

3 Ergebnisse

3.1 Ausschluss von Kandidatengen und Identifikation des Gens

3.1.1 Beschreibung der Kandidatenregion und der Kandidatengene

Durch ein *homozygosity mapping* war vor Beginn meiner Arbeiten ein homozygoter Bereich von 64 cM auf Chromosom 8 (D8S264 bis D8S532) als Kandidatenregion ermittelt und das gesamte übrige Genom ausgeschlossen worden (siehe Einleitung 2.4). Damit waren auch verschiedene primäre Kandidatengene ausgeschlossen, wie z.B. RCC1 auf 1q36.1. RCC1 komplementiert eine in-vitro Mutation in der Hamsterzelllinie BHK21, die zu vorzeitiger Chromosomenkondensation führt (Uchida *et al.*, 1990). Des Weiteren waren Cyclin B1/CDK1, Cyclin A/CDK2, die drei CDC25 Gene des Säugers, beide Isoformen von Topoisomerase II, Aurora B Kinase und die zum damaligen Zeitpunkt bekannten Condensin- und Cohesin-Untereinheiten ausgeschlossen (Alle Lokalisationen nach Human Genome Map Viewer, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>, 04.04.05).

Insgesamt befinden sich nach heutigem Wissensstand jedoch 408 Gene im Bereich zwischen den flankierenden heterozygoten Markern D8S504 und D8S285. Als Kandidaten für die Chromosomenkondensationsstörung kamen grundsätzlich Proteinphosphatasen, Kinasen, Mitglieder der RAN-Familie und Cycline in Frage, aber auch Gene, die sich durch Protein-Domänen auszeichnen, die eine Beteiligung an Zellzyklusabläufen wahrscheinlich machen, wie z.B. BRCT-Domänen. In der homozygoten Region auf Chromosom 8 befanden sich als mögliche Kandidatengene fünf katalytische bzw. regulatorische Untereinheiten von Proteinphosphatasen: PPP2CB, PPP3CC, PPP2R2A, PPP1R3B und DUSP4, die in die Regulation des Zellzyklus durch reversible Phosphorylierungsvorgänge einbezogen sind. Ferner war das Gen für primäre autosomal rezessive Mikrozephalie MCPH1 mittels *homozygosity mapping* in eine 13 cM große Region auf 8p22-pter (von D8S1824 bis D8S1825) kartiert (Jackson *et al.*, 1998). Mögliche weitere Kandidaten in dieser Region waren der Rho-Guanin-Nukleotide Exchange Factor ARHGEF10, das RAN-bindende Protein RANBP16 und das Zellzyklus-assoziierte Protein CDCA2.

3.1.2 Ausschluss von Kandidatengen

PPP2CB: Eines der aussichtsreichsten Kandidatengene war das Gen für die beta-Isoform der katalytischen Untereinheit der Serin/Threonin Proteinphosphatase 2A (PP2A), PPP2CB, da Mutanten dieser Untereinheit bei der Hefe mit vorzeitiger Mitose einhergehen (Kinoshita *et al.*, 1990). Die Rolle der PP2A als negativer Regulator des MPF (*mitosis promoting factor*) ist

zudem seit geraumer Zeit bekannt (Lee *et al*, 1994). Im Rahmen meiner Diplomarbeit hatte ich einen homozygoten Basenaustausch (1536A>G) in der 3'-UTR (3'- *untranslated region*) bei den Patienten der libanesischen Kernfamilie nachweisen können. Dieser liegt zwischen dem Polyadenylierungssignal und der Poly(A)-Schnittstelle (Abbildung 10). Es war somit nicht auszuschließen, dass dieser Basenaustausch möglicherweise mit der Stabilität der mRNA des Gens interferieren (Conne *et al*, 2000) und somit ursächlich für den klinischen und zellulären Phänotyp sein könnte.

AATAAACTTTTC**G**TTTTAAACA

Abbildung 10 **Darstellung des Basenaustausches 1536A>G im PPP2CB-Gen** zwischen Polyadenylierungssignal AATAAA und Poly(A)-Schnittstelle CA. Diese Schnittstelle entspricht meinen experimentellen Daten und nicht den Angaben der Datenbanken, welche eine Schnittstelle neun Nukleotide *downstream* angeben.

Durch Sequenzierung und SSCP-Analysen des betreffenden Abschnitts bei 339 Kontrollindividuen wurden im Anschluss an meine Diplomarbeit 26 heterozygote Individuen, dies entspricht einer Heterozygotenfrequenz von annähernd 8%, und eine für den Basenaustausch homozygote Kontrollperson identifiziert (siehe Abbildung 11). Es war somit davon auszugehen, dass es sich um einen Polymorphismus handelt.

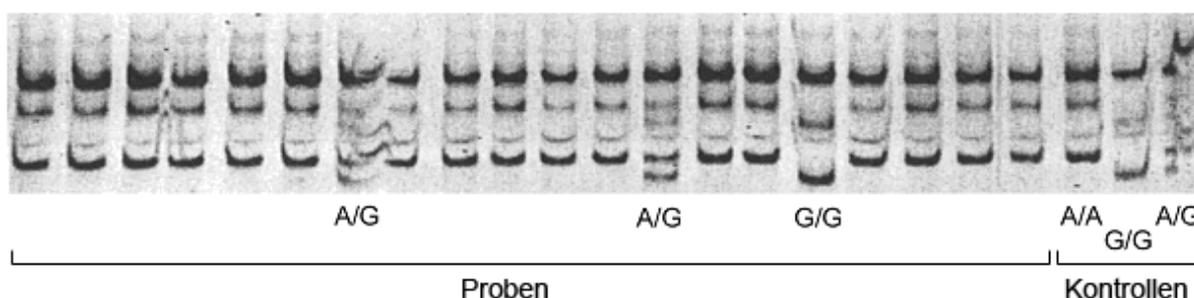


Abbildung 11 **SSCP Analyse von Kontrollallelen.** SSCP Gel mit PCR-Produkten von 17 Normalpersonen. Ganz rechts zum Vergleich Proben von Kontrollen: homozygot Wildtyp (A/A), homozygot Variante (G/G) = Patient, heterozygot (A/G) = Vater. Es wurden auf diesem Gel zwei heterozygote, sowie eine für die Sequenzvariation homozygote Person identifiziert.

Unterdessen ist diese Sequenzvariation auch als rs3177965 in der SNP-(*single nucleotide polymorphism*) Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) aufgeführt.

PPP2CA: Im menschlichen Genom existiert eine Isoform von PPP2CB: PPP2CA, die auf Chromosom 5q23 kartiert ist. Die beiden Proteine sind bezüglich ihrer Aminosäuresequenz zu 97% identisch. Es war somit denkbar, dass Mutationen in PPP2CB durch redundante Funktion von PPP2CA kompensiert würden. Um auszuschließen, dass die bei unseren Patienten in PPP2CB homozygot vorliegende Sequenzvariation bei einer zusätzlichen heterozygot vorliegenden Mutation in der Isoform PPP2CA zu einer pathogenen Haploinsuffizienz führen könnte, wurde dieses Gen bei beiden Patienten, beiden Eltern und zwei Kontrollen auf cDNA-Ebene sequenziert und mit einer Referenzsequenz (NM_002715) verglichen. Dabei konnten keine Sequenzvariationen identifiziert werden, die auf einen solchen Mechanismus hindeuten

würden. Es wurde lediglich ein heterozygot vorliegender Nukleotidaustausch in der 5'-UTR bei nur einem der beiden untersuchten Patienten gefunden (Tabelle 1).

PPP2R2A: PPP2R2A ist die α -Isoform der regulatorischen Untereinheit B der Proteinphosphatasen PP2A. Sie erstreckt sich genomisch über einen Bereich von über 80 kbp in 8p21 und besteht aus 10 Exons mit einem *open reading frame* (ORF) von 1341 bp. Das Gen kodiert ein Protein mit 447 Aminosäuren. Hrimech und Mitarbeiter beschrieben 2000, dass HIV-1-Vpr einen G2-Phase-Arrest durch eine Komplexierung mit PP2A nach Bindung an diese regulatorische Untereinheit auslöst. Dies geschieht durch *targeting* des Komplexes in den Zellkern und daraus resultierender Dephosphorylierung von CDC25 (Hrimech *et al*, 2000). Auch PPP2R2A lokalisiert in dem durch das *homozygosity mapping* definierten Abschnitt des Genoms. Die Sequenzierung von PPP2R2A erfolgte auf cDNA-Ebene über den gesamten kodierenden Bereich für die beiden betroffenen Kinder, beide Eltern und zwei Kontrollen. Dabei fand sich keine Mutation, sondern lediglich ein Polymorphismus an Position 291, der auch in den Datenbanken beschrieben ist (dbSNP:rs1059235, Tabelle 1). Somit konnte auch dieses Kandidatengen mittels Sequenzierung ausgeschlossen werden. Die Publikation von Hrimech *et al*. (Hrimech *et al*, 2000) wurde unterdessen aufgrund sich widersprechender Ergebnisse bei weiterführenden Experimenten zurückgezogen (Hrimech *et al*, 2002).

PPP1R3B: CDC2-unabhängige Induktion der Mitose durch Okadeinsäure wird vermutlich durch Phosphatasen vom Typ PP1 vermittelt (Ghosh *et al*, 1998). Bei PPP1R3B handelt es sich um eine regulatorische Untereinheit B der Proteinphosphatase 1. Das Gen ist auf 8p23 kartiert und besteht aus 2 Exons, von denen Exon 2 den gesamten ORF von 858 bp enthält. Die kodierende Region von beiden Betroffenen und beiden Eltern wurde daher genomisch sequenziert. Es wurden außer drei SNPs, die bereits aus den Datenbanken bekannt sind, keine Veränderungen gefunden (Tabelle 1).

Alle Sequenzvariationen, die bei der Sequenzierung der Kandidatengene bei den Patienten gefunden wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 Verzeichnis aller bei den Patienten in den verschiedenen Kandidatengenen gefundenen Sequenzvariationen.

Gen	Referenzsequenz	Größe des Gens	Sequenzvariation auf Nukleotidebene	Sequenzvariation auf Proteinebene
PPP2CB	NM_004156	mRNA: 1790 bp CDS: 929 bp	1536A>G ¹	(3'-UTR) keine
PPP2CA	NM_002715	mRNA: 2634 bp CDS: 929 bp	-37C>G ²	(5'-UTR) keine
PPP2R2A	NM_002717	mRNA: 2385 bp CDS: 1343 bp	291T>C ¹	(CDS) keine
PPP1R3B	NM_024607	mRNA: 3807 bp CDS: 857 bp	446C>T ¹ 490T>C ¹ 899 900AG>CA ¹	(CDS) A449V (CDS) keine (3'-UTR) keine

¹ Diese Sequenzvariationen sind entweder in der dbSNP verzeichnet, bzw. aus verschiedenen Einträgen in der Nukleotide Datenbank (NCBI) oder eigener Sequenzierung von Kontrollallelen bekannt.

² Diese Sequenzvariation liegt bei einem der Patienten und einem Elter in heterozygoter Form vor. PPP2CA liegt nicht in der Kandidatenregion. Alle anderen Varianten liegen bei beiden Eltern heterozygot und bei beiden Patienten in homozygoter Form vor, da die sequenzierten Gene in der Kandidatenregion liegen.

3.1.3 Mutationen im MCPH1-Gen sind ursächlich für das PCC Syndrom

3.1.3.1 Mutationsanalyse

Andrew Jackson und seine Mitarbeiter veröffentlichten im Juli 2002 (Jackson *et al*, 2002), dass Mutationen im bis dahin uncharakterisierten Gen *AX087870* ursächlich für die primäre autosomal rezessiv vererbte Mikrozephalie der Untergruppe MCPH1 sind. Das MCPH1-Gen war zuvor durch *homozygosity mapping* bei zwei pakistanischen Familien in einer 13cM großen Region auf 8p22-pter (von D8S1824 bis D8S1825) kartiert worden (Jackson *et al*, 1998). Die Betroffenen beider Familien haben denselben Haplotyp und tragen die gleiche Mutation (c.74G>C; p.Ser25X). *AX087870* kartiert auf 8p23.1 und somit in dem Bereich, in dem auch das Gen für das PCC Syndrom vermutet wurde. Es besteht aus 14 Exons und einem 2508 bp langen ORF, der für ein Protein mit 835 Aminosäuren kodiert (Abbildung 12A). Dieses Protein, welches Microcephalin genannt wurde, besitzt drei konservierte BRCT-Domänen (BRCT = *BRCA1 C terminus domain*) und entsprach damit den Forderungen an ein Kandidatengen, das in Zellzyklusprozesse involviert ist.

Es gelang daraufhin in unserer Familie eine Mutation in dem Gen für MCPH1 (*AX087870*) nachzuweisen (Trimborn *et al*, 2004), die durch Insertion eines Adenins in einem *A6-Run* in Exon 5 zu einer Leserasterverschiebung führt (c.427_428insA), wodurch ein vorzeitiges Stopcodon UGA generiert wird (p.Thr143AsnfsX5), dass zum Kettenabbruch nach 147 Aminosäuren führt (Abbildung 12B und C). Ein Ausschnitt der kodierenden Sequenz des

Bereiches, der die Mutation aufweist, ist in Abbildung 12C dargestellt. Die Sequenzierung von 220 Kontrollallelen ergab bei keinem eine Insertion an dieser Position. Die Segregationsanalyse zeigte, dass die beiden betroffenen Kinder homozygot und die beiden Eltern heterozygot für die Insertion sind. Es war somit davon auszugehen, dass das PCC Syndrom auf Mutationen im MCPH1-Gen zurückgeht.

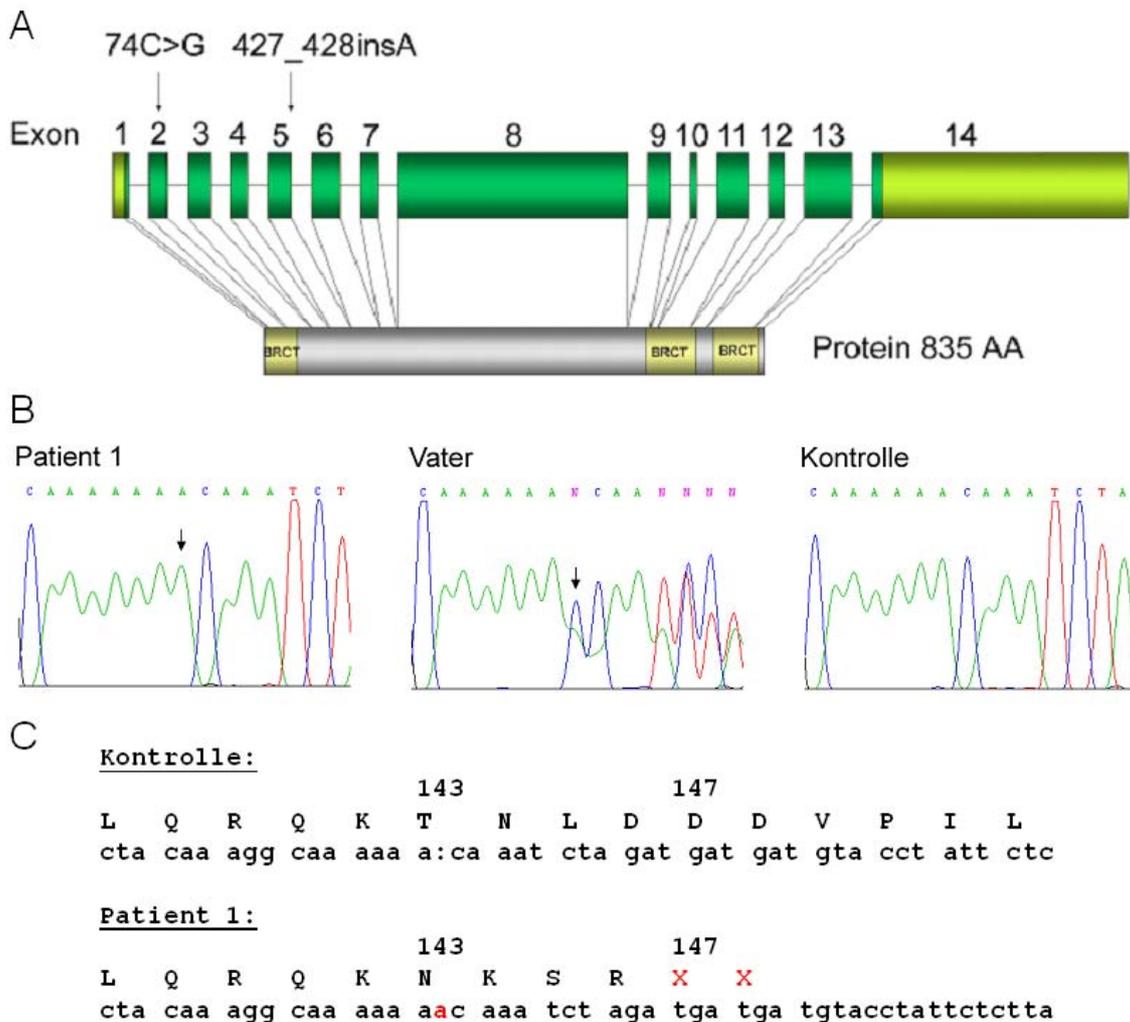


Abbildung 12 **Darstellung von MCPH1/Microcephalin und Mutationen** (A) Darstellung der genomischen Struktur des MCPH1-Gens (oben) bezogen auf die Organisation des Proteinprodukts Microcephalin (unten). Die Lagen der Mutationen sind eingezeichnet. Mutationsanalyse: Elektropherogramme (B) sowie ein Ausschnitt aus der Referenzsequenz AX087870 (C). Bei den Patienten liegt eine die Insertion eines Adenins vor, wodurch vier Codons später ein Stop (TGA) generiert wird.

Die MCPH1-mRNA der Patienten unterliegt dem *nonsense mediated decay*. Durch quantitative Real-Time PCR mit cDNA aus peripherem Blut von Patienten und Kontrollen konnte eine ca. 6-7-fach verringerte Menge von MCPH1-mRNA bei den Patienten nachgewiesen werden. Die relative Quantifizierung gegen zwei Kontrollen ergab für Patient 1 einen LogRQ-Wert von $-0,82$ (entspricht einer 6,5-fach verringerten Menge an MCPH1-mRNA gegenüber den beiden Kontrollen) und für Patient 2 einen LogRQ-Wert von $-0,81$ (entspricht ebenfalls einer 6,5-fach

verringerten Menge an MCPH1-mRNA gegenüber den beiden Kontrollen). Die MCPH1-mRNA wird in den Patientenzellen offensichtlich aufgrund des vorzeitigen Stopcodons abgebaut. Die beiden Patienten mit c.427_428insA Mutationen werden im weiteren Verlauf der Arbeit als Patient 1 (weiblich) und Patient 2 (männlich) bezeichnet.

3.1.3.2 Untersuchung von zytogenetischen Präparaten von Patienten mit MCPH1 primärer Mikrozephalie

Dr. Jackson und seine Mitarbeiter hatten für ihre Patienten mit MCPH1 Mikrozephalie nicht den für unsere Patienten mit PCC Syndrom typischen zellulären Phänotyp beschrieben. Im Rahmen unserer Kooperation wertete ich archivierte zytogenetische Präparate von PHA-stimulierten T-Lymphozyten dieser Patienten hinsichtlich des Anteils Prophase-ähnlicher Zellen aus und fertigte Präparate aus lymphoblastoiden Zellkulturen der Patienten an, um diese mit Präparaten unserer Patienten und Kontrollen zu vergleichen. Bei beiden Zelltypen konnte ich für die 74C>G-Patienten einen erhöhten Anteil Prophase-ähnlicher Zellen nachweisen: 7% und 17% in den archivierten T-Lymphozytenpräparaten (Trimborn *et al*, 2004) sowie 9% und 12% in den lymphoblastoiden Zellkulturen (siehe dazu auch die Abbildungen 15, 23 und 24). Diese glichen morphologisch dem bei unseren Patienten beobachteten zellulären Phänotyp. Es konnte somit demonstriert werden, dass bei den Patienten mit MCPH1 primärer Mikrozephalie die gleiche Chromosomenkondensationsstörung vorlag, und dass es sich somit bei den beiden Erkrankungen um allelische Varianten handelt. Die Patienten mit 74C>G Mutationen bzw. Zellkulturen dieser Patienten werden im Weiteren als Patienten 3 und 4 bezeichnet.

3.1.3.3 RNA Interferenz (RNAi) gegen MCPH1: MCPH1 ist ein negativer Regulator der Chromosomenkondensation

Um den direkten Zusammenhang zwischen dem MCPH1-Funktionsverlust und dem zellulären Phänotyp vorzeitiger Chromosomenkondensation nachzuweisen, wurde ein *knockdown* der MCPH1-mRNA mittels RNAi durchgeführt. Die Transfektion mit MCPH1 spezifischen siRNA Duplexen führt sowohl in Hela-Zellen als auch in einer weiteren Kontrollzelllinie (LN9SV = SV40 transformierte Fibroblastenlinie) zur Manifestation des zellulären Phänotyps (Abbildung 13A). Durch Bestimmung des Anteils der PLCs nach RNAi in logarithmisch wachsenden Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass bei den mit der MCPH1-siRNA behandelten Zellen signifikant mehr Prophase-ähnliche Zellen vorlagen als in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellkulturen ($P \ll 0,001$; χ^2) (Trimborn *et al*, 2004) (Abbildung 13A).

