 Die WW-Domänen Bindungsregion (WDR) liegt im C-Terminus von MeCP2  | 61 |
| 3.7 MeCP2 bindet an die WW-Domänen von FBP11 und HYPIC <i>in vivo</i>  | 64 |
| 3.8 Vergleich mit Genotyp/Phänotyp-Studien von Rett-Syndrom-Patienten  | 68 |
| 3.9 Mutationen im <i>MECP2</i> -Gen                                    | 70 |
| <b>4 DISKUSSION</b>  | 73 |
| <b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>   | 84 |
| <b>6 LITERATUR</b>   | 87 |
| <b>7 ANHANG</b>  | 97 |
| 7.1 Abkürzungen  | 97 |
| 7.2 Danksagung   | 99 |

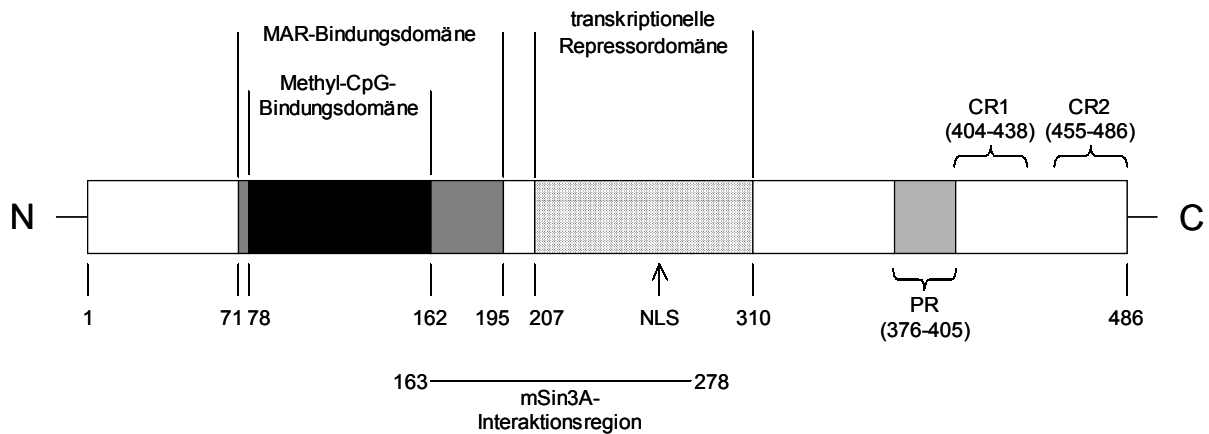
# 1 EINLEITUNG

Das Kernprotein MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) wurde in zwei Laboratorien unabhängig voneinander entdeckt. Im Labor von Prof. Wolf H. Strätling wurde im Huhn ein Protein identifiziert, das an das 5' MAR-Element (MAR für matrix attachment region) des Hühner-Lysozymgens und an MARs aus *Drosophila*, Maus und Mensch bindet. Es wurde daher attachment region binding protein (ARBP) genannt (von Kries et al., 1991). 1997 stellte sich heraus, daß dieses Protein homolog zum Protein MeCP2 ist (Weitzel et al., 1997), das in der Ratte im Labor von Adrian Bird gefunden wurde (Lewis et al., 1992). MeCP2 wurde aufgrund seiner Eigenschaft, an methylierte DNA-Fragmente zu binden, identifiziert und benannt. Im folgenden wird hauptsächlich die Bezeichnung MeCP2 verwendet.

Menschliches MeCP2 besteht aus 486 Aminosäuren. MeCP2 ist hoch konserviert zwischen Mensch, Ratte, Huhn und dem afrikanischen Krallenfrosch. Bisher wurden zwei funktionelle Domänen charakterisiert (Abb. 1): die DNA-Bindungsdomäne und die transkriptionelle Repressordomäne. Die DNA-Bindungsdomäne liegt in einer evolutionär stark konservierten Region in der N-terminalen Hälfte des Proteins. Die MAR-Bindungsdomäne wurde auf einen Bereich von 125 Aminosäuren eingegrenzt (aa 71-195) und schließt die Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) ein, die 85 Aminosäuren lang ist (aa 78-162). Die MBD ist in der Lage, an ein einziges, symmetrisch methyliertes CpG innerhalb einer DNA-Sequenz zu binden (Nan et al., 1993). MeCP2 bindet *in vitro* an unmethylierte sowie methylierte Mäuse- und Hühner-Satelliten-DNA (Weitzel et al., 1997). In Übereinstimmung damit wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt, daß MeCP2 ein abundanter Bestandteil vom pericentromeren Heterochromatin in Mäusechromosomen ist, welches Satelliten-DNA enthält und *in vivo* stark methyliert ist (Lewis et al. 1992). Es ist daher wahrscheinlich, daß MeCP2 auch *in vivo* an methylierte Sequenzen bindet. Die Methylierung genomischer DNA-Sequenzen spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Säugetieren und ist entscheidend für Vorgänge wie der transkriptionellen Repression von Genaktivität, genomisches Imprinting, der Inaktivierung des X-Chromosoms und Krebs. Durch NMR-Spektroskopie wurde die Struktur der Methyl-CpG-Bindungsdomäne von humanem MeCP2 aufgeklärt (Wakefield et al., 1999; Brunner et al., 2000). Die MBD von MeCP2 bildet eine keilförmige Tertiärstruktur, die bisher bei keinem anderen Protein gefunden wurde (Wakefield et al., 1999). Ein Vergleich der MeCP2-MBD-Sequenz mit verschiedenen Datenbanken führte zur Identifizierung von vier weiteren Proteinen, die alle ein MBD-

Sequenzmotiv aufwiesen und als MBD1, 2, 3 und 4 bezeichnet wurden (Cross et al., 1997; Hendrich und Bird, 1998).

#### hMeCP2



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur des humanen Methyl-CpG-Bindungsproteins 2 (hMeCP2)

Die funktionellen Domänen sind grau markiert: MAR- und Methyl-CpG-Bindungsdomäne, transkriptionelle Repressordomäne; CR1 und CR2, konservierte Region 1 und 2; PR, Proline-reiche Region; NLS, Kernlokalisationssignal; (in Klammern ist der entsprechende Aminosäureabschnitt angegeben). Die Zahlen unter dem Protein geben die MeCP2-Aminosäureposition an. Außerdem ist die mSin3A Interaktionsregion angegeben.

Die zweite funktionelle Domäne von MeCP2 ist die transkriptionelle Repressordomäne (TRD) im Zentrum des Proteins (Abb. 1). Durch *in vitro*-Transkriptionsuntersuchungen wurde festgestellt, daß MeCP2 spezifisch methylierte Gene reprimiert (Nan et al., 1997). Mit Hilfe von Fusionsproteinen bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 und verschiedenen MeCP2-Fragmenten in Kombination mit Reporteranalysen konnte die Repressoraktivität auf den Bereich der Aminosäuren 207 bis 310 eingegrenzt werden. Mit diesen Experimenten konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die TRD auch *in vivo* die Transkription reprimiert (Nan et al., 1997). Durch Coimmunpräzipitations-Experimente konnte mSin3A (mammalian SWI independent) als Interaktionspartner der TRD von MeCP2 identifiziert werden (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998). Mittels mSin3A werden auch die Histondeacetylasen 1 und 2 durch MeCP2 rekrutiert (Nan et al., 1998). mSin3A und die Histondeacetylasen 1 und 2 sind Bestandteil eines großen Corepressorkomplexes, zu dem ferner die Proteine RbAp 46 und 48 (Retinoblastoma protein-associated protein 46/48) und SAP18 und 30 (silencer associated protein 18/30) gehören und der als Sin3-Repressor-komplex bezeichnet wird. mSin3A ist mit 1219 Aminosäuren ein großes Protein, daß durch

zahlreiche weitere Repressoren/Proteine gebunden werden kann, beispielsweise Mad, Ume6, N-CoR (nuclear receptor co-repressor), SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid-hormone receptors), Ski und p53 (Knoepfler und Eisenman, 1999). Durch diese und andere Untersuchungen ergibt sich folgendes Bild: Chromatin-gebundenes MeCP2 rekrutiert mittels mSin3A die Histondeacetylasen 1 und 2 zu methylierten Promotoren. Dies führt zu einer lokalen Deacetylierung der in den Nukleosomen vorhandenen Histonen (und möglicherweise auch anderer Proteine) und somit zu einer kompakten Chromatinstruktur, die für die Transkriptionsmaschinerie nicht mehr zugänglich ist. Die Funktionalität der Histondeacetylasen konnte durch die Verwendung des Histondeacetylaseinhibitors Trichostatin A gezeigt werden: Durch den Einsatz von Trichostatin A konnte die transkriptionelle Repression zumindest teilweise wieder aufgehoben werden (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998). MeCP2 verbindet auf diese Weise zwei generelle Mechanismen der Genregulation, DNA-Methylierung und Histondeacetylierung. Es gibt jedoch auch eine transkriptionelle Repression durch MeCP2, die unabhängig von Histondeacetylierung stattfindet (Yu et al., 2000; Kaludov und Wolffe, 2000). Wie oben schon erwähnt wird die Repression des menschlichen  $\beta$ -Aktin-Promotors durch Trichostatin A nur teilweise wieder aufgehoben (Nan et al., 1998). Yu et al. (2000) konnten durch Reporteranalysen zeigen, daß die transkriptionelle Repression des SV40-Promotors durch die MeCP2-TRD nicht durch Trichostatin A aufgehoben werden kann. Die Repression des SV40-Promotors ist Histondeacetylase-unabhängig. Im Gegensatz dazu wird die (schwache) Repression des adenoviralen „major late promoter“ durch Trichostatin A aufgehoben, sie ist Histondeacetylase-abhängig. Der Mechanismus der Repression wird durch den Promotor bestimmt, wobei es durchaus denkbar ist, wie im Falle des  $\beta$ -Aktin-Promotors, daß beide Mechanismen gleichzeitig eine Rolle spielen (Yu et al., 2000). Kaludov und Wolffe (2000) konnten ebenfalls einen Histondeacetylase-unabhängigen Weg der Repression für MeCP2 nachweisen: In einem *in vitro*-Transkriptionssystem konnte MeCP2 die Transkription von methylierter DNA, die nicht in Nukleosomen verpackt war, reprimieren. Durch GST pulldown-Experimente konnten sie ferner eine Interaktion der MeCP2-TRD mit TFIIB nachweisen und somit möglicherweise den Histondeacetylase-unabhängigen Weg der Repression näher charakterisieren.

Durch GST pulldown-Experimente und Coimmunpräzipitation konnten zwei weitere Interaktionspartner von MeCP2, c-Ski und N-CoR, identifiziert werden (Kokura et al., 2001). c-Ski und das aus derselben Genfamilie stammende Protein Sno (*ski-related novel gene*) wirken als Corepressoren und binden direkt an zwei weitere Corepressoren, N-CoR/SMRT und mSin3A (Nomura et al., 1999). N-CoR und SMRT wurden als Corepressoren für



Hormon-Kernrezeptoren identifiziert (Hörlein et al., 1995; Chen et al., 1995) und bilden einen Komplex mit den Histondeacetylasen 3, 4, 5 und 7 (Huang et al., 2000; Kao et al., 2000, Guenther et al., 2000; Li et al., 2000). Die Region im MeCP2-Protein, die für die Bindung von c-Ski wichtig ist, umfaßt die Aminosäuren 163 bis 320 und schließt die TRD ein (Kokura et al., 2001). Durch Phage-Display, far Western- und GST pull down-Experimente wurde MeCP2 als Bindungspartner von HMGB1 (High Mobility Group protein 1) identifiziert (Dintilhac und Bernués, 2001). Das Kernprotein HMGB1 ist Bestandteil von Chromatin und interagiert mit vielen Proteinen unterschiedlicher Funktion. Die Autoren vermuten, daß HMGB1 eine zentrale Rolle bei der Assemblierung oder Stabilisierung verschiedener, multifunktionaler Proteinkomplexe spielen könnte. Während über die MBD und die TRD von MeCP2 schon relativ viele Daten vorliegen, ist über die ebenfalls stark konservierte C-terminale Region (Aminosäuren 311 bis 486) noch wenig bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, daß die letzten 63 Aminosäuren von MeCP2 an der Bindung nukleosomal verpackter DNA beteiligt sind (Chandler et al., 1999). Möglicherweise liegt im C-Terminus auch die Region, die für die Interaktion mit HMGB1 wichtig ist (Dintilhac und Bernués, 2001).

In einer Publikation von Bedford et al. von 1997 wurde MeCP2 durch Expressionsscreening und far Western-Experimente als Bindungspartner der WW-Domänen des Spleißfaktors FBP11 (formin binding protein 11) identifiziert. WW-Domänen sind kleine, sich unabhängig faltende Proteindomänen, die aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehen (Macias et al., 1996; Ranganathan et al., 1997) und Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. WW-Domänen (auch WWP-Domänen genannt) sind durch zwei hochkonservierte Tryptophan-Reste und einem Prolin-Rest charakterisiert und binden Prolin-reiche Sequenzen. Proteine mit WW-Domänen sind in viele verschiedene zelluläre Vorgänge eingebunden, z.B. Ubiquitin vermittelte Proteindegradation (Staub et al., 1996; Wang et al., 1999), virale Knospung (Craven et al., 1999; Harty et al., 1999), Spleißen von RNA (Wang et al., 1998; Bedford et al., 1998), transkriptionelle Coaktivierung (Gavva et al., 1997; Yagi et al., 1999; Waragai et al., 1999) und Mitose (Yaffe et al., 1997; Shen et al., 1998). Einige WW-Domänen enthaltende Proteine wurden direkt oder indirekt mit verschiedenen menschlichen Krankheiten in Verbindung gebracht wie Liddle-Syndrom, Duchenne-Muskeldystrophie, Chorea-Huntington, Alzheimer (Staub et al., 1996; Rentschler et al., 1999; Faber et al., 1998; Sudol et al., 2001) und Krebs (Bednarek et al., 2000; Sudol und Hunter, 2000). WW-Domänen werden aufgrund ihrer bevorzugten Bindungsmotive in vier Gruppen eingeteilt. Die WW-Domänen der Gruppe 1 binden Polypeptide, die die Sequenz PPxY enthalten, die der Gruppe 2 Polypeptide mit dem Motiv PPLP. WW-Domänen der Gruppe 3 bevorzugen Poly-P-Sequenzen, die von R oder K

flankiert werden. Gruppe 4 beinhaltet WW-Domänen, die kurze Sequenzen mit P und phosphoryliertem S oder T binden (Bedford et al., 2000; Macias et al., 2002). FBP11 besitzt N-terminal zwei WW-Domänen, die durch 15 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Jede WW-Domäne besteht aus 26 Aminosäuren mit den zwei konservierten Tryptophan-Resten N- und C-terminal. Ebenfalls C-terminal befindet sich der stark konservierte Prolin-Rest. Die WW-Domänen von FBP11 binden das PPLP-Motiv (Gruppe 2). In ihrer Veröffentlichung haben Bedford et al. (1997) eine Prolin-reiche Sequenz im C-Terminus von MeCP2 als mögliche Bindungsstelle der WW-Domänen von FBP11 beschrieben. Es wurde gezeigt, daß FBP 11 mit dem U1 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) assoziiert ist und an der Brückenbildung zwischen der 3'- und 5'-Spleißstelle beteiligt ist (Kao et al., 1996; Abovich und Rosbash, 1997). Über die Funktion der Interaktion von MeCP2 mit FBP11 ist noch nichts bekannt.

Ein weiteres Protein, ebenfalls ein Spleißfaktor, mit einer WW-Domäne ist HYPC (Faber et al., 1998; Passani et al., 2000). HYPC steht für „huntingtin yeast partner C“ und wurde durch einen Hefe two hybrid-Screen mit dem mutierten Protein „huntingtin“ als Bait isoliert (Faber et al., 1998). Interessanterweise wurde in dem Screen auch HYPA isoliert, das menschliche Homolog zum Maus-FBP11.

Mindestens 50% des menschlichen Genoms sind repetitive Sequenzen. Ein Großteil dieser Sequenzen (45% des menschlichen Genoms) läßt sich von transponierbaren Elementen herleiten (Lander et al., 2001). und kann in vier Klassen eingeteilt werden: long interspersed elements (LINEs), short interspersed elements (SINEs), long terminal repeats retrotransposons (LTR retrotransposons) und DNA transposons. Drei dieser vier Klassen (LINEs, SINEs und LTR retrotransposons) transponieren durch ein RNA-Intermediat, während die DNA-Transposons direkt transponiert werden. Mehr als 90% der methylierten Cytosine des menschlichen Genoms befinden sich in Retrotransposons, ein paar Prozent in Satelliten-DNA und nur ein geringer Anteil in Exons und regulatorischen Sequenzen. Yu et al. (2001) haben untersucht, ob und wie MeCP2 die Transkription von den Retrotransposonelementen LINE-1 (L1) bzw. Alu und die L1-Retrotransposition beeinflusst. Die Ergebnisse deuten daraufhin, daß MeCP2 eine Rolle bei der Repression der L1-Expression und L1-Retrotransposition spielt, jedoch keinen reprimierenden Einfluß auf die Alu-Transkription ausübt.

Die Proteine MBD1, 2 und 3 wurden wie MeCP2 mit der Repression der Transkription in Verbindung gebracht, während MBD4 an der Reparatur von TG-Mismatchen (TG/CG) beteiligt ist, welche durch Desaminierung von Methylcytosin zu Thymin entstehen (Hendrich et al., 1999). Rekombinantes MBD1 reprimiert *in vitro* die Transkription von methylierter,

nicht aber von unmethylierter DNA, ähnlich wie MeCP2 (Fujita et al., 1999). MBD1 besitzt wie MeCP2 eine C-terminale, transkriptionelle Repressordomäne, die jedoch keine Sequenzähnlichkeit zur MeCP2-TRD aufweist (Ng et al., 2000). Wie bei MeCP2 kann die transkriptionelle Repression durch den Histondeacetylasehemmer Trichostatin A teilweise aufgehoben werden, jedoch ist derzeit nicht bekannt, welche Histondeacetylase mit MBD1 assoziiert sind (Ng et al., 2000). MBD2 wurde als ein Bestandteil von MeCP1 identifiziert (Ng et al., 1999). MeCP1 war die zuerst entdeckte Methyl-CpG-Bindungsaktivität (Meehan et al., 1989) und ist ein großer Proteinkomplex von 400 bis 800 kD, der 12 oder mehr methylierte CpGs unabhängig vom Sequenzkontext bindet. Der MeCP1-Komplex bindet, moduliert und deacetyliert bevorzugt methylierte Nukleosomen *in vitro* und reprimiert somit methylierte Gene (Feng und Zhang, 2001). Wie MeCP2 besitzt MBD2 eine transkriptionelle Repressordomäne, die mSin3A bindet und, ungleich MeCP2, teilweise mit der Methyl-CpG-Bindungsdomäne überlappt (Boeke et al., 2000). Die transkriptionelle Repression von MBD2 ist Trichostatin A-sensitiv (Ng et al., 1999). Eine *Mbd2* knock-out-Maus zeigt ein gestörtes mütterliches Verhalten (Hendrich et al., 2001). Im Gegensatz zu Mensch/Maus-MBD2 bindet Mensch/Maus-MBD3 weder *in vitro* noch *in vivo* an methylierte DNA (Hendrich und Bird, 1998). Von einem *Xenopus* MBD3-ähnlichen Protein konnte jedoch gezeigt werden, daß es an methylierte DNA bindet (Wade et al., 1999). MBD3 wurde als eine Komponente des NuRD- (nucleosome remodelling and histone deacetylation) oder Mi-2-Komplexes identifiziert, der aus HeLa-Zellen und *Xenopus*-Eizellextrakten aufgereinigt wurde (Tong et al., 1998; Wade et al., 1998, 1999; Xue et al., 1998; Zhang et al., 1999). Obwohl MBD2 kein Bestandteil von NuRD ist, kann es *in vitro* den Komplex an methylierte DNA rekrutieren (Zhang et al., 1999). Dies ist ein Hinweis darauf, daß NuRD an der transkriptionellen Repression von methylierter DNA beteiligt sein könnte. Alle Komponenten des NuRD-Komplexes sind auch Bestandteile des MeCP1-Komplexes (Feng und Zhang, 2001). Die Rekrutierung des NuRD-Komplexes durch MBD2 könnte auf eine Interaktion zwischen MBD2 und MBD3 zurückzuführen sein. Diese beiden Proteine interagieren in einem Hefe two-hybrid-assay miteinander und wurden auch durch Coimmunpräzipitation als Interaktionspartner identifiziert (Tatematsu et al., 2000). Der NuRD-Komplex kann aber auch durch eine Vielzahl von Proteinen mit sequenzspezifischer DNA-Bindungsaktivität rekrutiert werden, z.B. *Hunchback*, Ikaros oder p53 (Knoepfler und Eisenman, 1999). Höchstwahrscheinlich ist der NuRD-Komplex gebunden von MBD2 identisch mit dem MeCP1-Komplex (Hendrich et al., 2001; Feng und Zhang, 2001). Eine *Mbd3* knock-out-Maus stirbt während der frühen Embryogenese, während die *Mbd2*-knock-out-Maus lebensfähig ist (Hendrich et al., 2001). Die Deletion des *Mbd2*-

Gens hat wahrscheinlich nur einen Einfluß auf einen Teil der NuRD-Funktion, während die Deletion des *Mbd3*-Gens den größten Teil oder die gesamte NuRD-Funktion zerstört und somit letal ist (Hendrich et al., 2001).

Die obigen Ausführungen zeigen, daß es bei der transkriptionellen Repression zu einer Vielzahl von verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen kommt und daß daran große Proteinkomplexe beteiligt sind, die durch verschiedene DNA-bindende Proteine rekrutiert werden können. MeCP2 ist jedoch nicht nur ein transkriptioneller Repressor methylierter Gene, es besitzt auch die Eigenschaft MARs zu binden (von Kries et al., 1991; Weitzel et al., 1997). MARs oder SARs (SAR für scaffold-assisted region) spielen eine wichtige Rolle bei der strukturellen und funktionellen Organisation des Chromatins. Durch Nukleosomen und der Verpackung dieser in die 30 nm-Faser des Chromatins wird die DNA dicht gepackt. Es wird angenommen, daß durch S/MARs die 30 nm-Faser des Chromatins an ein Chromosomengerüst gebunden wird, wobei Chromatinschleifen mit 20000 bis 80000 Basenpaaren entstehen. Diese Struktur findet man in Interphase-Chromosomen. Metaphase-Chromosomen weisen eine noch kompaktere Struktur auf, dessen genauer Aufbau noch nicht bekannt ist. S/MARs sind zwischen 200 und 3000 bp lang und zeichnen sich durch A/T-Reichtum aus, ohne daß eine Konsensussequenz bestimmt werden kann. Es wird angenommen, daß die durch MARs entstehenden Schleifen in Interphase-Chromosomen Transkriptionseinheiten darstellen, in denen die Expression der Gene unabhängig von ihrer genomischen Lokalisation und somit ohne störenden Einfluß von benachbarten Genen stattfinden kann. Einen Hinweis auf den Einfluß von MARs ergab sich aus einem Experiment, in dem ein stabil in das Genom integriertes Reporterkonstrukt verwendet wurde, das auf beiden Seiten mit einem MAR-Element des Hühnerlysozymgens flankiert war. Es zeigte sich, daß durch das MAR-Element die Expression des Gens verstärkt wurde und unabhängig vom Integrationsort war (Stief et al., 1987). Dieser Effekt konnte auch mit einigen anderen MARs erreicht werden (z.B. Phi-Van und Strätling, 1996). Von W.H. Strätling wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß MeCP2 durch die Bindung an ein MAR-Element das Chromatin in der näheren Umgebung in ein transkriptionell inaktiven, „kompakten“ Zustand überführt. Dadurch kommt es weiter entfernt vom MAR-Element zu einer höheren Konzentration von Proteinen, die Acetyltransferase-Aktivität besitzen und das Chromatin in einen „offenen“ Zustand überführen. Transkriptionsfaktoren können somit an Promotoren binden und für eine verstärkte Expression sorgen (Strätling und Yu, 1999).

Zahlreiche andere MAR-bindende Proteine sind in vielfältige Funktionen des Zellkerns eingebunden (Strätling und Yu, 1999). Beispielsweise, der scaffold attachment factor B (SAF B) bindet an MAR-DNA, dem Promotor des menschlichen Hitzeschockproteins hsp27 und interagiert mit RNA-Polymerase II und mit Spleißfaktoren (Oesterreich et al., 1997; Nayler et al., 1998). Es wurde vorgeschlagen, daß SAF-B Transkription und prä-mRNA-Spleißing auf MAR-Elementen verbindet (Nayler et al., 1998). Ein anderes MAR-bindendes Protein, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hn RNP U), kann sowohl RNA als auch MAR-DNA binden und interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Brain 4 und dem Glucocorticoid-Rezeptor (Gupta et al., 1997; Malik et al., 1997; Eggert et al., 1997). Das MAR-bindende Protein SATB1 (special AT-rich sequence binding protein 1), ein Homeodomänen-Protein, erkennt ATC-reiche Sequenzen und ein negatives Regulatorelement im Maus „mammary tumor virus promotor“ und bindet an das Homeodomänen-Protein CDP (CCAAT displacement protein) (Liu et al., 1999). Diese und andere Beispiele zeigen, daß zahlreiche MAR-bindende Proteine verschiedene Funktionen ausüben und dabei mit unterschiedlichen Proteinen wechselwirken. Vermutlich gilt dies auch für MeCP2. Hinsichtlich weiterer Funktionen und Proteininteraktionen ist insbesondere der stark konservierte C-Terminus von MeCP2 interessant.

Das *MECP2*-Gen aus Mensch und Maus ist vollständig sequenziert (Reichwald et al., 2000). Es ist X-chromosomal lokalisiert und besteht aus vier Exons. Das menschliche *MECP2*-Gen ist 75,9 Kbp groß. Das erste Exon (69 bp) sowie der Promotor liegen in einer CpG-Insel. Der Translationsstart liegt im zweiten Exon (124 bp). Das dritte und vierte Exon (351 und 9642 bp) codieren für die MBD (Exon 3 und 4) und die TRD (Exon 4). Das *MECP2*-Gen wird in allen untersuchten Geweben exprimiert und besitzt zwei Polyadenylierungssignale (Reichwald et al., 2000). Daraus resultieren zwei unterschiedlich lange Transkripte: Im Gehirn wird stark das 10 Kb-Transkript exprimiert, das 1,9 Kb-Transkript ist dagegen kaum detektierbar. Umgekehrt ist es im Herzen und in der Skelettmuskulatur. Dort findet man vor allem das kurze Transkript stark exprimiert, das längere ist in weitaus geringerer Menge vorhanden (Reichwald et al., 2000). Das 10 Kb-Transkript enthält eine 8555 b lange 3' nichttranslatierte Region (3'UTR), die zwischen Mensch und Maus stark konserviert ist (Coy et al., 1999; Reichwald et al., 2000).

Eine wichtige Entdeckung im Zusammenhang mit dem *MECP2*-Gen wurde 1999 veröffentlicht: Amir und Mitarbeiter identifizierten Mutationen im *MECP2*-Gen als Ursache für das Rett-Syndrom, eine dominante, neuronale Erkrankung, von der vor allem Mädchen betroffen sind (Amir et al., 1999). Das Rett-Syndrom wurde zuerst von Andreas Rett 1966

beschrieben. Es tritt mit einer Häufigkeit von 1 Fall auf 10000 bis 15000 weiblichen Neugeborenen auf. Die Patientinnen entwickeln sich (aus klinischer Sicht) in den ersten 6 bis 18 Lebensmonaten normal. Es folgt eine Phase der Verschlechterung, in der es zur mentalen Retardierung der Patientin und zu einem Verlust bereits erworbener Fähigkeiten, beispielsweise dem Sprechen bereits erlernter Wörter, dem Ausführen von bestimmten Handbewegungen oder sozial-kommunikativen Fähigkeiten kommt. Es entwickeln sich stereotype Bewegungen, die während der gesamten Wachperiode ausgeführt werden (z.B. eine Bewegung, die dem Händewaschen gleicht). Außerdem kommt es zu Krämpfen, Atemproblemen, Verstopfung, Skoliose und Wachstumsstillstand. Ab dem 2. Lebensjahr folgt eine Phase des relativen Stillstandes, die während des ganzen Erwachsenenlebens anhält. Das Gewicht des Gehirns, die Größe der Neuronen und deren Zellkerne sowie die Zelldichte im Gehirn sind bei Rett-Patientinnen im Vergleich zu normalen Frauen reduziert (Baumann et al., 1995; Belichenko et al., 1994).

Alle Arten von Mutationen (missense- und nonsense-Mutationen, Insertionen und Deletionen) wurden bisher im *MECP2*-Gen gefunden. Viele Arbeitsgruppen haben in ca. 70-80% der klassischen Rett-Patienten bzw. Rett-Patienten, die eine variable Form des Rett-Syndroms zeigen, Mutationen gefunden, wobei sich die Analysen überwiegend auf die codierende Sequenz beschränkten (Amir et al., 1999; Wan et al., 1999; Bienvenu et al., 2000; Cheadle et al., 2000; Dragich et al., 2000; Huppke et al., 2000). Alle Bereiche der codierenden Sequenz des *MECP2*-Gens sind von Mutationen betroffen. Besonders häufig sind Transitionen von C nach T innerhalb von CpG-Stellen, die höchstwahrscheinlich durch Desaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin entstehen. Entsprechend führt eine Desaminierung auf dem antisense-Strang zu einer Transition von G nach A. Diese Transitionen sind für ca. 65% der Mutationen in Patienten mit klassischem Rett-Syndrom verantwortlich. Im 3'-Ende des Exons 4 sind besonders häufig Deletionen anzutreffen, die für weitere ca. 10% der Mutationen in Patienten mit Rett-Syndrom verantwortlich sind (Dragich et al., 2000). In 20 bis 25% der sporadisch auftretenden Fälle mit klassischem Rett-Syndrom konnten keine Mutationen im *MECP2*-Gen gefunden werden. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß große Deletionen oder Inversionen durch die bisher angewandten Analyseverfahren (PCR-basierendes oder direktes Sequenzieren) nicht detektiert werden konnten. Auch ist es möglich, daß sich Mutationen in den bisher wenig untersuchten nicht-translatierten Bereichen des *MECP2*-Gens befinden. In den seltenen familiär auftretenden Fällen mit Rett-Syndrom werden im Vergleich zu den sporadischen Fällen weitaus weniger Mutationen detektiert (Amir et al., 2000; Cheadle et al., 2000). Da das *MECP2*-Gen auf dem X-Chromosom

lokalisiert ist, kann bei den Patientinnen das Muster der X-Chromosom-Inaktivierung bei der Ausprägung des Rett-Syndroms eine wichtige Rolle spielen (Wan et al., 1999; Bienvenu et al., 2000; Amir et al., 2000). Beispielsweise fanden Amir et al. (2000) in 31 von 34 Patientinnen mit klassischem Rett-Syndrom (91%) eine zufällsmäßige Inaktivierung des X-Chromosoms; eine nicht-zufällsmäßige Inaktivierung war mit einem mildereren Phänotyp assoziiert. Die überwiegende Mehrheit der Rett-Patienten sind Mädchen bzw. Frauen. Diese Tatsache wurde damit erklärt, daß *MECP2*-Mutationen für Jungen letal sind, da sie nur ein X-chromosomal lokalisiertes *MECP2*-Gen besitzen. Diese Sichtweise wurde durch eine Untersuchung unterstützt, in der gezeigt wurde, daß Mäuse mit einer *MECP2* null-Mutation schon während der Embryogenese sterben (Tate et al., 1996). Mutationen, die zum Rett-Syndrom führen, haben jedoch (meistens) einen paternalen Ursprung (Girard et al., 2001; Trappe et al., 2001). Daraus läßt sich ableiten, daß Männer natürlicherweise vor dem sporadisch auftretenden Rett-Syndrom, welches durch *de novo* Mutationen in der Keimbahn verursacht wird, geschützt sind (Trappe et al., 2001). Es gibt aber auch einige Fälle von männlichen Trägern einer *MECP2*-Mutation (Wan et al., 1999; Orrico et al., 2000; Clayton-Smith et al., 2000; Villard et al., 2000); diese ist also nicht unbedingt letal für Jungen.

Durch die Verwendung des Cre/loxP-Rekombinasesystems wurden von zwei Arbeitsgruppen konditionelle *MECP2* knock-out Mäuse hergestellt, die wichtige Einblicke in die Entwicklung des Rett-Syndroms zuließen (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Überraschenderweise waren beide *MECP2* null-Mutanten, männlich hemizygot und weiblich homozygot, lebensfähig und zeigten direkt nach der Geburt keinen Rett-Phänotyp. Erst nach drei bis acht Wochen stellten sich Symptome wie unkoordinierte Bewegungen, reduzierte Aktivität und Atmungsprobleme ein (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Außerdem wiesen diese Mäuse kleinere Gehirne sowie kleinere und dicht gepacktere Neuronen auf (Chen et al., 2001). Die Tiere starben innerhalb von 10 Wochen. Bei heterozygoten Weibchen stellte sich ein Rett-ähnlicher Phänotyp erst nach 3 bis 12 Monaten ein (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Durch gezielte Mutagenese wurden auch Mäuse erzeugt, in denen *MECP2* spezifisch im Gehirn während des Embryonalstadiums deletiert wurde (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001) oder Mäuse, in denen *MECP2* erst in post-mitotischen Neuronen des Gehirns ausgeschaltet wurde (Chen et al., 2001). Die zuerst genannten Mäuse zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie die null-Mutanten, die zuletzt genannten ebenso, jedoch war der Phänotyp weniger stark ausgeprägt und stellte sich erst später ein. Diese Untersuchungen zeigen, daß durch eine *MECP2*-Mutation vor allem die Neuronen des Gehirns geschädigt werden, andere Gewebe scheinen nicht oder kaum betroffen zu sein. Des weiteren wirkt sich die Mutation wahrscheinlich erst auf das aus-

gereifte (postmitotische) Gehirn aus und scheint die Entwicklung desselben möglicherweise nur geringfügig zu behindern (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Wie aber ist es zu erklären, daß trotz der Expression von MeCP2 in zahlreichen Geweben (Reichwald et al. 2000) vor allem das Gehirn durch *MECP2*-Mutationen betroffen zu sein scheint? Aufgrund der Funktion von MeCP2 als transkriptioneller Repressor wird angenommen, daß MeCP2 im Gehirn die unspezifische Transkription, den transkriptionellen „noise“, unterdrückt und es somit ermöglicht, daß das Gehirn fein abgestufte Signale wahrnehmen kann und auf diese ebenso abgestuft mit der Transkription neuer Gene reagieren kann (Nan et al., 1997; Carter und Segal, 2001). Möglicherweise sind Neuronen gegenüber dem transkriptionellen „noise“ empfindlicher als andere Gewebe, so daß vor allem das Gehirn von *MeCP2*-Mutationen betroffen ist. Alternativ könnte MeCP2 im Gehirn spezifisch die Expression der Gene kontrollieren, die für die Funktionen der Neuronen wichtig sind. In anderen Geweben könnten diese Gene durch andere Mechanismen gänzlich ausgeschaltet sein, da sie ohnehin nicht gebraucht werden. Durch eine *MECP2*-Mutation würde es dann zu einer unkontrollierten Expression bestimmter Gene im Gehirn kommen (Carter und Segal, 2001).

