

**Molekulargenetische und zellphysiologische  
Charakterisierung einer autosomal-rezessiven Erkrankung  
mit Chromosomenkondensationsstörung**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin  
im Dezember 2005

vorgelegt von Dipl. Biochem. Marc Trimborn

Angefertigt am Institut für Humangenetik, Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Heidemarie Neitzel  
Charité-Universitätsmedizin  
Institut für Humangenetik  
Augustenburger Platz 1  
13353 Berlin
2. Prof. Dr. Volker Erdmann  
Freie Universität Berlin  
Institut für Chemie - Biochemie  
Thielallee 63  
14195 Berlin

Disputation am 17.11.06

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	DER ZELLZYKLUS UND ZELLZYKLUSKONTROLLE .....	1
1.2	DIE MITOTISCHEN PHASEN .....	4
1.3	CHROMOSOMENKONDENSATION .....	6
1.3.1	<i>Strukturelle Modelle der Metaphasechromosomen</i> .....	8
1.3.2	<i>Molekulare Regulatoren und Elemente der Chromosomenkondensation</i> .....	9
1.3.2.1	Topoisomerase II (TopoII) .....	9
1.3.2.2	Die Condensinkomplexe .....	10
1.3.2.3	Cohesin und weitere Kohäsionsfaktoren .....	11
1.3.2.4	Weitere potentielle Regulatoren der Chromosomenkondensation .....	12
1.4	PCC SYNDROM .....	14
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	17
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
2.1	GERÄTE .....	18
2.1.1	<i>Zentrifugen</i> .....	18
2.1.2	<i>Mikroskope</i> .....	18
2.1.3	<i>Elektrophorese und Westernblot</i> .....	18
2.1.4	<i>PCR</i> .....	18
2.1.5	<i>Sequenzierung</i> .....	18
2.1.6	<i>Zellkultur</i> .....	18
2.1.7	<i>Sonstige Geräte</i> .....	18
2.1.8	<i>Software</i> .....	19
2.2	VERBRAUCHSMATERIAL UND REAGENZIEN .....	19
2.2.1	<i>Antikörper</i> .....	19
2.2.2	<i>Primer</i> .....	20
2.2.3	<i>siRNA Duplexe</i> .....	20
2.2.4	<i>Vektoren</i> .....	20
2.2.5	<i>Chemikalien und Reagenzien</i> .....	20
2.2.6	<i>Längen und Größenstandards</i> .....	20
2.2.7	<i>Enzyme</i> .....	21
2.2.8	<i>Kits</i> .....	21
2.2.9	<i>Säulen</i> .....	21
2.2.10	<i>Westernblot</i> .....	21
2.2.11	<i>Zellen</i> .....	21
2.2.12	<i>Zellkulturmedien</i> .....	22
2.2.13	<i>Zellkulturmaterial</i> .....	22
2.2.14	<i>Standardpuffer, -Lösungen und -Medien</i> .....	22
2.2.15	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	22
2.2.16	<i>Sonstiges</i> .....	23
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	23
2.3.1	<i>DNA-Präparation</i> .....	23
2.3.2	<i>RNA-Präparation</i> .....	23
2.3.3	<i>cDNA-Synthese</i> .....	23
2.3.4	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i> .....	23
2.3.5	<i>Single Strand conformational Polymorphism (SSCP) - Analyse</i> .....	24
2.3.6	<i>Sequenzierung</i> .....	25
2.3.7	<i>SNP (single nucleotide polymorphism)-Analyse</i> .....	25
2.3.8	<i>Mikrosatellitenanalyse</i> .....	25
2.3.9	<i>Quantitative Real-Time PCR</i> .....	26
2.3.10	<i>PCR-Klonierung</i> .....	26
2.3.11	<i>Restriktionsverdau</i> .....	26
2.3.12	<i>Ligation</i> .....	26
2.3.13	<i>Transformation, Auswahl positiver Klone und Plasmidpräparation</i> .....	26
2.3.14	<i>Gerichtete Mutagenese</i> .....	27
2.3.15	<i>Yeast-two-Hybrid-Screen (Y2H)</i> .....	27