Mit spezifischen siRNA-Duplexen gegen das Mausortholog von MCPH1 (Mm_MCPH1) konnte der gleiche Chromosomenkondensationsdefekt in der Mauszelllinie PT67 induziert werden

($P < 0,001$; χ^2 , Abbildung 13B)*. Diese Untersuchungen beweisen, dass der Funktionsverlust von Microcephalin ursächlich für den Chromosomenkondensationsdefekt ist und dass die Funktion von Microcephalin als negativer Regulator der Chromosomenkondensation evolutionär bei Maus und Mensch konserviert ist.

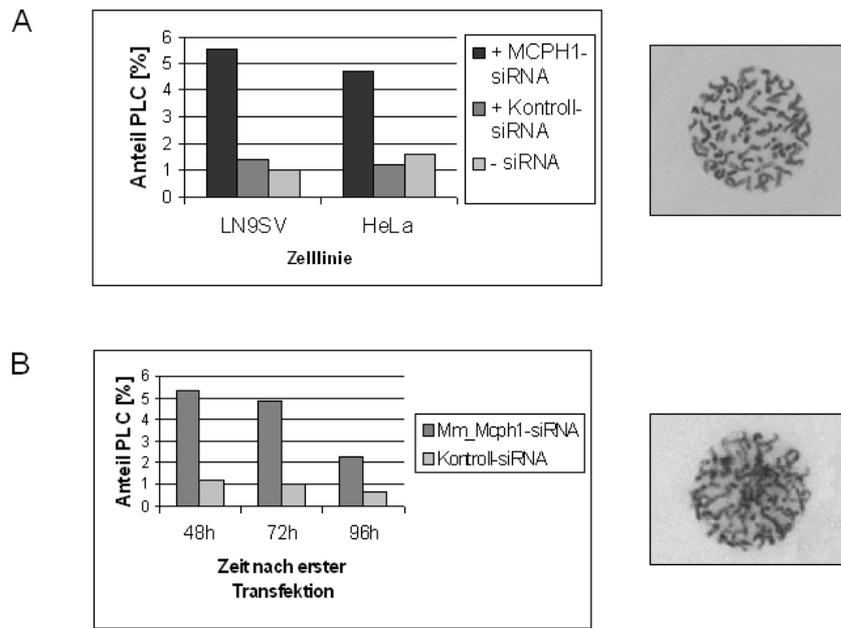


Abbildung 13 **RNAi gegen Microcephalin-mRNA** (A) Anteil Prophase-ähnlicher Zellen in humanen Kontrollzelllinien nach RNA Interferenz gegen MCPH1 (links). Beispiel einer auf diese Weise induzierten Prophase-ähnlichen Zelle (rechts). (B) Anteil Prophase-ähnlicher Zellen in der Mauszelllinie PT67 zu verschiedenen Zeitpunkten nach zweifacher Transfektion mit *Mus musculus* (Mm) Mcph1-spezifischen und Kontroll-siRNA-Duplexen (links). Beispiel einer auf diese Weise induzierten Prophase-ähnlichen Zelle (rechts).

3.2 Diagnostik

3.2.1 Pränataldiagnostik

Im Laufe meiner Doktorarbeit führte ich Pränataldiagnosen bei zwei Schwangerschaften in unserer Kernfamilie durch. Bei beiden Schwangerschaften befand sich die Frau zum Zeitpunkt der Chorionzottenbiopsie in der 13. Schwangerschaftswoche. Beide Schwangerschaften waren sonografisch unauffällig. Eine frühzeitige pränatale Diagnose anhand sonografischer Messungen des Kopfumfanges ist nicht möglich, da die Mikrozephalie erst gegen Ende des 2. Trimenons im Ultraschall sichtbar ist. Zum Zeitpunkt der ersten Schwangerschaft im Jahr 2001 war das Gen für die Erkrankung noch nicht bekannt und somit musste die Diagnostik auf Basis des zellulären Phänotyps und mit Hilfe einer auf dem *homozygosity mapping* basierenden indirekten DNA-

* Die Auswertung der von mir durchgeführten Experimente mit siRNA-Duplexen gegen Mm_MCPH1 erfolgte teilweise durch Charlotte Pöhlmann im Rahmen ihrer Doktorarbeit.

Diagnostik durchgeführt werden. Da die Chromosomenkondensation einen fundamentalen Prozess der Zellzykluskontrolle betrifft, war davon auszugehen, dass sich der zelluläre Phänotyp in allen sich teilenden Zellen eines Organismus gleichermaßen manifestiert, d.h. auch in den Zellen des Chorion im Falle einer Vererbung der Erkrankung an das Ungeborene. Die Chromosomenanalyse ergab einen numerisch und strukturell unauffälligen Chromosomensatz 46,XY. Die Morphologie und Bandenauflösung der Chromosomen war gut und entsprach dem erwarteten Bild bei Chorionzotten. Es ergaben sich bei der Auswertung mehrerer tausend Zellen aus Kurz- und Langzeitkultur keine Hinweise auf eine Chromosomenkondensationsstörung beim Feten.

Die indirekte DNA-Diagnostik mit Mikrosatellitenmarkern (*Short Tandem Repeats*, STR, Abbildung 14A und B) ergab, dass der Fötus von der Mutter über den gesamten kritischen, durch das *homozygosity mapping* definierten Bereich dasjenige Chromosom geerbt hat, welches von keinem der beiden betroffenen Geschwistern getragen wird. Ein Doppel-Crossover im Bereich der bei ihr nicht informativen Marker D8S1771 und D8S532 ist bei einem Abstand von 28 cM (Marshfield-Map) zwischen den beiden nächsten informativen Markern D8S560 und D8S285 wenig wahrscheinlich ($P = 0,28^2 = 0,078$). Die sechs vom Vater geerbten distalen Marker D8S264 – D8S261 schlossen ebenfalls eine Vererbung des kritischen Allels aus. Zwischen den Markern D8S261 und D8S560 war jedoch in der paternalen Meiose ein Crossover aufgetreten, so dass der Fötus im Bereich zwischen den Markern D8S560 – D8S532 sehr wahrscheinlich heterozygot für das kritische Chromosom war (Abbildung 14A). Da es sich bei der Erkrankung um einen autosomal rezessiven Erbgang handelt, konnte die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Kind betroffen wäre, abgeschätzt werden. Das Restrisiko ergibt sich aus dem nicht informativen Abschnitt des maternalen Chromosoms.

$$P_{(\text{betroffen})} = \frac{\text{Bereich}_{(\text{uninformativ})}}{\text{Bereich}_{(\text{gesamt})}} * P_{(\text{Doppel-Crossover})} = \frac{28\text{cM}}{71\text{cM}} * 0,078 = 0,031$$

In Kombination mit der zytologischen Analyse war also von einem sehr geringen Risiko für den Feten auszugehen. Es wurde ein gesunder Junge mit normalem Kopfumfang geboren. Dieser ist mittlerweile über drei Jahre alt und hat sich normal entwickelt. Aufgrund der heutigen Kenntnis der zugrundeliegenden Mutation kann geschlossen werden, dass dieses Kind homozygot für das Wildtypallel ist.

Bei der darauf folgenden Schwangerschaft war die familiäre Mutation im MCPH1 Gen bereits bekannt. Die Sequenzierung der betroffenen Region zeigte Heterozygotie für die familiäre Mutation (Abbildung 14C), was auch durch eine Mikrosatellitenanalyse mit flankierenden Markern bestätigt wurde (Abbildung 14A und B). Die Chromosomenanalyse ergab einen

unauffälligen Chromosomensatz 46,XX, die Morphologie und Bandenauflösung der Chromosomen war normal. Die Auswertung von Kurzzeit- und Langzeitkultur hinsichtlich des Anteils an Prophase-ähnlichen Zellen und der Vergleich mit Kontrollkulturen ergab keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Chromosomenkondensationsstörung. Es wurde ein gesundes Mädchen geboren. Das Mädchen ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt über ein Jahr alt und hat sich normal entwickelt.

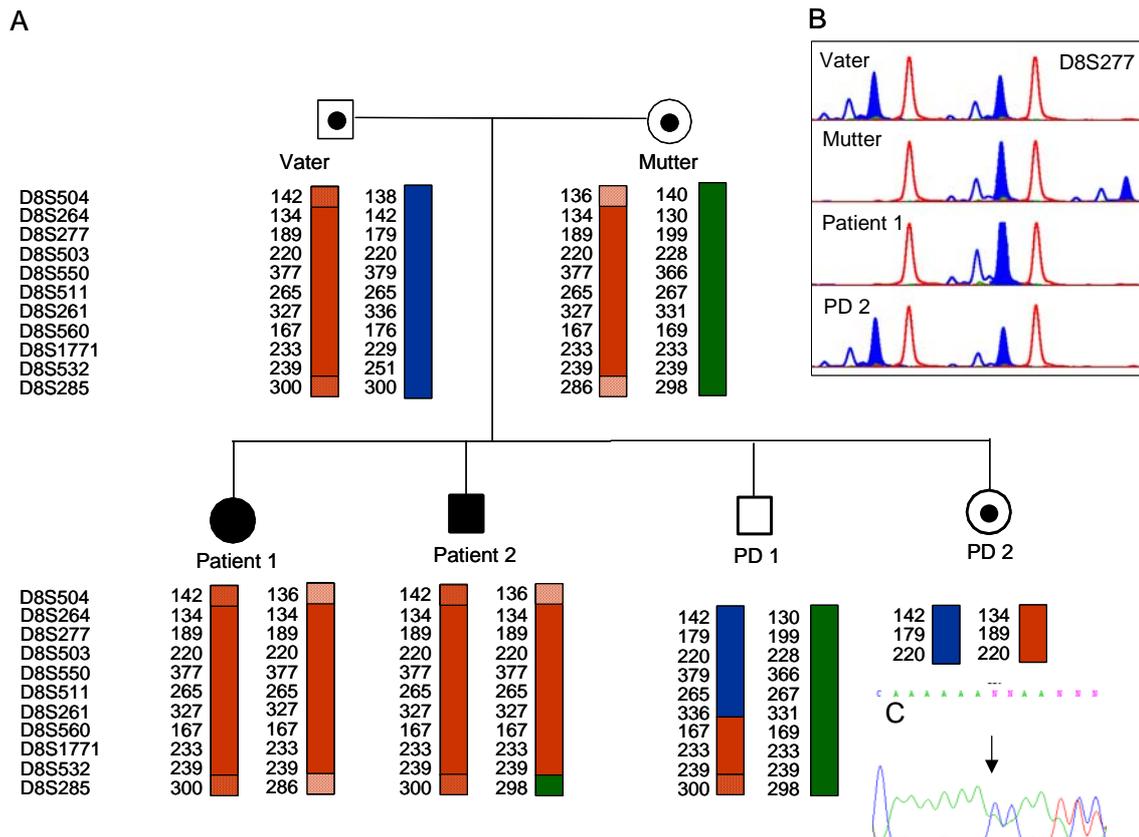


Abbildung 14 **Pränataldiagnostik** (A) Haplotypisierung der Kernfamilie. (PD = Pränataldiagnostik). Der homozygote Bereich (D8S264 – D8S532) ist rot dargestellt. Die begrenzenden Abschnitte (D8S504 und D8S285) auf den entsprechenden Chromosomen sind gemustert. Neben den Chromosomen sind die Längen der PCR-Produkte in Basenpaaren angegeben. (B) Beispiel für einen analysierten STR Marker (D8S277) der PD 2: Allele (blau), Standard (rot). (C) Elektropherogramm, dass die Heterozygotie von PD 2 für die familiäre Mutation zeigt (Leserahmenverschiebung ab Pfeil).

3.2.2 Diagnose der ersten *Missense* Mutation in MCPH1 bei einem Patienten mit sehr mildem klinischen und zellulären Phänotyp

Der Patient wurde uns im Alter von 6 Jahren überwiesen. Er ist das erste Kind einer 13 Jahre alten Mutter deutscher Herkunft. Der Vater ist unbekannt. Das Kind kam in der 35. Schwangerschaftswoche per Kaiserschnitt zur Welt, zwei Wochen nach Geburt wurde er zur Adoption freigegeben. Sein Geburtsgewicht betrug 2350 g (-0,7 SD). Seine Geburtslänge war 45 cm (-0,5 SD). Der Kopfumfang betrug 30,5 cm (-2,4 SD). Er konnte mit 6 Monaten sitzen, im Alter von 12 Monaten erlernte er das Laufen und begann mit 18 Monaten zu sprechen. Als 6-Jähriger zeigt er sehr gute verbale Fähigkeiten (IQ115) bei Bestehen einer Lernschwäche bzw.

geringfügigen mentalen Retardierung (IQ84). Seine feinmotorischen Fähigkeiten bleiben etwas zurück. Seine Größe beträgt mit 6 Jahren 114 cm (-0,7 SD), er wiegt 18,5 kg (-1,3 SD) und sein Kopfumfang liegt nun bei 47 cm (-3 SD). Der Patient, bzw. Zelllinien, die auf den Patienten zurückgehen, werden im Rahmen dieser Arbeit mit Patient 5 bezeichnet.

Die Überweisung erfolgte zum Ausschluss eines Nijmegen-Breakage-Syndroms mittels induzierter Chromosomenbrüchigkeit nach Bestrahlung. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen eines Nijmegen-Breakage-Syndrom. Es fiel jedoch die schlechte Chromosomenqualität auf, dabei im Besonderen die schlechte Auflösung der GTG-Banden nach Synchronisation mit Methotrexat (Abbildung 15A). Die genauere Analyse der diagnostischen Präparate zeigte einen leicht erhöhten Anteil Prophase-ähnlicher Zellen (ca. 3 %) mit der für das PCC-Syndrom typischen Morphologie (Abbildung 15B). Dieser Effekt war im Vergleich zu den bisher bekannten Patienten deutlich geringer, konnte aber durch Bestrahlung erhöht werden (siehe Abbildung 15C). Es wurden hierfür die Präparate der induzierten Chromosomenbrüchigkeit untersucht. Dabei wurden die Chromosomen 6h nach Bestrahlung mit 0,5 Gy, 1,0 Gy und 2,0 Gy präpariert. Die lymphoblastoide Zelllinie zeigte ebenfalls einen geringfügig erhöhten Anteil an Prophase-ähnlichen Zellen (Abbildung 15B). Auch bei dieser Zelllinie konnte der Anteil an PLCs durch Bestrahlung erhöht werden. (Abbildung 24).

Bei der anschließenden genomischen Sequenzierung aller Exons des MCPH1-Gens wurde ein homozygoter Basenaustausch C>G an Position 80 nachgewiesen (Abbildung 15D), welcher zu einer Aminosäuresubstitution von Threonin zu Arginin an Position 27 führt (c.80C>G; p.T27R) (Trimborn *et al.*, 2005). Die SNP-Analyse von 196 Kontrollallelen zeigte keine einzige weitere Variation an dieser Position (Abbildung 14E). T27 befindet sich in der N-terminalen BRCT-Domäne. Sequenzvergleiche mit den Microcephalin-Orthologen verschiedener Spezies zeigten, dass T27 bei Säugetieren und bei den Amphibien *Xenopus* und *Ambystoma* evolutiv konserviert ist. Lediglich beim Huhn ist das ungeladene Threonin konservativ gegen das neutrale Alanin ausgetauscht (Abbildung 14F). Es ist somit davon auszugehen, dass die Mutation g.80C>G im MCPH1 Gen ursächlich für den zellulären und klinischen Phänotyp ist. Eine Mikrosatellitenanalyse der Patienten-DNA ergab das Vorliegen von Heterozygotie für die STR Marker D8S504, D8S264 und D8S518 (telomerisch von MCPH1), aber Homozygotie für ein 19 Mb Segment proximal von MCPH1 (D8S277, D8S503, D8S560, und D8S1771). Diese Daten und die Homozygotie der Mutation deuten eher auf Konsanguinität der Eltern des Jungen hin als auf eine große Deletion dieses Segmentes, da eine so große Deletion zum einen einen auffälligeren Phänotyp mit schwerwiegenderen Fehlbildungen erwarten ließe, zum anderen auch bei schlechter chromosomaler Bandenauflösung erkannt worden wäre.

Der außerordentlich milde klinische und zelluläre Phänotyp des Patienten mit der *missense*-Mutation hat Konsequenzen für die klinische und zelluläre Diagnostik des PCC Syndroms und erfordert deshalb eine Revision der phänotypischen Definition der autosomal rezessiven primären Mikrozephalie MCPH1 (siehe Diskussion 4.1.3).

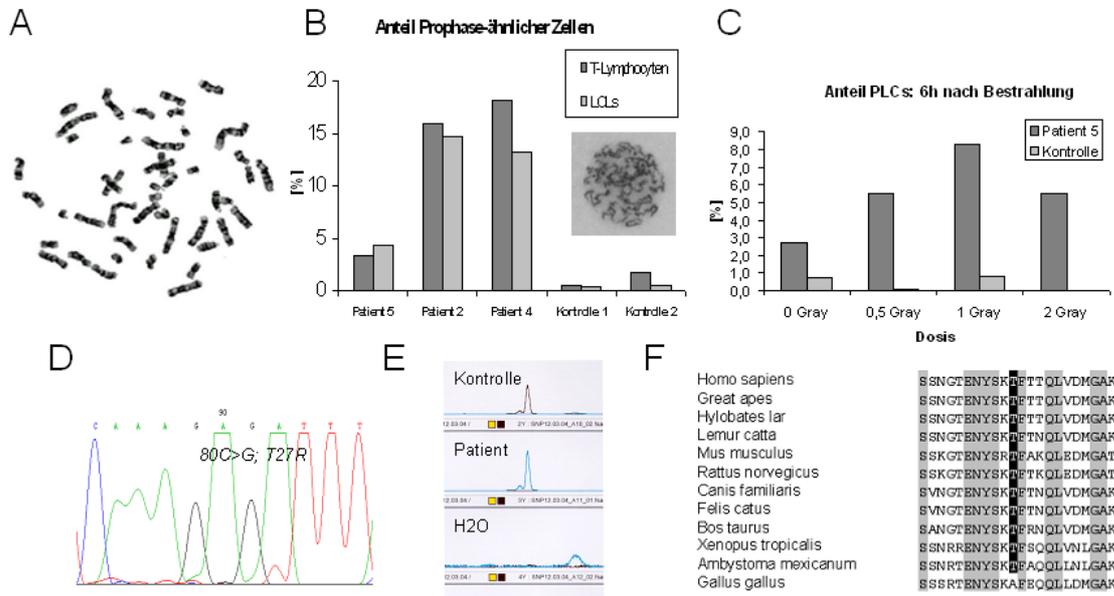


Abbildung 15 **Diagnose eines Patienten mit MCPH1 Missense Mutation** (A) GTG-gebänderte Metaphase des Patienten 5 mit der typischen, niedrigen Bandenauflösung. (B) Anteil Prophase-ähnlicher Zellen in LCLs und T-Lymphozyten im Vergleich zu Patienten mit Stopmutationen (T27R, Patient 5; T143NfsX5, Patient 2; S25X, Patient 4) und Kontrollen sowie eine exemplarische PLC des Patienten 5. (C) Anteil der PLCs 6h nach Bestrahlung in T-Lymphozyten. (D) Elektropherogramm der Missense-Mutation 80C>G; 727R. (E) Beispiel für die SNP-Analysen auf 196 Kontrollallelen. Die Farbgebung in diesem Programm entspricht nicht der Darstellung in den Elektropherogrammen, vgl. (D). (F) *Cross species alignment* von MCPH1: ClustalW Vergleich der Aminosäuren 19-40 des humanen Microcephalin mit den entsprechenden Orthologen verschiedener Spezies. Thr27 ist schwarz unterlegt. Die umgebenden, in Vertebraten konservierten Aminosäuren sind grau unterlegt.

3.3 Charakterisierung des Zellzyklusdefekts

Bereits vor Beginn meiner Arbeiten war gezeigt worden, dass der erhöhte Anteil an Prophase-ähnlichen Zellen bei den Patienten auf vorzeitige Chromosomenkondensation in der G2 Phase des Zellzyklus zurückzuführen ist (siehe 1.4). Im Rahmen meiner Doktorarbeit versuchte ich den beobachteten Zellzyklusdefekt zytologisch genauer zu charakterisieren. Dabei lag es nahe, die anderen „klassischen“ morphologischen Veränderungen des Zellkerns während der Mitose, die während der Kernteilung mit der Chromosomenkondensation koordiniert werden (siehe Einleitung 1.2), auf mögliche Fehlregulationen zu untersuchen, darunter die Auflösung und Neubildung der Kernmembran, die Separation der Centrosomen und den Aufbau des Spindelapparates, sowie das Verhalten der Nucleoli. Des Weiteren wurde die Fähigkeit der Patientenzellen zur Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden untersucht.