Obwohl bisher nur wenige Sequenzen bekannt sind, die von MeCP2 *in vivo* gebunden werden, konnte durch verschiedene *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden, daß durch Mutationen in der MeCP2-MBD die Affinität für methylierte DNA herabgesetzt oder gänzlich zerstört wird (Ballestar et al., 2000; Free et al., 2001). Sicherlich werden durch Mutationen auch zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen stark beeinträchtigt oder verhindert. Die Identifizierung neuer Proteininteraktionspartner von MeCP2 könnte weitere Hinweise auf die molekulare Ursache des Phänotyps des Rett-Syndroms liefern. Außerdem können sie Hinweise geben, ob MeCP2 noch andere Funktionen als die eines transkriptionellen Repressors ausübt.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Proteininteraktionspartner von MeCP2 durch Anwendung der Hefe two-hybrid-Technik. Es wurden zwei cDNA-Bibliotheken mit verschiedenen C-terminalen MeCP2-Fragmenten gescreent, ohne daß bekannte oder neue Interaktionspartner gefunden werden konnten. Durch eine gezielte Suche nach neuen Bindungspartnern mit Kollaborationsstudien in MCF7-Zellen konnten ebenfalls keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Daher konzentrierte sich die Arbeit auf die wenig charakterisierte Interaktion von MeCP2 mit den WW-Domänen von FBP11 und auf die WW-Domänen des Proteins HYPK. Durch GST pull down-Experimente und Coimmunpräzipitation konnte die Interaktion von MeCP2 mit den WW-Domänen von FBP11 bestätigt



werden und außerdem eine Bindung der WW-Domänen von HYPC an MeCP2 festgestellt werden. Des weiteren konnte die Interaktionsdomäne innerhalb von MeCP2 mit den WW-Domänen von FBP11 und HYPC bestimmt werden (WDR, WW domain binding region). Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Kontext neuer Funktionen von MeCP2 und der Entstehung des Rett-Phänotyps diskutiert.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck in p. A. Qualität bezogen. Restriktionsenzyme wurden von Roche oder MBI Fermentas bezogen.

### 2.1 Primer

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| HYPC <sub>wwF</sub>            | 5'-GGG GTA CCT GGA GTG AGC ATG TGG-3'  |
| HYPC <sub>wwR</sub>            | 5'-CGG GAT CCT CAA TCC AGA TCC TTG GG-3'   |
| FBP-BamHI                      | 5'-CGG GAT CCT CAT TCC TTA GGT TTG GCC C-3'                                      |
| FBP-KpnI                       | 5'-GGG GTA CCT GGA CAG AAC ATA AAT CAC-3'  |
| Me/KpnI/FLAG/aa1               | 5'-GGG GTA CCA TGG ACT ACA AGG ACG ACG ATG<br>ACA AGA TGG TAG CTG GGA TG-3'      |
| MeCP2/aa400R                   | 5'-CGG GAT CCT CAG GTG GGG TCC TC-3'   |
| MeCP2/aa438R                   | 5'-CGG GAT CCT CAG GGC TGA GTC TTA G-3'  |
| HA-Pr.                         | 5'-CCC CAA GCT TAT GTA CCC ATA CGA TGT TCC AGA<br>TTA CGC TGG GAT GAA GCT ACT-3' |
| GAL-R                          | 5'-GGG GTA CCC GAT ACA GTC AAC TG-3'   |
| mSin3A-BamHlr                  | 5'-CGG GAT CCC TAG TCG CTG ACG ATG TGC-3'  |
| mSin3A-KpnI                    | 5'- GGG GTA CCA TGA AGC GAC GGT TGG-3'   |
| hMeCP2-311f.<br>FY02           | 5'-CGG AAT TCA CGG TCA GCA TC-3'<br>5'-CCG GAT CCA TTA GCT AAC TCT C-3'          |
| mSin3A-PAH4 forward            | 5'-CGG GAT CCC TTT CCA AAG GAA CGA GC-3'   |
| mSin3A-PAH4 reverse            | 5'-GCG GGC CCT TAA GGG GCT TTG AAT AC-3'   |
| MeCP2-162f<br>310 aa TGA BamHI | 5'-CGG AAT TCA GAG GGA GCC CCT C-3'<br>5'-CGG GAT CCT CAC TCC CGG GTC TTG C-3'   |
| Gal4BD-seq.p.r<br>Gal4BD(NEW)  | 5'-TTT AAA ACC TAA GAG TCA C-3'<br>5'-AGT GTC GCT ACT CTC C-3'                   |
| FBP-SmaIF                      | 5'-TCC CCC GGG GTG GAC AGA ACA TAA ATC AC-3'                                     |
| FBP-EcoRIR                     | 5'- CGG AAT TCT CAT TCC TTA GGT TTG GCC C-3'                                     |

## 2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA einer optischen Dichte von 1,0.

## 2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, PCR-Produkten oder Plasmid-DNA wurden, je nach Größe der Nukleinsäuren, 1-1,5-prozentige Agarosegele verwendet. Die Agarose (Life Technologies) wurde durch Aufkochen in 0,5×TBE gelöst, nach Abkühlung mit Ethidiumbromid (2 µl Ethidiumbromidlösung [10 mg/ml] pro 50 ml) versetzt und dann in eine Gelapparatur gegossen. Die DNA-Probe wurde mit 5×DNA-Auftragspuffer vermischt und zusammen mit einem Längenstandard (DNA ladder-Mix, MBI Fermentas) auf das Gel aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer diente 0,5×TBE. Der Lauf erfolgte mit 10 V/cm Gel. Nach der Elektrophorese wurde die DNA durch UV-Licht sichtbar gemacht. Durch Agarose-Gelelektrophorese konnte die Qualität von Plasmidpräparationen oder die Vollständigkeit einer Restriktionshydrolyse beurteilt werden. Außerdem wurde sie für präparative Zwecke (Isolierung bestimmter DNA-Fragmente) eingesetzt

|                         |                  |        |
|-------------------------|------------------|--------|
| TBE-Puffer (5×)         | Tris/HCl; pH 8,0 | 445 mM |
|                         | Borsäure         | 445 mM |
|                         | EDTA             | 10 mM  |
| DNA-Auftragspuffer (5×) | Rohrzucker       | 50%    |
|                         | Harnstoff        | 4 M    |
|                         | EDTA             | 50 mM  |
|                         | Bromphenolblau   | 0,1%   |

## 2.4 DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen

Die endonukleolytische Spaltung von Plasmid-DNA erfolgte nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen (Temperatur, im Puffer der Hersteller) in einem Volumen von 20–30 µl. Es wurden 4-5 Enzymeinheiten pro µg DNA eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 2-3 h. Beim Verdauen mit zwei Enzymen wurde ein Puffer gewählt, in dem beide eine ausreichende Aktivität besaßen.

## 2.5 Ligation von DNA

Zur Konstruktion verschiedener Plasmide wurde linearisierte Vektor-DNA mit Insert-DNA ligiert. Die durch Restriktionsendonukleasen linearisierte Vektor-DNA wurde stets durch eine Inkubation mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine Selbst-Ligation des Vektors zu verhindern: Nach der Hydrolyse der Plasmid-DNA wurden die Restriktionsenzyme durch Hitze inaktiviert. Dem Ansatz wurden 10 µl frischer Puffer und 1 U CIAP (calf intestine alkaline phosphatase, MBI Fermentas) zugegeben. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei 37°C.

Die Insert-DNA wurde entweder durch PCR (mit Primern, die passende Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthielten) hergestellt oder aus anderen Plasmiden mit Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Extraktion mit dem NucleoSpin® Extract 2 in 1-Kit (Macherey-Nagel) isoliert und aufgereinigt. Ein drei- bis sechsfacher molarer Überschuß an Insert-DNA wurde mit 50 bis 100 ng Vektor-DNA und mit 30 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) in Ligasepuffer inkubiert. Die Ligation erfolgte 3 h bis ü.N. bei RT. Der Ligationsansatz wurde direkt für die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen (Stamm XL1-Blue) eingesetzt.

## 2.6 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (Stamm XL1-Blue)

Die Vorschrift ist modifiziert nach einer von Hanahn 1983 beschriebenen Methode. Durch die Inkubation in einem RbCl/CaCl<sub>2</sub>-Puffer werden *E. coli*-Zellen kompetent gemacht und können für die Transformation von Plasmid-DNA eingesetzt werden.

Für die Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden 50 ml LB-Medium mit 12,5 µg/ml Tetracyclin mit *E. coli* (Stamm XL1-Blue) angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,6 ( $4\text{--}7 \times 10^7$  Zellen/ml) wachsen gelassen. Nach dem Abkühlen der Kultur auf Eis für 12-15 min wurden die Zellen durch Zentrifugation (1000×g, 4°C, 12-15 min) geerntet. Das Pellet wurde in 16,7 ml ( $\frac{1}{3}$  des ursprünglichen Volumens) kaltem RFI vorsichtig resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation pelletiert, vorsichtig in 4 ml ( $\frac{1}{12,5}$  des ursprünglichen Volumens) kaltem RFII resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension aliquotiert und die kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei –80°C.

Für die Transformation wurde die Zellsuspension auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA gemischt. Das Gemisch wurde für eine  $\frac{1}{2}$  h auf Eis inkubiert. Es folgte ein 40 s langer

Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad. Die Zellen wurden anschließend 1 min auf Eis inkubiert und dann mit 0,8 ml LB-Medium gemischt. Es folgte eine Inkubation auf einem Schüttler bei 37°C für 30 min. Anschließend wurde die Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

|     |                   |                      |
|-----|-------------------|----------------------|
| RFI | RbCl              | 100 mM,              |
|     | MnCl <sub>2</sub> | 50 mM                |
|     | Kaliumacetat      | 30 mM                |
|     | CaCl <sub>2</sub> | 10 mM,               |
|     | Glycerin          | 15%                  |
|     | pH                | 5,8 (mit Essigsäure) |

|      |                   |                      |
|------|-------------------|----------------------|
| RFII | MOPS              | 10 mM                |
|      | RbCl              | 10 mM                |
|      | CaCl <sub>2</sub> | 75 mM                |
|      | Glycerin          | 15%                  |
|      | pH                | 5,8 (mit Essigsäure) |

Beide Puffer wurden bei 4°C gelagert.

|           |                   |                     |
|-----------|-------------------|---------------------|
| LB-Medium | Bacto-Tryptone    | 10 g                |
|           | Bacto-Hefeextrakt | 5 g                 |
|           | NaCl              | 10 g                |
|           | H <sub>2</sub> O  | <i>ad</i> 1 l       |
|           | pH                | 7,0 (mit Salzsäure) |

LB-Agarplatten wurden mit 20 g Agar/l hergestellt. LB<sub>amp</sub>-Flüssigmedium und LB<sub>amp</sub>-Agarplatten wurden mit 50 µg/ml Ampicillin hergestellt. Bacto-Tryptone, Bacto-Hefeextrakt und Agar wurden von der Firma Difco bezogen.

## 2.7 Präparation von Plasmid-DNA

Die Schnellpräparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalische Lyse von Birnboim und Doly (1979).

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden die Puffer S1, S2 und S3 der Firma Macherey-Nagel verwendet. Fünf Milliliter LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) wurden mit *E. coli* angeimpft und ü.N. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Eineinhalb Milliliter der Bakterien-suspension wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer S2 und dem Mischen der Flüssigkeiten wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde durch Zugabe von 150 µl Puffer S3 neutralisiert, gemischt und 10 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml 96%igen Ethanol gemischt und erneut in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert (4°C, max. Geschwindigkeit, 30 min). Die gefällte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-30 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Ausbeute betrug in der Regel ca. 15 µg. Die Reinheit war ausreichend, um die Plasmid-DNA für analytische Zwecke (Restriktionshydrolyse) einzusetzen, z.B. bei der Durchmusterung von Kolonien nach einer Transformation.

Für die Präparation hochreiner Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde der Nucleobond® AX20-Kit oder der NucleoSpin® Plasmid-Kit (beide von der Firma Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Präparation hochreiner Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde der Nucleobond® AX500-Kit (Macherey-Nagel) oder der Endofree™ Plasmid Maxi-Kit (Qiagen) verwendet. Hochreine Plasmid-DNA wurde für die Sequenzierung, die Transformation von Hefen und die Transfektion von HEK293-Zellen eingesetzt.

|    |                  |           |
|----|------------------|-----------|
| S1 | Tris/HCl; pH 8,0 | 50 mM     |
|    | EDTA             | 10 mM     |
|    | RNase A          | 100 µg/ml |
| S2 | NaOH             | 200 mM    |
|    | SDS              | 1%        |
| S3 | KAc; pH 5,1      | 2,80 M    |

## 2.8 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem Dye-Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach dem Prinzip der Dideoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Mit dem Dye-Terminator Sequencing Kit werden die DNA-Fragmente mit Fluorophoren an den Dideoxynukleotiden markiert.

Ein Reaktionsansatz enthielt ca. 400-800 ng Plasmid-DNA, 15 pmol Primer, 4 µl Premix und ddH<sub>2</sub>O *ad* 20 µl. Das Cycle-Sequencing wurde nach folgendem Programm durchgeführt: 1 × (95°C/1 min), 25 × (96°C/30 s, 50-54°C/15 s, 60°C/4 min), 1 × 4°C. Nach dem Cycle-Sequencing wurde der Ansatz mit 80 µl 0,3 M NaAc, pH 5,2 und 300 µl 96-prozentigen Ethanol gemischt und durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (30 min, 4°C, maximale Geschwindigkeit) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und die DNA an der Luft getrocknet. Alle weiteren Schritte wurden im Servicelabor des Instituts für Zellbiologie und klinische Neurobiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt: Die Proben wurden in 4 µl Formamid/50 mM EDTA pH 8,0 (5:1) gelöst, 2 min bei 90°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Die Proben wurden auf ein 6 %iges Polyacrylamidgel in TBE aufgetragen. Die Detektion der markierten DNA erfolgte mit einem Applied Biosystems 373A DNA Sequencer.

## 2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Konstruktion verschiedener Vektoren wurden DNA-Fragmente durch PCR mit dem Expand Long Template PCR System (Roche) erzeugt. Die Primer enthielten an ihrem 5'-Ende Restriktionsschnittstellen und gegebenenfalls Sequenzen für verschiedene Epitope, die an die zu amplifizierende cDNA angefügt werden sollten. Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µl mit 1×PCR-Puffer 3 (inklusive 2,25 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,5 mM dNTPs, 2,6 U Enzym-Mix, 10 ng template-DNA und je 10 pmol Primer durchgeführt. Das Temperaturprofil sah folgendermaßen aus: 1×95°C/2 min, 5×(95°C/10 s, X°C/30 s, 68°C/X min), 35×(95°C/10 s, ≤65°C/30 s, 68°C/X min), 1×68°C/7 min. Die annealing-Temperatur und die Dauer der Primerverlängerung richteten sich nach der Basenzusammensetzung der Primer [Faustregel:  $2 \times (A/T) + 4 \times (C/G) = T_m$ ] bzw. der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (Faustregel: 1000 bp/min). Für die ersten fünf Zyklen wurde die annealing-Temperatur für den komplementären Bereich zwischen Primer und Matrizen-DNA verwendet, für die nächsten 35 die des gesamten Primers.

## 2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische wurden durch die diskontinuierliche, denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihren Molekülmassen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Herstellung des Gels und die Elektrophorese wurden mit dem Minigel-System der Firma Biorad durchgeführt. Die Zusammensetzung für das am häufigsten benutzte 10%ige Gel ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben (Acryl-Bisacrylamid-Mix von der Firma Bio-Rad):

|   | <b>Trenngel</b> | <b>Sammelgel</b> |
|---|-----------------|------------------|
| ddH <sub>2</sub> O                                | 1,9 ml          | 1,4 ml           |
| Acryl-Bisacrylamid-Mix<br>(37,5:1; 30% Acrylamid) | 1,7 ml          | 0,33 ml          |
| 1,5 M Tris, pH 8,8                                | 1,3 ml          | -                |
| 1,0 M Tris, pH 6,8                                | -               | 0,25 ml          |
| 10% SDS   | 0,05 ml         | 0,02 ml          |
| 10% Ammoniumpersulfat                             | 0,05 ml         | 0,02 ml          |
| TEMED   | 0,002 ml        | 0,002 ml         |

Das Proteingemisch wurde in 1×SDS-Gelladepuffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf das Gel 10 min bei 95°C gekocht. Der Lauf erfolgte in 1×Glycin-Laufpuffer bei 120 V. Zur Anfärbung der Proteinbanden wurde das Trenngel mehrere Stunden in Coomassie-Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel über Nacht in Entfärbelösung geschwenkt.

Glycin-Laufpuffer (5×)                      15,1 g Tris-Base  
    94 g Glycin  
    5 g SDS  
    ddH<sub>2</sub>O *ad* 1 l; pH 8,3

SDS-Gelladepuffer (1×)                      50 mM Tris/HCl, pH 6,8  
    1% (v/v) 2-Mercaptoethanol  
    2% SDS  
    0,1% Bromphenolblau  
    10% Glycerin



|                          |                           |
|--------------------------|---------------------------|
| Coomassie-Färbelösung    | 0,5 g Coomassie-Blau      |
|                          | 200 ml Methanol           |
|                          | 50 ml Eisessig            |
|                          | 250 ml ddH <sub>2</sub> O |
| Coomassie-Entfärbelösung | 50 ml Methanol            |
|                          | 75 ml Eisessig            |
|                          | 875 ml ddH <sub>2</sub> O |

## 2.11 Western-Blotting

Beim Western-Blotting werden Proteingemische durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgt immunologisch.

Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem ECL<sup>™</sup>-System der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Bei diesem System wird der primäre Antikörper, der gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist, durch einen mit Meerrettichperoxidase gekoppelten, sekundären Antikörper gebunden. Unter alkalischen Bedingungen oxidiert diese Peroxidase das Substrat Luminol, welches in einen angeregten Zustand übergeht und durch Chemilumineszenz, die durch eine Phenolverbindung verstärkt wird, in den Grundzustand zurückkehrt. Die Emmission des Lichts kann mit einem Blaulicht-sensitiven Film detektiert werden. In der Praxis wird die Chemilumineszenz durch das Mischen der ECL-Lösung I und II in Anwesenheit der mit den beiden Antikörpern dekorierten Membran initiiert.

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mit dem Mini-Transblot-System (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm, BA85; Schleicher & Schuell), die zuvor 20 min in Transferpuffer benetzt wurde, elektrisch transferiert. Während des Transfers (75 min, 100 V) befand sich die Blotkammer, die zusätzlich einen Eisblock enthielt, in einem Eiswasserbad. Durch die Verwendung eines vorgefärbten Proteinmarkers konnte die Vollständigkeit des Transfers beurteilt werden. Alle nachfolgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur in einer Plastikschaale. Nach dem Blotting wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungskapazitäten für mindestens 45 min in Blockpuffer inkubiert. Die blockierte Membran wurde kurz mit TBS gewaschen und anschließend für mindestens 2 h mit dem primären Antikörper inkubiert. Wurde mit dem primären Antikörper über Nacht inkubiert, erfolgte dies im Kaltraum. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit TBS wurde die Membran für mindestens 1 h

(maximal 4 h) mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die Membran wurde zweimal kurz mit TBS gespült. Es folgten mehrere Waschschrte:

2 × 10 min in TBS/0,5% Tween 20 (v/v)

1 × 10 min in TBS/3% Tween 20 (v/v)

2 × 15 min in TBS/0,5% Tween 20 (v/v)

2 × 30 min in TBS/0,5% Tween 20 (v/v)

2 × 30 min in TBS

Abschließend wurde die Membran nochmals kurz mit TBS gespült. Der TBS-Puffer wurde entfernt und die Membran in gleiche Volumina ECL-Lösung I und II 1 min inkubiert. Nach Entfernen der ECL-Lösung wurde die Membran in Plastikfolie eingewickelt und in eine Filmkassette mit der Proteinseite nach oben geklebt. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde der Film „Fuji medical X-ray film 100NIF super RX“ verwendet und 10 sec bis mehrere Stunden exponiert.

|            |                                       |
|------------|---------------------------------------|
| TBS-Puffer | 10 mM Tris/HCl; pH 7,5<br>150 mM NaCl |
|------------|---------------------------------------|

|             |   |
|-------------|---|
| Blockpuffer | 3% Magermilchpulver (Uelzena Milchwerke e.G.)<br>in TBS |
|-------------|---|

## **2.12 Das MATCHMAKER two-hybrid-System 2 der Firma Clontech**

Das Hefe two-hybrid-System ist ein genetischer Assay zur Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen. Mit Hilfe dieses Systems können unbekannte Proteine identifiziert werden, die mit einem bekannten Protein interagieren.

Das Hefe two-hybrid-System wurde zuerst von Fields und Song 1989 beschrieben. Ihr System beruht auf den Eigenschaften und Funktionen des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4. Gal4 besitzt zwei strukturelle Domänen, die je eine spezifische Funktion ausüben. Die DNA-bindende Domäne bindet an eine spezifische Upstream-Aktivatorsequenz (UAS) der DNA und positioniert den Transkriptionsfaktor in die Nähe eines Promotors oder einer Transkriptionseinheit. Dadurch wird es der Aktivierungsdomäne möglich, mit dem basalen Transkriptionsapparat Kontakt aufzunehmen und die Transkription zu aktivieren. Diese beiden Domänen sind im Hefe two-hybrid-System voneinander getrennt. Die DNA-bindende

Domäne ist mit einem bekannten Protein fusioniert. Dieses Hybridprotein wird als „Bait“ bezeichnet. Die Aktivierungsdomäne ist mit einem weiteren Protein fusioniert, das „Prey“ genannt wird. Die beiden Hybridproteine geben dem Hefe two-hybrid-System seinen Namen. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Systems ist ein Reportergen, das beispielsweise für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase codiert. Das Reportergen muß in seiner Promotorregion die DNA-Sequenz enthalten, an die die DNA-bindende Domäne des ersten, oben beschriebenen Hybridproteins bindet. Die beiden Hybridproteine und das Reportergen sind im Hefe two-hybrid-System im Zellkern einer Hefezelle lokalisiert. Die Hybridproteine allein sind nicht in der Lage, die Transkription des Reportergens zu aktivieren. Auch wenn die beiden zu untersuchenden Proteine (die mit der DNA-bindenden Domäne bzw. der Aktivierungsdomäne fusioniert sind) nicht miteinander interagieren, bleibt das Reportergen stumm. Nur wenn die beiden zu untersuchenden Proteine aneinander binden, wird der Gal4 Transkriptionsfaktor funktionell rekonstituiert und das Reportergen aktiviert. Eine solche Aktivierung des Reportergens signalisiert eine Interaktion der beiden Proteine. Die Aktivierung ist also direkt abhängig von der Interaktion der zu untersuchenden Proteine.

Um unbekannte Proteine zu identifizieren, die mit einem bekannten Protein interagieren, wird die Aktivierungsdomäne nicht mit einem ausgewählten Protein fusioniert, sondern mit einer Vielzahl von Polypeptiden, die im Idealfall allen Proteinen entsprechen, die in einem bestimmten Gewebe exprimiert werden. Die überwiegende Mehrzahl der von dieser Bibliothek exprimierten Proteine wird mit dem Bait nicht interagieren. Aber aus denjenigen Zellen, in denen das Reportergen aktiviert wird, können cDNAs für die interagierenden Proteine sehr einfach gewonnen werden. Solche Untersuchungen werden als „Hefe two-hybrid-Screening“ bezeichnet.

Die codierende Sequenz für das Bait-Protein befindet sich in einem Hefe-Expressionsvektor. Solche Vektoren enthalten einen Polylinker, mit dessen Hilfe die cDNA für das zu untersuchende Protein im richtigen Leseraster mit der bereits im Vektor enthaltenen cDNA der DNA-bindenden Domäne fusioniert werden kann. Der Vektor besitzt einen Promotor, der dafür sorgt, daß das Hybridprotein konstitutiv in den Hefezellen exprimiert wird. Die GAL4 DNA-bindende Domäne enthält interne Kernlokalisierungssequenzen, so daß das Hybridprotein in den Zellkern transportiert wird. Weiterhin enthält der Vektor Elemente, die seine Propagation in Hefe- und *E. coli*-Zellen ermöglicht.

Das MATCHMAKER two-hybrid-System 2 der Firma Clontech basiert auf dem System, das von Fields und Song 1989 beschrieben wurde. In das Plasmid pAS2-1 wird die codierende Sequenz für das Köderprotein inseriert. In der Hefezelle codiert dieses Plasmid dann für ein

Fusionsprotein mit der Gal4 DNA-bindenden Domäne (Gal4-BD). Die Expression steht unter der Kontrolle des starken Alkohol-Dehydrogenase1 (ADH1)-Promotors und wird in der späten log-Phase durch Alkohol gehemmt. Ein weiteres Plasmid, mit dem Fusionsproteine mit der Gal4-BD in Hefezellen exprimiert wurden, ist pGBT9. Dieser Vektor stammt aus dem ersten MATCHMAKER two-hybrid-System von Clontech. Die Expression steht unter der Kontrolle eines gekürzten ADH1-Promotors und ist im Vergleich zu pAS2-1 sehr schwach und wird nicht durch Alkohol gehemmt. Mit dem Vektor pACT2 wurden Fusionsproteine mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (Gal4-AD) in Hefezellen exprimiert. Die Expression steht unter der Kontrolle eines gekürzten ADH1-Promotors. Die Vektoren pVA3-1, pTD1-1, pCL1 und pLAM5'-1 sind Kontrollplasmide. Das Plasmid pVA3-1 codiert für ein Fusionsprotein aus der Gal4-BD und dem Maus p53-Protein. pTD1-1 codiert für ein Fusionsprotein aus der Gal4-AD und dem großen T-Antigen des Virus SV40. Diese beiden Plasmide codieren für Proteine, die miteinander interagieren und dienen als Positivkontrolle. pCL1 enthält die codierende Sequenz für den Gal4 Transkriptionsfaktor und dient als Kontrolle z.B. für ein selbstaktivierendes Fusionsprotein. Das Plasmid pLAM5'-1 codiert für ein Fusionsprotein aus der Gal4-BD und dem menschlichen Lamin C-Protein. Von Lamin C sind bisher keine Interaktionspartner bekannt. pLAM5'-1 dient somit zur Identifizierung von falsch Positiven. Das „Rückgrat“ der Vektoren pVA3-1 und pLAM5'-1 bildet pAS2-1, das des Vektors pTD1-1 das Plasmid pACT2. Die Expression der Fusionsproteine ist konstitutiv (mit Ausnahme der Alkohol-Repression in der späten log-Phase bei den pAS2-1-Vektoren).

Die Plasmide, die für ein Fusionsprotein mit der Gal4-BD codieren, enthalten das *TRP1*-Gen zur Selektion in  $\text{Trp}^-$  auxotrophen Hefestämmen auf oder in synthetischen Medien. Plasmide für ein Fusionsprotein mit der Gal4-AD enthalten das *LEU2*-Gen zur Selektion in  $\text{Leu}^-$  auxotrophen Hefestämmen. Das Plasmid pCL1 enthält das *LEU2*-Gen. Für die Replikation in *Saccharomyces cerevisiae* enthalten die Plasmide den 2 $\mu$ -Plasmid-ori. Weiterhin enthalten alle oben erwähnten Vektoren Elemente, die ihre Replikation und Propagation in *E. coli*-Zellen ermöglichen: einen Replikationsursprung für die Amplifikation des Plasmids sowie das  $\beta$ -Lactamase Gen zur Erzeugung der Ampicillin-Resistenz.

Der Hefestamm Y190 (*Saccharomyces cerevisiae*) dient zur Durchführung des Hefe two-hybrid-Screenings. Y190 ist auxotroph für die Aminosäuren Leucin, Tryptophan und Histidin. Die ersten beiden Marker werden ausschließlich für die unabhängige Propagation und Selektion der Gal4-BD und -AD Plasmide benötigt. Der Stamm Y190 enthält zwei Reportergene, den *HIS3*- und den *lacZ*-Reporter, die in das Genom der Hefe integriert sind. Das *HIS3*-Reportergen steht unter der Kontrolle einer *GALI* UAS und eines

Minimalpromotors mit beiden *HIS3* TATA-Boxen. Bei einer Interaktion von zwei Hybridproteinen kommt es zu einer starken Expression des *HIS3*-Reporters. Die Hefe ist dann in der Lage auf Selektionsmedium ohne Histidin zu wachsen und zeigt somit eine Interaktion der Hybridproteine an. Jedoch findet auch eine erhebliche konstitutive Expression in Abwesenheit von interagierenden Hybridproteinen statt. Diese Leckexpression kann durch den Gebrauch des kompetitiven Inhibitors der Histidinbiosynthese (genauer des *HIS3*-Genprodukts Phosphoribosyl-AMP-Cyclohydrolase) 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) im Medium kompensiert werden. Der *lacZ*-Reporter steht unter der Kontrolle des starken *GALI*-Promotors und ist im Vergleich zum *HIS3*-Reporter wesentlich stringenter reguliert.

Für das Hefe two-hybrid-Screening wurde die humane HeLa MATCHMAKER cDNA-Bibliothek der Firma Clontech eingesetzt. Für die Herstellung der Bibliothek wurde mRNA von exponentiell wachsenden HeLa S3 Zellen (ATCC #CCL 2.2) verwendet (Hannon *et al.*, 1994). Die cDNA wurde durch Xho I-(dT)<sub>15</sub> priming hergestellt und in die *EcoR* I/*Xho* I Restriktionsschnittstellen des Plasmids pGAD GH eingefügt. pGAD GH ist ein Plasmid mit Gal4-AD codierender Sequenz und einer starken Expression des Fusionsproteins. Die Library ist kompatibel mit pAS2-1 und pGBT9, die einen starken bzw. schwachen Promotor besitzen (Angabe des Herstellers Clontech). Die Library lag als *E. coli* (DH10B)-Zellsuspension vor.

### 2.13 Hefemedium

Das komplexe YPD-Medium (mit oder ohne Agar) wurde hauptsächlich für die Kultivierung von untransformierter Hefe eingesetzt. Es wurde von der Firma Clontech bezogen und ist eine Mischung aus Pepton, Hefeextrakt und Dextrose.

Das definierte SD (synthetic dropout) Medium ist ein Minimalmedium, das für die Selektion und den Test des Phänotyps von transformierten Hefen eingesetzt wurde. SD Medium wurde ebenfalls von der Firma Clontech bezogen. Es wurde aus zwei Bestandteilen hergestellt: Minimal SD base (mit oder ohne Agar) mit Dextrose und Ammoniumsulfat und einem SD-Gemisch verschiedener Aminosäuren und Nukleosiden, dem eine oder mehrere dieser Substanzen fehlen.

Zur Kompensation der Leckexpression des *HIS3*-Reportergens in Y190 wurde dem SD Medium 20-40 mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) zugesetzt. Eine 3 molare 3-AT Stammlösung wurde sterilfiltriert und die entsprechende Menge den autoklavierten (auf mindestens 50°C abgekühlten) Medien zugegeben.

## **2.14 Lagerung von Hefen**

Der Stamm Y190 wurde als Glycerinkultur (YPD Medium mit 25% Glycerin) bei -80°C gelagert. YPD-Agarplatten mit Y190 wurden bis zu vier Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lagerung von transformierter Hefe erfolgte ebenfalls in Form von Glycerinkulturen (SD Medium mit 25% Glycerin) oder auf Agarplatten im Kühlschrank (maximal 2-3 Wochen).

## **2.15 Phänotyp-Test**

Zur Kontrolle des Phänotyps wurde der Hefestamm Y190 auf verschiedenen synthetischen dropout (SD) Medien ausgestrichen. Diesen Nährmedien fehlen je eine oder mehrere Aminosäuren oder andere Substanzen, ohne die der Hefestamm Y190 nicht wachsen kann. Entsprechend der Auxotrophie von Y190 wurde SD-Leu, -Trp und -His Medium verwendet. Dem SD-His Medium wurden aufgrund der Leckexpression des *HIS3*-Reporters 40 mM 3-AT zugesetzt. Außerdem wurde Y190 auf SD-Ura Medium und YPD ausplattiert. Y190 ist in der Lage, Uracil zu synthetisieren und kann daher auf SD-Ura Medium wachsen. Die Platten wurden für 4-5 Tage bei 30°C inkubiert und dann auf Wachstum kontrolliert. Starkes Wachstum stellte sich stets nur auf SD-Ura Medium und YPD ein. Dieser Test wurde durchgeführt, wenn Y190 von einer Glycerinkultur neu ausplattiert wurde.

## **2.16 Transformation von Hefezellen mit der Lithium Acetat/einzelsträngige Träger-DNA/Polyethylenglykol-Methode**

Bei dieser Methode werden zunächst kompetente Hefezellen hergestellt. Um eine hohe Transformationseffizienz zu erreichen, werden die Hefezellen in der log-Phase geerntet und bereits vor der Aufnahme der Plasmid-DNA mit Lithium Acetat inkubiert. Die kompetenten Hefezellen werden dann in einer Lösung bestehend aus Polyethylenglykol, Lithium Acetat, einem Überschuß an einzelsträngiger Träger-DNA zusammen mit der zu transformierenden Plasmid-DNA suspendiert. Während eines Hitzeschocks bei 42°C erfolgt die Aufnahme der Plasmid-DNA. Die Hefezellen werden auf SD Medium ausplattiert, auf dem eine Wachstumsselektion der transformierten Zellen erfolgt. Im folgenden und unter „Vorbereitung und Durchführung des Hefe two-hybrid-Screenings“ sind drei Protokolle wiedergegeben. Bei jedem Protokoll wird die oben dargestellte Methode verwendet, jedoch unterscheiden sie sich in der Transformationseffizienz und der Größe des Ansatzes.

### 2.16.1 Standard Transformation von Hefe

Bei diesem Protokoll liegt die Transformationseffizienz zwischen  $10^3$ - $10^5$  transformierten Zellen pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA. Fünf Milliliter YPD Medium oder entsprechendes SD Medium wurden mit einer Hefekolonie angeimpft und über Nacht bei  $30^\circ\text{C}$  in einem Schüttler bei 200 UpM inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Zelltiter der Kultur bestimmt, indem die  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  einer 1:10 Verdünnung mit Wasser gemessen wurde. Für die meisten Hefestämme entspricht eine  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,1 ungefähr einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml. Mit dem Volumen von  $2,5 \times 10^8$  Zellen wurden dann 50 ml YPD-Medium in einem 300 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und bei  $30^\circ\text{C}$  in einem Schüttler bei 200 UpM solange inkubiert, bis die Hefen zwei Zellteilungen durchlaufen hatten. Dies dauerte für den Hefestamm Y190 in der Regel ungefähr 5 Stunden. Die Zellen wurden nach dieser Inkubation in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei  $3000 \times g$  5 min in einer Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in ca. 25 ml sterilem  $\text{ddH}_2\text{O}$  resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 900  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Zellen wurden wieder durch Zentrifugation sedimentiert (13.000 UpM, 1 min, Eppendorf-Tischzentrifuge) und das Pellet in 700  $\mu\text{l}$  100 mM LiAc resuspendiert. Die Zellen wurden dann 10 min bei  $30^\circ\text{C}$  in einem Wasserbad inkubiert. Für jeden Transformationsansatz wurden nun 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. In ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden ebenfalls für jeden Transformationsansatz folgende Reagenzien pipettiert:

50% PEG, 240  $\mu\text{l}$

1 M LiAc, 36  $\mu\text{l}$

ss-DNA (10 mg/ml), 10  $\mu\text{l}$

Plasmid-DNA (100 ng-1  $\mu\text{g}$ )

steriles  $\text{ddH}_2\text{O}$  ad 360  $\mu\text{l}$

Dieser Transformationsmix wurde gründlich gemischt (Vortex) und zu dem Zellpellet pipettiert. Wieder wurde gründlich gemischt (Vortex) bevor jeder Ansatz zunächst 30 min bei  $30^\circ\text{C}$  und anschließend 30 min bei  $42^\circ\text{C}$  in einem Wasserbad inkubiert wurde. Nach dem Hitzeschock wurden die Transformationsansätze 1 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml sterilem  $\text{ddH}_2\text{O}$

resuspendiert. 100 bis 200  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden auf entsprechende SD Agarplatten (10 cm Durchmesser) ausplattiert. Als Kontrolle wurde stets ein Transformations-ansatz ohne DNA durchgeführt und ausplattiert. Alle Platten wurden 3-4 Tage bei 30°C in einem Brutschrank inkubiert.

