

## 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-Mismatchen (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.