3.3.1 MCPH1-Defizienz verzögert die postmitotische Chromosomendekondensation in der G1 Phase des Zellzyklus

Bei der Analyse zytologischer Präparate aus verschiedenen Geweben (T-Lymphozyten, lymphoblastoide Zellen, Fibroblasten) von MCPH1 Patienten war aufgefallen, dass häufig Paare kleiner Kerne mit kondensiertem Chromatin auftraten. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass es sich dabei um Zellen in der G1-Phase unmittelbar nach Abschluss der Mitose handelt, deren Chromatin noch nicht vollständig dekondensiert war. Um diesen möglichen Dekondensationsdefekt in der frühen G1-Phase zu untersuchen, wurden lymphoblastoide Zellen von Patienten und Kontrollen für kurze Zeit (2h, 4h, 6h) mit Cytochalasin B, einem Inhibitor der Zytokinese, behandelt, bevor eine Chromosomenpräparation durchgeführt wurde. Dies führt zu binukleären Zellen (BNZ, Abbildung 16A), welche sich aufgrund der kurzen Behandlung mit dem Inhibitor mit Sicherheit noch in der G1 Phase des Zellzyklus befinden. Der Anteil binukleärer Zellen mit kondensiertem Chromatin wurde bei Patienten- und Kontrollenzellen bestimmt und die Ergebnisse zeigten, dass bei den Patientenzellen im Gegenteil zu den Kontrollen ein großer Anteil der binukleären Zellen kondensiertes Chromatin aufwies (bis zu 45% für Patient 4 nach 2h Cytochalasin B-Behandlung, im Vergleich zu 4% bei den Kontrollen) (Abbildung 16A). Diese Befunde beweisen, dass, neben der bereits bekannten vorzeitigen Chromosomenkondensation in G2, eine deutlich verzögerte Dekondensation in der frühen G1 Phase zu verzeichnen ist (Trimborn *et al*, 2004). Der relative Anteil binukleärer Zellen mit kondensiertem Chromatin nimmt folgerichtig mit längerer Einwirkungszeit des Inhibitors ab, da die Anzahl BNZ insgesamt zunimmt. Der Anteil der binukleären PLC an der Gesamtheit aller PLCs betrug 42% (Abbildung 16C).

Der Befund wurde durch immunzytochemische Methoden in einem weiteren Gewebe (Fibroblasten) bestätigt. Dazu wurden spezifische Antikörper gegen die beiden Proteine Cyclin A und Aurora B verwendet, da beide Proteine zyklisch reguliert und nach Abschluss der Mitose abgebaut werden. Beide Proteine sind in der G2 Phase nukleär. Cyclin A wird in der Prometaphase rasch proteolysiert und Aurora B sammelt sich in der Telophase im Midbody und wird in der frühen G1 Phase abgebaut. Beide Proteine eignen sich somit als Marker, um S/G2 Zellen von G1 Zellen zu unterscheiden. Durch Immunfärbungen der SV40 transformierten Fibroblastenlinie von Patient 1 (Patient 1SV) mit spezifischen Antikörpern gegen Cyclin A und Aurora B Kinase konnte gezeigt werden, dass jeweils lediglich auf etwa 50 % der Prophase-ähnlichen Zellen ein Signal zu erkennen war (Abbildung 16B). Bei den markierten PLCs handelt es sich um Zellen in der G2- und Prophase, bei den unmarkierten um Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus. Der Einfachheit halber werden die Zellen mit auffälliger Chromosomenkondensation

in ihrer Gesamtheit weiterhin als Prophase-ähnliche Zellen (PLCs) bezeichnet und in G2-PLCs (prämitotisch) und G1-PLCs (postmitotisch) unterschieden, auch wenn für letztere der Ausdruck „Telophase-ähnliche Zellen“ zutreffender wäre.

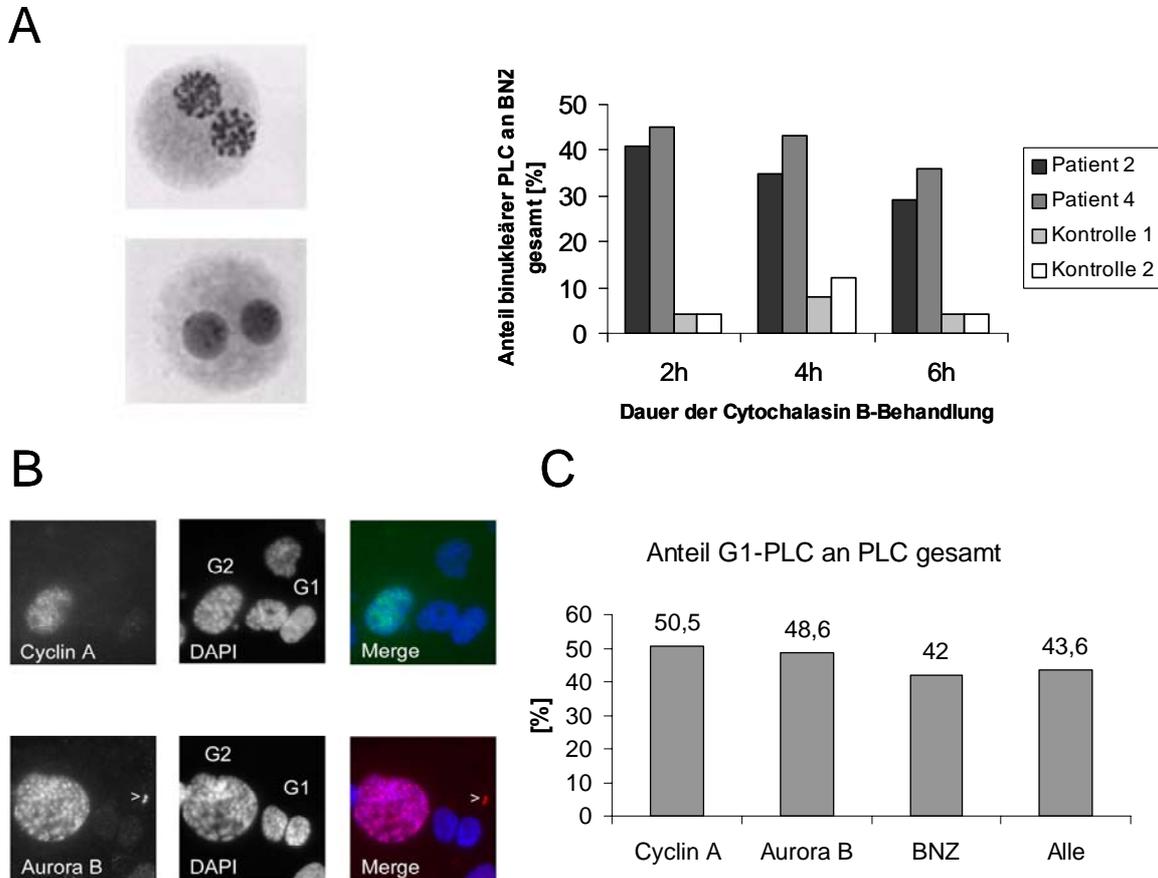


Abbildung 16 **Nachweis der Dekondensationsstörung.** (A) Nachweis über binukleäre Zellen. Links: Beispiel einer Zelle mit kondensiertem Doppelkern (oben) und einer binukleären Zelle mit decondensiertem Interphasechromatin (unten). Rechts: Anteil der binukleären Zellen (BNZ) mit kondensiertem Chromatin an der Gesamtheit der doppelkernigen Zellen in Abhängigkeit von der Dauer der Cytochalasin B-Behandlung. (B) Nachweis durch zyklisch regulierte Proteine. Oben: Cyclin A (grün) positive PLC in G2 und zwei Cyclin A negative PLCs in G1, daneben eine Interphase. Unten: Aurora B positive G2-PLC (rot). G1-PLCs sind definiert durch Abwesenheit des Aurora B Signals und den mit der Pfeilspitze markierten Midbody. (C) Bestimmung des Anteils der G1-PLC an der Gesamtheit der Prophase-ähnlichen Zellen mit verschiedenen Methoden.

Wenn man die Werte aller Experimente vereint, errechnet sich ein Anteil von G1-PLC an der Kondensationsstörung von 43,6 %. Dies ergibt grob gerundet ein Verhältnis von G2-PLC zu G1-PLC von 3:2 und ein Verhältnis der Verweildauer im kondensierten Zustand von 3:1, da aus einer G2 Zelle zwei G1 Zellen hervorgehen. Legt man eine Zellzyklusdauer von 24h und einen PLC-Anteil an der Gesamtpopulation einer logarithmisch wachsenden Kultur von 15% zugrunde, kommt man auf einen etwa 1h andauernden Chromosomendekondensationsdefekt, während die vorzeitige Chromosomenkondensation bereits ungefähr 3h vor der Mitose, also zu Beginn der G2 Phase, einsetzt. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren Experiment bestätigt. Nach vierstündiger Behandlung mit den Spindelgiften Colcemid und Nocodazol reduzierte sich

der Anteil Prophase-ähnlicher Zellen aufgrund der Arretierung der Zellen in der Metaphase deutlich, offensichtlich um den Anteil der G1-PLCs (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 **Anteil Prophase-ähnlicher Zellen nach Behandlung mit Spindelgiften** (Kontrolle = unbehandelte Kultur, Colcemid = 4h Inkubation mit Colcemid, Nocodazol = 4h Inkubation mit Nocodazol, M = Metaphasen, PLC = Prophase-ähnliche Zellen)

	Kontrolle	Colcemid	Nocodazol
Patient 5	M=0,5% PLC=2,75%	M=3,6% PLC=1,7%	M=3,5% PLC=0,8%
Patient 1	M=1,1% PLC=12%	M=7,25% PLC=5,25%	M=4,85% PLC=5,65%
Kontrolle 1	M=0,55% PLC=1,3%	M=4,55% PLC=0,1%	M=4,35% PLC=0,3%
Kontrolle 2	M=1,7% PLC=1,05%	M=9,2% PLC=0,3%	M=8,15% PLC=0,5%

3.3.2 Die Metaphasechromosomen von MCPH1 Patienten sind verkürzt

Ein weiteres zellmorphologisches Charakteristikum von MCPH1 Mutationen, neben dem erhöhten Anteil Prophase-ähnlicher Zellen, ist eine schlechte chromosomale Bandenauflösung. Die maximal erreichbare Bandenauflösung liegt bei etwa 250 Banden pro haploiden Chromosomensatz (Neitzel *et al.*, 2002; Trimborn *et al.*, 2004; Trimborn *et al.*, 2005). Um nachzuweisen, ob diese sehr niedrige Bandenauflösung durch eine Verkürzung der Chromosomen verursacht wird, wurde die Länge Giemsa-gefärbter Metaphasechromosomen mit der Isis-Software (Metasystems) bestimmt. Dazu wurden die Längen der Chromosomen 2 und 3 in parallel aufgearbeiteten und je zwei Stunden mit Colcemid behandelten T-Lymphozyten-Kulturen von zwei Patienten und drei Kontrollen gemessen. Die beiden ausgewählten Chromosomen zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus. 1. Sie sind in der Giemsa-Färbung leicht zu identifizieren. 2. Es sind lange Chromosomen, dadurch wird der relative Messfehler möglichst klein gehalten. 3. Sie haben keine nennenswerten heterochromatischen Anteile, wodurch die Variation zwischen einzelnen Individuen minimiert wird. Die Länge jedes einzelnen Chromosoms wurde zweifach bestimmt. Insgesamt wurden die Chromosomen in 75 Patienten-Metaphasen und 94 Kontroll-Metaphasen gemessen (siehe Abbildung 17). Nur eindeutig identifizierbare Chromosomen wurden ausgewählt. Die durchschnittliche Länge von Chromosom 2 betrug bei den Patienten 5,4 μm ($n = 151$; $\text{SD} \pm 0,6$) gegenüber 7,2 μm ($n = 186$; $\text{SD} \pm 1,1$) bei den Kontrollen. Für Chromosom 3 wurden Werte von durchschnittlich 4,5 μm (Patienten; $n = 148$; $\text{SD} \pm 0,5$), sowie 6 μm (Kontrollen; $n = 180$; $\text{SD} \pm 0,9$) bestimmt. Die Länge der Patientenchromosomen beträgt somit nur etwa 75 % der Kontrollchromosomen.

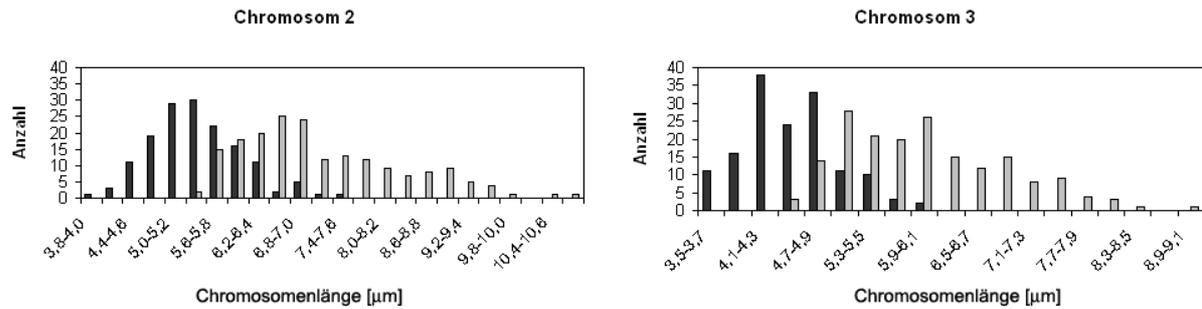


Abbildung 17 **Verteilung der Längen von Chromosom 2 und 3.** Die Verteilung der Chromosomenlängen ist für die Patienten (schwarz) im Vergleich zu den Kontrollen (grau) bei beiden Chromosomen deutlich in Richtung kürzerer Längen verschoben. Die Länge jedes Chromosoms wurde zweifach bestimmt und die Chromosomen gleicher Länge in 0,3 μm - Intervallen gruppiert.

3.3.3 Die Kernmembran wird nicht vorzeitig aufgelöst

Der Zellkern wird durch eine doppelte Membran vom restlichen Cytoplasma abgetrennt. Die Kernlamina, eine zusätzliche zweidimensionale Struktur an der inneren Membran, ermöglicht eine Stabilisierung dieser Membran (Aebi *et al.*, 1986). Lamine, eine Klasse der Intermediärfilamente, bilden die Bausteine dieser Struktur. Innere Kernmembran und Kernlamina bilden Anheftungsstellen für Chromatin und spielen somit für die Organisation der Chromosomen innerhalb des Kerns eine wichtige Rolle (Stuurman *et al.*, 1998; Gruenbaum *et al.*, 2005). Mit dem Durchlaufen der Mitose ist auch ein zyklischer Auf- und Abbau der Kernmembran bzw. der Kernlamina verbunden. Mit dem Eintritt in die Prometaphase werden Lamine phosphoryliert - die Kernlamina verliert an Stabilität und zerfällt. Lamin B bleibt an die Membranvesikel gebunden (Stuurman *et al.*, 1998). Der Wiederaufbau der Kernmembran beginnt vermutlich in der späten Telophase (Broers *et al.*, 2004). Antikörper gegen diese Lamine ermöglichen demnach einen Nachweis der Kernmembran. Ziel der Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern gegen Lamin B war es, herauszufinden, ob bei unseren Patienten neben dem Chromosomenzyklus auch der Membranzyklus gestört ist und ob die Störung eines der beiden Prozesse eventuell den anderen beeinflussen könnte. Es konnte jedoch immunzytochemisch nachgewiesen werden, dass die Kernmembran in allen Prophase-ähnlichen Zellen erhalten und mit dieser Methode keine vorzeitige Auflösung der Kernmembran nachweisbar ist (Neitzel *et al.*, 2002) (Abbildung 18).

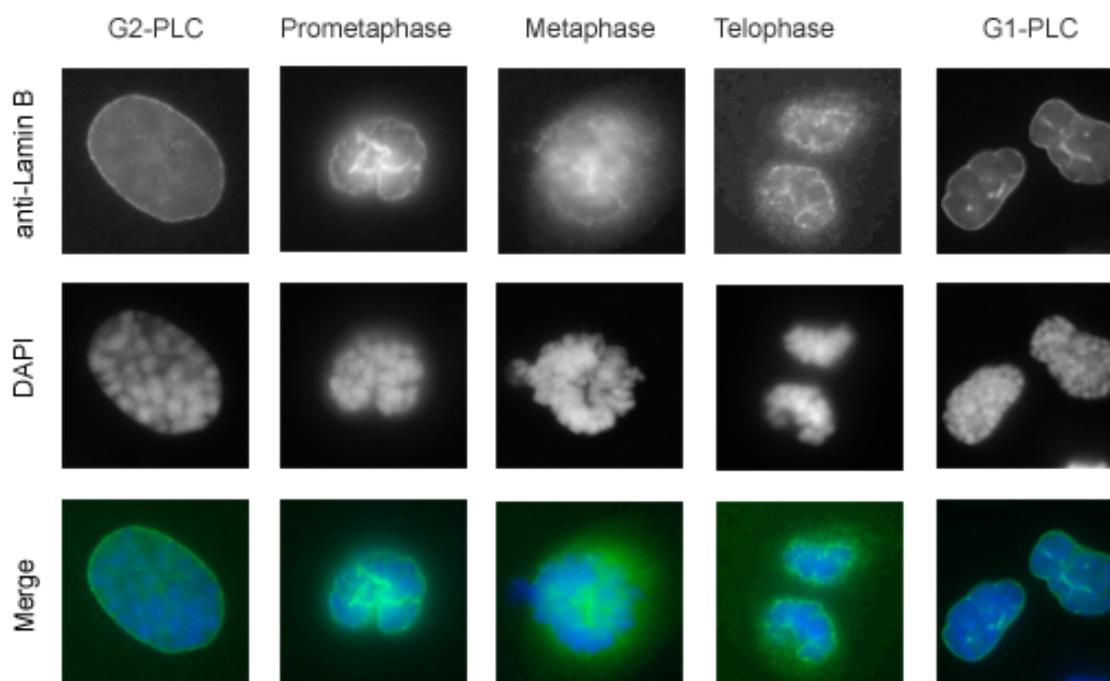


Abbildung 18 **Nachweis der Kernmembran an Patientenzellen.** Die Kernlamina, dargestellt mit Antikörpern gegen Lamin B (oberste Reihe, FITC-markiert) ist bei G2-PLC unangetastet. Die Auflösung beginnt in der Prometaphase. In der Metaphase hat sich die Kernmembran komplett aufgelöst. Sie beginnt sich während der Telophase neu zu formieren. In der frühen G1 Phase ist sie trotz weiterhin bestehender Chromosomenkondensation wieder vollständig aufgebaut. Mittlere Reihe: Darstellung der Chromatinmorphologie durch DAPI-Färbung. Untere Reihe: Überlappende Darstellung von anti-Lamin B (grün) und DAPI (blau).

Lediglich in Zellen, die von der Morphologie der Chromosomen als Prometaphasen klassifiziert wurden, beginnt sich die Kernmembran aufzulösen. Es sei hier angemerkt, dass dieser Übergang fließend ist und die Klassifizierung von der Einschätzung des Betrachters abhängt. Doch bei der Auswertung vieler Experimente auch in Kombination mit anderen Immunfärbungen (siehe auch Abschnitte 3.4.3.ff) ergaben sich keinerlei Hinweise auf eine vorzeitige Auflösung der Kernmembran im Zusammenhang mit der vorzeitigen Chromosomenkondensation. Ebenfalls ergaben sich keine Hinweise auf eine verspätete Neubildung der Kernmembran in der Telophase.

3.3.4 Untersuchungen des Centrosomenzyklus und des Spindelapparates

Ein weiteres klassisches Charakteristikum der Mitose ist der Auf- und Abbau sowie die Positionierung der Spindel. Die Separation der duplizierten Centrosomen in zwei klar distinkte Mikrotubuli-organisierende Zentren und ihr Wandern entlang der nukleären Peripherie zu den Polen ist das früheste lichtmikroskopisch erkennbare Ereignis der Mitose (Aubin *et al*, 1980; McIntosh & Koonce, 1989). Am Ende der Prophase ist die Polbildung dann abgeschlossen und die Centrosomen liegen sich im Allgemeinen gegenüber, auch wenn z.B. die Arbeit von Aubin und Mitarbeitern (Aubin *et al*, 1980), darauf hindeutet, dass die zeitliche Koordinierung nicht

immer exakt ist. Der Aufbau des Spindelapparates geschieht in normalen Zellen parallel zur Chromosomenkondensation am G2/M Übergang in der Prophase. Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass eine Deregulation des Centrosomenzyklus mit Aneuploidie und Tumorbildung korreliert (siehe unter anderem Ghadimi *et al*, 2000; D'Assoro *et al*, 2002). Ein korrekter Aufbau des Spindelapparates und Bindung an die Kinetochoren ist ein essentieller Teil der Mitose. Fehler in diesem Prozess führen ebenfalls zu Aneuploidie und erhöhter Krebsdisposition. Daher wird dieser Prozess am sogenannten Spindelcheckpoint sehr rigide überwacht (Bharadwaj & Yu, 2004). Alle weiteren Proteine, die von den unterdessen bekannten Genen für primäre Mikrozephalie kodiert werden (MCPH5/ASPM, (Bond *et al*, 2002), MCPH3/CDK5RAP2 und MCPH6/CENPJ, (Bond *et al*, 2005), sind mit den Centrosomen bzw. der Spindel assoziiert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen γ -Tubulin und α -Tubulin wurden die Centrosomen bzw. die Spindel dargestellt und untersucht. Mit Hilfe von Cytochalasin B und Chromosomen-spezifischen FISH Proben wurde die Fehlverteilungsrates in den Zellen unserer Patienten untersucht.