### **2.16.2 “Quick and easy“ Transformation**

Mit diesem Protokoll lassen sich nur wenige transformierte Hefeklonen erzeugen. Es wurde benutzt, wenn nur wenige Kolonien für den Fortgang der Arbeit benötigt wurden. Ein Volumen von 25  $\mu\text{l}$  Hefezellen wurde mit einer Impföse von einer Agarplatte abgenommen und in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß resuspendiert. Das richtige Volumen wurde mit einer 200  $\mu\text{l}$ -Pipette kontrolliert; anschließend wurde das Volumen auf 1 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde gründlich gemischt (Vortex), um die Zellen zu waschen. Die Zellen wurden dann 30 s in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Der Transformationsmix (siehe „Standard Transformation von Hefe“) wurde dem Pellet zugefügt. Der Ansatz wurde gründlich gemischt (Vortex) und anschließend 30 min in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 1 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Auf die Zellen wurde 400  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O pipettiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Pellet resuspendiert. Je 200  $\mu\text{l}$  Suspension wurden auf entsprechenden SD Agarplatten (10 cm Durchmesser) ausplattiert. Die Platten wurden 3-4 Tage bei 30°C in einem Brutschrank inkubiert.

### **2.17 Proteinextraktion aus Hefen durch die Harnstoff/SDS-Methode oder durch alkalische Lyse**

Die Harnstoff/SDS-Methode oder die alkalische Lyse wurden für die Extraktion von Proteinen angewendet, die in Hefen durch die Bait- und Prey-Plasmide codiert wurden. Die Proteine wurden anschließend durch Western-Blotting nachgewiesen.

Für beide Protokolle werden Hefen in der logarithmischen Wachstumsphase benötigt: Mit einer einzelnen Hefekolonie wurde eine Übernachtskultur in 5 ml eines entsprechenden SD Selektionsmediums angeimpft. Diese Kultur wurde in einem Schüttler bei 200 UpM und 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur gründlich gemischt und in 50 ml YPD Medium überführt. Es folgte eine Inkubation bei 220 UpM und 30°C bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0,4-0,6 erreicht war. In Abhängigkeit vom Fusionsprotein wurde die gewünschte OD<sub>600nm</sub> nach 4-8 h erreicht. Der gemessene OD<sub>600nm</sub>-Wert wurde mit dem Kulturvolumen multipliziert. Diese



OD<sub>600nm</sub>-Einheiten wurden für die Bestimmung des Volumens des cracking-Puffers (bei der Harnstoff/SDS-Methode) benötigt. Die Kultur wurde in einen vorgekühlten und mit ca. 50 ml Eis gefüllten Zentrifugenbecher gegossen und in einem vorgekühlten Rotor mit 1000×g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Die Hefen wurden wieder abzentrifugiert und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

Harnstoff/SDS-Methode: Pro 7,5 OD<sub>600nm</sub>-Einheiten wurden 100 µl cracking-Puffer (komplett) hergestellt. Da das PMSF schnell hydrolysiert, wurde während der weiteren Aufarbeitung ca. alle 5 min neues PMSF zugefügt (1 µl 100×PMSF pro 100 µl cracking-Puffer). Der cracking-Puffer wurde auf 60°C vorgewärmt und auf die Hefezellen pipettiert. Um das Auftauen zu unterstützen, wurde das Reaktionsgefäß mit den Zellen in ein auf 60°C vorgewärmtes Wasserbad gestellt und für höchstens 2 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 80 µl Glaskügelchen (425-600 µm; Sigma) pro 7,5 OD<sub>600nm</sub>-Einheiten überführt und 1 min gründlich gemischt (Vortex). Zelltrümmer und nicht aufgebrochene Zellen wurden abzentrifugiert (14.000 UpM, 5 min bei 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge). Der Überstand (oberhalb der Glaskügelchen) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Das Reaktionsgefäß mit dem Pellet wurde 3-5 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend 1 min gründlich gemischt (Vortex). Nach einer weiteren Zentrifugation (14.000 UpM, 5 min bei 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Überstand mit dem Proteinextrakt auf Eis vereinigt. Die Probe wurde dann nochmals gekocht und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei –70°C gelagert.

|                           |             |            |
|---------------------------|-------------|------------|
| Protease-Inhibitor-Lösung | Pepstatin A | 0,1 mg/ml  |
|                           | Leupeptin   | 0,03 mM    |
|                           | Benzamidin  | 145 mM     |
|                           | Aprotinin   | 0,37 mg/ml |

Die Protease-Inhibitor-Lösung wurde frisch auf Eis angesetzt.

|                         |      |                       |
|-------------------------|------|-----------------------|
| PMSF-Stammlösung (100×) | PMSF | 100 mM in Isopropanol |
|-------------------------|------|-----------------------|

|                               |  |                   |
|-------------------------------|--|-------------------|
| Cracking-Puffer (Stammlösung) | Harnstoff                              | 8 M               |
|                               | SDS                                    | 5 % (w/v)         |
|                               | Tris/HCl; pH 6,8                       | 40 mM             |
|                               | EDTA                                   | 0,1 mM            |
|                               | Bromphenolblau                         | 0,4 mg/ml         |
| Crackng-Puffer (komplett)     | Cracking-Puffer (Stammlösung)          | 1 ml              |
|                               | 2-Mercaptoethanol                      | 10 µl             |
|                               | Protease-Inhibitor-Lösung (vorgekühlt) | 70 µl             |
|                               | PMSF (100×)                            | 50 µl             |
|                               | ddH <sub>2</sub> O                     | <i>ad</i> 1,13 ml |

Alkalische Lyse: Eine OD<sub>600nm</sub>-Einheit (entspricht ca. 10<sup>7</sup> Zellen) einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden durch Zentrifugation (3 min bei 16.000×g) geerntet. Das Pellet wurde in 300 µl NaOH/2-Mercaptoethanol resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 30 µl 110%ige TCA (Endkonzentration 10% [w/v]) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und erneut 10 min auf Eis gestellt. Daraufhin wurden die gefällten Proteine durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 16.000×g pelletiert und durch Zugabe von 100 µl 1M Tris/HCl (pH 7,5) neutralisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in 30 µl Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert.

|                        |                    |                                  |
|------------------------|--------------------|----------------------------------|
| NaOH/2-Mercaptoethanol | NaOH               | 2 M                              |
|                        | 2-Mercaptoethanol  | 5% (v/v)                         |
| 110%ige TCA-Lösung     | Trichloressigsäure | 110% (w/v) in ddH <sub>2</sub> O |

## 2.18 Durchführung eines Hefe two-hybrid-assays

Bei einem Hefe two-hybrid-assay wird die Interaktion zwei bekannter Proteine untersucht. Die entsprechenden Plasmide wurden wie unter „Standard Transformation von Hefe“ beschrieben in den Hefestamm Y190 cotransformiert und auf SD Medium ausplattiert. Die Platten wurden 3-5 Tage bei 37°C inkubiert. Die Expression der Proteine wurde durch Proteinextraktion und Western-Blotting überprüft. Die Aktivierung der beiden Reportergene wurde folgendermaßen getestet:

### 2.18.1 Colony-lift filter-assay zum Test der Aktivierung des *lacZ*-Reportergens

Für diesen Test wurden Hefekolonien auf Agarplatten verwendet, die nicht älter als vier Tage waren oder einen Durchmesser von 1-2 mm hatten. Auf die Kolonien wurde ein Filterpapier (Whatman 3MM Chr paper) gelegt und angedrückt. Das Filterpapier wurde anschließend von der Agarplatte abgenommen und für mindestens 10 s in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach dem Auftauen des Filterpapiers wurde es erneut für mindestens 10 s in flüssigen Stickstoff getaucht. Durch diese Prozedur wurden die am Filterpapier haftenden Hefezellen aufgeschlossen. In eine Petrischale wurde ein dünnes, den Boden bedeckendes Filterpapier gelegt und auf dieses Filter die Z-Puffer/X-GAL-Lösung pipettiert. Das Filter mit den Hefen nach oben wurde in die Petrischale auf das dünne Filter gelegt. Die Petrischale samt Deckel wurde in eine Plastiktüte eingewickelt und im Dunkeln bei 37°C 8 h bis ü.N. inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Hefen, die mit dem Plasmid pCL1 oder den Plasmiden pVA3-1 und pTD1-1 transformiert wurden, verwendet. Eine Aktivierung des *lacZ*-Reporters wurde durch eine Blaufärbung auf dem Filter signalisiert.

|                       |  |                                 |
|-----------------------|--|---------------------------------|
| Z-Puffer              | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O | 16,1 g/l                        |
|                       | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O   | 5,5 g/l                         |
|                       | KCl  | 0,75 g/l                        |
|                       | MgSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O                | 0,246 g/l                       |
|                       | pH   | 7,0                             |
| X-GAL-Lösung          | X-GAL  | 20 mg/l in N,N-Dimethylformamid |
| Z-Puffer/X-GAL-Lösung | Z-Puffer   | 100 ml                          |
|                       | 2-Mercaptoethanol                                    | 0,27 ml                         |
|                       | X-GAL-Lösung   | 1,67 ml                         |

### 2.18.2 Test auf Aktivierung des *HIS3*-Reportergens

Hefekolonien, die auf die Aktivierung des *HIS3*-Reporters getestet wurden, wurden auf SD Agarplatten ohne Histidin, Tryptophan und Leucin und mit 20–40 mM 3-AT ausgestrichen oder ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Schnelles Wachstum signalisierte eine Aktivierung des *HIS3*-Reportergens. Als Positivkontrolle wurde Hefe, die mit dem Plasmid pCL1 oder den Plasmiden pVA3-1 und pTD1-1 transformiert wurde, verwendet.

## **2.19 Vorbereitung und Durchführung des Hefe two-hybrid-Screenings**

Zu den Vorbereitungen des Hefe two-hybrid-Screenings gehörten die Konstruktion des Bait-Plasmides, die Bestätigung der Expression des Bait-Proteins in Hefe, der Test auf Selbstaktivierung, die Bestimmung der optimalen 3-AT-Konzentration für die Agarplatten für das Hefe two-hybrid-Screening sowie die Amplifikation der cDNA-Bibliothek. Die Durchführung des Hefe two-hybrid-Screenings umfaßte die Transformation des Bait-Plasmides und der cDNA-Bibliothek, das Ausplattieren der transformierten Hefe sowie die Selektion zweifach positiver Klone und die Eliminierung falsch Positiver.

### **2.19.1 Konstruktion des Bait-Plasmids**

Die cDNA des Bait-Proteins wurde in den Vektor pAS2-1 und/oder pGBT9 inseriert. Das richtige Leseraster und die Sequenz wurden durch Sequenzierung bestätigt.

### **2.19.2 Bestätigung der Expression des Bait-Proteins**

Durch Proteinextraktion und Western-Blotting wurde überprüft, ob das Bait-Protein tatsächlich in der Hefe exprimiert wird. Für die Immundetektion des Hybridproteins durch Western-Blotting wurden Antikörper gegen die GAL4-BD und das eigentliche Bait-Protein eingesetzt:

#### primäre Antikörper:

|                  |   |
|------------------|---|
| anti Gal4-DNA-BD | (Maus monoklonal IgG1 <sub>κ</sub> , Klon: keine Angabe, Clontech Laboratories, Best.Nr. 5399-1) Verdünnung: 1:5000 |
| anti MeCP2       | (Huhn polyklonal, Box 2; erhalten von C. Koch)<br>Verdünnung: 1:5000  |

#### sekundäre Antikörper:

- donkey anti mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) Verdünnung: 1:5000
- anti chicken IgY-HRP (Promega) Verdünnung: 1:5000

### **2.19.3 Test auf Selbstaktivierung und Bestimmung der optimalen 3-AT-Konzentration**

Es wurde getestet, ob das Bait-Protein selbstaktivierend ist, d.h., ob es in der Lage ist, die Reportergene allein, ohne eine Interaktion mit einem weiteren Hybridprotein, zu aktivieren. Dieser Test wurde kombiniert mit der Bestimmung der optimalen 3-AT-Konzentration der

Agarplatten für das Hefe two-hybrid-Screening. Die mit dem Bait-Plasmid transformierte Hefe wurde auf SD-Agarplatten mit 20, 30, 40 und 50 mM 3-AT ohne Tryptophan und Histidin ausgestrichen. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden Hefeklone, die mit den Plasmiden pCL1 bzw. pLAM5-1 transformiert waren, verwendet. Die Platten wurden eine Woche bei 30°C inkubiert. Ist das Bait-Protein selbstaktivierend, kommt es zu einem starken Wachstum auf allen Agarplatten. Ist das Wachstum nur schwach, d.h. vergleichbar mit der Negativkontrolle, ist das Bait-Protein nicht selbstaktivierend. Die optimale 3-AT-Konzentration der Agarplatten für das Hefe two-hybrid-Screening ist diejenige, bei der die mit dem Bait-Plasmid transformierten Hefekolonien nach einer Woche nicht größer oder gleich 1 mm im Durchmesser sind.

#### **2.19.4 Amplifikation der HeLa-cDNA-Bibliothek**

Die *E. coli*-Suspension mit der HeLa-cDNA-Bibliothek wurde auf 100 LB<sub>amp</sub>-Agarplatten (15 cm im Durchmesser) ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die fast konfluent gewachsenen Bakterien wurden in 2 × 1 l LB-Medium überführt und auf einem Schüttler weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Die Plasmidisolation wurde mit dem Plasmid Giga Kit der Firma Qiagen nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

#### **2.19.5 Transformation des Bait-Plasmides und der cDNA-Bibliothek**

Das folgende Protokoll wurde verwendet, um eine sequentielle Transformation von Bait-Plasmid und Prey-Plasmiden durchzuführen: Der Hefestamm Y190 wurde zuvor wie unter „Standard Transformation von Hefe“ beschrieben mit dem Bait-Plasmid transformiert. Fünfzig Milliliter SD-Trp Medium wurden dann mit einer Kolonie der transformierten Hefe angeimpft und über Nacht bei 30°C in einem Schüttler bei 200 UpM inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Zelltitert wie unter „Standard Transformation von Hefe“ beschrieben bestimmt. Mit dem Volumen von  $7 \times 10^8$  Zellen wurden dann 150 ml auf 30°C vorgewärmtes YPD Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Dies ergab einen anfänglichen Zelltitert von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Hefekultur wurde bei 30°C in einem Schüttler bei 200 UpM solange inkubiert, bis die Hefen zwei Zellteilungen durchlaufen und mindestens einen Zelltitert von ca.  $2 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht hatten. Die Flüssigkultur wurde nach dieser Inkubation in drei sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3000×g 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden in je ca. 25 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Zellen wurden wieder durch Zentrifugation sedimentiert (3000×g, 5 min), die Pellets in einem Gesamtvolumen von 3 ml 100 mM LiAc resuspendiert

und in einem 15 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Die Zellen wurden dann 15 min bei 30°C in einem Wasserbad inkubiert, anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3000×g 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. In ein anderes Reaktionsgefäß wurde der Transformationsmix in der unten aufgeführten Reihenfolge pipettiert:

50% PEG, 7,20 ml

1 M LiAc, 1,08 ml

ss-DNA (10 mg/ml), 300 µl

Plasmid-DNA (30-50 µg)

steriles ddH<sub>2</sub>O *ad* 10,80 ml

Der Transformationsmix wurde gründlich gemischt (Vortex) und zu dem Zellpellet gegeben. Die Zellen wurden nun in dem Transformationsmix resuspendiert und gründlich gemischt (Vortex). Die Suspension wurde 30 min in einem 30°C warmen Wasserbad inkubiert und nach 10 und 20 min durch leichtes Schwenken gründlich gemischt. Anschließend wurde die Suspension 45 min in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert und alle 5 min durch leichtes Schwenken gründlich gemischt. Der ganze Transformationsansatz wurde nun in 500 ml SD-LTH Medium überführt und 4 Stunden bei 30°C in einem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert und in 2,4 ml SD-LTH resuspendiert und auf 20 SD-LTH Agarplatten mit 3-AT ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C in einem Brutschrank inkubiert und jeden Tag auf das Erscheinen neuer Kolonien bzw. das Wachstum schon vorhandener Kolonien untersucht.

#### **2.19.6 Selektion zweifach positiver Klone und Eliminierung „falsch Positiver“**

Durch das Wachstum auf den Agarplatten ohne Histidin und mit 3-AT wurden diejenigen Hefeklone selektiert, in denen das *HIS3*-Reportergen aktiviert wurde. Die Aktivierung des zweiten Reportergens wurde durch den colony-lift filter-assay getestet. Viele der in einem Hefe two-hybrid-Screening zweifach positiven Hefeklone sind sogenannte „falsch Positive“, das bedeutet, daß es in diesen Hefen trotz der Aktivierung beider Reportergene nicht zu einer spezifischen Interaktion der Hybridproteine kommt. Zunächst wurden von den zweifach positiven Klonen die Prey-Plasmide isoliert und sequenziert. Durch einen Datenbankabgleich (BLASTN) wurde das cDNA-Insert identifiziert. Durch die Sequenzierung der Prey-Plasmide konnte ebenfalls festgestellt werden, ob das cDNA-Insert im richtigen Leseraster mit der Gal4-AD fusioniert war. Klone mit Plasmiden, bei denen dies nicht der Fall war, wurden als

„falsch Positive“ gewertet. Da es sich bei MeCP2 um ein Kernprotein handelt, wurden auch mitochondriale oder cytoplasmatische Proteine ausgeschlossen. Durch den Test auf Selbstaktivierung konnten weitere falsch Positive identifiziert werden.

## **2.20 Plasmidisolation aus Hefen, Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen (Stamm HB101) und Elektroporation von *E. coli* (Stamm HB101)**

Die Hefeklone aus dem Hefe two-hybrid-Screen enthalten das Bait- und das Prey-Plasmid. Das Prey-Plasmid codiert für ein unbekanntes Fusionsprotein mit der Gal4-AD. Um dieses Protein zu identifizieren, wurden zunächst beide Plasmide aus der Hefe isoliert. Da die Ausbeute bei der hier angewandten Methode zur Plasmidisolation sehr gering ist, wurden die Vektoren zur Amplifikation in den *E. coli*-Stamm HB101 elektroporiert. Die Bakterienzellen enthalten nach der Elektroporation entweder das Bait- oder das Prey-Plasmid. HB101 ist auxotroph für Leucin. Das Hefe *LEU2*-Gen, das sich auf den hier verwendeten Vektoren für Fusionsproteine mit der Gal4-AD befindet, wird in HB101 exprimiert. Somit lassen sich auf einem leicht modifizierten M9-Medium diejenigen Bakterienklone isolieren, die den Vektor mit dem *LEU2*-Gen und somit die cDNA für das Prey-Protein enthalten. Von diesen Klonen wurde das Prey-Plasmid isoliert und das unbekannte Gen identifiziert. Bakterienklone mit dem Bait-Vektor wachsen auf dem modifizierten M9-Medium nicht, da sie anstatt des *LEU2*-Gens das *TRP1*-Gen enthalten.

### **2.20.1 Plasmidisolation aus Hefen**

Eine Hefekolonie von 2 bis 3 mm Durchmesser wurde in 200 µl Hefelysierlösung resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß mit 0,3 g Glaskügelchen (425-600 µm, Sigma) und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) überführt und 2 min gründlich geschüttelt (Vortex). Nach einer 5-minütigen Zentrifugation (14.000 UpM, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurden 150 µl der wässrigen Phase in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 15 µl 5 M Kaliumacetat und 300 µl Ethanol sowie Mischen und anschließender Zentrifugation (5 min, 14.000 UpM, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde die DNA gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 80%igem Ethanol gewaschen und dann bei RT getrocknet. Die DNA wurde in 40 µl TE-Puffer mit RNase A (100 µg/ml, DNasen wurden zuvor inaktiviert) gelöst und 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat, 150 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation (10 min, 14.000 UpM, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde die DNA abermals gefällt. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl dd H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.20.2 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen (Stamm HB101)

Fünfhundert Milliliter LB-Medium wurden mit 2,5 ml einer frischen Übernachtskultur (Gesamtvolumen der Übernachtskultur: 5 ml) angeimpft und solange bei 37°C auf einem Schüttler (220 UpM) inkubiert bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0,3–0,5 erreicht war. Der Kolben mit der Bakterienkultur wurde dann 15–20 min auf Eis abgekühlt. Alle weiteren Arbeiten wurden mit vorgekühlten Flüssigkeiten und Geräten und auf Eis durchgeführt. Die Bakterien wurden in Zentrifugenbecher überführt und abzentrifugiert (15 min, 4000×g). Es folgten drei Waschschrte: Die Zellen wurden in 500 und 250 ml ddH<sub>2</sub>O und 20 ml 10% Glycerin-Lösung resuspendiert und jeweils nach der Resuspension abzentrifugiert (15 min, 4000×g). Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 1-1,5 ml 10% Glycerin-Lösung resuspendiert, in 90 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C bis zu 6 Monaten gelagert.

### 2.20.3 Elektroporation von *E. coli* (Stamm HB101)

Die Elektroporation wurde mit dem „Electroporator II“ von der Firma Invitrogen durchgeführt. Die Bedienung des „Electroporators II“ erfolgte nach Angaben des Herstellers. Vierzig Mikroliter der auf Eis aufgetauten, elektrokompenten Bakteriensuspension wurden mit 4 µl Plasmidlösung gemischt und in eine vorgekühlte Küvette (Abstand der Kontakte: 0,1 cm) pipettiert. Die Einstellungen für den „Electroporator II“ und für die Spannungsquelle und die sich daraus ergebende Feldstärke und Länge des Pulses sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

| Spannungsquelle   | Electroporator II                     |
|---|---------------------------------------|
| Spannung: 1500 V<br>Stromstärke: 25 mA<br>Leistung: 25 W                        | Kapazität: 50 µF<br>Widerstand: 150 Ω |
| Länge des Pulses (mit einer 0,1 cm Küvette) = 7,5 ms<br>Feldstärke = 15000 V/cm |                                       |

Nach dem Einsetzen der Küvette in den „Electroporator“ und dem Auslösen des Pulses wurde die Bakteriensuspension mit 2 ml LB-Medium gemischt und in einem 15 ml-Röhrchen 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde mit einem Drigalski-Spatel auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert. Die Agarplatten wurden in einem 37°C-Brutschrank über Nacht inkubiert.



Am nächsten Tag wurden Kolonien auf modifizierten M9-Agarplatten überstrichen und diese 18-24 h bei 37°C inkubiert. Von den Kolonien auf den modifizierten M9-Platten wurden dann die Plasmide isoliert.

|            |  |        |
|------------|--|--------|
| 5×M9-Salze | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O | 85,6 g |
|            | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                        | 15 g   |
|            | NaCl   | 2,5 g  |
|            | NH <sub>4</sub> Cl                                     | 5,0 g  |
|            | ddH <sub>2</sub> O                                     | ad 1 l |

5×M9-Salzlösung in 200 ml-Aliquots autoklavieren.

|                             |                       |        |
|-----------------------------|-----------------------|--------|
| modifiziertes M9-Agarmedium | Agar                  | 20 g   |
|                             | 5×M9-Salze            | 200 ml |
|                             | 1 M MgSO <sub>4</sub> | 2 ml   |
|                             | 20% Glucose           | 20 ml  |
|                             | 1 M CaCl <sub>2</sub> | 0,1 ml |
|                             | Prolin (10 mg/ml)     | 4 ml   |
|                             | 1 M Thiamin           | 1 ml   |
|                             | Ampicillin (50 mg/ml) | 1 ml   |
|                             | ddH <sub>2</sub> O    | ad 1 l |

Wasser mit Agar, Glucose- und MgSO<sub>4</sub>-Lösung autoklavieren. CaCl<sub>2</sub>-, Prolin-, Ampicillin- und Thiamin-Lösung sterilfiltrieren.

## 2.21 Isolierung von genomischer DNA aus Menschenblut

Für die Detektion von Mutationen im *MECP2*-Gen wurde genomische DNA aus dem Blut von Rett-Patienten isoliert. Zehn Milliliter EDTA-Blut wurden mit 30 ml Lysepuffer gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde alle 2-3 min gemixt. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (600×g, 15 min, 4°C) pelletiert und in 10 ml Nuklei-Lysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden 330 µl 10% SDS-Lösung und 1,67 ml Proteinase K-Lösung (2 mg/ml in 1% SDS/2 mM EDTA) zugefügt. Es folgte eine Inkubation über Nacht in einem Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln. Am nächsten Tag wurde die Probe mit 3,32 ml gesättigter NaCl-Lösung gemischt und 15 s kräftig geschüttelt. Die denaturierten Proteine wurden abzentrifugiert (1200×g, 20 min, RT) und der Überstand in einem neuen Gefäß mit 1 Volumen Isopropanol gemischt. Die ausfallende genomische DNA wurde in ein

1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in TE gelöst und die Konzentration bestimmt. Der OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>-Wert lag in der Regel zwischen 1,75 und 1,8.

|                   |                    |        |
|-------------------|--------------------|--------|
| Lysepuffer        | NH <sub>4</sub> Cl | 155 mM |
|                   | KHCO <sub>3</sub>  | 10 mM  |
|                   | EDTA               | 0,1 mM |
|                   | pH                 | 7,4    |
| Nuklei-Lysepuffer | Tis/HCl            | 10 mM  |
|                   | NaCl               | 400 mM |
|                   | EDTA               | 2 mM   |
|                   | pH                 | 8,2    |

## 2.22 PCR zur Amplifikation von Teilen des humanen *MECP2*-Gens

Folgende Primer (Amir, R.E. *et al.*, 1999) wurden benutzt, um Teile des *MECP2*-Gens zu amplifizieren:

Exon 3: E3-DBD-F 5'-AGC CCG TGC AGC CAT CAG CC-3'

E3-DBD-R 5'-GTT CCC CCC GAC CCC ACC CT-3' (annealing Temperatur: 66°C)

Exon 4: E4-DBD-F 5'-TTT GTC AGA GCG TTG TCA CC-3'

E4-DBD-R 5'-CTT CCC AGG ACT TTT CTC CA-3' (annealing Temperatur: 60°C)

Die folgenden Primer wurden von mir selbst ausgesucht:

Exon 2: E2-F 5'-TAG GTA AGC TGG GAA ATA GCC-3'

E2-R 5'-GCA CAG TTT GGC ACA GTT ATG-3' (annealing Temperatur: 63°C)

Exon 3: MBD3'-F 5'-CCT GCC TCT GCT CAC TTG TT-3'

MBD3'-R 5'-GGG GTC ATC ATA CAT GGG TC-3' (annealing Temperatur: 63°C)

Exon 4: E4-TRD-F 5'-CAC GTC AGA GGG TGT GCA G-3'

E4-TRD-R 5'-GCA GGG GCT TCA CCA CTT C-3' (annealing Temperatur: 63°C)

Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl mit 1×PCR-Puffer (20 mM Tris/HCl [pH 8,4], 50 mM KCl; Life Technologies), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 2 U *Taq* DNA-Polymerase (Life Technologies), 100 ng genomische DNA und je 10 pmol Primer durchgeführt. Das

PCR-Pogramm sah folgendermaßen aus:  $1 \times 95^{\circ}\text{C}/5 \text{ min}$ ,  $30 \times (95^{\circ}\text{C}/30 \text{ s}, 60 - 66^{\circ}\text{C}$  [je nach Primerpaar, s.o.]/ $30 \text{ s}, 72^{\circ}\text{C}/7 \text{ s})$ ,  $1 \times 72^{\circ}\text{C}/7 \text{ min}$ . Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die spezifischen PCR-Produkte aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract 2 in 1-Kit (Macherey-Nagel) gereinigt. Die PCR-Produkte wurden mit den Primern, die auch für die PCR eingesetzt wurden, in beide Richtungen direkt sequenziert. Bei kleineren Insertionen/Deletionen wurden die PCR-Produkte mit dem pGEM<sup>®</sup>T Easy Vector System von Promega nach Angaben des Herstellers kloniert und anschließend sequenziert.

## 2.23 Kultur humaner Krebszellen

Für das mammalian two-hybrid-System und die Coimmunpräzipitation wurden menschliche HEK293-Zellen, eine Adenovirus-transformierte, embryonale Nierenzelllinie (Graham et al., 1977), verwendet. Als Nährlösung wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (Life Technologies) mit 10% fötalem Kälberserum in einer Kulturflasche benutzt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> in der Luft bei 37°C kultiviert. Sobald die adherenten HEK293-Zellen konfluent waren, wurde die Nährlösung abgesaugt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Trypsinlösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst und bis auf ein Aliquot abgesaugt. Die verbleibenden Zellen wurden in frische Nährlösung aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Es wurde darauf geachtet, daß die Zellen nicht länger als einen Tag in einem konfluenten Zustand waren.

MCF7-Zellen (Herkunft: menschliches Mamakarzinom) wurden für immuncytologische Untersuchungen verwendet. Als Nährlösung wurde RPMI-Medium (Life Technologies) benutzt. Auch die adherenten MCF7-Zellen wurden in einem Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> in der Luft bei 37°C kultiviert und regelmäßig in neues Nährmedium überführt.

|               |         |           |
|---------------|---------|-----------|
| Trypsinlösung | Trypsin | 0,5 g/l   |
|               | EDTA    | 0,197 g/l |

Die Trypsinlösung wurde in PBS angesetzt.

|     |                                  |        |
|-----|----------------------------------|--------|
| PBS | KCl                              | 0,2 g  |
|     | NaCl                             | 8,0 g  |
|     | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,2 g  |
|     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,15 g |
|     | ddH <sub>2</sub> O               | ad 1 l |

## **2.24 Mammalian two-hybrid-assay**

Das Prinzip des mammalian two-hybrid-assays ist dasselbe wie das des Hefe two-hybrid-assays. Bei dem hier verwendeten System wurden die Gal4-BD und die VP16-Aktivierungsdomäne benutzt, um die entsprechenden Fusionsproteine herzustellen. Das System funktioniert mit nur einem Reporterogen, das auf einem Plasmid lokalisiert ist. Der mammalian two-hybrid-assay wurde in HEK293-Zellen durchgeführt, die mit dem Reporterplasmid und zwei Expressionsplasmiden transfiziert wurden. Die Calciumphosphat-Methode oder die Lipofectamine Plus Reagenzien (Invitrogen) wurden verwendet, um die HEK293-Zellen transient mit Plasmid-DNA zu transfizieren. Bei der Calciumphosphat-Methode wird die DNA mit Calciumchlorid und einer phosphathaltigen Pufferlösung gemischt. Dabei bilden sich feine DNA-Calciumphosphat-Kristalle, die sich, wenn sie mit Zellen in Kontakt kommen, auf der Zelloberfläche niederschlagen. Die DNA gelangt anschließend durch Endocytose in die Zelle. Mit den Lipofectamine Plus Reagenzien wird eine Liposomen-vermittelte Transfektion durchgeführt. Beide Methoden wurden verwendet, um Zellen transient zu transfizieren und anschließend die Expression von Proteinen durch Western-Blotting zu überprüfen. Für die mammalian two-hybrid- und die Coimmunpräzipitationsexperimente wurden jedoch ausschließlich die Lipofectamine Plus Reagenzien verwendet.

### **2.24.1 Plasmide**

Plasmide für die Expression verschiedener Fusionsproteine mit der Gal4-BD wurden mit dem Vektor pcDNA3-Gal4BD (erhalten von J.Han) durch Einfügen der verschiedenen cDNA-Inserts in die *KpnI*- und *BamHI*-Schnittstellen hergestellt. Für die Expression eines Fusionsproteins bestehend aus der transkriptionellen Repressordomäne von MeCP2 (TRD, aa 197-486) und der VP16-Aktivierungsdomäne wurde das Plasmid pcDNA3-Flag-TRD-VP16 verwendet. Als firefly luciferase-Reporterplasmid wurde der Vektor pFR-LUC (Stratagene) mit fünf Gal4-Bindungsstellen, die in die *BamHI*-Schnittstelle eingefügt waren, verwendet. Zur Standardisierung der firefly luciferase-Aktivität wurde das renilla luciferase-Plasmid pRL-TK (Promega) cotransfiziert.