2.3.16	<i>Klonierung der MCPH1-Fragmente in die Y2H-Vektoren.....</i>	28
2.4	PROTEINANALYSEN .....	29
2.4.1	<i>Herstellung der Proteinlysate.....</i>	29
2.4.2	<i>SDS-Gelelektrophorese und Westernblot.....</i>	30
2.5	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	30
2.5.1	Zellkultur .....	30
2.5.1.1	Aktivierung von T-Lymphozyten.....	30
2.5.1.2	Suspensionskulturen (LCLs) .....	30
2.5.1.3	Adhäsionskulturen (Fibroblasten) .....	31
2.5.1.4	Anlage und Präparation von Chorionzottenkulturen.....	31
2.5.1.5	Transformation von B-Lymphozyten durch B95-8 EBV .....	31
2.5.1.6	Kultivierung der lymphoiden Starterzelllinie B95-8 und Aufreinigung des Epstein-Barr-Virus-haltigen Mediums .....	32
2.5.1.7	Ficollseparation mononucleärer Lymphozyten aus einer Vollblutprobe.....	32
2.5.1.8	Etablierung der lymphoblastoiden Zellkulturen (LCLs) .....	32
2.5.1.9	Bestimmung der Zellzahl .....	32
2.5.2	<i>Chromosomenanalyse .....</i>	32
2.5.2.1	Chromosomenpräparation .....	32
2.5.2.2	Hochauflösende Chromosomenpräparationen.....	33
2.5.2.3	Giemsafärbung .....	33
2.5.2.4	GTG-Bänderung.....	33
2.5.2.5	Silberbanden (AgNOR-Färbung) .....	33
2.5.2.6	Bestrahlung und Bestimmung der Chromosomenbrüchigkeit.....	34
2.5.2.7	Replikationsfärbung: Schwesterchromatidaustausche .....	34
2.5.2.8	Messung der Chromosomenlängen .....	34
2.5.2.9	Kernpräparationen für PLC Assay .....	34
2.5.2.10	Herstellung binukleärer Zellen durch Cytochalasin B Behandlung .....	34
2.5.2.11	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) .....	35
2.5.2.12	Immunfluoreszenz.....	35
2.5.3	<i>RNA Interferenz (RNAi).....</i>	36
2.5.4	<i>Durchflusszytometrie.....</i>	37
2.5.5	<i>Retroviraler Gentransfer.....</i>	38
2.5.5.1	Elektroporation der Verpackungszelllinie PT67 .....	38
2.5.5.2	Retrovirale Transduktion.....	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
3.1	AUSSCHLUSS VON KANDIDATENGENEN UND IDENTIFIKATION DES GENS.....	40
3.1.1	<i>Beschreibung der Kandidatenregion und der Kandidatengene .....</i>	40
3.1.2	<i>Ausschluss von Kandidatengenen.....</i>	40
3.1.3	<i>Mutationen im MCPH1-Gen sind ursächlich für das PCC Syndrom.....</i>	43
3.1.3.1	Mutationsanalyse.....	43
3.1.3.2	Untersuchung von zytogenetischen Präparaten von Patienten mit MCPH1 primärer... Mikrozephalie.....	45
3.1.3.3	RNA Interferenz (RNAi) gegen MCPH1: MCPH1 ist ein negativer Regulator der Chromosomenkondensation .....	45
3.2	DIAGNOSTIK .....	46
3.2.1	<i>Pränataldiagnostik.....</i>	46
3.2.2	<i>Diagnose der ersten Missense Mutation in MCPH1 bei einem Patienten mit sehr mildem klinischen und zellulären Phänotyp.....</i>	48
3.3	CHARAKTERISIERUNG DES ZELLZYKLUSDEFEKTS .....	50
3.3.1	<i>MCPH1-Defizienz verzögert die postmitotische Chromosomendekondensation in der G1 Phase des Zellzyklus .....</i>	51
3.3.2	<i>Die Metaphasechromosomen von MCPH1 Patienten sind verkürzt .....</i>	53
3.3.3	<i>Die Kernmembran wird nicht vorzeitig aufgelöst .....</i>	54
3.3.4	<i>Untersuchungen des Centrosomenzyklus und des Spindelapparates .....</i>	55
3.3.4.1	Die Separation der Centrosomen ist nicht an die vorzeitige Chromosomenkondensation gekoppelt.....	56

3.3.4.2	Die Spindel wird normal ausgebildet .....	57
3.3.4.3	Bestimmung der Fehlverteilungsrates ( <i>nondisjunction rate</i> ) .....	58
3.3.5	<i>Untersuchung der Nucleoli in den Prophase-ähnlichen Zellen</i> .....	59
3.3.6	<i>Untersuchung des DNA-Schadenskontrollpunktes</i> .....	60
3.4	DIE ZELLEN ALS WERKZEUG: ANALYSE DES SIGNALWEGS DER FEHLREGULIERTEN CHROMOSOMENKONDENSATION .....	62
3.4.1	<i>Array-basierter Yeast-two-Hybrid-Screen</i> .....	63
3.4.2	<i>Funktionelle Komplementation durch retroviralen Gentransfer</i> .....	64
3.4.3	<i>Analyse von Kondensationsfaktoren – Was faltet die Chromosomen?</i> .....	65
3.4.3.1	Histon H3 Phosphorylierung und der <i>chromosomal passenger</i> Komplex .....	66
3.4.3.2	Die Phosphorylierung von Histon H3 durch Aurora B Kinase ist nicht essentiell für die vorzeitige Chromosomenkondensation .....	66
3.4.3.3	Cohesin und Kohäsionsfaktoren .....	69
3.4.3.4	Vorzeitige Ablösung von Cohesin und Kohäsionsfaktoren .....	69
3.4.3.5	Die Condensinkomplexe und Topoisomerase II $\alpha$ .....	70
3.4.3.6	Untersuchung der zentralen Chromatidachsen .....	71
3.4.3.7	Condensin II nicht Condensin I lokalisiert auf den vorzeitig kondensierten Chromosomen .....	73
3.4.3.8	Histon H3 Phosphorylierung korreliert mit Condensin II Bindung .....	76
3.4.3.9	Topoisomerase II $\alpha$ zeigt ein ähnliches Verhalten wie Condensin II .....	77
3.4.3.10	Analyse von Cyclin A und Cyclin B1 in Bezug auf die Lokalisation der Condensin-Komplexe .....	78
3.4.3.11	RNA Interferenz gegen Condensin II „rettet“ den zellulären Phänotyp .....	78
3.4.3.12	Condensin II hat eine Funktion bei der Chromosomendekondensation .....	81
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>82</b>
4.1	MUTATIONEN IN MCPH1 VERURSACHEN DAS PCC SYNDROM .....	82
4.1.1	<i>MCPH1 – Microcephalin</i> .....	83
4.1.2	<i>Genetische Heterogenität bei autosomal rezessiver Mikrozephalie (MCPH)</i> .....	83
4.1.3	<i>Allelische und klinische Heterogenität bei MCPH1</i> .....	84
4.2	CHARAKTERISIERUNG DES ZELLZYKLUSDEFEKTES .....	86
4.3	DIE MORPHOLOGIE DER PATIENTENCHROMOSOMEN .....	88
4.4	DNA-REPARATUR UND DER G2/M-CHECKPOINT .....	89
4.5	HISTON H3 PHOSPHORYLIERUNGEN UND KOHÄSIONSFAKTOREN .....	92
4.6	DIE ROLLE DER CONDENSINKOMPLEXE IN DER CHROMOSOMENKONDENSATION .....	93
4.7	DIE FEHLREGULIERTE CHROMOSOMENKONDENSATION BEI VERLUST DER MICROCEPHALIN- FUNKTION: EIN ARBEITSMODELL .....	96
4.8	MOLEKULARE PATHOLOGIE DER MIKROZEPHALIE UND DIE EVOLUTION DES MENSCHLICHEN GEHIRNS .....	97
4.9	AUSBLICK: MICROCEPHALIN ALS MULTITALENT IN DER ZELLZYKLUSKONTROLLE ? .....	100
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>104</b>
5.1	ZUSAMMENFASSUNG .....	104
5.2	SUMMARY .....	105
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>117</b>
7.1	ABKÜRZUNGEN .....	117
7.2	EIGENE PUBLIKATIONEN .....	118
7.2.1	<i>Weitere eigene Originalarbeiten</i> .....	118
7.2.2	<i>Tagungsbeiträge</i> .....	119
7.2.3	<i>Weitere Tagungsbeiträge</i> .....	119
7.3	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN PRIMER .....	120
7.4	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN SIRNA-DUPLEXE .....	123
7.5	LEBENS LAUF .....	124
7.6	DANKSAGUNG .....	125