3.3.4.1 Die Separation der Centrosomen ist nicht an die vorzeitige Chromosomenkondensation gekoppelt

Mit einem Antikörper gegen γ -Tubulin wurde das Verhalten der Centrosomen bei der Patientenzelllinie 562SV untersucht und mit der Kontrollzelllinie LN9SV verglichen. γ -Tubulin ist Teil der pericentriolaren Matrix und kann daher als Centrosomenmarker verwendet werden (Zheng *et al*, 1991). Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und die Chromosomen mit DAPI gegengefärbt. Es wurden in mehreren Experimenten insgesamt über 2500 Zellen jeweils von Patient und Kontrolle hinsichtlich des Status der Centrosomen ausgewertet. Dabei ergaben sich im Vergleich zur Kontrolle keine Hinweise auf eine an die Chromosomenkondensationsstörung gekoppelte vorzeitige Centrosomenseparation. Die Anzahl der Zellen mit separierten Centrosomen war im Vergleich nicht deutlich erhöht (Patient: 8 %, Kontrolle 6 %, Abbildung 19). Der Großteil der PLCs zeigt keine separierten Centrosomen (Abbildung 19A). Lediglich bei 16,8% der PLCs war eine Separation der Centrosomen zu beobachten, was etwa einem Anteil von 28% der G2-PLCs entspricht. Von diesen separierten Centrosomen hatte sich auch ein großer Teil kaum von einander entfernt. Es kann vermutlich davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Zellen um echte Prophasen handelt. *

* Die Auswertung der von mir durchgeführten Experimente zur Separation der Centrosomen erfolgte teilweise durch Reyk Richter im Rahmen seiner Diplomarbeit.

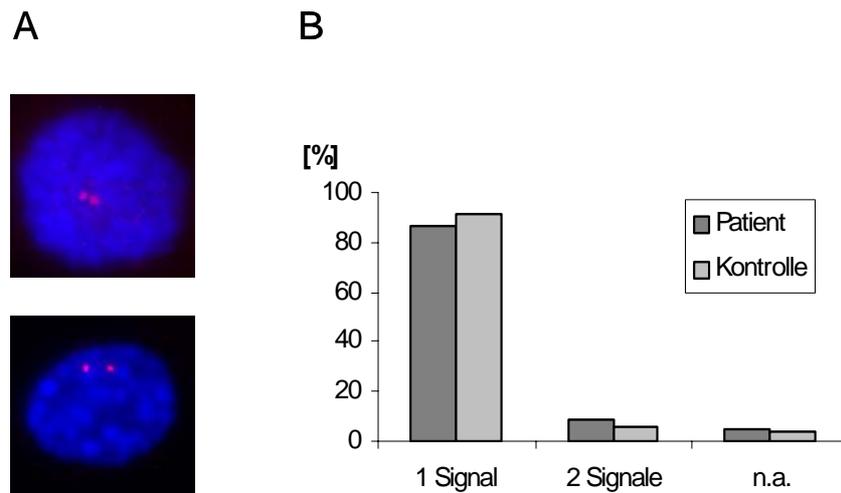


Abbildung 19 **Analyse des Centrosomenzyklus bei MCPH1 Defizienz** (A) Darstellung der Centrosomen mit anti- γ -Tubulin (TRITC-markiert) auf Patientenzellen. In der G2 Phase hat sich das Centrosom (rot) verdoppelt (oben). Nur in wenigen späten Prophase-ähnlichen Zellen beginnen sich die Centrosomen zu separieren (unten). Darstellung der Chromatinmorphologie durch DAPI-Färbung (blau). (B) Die Anzahl von Zellen mit bereits separierten Centrosomen ist im Vergleich zur Kontrollzelllinie nicht deutlich erhöht. (n.a. = nicht auswertbar).

3.3.4.2 Die Spindel wird normal ausgebildet

Am Ende der Prophase, nach Abbau der Kernmembran, werden die Chromosomen an der Mitosespindel befestigt und positioniert. Die Grobmorphologie der Spindel wurde immunzytochemisch mit Hilfe von Antikörpern gegen α -Tubulin untersucht. Die Kinetochoren wurden durch humanes CREST Antiserum gefärbt. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf Fehler beim Auf- und Abbau bzw. Positionierung des Spindelapparates (Abbildung 20).

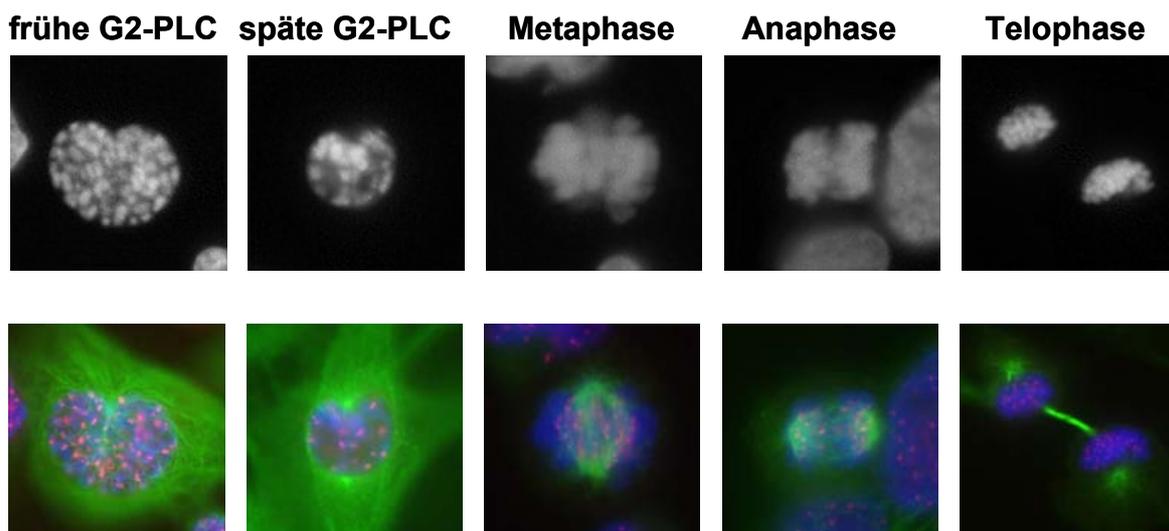


Abbildung 20 **Darstellung der Spindel in Patientenzellen**. Oben: Das Chromatin wurde mit DAPI gegengefärbt. Unten: Darstellung der Spindel mit Antikörpern gegen α -Tubulin (grün). Die Kinetochoren wurden mit humanem CREST-Antikörpern dargestellt (rot). DAPI (blau). In der G2 Phase wird das Tubulinnetzwerk von einem einzelnen Zentrum (Centrosom) organisiert. In der späten G2 Phase liegen sich zwei Pole gegenüber. Zur Metaphase hat sich der Spindelapparat ausgebildet und die Chromosomen sind auf der Äquatorialebene angeordnet. Während der Anaphase werden die Schwesterchromatiden getrennt und zu den Spindelpolen gezogen. In der Telophase haben die Chromosomen die Spindelpole erreicht. Ein Teil der Tubuline verbleibt im Midbody.

3.3.4.3 Bestimmung der Fehlverteilungsrates (*nondisjunction rate*)

Fehler im Centrosomenzyklus oder im *spindle assembly checkpoint* führen zu erhöhten chromosomalen Fehlverteilungsrates. Um zu untersuchen, ob die Chromosomenkondensationsstörung einen Einfluss auf die Segregation der Chromosomen in der Anaphase hat, wurde die Fehlverteilung zweier Chromosomen (Chromosomen 8 und 18) bei zwei Patienten und vier gesunden Kontrollen untersucht. Dazu wurden durch Behandlung mit Cytochalasin B binukleäre Lymphozyten hergestellt und auf diese spezifische Zentromerproben für die beiden oben genannten Chromosomen (CEP-8, SpectrumOrange; CEP-18, SpectrumGreen, Vysis) hybridisiert (Abbildung 21). Die Kriterien zur Auswertung der Präparate wurden in (Zijno *et al*, 1994; Shi *et al*, 2000) beschrieben. Dann wurde am Fluoreszenzmikroskop jeweils die Signalverteilung auf den beiden Zellkernen innerhalb einer binukleären Zelle bestimmt. Im Durchschnitt zeigten 0,56 % der Patientenzellen eine Fehlverteilung eines der beiden Chromosomen ($n_{\text{gesamt}}=1977$; SD $\pm 0,09$). Im Vergleich zu einem Wert der Kontrollen von 0,58 ($n_{\text{gesamt}}=3427$; SD $\pm 0,34$) konnte kein Unterschied gefunden werden (Neitzel *et al*, 2002) (Tabelle 3).

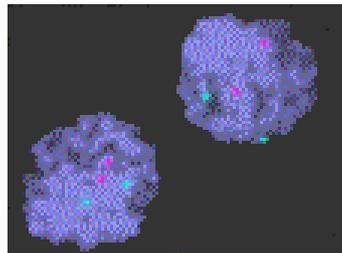


Abbildung 21 **Analyse der Nondisjunctionrate.** Nach 44-stündiger Cytochalasinbehandlung erfolgte die FISH mit Zentromerproben für Chromosom 8 (rot) und 18 (grün). Die dargestellten Kerne einer binukleären Zelle zeigen eine Normalverteilung der Signale.

Die statistische Analyse durch χ^2 -Testung ergab keinen signifikanten Unterschied für die Nondisjunctionrate zwischen Patienten und Kontrollen ($\chi^2 = 0.517$; $P > 0,05$). Untersuchungen von Anaphase-Konfigurationen an Präparaten von in-situ fixierten Fibroblasten hatten vor Beginn meiner Arbeiten ebenfalls keinen Hinweis auf Störungen der Anaphase ergeben.

Tabelle 3 **Analyse der Fehlverteilungsrates in Lymphozyten von MCPH1 Patienten**

Individuum	Anzahl ausgewerteter Zellen	Anzahl der Zellen mit Fehlverteilung der Chromosomen 8 oder 18 in Prozent; (n)
Patient 1	1006	0,50 (5)
Patient 2	971	0,62 (6)
Kontrolle 1	596	0,84 (5)
Kontrolle 2	931	0,97 (9)
Kontrolle 3	948	0,32 (3)
Kontrolle 4	952	0,32 (3)
Σ Patienten	1977	0,56 \pm 0,09 (11)
Σ Kontrollen	3427	0,58 \pm 0,34 (20)

3.3.5 Untersuchung der Nucleoli in den Prophase-ähnlichen Zellen

Der Nucleolus oder die Nucleoli, Ort der ribosomalen RNA-Synthese, sind die prominentesten membranlosen Subkompartimente im Zellkern. Während der Mitose müssen diese aufgelöst werden, um am Ende der Mitose wieder aufgebaut zu werden. Komponenten der Nucleoli spielen vermutlich eine Rolle bei der Dekondensation von Chromatin (Shi *et al*, 1987; Erard *et al*, 1988). Fibrillarin ist ein Teil der nucleolaren snRNP-Partikel (= *small nuclear ribonucleoprotein particles*). Antikörper gegen Fibrillarin können somit als nucleolare Marker verwendet werden. Die Proteine der Nucleolus-organisierenden Region (NOR) können mit Silberfärbung (*AgNOR-staining*) nachgewiesen werden (Goodpasture & Bloom, 1975). Die Auflösung der Nucleoli findet im Allgemeinen in der späten Prophase / Prometaphase statt (Leblond & El-Alfy, 1998). *Prenucleolar bodies* erscheinen in der Anzahl der aktiven NORs während der frühen Telophase (Dundr *et al*, 2000).

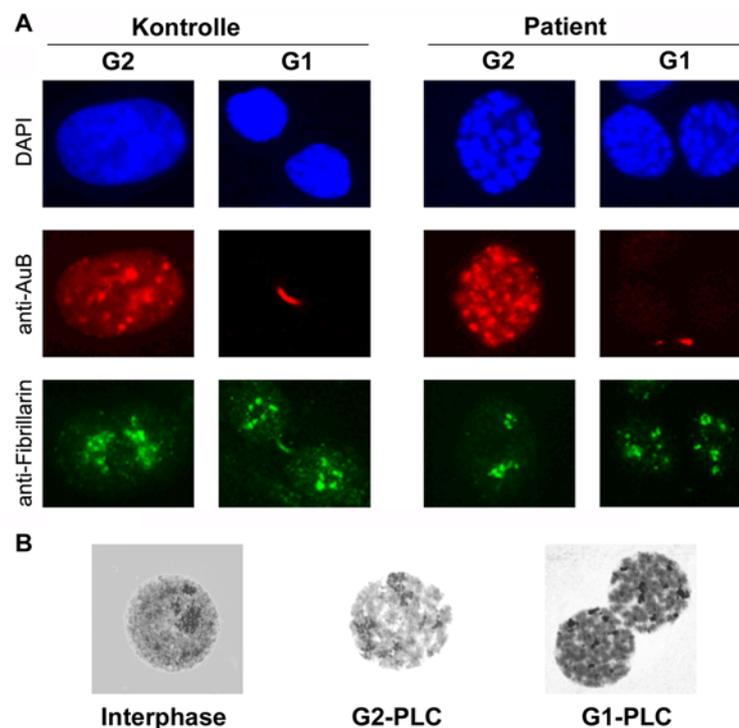


Abbildung 22 **Analyse der Nucleoli auf den kondensierten Chromosomen.** (A) Darstellung der Nucleoli auf Kontrollzellen und Patienten-PLC mittels Fibrillarinantikörper (FITC-markiert, grün). Die entsprechende Zellzyklusphase bei Kontrollen wurde mit Hilfe von Aurora B Antikörpern (TRITC-markiert, rot) definiert. Die Patientenzellen zeigen auch auf kondensiertem Chromatin ein den Kontrollen entsprechendes Färbemuster. (B) Auch AgNOR-Färbung zeigt zusammenhängende Nucleoli auf kondensiertem Chromatin (G2-PLC) und die Bildung von pre-nucleolar bodies auf G1-PLC.

Mit Hilfe eines Fibrillarin-Antikörpers* in Kombination mit Aurora B-Antikörpern und AgNOR-Färbung konnte anhand der SV40 transformierten Fibroblastenlinie von Patient 1 gezeigt werden, dass bei einem Großteil der G2-PLC die Nucleoli erhalten waren und sich nicht von G2 Zellen der Kontrollzelllinie unterschieden (Abbildung 22 A). Nach Abschluss der Mitose fanden

* Die Auswertung der von mir durchgeführten Experimente mit Antikörpern gegen Fibrillarin erfolgte teilweise durch Reyk Richter im Rahmen seiner Diplomarbeit.

sich auf den G1-PLCs mehrere kleine Foci, offensichtlich *prenucleolar bodies*, auch diese unterschieden sich nicht von der mittels des Midbodies definierten Vergleichsfraktion bei der Kontrolle (Abbildung 22 A). Diese Befunde wurden an PHA-stimulierten T-Lymphozyten mittels Silberfärbung bestätigt (Abbildung 22B).

3.3.6 Untersuchung des DNA-Schadenskontrollpunktes

Es liegt nahe anzunehmen, dass der Chromosomenkondensationsdefekt einen Einfluss auf die Fähigkeit der Patientenzellen zur Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden haben könnte. Außerdem enthält Microcephalin drei BRCT Domänen. Diese kommen gehäuft bei Proteinen vor, die eine Rolle als Vermittler von DNA-Schäden haben (siehe Einleitung 1.1). Daher führte ich einige Experimente durch, um die Erkennung von DNA Schäden und deren Reparatur in den Zellen von MCPH1 Patienten zu überprüfen. Die Patientenzellen zeigten keine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit (Daten nicht gezeigt) und ebenfalls keine erhöhte SCE- (*sister chromatid exchange*) Rate. Diese lag mit 4,5 - 5,5 Austausch pro Zelle im Normbereich. Außerdem demonstrierte die sequentielle Aufarbeitung von lymphoblastoiden Zellkulturen der Patienten nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen ionisierender Strahlung, dass die Zellen in der Lage sind, trotz der vorzeitigen Chromosomenkondensation und dem Verlust funktionellen Microcephalins DNA-Schäden zu erkennen und als Folge daraus den Zellzyklus anzuhalten. Für diese Reihe von Experimenten wurden lymphoblastoide Zellkulturen verschiedenen Dosen (0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy) ionisierender Strahlung ausgesetzt. In regelmäßigen Abständen wurden die bestrahlten Kulturen fixiert, gefärbt und kodiert ausgewertet. Von jeder Zelllinie wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils 1000 Zellen visuell bewertet und der Mitoseindex sowie der Anteil Prophase-ähnlicher Zellen bestimmt (Abbildung 25).

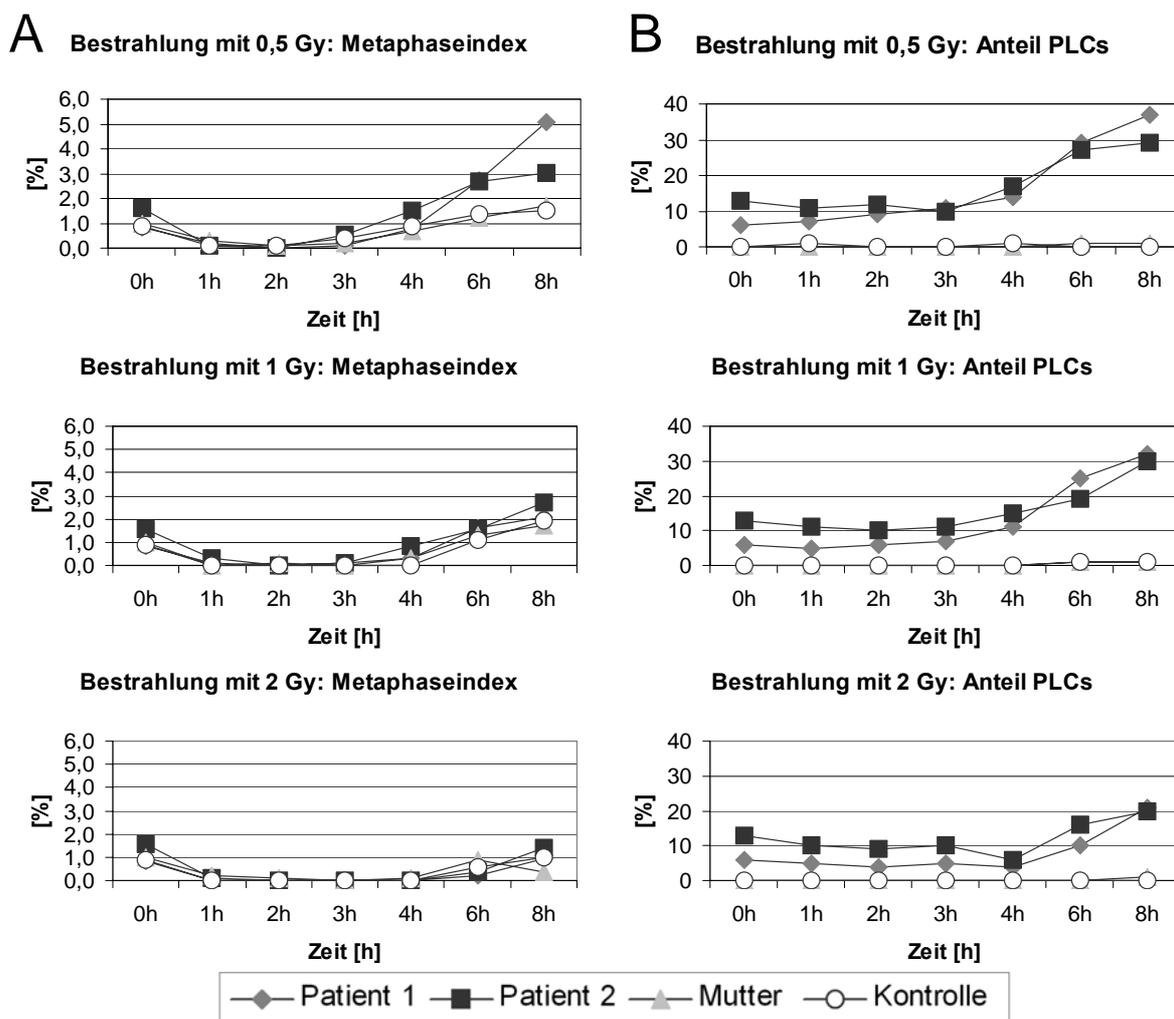


Abbildung 23 **Verhalten nach Bestrahlung.** (A) Patienten und Kontrollen stoppen nach Bestrahlung den Zellzyklus. Nach einer Stunde fällt der Metaphaseindex auf null. Die Zeit bis zum Wiedereinsatz des Zellzyklus ist dosisabhängig (Steigende Energiedosis 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy von oben nach unten). Normalisierung wird nach 4h (0,5 Gy), 6h (1 Gy), 8h (2 Gy) erreicht. (B) Der Anteil der Prophase-ähnlichen Zellen der Patienten bleibt nach Bestrahlung zunächst konstant und steigt in etwa mit Erreichen der Normalisierung des Metaphaseindex, bzw. kurz davor über den Basiswert. (Steigende Energiedosis 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy von oben nach unten, Anstieg über Normalwert: 4h (0,5 Gy), 4h-6h (1 Gy), 6h-8h (2 Gy). Im weiteren Verlauf steigt der Anteil deutlich über den Normalwert, siehe dafür auch Abbildung 26.