### **2.24.2 Transiente Transfektion und Analyse**

Für die transiente Transfektion mit der Calciumphosphat-Methode wurden HEK293-Zellen in Gewebekulturschalen (35 mm im Durchmesser) am Tag vor der Transfektion ausgesät. Als Nährlösung wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (Life Technologies) mit 10%

fötalem Kälberserum verwendet. Drei Stunden vor dem Start der Transfektion wurde die Nährlösung durch frisches Medium ersetzt. Zur transienten Transfektion von drei Gewebekulturschalen wurde folgender Ansatz in der angegebenen Reihenfolge in ein 4 ml-Röhrchen pipettiert: Plasmid-DNA, ddH<sub>2</sub>O *ad* 350 µl, 22 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> und 175 µl 2×HBS. Dabei wurde der Ansatz jeweils nach Zugabe des Wassers, des Calciumchlorids und während der tropfenweisen Zugabe des 2×HBS gemischt (Vortex). Der Ansatz wurde ½ h bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden je 100 µl tropfenweise auf das Medium einer Gewebekulturschale pipettiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit dem Präzipitat entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in PLP-Puffer (aus dem Dual-Luciferase Assay von Promega) aufgenommen und eingefroren. Transiente Transfektion mit den Lipofectamine Plus Reagenzien (Life Technologies) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (siehe auch Abschnitt „Coimmunpräzipitation“). Firefly- und renilla-luciferase-Aktivität wurden nach Herstellerangaben mit dem Dual-Luciferase Assay (Promega) bestimmt.

|       |                                  |        |
|-------|----------------------------------|--------|
| 2×HBS | HEPES                            | 50 mM  |
|       | NaCl                             | 280 mM |
|       | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,5 mM |
|       | pH                               | 7,1    |

## 2.25 Immuncytologische Untersuchungen

MCF7-Zellen wurden auf einem Objektträger (Diagnostica-Objektträger, schwarz beschichtet, 10 Zählfelder, ca. 6 mm Durchmesser; Firma: Assistent) in RPMI-Medium (Life Technologies) bei 37°C über Nacht in einem Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> in der Luft inkubiert. Das Nährmedium wurde mit PBS gewegewaschen und die adherenten Zellen 10 min in 1% Paraformaldehyd in PBS (frisch angesetzt) fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Es folgte eine zehnminütige Dehydratisierung/Permeabilisierung mit –20°C kaltem Methanol. Danach wurden die Zellen einmal kurz mit PBS gewaschen und dann 10 min in PBS inkubiert. Das PBS wurde entfernt und die Zellen 1 h mit dem ersten Antikörper inkubiert. Die Antikörperlösung wurde mit PBS weggespült und die Zellen wurden zweimal 15 min mit PBS gewaschen. Das PBS wurde entfernt und die Zellen wurden mit dem sekundären Antikörper und gegebenenfalls mit DAPI 1 h im Dunkeln inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls im Dunkeln. Die sekundäre Antikörperlösung wurde mit PBS gewegewaschen und es folgten zwei zehnminütige

Waschschritte mit PBS. Die Zellen wurden kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mindestens 15 min an der Luft getrocknet. Die Zellen wurden mit Einbettungsmedium (20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 2,3% DABCO; 90% Glycerin) überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Folgende Antikörper wurden in der angegebenen Verdünnung mit 3% BSA in PBS verwendet:

#### Primäre Antikörper:

|                   |   |
|-------------------|---|
| anti HDAC1        | (Ziege polyklonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Best.Nr. sc-6298)<br>Verdünnung: 1:80                            |
| anti HDAC2 (c-19) | (Ziege polyklonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Best.Nr. sc-6296)<br>Verdünnung: 1:40                            |
| anti HDAC3        | (Maus monoklonal IgG1, Klon 40, Transduction Laboratories, Best.Nr. H80920) Verdünnung: 1:160                     |
| anti RbAp46/48    | (Maus monoklonal IgG <sub>2ak</sub> , Klon 3-255, Upstate Biotechnology, Best.Nr. 05-523) Verdünnung: 1:200       |
| anti RNA-Pol II   | (Maus monoklonal IgG <sub>2ak</sub> , Klon 8WG16, Berkeley Antibody Company, Best.Nr. MMS-126R) Verdünnung: 1:100 |
| anti MeCP2        | (Kaninchen polyklonal IgG, Upstate Biotechnology, Best.Nr. 07-013)<br>Verdünnung: 1:50                            |
| anti TFIIB        | (mAb, Transduction Laboratories, Best.Nr. T41520) Verdünnung: 1:80  |
| mSin3A(K-20)      | (Kaninchen polyklonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Best.Nr. sc-994) Verdünnung: 1:160                           |

#### Sekundäre Antikörper:

- Cy<sup>TM</sup>2-conjugated AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch), Verdünnung: 1:160
- Rhodamine Red<sup>TM</sup>-X goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate (Molecular Probes), Verdünnung: 1:100
- Cy<sup>TM</sup>2-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch), Verdünnung: 1:100
- Texas red<sup>®</sup>dye-conjugated AffiniPure rabbit anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch), Verdünnung: 1:50

## 2.26 GST pull down-assay

Die GST pull down-assays wurden durchgeführt, um die Interaktion zweier Proteine *in vitro* zu untersuchen. Beide Proteine wurden bakteriell exprimiert, eines davon als GST-Fusionsprotein (GST für Glutathion-S-Transferase). Zunächst wurde Glutathion-Sepharose mit dem GST-Fusionsprotein beladen und anschließend gewaschen. Die beladene GST-Sepharose wurde dann mit dem zweiten Protein (als Bestandteil eines bakteriellen Extraktes) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die Glutathion-Sepharose durch Zentrifugation isoliert und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Bei einer Bindung des zweiten Proteins an das Fusionsprotein werden beide Proteine zusammen mit der GST-Sepharose sedimentiert, nicht jedoch andere Proteine des bakteriellen Extraktes. Durch Western-Blotting wurde analysiert, ob das zweite Protein an das Fusionsprotein gebunden war. Als Kontrolle wurde stets ein Ansatz mit GST allein parallel zu den anderen Ansätzen durchgeführt, um später eine unspezifische Bindung an GST ausschließen zu können. Die GST-Expressionsplasmide pGEX-FBP11WW, pGEX-FBP21WW und pGEX-HYPCWW (für GST-FBP11[WW], GST-FBP21[WW] und GST-HYPC[WW]) wurden von M.T. Bedford zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle wurde das Plasmid pGEX-2T eingesetzt (zur Expression von GST). Das folgende Protokoll beschreibt die bakterielle Expression der Proteine in *E. coli* (Stamm BL21 pLysS) und die Herstellung der Proteinextrakte sowie die Durchführung des eigentlichen GST pull down-Experiments:

### Bakterielle Expression der Proteine und Herstellung der Extrakte

Als Ausgangsmaterial standen eine Reihe mit Expressionsplasmiden transformierte Bakterienklone (*E. coli*, Stamm BL21 pLysS) zur Verfügung. Von jedem Klon wurde zunächst eine 5 ml-Übernachtskultur in LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (30 µg/ml) hergestellt. Die 5 ml-Kultur wurde zu 50 ml LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol (Konzentrationen wie oben) gegeben und bei 37°C geschüttelt. Nach 1 h wurde die Expression der GST-Fusionsproteine (GST-FBP11-WW und GST-HYPC-WW) durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expression von hMeCP2 bzw. von verschiedenen hMeCP2-Fragmenten wurde bei einer OD<sub>600nm</sub> von ca. 0,6 mit 1 mM IPTG induziert. Die unterschiedliche Behandlung der GST- und MeCP2-Expressionsplasmide hinsichtlich des Zeitpunktes der Induktion ist vektorabhängig und dementsprechend optimiert. Das Rückgrat der GST-Expressionsplasmide ist GST-2TK (Pharmacia), das der MeCP2-Expressionsplasmide ein pET-Vektor (Novagen). Die Bakterienkultur wurde anschließend für weitere 2-3 h bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und die Bakterien

wurden durch Zentrifugation (Heräeus, 4°C, 3500 UpM, 15 min) pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml Extraktionspuffer (auf 4°C gekühlt) resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch achtmaliges Beschallen für je 30 sec bei 0°C in einem Wasserbad (Branson Sonifier: Modell 450 und 102C, Stufe 10, duty cycle 90%). Durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (maximale Geschwindigkeit, 4°C, 20 min) wurden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Der Proteinextrakt wurde eingefroren. Die bakteriellen Extrakte mit MeCP2 wurden wieder aufgetaut und nochmals zentrifugiert, um weitere unlösliche Bestandteile abzutrennen. Die Extrakte mit den Fusionsproteinen wurden hingegen nicht nochmals zentrifugiert, obwohl auch bei diesen nach dem Auftauen erneut unlösliche Bestandteile ausfielen. Um die Konzentration der exprimierten Proteine abschätzen zu können, wurden durch SDS-PAGE Proteingele mit 1, 3 und 5 µl Proteinextrakt und 1, 2 und 3 µg BSA-Standard angefertigt.

|                   |                     |        |
|-------------------|---------------------|--------|
| Extraktionspuffer | Na-Phosphat; pH 6,8 | 10 mM  |
|                   | NaCl                | 400 mM |
|                   | Triton X-100        | 0,1%   |
|                   | DTT                 | 1 mM   |
|                   | PMSF                | 0,5 mM |

DTT und PMSF wurden vor Gebrauch des Puffers hinzugefügt.

#### GST pull down-Experiment:

Die GST pulldown-Experimente wurden auf Eis durchgeführt, der auf 4°C gekühlte Bird-Puffer A wurde stets mit frisch zugesetztem PMSF (0,5 mM) verwendet. Zunächst wurde eine 75-prozentige Glutathion-Sepharose-Suspension (Pharmacia) gewaschen. Dazu wurden 67 µl der Suspension und 10 ml Bird-Puffer A in ein 15 ml-Plastikröhrchen pipettiert und von Hand geschwenkt. Die Sepharose wurde anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (500×g, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde nun mit dem GST-Fusionsprotein bzw. der Glutathion-S-Transferase allein beladen. Dazu wurde diese mit Bird-Puffer A (*ad final* 5 ml) und 50 µg Protein (als Bestandteil des bakteriellen Extraktes) gemischt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 4°C auf einem horizontalen Schüttler. Anschließend wurde der Ansatz wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde dreimal mit je 5 ml Bird-Puffer A gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde die beladene Glutathion-Sepharose mit dem bakteriellen Extrakt, der MeCP2 enthielt, inkubiert. Dazu wurden 10 µg Protein und Bird-Puffer A (*ad final* 2 ml) mit



der Sepharose gemischt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 4°C auf einem horizontalen Schüttler. Der Ansatz wurde wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Sepharose wurde fünfmal mit je 5 ml Bird-Puffer A gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose (ca. 80 µl Volumen) mit 70 µl H<sub>2</sub>O und 30 µl 6×Laemmli-Puffer gemischt und eingefroren. Das GST pull down-Experiment wurde durch Western-Blotting analysiert, wobei auch jeweils 10% der MeCP2-Extrakte (Input) aufgetragen wurden. Der primäre Antikörper für das Western-Blotting wurde über Nacht appliziert.

|                                   |              |        |
|-----------------------------------|--------------|--------|
| Bird-Puffer A (Nan et al., 1993): | HEPES        | 20 mM  |
|                                   | NaCl         | 150 mM |
|                                   | EDTA         | 0,5 mM |
|                                   | DTT          | 1 mM   |
|                                   | Glycerin     | 10%    |
|                                   | Triton X-100 | 0,1%   |
|                                   | pH           | 7,9    |

DTT wurde vor Gebrauch des Puffers hinzugefügt.

#### Primäre Antikörper:

anti MeCP2 (Kaninchen polyklonal IgG, Upstate Biotechnology, Best.Nr. 07-013),  
Verdünnung: 1:50

#### Sekundäre Antikörper:

- goat anti rabbit IgG (H+L)-HRP (Southern Biotechnology Associates), Verdünnung: 1:5000

## **2.27 Coimmunpräzipitation**

Coimmunpräzipitationsexperimente wurden durchgeführt, um die Interaktion zweier exogen exprimierter Proteine *in vivo* zu untersuchen. Für die Coimmunpräzipitation wurden HEK293-Zellen mit zwei verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert. Das Lysat der Zellen wurde mit einem Antikörper inkubiert, der an ProteinA/G-Plus-Agarose gebunden war. Dadurch ließ sich der Antikörper leicht durch Zentrifugation von dem Lysat isolieren. Eines der exprimierten Proteine wurde mit Hilfe dieses Antikörpers präzipitiert. Durch Western-Blotting wurde analysiert, ob das zweite Protein durch eine Interaktion copräzipitiert wurde.

Das folgende Protokoll beschreibt die Durchführung der Transfektion und die eigentliche Coimmunpräzipitation.

#### Protokoll für die Transfektion:

-Tag 1: HEK293-Zellen wurden in Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser so ausgesät, daß sie ca. 24 h später 90-95% konfluent waren. Die Zellzahl pro Schale betrug ca.  $1,2 \times 10^7$ . Es wurde darauf geachtet, daß die Zellen vor dem Aussäen nicht länger als einen Tag in einem konfluenten Zustand waren.

-Tag 2: Für jeden Transfektionsansatz wurden in zwei sterile 12 ml-Röhrchen (Greiner) je 750 µl serumfreies DMEM pipettiert. In eines der Röhrchen wurden anschließend je 5 µg der beiden zu transfizierenden Plasmide pipettiert. Wurde nur ein Expressionsplasmid transfiziert, wurden zusätzlich 5 µg des Plasmids pBluescript SK(+) dem Ansatz zugefügt. Das Röhrchen wurde anschließend kurz (3 sec) gevortext. Danach wurden dem Medium/DNA-Gemisch 20 µl Plus-Reagenz zugefügt. Vor der Zugabe wurde das Plus-Reagenz ebenfalls kurz gevortext. Der Ansatz wurde sofort wieder kurz gevortext und 15 min bei RT inkubiert. In das zweite Röhrchen wurden gegen Ende der Inkubationszeit 30 µl Lipofectamine-Reagenz pipettiert. Vor der Zugabe wurde das Lipofectamine-Reagenz ebenfalls kurz gevortext. Das Gemisch wurde kurz gevortext und nach Ablauf der Inkubationszeit dem Inhalt des anderen Röhrchens hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz 15 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das Medium in den Kulturschalen mit den HEK293-Zellen durch 5 ml frisches DMEM+10% FCS ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz mit Hilfe einer 2 ml Glaspipette durch Auf- und Abpipettieren nochmals gemischt und anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft. Das Medium wurde durch Schwenken der Kulturschale mit dem Transfektionsansatz vermischt. Die Zellen wurden 3 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden den Zellen 6 ml DMEM+10% FCS zugefügt. Es folgte eine 45-stündige Inkubation im Brutschrank mit Mediumwechsel nach ca. 24 h.

-Tag 3: Das Medium in den Kulturschalen wurde durch je 10-12 ml frisches DMEM+10% FCS ersetzt.

-Tag 4: Die Zellen wurden 48 h nach Beginn der Transfektion geerntet: Dazu wurde das Medium über den Zellen abgesaugt und die Zellen wurden (auf der Platte festsitzend) mit 10 ml vorgewärmten PBS gewaschen. Anschließend wurden erneut 10 ml vorgewärmtes PBS in die Schale gegeben. Die Zellen wurden mit einem Schaber in diesen 10 ml PBS resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation (Heräeus, 1200 UpM, 5 min, RT) wurden die Zellen pelletiert. Die Röhrchen wurden kurz über Kopf auf ein Papierhandtuch

gestellt, so daß möglichst viel PBS ablief. Zusätzlich wurde Flüssigkeit von der Gefäßwand mit einem Wattetupfer entfernt.

#### Protokoll für die Coimmunpräzipitation:

Für die eigentliche Coimmunpräzipitation wurden alle Puffer auf 0-4°C gekühlt und es wurde auf Eis im Kühlraum gearbeitet. PMSF (Stammlösung 50 mM) wurde den Puffern stets vor Gebrauch frisch zugesetzt.

Die pelletierten Zellen wurden auf Eis gestellt. In das Röhrchen wurden 200 µl Lysepuffer gegeben. Das Röhrchen wurde gevortext (ca. 10 sec) und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat zweimal 30 sec bei 0°C in einem Wasserbad sonifiziert (Branson Sonifier: Modell 450 und 102C, Stufe 10, duty cycle 90%). Danach wurden dem Lysat 4 µl PMSF zugegeben und das Lysat wurde gemischt. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit und bei 4°C 10 min zentrifugiert. 170 µl des Überstandes (Vorsicht: kein Pellet mitschleppen) wurden direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, das die Antikörper beladene ProteinA/G-Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) und 230 µl NP-40-Puffer enthielt. Ein Teil des restlichen Lysats (ca. 40 µl) wurde mit Laemmli-Puffer versetzt und eingefroren, um später die Expression der transfizierten Plasmide durch Western-Blotting zu prüfen. Das Auftragsvolumen betrug 15-20 µl. Beladung der ProteinA/G-Plus-Agarose: Die ProteinA/G-Plus-Agarose wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem anti FLAG-Antikörper (Sigma) oder dem anti HA-Antikörper (Roche) beladen. 25-30 µl resuspendierte ProteinA/G-Plus-Agarose und 400 µl NP-40-Puffer wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 0,25 µl FLAG-Antikörper bzw. 10 µl HA-Antikörper (je ca. 1 µg) hinzugefügt. Es folgte eine dreistündige Inkubation in einem Überkopfschüttler (ÜKS) bei 4°C, so daß diese ungefähr zu Beginn der 30 min Inkubation des Lysats zu Ende war. Die Agarose wurde durch Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, max. Geschwindigkeit, 4°C, jedoch Gesamtdauer der Zentrifugation nur 4 sec) pelletiert und dann dreimal mit je 400 µl NP-40-Puffer gewaschen: jeweils 10 min im ÜKS bei 4°C waschen und wie oben abzentrifugieren.

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden der Agarose 230 µl NP-40-Puffer und 170 µl des abzentrifugierten Lysats hinzugefügt (wie oben bereits beschrieben). Der Ansatz wurde bei 4°C im ÜKS drei Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Agarose viermal wie oben beschrieben mit NP-40-Puffer gewaschen. Zuletzt wurde die Agarose mit 400 µl PBS (mit 1 mM PMSF) gewaschen und schließlich in 30 µl 3×Laemmli-Puffer aufgenommen. Für

den anschließenden Western-Blot wurde der Gal4-BD-Antikörper (primärer Antikörper) ca. 3 h appliziert. Der FLAG-Antikörper (als primärer Antikörper im Western-Blot, wenn für die Coimmunpräzipitation der HA-Antikörper eingesetzt wurde) wurde über Nacht eingesetzt.

#### Primäre Antikörper:

|                  |   |
|------------------|---|
| anti FLAG        | (Maus monoklonal IgG, Klon M2, Sigma, Best.Nr. F3165)   |
| anti HA          | (Ratte monoklonal IgG <sub>1</sub> , Klon 3F10, Roche Diagnostics, Best.Nr. 1 867 423)            |
| anti Gal4-DNA-BD | (Maus monoklonal IgG1 <sub>κ</sub> , Klon: keine Angabe , Clontech Laboratories, Best.Nr. 5399-1) |

#### Sekundäre Antikörper:

-donkey anti mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) Verdünnung: 1:5000

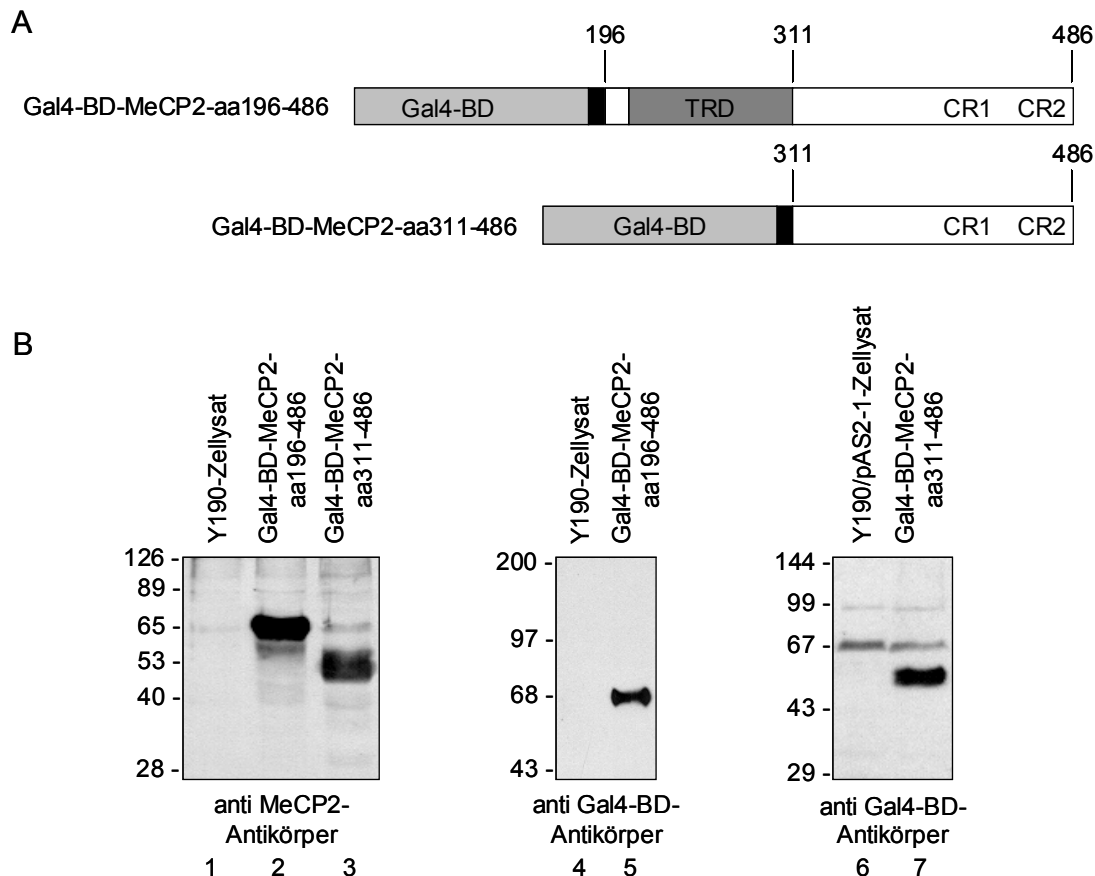
|                  |                      |        |
|------------------|----------------------|--------|
| PMSF-Stammlösung | 50 mM in Isopropanol |        |
| Lysepuffer       | Tris/HCl; pH 8,0     | 20 mM  |
|                  | NaCl                 | 150 mM |
|                  | NP-40                | 1%     |
|                  | DTT                  | 1 mM   |
|                  | Glycerin             | 10%    |
|                  | EDTA                 | 1 mM   |
|                  | PMSF                 | 0,5 mM |
| NP-40-Puffer     | HEPES/KOH; pH 7,5    | 50 mM  |
|                  | NaCl                 | 140 mM |
|                  | NP-40                | 1%     |
|                  | EDTA                 | 1 mM   |
|                  | Glycerin             | 10%    |
|                  | PMSF                 | 1 mM   |

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Hefe two-hybrid-Screens

Um neue Protein-Interaktionspartner für MeCP2 zu identifizieren, wurden zwei verschiedene C-terminale Fragmente des Proteins für Hefe two-hybrid-Screenings verwendet (Abb. 2A). Zunächst wurden die Aminosäuren 196 bis 486 von hMeCP2 mit der Gal4-BD fusioniert. Dieser Abschnitt enthält die transkriptionelle Repressordomäne (aa 207-310) und den zwischen dem afrikanischen Krallenfrosch, Maus, Ratte und Mensch stark konservierten C-Terminus (aa 311-486). Die kodierende Sequenz dieses Fragments wurde in die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* des Plasmids pAS2-1 (pAS-MeCP2-196-486) und in die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* des Plasmids pGBT9 (pGBT-MeCP2-196-486) jeweils unter Einhaltung des Leserasters eingefügt. Beide Plasmide enthielten bereits die cDNA für die Gal4-BD. Für das zweite Fusionsprotein, das für ein Hefe two-hybrid-Screening verwendet wurde, wurden die Aminosäuren 311 bis 486 von hMeCP2 mit der Gal4-BD fusioniert. Die kodierende Sequenz dieses Fragments wurde in die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* des Vektors pAS2-1 (pAS-MeCP2-311-486) unter Einhaltung des Leserasters eingefügt. Die korrekte Insertion der kodierenden Sequenzen wurde bei allen drei Plasmiden durch DNA-Sequenzierung sichergestellt. Zur Verifizierung der Expression beider Fusionsproteine wurden die auf pAS2-1 basierenden Vektoren separat in den Hefestamm Y190 transformiert und Proteinextrakte von den transformierten Hefen hergestellt. Die Proteinextrakte wurden durch Western-Blotting untersucht. Die Expression beider Fusionsproteine konnte mit Antikörpern gegen die Gal4-BD und gegen MeCP2 bestätigt werden (Abb. 2B, Spuren 2, 3, 5 und 7). Die Banden bei 67 und unterhalb 99 kD in Spur 6 und 7 sind sicherlich auf eine unspezifische Bindung des Gal4-BD-Antikörpers zurückzuführen. Die Expression eines durch das Plasmid pGBT9 kodierten Fusionsproteins läßt sich aufgrund des schwachen Promotors nicht durch Proteinextraktion und Western-Blotting nachweisen (Angabe des Herstellers Clontech). Beide Fusionsproteine waren nicht in der Lage die zwei Reportergene des Hefestammes Y190 selbstständig zu aktivieren (Daten nicht gezeigt). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Verwendbarkeit der Fusionsproteine für Hefe two-hybrid-Untersuchungen.

Für das Interaktionsscreening wurde eine humane HeLa MATCHMAKER cDNA Library (eine Plasmid-Bibliothek) der Firma Clontech verwendet, die von Hannon et al. (1993) aus exponentiell wachsenden HeLa S3 Zellen hergestellt wurde. Bait-Plasmid und HeLa-cDNA-Bibliothek wurden sequentiell in den Hefestamm Y190 transformiert. Die transformierten Hefen wurden auf synthetischem Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin und mit 3-



**Abb. 2: Schematische Darstellung der eingesetzten bait-Proteine und Expressionskontrolle**

(A) Die bait-Proteine sind schematisch dargestellt. Gal4-BD, Gal4-DNA-Bindungs-domäne; TRD, transkriptionelle Repressordomäne; CR1 und CR2, konservierte Region 1 und 2; schwarzer Abschnitt: Linker zwischen Gal4-BD und MeCP2-Fragment. Die Zahlen über den Fusionsproteinen geben die MeCP2-Aminosäureposition an. (B) Der Hefestamm Y190 wurde mit den entsprechenden Expressionsplasmiden für die bait-Proteine transformiert. Zur Kontrolle der Expression wurden die Lysate durch Western-Blotting mit Antikörpern gegen die Gal4-BD (Clontech) und MeCP2 (Box2, erhalten von C. Koch) analysiert. Jeweils links: Größenstandard in kD

Amino-1,2,4-triazol (3-AT) ausplattiert. Für jedes bait-Plasmid wurde die optimale 3-AT-Konzentration bestimmt (siehe Material und Methoden). Sie betrug für die Plasmide pGBT-MeCP2-196-486 und pAS-MeCP2-196-486 25 mM 3-AT sowie 20 mM 3-AT für pAS-MeCP2-311-486. Mit dem Plasmid pGBT-MeCP2-196-486 und der HeLa-cDNA-Bibliothek wurden  $7,1 \times 10^6$  Klone gescreent. Außerdem wurde mit dem Plasmid pAS-MeCP2-196-486 und dem Hefestamm HF7c eine Rattenhirn (Hippocampus)-cDNA-Bibliothek (beides erhalten von S. Stamm) gescreent ( $3 \times 10^6$  Klone wurden cotransformiert). Mit dem Plasmid pAS-MeCP2-311-486 und der HeLa-Bibliothek wurden  $14 \times 10^6$  Klone gescreent. Die Hefe two-hybrid-Screens wurden durch die Selektion derjenigen Klone, bei denen beide Reportergene aktiviert wurden, und durch die Eliminierung „falsch Positiver“ analysiert. Aus insgesamt 76 Hefeklonen wurden die Plasmide isoliert und bait- und prey-Plasmide getrennt. Die prey-

Plasmide wurden sequenziert und das cDNA-Insert wurde durch einen Datenbankabgleich (BLASTN) identifiziert. Alle erwiesen sich als „falsch Positive“. Sehr häufig stimmte das Leseraster des Inserts des prey-Plasmides nicht mit dem der Aktivierungsdomäne überein. Als Beispiele hierfür seien die cDNAs für die Proteine damage specific DNA binding protein 2, TIF (transcription termination factor)-I interacting peptide 20, das DNA-Bindungsprotein TAXREB 107 und das Homöoprotein C10 erwähnt. Einige der prey-Proteine waren selbst-aktivierend wie z.B. das mehrfach identifizierte Homöoprotein A11. Homöoproteine binden durch eine stark konservierte DNA-Bindungsdomäne an spezifische DNA-Sequenzen im Zellkern und wirken als Transkriptionsfaktoren. Durch die DNA-Bindungsdomäne könnte das Fusionsprotein bestehend aus dem Homöoprotein A11-Fragment und der Gal4-AD unspezifisch an den Promotor des Reportergens binden und auf diese Weise die Transkription aktivieren. Ebenso wurden diejenigen Klone als „falsch Positive“ identifiziert, die beispielsweise für mitochondriale oder cytoplasmatische Proteine codierten (z.B. ribosomal protein S12, natural killer enhancing factor A, mitochondrial cytochrome B protein). Eine kurze Zusammenfassung der durchgeführten Hefe two-hybrid-Screens und der Anzahl der gescreenten Klone enthält die Abb. 3.

|         |                 |         |                     | Interaktion | Anzahl der gescreenten Klone |
|---------|-----------------|---------|---------------------|-------------|------------------------------|
| Gal4-BD | MeCP2-aa196-486 | Gal4-AD | HeLa-Library        | keine       | 7,1x10 <sup>6</sup>          |
| Gal4-BD | MeCP2-aa196-486 | Gal4-AD | Hippocampus-Library | keine       | 3x10 <sup>6</sup>            |
| Gal4-BD | MeCP2-aa311-486 | Gal4-AD | HeLa-Library        | keine       | 1,4x10 <sup>7</sup>          |

**Abb. 3: Schematische Darstellung der durchgeführten Hefe-hybrid-Screens**

Die bait-Proteine und die cDNA-Bibliotheken sind schematisch dargestellt. Gal4-BD, Gal4-DNA-Bindungsdomäne; Gal4-AD, Gal4-Aktivierungsdomäne; Die Anzahl der gescreenten Hefeklone (mit bait- und prey-Plasmid transformiert) ist angegeben. Es wurden keine Interaktionspartner gefunden.

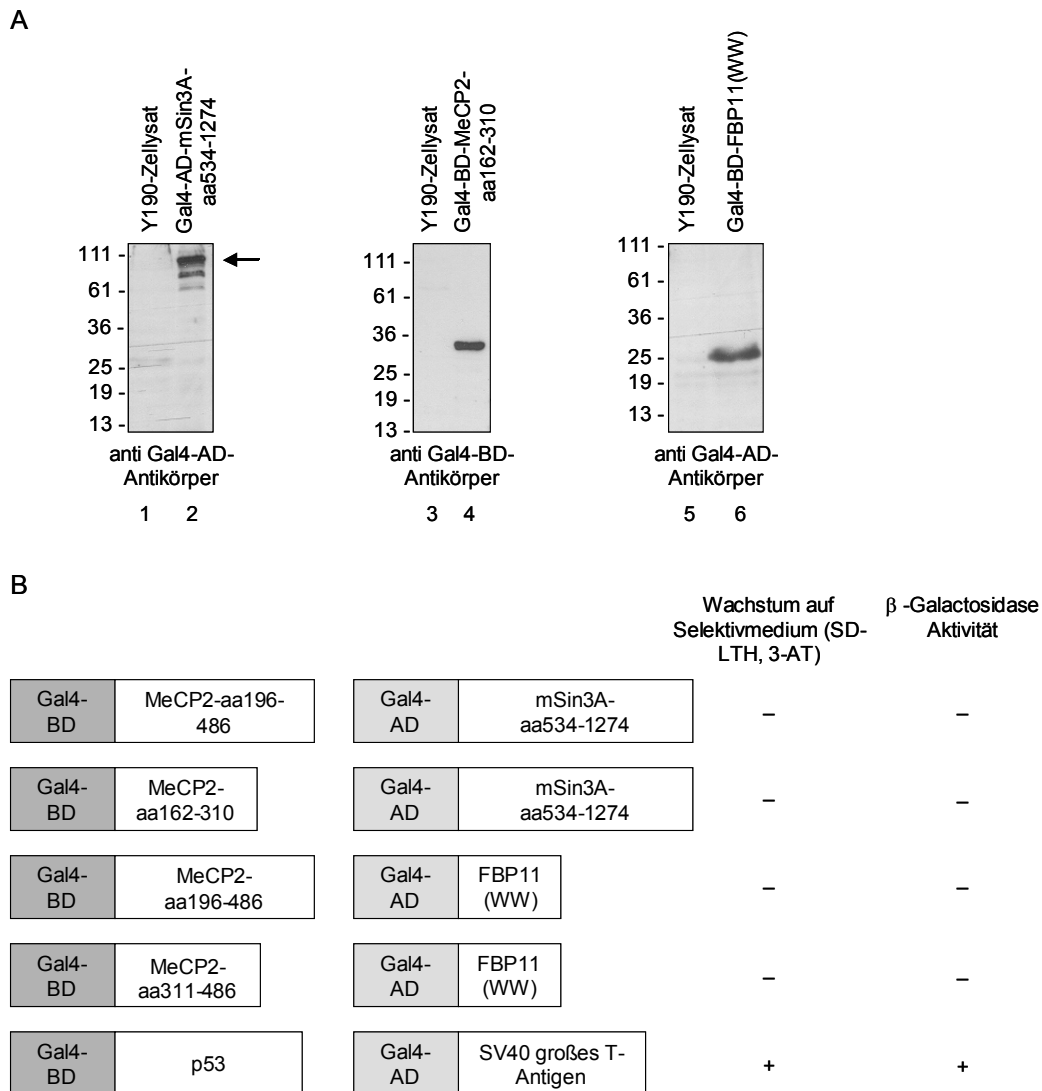
### 3.2 Hefe two-hybrid-assays

Eine bereits bekannte Interaktion von MeCP2 ist die Bindung an den Corepressor mSin3A (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998). Diese Interaktion sollte in einem Hefe two-hybrid-assay nachvollzogen werden. mSin3A besteht aus 1219 (Ayer et al., 1995) bzw. 1276 Aminosäuren (Schreiber-Agus et al., 1995) und enthält zwei MeCP2-Interaktionsregionen, die durch GST

pull down-Experimente identifiziert wurden (Nan et al., 1998): Die erste befindet sich in der Mitte des Proteins (aa 524-679) während die zweite C-terminal lokalisiert ist (aa 1016-1219). Die mSin3A-Interaktionsregion in MeCP2 umfaßt die Aminosäuren 163 bis 278 (Abb. 1). Für den Hefe two-hybrid-assay stand die mSin3A-Maus-cDNA zur Verfügung, die im Labor von R.A. dePinho (Schreiber-Agus et al., 1995) hergestellt wurde. Die MeCP2-TRD ist zwischen Mensch und Maus sehr stark konserviert (Reichwald et al. 2000). Es ist daher sehr unwahrscheinlich, daß diese beiden Proteine nur aufgrund der Tatsache, daß sie aus zwei verschiedenen Spezies stammen, nicht miteinander interagieren würden. Die mSin3A-cDNA für die Aminosäuren 534 bis 1274 wurde in die Schnittstellen *Bam*HI und *Apa*I des prey-Plasmides pGAD GH inseriert (pGAD-mSin3A-534-1274). Die Expression des Fusionsproteins bestehend aus der Gal4-AD und dem mSin3A-Fragment wurde durch Western-Blotting mit einem Antikörper gegen die Gal4-AD bestätigt (Abb. 4A, Spur 2). Die Banden unterhalb des Pfeiles sind sehr wahrscheinlich Hydrolyseprodukte des Fusionsproteins. Mit den Plasmiden pGAD-mSin3A-534-1274 und pAS-MeCP2-196-486 oder pGBT-MeCP2-196-486 wurde die Interaktion zwischen hMeCP2 und mSin3A in einem Hefe two-hybrid-assay getestet. Dazu wurden die entsprechenden Expressionsplasmide in den Hefestamm Y190 transformiert. Anschließend wurde die Aktivität der beiden Reportergene getestet. Eine Interaktion konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt und Abb. 4B), obwohl Nan et al. (1998) mit einem ähnlichen MeCP2-Fragment eine Bindung an mSin3A durch GST pull down-Experimente zeigen konnten. Da die vollständige mSin3A-Interaktionsregion in MeCP2 die Aminosäuren 163 bis 278 umfaßt, wurde die cDNA für die Aminosäuren 162 bis 310 von hMeCP2 in die Schnittstellen *Eco*RI und *Bam*HI von pAS2-1 inseriert (pAS-MeCP2-162-310) und mit diesem Vektor nochmals die Interaktion zwischen MeCP2 und mSin3A in einem Hefe two-hybrid-assay getestet. Auch in diesem Fall konnte keine Bindung detektiert werden (Daten nicht gezeigt und Abb. 4A [Spur 4] und B).

Durch Expressionsklonierung wurde MeCP2 als Bindungspartner der WW-Domänen von FBP11 (formin binding protein 11) identifiziert (Bedford et al., 1997). FBP11 besitzt zwei WW-Domänen, die durch 15 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Jede WW-Domäne besteht aus 26 Aminosäuren mit zwei stark konservierten Tryptophan-Resten N- und C-terminal. Außerdem befindet sich C-terminal ein stark konservierter Prolin-Rest, weshalb WW-Domänen auch WWP-Domänen genannt werden. WW-Domänen sind kleine, sich unabhängig faltende Proteindomänen, die aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehen (Macias et al, 1996; Ranganathan et al., 1997). In ihrer Veröffentlichung haben Bedford et al. (1997) eine Prolin-reiche Sequenz im C-Terminus von MeCP2 als mögliche Bindungsstelle





**Abb. 4: Expressionskontrolle und Übersicht zu den Hefe two-hybrid-assays**

(A) Der Hefestamm Y190 wurde mit den entsprechenden Expressionsplasmiden für die bait- und prey-Proteine transformiert. Zur Kontrolle der Expression wurden die Lysate durch Western-Blotting mit Antikörpern gegen die Gal4-BD (Clontech) oder Gal4-AD (Santa Cruz Biotechnology) analysiert. Jeweils links: Größenstandard in kD. Expressionskontrolle für Gal4-BD-MeCP2-196-486 und Gal4-BD-MeCP2-311-486 gezeigt in Abb. 2. Die Expression von bait- und prey-Protein für die Positivkontrolle wurde nicht nachgewiesen. (B) Die bait- und prey-Proteine sind schematisch dargestellt. Gal4-BD, Gal4-DNA-Bindungsdomäne; Gal4-AD, Gal4-Aktivierungsdomäne. Die Aktivierung der beiden Reportergene ist mit + oder - angegeben. Das unterste Proteinpaar diente als Positivkontrolle.

der WW-Domänen von FBP11 postuliert. Um diese Interaktion zu bestätigen, wurde die cDNA der beiden WW-Domänen (aa 146-214) in die Schnittstellen *EcoRI* und *SmaI* des prey-Plasmides pACT2 inseriert (pACT-FBP11WW) und dieser Vektor zusammen mit pAS-MeCP2-196-486 bzw. pAS-MeCP2-311-486 in einem Hefe two-hybrid-assay verwendet. Auch in diesem Fall konnte keine Bindung detektiert werden (Daten nicht gezeigt und Abb. 4A [Spur 6] und B). Als Positivkontrolle für eine Protein-Protein-Interaktion in Hefezellen

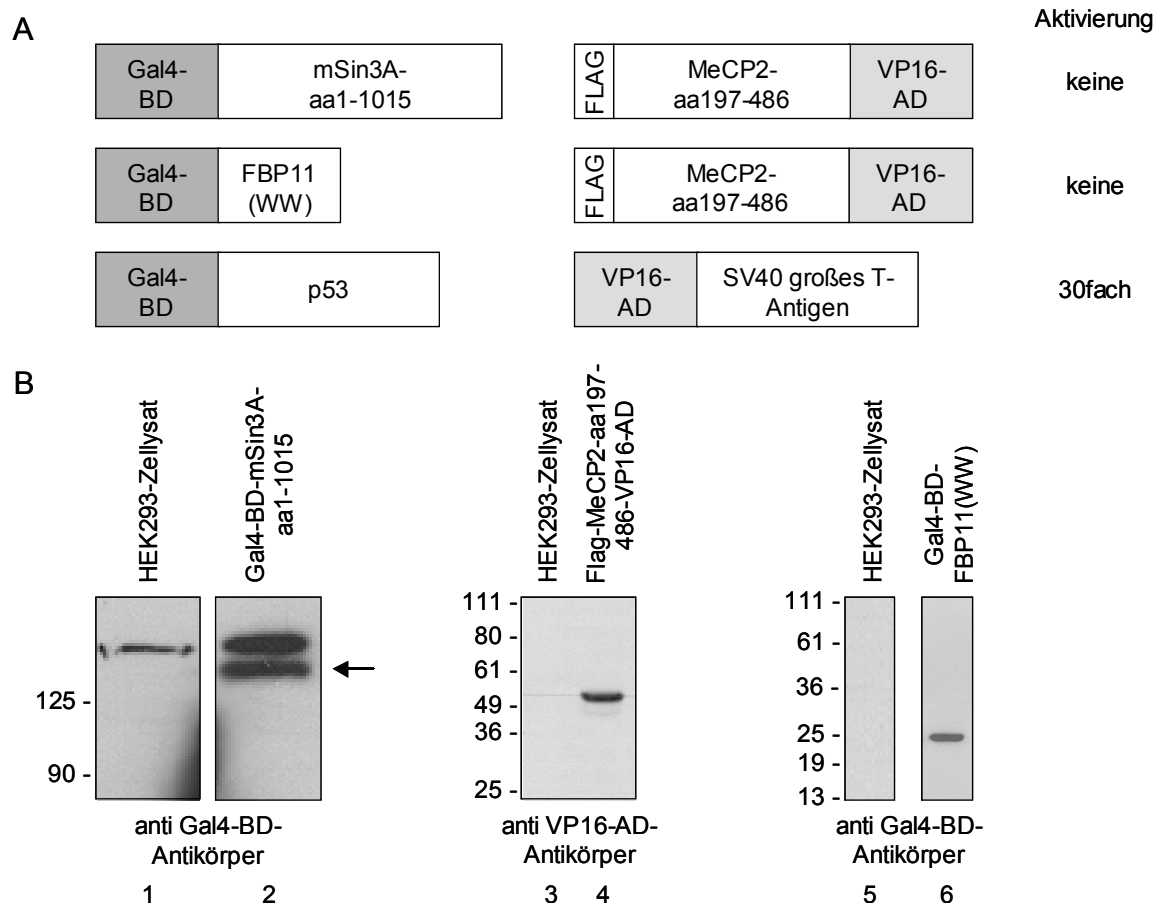
standen die beiden Plasmide des Herstellers (Clontech) pVA3-1 und pTD1-1 zur Verfügung, die für die Fusionsproteine Gal4-BD/p53 bzw. Gal4-AD/SV40-großes T-Antigen kodieren. In einem Hefe two-hybrid-assay, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, interagierten diese beiden Proteine (Daten nicht gezeigt und Abb. 4B).

### 3.3 Mammalian two-hybrid-assays

Die oben genannten Hefe two-hybrid-assays wurden in modifizierter Form in einem mammalian two-hybrid-System wiederholt. Dazu wurden mit Hilfe des Vektors pcDNA3-Gal4BD, der bereits die kodierende Sequenz für die Gal4-BD enthält, mSin3A (aa1-1015; Ayer et al., 1995) bzw. die WW-Domänen (aa 146-214) von FBP11 mit der Gal4-BD fusioniert. Die cDNAs wurden in die Schnittstellen *KpnI* und *BamHI* von pcDNA3-Gal4BD eingefügt. Der Interaktionspartner wurde durch den Vektor pcDNA3-Flag-TRD-VP16 exprimiert (Yu et al., 2000). Dieser Vektor kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus einer Flag-Sequenz, MeCP2 (aa 197-486) und der VP16-Aktivierungsdomäne. Die Expression der Fusionsproteine in HEK293-Zellen wurde durch Western-Blotting bestätigt (Abb. 5B, Spuren 2, 4 und 6). Der Pfeil an Spur 2 kennzeichnet die Bande des Fusionsproteins Gal4-BD-mSin3A-aa1-1015. Die Bande darüber und in Spur 1 ist sicherlich auf eine unspezifische Kreuzreaktion des Gal4-BD-Antikörpers zurückzuführen. Als Reportergen wurde das firefly luciferase-Gen verwendet. Dieses ist Bestandteil des Reporterplasmides pFR-LUC (Stratagene). Die mammalian two-hybrid-assays wurden in HEK293-Zellen durchgeführt, die mit den entsprechenden Expressionsplasmiden und dem Reporterplasmid transfiziert wurden. 48 h nach der Transfektion wurde die Aktivität der firefly-luciferase bestimmt. Getestet wurde die Interaktion zwischen mSin3A bzw. den WW-Domänen von FBP11 und MeCP2 mit den oben genannten Fusionsproteinen. Als Positivkontrolle standen die beiden Plasmide pM-53 und pVP16-T (Clontech) zur Verfügung, die für die Fusionsproteine Gal4-BD/p53 bzw. Gal4-AD/SV40-großes T-Antigen kodieren. Weder zwischen mSin3A und MeCP2 noch zwischen den beiden WW-Domänen von FBP11 und MeCP2 konnte im mammalian two-hybrid-System eine Interaktion nachgewiesen werden. Parallel dazu konnte jedoch eine Interaktion zwischen Gal4-BD/p53 und Gal4-AD/SV40-großes T-Antigen gezeigt werden (Abb. 5 und Tabelle 1).

### 3.4 Immuncytologische Untersuchungen

Protein-Protein-Interaktionen werden oft durch cytologische Untersuchungen bestätigt (z. B. Pestic-Dragovich et al., 2000; Tsai et al., 2000). Durch spezifische Antikörper werden die zu untersuchenden Proteine in fixierten und permeabilisierten Zellen gebunden. Durch sekundäre



**Abb. 5: Übersicht zu den mammalian two-hybrid-assays und Expressionskontrollen für die bait-und prey-Proteine**

(A) Die bait-und prey-Proteine sind schematisch dargestellt. Gal4-BD, Gal4-DNA-Bindungsdomäne; VP16-AD, VP16-Aktivierungsdomäne. Die relative Aktivierung des Reportergens ist angegeben (siehe Tabelle 1). Das unterste Proteinpaar diente als Positivkontrolle. (B) HEK293-Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden für die bait- und prey-Proteine transfiziert. Zur Kontrolle der Expression wurden die Lysate durch Western-Blotting mit Antikörpern gegen die Gal4-BD (Clontech) oder VP16-AD (Santa Cruz Biotechnology) analysiert. Jeweils links: Größenstandard in kD. Die Expression von bait- und prey-Protein für die Positivkontrolle wurde nicht nachgewiesen.

Antikörper, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, werden die Proteine farblich unterschiedlich markiert. An einem Fluoreszenzmikroskop können die Proteine jeweils separat sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe eines Computers und einer speziellen Software können die Fluoreszenzbilder übereinandergelegt werden, so daß es, im Falle einer Koloalisation, zu einer Überlagerung der beiden Farben kommt. Eine durch Interferenz entstehende dritte Farbe ist ein Hinweis auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine. Häufig eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe sind Rhodamine (rote Fluoreszenz), Texas rot (rote Fluoreszenz) oder Cy2 (grüne Fluoreszenz). Diese Fluoreszenzfarbstoffe wurden auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen verwendet.

| Fusionsproteine   | firefly-luciferase-Aktivität | renilla-luciferase-Aktivität | standardisierte firefly-luciferase-Aktivität | Mittelwert und Standardabweichung | relative Stimulierung in % und Standardabweichung |
|---|------------------------------|------------------------------|--|-----------------------------------|---|
| Gal4-BD-FBP11(WW)   | 1877<br>2469                 | 122489<br>124097             | 153,24<br>198,96                             | 176 ± 23                          | 100 ± 13  |
| FLAG-MeCP2-aa197-486-VP16-AD                              | 663<br>740                   | 872077<br>682237             | 7,60<br>10,85                                | 9 ± 2                             | 5 ± 1   |
| Gal4-BD-FBP11(WW) +<br>FLAG-MeCP2-aa197-486-VP16-AD       | 7766<br>11414                | 606872<br>680961             | 127,97<br>167,62                             | 148 ± 20                          | 84 ± 11   |
| Gal4-BD-mSin3A-aa1-1015                                   | 1158<br>1219                 | 249979<br>251341             | 46,32<br>48,50                               | 47 ± 1                            | 100 ± 2   |
| FLAG-MeCP2-aa197-486-VP16-AD                              | 663<br>740                   | 872077<br>682237             | 7,6<br>10,85                                 | 9 ± 2                             | 19 ± 4  |
| Gal4-BD-mSin3A-aa1-1015 +<br>FLAG-MeCP2-aa197-486-VP16-AD | 746<br>922                   | 205689<br>224761             | 36,27<br>41,02                               | 39 ± 2                            | 81 ± 4  |
| Gal4-BD-p53   | 1129<br>1327                 | 492544<br>464300             | 22,92<br>28,58                               | 26 ± 3                            | 100 ± 12  |
| VP16-großes T-Antigen                                     | 422<br>514                   | 534934<br>469329             | 7,89<br>10,95                                | 9 ± 2                             | 37 ± 8  |
| Gal4-BD-p53 +<br>VP16-großes T-Antigen                    | 58757<br>46746               | 610763<br>791827             | 962,03<br>590,36                             | 776 ± 186                         | 3014 ± 715  |

**Tabelle 1: Meßergebnisse und Auswertung der mammalian two-hybrid-assays**

1000 ng Reporterplasmid pFR-Luc (Stratagene) wurden mit 100 ng der entsprechenden Expressionsplasmide für die angegebenen Fusionsproteine in HEK293-Zellen transient cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden die renilla- und firefly-luciferase-Aktivitäten bestimmt. Die standardisierte firefly-luciferase-Aktivität wurde folgendermaßen berechnet:  $10.000 \times [\text{firefly-luciferase-Aktivität}] : [\text{renilla-luciferase-Aktivität}]$ . Die jeweiligen standardisierten firefly-luciferase-Aktivitäten, die in den Lysaten der nur mit dem Gal4-BD-Fusionsprotein transfizierten Zellen gemessen wurden, wurden als 100% definiert. Angegeben in den drei rechten Spalten sind die gerundeten Werte, die Berechnungen wurden mit den nicht-gerundeten Werten durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte diese Methodik verwendet werden, um bestehende Interaktionen mit MeCP2 zu bestätigen und um Hinweise auf mögliche neue Interaktionspartner zu bekommen. Für die Untersuchungen wurden Proteine ausgewählt, von denen bereits bekannt war, daß sie mit MeCP2 interagieren (mSin3A [Nan et al., 1998; Jones et al., 1998]; TFIIB [Kaludov et al., 2000]), sowie Proteine, von denen eine Interaktion vermutet wurde: RNA-Polymerase II; HDAC1, 2 und 3; RbAp46/48. Die RNA-Polymerase II könnte ein direktes Zielprotein von MeCP2 im Histondeacetylase-unabhängigen Weg der transkriptionellen Repression sein. Die Proteine HDAC1 und 2 sowie RbAp46 und 48 bilden den sogenannten HDAC-Kernkomplex, der Bestandteil von NuRD und vom Sin3-Repressor-komplex ist. Der Sin3-Repressorkomplex kann durch MeCP2 rekrutiert werden. Das DNA-Bindungsprotein YY1 (Yin-Yang 1) bindet direkt an HDAC2 (Knoepfler und Eisenman,

1999). Diese Möglichkeit sollte auch für MeCP2 untersucht werden. HDAC3 interagiert mit den Corepressoren N-CoR und SMRT (Li et al., 2000), die auch mit MeCP2 wechselwirken. Die Experimente wurden mit MCF7-Zellen an einem konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Typ Sp2 mit Standardausrüstung) durchgeführt. Es wurden folgende Proteinpaare untersucht (der Antikörper gegen RbAp 46/48 erkennt RbAp46 und RbAp48):

| <u>getestete Proteinpaare</u> |                           |
|-------------------------------|---------------------------|
| MeCP2 – mSin3A                | MeCP2 – RNA-Polymerase II |
| MeCP2 – TFIIB                 | MeCP2 – HDAC2             |
| RbAp 46/48 – HDAC2            | MeCP2 – HDAC3             |
|                               | MeCP2 – RbAp 46/48        |

Durch Western-Blotting mit MCF7-Gesamtzelllysate wurde zunächst jeder Antikörper auf seine Spezifität untersucht. Außerdem konnte auf diese Weise bestätigt werden, daß MCF7-Zellen das entsprechende Protein exprimieren. Grundsätzlich zeigten alle hier verwendeten Antikörper eine gute bis ausreichende Spezifität, d.h. mit den Antikörpern konnten eine Bande oder eine Hauptbande und einige, möglicherweise unspezifische Nebenbanden im MCF7-Gesamtzelllysate detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Hinweis auf die Spezifität der Antikörper ergab sich aus der Tatsache, daß es sich bei den hier untersuchten Proteinen ausschließlich um Kernproteine handelte. Dementsprechend konnte bei den immunocytoologischen Untersuchungen nur eine Anfärbung innerhalb des Zellkerns beobachtet werden (Abb. 6 und Daten nicht gezeigt). Durch die Verwendung der sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper allein wurden die Zellen nur sehr schwach unspezifisch angefärbt (Daten nicht gezeigt).

Durch das Übereinanderlegen der Einzelbilder sollten sich Hinweise auf Interaktionen von MeCP2 mit den getesteten Proteinen ergeben. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, war es wichtig, die Zellen nicht zu stark (und somit unspezifisch) anzufärben und die Intensität der Anfärbung für beide Proteine ungefähr gleich einzustellen. Jedoch weder bei den Proteinen, von denen eine Interaktion mit MeCP2 beschrieben wurde, noch bei den anderen Proteinen konnte eine Überlagerung der Einzelfarben festgestellt werden (Abb. 6 und Daten nicht gezeigt). Ebenso konnte durch diese Methodik kein Hinweis auf eine Interaktion von RbAp46/48 mit HDAC2 festgestellt werden, obwohl diese Bestandteile des HDAC-Kernkomplexes sind (Knoepfler und Eisenman, 1999).

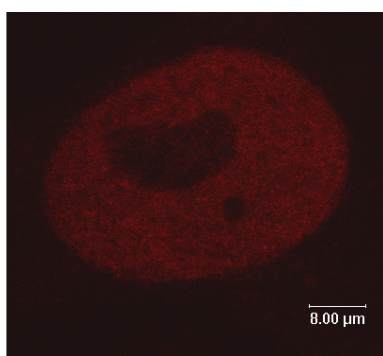
### 3.5 MeCP2 bindet an die WW-Domänen von FBP11 und HYPC *in vitro*

Durch Hefe und mammalian two-hybrid-assays konnte keine Bindung zwischen MeCP2 und den beiden WW-Domänen von FBP11 detektiert werden. In ihrer Veröffentlichung haben Bedford et al. (1997) diese Interaktion durch far Western-Experimente gezeigt. Daher wurde nun ebenfalls eine *in vitro*-Methode (GST pull down) angewendet, um die Interaktion zwischen MeCP2 und den WW-Domänen von FBP11 zu bestätigen und näher zu untersuchen. Zwei weitere Proteine, die wie FBP11 zwei WW-Domänen besitzen, sind HYPC und FBP21. HYPC steht für „huntingtin yeast partner C“ und wurde durch einen Hefe two-hybrid-Screen mit dem mutierten Protein „Huntingtin“ als Bait isoliert (Faber et al., 1998). Die WW-Domänen der drei genannten Proteine stimmen in ihrer Sequenz und Größe gut überein (Abb. 7). Die WW-Domänen von FBP11 und HYPC binden bevorzugt das PPLP-Motiv, während die WW-Domänen von FBP21 Poly-P-Sequenzen, die von R oder K flankiert werden, binden (Macias et al., 2002; Bedford et al., 2000; siehe auch Einleitung). Zunächst sollte die Bindung der WW-Domänen von FBP11 (Maus) an MeCP2 (Mensch) durch GST pull down-Experimente bestätigt werden. Die WW-Domänen von FBP11, FBP21 (beide aus der Maus) und von HYPC (Mensch) wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert (GST-FBP11[WW], GST-FBP21[WW] und GST-HYPC[WW]), an Glutathion-Sepharose gebunden und mit einem C-terminalen Fragment von MeCP2 (aa 196-486) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die Glutathion-Sepharose (samt den gebundenen Proteinen) isoliert und durch Western-Blotting mit einem Antikörper gegen MeCP2 analysiert. Die beiden WW-Domänen von HYPC sollten ebenfalls an MeCP2 binden, nicht jedoch die von FBP21 (M.T. Bedford, persönliche Mitteilung). MeCP2 (MeCP2 aa196-486) wurde an die WW-Domänen von FBP11 und HYPC gebunden (Abb. 8, Spuren 3 und 4). Eine Bindung an die WW-Domänen von FBP21 sowie an GST konnte nicht detektiert werden (Abb. 8, Spuren 5 und 2). Spur 1 der Abb. 8 zeigt 10% des eingesetzten MeCP2-Fragments (Input). Im direkten

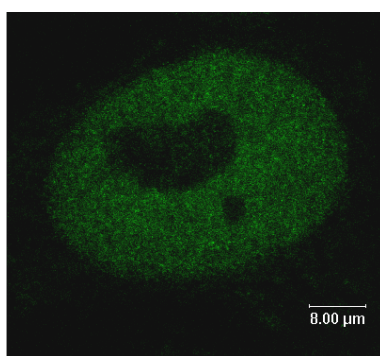
#### **Abb. 6: Colokalisationsstudien in MCF7-Zellen**

MCF7-Zellen wurden fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Antikörpern, die gegen die angegebenen Proteine gerichtet waren, inkubiert. Mit geeigneten sekundären Antikörpern wurden die Proteine mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit einem konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Typ Sp2 mit Standardausrüstung) sichtbar gemacht. Die übereinandergelegten Bilder (merge) wurden mit dem integrierten Computer des Lasermikroskops erzeugt.

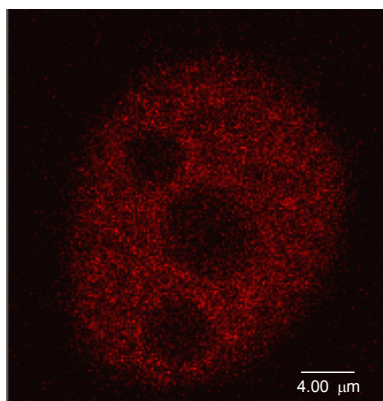
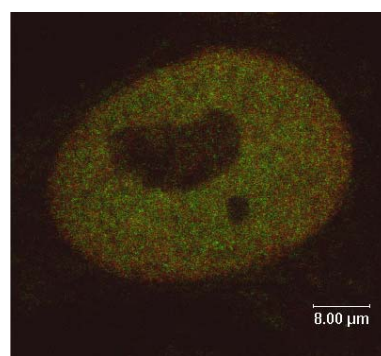
MeCP2



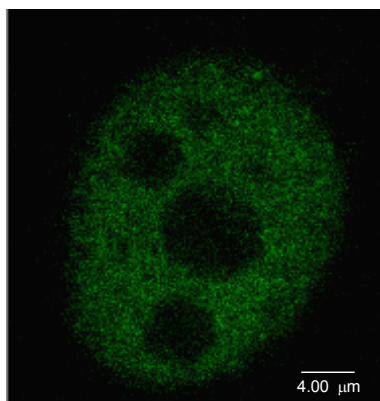
mSin3A



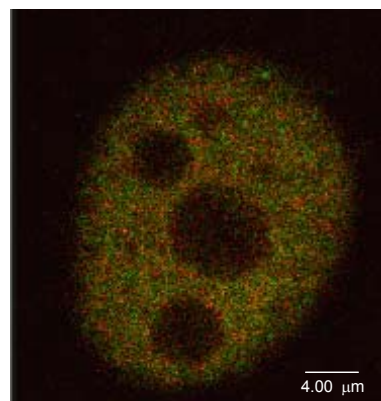
merge



MeCP2

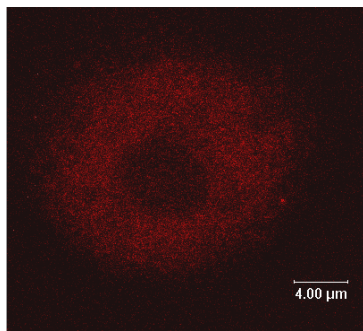


RbAp46/48

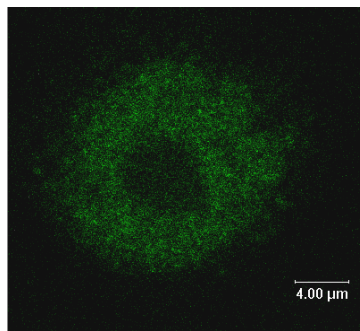


merge

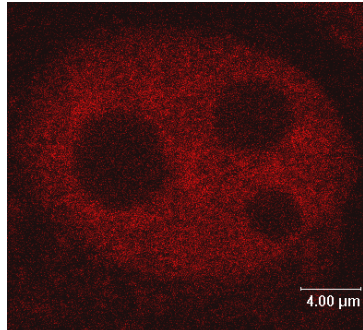
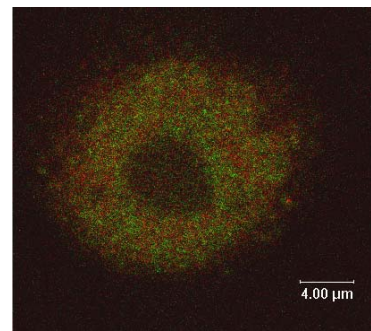
HDAC2



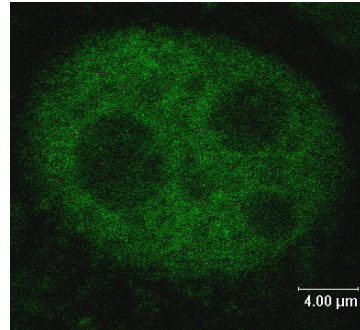
MeCP2



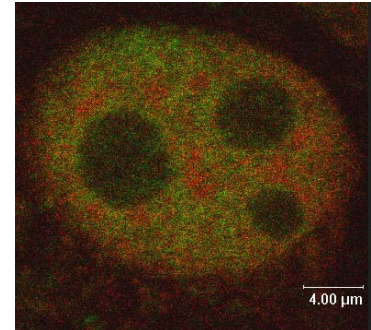
merge



HDAC2



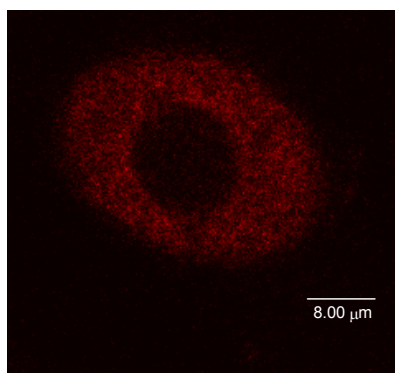
RbAp46/48



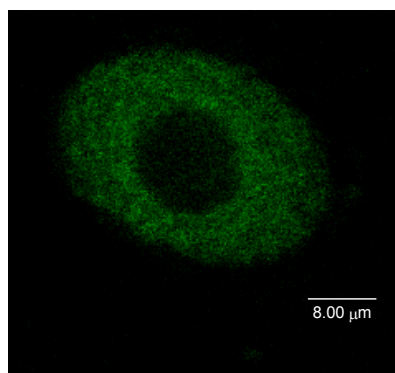
merge



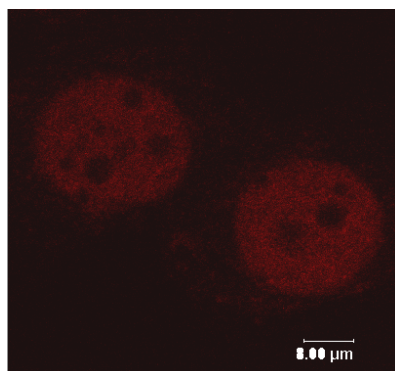
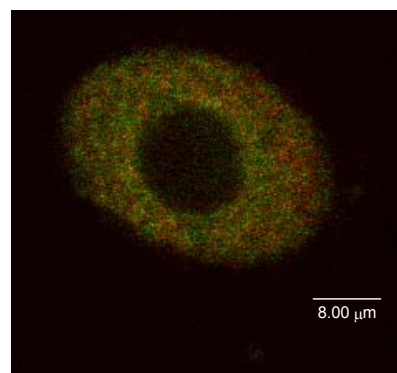
MeCP2



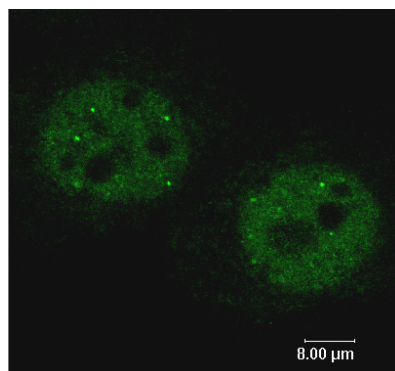
HDAC3



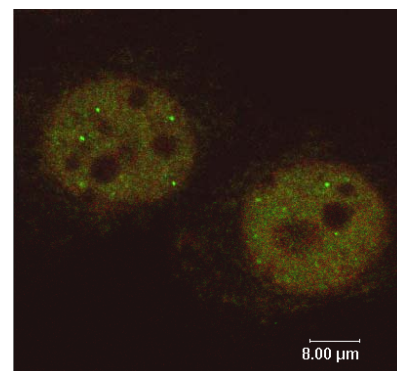
merge



MeCP2



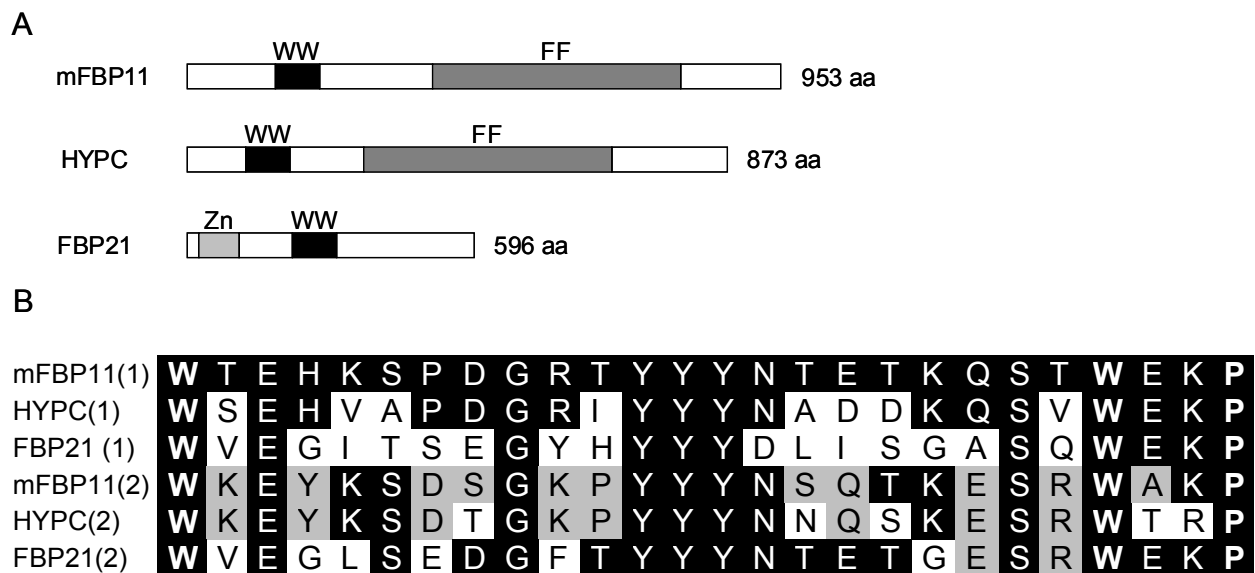
RNA-Pol.II



merge

Vergleich von Spur 3 und 4 und im Vergleich mit Spur 1 fällt auf, daß wesentlich mehr MeCP2 an die WW-Domänen von FBP11 als an die von HYPC gebunden wurde. Da es sich um einen *in vitro*-Versuch mit bakteriell exprimierten Säugetierproteinen handelt, entspricht diese quantitative Betrachtung wahrscheinlich nicht den tatsächlichen Verhältnissen. Bei einer bakteriellen Expression von Säugetierproteinen kann nicht überprüft werden, in welchem Maß jedes Protein seine native Form annimmt und somit volle Bindungsaktivität besitzt.

Die Ergebnisse bestätigen die Bindung von MeCP2 an die beiden WW-Domänen von FBP11 *in vitro* und deuten daraufhin, daß es sich um eine spezifische Interaktion handelt, da MeCP2 nicht an die zwei WW-Domänen von FBP21 gebunden wurde. Darüber hinaus konnte eine Bindung von MeCP2 an die WW-Domänen von HYPC gezeigt werden.

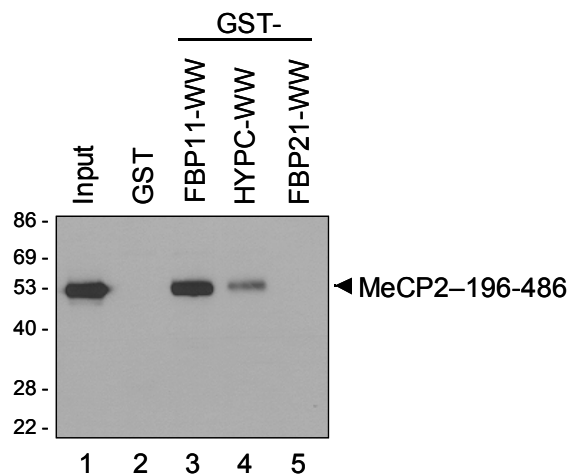


**Abb. 7:** Schematische Darstellung von mFBP11, HYPC und FBP21 und Sequenzvergleich der WW-Domänen

(A) Schematische Darstellung mFBP11, HYPC und FBP21. schwarz: je zwei WW-Domänen, dunkelgrau: FF-Region, hellgrau: Zinkfinger-Motiv. (B) Der Sequenzvergleich der WW-Domänen von mFBP11, HYPC und FBP21 zeigt die Sequenzidentität mit der ersten (schwarz) und der zweiten (grau) WW-Domäne von mFBP11. Fett hervorgehoben sind die für die WW-Domänen charakteristischen Aminosäurereste Tryptophan und Prolin.