Bereits eine Stunde nach Bestrahlung fällt der Mitoseindex bei Patienten- und Kontrollzellen auf annähernd null, so dass davon auszugehen ist, dass die Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert werden. Die Dauer dieses Zellzyklusarrestes ist dosisabhängig (Abbildung 25A). Im Gegensatz zum Mitoseindex bleibt der Anteil der Prophase-ähnlichen Zellen zunächst konstant und steigt mit der Wiederaufnahme der Proliferation deutlich an. Der Anteil der PLCs kann sich bis um das fünffache erhöhen (Abbildung 25 B, Patient1, 0,5 Gy). Dieser Effekt ist statistisch signifikant ($\chi^2(t_0;t_8)$, $p < 0,001$). Er bleibt auch noch 24h nach Bestrahlung nachweisbar und lässt sich auch an PHA-stimulierten T-Lymphozyten nachweisen (Abbildung 26C). Der Anteil an PLCs wird durch die Bestrahlung so deutlich erhöht, dass der zelluläre Phänotyp der Kondensationsstörung auch bei dem in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Patient 5 (c.80C>G, p.Thr27Arg) deutlich zu erkennen ist. Auch die Erhöhung des Anteils Prophase-ähnlicher Zellen

ist dosisabhängig. Je höher die Strahlendosis, desto größer der Anteil Prophase-ähnlicher Zellen nach 24h (Abbildung 26 B).

Um die Zellzyklusverteilung der PLCs nach Bestrahlung zu untersuchen, wurde die Zelllinie Patient 1 SV nach Bestrahlung sequentiell direkt auf Deckgläschen fixiert und mit Antikörpern gegen Aurora B Kinase gefärbt, um zwischen G1- und G2-PLCs zu differenzieren. Wie erwartet, waren zu Beginn etwas weniger als 50 % der Prophase-ähnlichen Zellen in G1. Vier Stunden nach Bestrahlung verschob sich der Anteil explizit in Richtung G2 (bis 82,4 %). Dies weist darauf hin, dass die Zellen in G2 akkumulieren. Dieser Effekt hält auch nach 24h an*.

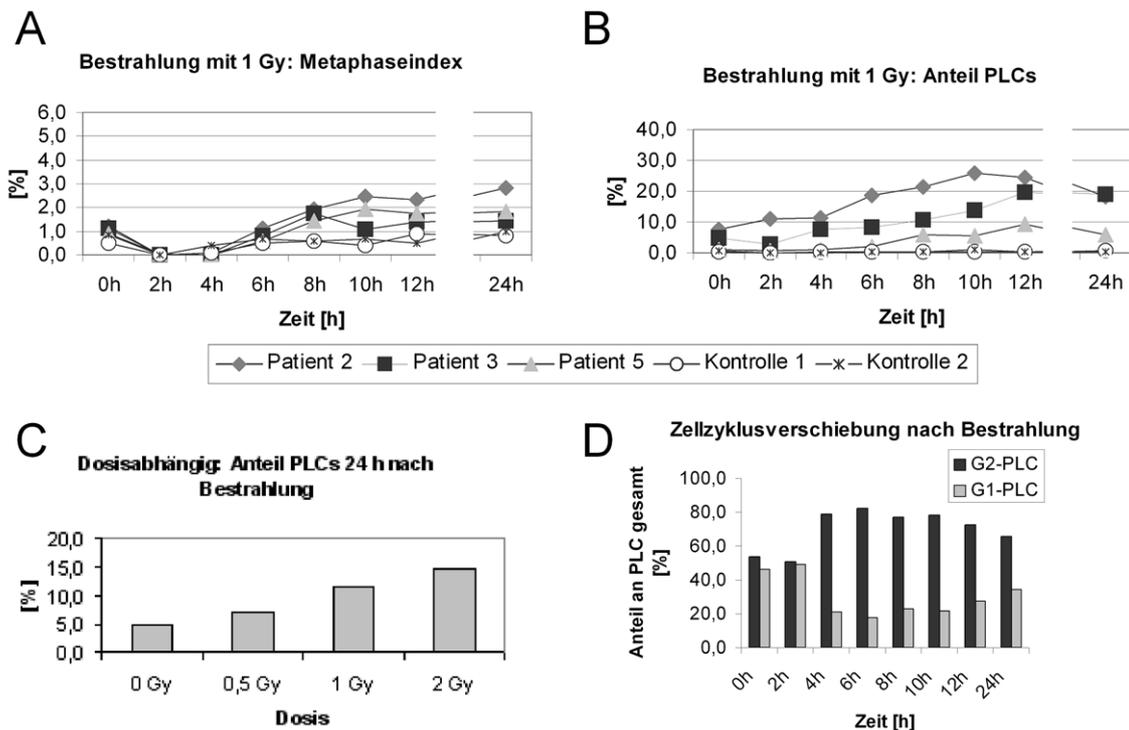


Abbildung 24 **Langzeiteffekt nach Bestrahlung** (A) Der Metaphaseindex fällt bei Patienten wie Kontrollen 2h nach Bestrahlung mit 1 Gy auf null und steigt 6h nach Bestrahlung wieder an. (B) Der Anteil der Prophase-ähnlichen Zellen beginnt 6h- 8h deutlich über den Basiswert hinauszusteigen und hat sich auch nach 24h noch nicht normalisiert. (C) 24h nach Bestrahlung ist der Anteil der Prophase-ähnlichen Zellen bei Patient 1 dosisabhängig erhöht. (D) Patientenzellen wurden zur Differenzierung von G1- und G2-PLC nach Bestrahlung mit Antikörpern gegen Aurora B Kinase gefärbt. 4h nach Bestrahlung mit 1 Gy erhöht sich der Anteil Aurora B positiver PLC (= PLC in G2 Phase) deutlich. Dieser Effekt hält auch nach 24h noch an.

3.4 Die Zellen als Werkzeug: Analyse des Signalwegs der fehlregulierten Chromosomenkondensation

Nach der Identifikation von MCPH1-Mutationen als genetischer Ursache des PCC Syndroms sowie des dafür spezifischen Chromosomenkondensationsdefektes, versuchte ich mit verschiedenen Methoden, die Funktion des Microcephalin-Proteins weiter zu charakterisieren. Dazu gehörte, mit Hilfe eines *Yeast-two-Hybrid-Screens* mögliche Interaktoren des Proteins zu

* Die Auswertung der von mir durchgeführten Experimente mit Antikörpern gegen Aurora B nach Bestrahlung zur erfolgte teilweise durch Nadine Sternberg im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

identifizieren. Außerdem wurde versucht, den Defekt in den mutanten Zelllinien funktionell zu komplementieren, um anschließend die Funktion bestimmter Domänen des Proteins durch gerichtete Mutagenese zu charakterisieren. Zusätzlich nutzte ich die Eigenschaften unserer Patientenzelllinien um über Lokalisations- und Kollokalisationsstudien mit Antikörpern gegen bekannte *Keyplayer* der Chromosomenkondensation/dekondensation den Signal- und Funktionsweg der Chromosomenkondensation zu analysieren. Schließlich wurde dieser durch den Verlust der Microcephalinfunktion gestörte Reaktionsweg durch gezielte Ausschaltung bestimmter Proteine mittels RNA-Interferenz noch genauer untersucht.

3.4.1 Array-basierter Yeast-two-Hybrid-Screen

In Zusammenarbeit mit der AG von Prof. Erich Wanker am Max-Delbrück-Zentrum in Berlin-Buch wurde eine Array-basierter *Yeast-two-Hybrid-Screen* (Y2H) durchgeführt. Dabei wurde der automatisierte Screen gegen eine Array-Library aus ca. 5000 Klonen von cDNA Fragmenten (größtenteils aus humanem fötalem Gehirngewebe) am Max-Delbrück-Zentrum durchgeführt (Stelzl *et al*, 2005). Es wurden 6 Fragmente des MCPH1-Gens für den Y2H-Screen ausgewählt, darunter das gesamte Gen (siehe Abbildung 25). Die Klonierungsarbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Reyk Richter im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.

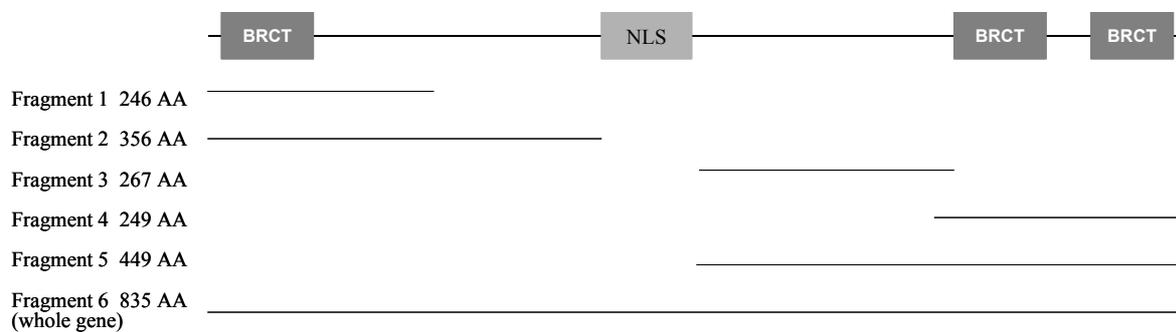


Abbildung 25 **Darstellung der für den Y2H-Screen ausgewählten MCPH1-Fragmente**, darunter das gesamte Gen (Fragment 6). Bei den Fragmenten 1-5 wurde das *nuclear localization signal* ausgeschlossen, um Interaktionen mit Kerntransportern zu vermeiden.

Fragment 2 zeigte Autoaktivierung und wurde deswegen vom Screen ausgeschlossen. Alle weiteren Fragmente wurden als *baits* gegen die cDNA-Bibliothek getestet. In einem ersten Screen wurden 7 potentielle Kandidaten identifiziert. Diese konnten aber im *Backmating* nicht verifiziert werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich dabei nicht um echte Interaktoren handelt. Der Vollständigkeit halber sind die sieben positiven Klone aus dem ersten Durchlauf jedoch in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4 Kandidaten nach dem erste Screen

Kandidat	vollständige Bezeichnung(en)	Größe [AS]	Quelle
APOC1	Apolipoprotein C-1 (Vorläufer)	83	P02654 (swissprot)
FTH1	Ferritin schwere Kette 1	190	P02794 (swissprot)
GGPS1	Geranylgeranyl-Diphosphat synthase	300	NP_004828 (ncbi)
KIAA1862	Keine	1070	NP_115923 (ncbi)
SCN2A2	Natriumkanal TypII alpha2-Untereinheit	2005	NP_066287 (ncbi)
TNRC4	Trinucleotide repeat containing 4; CELF3	465	AAN73884 (ncbi)
ZNF145	Zinkfingerprotein 145	673	NP_005997 (ncbi)

Alle Fragmente wurden zusätzlich in den prey-Vektor eingeführt und in die cDNA-Bibliothek aufgenommen. Sollten sich bei zukünftigen Screens mit diesen Klonen Interaktionen ergeben, werden wir darüber informiert.

3.4.2 Funktionelle Komplementation durch retroviralen Gentransfer

Die Chromosomenkondensationsstörung in den Zelllinien der Patienten sollte durch retroviralen Transfer einer funktionellen Kopie des Wildtypallels komplementiert („aufgehoben“) werden. Dies sollte die funktionelle Analyse bestimmter Domänen des Proteins ermöglichen, indem diese durch gerichtete Mutagenese ausgeschaltet, bzw. verändert würden, um dann auf ihre Fähigkeit zur Komplementation des Defekts zu testen. Über Sequenz-Tags könnte man zusätzlich die über die eingeführte Gensequenz exprimierten Proteine oder trunkierten Varianten per Antikörper oder GFP-Fusion nachweisen.

Die cDNA des gesamten Gens wurde in den retroviralen Vektor S11IN kloniert (S11IN-MCPH1). Über gerichtete Mutagenese wurde zusätzlich eine Variante mit einem stärkeren Kozak-Signal hergestellt (S11IN-MCPH1-K+), um eine stärkere Expression zu ermöglichen. Neben diesen beiden Forward-Konstrukten wurde das Gen zusätzlich in umgekehrter (reverser) Ausrichtung in den Vektor eingefügt (S11IN-MCPH1-r). Alle Konstrukte sowie der Vektor allein (S11IN) wurden in mehreren unabhängigen Experimenten durch retroviralen Gentransfer in lymphoblastoide Zelllinien und Fibroblasten (Patient 1 und 2, Kontrolle 1 und 2, Patient 1 SV, LN9 SV (Kontrolle)) eingebracht. In allen Ansätzen mit Gentransfer von S11IN alleine oder mit MCPH1-revers, konnten proliferierende Kulturen nach G-418-Selektion etabliert werden. Der Nachweis über die Integration des Vektors erfolgte über spezifische PCR. Die Transduktion des Konstruktes mit der reversen Orientierung des Gens zeigte keinerlei Auswirkung auf das Kondensationsverhalten von Kontroll- und Patientenzellen.

Dahingegen gelang es in keinem Experiment, proliferierende Kulturen zu etablieren, die eine eingeführte Kopie des Wildtyp MCPH1-Gens exprimierten. Es war demnach nicht möglich, den Chromosomenkondensationsdefekt durch retrovirale Transduktion mit MCPH1-Expressionsvektoren zu komplementieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Diese Ergebnisse wurden von Prof. Dr. D. Schindler in Würzburg reproduziert und entsprechen

auch den Erfahrungen von Dr. A. Jackson (Edinburgh) mit der Expression von MCPH1-GFP-Fusionsproteinen. Vermutlich ist eine durch den retroviralen Promotor vermittelte Überexpression von Microcephalin verantwortlich für einen Zellzyklusarrest. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen von Dr. Jackson (persönliche Mitteilung) zeigten in Kontrollzellen nach Transfektion mit einem MCPH1-GFP-Fusionskonstrukt eindeutig eine Arretierung im G2/M Kompartiment.

Tabelle 5 **Retrovirale Transduktion von MCPH1 in Patienten- und Kontrollzelllinien.** Dargestellt ist, ob es gelang proliferierende Kulturen unter Selektion herzustellen und ob eine Komplementation des zellulären Phänotyps zustande kam: Proliferation / Komplementation

Zelllinie:	Konstrukt:			
	S11IN	S11IN-MCPH1-r	S11IN-MCPH1	S11IN-MCPH1-K+
Patient 2 (LCL)	+ / -	+ / -	- / -	- / -
Patient 4 (LCL)	+ / -	+ / -	- / -	- / -
Kontrolle (LCL)	+ / -	+ / -	- / -	- / -
Patient 1(SV40)	+ / -	+ / -	- / -	- / -
Kontrolle (SV40)	+ / -	+ / -	- / -	- / -

3.4.3 Analyse von Kondensationsfaktoren – Was faltet die Chromosomen?

Wie in der Einleitung (1.3.2) beschrieben sind unterdessen einige Proteine bekannt, denen eine Rolle bei der Verpackung des Genoms in die Metaphasechromosomen zugeschrieben wird. Wie und wann diese Funktionen *in vivo* ausgeübt werden, ist jedoch größtenteils noch ungeklärt. Im Besonderen sind die Vorgänge, die zur Initiation der Chromosomenkondensation führen, weitestgehend unbekannt. Hinderlich bei der Dissektion der Chromosomenkondensationsmaschinerie ist das außerordentliche Tempo mit dem die Verdichtung des Chromatins in die Metaphasechromosomen vonstatten geht. Die Zelllinien der MCPH1 Patienten stellen ein hervorragendes Werkzeug dar, um einige der Zusammenhänge zu untersuchen und mittels Lokalisierungsstudien den Anteil bestimmter Proteine an der Initiation der Chromosomenkondensation zu analysieren. Im Rahmen meiner Arbeit habe ich einige *keyplayer* der Chromosomenkondensation mit spezifischen Antikörpern immunzytochemisch und durch Immunoblotting an den Patienten- und Kontrollzellen analysiert: Aurora B Kinase, Cohesin, Cyclin A, Cyclin B, Condensin I, Condensin II, Phospho-Histon H3 (Ser10), Phospho-Histon H3 (Ser28), INCENP, ISWI, PDS5 und Topoisomerase II α . Zusätzlich wurde durch selektiven *knockdown* einiger der genannten Proteine mittels RNA Interferenz deren Einfluss auf die durch den MCPH1-Funktionsverlust ausgelöste Chromosomenkondensationsstörung untersucht.

3.4.3.1 Histon H3 Phosphorylierung und der *chromosomal passenger* Komplex

Wie in der Einleitung (1.3.2.4) beschrieben, geht die normale Prophasenkondensation mit einer Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 (H3P-S10) einher. Diese Phosphorylierung beginnt bereits in der späten G2 Phase in pericentromerischen Foci und breitet sich zu Beginn der sichtbaren Chromosomenkondensation über die Chromosomenarme aus. Die Dephosphorylierung beginnt in der Anaphase und ist kurz vor Ende der Telophase abgeschlossen (Hendzel *et al*, 1997). Eine weitere Mitose-spezifische Phosphorylierung von Histon H3 findet außerdem an Ser28 statt (H3P-S28) (Goto *et al*, 1999). Verantwortlich für diese Phosphorylierungen ist ein Komplex aus *chromosomal passengers*, der unter anderem Aurora B Kinase und INCENP enthält (Vagnarelli & Earnshaw, 2004). Aurora B reguliert daneben unter anderem die Dissoziation von Cohesin von den Prophase-Chromosomen (Gimenez-Abian *et al*, 2004). Ich untersuchte die Histon H3-Phosphorylierungen der MCPH1-Patientenzellen im Vergleich zu einer Kontrollzelllinie mittels Immunfluoreszenz, sowie die zelluläre Lokalisation von Aurora B Kinase.

3.4.3.2 Die Phosphorylierung von Histon H3 durch Aurora B Kinase ist nicht essentiell für die vorzeitige Chromosomenkondensation

Im Westernblot lassen sich keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen hinsichtlich der Menge von Aurora B feststellen (Abbildung 26A). Auch in der Immunfluoreszenz zeigte sich im Vergleich zu Kontrollen und Literaturangaben (u.a. Vagnarelli & Earnshaw, 2001; Crosio *et al*, 2002) ein normales Verhalten von Aurora B. 24% - 32% der Zellkerne von Kontrollen und Patienten ließen sich deutlich mit Antikörpern gegen Aurora B Kinase anfärben. Die Färbung ist spezifisch für die späte S und gesamte G2 Phase. Bei den Patientenzellen lokalisiert die Kinase auf den vorzeitig kondensierten G2 Phase Chromosomen, dabei ist eine angereicherte fokale Färbung im Zentromerbereich zu beobachten. In der Prometaphase und Metaphase ist das Protein fast ausschließlich an den Zentromeren zu finden. Zu Beginn der Zytokinese verbleibt Aurora B im *Midbody* (Abbildung 26B). INCENP zeigt ein ähnliches Verhalten (ohne Abbildung). Die fehlregulierte Chromosomenkondensation hat keinen, durch diese Methoden nachweisbaren Einfluss auf das Verhalten dieser beiden *chromosomal passenger*.

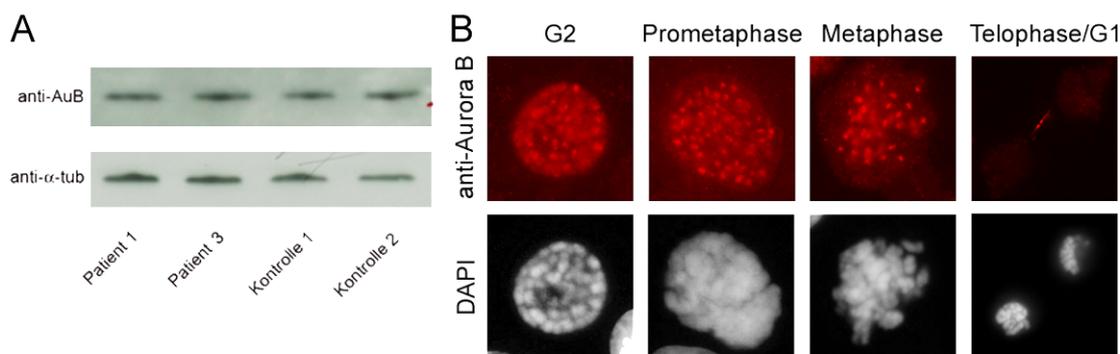


Abbildung 26 **Keine nachweisbare Fehlregulierung von Aurora B Kinase.** (A) Im Westernblot sind keine Mengenunterschiede zwischen Patienten und Kontrollen nachweisbar. (B) Normale Lokalisation der Kinase (dargestellt mit anti-Aurora B, oben, rot) in den verschiedenen mitotischen Phasen. Darstellung der Chromatinmorphologie durch DAPI-Färbung (unten).

Die Versuche mit Antikörpern gegen Histon H3 Phosphorylierungen (H3P) zeigen eindeutig, dass sowohl die Phosphorylierung an Ser10 (H3P-S10) als auch Ser28 (H3P-S28) nicht für die vorzeitige Chromosomenkondensation durch MCPH1-Defizienz erforderlich sind. (Siehe Abbildung 27). Der überwiegende Anteil von 84,9 % der Prophase-ähnlichen Zellen waren H3P-S10 negativ (Siehe Abbildung 27A). Eine quantitative Auswertung der Ko-Hybridisierung mit Cyclin B1 Antikörpern ergab, dass bei allen PLC mit einem H3P-S10-Signal bereits eine Akkumulation von Cyclin B1 stattgefunden hatte (11,6 % aller PLCs). Einige wenige Zellen zeigten Cyclin B1 Akkumulation ohne H3P-S10-Signal (3,5 % der PLCs). Bezogen auf die Gesamtheit aller Zellen konnten bei den Patientenzellen 3,8 % H3P-S10 positive Zellen nachgewiesen werden. Dieser Wert liegt in der Größenordnung der Kontrollen (4,5 %; n = 1000).

Auch durchflusszytometrische Untersuchungen an LCLs zeigten, dass es keine Unterschiede zwischen Patientenzellen und Kontrollen in Bezug auf den Anteil H3P-S10-positiver Zellen gab (Prof. Dr. D. Schindler, persönliche Mitteilung).

Auch für die Phosphorylierung an Ser28 ergab sich kein Zusammenhang mit der Chromosomenkondensationsstörung (Abbildung 27C). Die gleichzeitige Hybridisierung von direkt-markiertem anti-H3P-S10 und anti-H3P-S28 zeigte, dass ein großer Teil der PLCs (81,2 %; n = 330) ausschließlich mit dem P-S10-spezifischen Antikörper angefärbt wurden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Phosphorylierung erst zu einem späteren Zeitpunkt geschieht, vermutlich kurz vor Beginn der Prometaphase. Dies deckt sich mit den Angaben aus der Literatur (Crosio *et al*, 2002). Außerdem dauert die Phosphorylierung an S10 länger an, nämlich bis in die Telophase (vgl. Abbildung 27B und C).

Die Ergebnisse weisen nach, dass die vorzeitige Chromosomenkondensation in den Patientenzellen nicht mit einer vorzeitigen Phosphorylierung der beiden Serin-Residuen einhergeht und diese Phosphorylierungen somit, entgegen der Ansicht vieler Autoren (Henzel

et al, 1997; Goto *et al*, 1999; Wei *et al*, 1999; Schmiesing *et al*, 2000), nicht essentiell für die Initiation von Chromosomenkondensation sind.

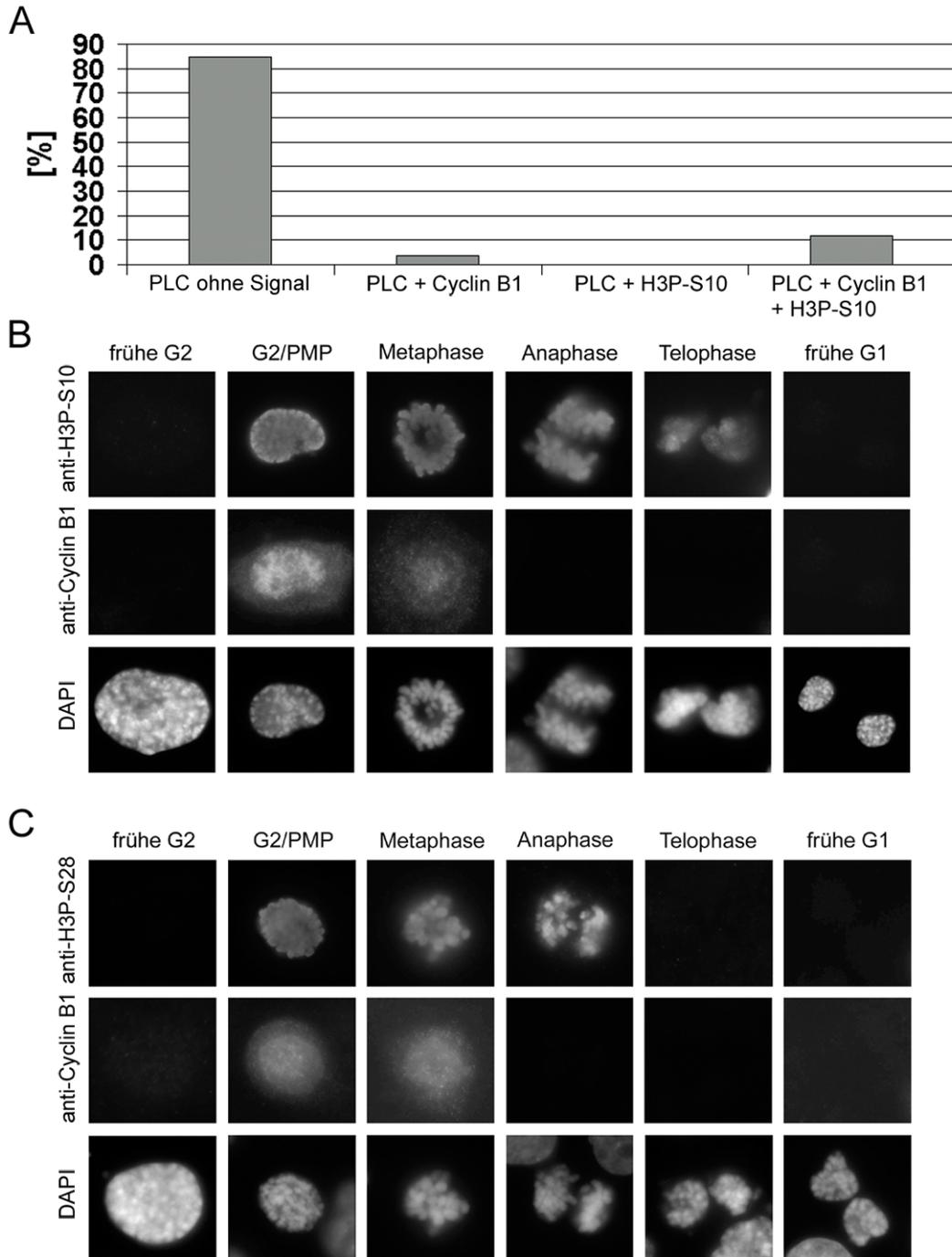


Abbildung 27 **Analyse der Histon H3 Phosphorylierung in MCPH1 defizienten Zellen.** (A) Quantitative Auswertung der Kohybridisierung von anti-H3P-S10 und anti-Cyclin B1. Die Mehrzahl der PLCs zeigen keine Phosphorylierung von Histon H3 an S10. Alle H3P-S10-positiven Zellen zeigen Akkumulation von Cyclin B1. (B) Phosphorylierungsmuster von Histon H3 an Serin 10 in verschiedenen Zellzyklusphasen und gleichzeitige Darstellung der Cyclin B1-Akkumulation. Oberste Reihe: Anti-H3P-S10 (TRITC-markiert). Mittlere Reihe: Anti-Cyclin B1 (FITC-markiert). Untere Reihe: Darstellung der Chromatinmorphologie mit DAPI. (C) Phosphorylierungsmuster von Histon H3 an Serin 28. Sehr wenige Prophase-ähnliche Zellen sind phosphoryliert. Die Phosphorylierung beginnt erst kurz vor der Prometaphase. Bereits in der Telophase ist Histon H3 an S28 weitestgehend dephosphoryliert. Oberste Reihe: Anti-H3P-S28 (TRITC-markiert). Mittlere Reihe: Anti-Cyclin B1 (FITC-markiert). Untere Reihe: Darstellung der Chromatinmorphologie mit DAPI.

3.4.3.3 Cohesin und Kohäsionsfaktoren

Auch Cohesin und die Kohäsionsfaktoren Pds5 und ISWI wurden mittels Immunfluoreszenz hinsichtlich ihrer Lokalisation in den Prophase-ähnlichen Zellen untersucht. Wie in der Einleitung (1.3.2.3) beschrieben, dissoziiert bei Vertebraten zu Beginn der Prophase ein Großteil des Cohesins von den Prophasechromosomen. Der verbleibende Rest wird zu Beginn der Anaphase abgelöst. Schon kurz nach der Telophase bindet der Komplex wieder an die Chromosomen (Losada & Hirano, 2005).

3.4.3.4 Vorzeitige Ablösung von Cohesin und Kohäsionsfaktoren

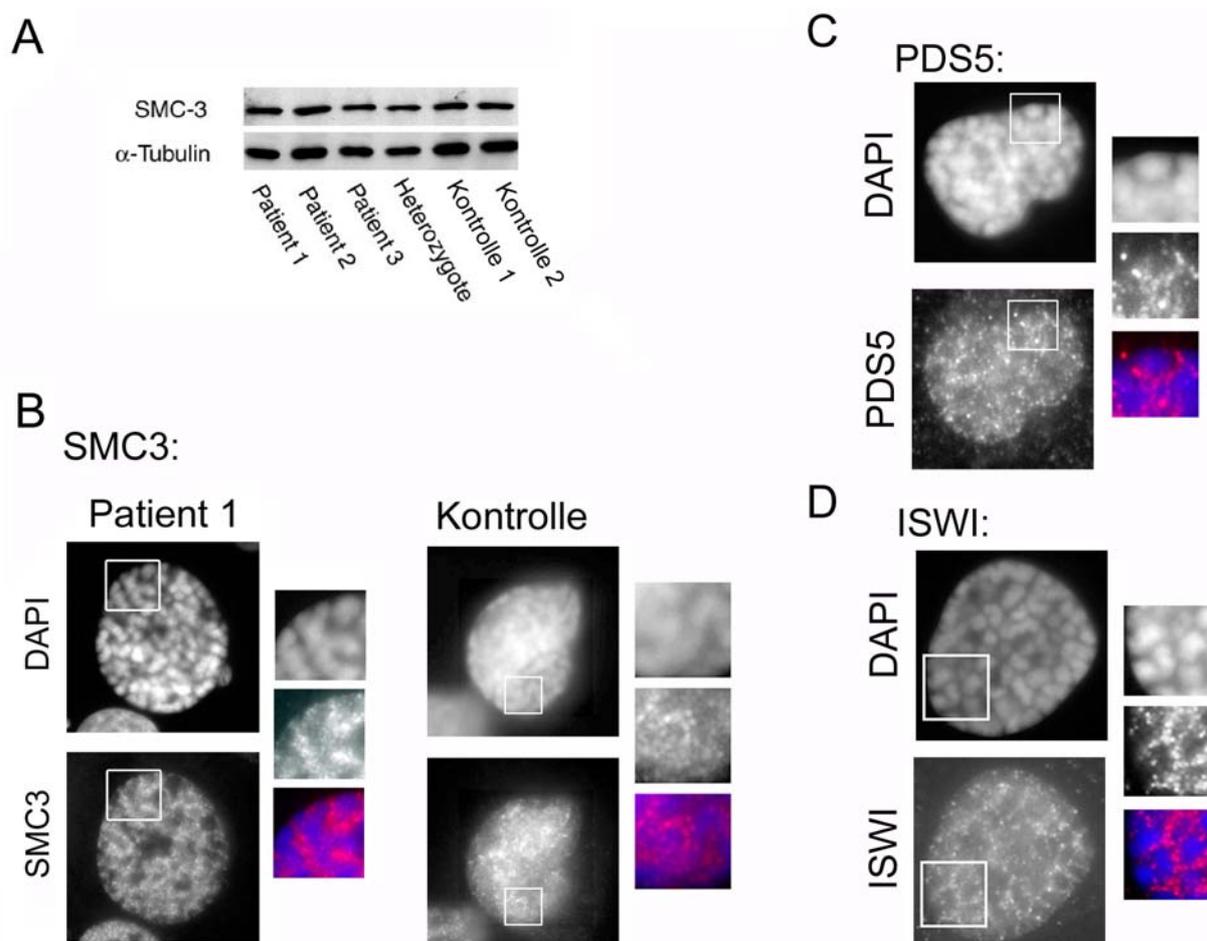


Abbildung 28 **Ergebnisse der Experimente mit Kohäsionsfaktoren.** (A) Westernblot mit Antikörpern gegen Cohesin (SMC3) mit Proteinlysaten aus lymphoblastoiden Zelllinien von Patienten, eines Heterozygoten und zweier Kontrollen, α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Es konnten keine Unterschiede in der SMC3-Gesamtmenge nachgewiesen werden. (B) Lokalisation der Cohesin-Untereinheit SMC3 auf einer Prophase-ähnlichen Patientenzelle und einer echten Prophase einer Kontrollzelllinie. Die kondensierten Chromosomen der MCPH1-defizienten Zellen werden von der Färbung ausgespart. Die eingerahmten Bereiche sind rechts vergrößert und signalverstärkt dargestellt: Oben: DAPI, Mitte: Cohesin/SMC3, Unten: gemeinsam, DAPI (blau), SMC3 (rot). Ein ähnliches, jedoch nicht so deutliches Bild ergibt sich für die Prophase der Kontrollzelllinie. (C) Lokalisation des Kohäsionsfaktors PDS5 auf Patientenzellen. Das Bild gleicht der Lokalisation von SMC3. Die eingerahmten Bereiche auf einer G1-PLC sind rechts vergrößert und signalverstärkt dargestellt. Oben: DAPI, Mitte: PDS5, Unten: gemeinsam, DAPI (blau), PDS5 (rot). (D) Lokalisation des Kohäsionsfaktors ISWI auf Patientenzellen. Das Bild gleicht ebenfalls der Lokalisation von SMC3. Die eingerahmten Bereiche auf einer G2-PLC sind unterhalb vergrößert und signalverstärkt dargestellt. Oben: DAPI, Mitte: ISWI, Unten: gemeinsam, DAPI (blau), ISWI (rot).

Die zelluläre Gesamtmenge von SMC3 ist im Westernblot nicht reduziert (siehe Abbildung 28A). In der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen SMC3 (Cohesin-Kern-Untereinheit) deutet sich aber eine vorzeitige Ablösung des Cohesins von den kondensierenden Chromosomen an. Normalerweise ist Cohesin fast über den gesamten Zellzyklus fest an das Chromatin gebunden. Bei Metazoen dissoziiert der Großteil dieser Komplexes zu Beginn der Prophase am G2/M-Übergang von den Chromosomen (Losada *et al*, 1998; Waizenegger *et al*, 2000). Die Immunfluoreszenzfärbung an den Patientenzellen zeigt, dass das SMC3 - Signal bei der Mehrzahl aller PLCs die kondensierten Bereiche ausspart und nur in den Arealen zwischen den Chromosomen deutlich zu sehen ist. Dies entspricht weitestgehend - wenn auch aufgrund der stärkeren Kondensation der Chromosomen verstärkt - dem Bild in normalen Prophasen (siehe Abbildung 28B). Der Vorgang läuft jedoch zu einem deutlich früheren Zeitpunkt im Zellzyklus ab (zu Beginn nicht am Ende der G2 Phase). In der Metaphase ist wie bei der Kontrollzelllinie keine Bindung von Cohesin an das Chromatin mehr nachweisbar (ohne Abbildung). In der frühen G1 Phase akkumuliert der Komplex wieder im Nukleus. Das Bild ist jedoch ähnlich dem der G2 Phase, auch hier werden die kondensierten Chromosomen ausgespart (ohne Abbildung). Um G2- und G1-PLCs zu differenzieren, wurden Antikörper gegen Aurora B Kinase verwendet (nicht dargestellt). Die für die Rekrutierung und Stabilisierung der Cohesin-Chromatin-Bindung wichtigen Kohäsionsfaktoren Pds5 und ISWI zeigen ein identisches Verhalten in der Immunfluoreszenz (Siehe Abbildung 28C und D). Es könnte somit zu einer vorzeitigen Dissoziation von Kohäsionselementen aufgrund der MCPH1-Defizienz kommen. Möglicherweise als direkte Folge des Mikrocephalin-Funktionsverlustes oder auch indirekt durch die einsetzende Chromosomenkondensation. Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche vorzeitige Cohesin-Dissoziation ergibt sich durch die Morphologie der Patientenchromosomen auf Cytospinpräparaten. Dort konnte ich bei den Patientenchromosomen häufig eine deutliche Spreizung (X-Form) der Chromosomen beobachten, während die Kontrollzellen meist parallel verlaufende Schwesterchromatiden aufwiesen (siehe Abbildung 28). Dies könnte ebenfalls auf eine vorzeitige Beendigung der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden hindeuten.

3.4.3.5 Die Condensinkomplexe und Topoisomerase II α

Topoisomerase II α und Condensin I bilden den chromosomalen *scaffold* (Earnshaw *et al*, 1985; Saitoh *et al*, 1995) (siehe Einleitung 1.3.ff). Deshalb wurde diesen Proteinen eine entscheidende Bedeutung bei der Chromosomenkondensation zugeschrieben. Erst kürzlich wurde der Condensin II Komplex identifiziert (Ono *et al*, 2003), dem eine Rolle bei der Initiation der Chromosomenkondensation zugeschrieben wird (Hirota *et al*, 2004; Ono *et al*, 2004). Die genannten Proteine wurden immunzytochemisch auf ihre Lokalisation in Patientenzellen und

Kontrollen untersucht. Durch Kohybridisierungen untereinander sowie mit Zellzyklus-spezifischen Markern wurde versucht, ihre zeitliche und räumliche Regulation zu charakterisieren. Topoisomerase II α und die Condensin-Komplexe bilden die zentralen Chromatidachsen. Nach neueren Literaturangaben (Maeshima & Laemmli, 2003) binden Condensin I und Topoisomerase II α alternierend an die chromosomale Achse (*barber pole*). Ein ähnliches Muster findet man für Condensin I und II (Ono *et al*, 2003). Zuvor war jedoch eine Lokalisation von TopoII an AT-reichen DNA-Sequenzen, also den Giemsa-, bzw. Q-Banden, nachgewiesen worden (Saitoh & Laemmli, 1994).

3.4.3.6 Untersuchung der zentralen Chromatidachsen

Mittels einer Zytozentrifuge wurden Metaphasespreitungen von Patienten- und Kontrollzellen hergestellt, die mit Antikörpern gegen Condensin I (Abbildung 29A und C) und Condensin II (Abbildung 29A und B), sowie Topoisomerase II α (Abbildung 29B und C) angefärbt wurden. Auf den Chromosomen der Patienten wurde für alle Proteine ein weitgehend den Kontrollen entsprechendes Hybridisierungsverhalten nachgewiesen. Die Chromosomen der MCPH1-defizienten Zelllinien unterschieden sich von den Kontrollen jedoch insofern, als sie kürzer und meist spiralig verdreht waren (Abbildung 29 A-C und Abbildung 38 in der Diskussion). Dies entspricht auch den Erfahrungen aus der konventionellen Zytogenetik (siehe 3.3.2) (Neitzel *et al*, 2002; Trimborn *et al*, 2005). Zudem zeigten sie im Gegensatz zu den Kontrollen, bei denen die Chromatiden meist parallel verliefen, häufig abgespreizte Schwesterchromatiden. Die Signale für die verschiedenen Antikörper waren breiter, d.h. lokalisierten nicht wie bei den Kontrollen in einer schmalen, zentralen chromosomalen Achse.

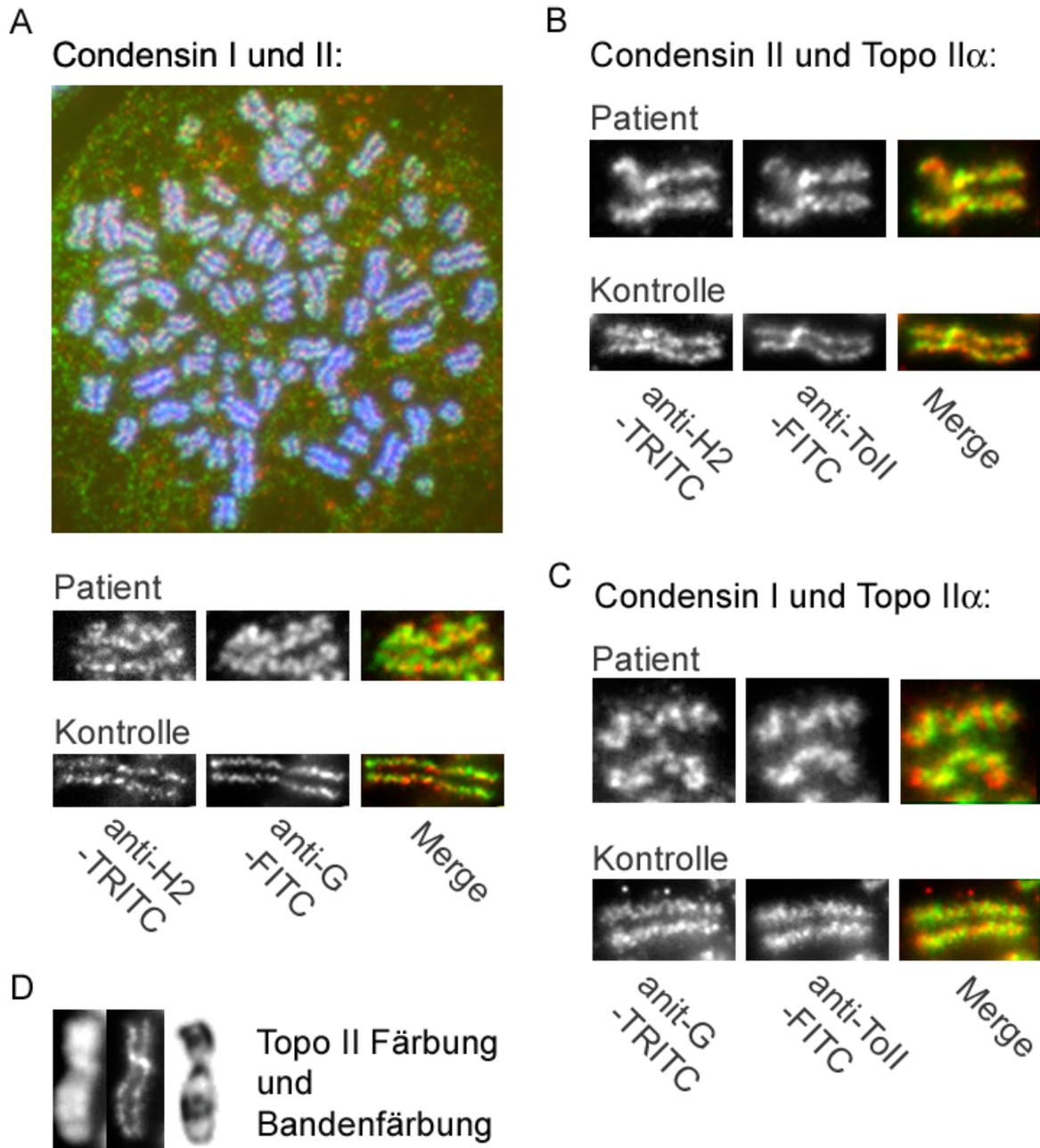


Abbildung 29 **Untersuchung der zentralen Chromatidachsen bei MCPH1 Defizienz.** (A) Lokalisation von Condensin I (anti-G, grün) und Condensin II (anti-H2, rot). Oben: Metaphase gesamt, Unten: Vergleich einzelner Chromosomen von Patient und Kontrolle, das Patientenchromosom wurde in der Größe angepasst. (B) Lokalisation von Condensin II (anti-H2, rot) und TopoII (anti-ToII, grün). Vergleich einzelner Chromosomen von Patient und Kontrolle, das Patientenchromosom wurde in der Größe angepasst. (C) Lokalisation von Condensin I (anti-G, rot) und TopoII (anti-ToII, grün). Vergleich einzelner Chromosomen von Patient und Kontrolle, das Patientenchromosom wurde in der Größe angepasst. Bei allen Kohybridisierungen konnten zwischen Patienten und Kontrollen keine Unterschiede im Bindungsmuster gefunden werden. Die Chromosomen der MCPH1-defizienten Zelllinien unterschieden sich von den Kontrollen jedoch in ihrer Morphologie. Sie sind kürzer (hier aufgrund der Größenanpassung nicht sichtbar) und spiralig verdreht. (D) Lokalisation von TopoII in Relation zu chromosomaler Bandenfärbung auf einem Chromosom 11 der Kontrollzelllinie, von links nach rechts: DAPI, anti-ToII und exemplarische GTG-Banden.

Die beiden oben genannten Modelle (*barber pole*, TopoII-Bindung an AT-reiche Sequenzen) konnten weder endgültig bestätigt noch widerlegt werden. In allen untersuchten Konstellationen konnten annähernd alternierende Hybridisierungsmuster nachgewiesen werden. Einige Chromosomen zeigten eine deutliche Affinität von TopoII zu AT-reichen Sequenzen, was durch eine Zuordnung der TopoII-Signale zu den DAPI-Banden deutlich gemacht werden kann. DAPI-Banden entsprechen den Giemsa-Banden und sind AT-reich (Abbildung 29B unten). Dies würde, sollte also auch das *barber pole* Modell zutreffen, im Umkehrschluss einer Bindung von Condensin I an GC-reiche, Giemsa-negative Banden entsprechen. Dem widerspricht die scheinbar alternierende Anordnung auf der chromosomalen Achse von Condensin II sowohl mit Condensin I als auch Topo II. Problematisch erwiesen sich unterschiedliche Bindungseffizienzen der Antikörper und Hybridisierung in verschiedenen Ebenen. Dies wird besonders bei der starken Kinetochorfärbung durch TopoII und hCAP-H2-Antikörper deutlich. Je nach aufgenommener Focusebene ist dieses Signal sichtbar oder nicht. Offensichtlich ist jedoch eine insgesamt gestörte Chromosomenmorphologie bei den Patienten, die jedoch nicht auf eine eindeutig fehlregulierte axiale Lokalisation eines der untersuchten Proteine zurückzuführen ist.

3.4.3.7 Condensin II nicht Condensin I lokalisiert auf den vorzeitig kondensierten Chromosomen

Im Westernblot ergaben sich für Condensin I (hCAP-G), Condensin II (hCAP-H2, hCAP-D3) und den Condensinkern (hCAP-E) keine Hinweise auf unterschiedliche Proteinmengen in den Patientenzellen im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Abbildungen 30A).

Dieselben Antikörper wurden für zelluläre Lokalisationsstudien in den Patientenzellen verwendet. Kohybridisierungen mit Lamin B-Antikörpern zeigten, dass Condensin I wie in Kontrollzellen erst in der Prometaphase, also nach der Auflösung der Kernmembran an die Chromosomen bindet (Abbildung 30B). Simultane Hybridisierung von Condensin I- (hCAP-G) und Condensin II-spezifischen Antikörpern (hCAP-H2) demonstrierten ebenfalls, dass Condensin I in fast allen Prophase-ähnlichen Zellen zytoplasmatisch ist. Condensin II hingegen ist über den gesamten Zellzyklus nuklear und mit dem Chromatin assoziiert (Abbildung 32C): Es lässt sich auch noch nach Extraktion mit Detergentien vor und nach der Fixierung im Kern nachweisen. Ein großer Anteil ist demnach fest an Strukturen im Kern gebunden.

Laut Literatur binden beide Condensinkomplexe in der Prometaphase an die zentralen Chromatidachsen (Hirota *et al*, 2004; Kireeva *et al*, 2004; Ono *et al*, 2004).

Die Hybridisierungen zeigen, dass in einigen G2-Phase-Zellen hCAP-H2 bereits an die zentrale chromosomale Achse bindet während sich Condensin I noch im Zytoplasma befindet (Abbildung 32C). In der G1-Phase bleibt Condensin II an die Achse gebunden, nachdem die Kernmembran

wieder aufgebaut wurde und sich Condensin I bereits wieder im Zytoplasma befindet (ohne Abbildung, bzw. siehe Abbildung 39 in der Diskussion). Dies hebt die voneinander unabhängige Regulation der beiden Condensinkomplexe hervor und weist auf eine asynchrone Regulierung als Folge des Funktionsverlustes von MCPH1 hin. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigen die Patientenzellen einen höheren Anteil von Zellen mit axialer Condensin-II-Färbung, so dass davon auszugehen ist, dass die axiale Bindung von Condensin II bei MCPH1-Patienten vorzeitig auftritt und länger persistiert.

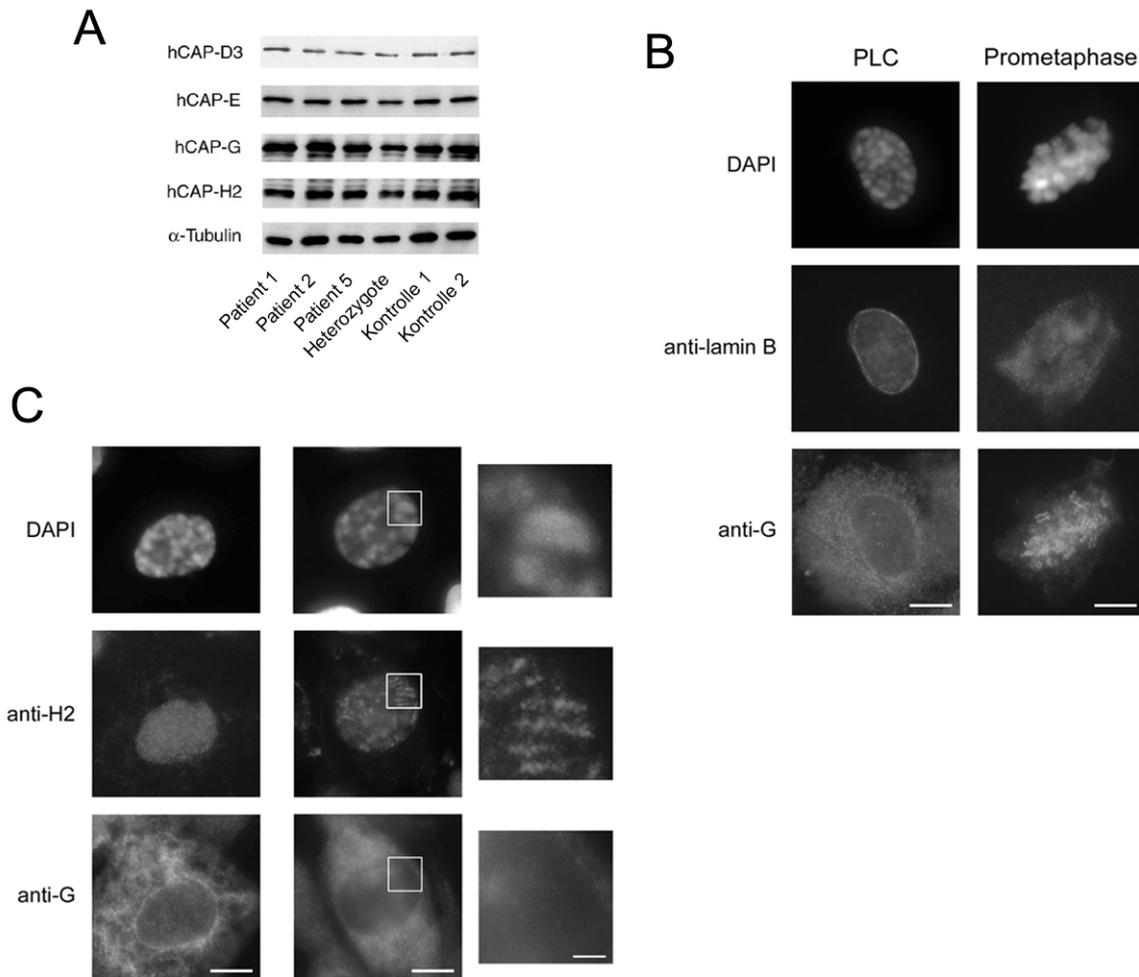


Abbildung 30 Menge und zelluläre Lokalisation von Condensin Untereinheiten in Zellen von MCPH1 Patienten. (A) Westernblot mit Antikörpern gegen Condensin I (hCAP-G), Condensin II (hCAP-H2, hCAP-D3) und den Condensinkern (hCAP-E). (B) Ko-Hybridisierung von Antikörpern gegen Condensin I (anti-G) und die Kernmembran (anti-lamin B). Condensin I bleibt in den Prophase-ähnlichen Zellen (PLC) zytoplasmatisch und bindet erst nach Abbau der Kernmembran (Prometaphase) auf die Chromosomen. (C) Gleichzeitige Färbung mit anti-hCAP-H2 (Mitte) und anti-hCAP-G (unten). Gegenfärbung mit DAPI. In Zellen mit Prophase-ähnlicher Kondensation ist Condensin II (anti-H2) nuklear, wohingegen Condensin I im Zytoplasma bleibt (linke Spalte). In einigen Zellen hat Condensin II bereits an die Chromatidachsen gebunden, während Condensin I noch nicht in den Nukleus eingetreten ist (mittlere Spalte). Die eingerahmten Ausschnitte sind rechts vergrößert dargestellt. Maßstäbe 10µm, außer in den vergrößerten Bereichen: 2µm.

Die vorzeitige Chromosomenkondensation bei MCPH1-Defizienz ist aber offensichtlich unabhängig von Condensin I. Ein Einfluss von nicht detektierbaren nuklearen Condensin I kann jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

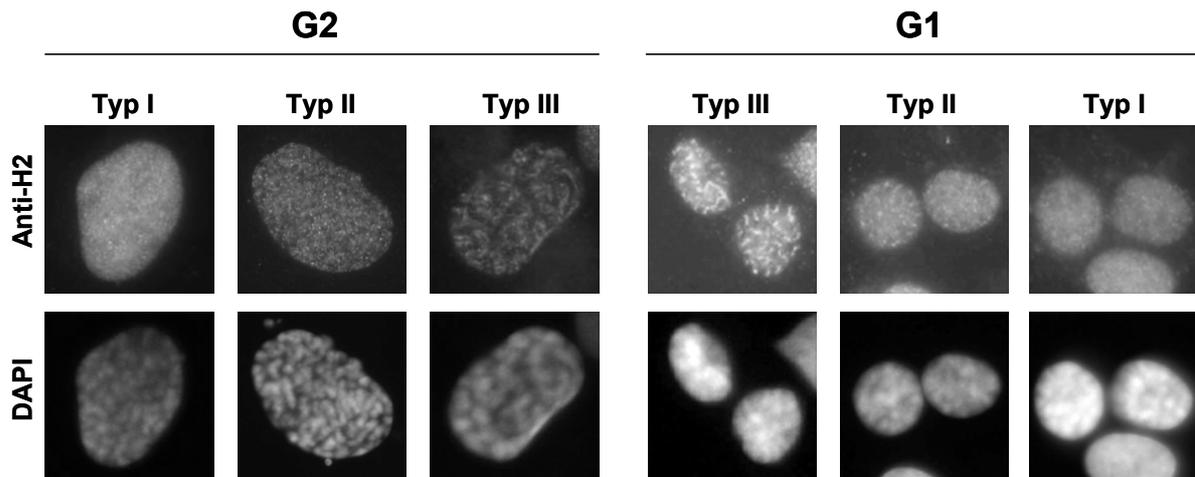


Abbildung 31 **Lokalisation von Condensin II (hCAP-H2) auf den Prophase-ähnlichen Chromosomen.** Es konnten verschiedene Lokalisationsmuster definiert werden. Typ I: Gleichmäßige Verteilung von Condensin II (Anti-H2) über den gesamten Zellkern, trotz Chromosomenkondensation. Typ II: Strukturelle Färbung mit dem Antikörper gegen Condensin II (Anti-H2), weitestgehend nicht mit Chromosomen überlappend. Typ III: Färbung der zentralen Chromatidachse mit dem Antikörper gegen Condensin II (Anti-H2). Links sind Zellen in der G2 Phase dargestellt, rechts Zellen in der G1 Phase. Erste Reihe: Lokalisation von Condensin II dargestellt mit anti-hCAP-H2 (Anti-H2). Zweite Reihe: Darstellung der Chromatinmorphologie mit DAPI.

Das Verhalten von Condensin II, bezüglich seiner Lokalisation auf dem Chromatin, ist anscheinend zeitlich, jedoch nicht örtlich fehlreguliert. So finden sich drei verschiedene Klassen Prophase-ähnlicher Zellen (Abbildung 31). Typ I ist durch eine uniforme Verteilung auf dem kondensierten Chromatin gekennzeichnet. Bei Typ II lassen sich erste Strukturen in den Färbung erkennen, diese überlappen jedoch weitestgehend nicht mit den chromosomalen Strukturen. Teilweise sind aber parallele Stränge am äußeren Rand der Chromatiden zu erkennen. Typ III zeichnet sich durch die axiale Bindung von Condensin II aus. Häufig werden dabei die Kinetochoren zuerst bzw. verstärkt angefärbt. Über vergleichbare Lokalisationsmuster in „echten“ Prophasen wurde 2004 von Kireeva *et al* berichtet.

Es gibt keine Voruntersuchungen hinsichtlich der differentiellen Lokalisation der Condensine auf dekondensierendem Chromatin der G1-Phase. Die Patientenzellen zeigen für Condensin II ein annähernd symmetrisches Verhalten vor und nach der Mitose. Condensin II spielt demnach vermutlich auch eine Rolle bei der Chromosomendekondensation (Abbildung 31).

3.4.3.8 Histon H3 Phosphorylierung korreliert mit Condensin II Bindung

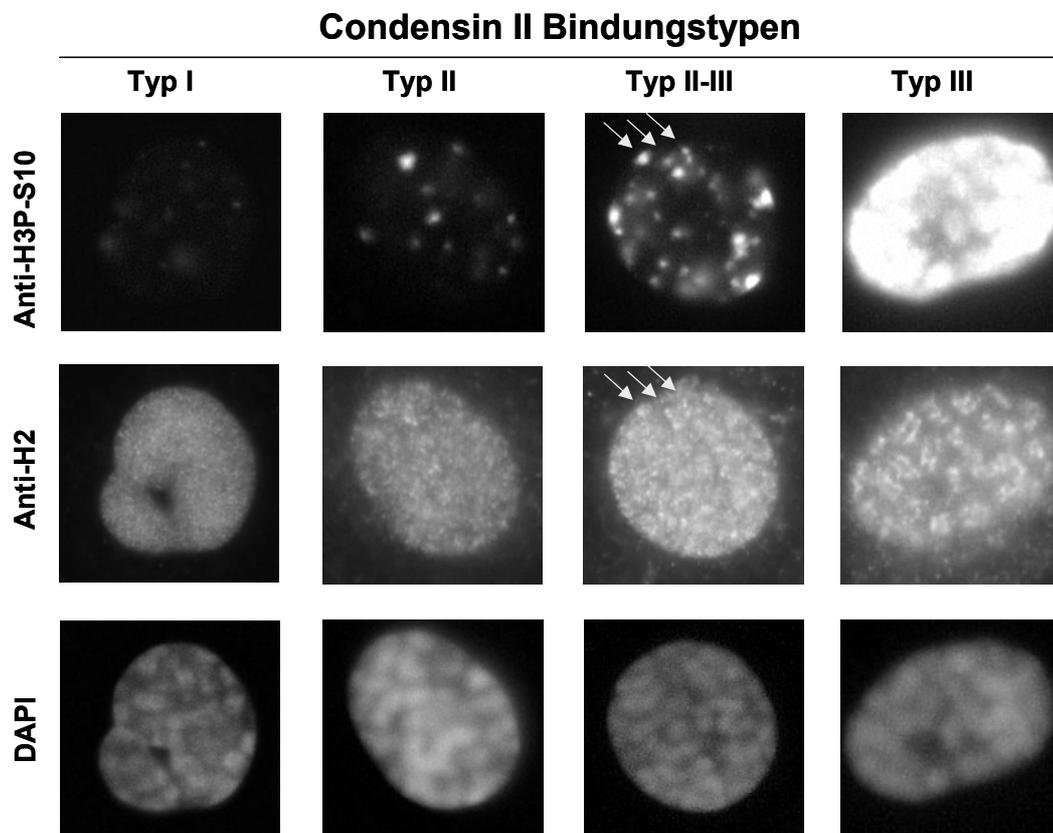


Abbildung 32 **H3P-S10 Phosphorylierung korreliert mit Condensin II-Bindung.** Typ I (uniforme Condensin II-Verteilung): Keine oder annähernd keine Histon H3 Phosphorylierung. Typ II (Ausbildung von Strukturen in der Condensin II-Verteilung, ohne eindeutige Überlappung mit der Chromatinstruktur): Zunahme der Phosphorylierung. Beide Antikörper kolokalisieren in Foci, vermutlich an den Kinetochoren (Pfeile). Typ III (axiale Condensin II-Färbung): Deutliche Phosphorylierung von Serin 10. Erste Reihe: Darstellung der Histon H3 Phosphorylierung mit anti-H3P-S10. Zweite Reihe: Lokalisation von Condensin II dargestellt mit anti-hCAPH-H2 (Anti-H2). Dritte Reihe: Darstellung der Chromatinmorphologie mit DAPI.

Da die zeitliche Abfolge der Condensin II Bindung in den verschiedenen Phasen der Chromosomenkondensation bei MCPH1 Patienten offensichtlich fehlreguliert ist, versuchte ich mittels Kohybridisierungen die zeitliche Regulation weiter zu charakterisieren. Kohybridisierung mit α -H3P-S10 deutet darauf hin, dass ein gradueller Anstieg des Histon H3-Signals die zeitlichen Übergänge zwischen den einzelnen Condensin II-Färbeklassen (deren Übergänge selbstverständlich ebenfalls graduell sind) integriert, vielleicht sogar reguliert (Abbildung 32). Prophase-ähnliche Zellen, bei denen Condensin II gleichmäßig über den Kern verteilt war, zeigten keine Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von Histon H3 an S10 begann mit zunehmender Strukturierung des Condensin II-Signals und hatte sich, sobald axiale Lokalisation von Condensin II nachweisbar über die gesamten Chromosomenarme ausgebreitet. Demnach könnte die viel diskutierte Rolle der Histon H3-Phosphorylierungen in der Rekrutierung von

Condensin II liegen. Der Kondensationsgrad der Chromosomen ist davon jedoch lichtmikroskopisch unabhängig.

3.4.3.9 Topoisomerase II α zeigt ein ähnliches Verhalten wie Condensin II

Topoisomerase II α zeigt ein ähnliches, jedoch kein identisches Verhalten wie Condensin II. Das Enzym ist nuklear und Chromatin-gebunden. Im Gegensatz zu Condensin II wird es jedoch zyklisch exprimiert. Es sind deutliche Unterschiede in der Intensität der Signale zu beobachten. Die Unterschiede sind repräsentativ für bestimmte Zellzyklusphasen, die höchste Konzentration wird in G2 die geringste Konzentration in G1 gefunden (Swedlow *et al*, 1993).

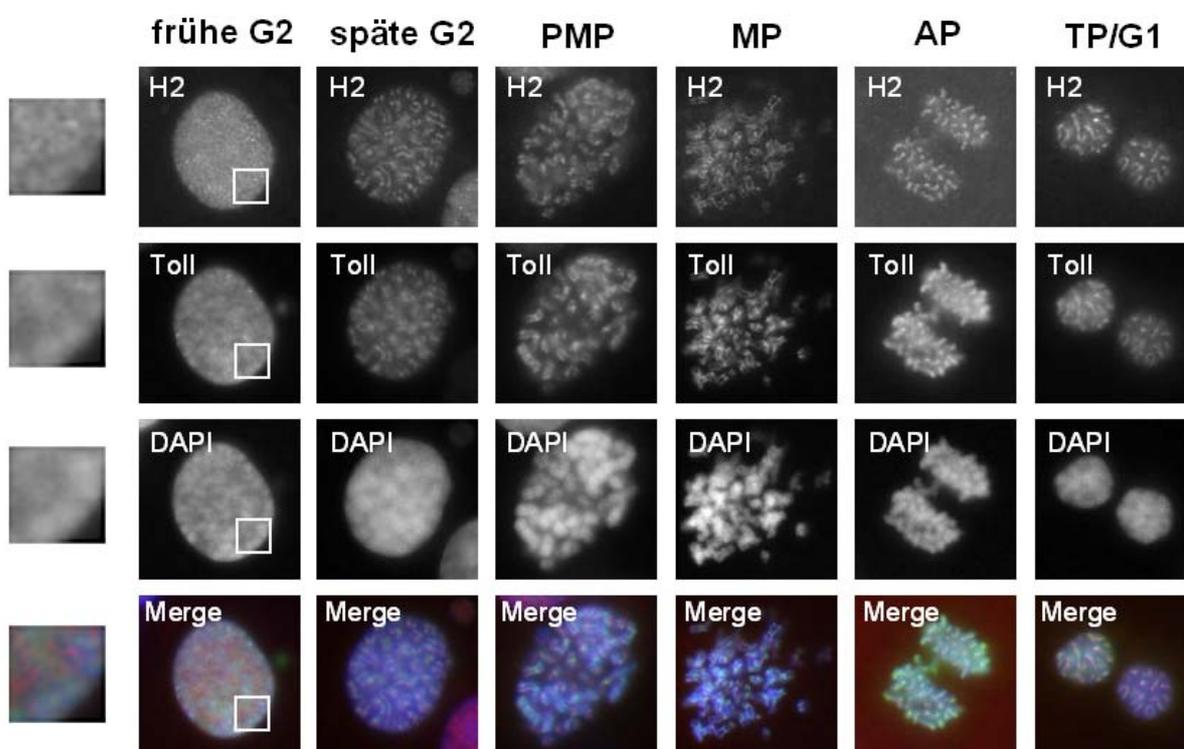


Abbildung 33 Vergleich der Lokalisation von Topoisomerase II α und hCAP-H2 auf MCPH1 Patientenzellen. Die Lokalisation der beiden Proteine unterscheidet sich hauptsächlich in der frühen G2 Phase. Die gerahmten Ausschnitte sind links vergrößert dargestellt. Während sich mit anti-hCAP-H2 (H2, erste Reihe, TRITC-markiert) kein den chromosomalen Strukturen zuzuordnendes Färbungsbild ergibt, bildet die Färbung mit Antikörpern gegen Topoisomerase II (Toll, zweite Reihe, FITC-markiert) die Chromatinstruktur ab. Für beide Proteine ist keine Bindung an die Chromatidachsen nachweisbar. Ab der späten G2 Phase bis in die frühe G1 Phase binden beide Proteine an die Chromatidachsen. Die Chromatinmorphologie wird durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht (dritte Reihe). Überlappende Darstellung von anti-hCAP-H2 (rot), anti-Topoisomerase II α (grün) und DAPI (blau) (vierte Reihe).

Im Gegensatz zur Färbung mit Condensin II Antikörpern zeigt die Hybridisierung mit anti-Topo II α für fast alle PLCs deutlich strukturierte Färbemuster. In den frühen Phasen wird die Chromatinstruktur nachgebildet. Wie bei Condensin II bilden sich die chromosomalen Achsen vermutlich erst sehr spät aus. Sie sind etwas breiter und unschärfer als die Condensin II bedingten Achsen (Abbildung 33). Diese axiale Bindung dauert bis in die G1 Phase an. Wie bei

hCAP-H2 findet man eine Häufung der axialen Strukturen bei den Patientenzellen. Dieser Vorgang ist demnach ebenso fehlreguliert.

3.4.3.10 Analyse von Cyclin A und Cyclin B1 in Bezug auf die Lokalisation der Condensin-Komplexe

Zur Analyse der beiden mitotischen Kinasen Cyclin B1/CDK1 und Cyclin A/CDK2 wurden Kohybridisierungen von Condensin-spezifischen Antikörpern und Antikörpern gegen die Cycline A und B1 durchgeführt. Etwa 50 % der PLCs zeigten nukleare Cyclin A-Signale (siehe auch Abschnitt 3.3.1). Dieser Anteil entspricht dem Anteil der G2-PLCs, so dass alle G2-PLCs auch positiv für Cyclin A sind. Im Gegensatz dazu zeigten nur 12 % der PLCs eine Akkumulation von Cyclin B1 (siehe auch 3.4.3.2). Demnach muss die Initiation der Chromosomenkondensation bei MCPH1-Defizienz unabhängig von Cyclin B1/Cdk1 sein. Eine potentielle Rolle für Cyclin A/Cdk2 in der Fehlregulation der Chromosomenkondensation ist jedoch möglich. Cyclin B1-Akkumulation war notwendige aber nicht hinreichende Voraussetzung für die prämitotische axiale Bindung von Condensin II, d.h. G2-PLC mit axialer Färbung zeigten in fast allen Fällen ein deutliches Cyclin B1-Signal im Kern. Jedoch nicht alle Cyclin B1-positiven Kerne zeigten axiale Färbung (ohne Abbildung). Phosphorylierung von Condensin II oder die Phosphorylierung von Histon H3-Ser10 durch Cyclin B1/Cdk1 könnten somit Voraussetzungen für die axiale Bindung von Condensin II sein.

3.4.3.11 RNA Interferenz gegen Condensin II „rettet“ den zellulären Phänotyp

Um die differentielle Regulation der Condensinkomplexe und deren Effekte auf die Chromosomenkondensation genauer zu analysieren, etablierte ich RNA Interferenz in der SV40 transformierten Fibroblastenlinie von Patient 1. Ich benutzte *small interfering* RNA Duplexe (siRNA) gegen hCAP-G und hCAP-H, um spezifisch Condensin I auszuschalten, sowie siRNAs gegen hCAP-G2 und hCAP-H2, um Condensin II mRNA abzubauen. Zusätzlich wurde der beiden Komplexen gemeinsame Condensinkern durch einen Duplex gegen hCAP-E ausgeschaltet. Für die systematische Analyse wurden parallele Zellkulturen mit den oben genannten siRNAs gegen die einzelnen Untereinheiten transfektiert. Ein Teil jeder Kultur wurde verwendet, um zytologische Präparate herzustellen. Die Zellen wurden fixiert, auf Objektträger aufgetropft und mit Giemsa gefärbt. Die Präparate wurden verschlüsselt und der Anteil der PLCs wurde bestimmt. Pro Präparat und Experiment wurden jeweils 1000 Zellen beurteilt (Abbildung 34Aa). Die restlichen Zellen wurden lysiert, um die Effizienz des *knockdowns* durch Westernblot zu überprüfen (Abbildung 34Ab).

Der *knockdown* von Condensin I durch RNAi gegen CAP-G und CAP-H zeigte keine Veränderung des Anteils Prophase-ähnlicher Zellen in der Patientenzelllinie. In den CAP-G und CAP-H reduzierten Proben wurden Anteile von 13,9% bzw. 16,2% PLCs gefunden. Zur Kontrolle wurde die Patientenzelllinie mit *non-silencing* RNA transfektiert bzw. einer *mock*-Behandlung unterzogen. Dabei wurden Anteile von 15,6% respektive 14,1% PLCs bestimmt. In bemerkenswertem Kontrast dazu stehen die Effekte nach *knockdown* von Condensin II-spezifischen Untereinheiten, bzw. des Condensinkerns. Diese *knockdowns* führten zu einer deutlichen Abnahme des Anteils Prophase-ähnlicher Zellen oder zu einer deutlichen Abschwächung des Kondensationsdefektes. Die entsprechenden Anteile der Prophase-ähnlichen Zellen in diesen Kulturen waren: 7,2 % (CAP-G2), 5,5 % (CAP-H2) und 6,4 % (CAP-E) (Siehe Abbildung 36Aa). Ähnliche Resultate wurden erzielt, wenn die Zellen direkt auf Deckgläschen fixiert und mit DAPI gegengefärbt wurden (Daten nicht gezeigt). Die beobachtete „Normalisierung“ des Kondensationsdefektes war dabei unabhängig von vorausgehender hypotoner Behandlung mit 60 mM KCl.

Durchflusszytometrische Analysen* zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit CAP-H2-, CAP-H- oder Kontroll-siRNA (Abbildung 36 Ca-c). Die Abnahme der PLCs ist demnach in der Tat eine funktionelle Konsequenz des Condensin II *knockdowns* und kommt nicht durch eine G2-Phase-Verlängerung im Zellzyklus und somit durch eine Akkumulation der Zellen in dieser Phase als Folge des Condensin II *knockdowns* zustande. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der visuellen Zellzählungen, die keine Abnahme des Mitoseindex nach RNAi gegen CAP-H2, CAP-G2 oder CAP-E aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Um die Ergebnisse aus den MCPH1-defizienten Zellen zu bestätigen, wurden simultane *knockdowns* von Microcephalin und Condensin-Untereinheiten in HeLa-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse aus den Patientenzellen reproduziert. Die Dezimierung von Microcephalin alleine ohne eine zweite siRNA oder gemeinsam mit Kontroll-Duplexen resultierte in durchschnittlichen PLC-Anteilen von 12,4 % bzw. 11,2 %. Doppel-*knockdowns* von Microcephalin und Condensin I-spezifischen Untereinheiten führte nicht zu einer Abnahme der PLC-Fraktionen: 14 % (CAP-G) und 13,3 % (CAP-H). Im Gegensatz dazu resultierte der zusätzliche *knockdown* von Condensin II Untereinheiten in deutlich niedrigeren Prophase-Anteilen von 4,9 % (CAP-G2-siRNA) und 6,4 % (CAP-H2-siRNA). Wie erwartet, ergab sich bei simultaner Transfektion mit siRNAs gegen CAP-E und Microcephalin ein vergleichbar niedriger Anteil an PLCs (3,7%) (Abbildung 36 Ba und Bb).

* Die Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Schindler (Würzburg).

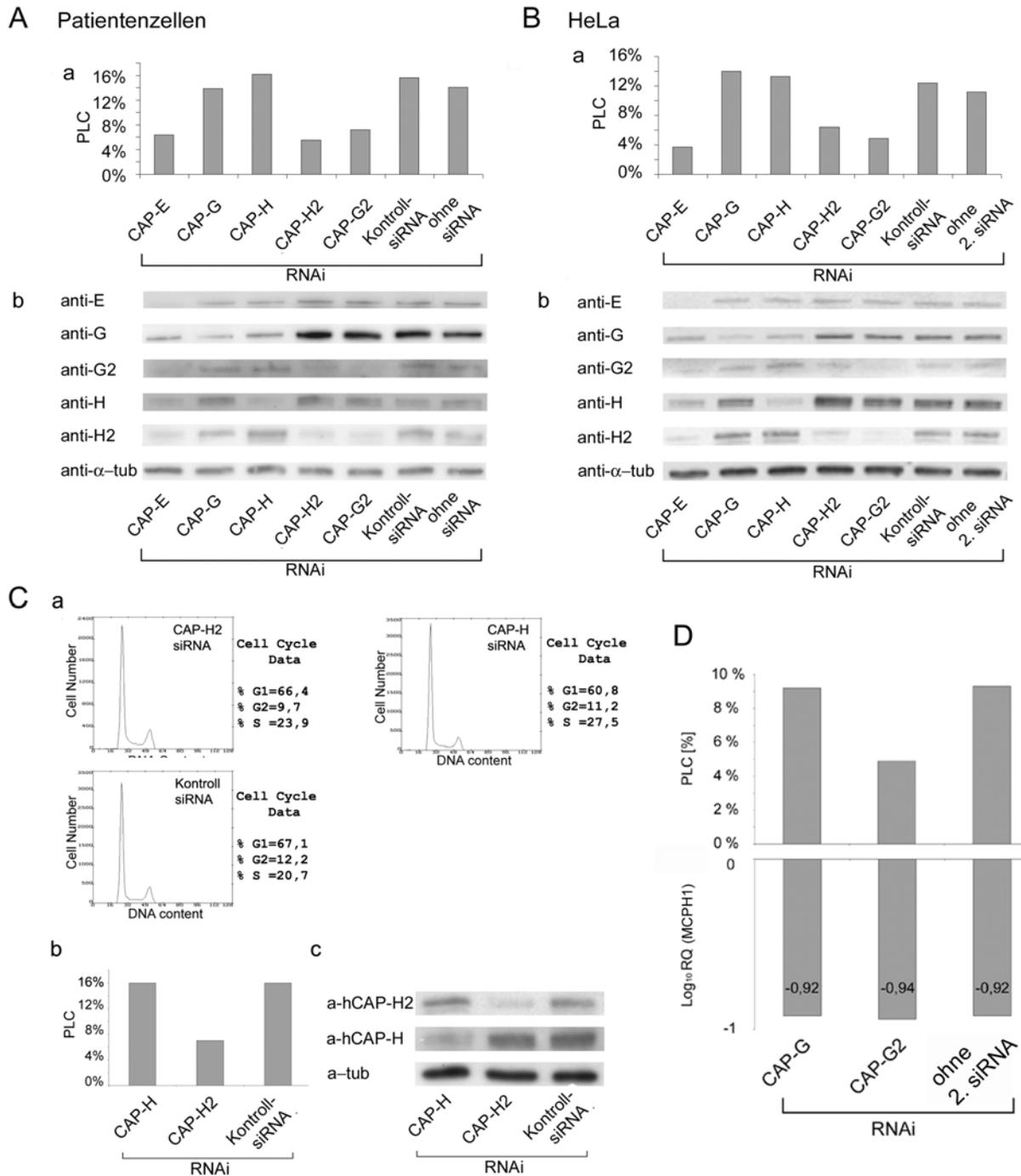


Abbildung 34 **Effekte von Condensin-Silencing auf den Kondensationsdefekt und Zellzyklusprogression.** Nach siRNA vermittelten *knockdown* der Condensin-Komplexe in Patientenzellen und simultanem Abbau von Condensinen und Microcephalin in HeLa wurde der Anteil der Prophase-ähnlichen Zellen durch Zählungen am Lichtmikroskop bestimmt: Patientenzellen (Aa) und HeLa (Ba). χ^2 -Testung gegen ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$ ergab für beide Zelllinien eine signifikante Abnahme der PLCs als Folge des *knockdowns* von Condensin II (CAP-H2, CAP-G2) oder des gemeinsamen Condensinkerns (CAP-E). *Knockdown* von Condensin I spezifischen Untereinheiten (CAP-G, CAP-H) hatte keinen Einfluss auf das Kondensationsverhalten. Die Effizienz des *knockdowns* wurde durch Westernblots kontrolliert; Patientenzellen (Ab) und HeLa (Bb). Als Ladekontrolle wurde anti- α -Tubulin verwendet. Die Zellzyklusverteilungen nach RNAi wurde für die Patientenzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Ca). Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Zellzyklusverzögerung durch die RNA Interferenz. Zur Kontrolle wurde auch in diesem Fall der Anteil PLCs bestimmt (Cb) und die Abbaueffizienz für die Condensin-Untereinheiten per Westernblot (Cc) überprüft. (D) Der Abbau der MCPH1-mRNA in den HeLa-Zellen wurde durch quantitative Real-Time PCR kontrolliert Die Effizienz des MCPH1-*knockdowns* war in allen Proben gleich (unten). Gleichzeitig wurde der Anteil der PLCs wie gewöhnlich bestimmt (oben). Die Westernblotkontrolle des Condensin *knockdowns* ist nicht gezeigt.

Der geringe Anteil Prophase-ähnlicher Zellen in HeLa nach simultanen *knockdown* von Microcephalin und Condensin II kommt nicht durch eine schlechte Effizienz der Transfektion oder Interferenzreaktion in diesen Zellen zustande. Quantitative Real-Time PCR zeigte, dass die MCPH1-mRNA Mengen in allen Proben gleichmäßig reduziert waren (Abbildung 36D). Das simultane *silencing* von CAP-G/Microcephalin, CAP-G2/Microcephalin oder Microcephalin allein führte jeweils zu einer 8 – 9-fachen Reduktion der Mikrocephalin-mRNA Konzentration.

3.4.3.12 Condensin II hat eine Funktion bei der Chromosomendekondensation

Ich hatte zeigen können, dass die Prophase-ähnlichen Zellen von MCPH1 Patienten nicht nur aus vorzeitig kondensierten Zellen in der G2 Phase des Zellzyklus bestehen, sondern auch aus G1 Zellen mit verzögerter Dekondensation (siehe Abschnitt 3.3.1). Um zu untersuchen, ob der Effekt von RNA Interferenz gegen Condensin II auf die gestörte Chromosomenkondensation in der G2 Phase begrenzt ist oder beide Phasen betrifft, nutzte ich wiederum Antikörper gegen Aurora B, die eine Unterscheidung zwischen G1 und G2 Phase möglich machen (siehe 3.3.1). In diesem Fall wurden die Zellen (Patient 1 SV) direkt auf Deckgläschen fixiert, mit Aurora B-Antikörpern mit DAPI gefärbt und die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. *knockdown* von CAP-H2 in Patientenzellen führte zu einer Abnahme des Anteils Prophase-ähnlicher Zellen in beiden Phasen des Zellzyklus (Abbildung 35). Dies zeigt, dass Condensin II auch in den verlängerten Dekondensationsprozess in der G1 Phase von MCPH1 defizienten Zellen eingebunden ist.

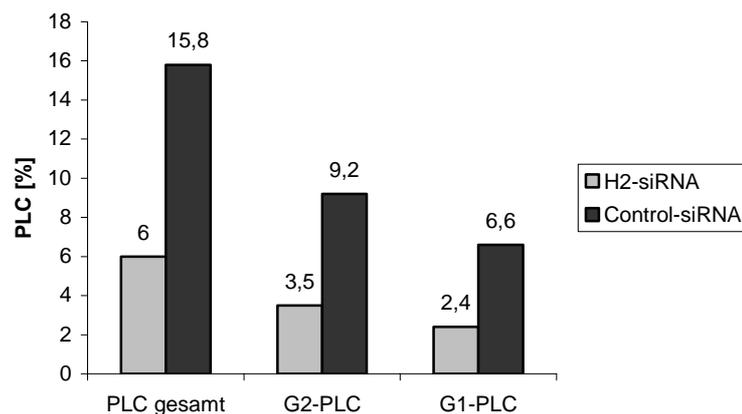


Abbildung 35 **Analyse des Dekondensationsverhaltens nach Condensin II *knockdown***. Die Gesamtheit der PLCs wurde durch Aurora B Antikörper in G1 und G2 Anteile differenziert. Condensin II *knockdown* reduziert beide Anteile gleichermaßen (n>2000).