### 3.6 Die WW-Domänen Bindungsregion (WDR) liegt im C-Terminus von MeCP2

Als nächstes sollte die WW-Domänen-Interaktionsregion innerhalb des MeCP2-Moleküls bestimmt werden. Sieben verschiedene N- und C-terminale Deletionsmutanten und volle Länge-hMeCP2 (Abb. 11) wurden bakteriell exprimiert und in GST pull down-Experimenten mit bakteriell exprimierten GST-FBP11(WW) bzw. GST inkubiert. Die an GST-FBP11(WW) bzw. GST gebundenen Proteine wurden durch Western-Blotting detektiert (Abb. 9). Volle Länge-MeCP2 und die N-terminalen Deletionsmutanten aa 196-486, aa 239-486 und aa 311-



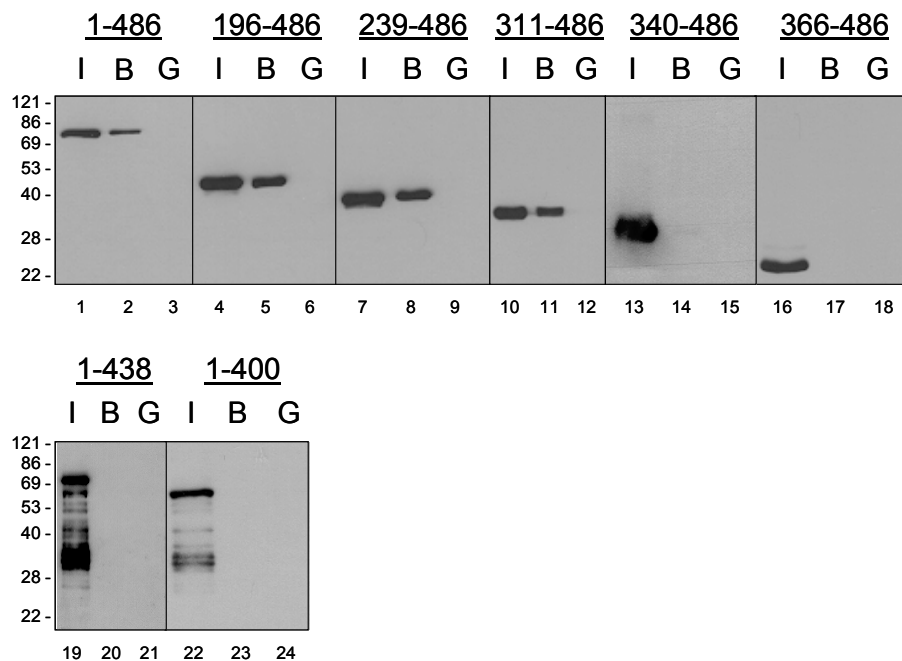
**Abb. 8: Vergleich der *in vitro*-Bindung von MeCP2 an die WW-Domänen dreier Spleißfaktoren durch GST pull down-Experimente**

GST und GST-Fusionsproteine mit den WW-Domänen von FBP11, HYPC oder FBP21 wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und mit MeCP2-196-486 inkubiert. Input (10% der Gesamtmenge) und die gebundenen Fraktionen wurden durch Western-Blotting mit einem anti MeCP2-Antikörper (gegen den C-Terminus gerichtet, Upstate Biotechnology) analysiert. Links: Größenstandard in kD.

486 wurden an die beiden WW-Domänen gebunden (Abb. 9, Spuren 1 und 2, 4 und 5, 7 und 8, 10 und 11). Die Deletionsmutanten aa 340-486 und aa 366-486 interagierten nicht mit GST-FBP11(WW) (Abb. 9, Spuren 13 und 14, 16 und 17). Die beiden C-terminalen Deletionsmutanten aa 1-438 und aa 1-400 wurden ebenfalls nicht an GST-FBP11(WW) gebunden (Abb. 9, Spuren 19 und 20 und 22 und 23). Bei keinem der durchgeführten GST pull down-Experimente konnte eine Bindung an GST festgestellt werden (Abb. 9, Spuren 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24). In der Abb. 11 werden die durch die GST pulldown-Experimente erzielten Ergebnisse zusammengefaßt. Interessanterweise scheint die oben erwähnte Prolin-reiche Sequenz im C-Terminus von MeCP2 (Bedford et al., 1997; Abb. 11) nicht allein für die volle Bindungskapazität verantwortlich zu sein: Die N-terminalen Deletionsmutanten aa 340-486 und aa 366-486 sowie die C-terminale Deletionmutante aa 1-438 enthalten diese Sequenz, wurden jedoch nicht an die WW-Domäne gebunden (Abb. 9, Spuren 13 und 14, 16 und 17, 19 und 20; und Abb. 11). Die Ergebnisse zeigen, daß der Proteinabschnitt aa 311-486, also der gesamte C-Terminus von MeCP2, für die Bindung der WW-Domänen von FBP11 verantwortlich ist und daß dieser Abschnitt die Prolin-reiche Sequenz einschließt.

Wie aus Abb. 8 hervorgeht, wurde das MeCP2-Fragment aa 196-486 auch an die WW-Domänen von HYPC gebunden. Die Interaktionsregion innerhalb von MeCP2 mit diesen beiden WW-Domänen wurde, wie im Falle der beiden WW-Domänen von FBP11, durch GST pull down-Experimente bestimmt. Dazu wurden die oben genannten MeCP2-Deletionsmutanten und volle Länge-MeCP2 sowie das Fusionsprotein GST-HYPC(WW) verwendet.

Volle Länge-MeCP2 und die N-terminalen Deletionsmutanten aa 196-486, aa 239-486 und aa 311-486 wurden an die beiden WW-Domänen von HYPC gebunden (Abb. 10, Spuren 1 und 2, 4 und 5, 7 und 8, 10 und 11). Die Deletionsmutanten aa 340-486 und aa 366-486 interagierten nicht mit HYPC(WW) (Abb. 10, Spuren 13 und 14, 16 und 17). Die beiden C-terminalen Deletionsmutanten aa 1-438 und aa 1-400 wurden ebenfalls nicht an GST-HYPC(WW) gebunden (Abb. 10, Spuren 19 und 20, 22 und 23). Bei keinem der durchgeführten GST pulldown-Experimente konnte eine Bindung an GST festgestellt werden (Abb. 10, Spuren 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24).

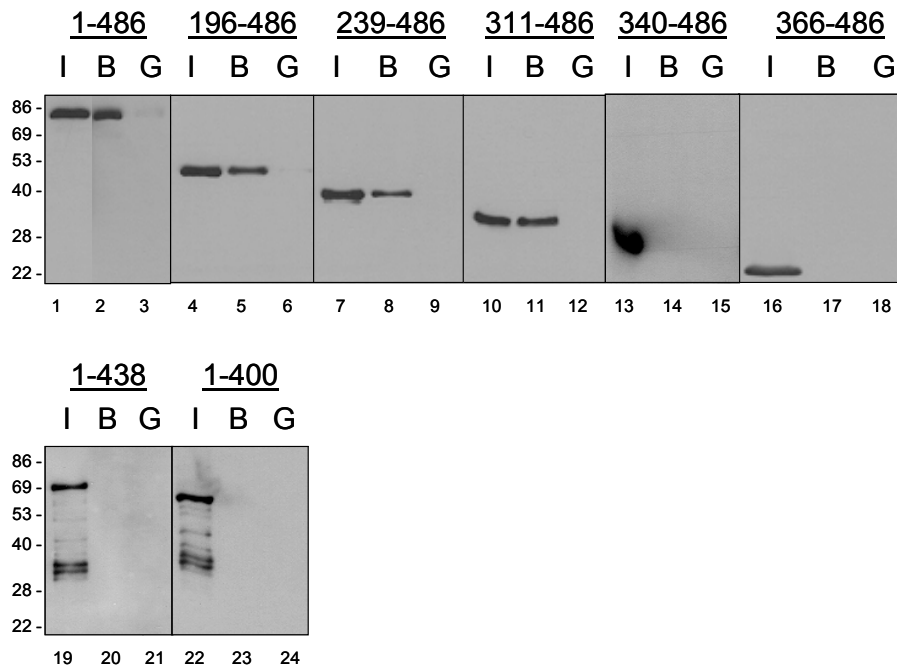


**Abb. 9: Bestimmung der FBP-11(WW)-Interaktionsregion innerhalb von MeCP2 durch GST pull down-Experimente**

Western-Blotting-Analyse der MeCP2-Deletionsmutanten, die an das Fusionsprotein GST-FBP11(WW) bzw. GST in einem GST pulldown-Experiment gebunden wurden. Input (I) entspricht 10% der Gesamtmenge. Die Blots wurden mit einem Antikörper gegen den C-Terminus (Spuren 1-18) oder den N-Terminus (Spuren 19-24) von MeCP2 inkubiert. In den Spuren 19 und 22 sind Hydrolyseprodukte der Deletionsmutanten aa 1-438 bzw. aa 1-400 zu sehen. Jeweils links: Größenstandard in kD.

In der Abb. 11 werden die Ergebnisse der GST pull down-Experimente mit GST-HYPC(WW) zusammengefasst. Für die Bindung der WW-Domänen von HYPC ist dieselbe Region innerhalb des MeCP2-Moleküls zuständig wie bei FBP11(WW). Daher wurde die Region, die für eine effiziente Bindung der WW-Domänen von FBP11 und HYPC verantwortlich ist (aa 311-486), WW-Domänen Bindungsregion (WDR) genannt. Diese neue Domäne von MeCP2 enthält die schon oben erwähnte Prolin-reiche Sequenz (aa 376-405) und zwei C-terminale, zwischen Mensch und dem afrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus*) stark konservierte

Regionen (CR1, aa 404-438; CR2 aa 455-486). Die Prolin-reiche Sequenz innerhalb von MeCP2 ist sicherlich die direkte Interaktionsstelle mit den WW-Domänen von FBP11 und HYPC, jedoch ist eine wesentlich größere Region (die gesamte WDR) für eine effiziente Bindung notwendig.

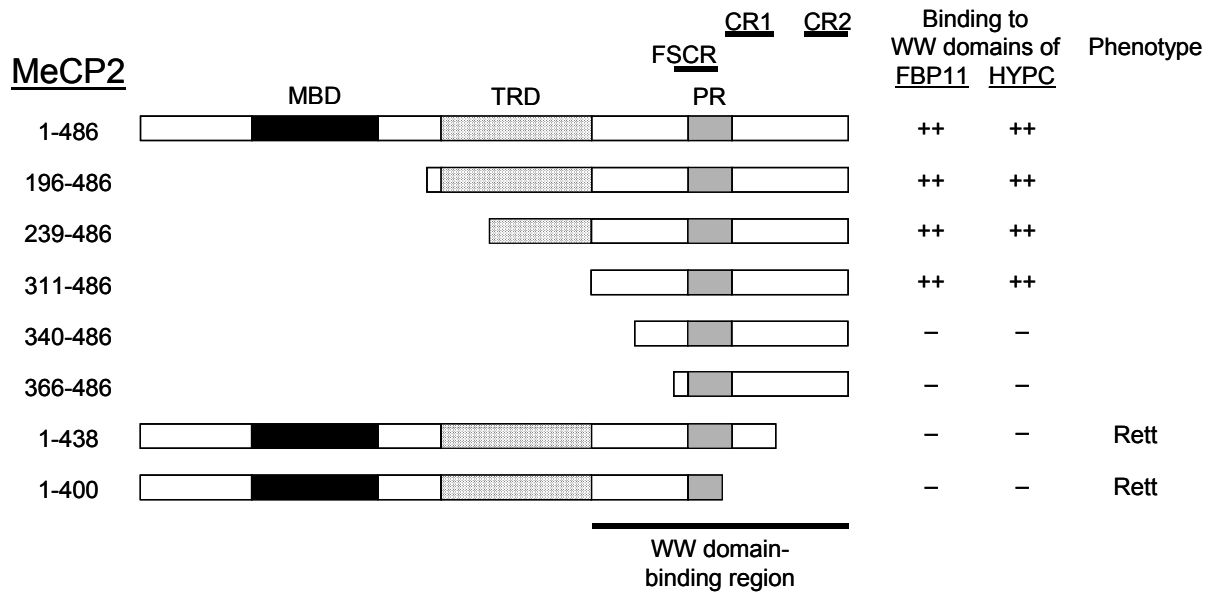


**Abb. 10: Bestimmung der HYPC(WW)-Interaktionsregion innerhalb von MeCP2 durch GST pull down-Experimente**

Western-Blotting-Analyse der MeCP2-Deletionsmutanten, die an das Fusionsprotein GST-HYPC(WW) bzw. GST in einem GST pull down-Experiment gebunden wurden. Input (I) entspricht 10% der Gesamtmenge. Die Blots wurden mit einem Antikörper gegen den C-Terminus (Spuren 1-18) oder den N-Terminus (Spuren 19-24) von MeCP2 inkubiert. In den Spuren 19 und 22 sind Hydrolyseprodukte der Deletionsmutanten aa 1-438 bzw. aa 1-400 zu sehen. Jeweils links: Größenstandard in kD.

### 3.7 MeCP2 bindet an die WW-Domänen von FBP11 und HYPC *in vivo*

Um die *in vitro*-Bindung von den WW-Domänen von FBP11 und HYPC an MeCP2 *in vivo* zu bestätigen, wurden Coimmunpräzipitationsexperimente mit transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Mit Hilfe des Vektors pcDNA3-Gal4BD, der bereits die kodierende Sequenz für die Gal4-BD enthält, wurden die WW-Domänen von FBP11 (aa 146-214) bzw. HYPC (aa 98-168) mit der Gal4-BD fusioniert. Die cDNAs wurden in die Schnittstellen *KpnI* und *BamHI* von pcDNA3-Gal4BD eingefügt. Die Vektoren wurden als pcDNA-Gal4BD-FBP11(WW) und pcDNA-Gal4BD-HYPC(WW) bezeichnet und dienten der Expression der entsprechenden Fusionsproteine in HEK293-Zellen. Drei verschiedene cDNA-Abschnitte von MeCP2 wurden mit einer Sequenz für das FLAG-Epitop fusioniert und in die Schnittstellen *HindIII* und *BamHI* des Expressionsplasmids pcDNA3 (Invitrogen) eingefügt. Die so

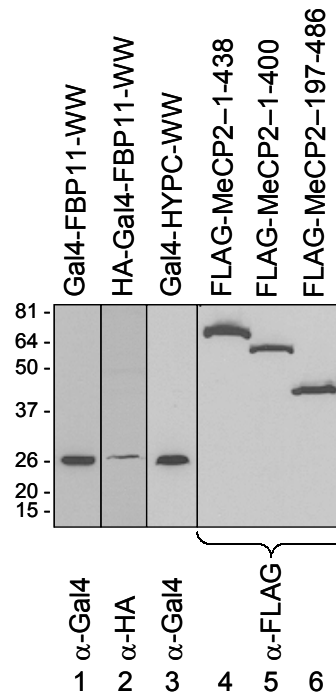


**Abb. 11: Übersicht zur Identifikation der WW-Domänen Bindungsregion (WDR) durch GST pull down-Experimente**

Die MeCP2-Deletionsmutanten, die für die GST pull down-Experimente eingesetzt wurden, sind schematisch dargestellt. Bezeichnung und Lage der zwei Domänen sowie von vier Regionen sind oben angegeben: MBD, methyl-CpG-binding domain; TRD, transcriptional repression domain; PR, proline-rich region; CR1 und CR2, conserved regions 1 und 2. Die Ergebnisse der GST pull down-Experimente aus den Abb. 9 und 10 sind rechts angegeben: Die relativen Bindungsaktivitäten sind mit ++ (mehr als 15% des Inputs wurden gebunden) und – (weniger als 0,5% des Inputs wurden gebunden) gekennzeichnet. Ebenfalls rechts wird der Phänotyp der dem MeCP2-Fragment entsprechenden Mutation wiedergegeben: Rett, klassisches Rett-Syndrom. Unten ist der Bereich der WW-Domänen Bindungsregion (WDR) angegeben.

konstruierten Vektoren pcDNA3-FLAG-MeCP2-aa1-438, pcDNA3-FLAG-MeCP2-aa1-400 und pcDNA3-FLAG-MeCP2-aa197-486 dienten der Expression von N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusionierten MeCP2-Fragmenten (schematische Darstellung in Abb. 16). Die Expression der beschriebenen Konstrukte in HEK293-Zellen wurde durch Western-Blotting mit verschiedenen Antikörpern bestätigt (Abb. 12, Spuren 1, 3, 4, 5 und 6). Zunächst wurde die Interaktion zwischen den FBP11(WW)-Domänen bzw. HYPC(WW)-Domänen und MeCP2 durch Coimmunpräzipitationsexperimente untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen mit pcDNA-Gal4BD-FBP11(WW) bzw. pcDNA-Gal4BD-HYPC(WW) und pcDNA3-FLAG-MeCP2-aa197-486 cotransfiziert. Die Lysate wurden mit einem anti FLAG-Antikörper immunpräzipitiert und die Präzipitate durch Western-Blotting mit einem Antikörper gegen die Gal4-BD untersucht. Mit FLAG-MeCP2-aa197-486 konnten Gal4-FBP11(WW) bzw. Gal4-HYPC(WW) gut präzipitiert werden (Abb. 13 und 15, jeweils Spur 5). Als Kontrollen wurden Zellen nur mit pcDNA-Gal4BD-FBP11(WW) bzw. pcDNA-Gal4BD-HYPC(WW) transfiziert

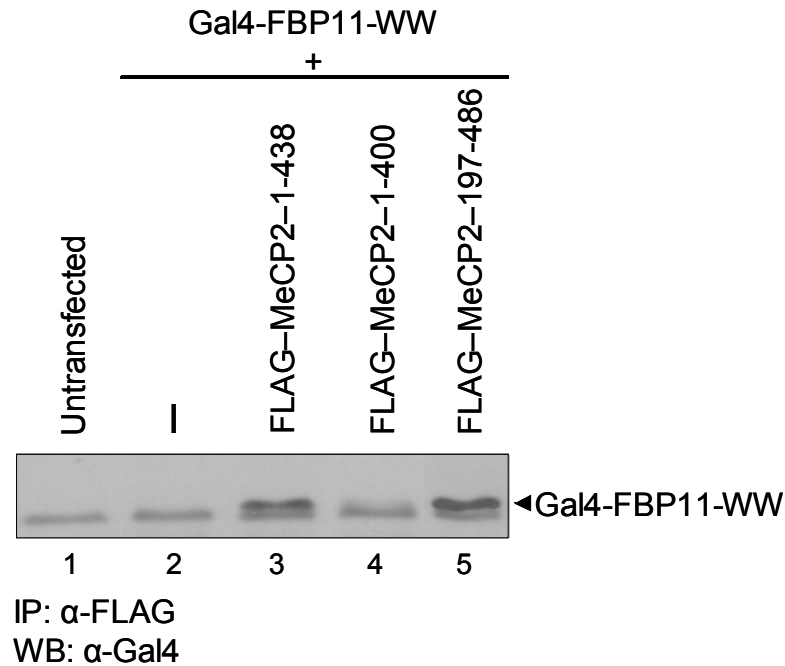
und untransfizierte Zellen verwendet. In den Präzipitaten dieser zwei Kontrollansätze konnten mit dem Antikörper gegen die Gal4-BD keine Proteine nachgewiesen werden (Abb. 13 und 15, jeweils Spur 1 und 2).



**Abb. 12: Expressionskontrolle verschiedener Fusionsproteine und MeCP2-Fragmente in HEK293-Zellen für die Coimmunpräzipitation**

HEK293-Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Zur Kontrolle der Expression wurden die Lysate durch Western-Blotting mit Antikörpern gegen die Gal4-BD (Clontech), HA (Roche) oder FLAG (M2, Sigma) analysiert. Links: Größenstandard in kD.

Mit Gal4BD-FBP11(WW) und FLAG-MeCP2-aa197-486 wurde eine im Vergleich zu den oben beschriebenen Ansätzen reverse Coimmunpräzipitation durchgeführt. Dafür wurde ein Antikörper gegen die Gal4-BD eingesetzt und für die Detektion des copräzipitierten FLAG-MeCP2-aa197-486 der FLAG-Antikörper. Zwei verschiedene Antikörper gegen die Gal4-BD wurden getestet, mit keinem ließ sich FLAG-MeCP2-aa197-486 copräzipitieren (Daten nicht gezeigt). Daher wurde an den N-Terminus von Gal4-BD-FBP11(WW) eine HA-Sequenz angehängt und die Coimmunpräzipitation mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop wiederholt. Mit diesem Antikörper ließ sich FLAG-MeCP2-aa197-486 copräzipitieren (Abb. 14, Spur 4). In den Kontrollansätzen (Zellen nur mit pcDNA3-FLAG-MeCP2-aa197-486 transfiziert und untransfizierte Zellen) konnten mit dem FLAG-Antikörper keine Proteine nachgewiesen werden (Abb. 14, Spur 2 und 3). Diese Ergebnisse zeigen, daß MeCP2 mit den WW-Domänen von FBP11 und HYPC *in vivo* interagiert.



**Abb. 13 Coimmunpräzipitation von FBP11(WW) mit verschiedenen MeCP2-Fragmenten**

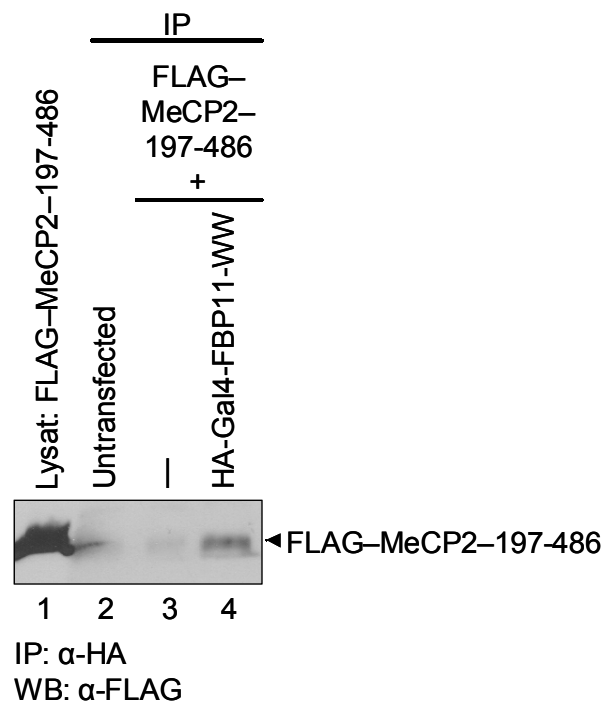
HEK293-Zellen wurden mit Gal4-FBP11-WW allein oder zusätzlich mit Plasmiden für die angegebenen FLAG-MeCP2-Mutanten transfiziert. Untransfizierte HEK293-Zellen dienten als weitere Kontrolle. Die mit einem anti FLAG-Antikörper (M2, Sigma) erhaltenen Immunpräzipitate wurden durch Western-Blotting mit einem anti Gal4-BD-Antikörper analysiert. Die Banden, die in jeder Spur zu sehen sind (unterhalb von Gal4-FBP11-WW), sind höchstwahrscheinlich auf eine Reaktion des sekundären Antikörpers aus dem Western-Blot mit der leichten Kette des FLAG-Antikörpers zurückzuführen.

Im Gegensatz zu FLAG-MeCP2-aa197-486 interagierte die C-terminale Deletionsmutante FLAG-MeCP2-aa1-438 nur schwach mit FBP11- bzw. HYPC-(WW) (Abb. 13 und 15, jeweils Spur 3). Weitere C-terminale Deletion bis aa 400 verhinderte die Interaktion fast vollständig (Abb. 13 und 15, jeweils Spur 4). Diese Daten deuten daraufhin, daß für die *in vivo*-Bindung der WW-Domänen von FBP11 und HYPC die gleiche MeCP2-Region wie bei der *in vitro*-Bindung erforderlich ist. In Abb. 16 werden die Ergebnisse der Coimmunpräzipitationen zusammengefaßt. Die Banden, die in Abb. 13 in jeder Spur zu sehen sind (unterhalb von Gal4-FBP11-WW), sind höchstwahrscheinlich auf eine Reaktion des sekundären Antikörpers aus dem Western-Blot mit der leichten Kette des FLAG-Antikörpers zurückzuführen.

Mit den GST pull down-Experimenten und den Coimmunpräzipitationen ließ sich eine Interaktion zwischen MeCP2 und den WW-Domänen von FBP11 bzw. HYPC zeigen und die WDR definieren. Bei den GST pull down-Experimenten handelte es sich um *in vitro*-Untersuchungen, bei den Coimmunpräzipitationen um *in vivo*-Experimente. Obwohl die



Proteine exogen exprimiert wurden und es sich lediglich um Fragmente der volle Länge-Formen handelte, spiegeln die Coimmunpräzipitationen die tatsächliche Situation sicherlich besser wider als die GST pull down-Experimente. Aus diesem Grund ist die Coimmunpräzipitation sicherlich die sensitivere Methode. Die leicht voneinander abweichenden Ergebnisse, die mit den beiden Methoden für das MeCP2-Fragment aa 1-438 erzielt worden sind (vergleiche Abb. 9 und 10, jeweils Spur 20 mit Abb. 13 und 15, jeweils Spur 3), sind höchstwahrscheinlich auf die unterschiedlichen Fähigkeiten der beiden Systeme, die native Form des Proteins auszubilden, zurückzuführen.

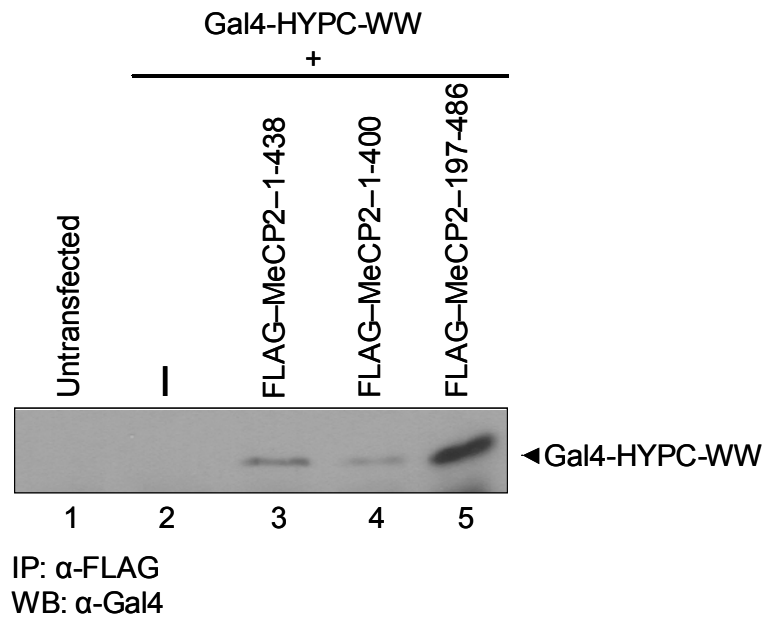


**Abb. 14: Reverse Coimmunpräzipitation: Coimmunpräzipitation eines MeCP2-Fragments mit FBP11(WW)**

HEK293-Zellen wurden mit FLAG-MeCP2-197-486 allein oder zusätzlich mit HA-Gal4-FBP11-WW transfiziert. Die mit einem anti HA-Antikörper (Roche) erhaltenen Immunpräzipitate wurden durch Western-Blotting mit einem anti FLAG-Antikörper (Sigma) analysiert. Das „Signal“ in Spur 2 ist ein Artefakt aus Spur 1.

### 3.8 Vergleich mit Genotyp/Phänotyp-Studien von Rett-Syndrom-Patienten

Durch den Vergleich von publizierten Genotyp/Phänotyp-Studien mit der Fähigkeit von mutiertem MeCP2 die WW-Domänen von FBP11 bzw. HYPIC zu binden, können sich Hinweise auf die molekulare Entstehung des Rett-Syndroms ergeben. Die Prolin-reiche Region im C-Terminus von MeCP2 überlappt mit einer Region, in der sehr häufig frameshift-Mutationen, die das Rett-Syndrom verursachen (Dragich et al., 2000; Van den Veyver *et al.*,

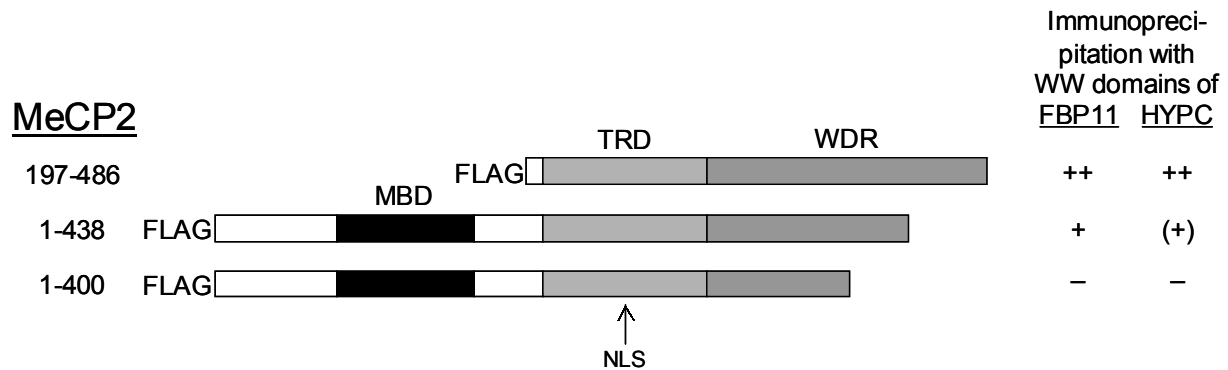


**Abb. 15: Coimmunpräzipitation von HYPC(WW) mit verschiedenen MeCP2-Fragmenten**

HEK293-Zellen wurden mit Gal4-HYPC-WW allein oder zusätzlich mit Plasmiden für die angegebenen FLAG-MeCP2-Mutanten transfiziert. Untransfizierte HEK293-Zellen dienten als weitere Kontrolle. Die mit einem anti-FLAG-Antikörper (M2, Sigma) erhaltenen Immunpräzipitate wurden durch Western-Blotting mit einem anti Gal4-BD-Antikörper analysiert.

2000), gefunden werden (frameshift cluster region, FSCR, aa 366-398). Die frameshifts werden durch Deletionen und/oder Insertionen verursacht, die zu kurzen Abschnitten falscher Aminosäuresequenzen und einem Stopp bei aa 392, 404 oder 408 führen. Die frameshift-Mutationen machen ungefähr 10% aller Rett-Syndrom verursachenden Mutationen aus (Dragich et al., 2000) und sind als Gruppe fast so häufig wie die beiden häufigsten hotspots für Mutationen in MeCP2 (T158M und R168X). Die MeCP2-Deletionsmutante aa 1-400, die diese große Gruppe der frameshift-Mutationen repräsentiert, ist nicht in der Lage die WW-Domänen von FBP11 und HYPC *in vivo* und *in vitro* zu binden (Abb. 11 und 16). C-terminal der FSCR werden nur selten Mutationen gefunden. Eine dieser Mutationen ist ein frameshift an Position aa 436, der klassisches Rett-Syndrom verursacht (Buyse et al., 2000). Diese Situation wird durch die Mutante aa 1-438 repräsentiert, die nicht oder nur noch schwach an die WW-Domänen von FBP11 und HYPC *in vitro* bzw. *in vivo* bindet (Abb. 11 und 16). Punktmutationen (E397K und P399L) in der wichtigen Prolin-reichen Region verhindern nicht die Bindung von entsprechenden MeCP2-Mutanten an die WW-Domänen von FBP11 bzw. HYPC *in vitro* (S. Cloppenburg und W.H. Strätling, persönliche Mitteilung). Die Mutation E397K verursacht kein Rett-Syndrom und stellt eine nicht-pathologische Variante dar (Couvert et al., 2001). Die Mutation P399L wurde zunächst als Rett-Syndrom

verursachend beschrieben (Couvert et al., 2001), in einer weiteren Publikation jedoch als Polymorphismus identifiziert (Lacone et al., 2002). Diese Vergleiche deuten an, daß die WW-Domänen-Bindungsaktivität der MeCP2-Mutanten mit dem Genotyp/Phänotyp entsprechender Rett-Patienten korrelieren könnte.



**Abb. 16:      Übersicht zu den durchgeführten Coimmunpräzipitationen**

Die MeCP2-Deletionsmutanten, die für die Coimmunpräzipitationen eingesetzt wurden (Abb. 11 und 12), sind schematisch dargestellt. MBD, methyl-CpG-binding domain; TRD, transcriptional repression domain; WDR, WW domain-binding region; NLS, nuclear localization signal. Die Effizienz der Coimmunpräzipitationen ist rechts mit ++, +, (+) und – wiedergegeben.

### 3.9      Mutationen im *MECP2*-Gen

Mutationen im *MECP2*-Gen sind die Ursache des Rett-Syndroms (Amir et al., 1999). Um solche Mutationen zu detektieren, standen Blutproben von 22 Patienten zur Verfügung. Bei zehn dieser Patienten konnte eindeutig die klinische Diagnose „Rett-Syndrom“ gestellt werden. Bei den anderen war eine eindeutige Diagnose nicht möglich oder unbekannt, alle wiesen aber eine neurologische Erkrankung auf. Von allen Blutproben wurde die genomische DNA isoliert. Mittels PCR wurden die codierenden Sequenzen für die Methyl-CpG-Bindungsdomäne, die Repressordomäne und den dazwischen liegenden Linker amplifiziert. Die spezifischen PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese gereinigt und sequenziert oder (im Falle einer Deletion/Insertion) in einen Vektor eingefügt und anschließend sequenziert.

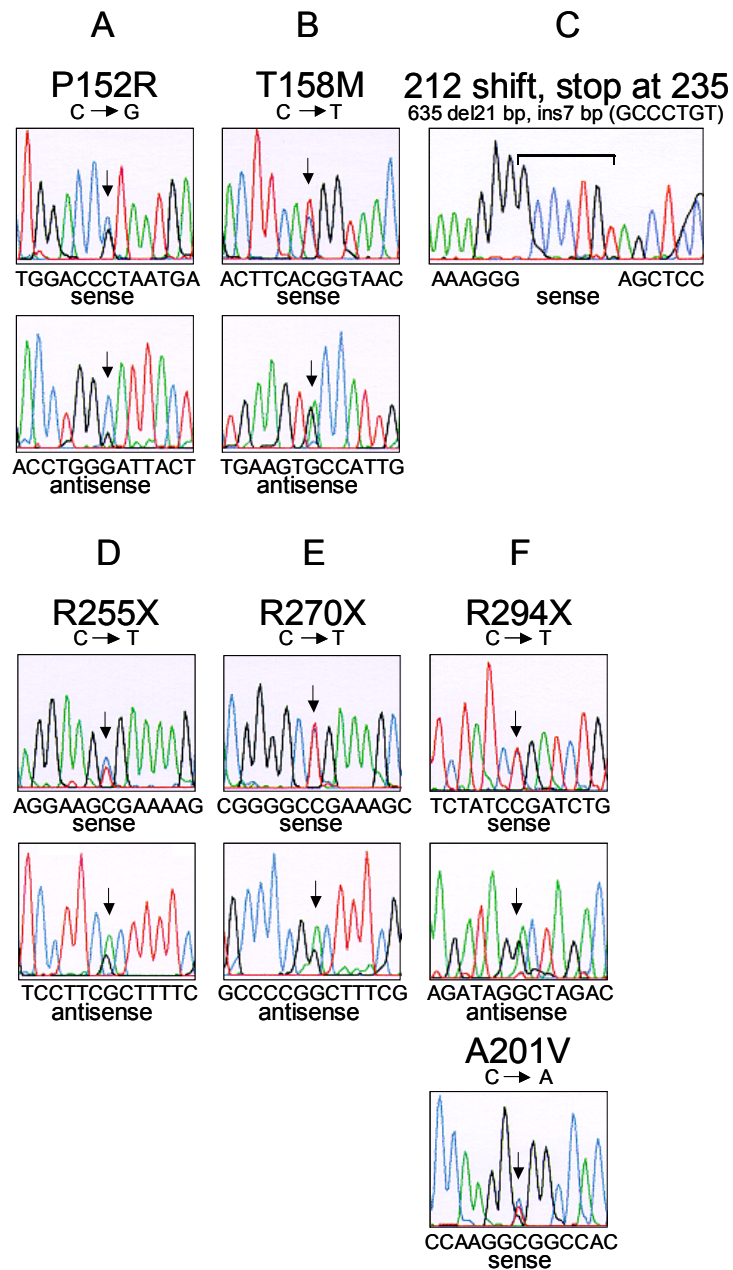
In sechs Patienten, alle mit der Diagnose „Rett-Syndrom“, wurden pathogene Mutationen gefunden. In den vier anderen Rett-Patienten sowie in den Patienten mit einer unbekannten neurologischen Erkrankung wurden keine Mutationen detektiert. Es wurden zwei missense- und drei nonsense-Mutationen, eine Deletion verbunden mit einer Insertion und ein (nicht pathogener) Polymorphismus identifiziert (Tabelle 2 und Abb. 17). Die zwei missense-

| Patient | Nukleotidaustausch    | Typ der Mutation   | Änderung auf Aminosäureebene | betroffene Domäne |
|---------|-----------------------|--------------------|------------------------------|-------------------|
| 7/00J   | C455G                 | missense           | P152R                        | MBD               |
| 9/00K   | C473T                 | missense           | T158M                        | MBD               |
| 14/00P  | C602T                 | Polymorphismus     | A201V                        | MBD/TRD-linker    |
| 28/01   | C763T                 | nonsense           | R255X                        | TRD               |
| 17/00N  | C808T                 | nonsense           | R270X                        | TRD               |
| 14/00P  | C880T                 | nonsense           | R294X                        | TRD               |
| 1/00S   | 635 del21 bp, ins7 bp | deletion/insertion | 212 shift, stop at 235       | TRD               |

**Tabelle 2: Übersicht zu den detektierten Mutationen in sechs Rett-Patientinnen**

Mutationen P152R und T158M (Abb. 17A und B) wurden in der codierenden Sequenz für die Methyl-CpG-Bindungsdomäne detektiert. Die Mutation P152R ist auf eine C/G-Transversion des Nukleotids 455 zurückzuführen, die Mutation T158M auf eine C/T-Transition des Nukleotids 473. Der Polymorphismus A201V (Abb. 17 F unten) wurde in der codierenden Sequenz der Linkerregion gefunden und entsteht durch einen C/A-Austausch des Nukleotids 602. Die drei nonsense-Mutationen R255X, R270X und R294X (Abb. 17D, E und F oben) wurden in der codierenden Sequenz für die Repressordomäne identifiziert. Sie alle sind auf eine C/T-Transition zurückzuführen: C763T, C808T und C880T. Der Polymorphismus und die pathogene Mutation R294X wurden in demselben Patienten gefunden. Auch die Deletion von 21 Basenpaaren verbunden mit einer Insertion von 7 Basenpaaren beginnend mit Nukleotid 635 führt zum Kettenabbruch in der Repressordomäne: 212 shift, stop at 235 (Abb. 17C). Die missense- und nonsense-Mutationen wurden neben zahlreichen weiteren Mutationen in vielen anderen Rett-Patienten gefunden (Van den Veyver *et al.*, 2000). Der Polymorphismus wurde ebenfalls schon beschrieben (Inui *et al.*, 2001), die Deletion/Insertion hingegen noch nicht. Viele Arbeitsgruppen haben in 70-80% der klassischen Rett-Patienten bzw. Rett-Patienten mit einer variablen Form des Rett-Syndroms Mutationen gefunden (Amir *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 1999; Bienvenu *et al.*, 2000; Cheadle *et al.*, 2000; Dragich *et al.*, 2000; Huppke *et al.*, 2000). Besonders häufig sind Transitionen von C nach T innerhalb von CpG-Stellen, die ca. 65% aller Mutationen in klassischen Rett-Patienten ausmachen (Dragich *et al.*, 2000). Bei den hier untersuchten zehn Rett-Patienten wurden in sechs Fällen pathogene Mutationen gefunden, allerdings wurden auch nicht alle codierenden Sequenzen des *MECP2*-Gens (insbesondere die codierenden Sequenzen für den C-Terminus) untersucht. Unter den

hier detektierten Punktmutationen wurden (in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur) besonders viele C/T-Transitionen detektiert (vier von fünf Punktmutationen).



**Abb. 17: Mutationen im *MeCP2*-Gen**

Genomische DNA wurde aus Blutproben von Rett-Patienten isoliert. Mittels PCR wurden die codierenden Sequenzen für die Methyl-CpG-Bindungsdomäne, die Repressordomäne und den dazwischen liegenden Linker amplifiziert. Die spezifischen PCR-Produkte wurden gereinigt und sequenziert. Gezeigt sind die Stellen des Sequenzierprofils von sense- und antisense Strang, in denen Mutationen gefunden wurden. Die Mutationen sind durch Pfeile oder eine Klammer markiert. Bei den Punktmutationen repräsentiert ein Signal die Mutation, das andere das Wildtyp-Allel. Die Wildtypsequenzen sind unter den Sequenzierprofilen wiedergegeben. Oberhalb der Profile ist der Nukleotidaustausch und die Auswirkung der Mutation auf Aminosäureebene angegeben. Die Mutationen R294X und A201V wurde in einer Rett-Patientin identifiziert.

#### 4 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nach neuen Protein-Interaktionspartnern von hMeCP2 durch Anwendung der Hefe two-hybrid-Methode gesucht. Mit zwei verschiedenen C-terminalen MeCP2-Fragmenten (aa 196-486 und aa 311-486) wurden zwei cDNA-Bibliotheken gescreent, ohne daß bekannte oder neue Interaktionspartner identifiziert werden konnten. Erst im Anschluß an die Screens konnten Hefe und mammalian two-hybrid-assays durchgeführt werden, um zu klären, ob die bekannte Interaktion zwischen MeCP2 und dem Corepressor mSin3A (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998) durch diese Methodik gezeigt werden kann. Weder durch Hefe noch durch mammalian two-hybrid-Experimente konnte ein positives Ergebnis erzielt werden. In der Literatur wurde die Bindung von mSin3A an MeCP2 durch GST pull down-Experimente und Coimmunpräzipitation gezeigt (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998, Yu et al., 2000). Im späteren Verlauf der Arbeit konnte die Interaktion zwischen der WW-Domäne von FBP11 und MeCP2 durch die gleichen Methoden bestätigt und näher charakterisiert werden. Doch auch diese Interaktion ließ sich nicht durch Hefe oder mammalian two-hybrid-assays zeigen. Ebenso konnte Fang Yu die Bindung von c-Jun, Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP1 (activator protein 1), an MeCP2 durch Coimmunpräzipitation mit endogenen Proteinen, nicht jedoch durch einen mammalian two-hybrid-assay zeigen (Doktorarbeit, 2002). Alle weiteren, bisher bekannten Protein-Interaktionspartner von MeCP2 wurden durch GST pull down-Experimente, Coimmunpräzipitation (TFIIB, c-Ski, N-CoR) bzw. phage display (HMGB1, FBP11) identifiziert (Kaludov und Wolffe, 2000; Kokura et al., 2001; Dintilhac und Bernués, 2001; Bedford et al., 1997). Mit der Ausnahme von HMGB1 und FBP11 wurden alle Bindungspartner durch eine gezielte Suche identifiziert. HMGB1 und FBP11 wurden durch Screenen von Phagen-Expressionsbibliotheken gefunden (Dintilhac und Bernués, 2001; Bedford et al., 1997). Die Identifikation von den genannten Interaktionspartnern sowie die weiteren obigen Ausführungen zeigen zwei Dinge: Erstens, es gibt zahlreiche Protein-Interaktionspartner von MeCP2 und, zweitens, im Falle von mSin3A, der WW-Domäne von FBP11 und c-Jun lassen sich die Interaktionen nicht durch konventionelle two-hybrid-Untersuchungen, jedoch durch GST pull down-Experimente und/oder Coimmunpräzipitation nachweisen.

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung eines Hefe two-hybrid Screens ist die Expression des bait-Proteins in der Hefe. Abb. 2 zeigt, daß die zwei für die Screens eingesetzten Fusionsproteine bestehend aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und einem MeCP2-Fragment in Hefe exprimiert wurden. Es ließ sich jedoch nicht überprüfen, ob das menschliche MeCP2-Fragment in der Hefe korrekt gefaltet oder gegebenenfalls post-

translational modifiziert wurde (bisher ist nichts über posttranslationale Modifikationen von MeCP2 bekannt). Eine inkorrekte Faltung und/oder fehlende Modifikationen könnten die Ursache dafür sein, daß durch die Hefe two-hybrid-Screens keine Interaktionspartner für menschliches MeCP2 gefunden wurden. Beispielsweise ist die Interaktion von LET-23 (RTK) und SEM-5 (Grb2) [Proteine von Signaltransduktionswegen] von Tyrosinphosphorylierung abhängig. Sie kann nicht in einem konventionellen Hefe two-hybrid-System detektiert werden, da in Hefezellen offensichtlich Tyrosinreste nicht phosphoryliert werden (Walhout et al., 2000). In menschlichen Krebszellen sollten diese Probleme nicht auftreten (es sei denn die Faltung kann aufgrund des Fehlens wichtiger Proteinabschnitte nicht oder nur unvollständig durchgeführt werden). Jedoch, wie bereits oben erwähnt, konnten auch durch die mammalian two-hybrid-Experimente keine Interaktionen gezeigt werden. Eine weitere Ursache für das Mißlingen der Hefe two-hybrid-Screens und der mammalian two-hybrid-assays könnte in der Funktion von MeCP2 selbst liegen. Als transkriptioneller Repressor könnte MeCP2 die Aktivierung der Reportergene verhindern. In einer Arbeit von Yu et al. (2000) wird gezeigt, daß die TRD von MeCP2 in der Lage ist, in transienten Transfektionsexperimenten in HEK293-Zellen eine durch die VP16-Domäne stark aktivierte Transkription zu reprimieren. Dies könnte für das längere MeCP2-Fragment (aa 196-486) in den Hefe und mammalian two-hybrid-Untersuchungen zutreffen. Allerdings würde diese Erklärung wahrscheinlich nicht für das kürzere MeCP2-Fragment (aa 311-486) gelten, da der C-terminale Abschnitt nur eine geringe Repressoraktivität besitzt (Yu et al., 2000). Möglicherweise interagieren die TRD und/oder der C-terminale Abschnitt (aa 311-486) mit einem zwischen Hefe und Mensch konservierten Protein. Durch die Interaktion mit einem endogenen Protein in Hefe- oder menschlichen Krebszellen könnte MeCP2 seine Funktion als Repressor ausüben oder stände nicht für die Bindung mit dem zweiten exogen exprimierten (zu testenden) Protein zur Verfügung. Beispielsweise wurde demonstriert, daß der Corepressor aus der Hefe Sin3 mit dem transkriptionellen Repressor aus der Maus Mad interagiert. In einem Hefe two hybrid-assay verhinderte endogenes Sin3 die Aktivierung des Reportergens durch die interagierenden Proteine LexA-Mad1 und VP16-Max durch direkte Bindung an diesen Komplex. Dies hatte zur Folge, daß die bekannte Interaktion zwischen Mad und Max nicht nachgewiesen werden konnte (Kasten et al., 1996). Die Regionen innerhalb von mSin3A, die für die Bindung von MeCP2 wichtig sind (Nan et al., 1998), sind zwischen Hefe-Sin3 und mSin3A hoch konserviert (Ayer et al., 1995). Es ist also durchaus möglich, daß das bait-Protein MeCP2-aa196-486 mit Hefe-Sin3 interagiert und es zu einer Repression der Transkription der Reportergene kommt. Ähnliche Beispiele wurden von Walhout et al. (2000) berichtet. Sie

halten es für möglich, daß Kernproteine wie Histondeacetylasen (HDACs), Proteine, die HDACs rekrutieren sowie transkriptionelle Repressoren eine Aktivierung der Reportergene in Hefezellen durch transkriptionelle Repression verhindern. Dies würde jedoch nicht für das bait-Protein MeCP2-aa311-486 gelten, da dieses nicht die für mSin3A notwendige Corepressor-Interaktionsregion (Nan et al., 1998) enthält. Für den C-terminalen Bereich (die letzten 63 Aminosäuren von MeCP2) wurde gezeigt, daß sie an der Bindung nukleosomal verpackter DNA beteiligt sind (Chandler et al., 1999). Möglicherweise liegt im C-Terminus (aa 311-486) auch die Region, die für die Interaktion mit HMGB1 (HMGB1 ist Bestandteil von Chromatin) wichtig ist (Dintilhac und Bernués, 2001). Es ist daher vorstellbar, daß MeCP2 durch diese Eigenschaften an das Chromatin der Hefe oder der HEK293-Zellen gebunden wird und dann nicht mehr für eine Interaktion mit dem prey-Protein zur Verfügung steht. Eine weitere denkbare Ursache für die negativen Ergebnisse der Hefe two-hybrid-Experimente könnte in der hier bestätigten Interaktion von MeCP2 mit den WW-Domänen von FBP11 liegen. Das Hefehomolog von FBP11 ist Prp40, ein essentieller Spleißfaktor (Koa und Siliciano, 1996). Beide Proteine besitzen zwei hoch konservierte WW-Domänen (Morris und Greenleaf, 2000). Es wäre vorstellbar, daß Prp40 mit MeCP2 interagiert und auf diese Weise eine Interaktion mit dem prey-Protein verhindert.

Die oben angeführten Beispiele und Überlegungen zeigen, daß die Schwierigkeiten in den two-hybrid-Untersuchungen durch die Eigenschaften von MeCP2 verbunden mit der Notwendigkeit der Aktivierung eines Reportergens verursacht sein könnten. Solche Schwierigkeiten wären auch für transkriptionelle Aktivatoren oder andere Kernproteine vorstellbar. Tatsächlich wurden in den letzten Jahren Hefe two-hybrid-Systeme entwickelt, um diese Hindernisse zu umgehen (Vidal und Legrain 1999). In dem „Sos recruitment system“ (Aronheim et al., 1997) findet die Interaktion der Hybridproteine im Cytoplasma statt. Das eine Hybridprotein ist mit der humanen Guanylnukleotidaustauschfaktor-Domäne von hSos fusioniert. Dieses Fusionsprotein wird durch das zweite Fusionsprotein, das lediglich ein Membrananker besitzt, bei einer Interaktion an die Zellmembran rekrutiert. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die es speziellen Hefezellen ermöglicht bei 37°C zu wachsen. Findet keine Interaktion statt, sterben die Zellen bei dieser Temperatur ab. Mit diesem System wurden neue Interaktionspartner für c-Jun gefunden (Aronheim et al., 1997). Jun ist Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP1. Ein anderes System basiert auf der Aktivierung eines Reportergens, das vom RNA-Polymerase III-System transkribiert wird (Marsolier et al., 1997; Petrascheck, et al., 2001). Das bait-Protein ist wie in konventionellen Systemen mit der Gal4-DB fusioniert. Das zweite Hybridprotein enthält das Protein  $\tau$ 138, ein



Aktivator für die RNA-Polymerase III. Mit dieser two-hybrid-Version konnte eine gut charakterisierte Interaktion detektiert werden (Marsolier et al., 1997). Diese beiden Beispiele zeigen, daß für bestimmte Anwendungen alternative two-hybrid-Systeme möglicherweise besser geeignet sind als die konventionellen Systeme (Vidal und Legrain, 1999). Die Interaktionen von HMGB1 bzw. den beiden WW-Domänen von FBP11 mit MeCP2 wurden durch Screenen von Phagen-Expressionsbibliotheken gefunden. Mit dieser Methode lassen sich sicherlich weitere, neue Proteininteraktionspartner von MeCP2 identifizieren.

Überraschenderweise konnten mit den immunocytoologischen Untersuchungen ebenfalls nur negative Ergebnisse erzielt werden. Getestet wurde die Colokalisation von bekannten bzw. potentiellen Interaktionspartnern und MeCP2 in MCF7-Zellen. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurden die endogenen Proteine angefärbt. Doch weder für die bekannten Interaktionspartner noch für alle anderen Proteine konnte eine Colokalisation festgestellt werden. Die Ursachen können auch hier vielfältig sein. Möglicherweise könnte nur ein geringer Anteil von MeCP2 mit den bekannten Interaktionspartnern assoziiert sein. Die Interaktion könnte dann nicht mehr detektierbar sein. Im Falle von c-Ski berichten Kokura et al. (2001) dementsprechend, daß nur ein Teil von endogenem c-Ski mit endogenem MeCP2 in 293-Zellen colokalisiert.

Die formin binding proteins (FBP) 11 und 21 wurden als Bindungspartner einer Prolin-reichen Sequenz des Mausproteins Formin identifiziert (Chan et al., 1996). Formin spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Extremitäten und der Niere von Mäusen. Das entsprechende Gen *Formin* wurde aufgrund von Mutationen gefunden, die zu einer Störung der Morphogenese der Mausgliedmaßen führten (Review: Zeller et al., 1999). Der Prolin-reiche Abschnitt des Formins wurde benutzt, um eine Maus-Expressionsbibliothek zu screenen (Chan et al., 1996). Es konnten zwei Klassen von Proteinen identifiziert werden: Zum einen Proteine, die eine oder mehrere Src homology regions 3 (SH3)-Domänen enthielten und zum anderen Proteine, die WW-Domänen aufwiesen. Von den SH3-Proteinen war bereits bekannt, daß sie mit Forminen interagieren. Neu waren jedoch die WW-Proteine als Bindungspartner der Prolin-reichen Sequenz. Die WW-Domäne ist durch zwei hoch-konservierte Tryptophan-Reste und einem Prolin-Rest charakterisiert (Abb. 7). WW-Domänen sind kleine, sich unabhängig faltende Proteindomänen, die aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehen (Macias et al, 1996; Ranganathan et al., 1997) und Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. FBP11 und FBP21 besitzen N-terminal je zwei WW-Domänen, die durch 15 Aminosäuren voneinander getrennt sind (Chan et al., 1996). Die beiden WW-Domänen von FBP11 binden ein 10 Aminosäuren langes, Prolin-reiches Motiv (Id10),

welches in den meisten Formin-Isoformen zu finden ist und die essentielle PPLP-Sequenz enthält (Chan et al., 1996). FBP21 erkennt und bindet Poly-P-Sequenzen, die von R oder K flankiert werden (Bedford et al., 2000). Von FBP11 gibt es homologe Proteine im Menschen (huntingtin yeast partner A, HYPA), *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und in *Saccharomyces cerevisiae* (Prp40). Die Funktion von Prp40 bzw. FBP11 liegt im Spleißen. Prp40 ist ein allgemeiner Spleißfaktor und spielt eine direkte Rolle beim Spleißen von prä-mRNA (Koa und Siliciano, 1996). Prp40 ist mit dem small nuclear Ribonucleoprotein Particle U1 (snRNP) assoziiert (Koa und Siliciano, 1996) und bindet das Hefe branch point binding protein (yBBP), welches wiederum mit Mud2p interagieren kann (Abovich und Rosbash, 1997). In einem Modell von Abovich und Rosbash (1997) wird auf diese Weise eine Brücke zwischen der 5'-Spleißstelle und der 3'-Spleißstelle gebildet: Der snRNP U1 bindet die 5'-Spleißstelle während die 3'-Spleißstelle vermutlich von den Proteinen yBBP und Mud2p gebunden wird. Im Menschen und in Säugetieren ergibt sich ein ähnliches Bild (Abovich und Rosbash, 1997): Die 3'-Spleißstelle wird von den interagierenden Proteinen U2AF65 und dem mammalian branch point binding protein (mBBP) gebunden. Die Interaktion von U2AF65 mit der 3'-Spleißstelle ist experimentell belegt (Valcarcel et al., 1993). Die Interaktion von U2AF65 und mBBP wurde ebenfalls gezeigt (Abovich und Rosbash, 1997). Das mBBP bindet an FBP11 (Abovich und Rosbash, 1997), das vermutlich mit dem snRNP U1 in Säugetieren assoziiert ist. Über U1 wird wiederum die Verbindung zur 5'-Spleißstelle hergestellt.

In einer Arbeit von Morris und Greenleaf (2000) wurde Prp40 außerdem als Bindungspartner der phosphorylierten carboxyterminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II identifiziert. Die Interaktion erfolgt nicht nur im Bereich der WW-Domänen sondern auch im Bereich des sogenannten FF-Motivs, eine Serie von sechs FF-Wiederholungen. FBP11 enthält ebenfalls ein solches FF-Motiv (Abb. 7A). Die Daten von Morris und Greenleaf (2000) deuten daraufhin, daß die phosphorylierte CTD der RNA-Polymerase II (in der Phase der Elongation) durch die Bindung von Prp40 die Assemblierung des oben beschriebenen Spleißkomplexes fördert. Die enge räumliche Anordnung von Transkript, 5'- und 3'-Spleißstelle ermöglicht eine schnelle Assemblierung und einen effektiven Spleißvorgang.

Das oben genannte FBP21 wurde ebenfalls mit Spleißen in Verbindung gebracht (Bedford et al., 1998). FBP21 ist mit dem snRNP U2 assoziiert und interagiert direkt mit dem U1 snRNP-Protein U1C, mit den snRNP-Proteinen SmB und SmB' und mit dem mBBP. Daher vermuten die Autoren, daß FBP21 ebenfalls zur Brückenbildung zwischen dem U1 und U2 snRNP in Säugetieren beitragen könnte (Bedford et al., 1998). Dieses Modell widerspricht nicht

unbedingt dem oben genannten, in dem FBP11 zur Brückenbildung beiträgt. FBP11 und FBP21 könnten nacheinander ihre Funktion erfüllen. Es wäre auch möglich, daß sie mit unterschiedlichen Isoformen des mBBP interagieren oder bei unterschiedlichen prä-mRNA-Substraten zum Einsatz kommen (Bedford et al., 1998).

Ein weiteres Protein mit zwei WW-Domänen ist HYPC. HYPC steht für „huntingtin yeast partner C“ und wurde durch einen Hefe two hybrid-Screen mit dem mutierten Protein „huntingtin“ als Bait isoliert (Faber et al., 1998). Interessanterweise wurde in diesem Screen auch HYPA isoliert, das menschliche Homolog zum Maus-FBP11. HYPC und HYPA gehören wie FBP11 zur Familie der prä-mRNA Spleißfaktoren (Faber et al., 1998; Passani et al., 2000). Die Funktion des Proteins Huntingtin (ca. 350 kD) ist bisher unbekannt. Es ist essentiell für eine normale Embryonenentwicklung und Neurogenese. Huntingtin enthält einen Polyglutamin-Abschnitt, der im entsprechenden Gen auf Chromosom 4 durch eine polymorphe CAG-Wiederholung (10-35 Codons) codiert wird. Kommt es durch Mutationen zu einer Expansion dieser CAG-Wiederholung (40-120 Codons), entsteht Chorea Huntington, eine dominant vererbte Krankheit, die durch unkoordinierte Bewegungen (Chorea), zunehmenden Verlust der Koordinationskontrolle und intellektuellen Verfall gekennzeichnet ist. Die Länge der CAG-Wiederholung korreliert mit dem Beginn der neurologischen Symptome der Krankheit: Bei ca. 42-48 CAG-Wiederholungen setzt die Krankheit im Erwachsenenalter ein, bei mehr als 60 Wiederholungen bricht sie schon während der Jugend aus. Die beiden oben genannten Proteine HYPA und HYPC zeigen eine verstärkte Bindung an mutiertes (verlängertes) Huntingtin. Diese Daten deuten auf eine Interaktion von Huntingtin mit prä-mRNA-Spleißkomplexen hin (Faber et al., 1998; Passani et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch GST pull down-Experimente eine spezifische Interaktion zwischen den WW-Domänen von FBP11 bzw. HYPC und MeCP2 gezeigt werden (Abb.8). Bereits 1997 wurde MeCP2 von Bedford et al. durch *in vitro*-Methoden als Bindungspartner der WW-Domänen von FBP11 identifiziert. Durch Coimmunpräzipitation konnte gezeigt werden, daß diese Interaktion sowie die zwischen MeCP2 und HYPC-WW auch *in vivo* stattfindet (Abb. 13, 14 und 15). Die WW-Domänen Bindungsregion (WDR) innerhalb des MeCP2-Moleküls wurde mit Hilfe verschiedener N- und C-terminaler Deletionsmutanten bestimmt (Abb. 9 und 10). Sie stellt eine eigenständige Domäne innerhalb von MeCP2 dar und reicht von Aminosäure 311 bis Aminosäure 486 (Abb. 11). Die WW-Domänen von FBP11 und HYPC sind die ersten identifizierten Bindungspartner für die Sequenz C-terminal der transkriptionellen Repressordomäne. Möglicherweise liegt im C-Terminus auch die Region, die für die Interaktion mit dem Kernprotein HMGB1 wichtig ist.

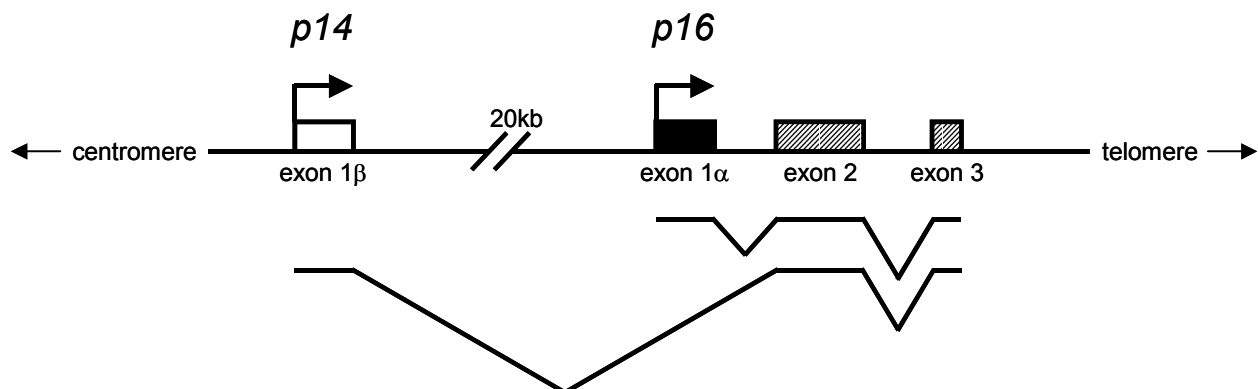
Die Interaktionsregion wurde jedoch nicht direkt bestimmt (Dintilhac und Bernués, 2001). Die WDR ist für eine effiziente Bindung der WW-Domänen von FBP11 und HYPC verantwortlich. Als mögliche Bindungsstelle innerhalb von Maus-MeCP2 wurde die Sequenz PPPP bestimmt (Bedford et al., 1997). Diese Sequenz ist auch in MeCP2 aus der Ratte und dem Menschen enthalten und ist Teil des Prolin-reichen Abschnitts in der Mitte der WDR. Der Prolin-reiche Abschnitt ist sicherlich die direkte Interaktionsstelle mit den WW-Domänen von FBP11 und HYPC. Für eine effiziente Bindung ist allerdings die gesamte WDR (aa 311-486) wichtig (Abb. 11). Deletionen, die die WDR betreffen (aa 340-486, aa 366-486, aa 1-438 und aa 1-400), verhindern eine effiziente Bindung an die WW-Domänen *in vitro* und *in vivo* (Abb. 11 und 16). Das bevorzugte Bindungsmotiv von FBP11 ist die Sequenz PPLP (Bedford et al., 1997). Dennoch bindet FBP11 auch an Maus-MeCP2, das dieses Motiv nicht enthält sondern lediglich die bereits oben genannte PPPP-Sequenz (Bedford et al., 1997). Ähnliches gilt für die Interaktion zwischen HYPA, dem menschlichen Homolog von FBP11, und dem N-Terminus des Proteins Huntingtin. Die beiden WW-Domänen von HYPA sind mit denen von FBP11 identisch. Huntingtin enthält einige sehr ähnliche Variationen des bevorzugten Bindungsmotives der WW-Domänen von FBP11/HYPA, jedoch nicht die PPLP-Sequenz (Faber et al., 1998). Die WW-Domänen von FBP21 binden bevorzugt Poly-P-Sequenzen, die von R oder K flankiert werden (Bedford et al., 2000). Ein derartiges Motiv fehlt in MeCP2. Damit übereinstimmend wurde keine Interaktion zwischen den WW-Domänen von FBP21 und MeCP2 gefunden (Abb. 8).

Durch die oben beschriebenen Experimente konnte eine Bindung von MeCP2 an die WW-Domänen von FBP11 und HYPC gezeigt werden. Um eindeutig eine Interaktion zwischen MeCP2 und den beiden Spleißfaktoren zu bestätigen, wäre es notwendig, das gesamte FBP11- bzw. HYPC-Protein für entsprechende Experimente einzusetzen. Ein anderes Protein mit einer WW-Domäne ist Fe65. Die WW-Domäne von Fe65 bindet bevorzugt hexa-Prolinsequenzen oder das PPR-Motiv, bindet jedoch ebenfalls (wenn auch schwächer) das PPLP-Motiv (Bedford et al., 2000). Fe65 ist im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert. Es wurde mit der Regulation der Transkription und der Entstehung der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht (Sudol et al., 2001). Da MeCP2 eine hexa-Prolinsequenz besitzt, interagiert es möglicherweise auch mit der WW-Domäne von Fe65. Eine Interaktion mit Fe65 könnte neue Hinweise auf die Regulation der transkriptionellen Repression durch MeCP2 und auf andere Funktionen von MeCP2 liefern.

Bisher wurde MeCP2 als transkriptioneller Repressor charakterisiert (Nan et al., 1997; Nan et al., 1998; Jones et al., 1998; Yu et al., 2000; Kaludov und Wolffe, 2000). Die Interaktion von

MeCP2 mit den WW-Domänen zweier Spleißfaktoren zeigt, daß MeCP2 noch weitere Funktionen haben könnte. Wie oben bereits beschrieben wurden FBP11 und FBP21 mit der Brückenbildung zwischen der 5'- und 3'-Spleißstelle in Verbindung gebracht (Abovich und Rosbash, 1997; Bedford et al., 1998) und könnten bei unterschiedlichen prä-mRNA-Substraten zum Einsatz kommen (Bedford et al., 1998). Es ist denkbar, daß MeCP2 bei der Bereitstellung und/oder dem Entfernen von Spleißfaktoren eine Rolle spielt. Dadurch käme es zu einer schnellen Versorgung des Spleißkomplexes mit den für eine bestimmte prä-mRNA benötigten Proteinfaktoren bzw. es würden bestimmte Faktoren, die das Spleißen einer bestimmten prä-mRNA stören könnten, schnell entfernt werden. Als Beispiel könnte der *p14/p16*-Genlocus dienen (Abb. 18). Die beiden Gene codieren für negative Regulatoren des Zellzyklus und der Zellproliferation. *p14* und *p16* bestehen aus drei Exons, wobei Exon 2 und 3 gemeinsam benutzt werden. Beide Gene besitzen ein eigenes erstes Exon und eigene Promotoren. Das erste Exon von *p14* wird als 1 $\beta$ , das von *p16* als 1 $\alpha$  bezeichnet. Der Start der Transkription der *p14*- und *p16*-Gene erfolgt an den unterschiedlichen ersten Exons, die anschließend an das gemeinsame zweite Exon (wenn auch in unterschiedlichen Leserastern) gespleißt werden. Nguyen et al. (2001) haben die Transkription, die Bindung von MeCP2 an die beiden Promotoren und das Exon 2 sowie den Methylierungs- und Histon H3-Acetylierungsstatus im *p14/p16*-Genlocus von drei unterschiedlichen Krebszelllinien (J82, T24, HCT15) und einer Fibroblastenzelllinie (LD419) untersucht. Die beiden Promotoren sowie das Exon 2 liegen in CpG-Inseln, die je nach Zelllinie unterschiedlich stark methyliert sind. In der Zelllinie J82 werden beide Gene transkribiert, besonders stark das *p16*-Gen. Nur das Exon 2 ist mit MeCP2 besetzt. Diese Bindung zeigt, das MeCP2 nicht die transkriptionelle Elongation der beiden stromaufwärts gelegenen, aktiven Promotoren inhibiert und deutet auf andere Funktionen für MeCP2 als die eines transkriptionellen Repressors hin (Nguyen et al., 2001). MeCP2 könnte in diesem Fall an der Bereitstellung von Spleißfaktoren beteiligt sein, die für das korrekte Spleißen von dem *p16*-Transkript notwendig sind. In der Fibroblastenzelllinie LD 419 sind weder die beiden Promotoren noch das Exon 2 von MeCP2 gebunden. Auch hier werden beide Gene transkribiert, das *p16*-Gen jedoch nur sehr schwach. Vielleicht hat die Bindung von MeCP2 an das Exon 2 und somit die Bereitstellung von Spleißfaktoren einen fördernden Einfluß auf die Transkription. Die Abwesenheit von MeCP2 führt umgekehrt zu einer schwachen Transkription des *p16*-Gens. In der Zelllinie T24 wird nur das *p14*-Gen transkribiert. Der *p16*-Promotor und das Exon 2 sind von MeCP2 gebunden. Promotorgebundenen MeCP2 hat hier offensichtlich eher die Funktion des transkriptionellen Repressors. Die Bindung von MeCP2 an das Exon 2 könnte

hier die Funktion des Abziehens von Spleißfaktoren von der *p14*-prä-mRNA haben, um ein effektives Spleißen mit anderen Spleißfaktoren zu gewährleisten. Dadurch könnte auch hier die Transkription des *p14*-Gens gefördert werden. Tatsächlich wird das *p14*-Gen in T24 stark exprimiert. In der vierten Zelllinie, HCT15, werden weder *p14* noch *p16* transkribiert. Beide Promotoren und das Exon 2 sind von MeCP2 gebunden. Auch hier hat MeCP2 eher die Funktion des transkriptionellen Repressors. Möglicherweise gilt dies unter diesen Bedingungen auch für Exon 2-gebundenes MeCP2. In Abwesenheit von Transkription könnte Exon 2-gebundenes MeCP2 die Funktion wechseln und zur Repression beitragen. In der hier vorgestellten Hypothese hat MeCP2 also nicht nur die Funktion eines transkriptionellen Repressors sondern auch die der Regulation der lokalen Konzentration von bestimmten Spleißfaktoren. Somit wäre die Methylierung von DNA nicht nur ein Signal für die transkriptionelle Repression sondern unter bestimmten Umständen (z.B. der Methylierung von Exon- oder Intron-Sequenzen) auch ein Signal für den Spleißvorgang.



**Abb. 18: Der *p14/p16*-Genlocus** (nach Nguyen et al., 2001)

Der *p14/p16* Genlocus enthält zwei verschiedene Promotoren, die den Start der Transkription an den unterschiedlichen ersten Exons initiieren. Die beiden ersten Exons werden anschließend an das gemeinsame zweite Exon (wenn auch in unterschiedlichen Leserastern) gespleißt.

Eine weitere Funktion von MeCP2 könnte im alternativen Spleißen liegen. Für die Entwicklung und Funktion werden insbesondere im Gehirn von Wirbeltieren verschiedene Isoformen von zahlreichen Proteinen (z.B. Ionenkanäle, Neurotransmitter-Rezeptoren) benötigt. Durch alternatives Spleißen können von einem Gen dieser Proteine verschiedene mRNAs produziert werden, die in verschiedenen Teilen und während unterschiedlicher Entwicklungsphasen des Gehirns exprimiert werden. Ein Mechanismus, mit dem alternatives Spleißen reguliert wird, ist die Veränderung der relativen Konzentration von allgemeinen Spleißfaktoren mit entgegengesetzten Wirkungen (Lopez, 1998). MeCP2 wird im Vergleich

zu anderen Geweben besonders stark in den Zellen des Gehirns exprimiert (LaSalle et al., 2001). Die Expression folgt dabei der Ontogenese des Gehirns, wobei MeCP2 besonders stark in ausgereiften Neuronen gebildet wird: MeCP2 wird erst im Rückenmark, dann im Gehirnstamm und erst später im Hippocampus und zuletzt in der Großhirnrinde exprimiert. Auch in der Großhirnrinde selbst folgt das Muster der MeCP2-Expression der Reifung der Neuronen (Shahbazian et al., 2002). Im Gehirn eines erwachsenen Menschen gibt es Zellen, in denen kein MeCP2 gebildet wird, sowie Zellen, die MeCP2 exprimieren. Auch gibt es Unterschiede in der Höhe der Expression unter den MeCP2-positiven Zellen. Die Subpopulationen (Zellen, die MeCP2 stark bzw. schwach exprimieren) können allerdings keinem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden (LaSalle et al., 2001). Durch die hier beschriebene Bindung der WW-Domänen von FBP11 und HYPC könnte MeCP2 einen Einfluß auf die Konzentration dieser beiden Spleißfaktoren in bestimmten Regionen (entsprechend der Methylierung) oder dem gesamten Zellkern haben und somit das Spleißmuster bestimmter Gene beeinflussen. Durch die Expression von MeCP2 insbesondere in vollständig entwickelten Neuronen könnte das Spleißmuster den Bedürfnissen eines ausgereiften Gehirns angepaßt werden. Die unterschiedlichen Konzentrationen von MeCP2 in verschiedenen Zellen könnten die Erfordernisse an die Konzentration von FBP11 und HYPC oder anderen Faktoren widerspiegeln.

Die im Ergebnisteil gemachten Vergleiche zwischen den Genotyp/Phänotyp-Studien von Rett-Patienten und den Bindungsaktivitäten der MeCP2-Deletionsmutanten setzen voraus, daß die mutierten MeCP2-Proteine tatsächlich exprimiert werden. Die Untersuchungen von LaSalle et al. (2001) deuten daraufhin, daß *MECP2*-Mutationen, die zu einem frühen Kettenabbruch führen (R168X), die Expression nicht beeinflussen und entsprechende MeCP2-Fragmente exprimiert werden. In einer Arbeit von Shahbazian et al. (2002) wird die Erzeugung und Analyse einer Maus mit einem Stop-Codon nach Codon 308 des *MECP2*-Gens vorgestellt. Die Maus zeigt einen Rett-ähnlichen Phänotyp und exprimiert das mutierte (verkürzte) MeCP2-Protein. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß viele Rett-Patienten mutiertes MeCP2 exprimieren.

Die oben genannten Vergleiche deuten an, daß die WW-Domänen-Bindungsaktivität der MeCP2-Mutanten mit dem Genotyp/Phänotyp entsprechender Rett-Patienten korreliert. Handelt es sich tatsächlich um eine echte Korrelation (nicht um eine zufällige) könnte eine gestörte Bindung der WW-Domänen von FBP11 und HYPC (oder anderer Proteine) an MeCP2 an der Ausbildung des Rett-Phänotyps beteiligt sein. Entsprechend den oben dargestellten Hypothesen würden solche Patienten ein im Vergleich zu gesunden Menschen

verändertes Spleißmuster aufweisen, das mit der Funktion eines ausgereiften Gehirns nicht vereinbar ist. In der Einleitung wurden zwei Theorien vorgestellt (Carter und Segal, 2001), die erklären, warum vor allem das Gehirn durch *MECP2*-Mutationen betroffen zu sein scheint, obwohl MeCP2 auch in zahlreichen anderen Geweben exprimiert wird (Reichwald et al. 2000). Eine der beiden besagt, daß MeCP2 im Gehirn spezifisch die Expression der Gene kontrolliert, die für die Funktionen der Neuronen wichtig sind. In anderen Geweben könnten diese Gene durch andere Mechanismen gänzlich ausgeschaltet sein, da sie ohnehin nicht gebraucht werden. Durch eine *MECP2*-Mutation würde es dann zu einer unkontrollierten Expression bestimmter Gene im Gehirn kommen. Diese Hypothese bezieht sich auf MeCP2 als transkriptionellen Repressor. Durch die vorliegende Arbeit könnte die Hypothese um die möglichen Wirkungen, die MeCP2 aufs Spleißen hat, erweitert werden. Während der Entwicklung von Säugetieren spielt alternatives Spleißen insbesondere im Gehirn eine wichtige Rolle. Durch MeCP2 könnte zum Abschluß der Entwicklung das Spleißmuster den Bedürfnissen eines ausgereiften Gehirns angepaßt werden. Durch *MECP2*-Mutationen könnte diese Anpassung verhindert oder gestört sein, so daß es zu einer unkontrollierten Spleißaktivität im Gehirn kommt. Dieser Zustand könnte (neben der oben dargestellten Störung der transkriptionellen Repression) zur Ausprägung des Rett-Syndroms beitragen.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Methyl-CpG-Bindungsprotein 2 (MeCP2) ist das Gründungsmitglied einer Proteinfamilie, deren Mitglieder alle eine Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) aufweisen. Die anderen Mitglieder sind die Proteine MBD1, 2, 3 und 4. Humanes MeCP2 besteht aus 486 Aminosäuren und besitzt zwei funktionelle Domänen: Die Methyl-CpG-Bindungsdomäne im N-Terminus des Proteins bindet an symmetrisch methylierte CpGs innerhalb einer DNA-Sequenz. Die zweite funktionelle Domäne von MeCP2 ist die transkriptionelle Repressordomäne (TRD) im Zentrum des Proteins. Die TRD interagiert mit dem Corepressor mSin3A (mammalian SWI independent). Durch mSin3A werden die Histondeacetylasen 1 und 2 gebunden. Es wird angenommen, daß MeCP2 mittels mSin3A die Histondeacetylasen 1 und 2 zu methylierten Promotoren rekrutiert. Dies führt zu einer lokalen Deacetylierung der in den Nukleosomen vorhandenen Histonen (und möglicherweise auch anderer Proteine) und somit zu einer kompakten Chromatinstruktur, die für die Transkriptionsmaschinerie nicht mehr zugänglich ist. MeCP2 verbindet auf diese Weise zwei generelle Mechanismen der Genregulation, DNA-Methylierung und Histondeacetylierung. Es gibt jedoch auch eine transkriptionelle Repression durch MeCP2, die unabhängig von Histondeacetylierung stattfindet. Der genaue molekulare Mechanismus des Histondeacetylase-unabhängigen Weges der transkriptionellen Repression ist noch nicht klar definiert; möglicherweise aber spielt die Interaktion von MeCP2 mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor IIB eine Rolle. Die Proteine MBD1, 2 und 3 wurden wie MeCP2 mit der Repression der Transkription in Verbindung gebracht, während MBD4 an der Reparatur von TG-Mismatches (TG/CG) beteiligt ist, welche durch Desaminierung von Methylcytosin zu Thymin entstehen. Die Methylierung genomischer DNA-Sequenzen spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Säugetieren und ist entscheidend für Vorgänge wie der transkriptionellen Repression von Genaktivität, der Inaktivierung parasitärer Elemente im Genom, genomisches Imprinting, der Inaktivierung des X-Chromosoms und Krebs.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Proteininteraktionspartner von humanem MeCP2 durch Anwendung der Hefe two-hybrid-Technik. Zwei cDNA-Bibliotheken (Hippocampus- und HeLa-cDNA-Bibliothek) wurden mit zwei verschiedenen C-terminalen MeCP2-Fragmenten (aa 196-486 und aa 311-486) gescreent. Der Abschnitt aa 311-486 enthält zwei stark konservierte Regionen im C-Terminus (aa 404-438, aa 455-486). Das MeCP2-Fragment aa 196-486 enthält darüber hinaus die transkriptionelle Repressordomäne. Durch die Hefe two-hybrid-Screens konnten weder neue noch bekannte (z.B. mSin3A, TFIIB)

Interaktionspartner gefunden werden. Die beiden bekannten Interaktionen von MeCP2 mit dem Corepressor mSin3A bzw. dem Spleißfaktor FBP11 konnten durch Hefe und mammalian two-hybrid-assays nicht gezeigt werden. Auch durch immuncytologische Untersuchungen ließen sich keine Interaktionspartner von MeCP2 nachweisen.

Daher konzentrierte sich die Arbeit auf die wenig charakterisierte Interaktion von MeCP2 mit den WW-Domänen von FBP11 (formin binding protein 11) und auf die WW-Domänen des Proteins HYPC (huntingtin yeast partner C). FBP11 und HYPC, beides Spleißfaktoren, besitzen je zwei WW-Domänen in ihren N-Termini. Jede WW-Domäne besteht aus 26 Aminosäuren mit zwei stark konservierten Tryptophan-Resten N- und C-terminal. Außerdem befindet sich C-terminal ein stark konservierter Prolin-Rest. WW-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen. Durch GST-pull down-Experimente konnte die Interaktion von MeCP2 mit den WW-Domänen von FBP11 bestätigt und außerdem eine Bindung der WW-Domänen von HYPC an MeCP2 festgestellt werden. Durch Coimmunpräzipitation mit transfizierten HEK293-Zellen konnten diese Interaktionen auch *in vivo* gezeigt werden. Des weiteren konnte durch GST pull down-Experimente die Interaktionsregion innerhalb von MeCP2 mit den WW-Domänen von FBP11 und HYPC bestimmt werden (WDR, WW domain-binding region). Sie befindet sich im C-Terminus und erstreckt sich von aa 311 bis aa 486. Die WDR stellt eine eigenständige Domäne dar und ist für eine effiziente Bindung der WW-Domänen von FBP11 und HYPC verantwortlich.

Mutationen im *MECP2*-Gen sind die Ursache einer neurologischen Entwicklungsstörung, dem Rett-Syndrom, von dem vor allem Mädchen betroffen sind. Es tritt mit einer Häufigkeit von 1 Fall auf 10000 bis 15000 weiblichen Neugeborenen auf. Die Patientinnen entwickeln sich (aus klinischer Sicht) in den ersten 6 bis 18 Lebensmonaten normal. Es folgt eine Phase der Verschlechterung, in der es zur mentalen Retardierung der Patientin und zu einem Verlust bereits erworbener Fähigkeiten, beispielsweise dem Sprechen bereits erlernter Wörter, dem Ausführen von bestimmten Handbewegungen oder sozial-kommunikativen Fähigkeiten kommt. Es entwickeln sich stereotype Bewegungen, die während der gesamten Wachperiode ausgeführt werden (z.B. eine Bewegung, die dem Händewaschen gleicht). Außerdem kommt es zu Krämpfen, Atemproblemen, Verstopfung, Skoliose und Wachstumsstillstand. Ab dem zweiten Lebensjahr folgt eine Phase des relativen Stillstandes, die während des ganzen Erwachsenenlebens anhält.

Im C-Terminus von MeCP2 befindet sich eine Prolin-reiche Region, in der häufig frameshift-Mutationen, die das Rett-Syndrom verursachen, gefunden werden (frameshift cluster region, FSCR, aa 366-398). Die frameshifts werden durch Deletionen und/oder Insertionen

verursacht, die zu kurzen Abschnitten falscher Aminosäuresequenzen und einem Stopp bei aa 392, 404 oder 408 führen. C-terminal der FSCR werden nur selten Mutationen gefunden. Eine dieser Mutationen ist ein frameshift an Position aa 436, der ebenfalls klassisches Rett-Syndrom verursacht. Durch den Vergleich von publizierten Genotyp/Phänotyp-Studien mit der Fähigkeit von C-terminalen MeCP2-Deletionsmutanten die WW-Domänen von FBP11 bzw. HYPIC zu binden, ergaben sich erste Hinweise, daß die WW-Domänen-Bindungsaktivität der MeCP2-Mutanten mit dem Genotyp/Phänotyp entsprechender Rett-Patienten korrelieren könnte: Im Gegensatz zu volle Länge-MeCP2 wurden die beiden C-terminalen Deletionsmutanten (aa 1-400 und aa 1-438) nicht an die WW-Domänen von FBP11 und HYPIC *in vitro* gebunden. *In vivo* konnte nur noch eine geschwächte Bindungsaktivität festgestellt werden (aa 1-438) bzw. fast keine Bindung mehr detektiert werden (aa 1-400). Durch die Fortführung dieser Untersuchungen könnte die molekulare Entstehung des Rett-Phänotyps möglicherweise besser verstanden werden.

In sechs Rett-Patienten, deren Blutproben zur Verfügung standen, wurden Mutationen im *MECP2*-Gen gefunden. Es wurden zwei missense- und drei nonsense-Mutationen (jeweils Punktmutationen) sowie eine Deletion verbunden mit einer Insertion identifiziert. Ein (nicht pathogener) Polymorphismus (A201V) wurde ebenfalls gefunden. Die missense-Mutationen (T158M, P152R) und die nonsense-Mutationen (R255X, R270X, R294X) wurden bisher in zahlreichen anderen Patientinnen detektiert. Der Polymorphismus wurde ebenfalls schon beschrieben, die Deletion/Insertion (635del 21bp + ins 7bp; 212 shift, stop at 235) hingegen noch nicht.

## 6 LITERATUR

- Abovich, N., und Rosbash, M. (1997) Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals. *Cell* **89**, 403-412.
- Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., und Zoghbi, H.Y. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* **23**, 185-188.
- Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Schulz, 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**, 670-679.
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S.J., und Karin, M (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3094-3102.
- Ayer, E.A., Lawrence, Q.A., und Eisenman, R.N. (1995) Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* **80**, 767-776.
- Ballestar, E., Yusufzai, T.M., und Wolffe, A.P. (2000) Effects of Rett syndrome mutations of the methyl-CpG binding domain of the transcriptional repressor MeCP2 on selectivity for association with methylated DNA. *Biochemistry* **39**, 7100-7106.
- Baumann, M.L., Kemper, T.L., und Arin, D.M. (1995) Microscopic observations of the brain in Rett syndrome. *Neuropediatrics* **26**, 105-108.
- Bedford, M.T., Chan, D.C., und Leder, P. (1997) FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *EMBO J.* **16**, 2376-2383.
- Bedford, M.T., Sarbassova, D., Xu, J., Leder, P., und Yaffe, M.B. (2000) A novel Pro-Arg motif recognized by WW Domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 10359-10369.
- Bednarek, A.K., Laflin, K.L., Daniel, R.L., Liao, Q., Hawkins, K.A., and Aldaz, C.M. (2000) WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res.* **60**, 2140-2145.
- Belichenko, P.V., Oldfors, A., Hagberg, B., und Dahlström, A. (1994) Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. *NeuroReport* **5**, 1509-1513.
- Bellacosa, A., Cicchillitti, L., Schepis, F., Riccio, A., Yeung, A.T., Matsumoto, Y., Golemis, E.A., Genuardi, M., und Neri, G. (1999) MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 3969-3974.
- 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**, 1377-1384.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Boeke, J., Ammerpohl, O., Kegel, S., Moehren, U., und Renkawitz, R. (2000) The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the Methyl-CpG binding domain and binds directly to Sin3A. *J. Biol. Chem.* **275**, 34963-34967

Brunner, E., Weitzel, J., Heitmann, B., Maurer, T., Strätling, W.H., und Kalbitzer, H.S. (2000) Letter to the Editor: Sequence-specific  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  assignments of the MAR-binding domain of chicken MeCP2/ARBP. *J. Biomol. NMR* **17**, 175-176.

Buhrmester, H., von Kries, J.P., und Strätling, W.H. (1995) Nuclear matrix protein ARBP recognizes a novel DNA sequence motif with high affinity. *Biochemistry* **34**, 4108-4117.

Carter, A.R., und Segal, R.A. (2001) Rett syndrome model suggests MeCP2 gives neurons the quiet they need to think. *Nature neuroscience* **4**, 342-343.

Cross, S.H., Meehan, R.R., und Bird, A. (1997) A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with a DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat. Genet.* **16**, 256-259.

Chan, C.C., Bedford, M.T., und Leder, P. (1996) Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J.* **15**, 1045-1054.

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**, 7008-7018.

Cheadle, P.C., Gill, H., Fleming, N., Maynard, J., Kerr, A., Leonard, H., Krawczak, M., Cooper, D.N., Lynch, S., Thomas, N., Hughes, H., Hulten, M., Ravine, D., Sampson, J.R., und Clarke, A. (2000) Long-read sequence analysis of the *MECP2* gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1119-1129.

Chen, J.D., und Evans, R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-457.

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. *Nature Genet.* **27**, 327-331.

Clayton-Smith, J., Watson, P., Ramsden, S., und Black, G.C.M. (2000) Somatic mutations in MeCP2 as a non fatal neurodevelopmental disorder in males. *Lancet* **356**, 830-832.

Craven, R.C., Harty, R.N., Paragas, J., Palese, P., und Willis, J.W. (1999) Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras. *J. Virol.* **73**, 3359-3365.

- Coy, J.F., Sedlacek, Z., Bächner, D., Delius, H., und Poustka, A. (1999) A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'- untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (*MECP2*) suggests a regulatory role in gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1253-1262.
- Dintilhac, A., und Bernués, J. (2001) HMGB1 interacts with many apparently unrelated proteins by recognizing short amino acid sequences. *J. Biol. Chem.* **277**, 7021-7028.
- Dragich, J., Houwink-Manville, I., und Schanen, C. (2000) Rett syndrome: a surprising result of mutation in *MeCP2*. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2365-2375.
- Eggert, M., Michel, J., Schneider, S., Bornfleth, H., Baniahmad, A., Fackelmayer, F.O., Schmidt, S., und Renkawitz, R. (1997) The glucocorticoid receptor is associated with the RNA-binding nuclear matrix protein hnRNP U. *J. Biol. Chem.* **272**, 28471-28478.
- Feng, Q., und Zhang, Y. (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev.* **15**, 827-832.
- Faber, P.W., Barnes, G.T., Srinidhi, J., Chen, J., Gusella, J.F., und MacDonald, M.E. (1998) Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1463-1474.
- Fields, S., und Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fujita, N., Takebayashi, S.-I., Okumura, K., Kudo, S., Chiba, T., Saya, H., und Nakao, M. (1999) Methylation-mediated transcriptional silencing in euchromatin by methyl-CpG binding protein MBD1 isoforms. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6415-6426.
- Gavva, N.R., Gavva, R., Ermekova, K., Sudol, M., und Shen, C.J. (1997) Interaction of WW domains with hematopoietic transcription factor p45/NF-E2 and RNA-Polymerase II. *J. Biol. Chem.* **272**, 24105-24108.
- Girard, M., Couvert, P., Carrie, A., Tardieu, M., Celly, J., Beldjord, C., und Bienvenu, T. (2001) Parental origin of de novo *MECP2* mutations in Rett syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **9**, 231-236.
- 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.
- Guenther, M.G., Lane, W.S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M.A., und Shiekhata, R. (2000) A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev.* **14**, 1048-1057.
- Gupta, A.K., Drazba, J.A., und Banerjee, A.K. (1998) Specific interactions of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle U with the leader RNA sequence of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **72**, 8532-8540.
- 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. *Nature Genet.* **27**, 322-326.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**, 557-580.

Hannon, G. J., Casso, D., und Beach, D. (1994) KAP: A dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. **91**, 1731-1735.

Harty, R.N., Paragas, J., Sudol, M., und Palese, P. (1999) A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. J. Virol. **73**, 2921-2929.

Hendrich, B., und Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. Mol. Cell. Biol. **18**, 6538-6547.

Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.-H., Jiricny, J., und Bird, A. (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. Nature **401**, 301-304.

Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A., und Bird, A. (2001) Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. Genes Dev. **15**, 710-723

Hörlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., und Rosenfeld, M.G. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature **377**, 397-404.

Huppke, P., Laccone, F., Krämer, N., Engel, W., und Hanefeld, F (2000) Rett syndrome: analysis of *MECP2* and clinical characterization of 31 patients. Hum. Mol. Genet. **9**, 1369-1375.

Huang, E.Y., Zhang, J., Miska, E.A., Guenther, M.G., Kouzarides, T., und Lazar, M.A. (2000) Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. Genes Dev. **14**, 45-54.

Inui, K., Akagi, M., Ono, J., Tsukamoto, H., Shimono, K., Mano, T., Imai, K., Yamada, M., Muramatsu, T., Sakai, N., und Okada, S. (2001) Mutational analysis of *MECP2* in japanese patients with atypical Rett syndrome. Brain Dev. **23**, 212-215.

Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., und Wolffe, A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat. Genet. **19**, 187-191.

Kaludov, N.K., und Wolffe, A.P. (2000) MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. Nucleic Acids Res. **28**, 1921-1928.

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.

Koa, H.-Y., und Siliciano, P.G. (1996) Identification of Prp40, a novel essential yeast splicing factor associated with U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 960-967.

Kasten, M.M., Ayer, D.E., und Stillman, D.J. (1996) *SIN3*-dependent transcriptional repression by interaction with the Mad1 DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4215-4221.

Knoepfler, P.S., und Eisenman, R.N. (1999) Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* **99**, 447-450.

Kokura, K., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Nomura, T., Khan, M.M., Shinagawa, T., Yasukawa, T., Colmenares, C., und Ishii, S. (2001) The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* **270**, 34115-34121.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lander et al. (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.

LaSalle, J.M., Goldstine, J., Balmer, D., und Greco, C.M. (2001) Quantitative localization of heterogeneous methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) expression phenotypes in normal and Rett syndrome brain by laser scanning cytometry. *Hum Mol. Genet.* **10**, 1729-1740.

Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., und Bird, A. (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69**, 905-914.

Li, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J.M., Qin, J., und Wong, J. (2000) Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in a large protein complex containing HDAC3. *EMBO J.* **19**, 4342-4350

Liu, J., Barnett, A., Neufeld, E.J., und Dudley, J.P. (1999) Homeoproteins CDP and SATB1 interact: potential tissue-specific regulation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4918-4926.

Lopez, A.J. (1998) Alternative splicing of pre-mRNA: Developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 279-305.

Macias, M.J., Hyvönen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., und Oschkinat, H. (1996) Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* **382**, 646-649.

Macias, M.J., Wiesner, S., und Sudol, M. (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS L.* **513**, 30-37.

Malik, K.F., Jaffe, H., Brady, J., und Young, W.S. (1997) The class III POU factor Brn-4 interacts with other class III factors and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle U. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **45**, 99-107.



- Marsolier, M.-C, Prioleau, M.-N., und Sentenac, A. (1997) A RNA polymerase III-based two-hybrid system to study RNA polymerase II transcriptional regulators. *J. Mol Biol.* **268**, 243-249.
- Meehan, R.R., Lewis, L.D., McKay, S., Kleiner, E.L., und Bird, A. (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* **58**, 499-507.
- Morris, D.P., und Greenleaf, A.L. (2000) The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **275**, 39935-39943.
- Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L., und Evans, R.M. (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**, 373-380.
- Nan, X., Tate, P., Li, E., und Bird, A. (1996) DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 414-421.
- Nan, X., Campoy, F.J., und Bird, A. (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**, 471-481.
- Nan, X., Meehan, R.R., und Bird, A. (1993) Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4886-4892.
- Nan, X., Ng, H.-H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., und Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389.
- Nayler, O., Strätling, W.H., Bourquin, J.-P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A.M., Fackelmayer, F.O., Ullrich, A., und Stamm, S. (1998) SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3542-3549.
- Ng, H.-H., Jeppesen, P., und Bird, A. (2000) Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1394-1406.
- 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. *Nature Genet.* **23**, 58-61.
- Nguyen, C.T., Gonzales, F.A., und Jones, P.A. (2001) Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4598-4606.
- Nomura, T., Khan, M.M., Kaul, S.C., Dong, H.-D., Wadhwa, R., Colmenares, C., Kohno, I., und Ishii, S. (1999) Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev.* **13**, 412-423.
- Orrico, A., Lam, C.-W., Galli, L., Dotti, M.T., Hayek, G., Tong, S.-F., Poon, P.M.K., Zappella, M., Federico, A., und Sorrentino, V. (2000) *MECP2* mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS L.* **481**, 285-288.

Oesterreich, S., Lee, A.V., Sullivan, T.M., Samuel, S.K., Davie, J.R., und Fuqua, S.A.W. (1997) Novel nuclear matrix protein HET binds to and influences activity of the HSP27 promotor in human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **67**, 275-286.

Passani, L.A., Bedford, M.T., Faber, P.W., McGinnis, K.M., Sharp, A.H., Gusella, J.F., Vonsattel, J.-P., und MacDonald, M.E. (2000) Huntingtin's WW domain partners in Huntington's disease post-mortem brain fulfill genetic criteria for direct involvement in Huntington's disease pathogenesis. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2175-2182.

Pestic-Dragovich, L., Stojiljkovic, L., Philimonenko, A.A., Nowak, G., Ke, Y., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hozak, P., und de Lanerolle, P. (2000) A myosin I isoform in the nucleus. *Nature* **290**, 337-341.

Petrascheck, M., Castagna, F., und Barberis, A. (2001) Two-hybrid selection assay to identify proteins interacting with polymerase II transcriptional factors and regulators. *Biotechniques* **30**, 296-298.

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**, 10735-10742.

Ranganathan, R., Lu Ping, K., Hunter, T., und Noel, J.P. (1997) Structural und functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* **89**, 875-886.

Reichwald, K., Thiesen, J., Wiehe, T., Weitzel, J., Strätling, W.H., Kioschis, P., Poustka, A., Rosenthal, A., und Platzer, M. (2000) Comparative sequence analysis of the *MECP2*-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mamm. Genome*. **11**, 182-190.

Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M.T., Espanel, X., und Sudol, M. (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol. Chem.* **380**, 431-442.

Rett, A. (1966) Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. *Wiener medizinische Wochenschrift* **37**, 723-726.

Schreiber-Agus, N., Chin, L., Chen, K., Torres, R., Rao, G., Guida, P., Skoultschi, A.I., und DePinho, R.A. (1995) An amino-terminal domain of Mxi1 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3. *Cell* **80**, 777-786.

(a) Shahbazian, M.D., Antalffy, B., Armstrong, D.L. und Zoghbi, H.Y. (2002) Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 115-124.

(b) Shahbazian, M.D., Yound, J.I., Yuva-Paylor, L.A., Spencer, C.M., Antalffy, B.A., Noebels, J.L., Armstrong, D.L., Paylor, R., und Zoghbi, H.Y. (2002) Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* **35**, 243-254.

- Shen, M., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W., and Lu, K.P. (1998) The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.* **12**, 706-720.
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., and Rotin, D. (1996) WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.* **15**, 2371-2380.
- Stief, A., Winter, D.M., Strätling, W.H., and Sippel, A.E. (1987) A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* **341**, 343-345.
- Sudol, M., Sliwa, K., and Russo, T. (2001) Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Letters* **490**, 190-195.
- Sudol, M., and Hunter, T. (2000) New wrinkles for an old domain. *Cell* **103**, 1001-1004.
- Tate, P., Skarnes, W., and Bird, A. (1996) The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nat. Genet.* **12**, 205-208.
- Tatematsu, K., Yamazaki, T., and Ishikawa, F. (2000) MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes to Cells* **5**, 677-688.
- Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., and Schreiber, S.L. (1998) Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodeling complex. *Nature* **395**, 917-921.
- Trappe, R., Laccone, F., Cobilanschi, J., Meins, M., Huppke, F., Hanefeld, F., and Engel, W. (2001) *MECP2* mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 1093-1101.
- Tsai, S.-C., Valkov, N., Yang, W.-M., Gump, J., Sullivan, D., and Seto, E. (2000) Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat. Genet.* **26**, 349-353.
- Valcárcel, J., Singh, R., Zamore, P.D., and Green, M.R. (1993) The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of *transformer* pre-mRNA. *Nature* **362**, 171-175.
- Van den Veyver, I.B., and Zoghbi, H.Y. (2000) Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 275-279.
- Villard, L., Kpebe, A., Cardoso, C., Chelly, J., Tardieu, M., and Fontes, M. (2000) Two affected boys in a Rett syndrome family. *Neurology* **55**, 1188-1193.
- von Kries, J.P., Buhrmester, H., and Strätling, W.H. (1991) A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell* **64**, 123-135.
- Wade, P.A., Jones, P.L., Vermaak, D., and Wolffe, A.P. (1998) A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr. Biol.* **8**, 843-846.

Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F., und Wolffe, A.P. (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodeling and histone deacetylase activity. *Nat. Genet.* **23**, 62-66.

Wakefield, R.I., Smith, B.O., Nan, X., Free, A., Soteriou, A., Uhrin, D., Bird, A.P., und Barlow, P.N. (1999) The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA. *J. Mol. Biol.* **291**, 1055-1065.

Walhout, A.J.M., Sordella, R., Lu, X., Hartley, J.L., Temple, G.F., Brasch, M.A., Thierry-Mieg, N., und Vidal, M. (2000) Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* **287**, 116-122.

Wan, M., Lee, S.S.J., Zhang, X., Houwink-Manville, I., Song, H.-R., Amir, R.E., Budden, S., Naidu, S., Pereira, J.L.P., Lo, I.F.M., Zoghbi, H.Y., Schanen, N.C., und Francke, U. (1999) Rett syndrome and beyond: Recurrent spontaneous and familial *MECP2* mutations at CpG hotspots. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1520-1529.

Wang, H.Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C., und Fu, X.D. (1998) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **140**, 737-750.

Waragai, M., Lammers, C.-H., Takeuchi, S., Imafuku, I., Udagawa, Y., Kanazawa, I., Kawabata, M., Mouradian, M.M., und Okazawa, H. (1999) PQBP1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 977-987.

Weitzel, J.M., Buhrmester, H., und Strätling, W.H. (1997) Chicken MAR-binding protein ARBP is homologous to rat methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5656-5666.

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**, 5500-5510.

Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Gote, J., und Wang, W. (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell* **2**, 851-861.

Yagi, R., Chen, L.F., Shigesada, K., Murakami, Y., und Ito, Y. (1999) A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J.* **18**, 2551-2562.

Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X.Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.U., Xu, J., Kirschner, M.W., Fischer, G., Cantley, L.C., und Lu, K.P. (1997) Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* **278**, 1957-60.

Yu, F. (2002) Untersuchungen zur Repressoraktivität des humanen Kernproteins MeCP2 (Methyl-CpG-Bindungsprotein 2). Doktorarbeit

Yu, F., und Strätling, W.H. (1999) Origin and roles of nuclear matrix proteins. Specific functions of the MAR-binding protein MeCP2/ARBP. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **9**, 311-318.

Yu, F., Thiesen, J., und Strätling, W.H. (2000) Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2201-2206.

Yu, F., Zingler, N., Schumann, G., und Strätling, W.H. (2001) Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4493-4501.

Zeller, R., Haramis, A.G., Zuniga, A., McGuigan, C., Dono, R., Davidson, G., Chabanis, S., und Gibson, T. (1999) Formin defines a large family of morphoregulatory genes and functions in establishment of the polarising region. *Cell Tissue Res.* **296**, 85-93.

Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S., und Reinberg, D. (1998) The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* **95**, 279-289.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

|                |   |
|----------------|---|
| aa             | amino acids                                     |
| ADH1           | Alkohol-Dehydrogenase1                          |
| ARBP           | attachment region binding protein               |
| 3-AT           | 3-Amino-1,2,4-triazol                           |
| b              | Base(n)   |
| bp             | Basenpaar(e)                                    |
| BSA            | Rinderserumalbumin                              |
| cDNA           | komplementäre DNA                               |
| CDP            | CCAAT displacement protein                      |
| CR             | conserved region                                |
| Cre/loxP       | causes recombination/locus of crossing over     |
| CTD            | carboxyterminale Domäne                         |
| DABCO          | 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan                    |
| DAPI           | 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid      |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid                                |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure                          |
| dNTP           | Desoxynukleotidtriphosphat                      |
| DTT            | 1,4-Dithiothreitol                              |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                         |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure                    |
| FBP11          | formin binding protein 11                       |
| FBP21          | formin binding protein 21                       |
| FBP11(WW)      | WW-Domänen von FBP11                            |
| FBP21(WW)      | WW-Domänen von FBP21                            |
| FCS            | fötales Kälberserum                             |
| g              | Erdbeschleunigung                               |
| Gal4-AD        | Gal4-Aktivierungsdomäne                         |
| Gal4-BD        | Gal4-DNA-Bindungsdomäne                         |
| GST            | Glutathion-S-Transferase                        |
| h              | Stunde(n)                                       |
| HDAC           | histone deacetylase                             |
| HEPES          | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure |
| hMeCP2         | human methyl-CpG-binding protein 2              |
| HMGB1          | High Mobility Group protein 1                   |
| hnRNP          | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein         |
| HRP            | horseradish peroxidase                          |
| HYP A          | huntingtin yeast partner A                      |
| HYP C          | huntingtin yeast partner C                      |
| HYP C(WW)      | WW-Domänen von HYP C                            |
| IPTG           | Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid        |
| Kbp            | Kilobasenpaare                                  |
| Kb             | Kilobasen                                       |
| kD             | Kilodalton                                      |
| LB             | Luria-Bertani                                   |
| LINE           | long interspersed element                       |
| LTR            | long terminal repeat                            |
| l              | Liter   |

|         |  |
|---------|--|
| M       | molar  |
| MAR     | matrix attachment region                                     |
| MBD     | methyl-CpG-binding domain                                    |
| min     | Minute(n)  |
| ml      | Milliliter   |
| mM      | millimolar   |
| MOPS    | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure                            |
| mSin3A  | mammalian SWI independent                                    |
| N-CoR   | nuclear receptor co-repressor                                |
| NLS     | nuclear localisation signal                                  |
| NuRD    | nucleosome remodelling and histone deacetylation             |
| PAGE    | Polyacrylamid gelelektrophorese                              |
| PBS     | phosphate buffered saline                                    |
| PCR     | polymerase chain reaction                                    |
| PR      | Prolin-reiche region   |
| RbAp 46 | retinoblastoma protein-associated protein 46                 |
| RbAp 48 | retinoblastoma protein-associated protein 48                 |
| RNA     | Ribonukleinsäure   |
| RNase   | Ribonuklease   |
| SAF     | scaffold attachment factor                                   |
| SAP18   | silencer associated protein 18                               |
| SAP30   | silencer associated protein 30                               |
| SAR     | scaffold-assisted region                                     |
| SATB1   | special AT-rich sequence binding protein 1                   |
| sec     | Sekunde  |
| SMRT    | silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor |
| snRNP   | small nuclear ribonucleoprotein particle                     |
| SH3     | Src homology regions 3                                       |
| SV      | Simian Virus   |
| Upm     | Umdrehungen pro Minute                                       |
| SDS     | sodium dodecylsulfate  |
| TEMED   | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin                             |
| TRD     | transkriptionelle Repressordomäne                            |
| Tris    | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan                              |
| TSA     | Trichostatin A   |
| U       | Unit(s)  |
| UAS     | Upstream-Aktivatorsequenz                                    |
| UKE     | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf                       |
| ÜKS     | Überkopfschüttler  |
| UV      | ultraviolettes Licht   |
| X-Gal   | 5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid          |
| YY1     | Yin-Yang 1   |

## **7.2 Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1998 bis Juni 2002 am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Strätling angefertigt.

Mein Dank gilt :

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

Herrn Prof. Dr. Hagen Bretting für die Vertretung meiner Arbeit gegenüber dem Fachbereich Biologie.

Prof. Dr. Stefan Stamm für die lehrreiche Zeit in seinem Labor.

Dr. Joachim Weitzel, Dr. Jens Thiesen, Dr. Fang Yu, Christoph Koch, Olaf Frieze und Susanne Giehler für fruchtbare Diskussionen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Allen Kollegen am Institut für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern, meinem Bruder, meinen Schwiegereltern und insbesondere meiner Frau für die große Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit.