

4 Diskussion

4.1 Mutationen in MCPH1 verursachen das PCC Syndrom

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis geführt, dass die erste beim Menschen beschriebene Chromosomenkondensationsstörung auf Mutationen im MCPH1-Gen beruht. Nach dem Ausschluss mehrerer Kandidatengene wurde bei den Betroffenen der libanesischen Kernfamilie (siehe Einleitung 1.4) eine Insertion eines Adenins im Exon 5 des MCPH1 Gens nachgewiesen, die zu einer Leserasterverschiebung führt (427_428insA) in deren Folge es zu einem vorzeitigen Stopcodon in Exon 6 des Gens kommt (T143NfsX5). Dadurch kann bei den Patienten lediglich ein N-terminales Fragment des Proteins synthetisiert werden, das aus 146 Aminosäuren besteht und somit nur etwa 1/6 des Wildtypproteins Microcephalin darstellt (835 Aminosäuren). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das MCPH1-Transkript dem *nonsense-mediated decay* unterliegt. Somit ist davon auszugehen, dass die Mutation in einem völligen Funktionsverlust des Proteins resultiert (Trimborn *et al*, 2004). Dies trifft auch für weitere Patienten aus zwei Familien mit pakistanischer Herkunft zu, bei denen eine *nonsense*-Mutation bereits nach 20 Aminosäuren zu einem Kettenabbruch führt (Jackson *et al*, 2002). Patienten mit den beiden allelischen Varianten können weder klinisch noch zellulär voneinander unterschieden werden. Beide Patientengruppen sind durch eine ausgeprägte Mikrozephalie gekennzeichnet und zeigen in proliferierenden Zellen einen erhöhten Anteil von bis zu 20% Zellen mit Prophase-ähnlicher Chromosomenkondensation (PLCs).

Eine identische Chromosomenkondensationsstörung konnte durch siRNA vermittelten Abbau von MCPH1-mRNA in verschiedenen Kontrollzelllinien artifiziell induziert werden. Der Verlust der Funktion des MCPH1-Proteins führt folglich auf zellulärer Ebene zu einer Fehlregulation der mitotischen Chromosomenkondensation und ist für den klinischen Phänotyp mit primärer Mikrozephalie verantwortlich (Trimborn *et al*, 2004).

Nicht erfolgreich waren die Versuche, den aberranten zellulären Phänotyp mittels retroviralem Gentransfer mit der Wildtyp-cDNA zu komplementieren, da keine proliferierenden Kulturen etabliert werden konnten. Alle Kontrollexperimente mit dem Vektor alleine sowie mit einer revers ausgerichteten Kopie des MCPH1-Gens führten hingegen zur Etablierung von Linien mit integrierter Virus-DNA. In Zusammenhang mit den Erfahrungen von Dr. Jackson, bezüglich der Expression von MCPH1-GFP-Fusionsproteinen (siehe 3.4.2), lassen diese Experimente vermuten, dass eine Überexpression von Microcephalin zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase führt. Es liegt nahe anzunehmen, dass dieser Zellzyklusarrest durch die Verhinderung der Chromosomenkondensation bedingt wird.

4.1.1 MCPH1 – Microcephalin

Das MCPH1-Gen überspannt einen genomischen Bereich von ca. 250 kb auf der chromosomalen Region Chromosom 8p23.1 und kodiert für 14 Exons mit einem offenen Leserahmen von 2508 bp. Das Protein besteht aus 835 Aminosäuren, die sich zu einem theoretischen Molekulargewicht von 93 kDa summieren. Es enthält ein nukleares Lokalisationssignal (*nuclear localisation signal*, NLS), sowie drei BRCT (BRCA1 C-terminus) Domänen, davon eine N-terminale und ein Tandem von zwei C-terminalen Domänen. Konservierte BRCT-Domänen kommen in verschiedenen Schlüsselproteinen vor, die den Zellzyklus regulieren - so im BRCA1-Protein selbst aber auch in DNA Topoisomerase II bindenden Proteinen, DNA-Ligasen, DNA-Polymerasen (Bork *et al*, 1997; Huyton *et al*, 2000) und vielen in die DNA Schadensantwort eingebundenen Proteinen (Li & Zou, 2005). Auch das NBS1-Genprodukt Nibrin weist eine BRCT-Domäne auf: Nibrin ist Teil des MRE11/RAD50 Doppelstrangreparatur-Komplexes (Trujillo *et al*, 1998). Die NBS-Betroffenen weisen phänotypisch ebenfalls eine ausgeprägte Mikrozephalie auf. Neuere Studien zeigen, dass BRCT-Domänen sowohl mit weiteren BRCT-Domänen interagieren, aber auch häufig als Phosphoproteinbindungsmodule wirken (Glover *et al*, 2004) können. Die exakten molekularen Funktionen von Microcephalin sind weitgehend unbekannt, es wurde jedoch über eine Rolle in der DNA Reparatur durch Regulation der beiden Checkpoint-Proteine BRCA1 und CHK1 berichtet (Xu *et al*, 2004; Lin *et al*, 2005). Ob dies eine direkte Interaktion zwischen Microcephalin und den beiden genannten Enzymen bedeutet, konnte nicht geklärt werden. Des Weiteren wurde eine mögliche Funktion von Microcephalin in der Repression der humanen Telomerase veröffentlicht. Daher wird das Protein gelegentlich auch als BRIT1 (*BRCT-repeat inhibitor of hTERT expression*) bezeichnet (Lin & Elledge, 2003). Das Protein ist unter Säugetieren evolutionär konserviert und es finden sich auch Orthologe bei verschiedenen anderen Vertebraten (Ponting & Jackson, 2005). Die Funktion von Microcephalin als negativer Regulator der Chromosomenkondensation ist vermutlich zumindest bei Säugetieren evolutiv konserviert, wie meine Versuche mit spezifischen siRNA Duplexen an Mäusezelllinien zeigen konnten. Über die funktionelle Konservierung bei anderen Vertebraten ist nichts bekannt.

4.1.2 Genetische Heterogenität bei autosomal rezessiver Mikrozephalie (MCPH)

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation waren 5 Gene für MCPH kartiert, darunter auch MCPH1, allerdings war noch keines dieser Gene identifiziert. Unterdessen sind sechs Gene kartiert und vier davon identifiziert worden: MCPH1 kodiert für Microcephalin, MCPH3 für CDK5RAP2, MCPH5 für ASPM und MCPH6 für CENPJ (Bond *et al*, 2002; Jackson *et al*, 2002; Bond *et al*, 2005; zusammengefasst in Woods *et al*, 2005). Der Phänotyp von Patienten,

die den unterschiedlichen Loci durch Kartierung zugeordnet werden konnten, ist klinisch nicht unterscheidbar. Es gibt Hinweise auf ein weiteres Gen am MCPH5 Locus (Wallerman *et al*, 2003), dabei muss es sich aber um eine extrem seltene Ursache für MCPH halten, da in allen anderen Familien, die MCPH5 zugeordnet wurden, anschließend Mutationen in ASPM nachgewiesen werden konnten (Woods *et al*, 2005). Alle bis zu diesem Zeitpunkt publizierten MCPH-Loci sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 **Zusammenfassung der bisher beschriebenen MCPH Loci**

Lokus	Chromosomale Lokalisation	Gen	Protein
MCPH1	8p22-pter	Microcephalin	Microcephalin enthält drei BRCT Domänen und ist in die Zellzykluskontrolle und / oder DNA-Reparatur eingebunden. Mutationen führen zu aberranter Chromosomenkondensation.
MCPH2	19q13.1-13.2	unbekannt	<i>Cyclin Dependent Kinase 5 Regulatory Associated protein 2</i> , lokalisiert während der Mitose an den Centrosomen.
MCPH3	9q34	CDK5RAP2	
MCPH4	15q15-q21	unbekannt	Das ASPM Protein enthält eine mutmaßliche N-terminale <i>microtubule binding domain</i> und spielt eine Rolle bei der Organisation von Microtubuli an den Spindelpolen.
MCPH5	1q31	ASPM	
MCPH5_b	1q31.3-1q32.1	unbekannt	<i>Centromere associated Protein J</i> , lokalisiert während der Mitose an den Centrosomen.
MCPH6	13q12.2	CENPJ	

Von besonderem Interesse ist, dass die drei anderen bekannten MCPH-Genprodukte ebenfalls in die Abläufe der Mitose einbezogen sind. ASPM ist das humane Ortholog des 'abnormal spindle' Gens (*asp*) von *Drosophila melanogaster* (Ripoll *et al*, 1985; Bond *et al*, 2002), das essentiell für die normale Funktion der Spindel in embryonalen Neuroblasten ist. Das Mausprotein *Aspm* wird pränatal spezifisch während der Neurogenese des Cortex exprimiert (Bond *et al*, 2002). CDK5RAP2 und CENPJ lokalisieren während der Mitose an den Centrosomen, wie durch Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gezeigt wurde (Bond *et al*, 2005). Da alle bisher identifizierten MCPH-Gene eine essentielle Rolle beim Mitose-Ablauf spielen, ist davon auszugehen, dass MCPH die Konsequenz eines defizienten Mitose-Ablaufs in den neuronalen Vorläuferzellen des Cortex ist (vergleiche Diskussion 4.8).

4.1.3 Allelische und klinische Heterogenität bei MCPH1

Die Kombination zellulärer und indirekter genetischer Analysen hatte die Möglichkeit eröffnet, den betroffenen Familien eine vorgeburtliche Diagnostik hinsichtlich des PCC Syndroms anzubieten, obwohl der exakte Genort zunächst nicht bekannt war (siehe 3.2.1).

Die Beschreibung des einzigartigen zellulären Phänotyps in Kombination mit der Aufklärung des Basisdefektes ermöglichte die Diagnosestellung bei einem Patienten mit sehr mildem klinischen und zellulären Phänotyp (Trimborn *et al*, 2005). Dieser Patient weist eine *missense*-Mutation (Thr27Arg, Patient 5) in der ersten BRCT-Domäne von MCPH1 auf (Trimborn *et al*, 2005). Die kürzlich vorgeschlagenen Kriterien für autosomal rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH) fordern für die klinische Diagnose einen Kopfumfang mindestens 4 Standardabweichungen unter dem Alters- und Geschlechtsdurchschnitt (Woods *et al*, 2005). Bei dem Patienten mit der Thr27Arg-Substitution jedoch lag der Kopfumfang bei Geburt bei lediglich $-2,4$ SD und im Alter von 6 Jahren bei $-3,0$ SD. Auch die mentale Retardierung ist geringer als bei anderen MCPH Patienten. Der Patient hat überraschend ausgeprägte verbale Fähigkeiten (IQ115) und einen allgemeinen IQ von 84. Diese Daten weisen daher eindeutig darauf hin, dass Mutationen in MCPH1 - und möglicherweise auch an anderen MCPH Loci - in deutlich mildereren Phänotypen resultieren können, als bisher angenommen. Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, dass nahezu alle bisher bekannten MCPH Mutationen *Frameshift*-, *Splice*- oder *Stopp*mutationen, also Mutationen waren, die zu einer Verkürzung des Proteins führten. Die rigorose klinische Definition könnte demnach dafür gesorgt haben, dass Patienten mit mildereren Phänotypen nicht diagnostiziert wurden. Durch die Diagnosestellung bei diesem Patienten konnte somit eine unerwartet variable Expressivität der klinischen Symptomatik gezeigt werden. Dieser Befund erfordert eine Überarbeitung und Erweiterung der Definition der klinischen Symptomatik für primäre Mikrozephalie MCPH1, um akkurate Diagnosen und Beratung der Patienten und ihrer Familien zu ermöglichen.

Auf zytogenetischer Ebene zeichnen sich die Metaphasen des Patienten, wie die der Patienten mit trunkierenden Mutationen, durch die ausgesprochen schlechte Bandenauflösung aus. Dies scheint somit ein wichtiges Kriterium bei der Diagnose von MCPH1 Mikrozephalie zu sein. Klinische Genetiker sollten bei Patienten mit Mikrozephalie und schlechter Bandenauflösung in der zytogenetischen Routinediagnostik an MCPH1 Mutationen denken.

Im Gegensatz zu der schlechten Bandenauflösung ist der zelluläre Phänotyp der aberranten Chromosomenkondensation bei diesem Patienten deutlich milder ausgeprägt, als bei MCPH1 Patienten mit trunkierenden Mutationen. Dies zeigt, dass eine Zuordnung zu MCPH1 durch die Bestimmung des Anteils Prophase-ähnlicher Zellen bei milden Mutationen schwierig sein kann. Die Erkenntnisse über die Dekondensationsverzögerung (siehe Ergebnisse 3.3.1) und im Besonderen die Experimente mit Spindelgiften an den Zellkulturen des Thr27Arg Patienten machen deutlich, dass der Einsatz von Colcemid den zellulären Phänotyp abschwächt, da die Zellen in der Metaphase arretiert werden und dadurch der G1 Anteil der PLCs wegfällt, wodurch

der Anteil der PLCs bis um die Hälfte sinken kann. Daher scheint es angemessen, bei Patienten mit Mikrozephalie, bei denen es nicht gelingt zytogenetische Präparate mit hoher Bandenauflösung herzustellen, weitere Analysen an Präparationen durchzuführen, die ohne die Anwendung von Spindelgiften hergestellt wurden. Außerdem konnte ich zeigen, dass die Anzahl Prophase-ähnlicher Zellen auch bei Patienten mit vergleichsweise mildem zellulären Phänotyp durch ionisierende Bestrahlung deutlich erhöht werden kann (siehe Ergebnisse 3.3.6). Die Bestimmung des Anteiles Prophase-ähnlicher Zellen nach Bestrahlung könnte also in Zukunft zur Diagnostik bei Mikrozephalie eingesetzt werden, ähnlich wie die induzierte Chromosomenbrüchigkeit nach Bestrahlung zur NBS- und AT-Diagnostik oder nach Behandlung mit DNA-Crosslinkern bei Fanconi Anämie Patienten eingesetzt wird (Paterson & Smith, 1979; Auerbach *et al*, 1981; Taalman *et al*, 1983). Dennoch kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte MCPH1-Mutationen zu nahezu undetektierbaren zellulären Defekten führen könnten.

Vom wissenschaftlichen Standpunkt aus ist der Nachweis von *Missense*-Mutationen, die mit einem Funktionsverlust des betroffenen Proteins assoziiert sind, wichtig für die Identifikation funktionell relevanter Proteindomänen. Der Aminosäureaustausch bei dem beschriebenen Patienten liegt in einer konservierten Region (siehe Ergebnisse 3.2.2, Abbildung 15) der N-terminalen BRCT-Domäne von Microcephalin (siehe Abbildung 36). Trotz der milden Ausprägung des zellulären Phänotyps konnte nachgewiesen werden, dass diese Thr27Arg Mutation zu der charakteristischen Chromosomenkondensationsstörung führt. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Domäne essentiell für die normale Regulation der Chromosomenkondensation sein muss.

MCPH1_BRCT1
 smart00292

PTLKDVVAYVEVWSSNGTENYSKTFTQLVDMCAKVSKTFNKQVTHVIFKDGYQSTWDK---AQKRCVKLVSVLWVEK
KLFKGKVFVI--ICSFDKEERDELKELEALGGKVISSVSSTTHVIVGSPEGGKLEKLLKAIALCIPIVTEDWLLDC

Abbildung 36 Alignment der N-terminalen BRCT Domäne aus Microcephalin (BRCT1) mit smart00292 BRCT domain (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Das bei Patient 5 substituierte Threonin ist rot dargestellt. Konservierte AS-Reste sind rot unterlegt. Konservative AS Austausche sind blau unterlegt.

4.2 Charakterisierung des Zellzyklusdefektes

Wie bereits in Abschnitt 4.1.3 erwähnt, konnte nachgewiesen werden, dass die Chromosomenkondensationsstörung nicht nur aus einer vorzeitigen Chromosomenkondensation in der G2 Phase des Zellzyklus resultiert, sondern auch mit einer verzögerten Dekondensation der Chromosomen in der frühen G1-Phase einhergeht. Dies deutet auf eine duale Funktion von Microcephalin prä- und postmitotisch hin. Microcephalin spielt also eine Rolle als negativer Regulator der Chromosomenkondensation, der vorzeitige Kondensation in der G2 Phase verhindert, hat aber eine aktivierende, postmitotische Funktion, die für eine zeitgerechte

Dekondensation in G1 sorgt. Es wird damit deutlich, dass es sich bei der Chromosomendekondensation wie bei der Kondensation um einen aktiv regulierten Prozess handeln muss, der aufgrund des Funktionsverlustes von Microcephalin verspätet eingeleitet wird. Eine ausführlichere Diskussion über mögliche Mechanismen findet sich in (4.6 und 4.7).

Weder in Bezug auf den Ab- und Wiederaufbau der Kernmembran, noch bezüglich der Auflösung der Nukleoli und der Nukleologenese konnten gravierende Unterschiede zu den Kontrollen festgestellt werden. Die eingesetzten zellbiologischen Methoden lassen keine Schlüsse über subtilere Fehler bei diesen beiden Prozessen zu, wie sie etwa mit feineren biochemischen Analysen eventuell feststellbar wären. Dennoch wird klar, dass sowohl der Membran- als auch Nukleolizyklus nicht direkt an den Chromosomenzyklus gekoppelt sind und keinesfalls ähnlich dramatische Störungen, wie im Chromosomenzyklus vorliegen.

Von besonderem Interesse war die Analyse des Verhaltens der Centrosomen und des Spindelapparates, da alle weiteren bisher identifizierten MCPH- Proteine (MCPH3/CDK5RAP2, MCPH6/CENPJ and MCPH5/ASPM) mit den Centrosomen bzw. dem Spindelapparat assoziiert sind (Bond *et al*, 2002; Hung *et al*, 2004; Bond *et al*, 2005; Kouprina *et al*, 2005). Es konnten an der transformierten Patientenzelllinie im Vergleich zur Kontrolle keine morphologischen Auffälligkeiten der Spindel festgestellt werden. Die Untersuchung der Centrosomen zeigte keinen deutlich erhöhten Anteil separierter Centrosomen bei der Patientenzelllinie, der mit dem erhöhten Anteil Prophase-ähnlicher Zellen vergleichbar wäre. Dennoch erscheinen diesbezüglich weitere Analysen angebracht, da der Anteil bei der Patientenzelllinie geringfügig erhöht war. Lohnenswert wäre der Vergleich mehrerer Fibroblastenlinien von Patienten und Kontrollen. Leider stehen diese nicht zur Verfügung. Möglich wäre jedoch der Vergleich normaler Zellen nach Behandlung mit MCPH1- und Kontroll-siRNA. Der deutlichste Nachweis darüber, dass bei Patienten mit MCPH1 Mutationen keine gravierende Fehlregulation des Spindel/Centrosomenzyklus vorliegen, wurde jedoch durch die Analyse der chromosomalen Fehlverteilungsrates erbracht. Diese ist im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöht und befindet sich im Normbereich.

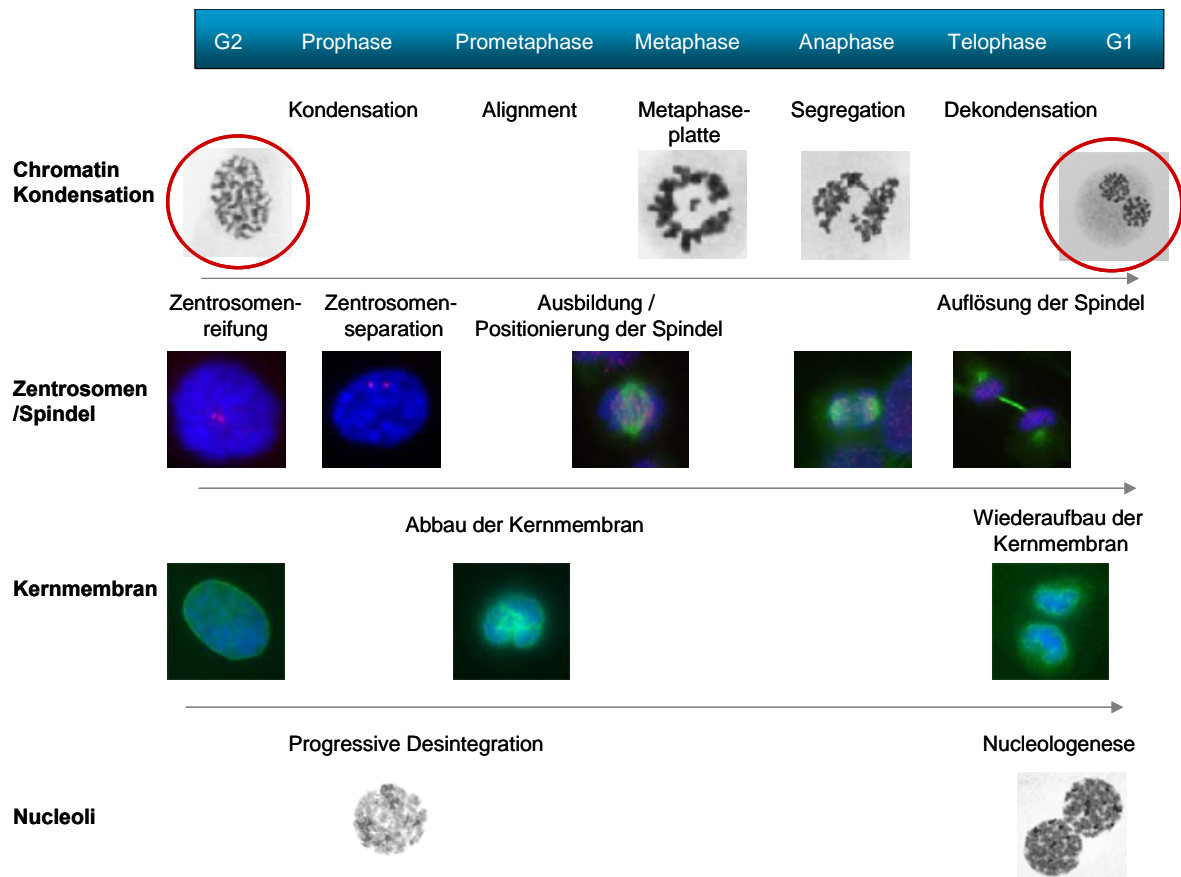


Abbildung 37 **Zusammenfassung der Analyse der klassischen mitotischen Transitionen bei MCPH1.** Alle Untersuchungen zeigten, dass bei den Patienten lediglich der Chromosomenzyklus gestört ist, während alle anderen grobmorphologischen Veränderungen während der Mitose normal zu verlaufen schienen.

Schon vor Beginn meiner Arbeiten war durch Durchflusszytometrie mit BrdU-Hoechst 33258 gezeigt worden, dass PHA-stimulierte T-Lymphozyten von Patienten mit PCC Syndrom für alle Phasen eine normale Zellzyklusverteilung zeigten (Neitzel *et al*, 2002). Zusammengefasst zeigt sich, dass im Zusammenhang mit dem PCC Syndrom ausschließlich der Chromosomenzyklus der Zellen fehlreguliert ist und zwar sowohl prä- als auch postmitotisch. Es ergaben sich keine Hinweise auf weitere Störungen im Ablauf der Mitose (siehe Abbildung 37). Alle neben der Chromosomenkondensation untersuchten klassischen mitotischen Prozesse werden offenbar unabhängig von der bei Patienten mit PCC Syndrom vorliegenden Chromosomenkondensationsstörung reguliert.

4.3 Die Morphologie der Patientenchromosomen

Die Morphologie der Patientenchromosomen unterscheidet sich deutlich von der normaler Individuen. Die Chromosomen sind kürzer und haben eine schlechte Bandenauflösung. Wie nachgewiesen werden konnte, zeigt die zentrale Chromatidachse eine ausladende spiralige

Ausformung (siehe Abbildung 38 und Abbildung 29, Ergebnisteil 3.4.3.6). Dies könnte der Grund für die um 25% verkürzten Chromosomen der Patienten sein.

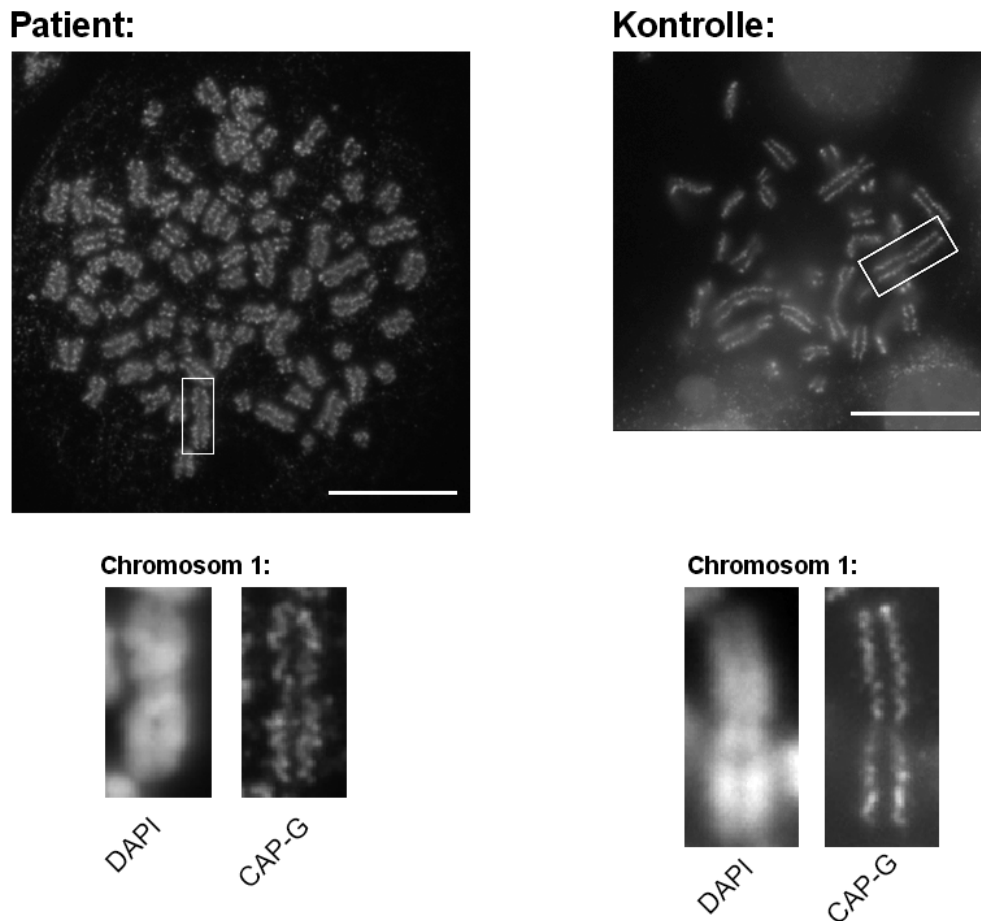


Abbildung 38 **Vergleich der Chromatidachsen von Patienten und Kontrollzellen.** Die zentrale Chromatidachse (hier angefärbt mit anti-hCAP-G) weist bei den Patienten eine deutliche spiralförmige Verformung auf (Maßstäbe 10 μm). Die eingerahmten Bereiche sind unten in dreifacher Vergrößerung und in DAPI-Gegenfärbung dargestellt.

Hyperkondensation von Chromosomen und starkes *coiling* der Chromatidachse sind Phänomene die durch langen Colcemidarrest (C-Mitose) induziert werden können (Rieder & Palazzo, 1992; Losada & Hirano, 2001; Maeshima & Laemmli, 2003). Es ist dabei nicht genau bekannt, worauf diese Hyperkondensation zurückgeht. Es wird aber vermutet, dass die Kondensationsvorgänge im Metaphase-Arrest immer weiter fortschreiten, die Hyperkondensation also durch langes Verweilen im kondensierten Zustand entsteht. Ein ähnlicher Effekt könnte durch den Verlust der Microcephalin-Funktion entstehen, da die Chromosomen über einen ungewöhnlich langen Zeitraum kondensiert sind. Dies könnte die schlechte chromosomale Bandenauflösung und die verkürzten Chromosomen der MCPH1 Patienten erklären.

4.4 DNA-Reparatur und der G2/M-Checkpoint

Die Untersuchung des G2/M-Checkpoints von MCPH1-defizienten Zellen und Kontrollzellen erfolgte nach ionisierender Bestrahlung und anschließender stündlicher Aufarbeitung über einen

Zeitraum von mindestens 8h. Dabei zeigte sich, dass der Mitoseindex 1h nach Bestrahlung in Patienten- und Kontrollzellen auf annähernd null absinkt und erst nach mehreren Stunden wieder auf den Normalwert ansteigt. Die Analyse der PLCs nach Bestrahlung und Antikörpermarkierung mit der G2-Phase-spezifischen Aurora B Kinase ergab, dass es 2h nach Bestrahlung zu einer starken Zunahme der G2-PLCs kommt, d.h. dass eine Blockierung der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus erfolgt.

Somit ergaben sich für beide Versuchsansätze keine Hinweise auf einen gestörten G2/M-Checkpoint nach Schädigung der Zellen mit ionisierenden Strahlen. Diese Befunde sind im Einklang mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie von Prof. Schindler (Würzburg), durch die ebenfalls keine erhöhte Radiosensitivität und eine normale G2-Phase-Blockierung der MCPH1-defizienten Zellen 48h nach Bestrahlung nachgewiesen wurde (Neitzel *et al*, 2002).

Unsere Daten stehen allerdings im Widerspruch zu zwei kürzlich veröffentlichten Studien (Xu *et al*, 2004; Lin *et al*, 2005), die darauf hindeuten, dass der *DNA damage checkpoint* am G2/M Übergang beim Verlust der MCPH1-Funktion beeinträchtigt ist. Die Arbeiten zeigen, dass U2OS Zellen nach MCPH1 *knockdown* mittels RNAi und anschließender Bestrahlung keinen G2 Block ausbilden, sondern fast unvermindert in die Mitose eintreten. Der Nachweis wurde durchflusszytometrisch nach Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen an Serin 10 phosphoryliertes Histon H3 (H3P-S10) als mitotischem Marker erbracht. Eine mögliche Erklärung für diese diskrepanten Ergebnisse könnten Unterschiede in den verwendeten Methoden sein.

So sind die von Prof. Schindler und mir erzeugten Daten an Patientenzellen mit trunkierenden Mutationen erhoben worden, wobei mehrere Patientenlinien mit mehreren Kontrollen verglichen wurden. Im Gegensatz dazu beruhen die Ergebnisse der beiden anderen Arbeitsgruppen auf RNA Interferenz gegen MCPH1 in einer einzelnen Zelllinie (U2OS). Dies bringt mit sich, dass weder sogenannte *off-target* Effekte, d.h. das unerwünschte Herunterregulieren zusätzlicher Gene aufgrund des RNAi Prozesses, noch Zelltyp-spezifische Effekte ausgeschlossen werden können.

Zur weitergehenden Abklärung wurden deshalb im Rahmen einer Diplomarbeit (Ioannis Gavvovidis) Patienten- und Kontrollzelllinien nach dem von Xu *et al* verwendeten Protokoll mit 4 Gy bestrahlt und nach Markierung mit anti-H3P-S10 zwei Stunden später durchflusszytometrisch gemessen. Dabei ergaben sich zwischen Kontrollen und Patienten keine Unterschiede und somit auch keine Hinweise auf eine Störung des G2/M-Checkpoints.

Damit wird deutlich, dass sich MCPH1-defiziente Patientenzellen unter Verwendung des gleichen Protokolls offenbar anders verhalten als U2OS-Zellen nach MCPH1- *knockdown* mittels RNAi. Eine mögliche Erklärung wäre die oben erwähnte Herunterregulation weiterer

Gene durch RNAi in den U2OS-Zellen. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass in den Patientenzellen nach dem vorzeitigen Stopcodon ein zweites AUG initiiert wird oder dass durch alternatives Splicing Isoformen des Proteins gebildet werden, die eine Restfunktion ausüben könnten, die verhindert, dass der G2/M-Checkpoint „überlaufen“ wird. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu klären, ob und inwieweit die DNA-Reparatur und die G2/M-Checkpointkontrolle normal erfolgt. Für die Patienten mit MCPH1 Mutationen wäre dies von großer Wichtigkeit im Hinblick auf die Prognose und folglich die Vorsorge von Krebserkrankungen. Bisher hat keiner der uns bekannten MCPH1 Patienten eine Tumorerkrankung entwickelt, wobei die ältesten Patienten unterdessen über 30 Jahre alt sind. Dies könnte ebenfalls ein Zeichen dafür sein, dass die DNA-Reparaturmechanismen auch beim Vorliegen von MCPH1 Mutationen zufriedenstellend funktionieren. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass es sich bei den Ergebnissen von Xu *et al* und Lin *et al* sehr wahrscheinlich um ein RNAi induziertes Artefakt handelt, das zur fast vollständigen Aufhebung des G2/M Checkpoints führt. Heute ist nur eine einzige autosomal rezessive Erkrankung bekannt, bei der der G2/M Checkpoint vergleichbare Defekte aufweist. Dabei handelt es sich um Zellen der Fanconi Anämie Komplementationsgruppe FANCD1/BRCA2. Die Zellen treten trotz erheblicher DNA-Schäden fast unvermittelt in die Mitose ein. Alle bekannten Patienten manifestierten bis zum Alter von 5 Jahren schwerwiegende Tumorerkrankungen, in der Regel Hirn- oder Wilmstumoren (Hirsch *et al*, 2004).

Von großem Interesse war außerdem das Kondensationsverhalten der Patientenzellpopulationen nach Bestrahlung. Der Anteil Prophase-ähnlicher Zellen bleibt nach Bestrahlung zunächst für 3-4 Stunden konstant. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Zellen ihr Chromatin sehr wahrscheinlich nicht zur Reparatur von DNA Schäden dekondensieren können wie es für normale Zellen gezeigt wurde. Cole und Rieder beschrieben 1998 einen sogenannten „*point of no return*“ (Rieder & Cole, 1998). Bis zu diesem Punkt können Prophasezellen, nach schädigenden exogenen Einflüssen, wie zum Beispiel ionisierender Strahlung, ihr Chromatin dekondensieren und in die Interphase zurückzukehren, um DNA-Schäden zu reparieren. Haben Zellen den „*point of no return*“ bereits überschritten, wenn die Schäden gesetzt werden, so durchlaufen sie trotz fehlerhafter DNA die Kernteilung (Pines & Rieder, 2001). Obwohl die MCPH1 Zellen ihr Chromatin offensichtlich nicht dekondensieren, stoppen sie aber das weitere mitotische Programm. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Microcephalin in normalen Zellen direkt oder indirekt von diesem Prophase-Kontrollpunkt angesprochen wird. Eine attraktive Hypothese zur Erklärung der vorliegenden Befunde ist, dass die Vermittlung des Prophase-Checkpoints

über eine Inaktivierung von Cyclin A-CDK erfolgt (Furuno *et al*, 1999) und dass dementsprechend die kondensationspezifische Funktion von Microcephalin *downstream* von Cyclin A-CDK liegt.

Es bleibt die Frage, ob die Beobachtung, dass die Anzahl der Prophase-ähnlichen Zellen nach Erholung deutlich über den Normalwert steigt, Ausdruck einer Pathologie ist oder normales Zellzyklusverhalten repräsentiert. Die immunzytochemische Analyse mit Aurora B Antikörpern erbrachte Hinweise darauf, dass es nach Bestrahlung zu einem „Stau“ der Zellen in der G2 Phase kommt, d.h. die Zellen in der G2 Phase arretieren, um dann nach der erfolgten DNA-Reparatur in die Mitose einzutreten. Dies ist ein regulärer physiologischer Prozess, der auch bei Kontrollen zu beobachten ist und der eine Erklärung für den erhöhten Anteil Prophase-ähnlicher Zellen nach Bestrahlung bieten könnte. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass die Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befinden, die weitere DNA-Synthese einstellen, um zunächst die vorhandenen DNA-Schäden zu reparieren und nach erfolgter Reparatur ebenfalls in die G2-Phase eintreten. Derzeit gibt es keine Analyse zur radioresistenten DNA-Synthese an den Patientenzellen. Zur weitergehenden Abklärung sind Vergleiche der Zellzyklusverteilungen von Kontrollen und Patienten nach Bestrahlung notwendig, sowie eine Analyse der radioresistenten DNA-Synthese. Nur so kann endgültig festgestellt werden, wodurch die Erhöhung der PLCs ausgelöst wird und ob es dabei zu pathologischen Zellzyklusveränderungen kommt.

4.5 Histon H3 Phosphorylierungen und Kohäsionsfaktoren

Die Untersuchungen mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gegen Histon H3 zeigten eindeutig, dass weder die Phosphorylierung an Ser10 noch an Ser28 mit der vorzeitigen Chromosomenkondensation einhergeht, da die Mehrzahl der PLCs keine Markierung zeigt. Diese Daten fügen weitere Evidenz zu den Untersuchungen hinzu, die gezeigt haben, dass auch die nicht-pathologische Prophasekondensation unabhängig von Histon H3-Phosphorylierungen ist (Hsu *et al*, 2000; Adams *et al*, 2001) und dass diese Modifizierungen andere Funktionen haben müssen, als die ursprünglich postulierte Initiation der Chromosomenkondensation (Van Hooser *et al*, 1998; Wei *et al*, 1999). Möglicherweise kommen ihnen strukturelle Aufgaben zu, beispielsweise durch das *targeting* von Condensin II an die Kinetochoren und die zentrale Chromatidachse. Die Kolokalisationsstudien mit Condensin II Antikörpern deuteten zumindest für H3P-S10 eine solche Möglichkeit an. Ein ähnliches Verhalten wurde für den Condensin I Komplex postuliert (Schmiesing *et al*, 2000). Da diese Experimente vor der Entdeckung von Condensin II mit Antikörpern gegen den gemeinsamen Condensinkern durchgeführt wurden, ist

es wahrscheinlich, dass das von Schmiesing und Mitarbeitern beobachtete Verhalten ebenfalls Condensin II zuzuordnen ist.

Die Untersuchungen mit Antikörpern gegen Cohesin und die Kohäsionsfaktoren PDS5 und ISWI deuteten darauf hin, dass es in den Patientenzellen zu einer vorzeitigen Ablösung eines Teils dieser Faktoren kommt. Bei Vertebraten dissoziiert zu Beginn der Prophase ein Großteil des Cohesins von den Chromosomenarmen, übrig bleibt ein kleiner Teil, der in den pericentromerischen Regionen angereichert ist (zusammengefasst in Losada & Hirano, 2005). Das Hybridisierungsbild bei den Patientenzellen könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese *bulk*-Dissoziation von Cohesin vorzeitig erfolgt. Es ist unklar, ob diese Dissoziation von Cohesin eine Voraussetzung für die Chromosomenkondensation ist oder aber eine Konsequenz aus dieser. Die hier vorgelegten Ergebnisse legen jedenfalls nahe, dass Microcephalin in diesen Vorgang direkt oder indirekt involviert ist. Diese Daten werden durch eine weitere Beobachtung hinsichtlich auf eine möglichen Störung der Chromatidkohäsion erhärtet. Die Morphologie der Patientenchromosomen auf Cytospinpräparaten zeigt im Vergleich zu Kontrollen häufig abgespreizte Chromosomenarme, also einen Verlust der Schwesterchromatidkohäsion. Beide Beobachtungen die auf einen möglichen Kohäsionsdefekt bei MCPH1-Funktionsverlust hinweisen, müssen in weiteren Experimenten überprüft werden. Die Bestätigung der vorliegenden Beobachtungen könnte beispielsweise über synchronisierbare Zellkulturen erfolgen, in denen MCPH1 über RNAi ausgeschaltet wird. Auf diese Weise könnte Chromatin aus einzelnen Zellzyklusphasen isoliert werden und die Menge des gebundenen Cohesins - im Vergleich zu synchronisierten Kontrollkulturen - mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden.

4.6 Die Rolle der Condensinkomplexe in der Chromosomenkondensation

Von besonderem Interesse war die Analyse der beiden Condensinkomplexe in den Patientenzellen hinsichtlich der Kondensationsstörung und im Vergleich zu Kontrollen, da für beide Komplexe zentrale Rollen in der Chromosomenkondensation postuliert, bzw. nachgewiesen wurden (Kimura & Hirano, 1997; Kimura *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 2003; Hirota *et al.*, 2004; Hirano, 2005). Nach Literaturangaben binden beide Condensinkomplexe in der späten Prophase/Prometaphase an die zentralen Chromatidachsen (Hirota *et al.*, 2004; Kireeva *et al.*, 2004; Ono *et al.*, 2004). Die Untersuchungen zur Lokalisation der beiden Condensinkomplexe erfolgten mittels Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen Condensin I (hCAP-G) und Condensin II (hCAP-H2). Sowohl die Beobachtungen in der Immunfluoreszenz als auch die Ergebnisse der *knockdowns* mit Condensin I-spezifischen siRNA Duplexen zeigten, dass

Condensin I offenbar nicht in die Kondensationsstörung involviert ist. Condensin I bleibt in den Patientenzellen wie in den Kontrollzellen bis zur Auflösung der Kernmembran im Zytoplasma lokalisiert, und es ergaben sich keine Hinweise auf eine vorzeitige Translokation des Proteinkomplexes in den Nukleus. Die vorzeitige Chromosomenkondensation aufgrund der Microcephalin-Defizienz ist demnach unabhängig von Condensin I (Trimborn *et al*, accepted for publication).

Im Gegensatz dazu, demonstrierten die immunocytochemischen Untersuchungen, dass der Condensin II Komplex „zur richtigen Zeit am richtigen Ort“ ist. Condensin II ist in Patientenzellen wie Kontrollzellen über den gesamten Zellzyklus nuklear und chromatingebunden. Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass in einigen G2-Phase-Zellen der Patienten hCAP-H2 bereits an die zentrale chromosomale Achse gebunden ist, während sich Condensin I noch im Zytoplasma befindet (Trimborn *et al*, accepted for publication). Es ist somit davon auszugehen, dass die Bindung von Condensin II an die Achse vorzeitig erfolgt. Die Bindung von Condensin II an die Achse kann aber entweder nicht essentiell für die eigentliche Initiation der Kondensation sein, weil ein Großteil der G2-PLCs keine axiale Färbung aufweist oder es sind dafür so geringe Mengen nötig, dass sie immunhistochemisch nicht nachweisbar sind. Zusätzlich zu der vorzeitigen Bindung scheint eine verzögerte Ablösung von Condensin II in der G1-Phase vorzuliegen, weil Condensin II in den Patientenzellen noch an die Achse gebunden ist, nachdem die Kernmembran wieder aufgebaut wurde und sich Condensin I bereits wieder im Zytoplasma befindet.

Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass die beiden Condensinkomplexe differentiell reguliert werden und dass in den Microcephalin-defizienten Patientenzellen nur das Verhalten von Condensin II fehlreguliert ist.

Um die Condensin II spezifischen Effekte in den MCPH1-defizienten Zelllinien weitergehend zu analysieren, wurde Condensin II mittels RNAi in verschiedenen Zellsystemen ausgeschaltet. Dies führt zu einer deutlichen Abschwächung des aberranten zellulären Phänotyps. Der Anteil der Zellen mit kondensiertem Chromatin sinkt signifikant, außerdem dekondensieren die Chromosomen wieder schneller nach Abschluss der Mitose (Trimborn *et al*, accepted for publication). Der Einsatz verschiedener siRNA Duplexe gegen jede analysierte Untereinheit (2 – 3 siRNAs gegen jedes Target), die Ausschaltung verschiedener Komponenten funktioneller Komplexe (jeweils zwei Untereinheiten von Condensin I respektive Condensin II, sowie eine Untereinheit des gemeinsamen Condensin-Kerns) und der Einsatz zweier verschiedener Zelllinien (MCPH1 defiziente Patientenzellen und HeLa mit simultanen *knockdown* von

Microcephalin), die alle zu konsistenten Ergebnissen führten, machen es sehr unwahrscheinlich, dass die Beobachtung auf *off-target* Effekte d.h. das unerwünschte und unspezifische Effekte auf zusätzlicher Gene aufgrund des RNAi Prozesses zurückgeht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Condensin II in die MCPH1 vermittelte Regulation der Chromosomenkondensation involviert ist und dass der Verlust von Microcephalin zu einer unzeitigen Aktivierung der mitotischen Funktion von Condensin II führt. Darüber hinaus konnte erstmalig gezeigt werden, dass Condensin II auch eine Funktion bei der Dekondensation der Chromosomen in der G1-Phase haben muss. Im Gegensatz zur Chromosomenkondensation gibt es über den Prozess der Dekondensation fast keine experimentellen Daten. Die hier vorgelegten Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei der Dekondensation um einen aktiv gesteuerten Prozess handelt, in den Condensin II einbezogen ist.

Auf welche Weise Microcephalin die Funktionen von Condensin II reguliert, muss noch ermittelt werden. Es ist wahrscheinlich, dass Cyclin A/CDK in diesen Signalweg eingebunden ist, da bereits 1999 gezeigt wurde, dass Mikroinjektion von aktivem Cyclin A/CDK2 Chromosomenkondensation in der G2 Phase aber nicht in der S Phase induziert (Furuno *et al*, 1999). Außerdem führt die Mikroinjektion von Cyclin A/CDK2 Inhibitoren zu einer Dekondensation von Prophasechromatin solange die Kernmembran noch nicht aufgelöst ist (Furuno *et al*, 1999). Es wurde daher vorgeschlagen, dass Cyclin A/CDK Condensin II phosphoryliert und dadurch aktiviert (Hirano, 2005). Diese Hypothesen passen gut zu den hier präsentierten Ergebnissen. Cyclin A befindet sich zum Zeitpunkt der vorzeitigen Chromosomenkondensation im Zellkern, während Cyclin B1 erst lange nach Beginn der vorzeitigen Chromosomenkondensation im Zellkern akkumuliert (siehe 3.4.3.10). Einer der ersten Schritte könnte somit die Aktivierung von Condensin II durch Cyclin A/CDK sein, gefolgt von der Bindung von Condensin II an die axialen Elemente. Aus dieser Überlegung ergeben sich zwei mögliche Hypothesen für die Wirkung von Microcephalin. Microcephalin könnte bis zu seiner eigenen Inaktivierung durch Cyclin A/CDK am Beginn der Prophase die mitotische Funktion von Condensin II unterbinden und nach der Mitose durch eine korrespondierende Phosphatase wieder aktiviert werden. Alternativ könnte Microcephalin ein Signalmolekül darstellen, das *upstream* von Cyclin A-CDK in den Prozess eingreift und dadurch die Aktivierung von Condensin II durch Cyclin A-CDK verhindert.

Für die Rolle von Condensin II bei der Chromosomenkondensation gibt es zwei vorstellbare Modelle. Entweder spielt Condensin II eine aktive Rolle im Faltungsprozess des Chromatins oder dem Komplex kommt hauptsächlich eine strukturelle Rolle zu, indem er spezifische Stadien

der Kondensation, bzw. der Dekondensation stabilisiert. Das Ausschalten weder des einen noch des anderen Condensinkomplex verhindert die Initiation der Chromosomenkondensation vollständig, was für die letztere der beiden Hypothesen spricht. Die beiden Komplexe spielen offensichtlich in verschiedenen Stadien der Chromatinverpackung eine Rolle. Dies könnte hierarchische Modelle der Chromatinkondensation (siehe Einleitung 1.3.1) unterstützen. Auch die späte Formierung einer klaren Chromatidachse bei den den stark kondensierten Chromosomen der Patienten spricht eher für hierarchische Modelle der Chromosomenkondensation (Belmont *et al*, 1987; Poirier & Marko, 2002; Kireeva *et al*, 2004) als für das *scaffolding loop* Modell (Paulson & Laemmli, 1977; Laemmli *et al*, 1978).

4.7 Die fehlregulierte Chromosomenkondensation bei Verlust der Microcephalin-Funktion: Ein Arbeitsmodell

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten können in dem im Folgenden dargestellten hypothetischen Arbeitsmodell vereinigt werden. In normalen Zellen inhibiert Microcephalin die kondensationspezifische mitotische Funktion von Condensin II bis zum Beginn der Prophase. In der frühen Prophase erfolgt dann die Inaktivierung von Microcephalin durch Cyclin A/CDK sowie die gleichzeitige zunehmende Aktivierung von Condensin II und demzufolge der Beginn der sichtbaren Chromosomenkondensation. Nach Aktivierung von Cyclin B/CDK1 erfolgt die Auflösung der Kernmembran und die Bindung von Condensin I an die Chromosomen. Die Bindung beider Komplexe an die Chromatidachsen persistiert bis in die Telophase. Die aus den Condensinkomplexen und Topoisomerase II aufgebaute Chromatidachse könnte den mitotischen Chromosomen die nötige Stabilität für die während der Anaphasesegregation wirkenden Kräfte bieten. Der *anaphase promoting complex* (APC) sorgt dann in normalen Zellen für die Dissoziation der beiden Condensinkomplexe von der Chromatidachse. Dies geschieht im Falle von Condensin II durch Reaktivierung von Microcephalin, das in der Telophase die Inaktivierung von Condensin II und damit den Dekondensationsprozess einleitet.

In MCPH1 defizienten Zellen reicht bereits die zu Beginn der G2 Phase bestehende Cyclin A/CDK Aktivität aus, um Condensin II vorzeitig zu aktivieren. In Abwesenheit der Microcephalin Aktivität kommt es dadurch zu vorzeitiger Chromosomenkondensation und deutlich danach zu leicht verfrühter Bindung von Condensin II an die zentrale Chromatidachse. Die Phosphorylierung von Histon H3-Ser10 ist offensichtlich nicht notwendig für die Prophase-ähnliche Chromosomenkondensation, sondern könnte lediglich beim Targeting von Condensin II an die Kinetochoren und die Achse eine Rolle spielen. Die beobachtete Kolo-kalisation kann aber ebenso gut eine nicht-funktionelle Koinzidenz darstellen. Condensin I bleibt in den Prophase-

ähnlichen Zellen im Zytoplasma und bindet erst zum normalen Zeitpunkt nach Abbau der Kernmembran durch Cyclin B/CDK1 an die Chromosomen. Wie in normalen Zellen, persistiert die Bindung beider Komplexe an die Chromatidachsen auch in den Microcephalin-defizienten Zellen bis in die Telophase. Aufgrund der Microcephalin-Defizienz ist die in der Telophase stattfindende Ablösung von Condensin II von den Chromosomenachsen und schließlich auch die Dekondensation der Chromosomen durch einen bisher unbekanntem Mechanismus verzögert. Das hypothetische Arbeitsmodell ist in Abbildung 39 zusammengefasst.

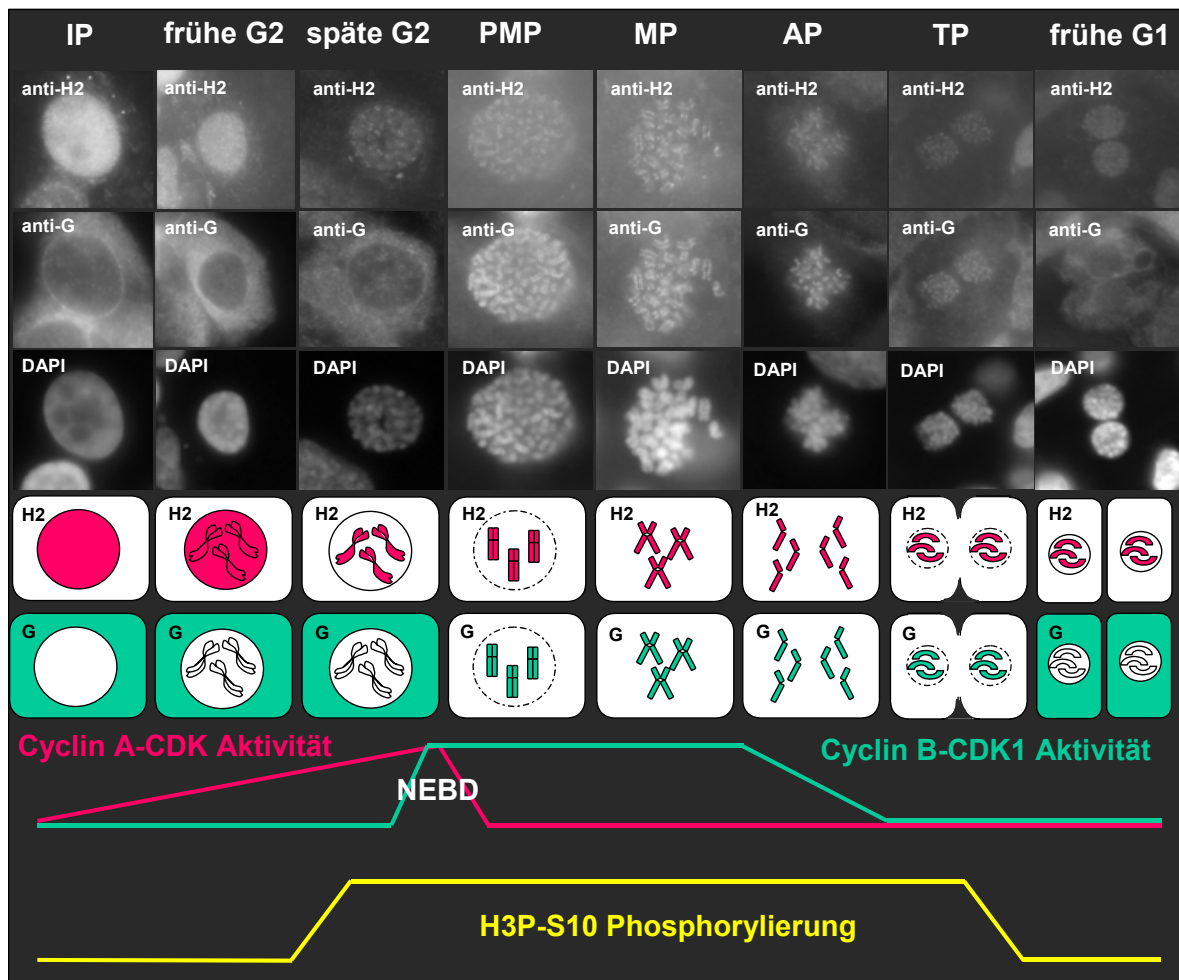


Abbildung 39 **Arbeitsmodell der Chromosomenkondensation bei MCPH1 Defizienz.** Nur für Condensin II konnte ein nicht regelgemäßes Verhalten nachgewiesen werden. Alle anderen dargestellten Vorgänge scheinen regelrecht abzulaufen. (NEBD = nuclear envelope breakdown; H2 = hCAP-H2/Condensin II; G = hCAP-G/Condensin I)

4.8 Molekulare Pathologie der Mikrozephalie und die Evolution des menschlichen Gehirns

Unlängst wurde eine wachsende Anzahl von Genen mit Funktionen in der Chromosomendynamik bzw. Zellzyklusprogression als Ursache von Entwicklungsstörungen oder progressiven neurologischen Erkrankungen ausgemacht. Darunter waren zwei potentielle

Regulatoren von Cohesin, das wie die Condensine einen unter Eukaryonten hochkonservierten SMC Proteinkomplex darstellt. Mutationen im humanen NIPBL/Scc2-Gen verursachen das Brachmann/de Lange Syndrom (Krantz *et al*, 2004; Tonkin *et al*, 2004), während Mutationen im ESCO2/Eco1-Gen für das Roberts Syndrom verantwortlich sind. Klinisch sind beide Erkrankungen durch Mikrozephalie, Wachstumsretardierung und Extremitätenfehlbildungen gekennzeichnet. Bisher gibt es jedoch keinerlei Evidenzen, dass diese Defekte tatsächlich auf die Störung von Cohesinfunktionen zurückgehen. Daher ist der Nachweis einer Fehlfunktion von Condensin II in MCPH1 das erste Beispiel für die Fehlregulation eines SMC Proteinkomplexes, die in einem zellulären Phänotyp resultiert, welcher eng mit einer Entwicklungsstörung verbunden ist.

Das ausgeprägteste Merkmal des Menschen ist die Größe und Komplexität seines Gehirns. Im Verlauf der Säugetierevolution ergab sich eine dramatische Expansion der Gehirngröße, die sich beispielsweise in einem 1000-fachen Unterschied der corticalen Oberfläche von Mensch und Maus ausdrückt (Rakic, 1995). Primäre Mikrozephalien werden von einigen Autoren als atavistische Erkrankungen angesehen, bei denen es durch Mutationen in einzelnen Genen zu einer „Rückbildung“ in frühere evolutionäre Formen kommt (Ponting & Jackson, 2005). In der Tat ist das Gehirnvolumen bei Individuen mit primärer Mikrozephalie um etwa zwei Drittel reduziert und entspricht damit in etwa der Größe des Gehirns früher Hominiden (Ponting & Jackson, 2005). Aus diesem Grund besteht ein starkes evolutionsbiologisches Interesse an den MCPH Genen, und in den letzten Jahren wurde eine große Anzahl von Arbeiten veröffentlicht, die diese Gene (darunter MCPH1) mit der Evolution des menschlichen Gehirns bzw. dem der Primaten in Verbindung bringen (Zhang, 2003; Evans *et al*, 2004a; Evans *et al*, 2004b; Kouprina *et al*, 2004; Wang & Su, 2004; Evans *et al*, 2005; Mekel-Bobrov *et al*, 2005; Ponting & Jackson, 2005; Woods *et al*, 2005). Tatsächlich gehört MCPH1 zu den 10% der am schnellsten evolvierenden Genen in der zum Menschen führenden Linie (Evans *et al*, 2004a; Wang & Su, 2004; Ponting & Jackson, 2005). Kürzlich wurden zwei Studien veröffentlicht, die zeigen, dass die Evolution von MCPH1 und MCPH5 beim modernen Menschen andauert (Evans *et al*, 2005; Mekel-Bobrov *et al*, 2005). Die Autoren folgern daraus eine andauernde Evolution des menschlichen Gehirns und korrelieren das Auftreten und die positive Selektion neuer Haplotypen mit kulturellen Meilensteinen der Entwicklung des modernen Menschen, darunter die Verwendung von Symbolen und die Entstehung der ersten Städte. Tatsächlich kann in diesem Zusammenhang festgestellt werden, dass der Verlust der Microcephalin-Funktion weder zellulär noch für den gesamten Organismus letal ist, sondern lediglich zu einer

Entwicklungsstörung führt, die hauptsächlich in die Gehirnentwicklung eingreift. Diese nicht-essentielle Funktion von Microcephalin ist durchaus konsistent mit der beschriebenen möglichen Rolle bei der Evolution des Gehirns der Primaten und des modernen Menschen. Es gibt aber bis heute keinerlei Beweise für einen direkten Einfluss der von Evans *et al* benannten Microcephalin-Varianten auf die Entwicklung des menschlichen Gehirns.

Die relativen Raten von Proliferation und Zelltod während der Neurogenese sind vermutlich die bestimmenden Faktoren für die Größe des Säugetiergehirns (Ponting & Jackson, 2005) und primäre Mikrozephalie wird vermutlich durch eine reduzierte Produktion von Neuronen und ihrer Vorläufer hervorgerufen (Woods, 2004). Es gibt bisher keinerlei Berichte über die zellulären und molekularen Konsequenzen der anderen MCPH Mutationen beim Menschen. Daher kann über einen gemeinsamen Mechanismus, der zum ununterscheidbaren klinischen MCPH-Phänotyp führt, nur spekuliert werden. Es ist offensichtlich, dass die genetische Heterogenität bei MCPH nicht ein Resultat von Mutationen in Genen ist, die für Proteine eines gemeinsam gebildeten Komplexes kodieren oder die in einem funktionellen Signalweg agieren. Eher gibt es ein zugrunde liegendes gemeinsames Leitmotiv: Die Störung fundamentaler mitotischer Ereignisse, wie der Chromosomenkondensation, des Aufbaus der Spindel oder der Funktion der Centrosomen.

Bei sub-humanen Primaten und Menschen hat im Vergleich zu anderen Säugern eine außerordentliche Vergrößerung des Neocortex stattgefunden. Dies spiegelt eine länger andauernde Phase der Produktion von Neuronen während der pränatalen Entwicklung wider – jede neuronale Vorläuferzelle vollzieht im Vergleich mehr Zellzyklen bevor die Zellteilungen gestoppt werden (Kornack & Rakic, 1998). Eine geringfügige Störung der grundlegenden mitotische Prozesse wie der Chromosomenkondensation oder des Spindel/Centrosomenzyklus könnte entscheidende Auswirkungen auf die Entscheidung zum Wiedereintritt in den Zellzyklus und somit durch eine daraus resultierende verminderte Produktion von Neuronen auf die humane Gehirnentwicklung haben. In diesem Zusammenhang scheint es wichtig festzustellen, dass kongenitale Mikrozephalie nicht nur bei MCPH sondern auch bei Patienten mit DNA-Reparaturerkrankungen, wie z.B. Nijmegen Breakage Syndrom, Fanconi Anämie, Ligase IV Defizienz oder Seckel Syndrom auftritt. Dies und die Berichte über eine potentielle Funktion von Microcephalin und ASPM in der *DNA damage checkpoint* Kontrolle und der Regulation von BRCA1 und CHK1 (Xu *et al*, 2004; Lin *et al*, 2005; Zhong *et al*, 2005) lassen auch eine erhöhte Apoptoserate als Ursache möglich erscheinen.

Es bleibt also nachzuweisen, ob die berichtete positive Selektion eines bestimmten MCPH1-Haplotypen wirklich die Konsequenz einer andauernden Evolution des menschlichen Gehirns ist

(Evans *et al*, 2005) oder eher einen Selektionsvorteil darstellt, der auf andere Funktionen des Proteins zurückgeht, wie die Zellzykluskontrolle, die DNA-Reparatur oder bisher unbekannt Funktionen. Betrachtet man die extreme Komplexität zellulärer Regulationsvorgänge und die multiplen Funktionen, die ein einzelnes Housekeeping-Protein, wie Microcephalin, in diesem Netzwerk bereits auf dem Einzelzellniveau ausübt (siehe 4.9), so scheint es unwahrscheinlich, dass man in absehbarer Zeit durch Forschung eine „einfache“ Erklärung für die dramatische Expansion der Gehirngröße beim Menschen finden wird.

4.9 Ausblick: Microcephalin als Multitalent in der Zellzykluskontrolle ?

Mutationen im Gen MCPH1 führen zu primärer Mikrozephalie (Jackson *et al*, 2002). Vergleichende Haplotypisierungen zeigen, dass das Gen im modernen Menschen weiter unter Selektionsdruck steht. Bestimmte Microcephalin-Varianten, die erst nach dem Erscheinen des Homo sapiens entstanden sind, unterliegen positiver Selektion (Evans *et al*, 2005). Dies führte zu der Annahme, dass die Evolution von Microcephalin für die Entwicklung des menschlichen Gehirns und dessen außergewöhnliche Eigenschaften von Bedeutung ist. Beim gegenwärtigen Stand des Wissens bleiben derartige Funktionszuschreibungen für die Gehirnentwicklung jedoch unbewiesen und daher spekulativ.

Seit dieser Erstbeschreibung des Proteins sind allerdings verschiedene Funktionen von Microcephalin in der Zellzykluskontrolle beschrieben und experimentell belegt worden (zusammengefasst in Abbildung 40). Durch die vorliegende Dissertation und eine vorausgegangene Publikation konnte gezeigt werden, dass MCPH1 Mikrozephalie und das PCC Syndrom allelische Varianten darstellen (Neitzel *et al*, 2002; Trimborn *et al*, 2004). Die Rolle als negativer Regulator der Chromosomenkondensation und Aktivator der Chromosomendekondensation beinhaltet eine Funktion von Microcephalin am G2/M Übergang und beim Austritt aus der Mitose, die besonders im Rahmen dieser Arbeit beschrieben und genauer charakterisiert wurde. Diese erfolgt offensichtlich durch die Regulation des kürzlich beschriebenen Condensin II Komplexes (Ono *et al*, 2003; Trimborn *et al*, accepted for publication).

Microcephalin ist außerdem möglicherweise durch die Regulation der beiden wichtigen Vermittler BRCA1 und CHK1 in DNA Reparaturprozesse, bzw. die DNA Checkpoint Kontrolle eingebunden (Xu *et al*, 2004; Lin *et al*, 2005). Ob und welche Funktionen es in diesem Zusammenhang genau ausübt und welchen Einfluss dies auf die Tumorentstehung bei den Patienten hat, muss, wie in 4.4 dargestellt, noch genauer untersucht werden.

Sowohl der Bezug zur DNA Checkpoint Kontrolle in der S und G2 Phase des Zellzyklus, als auch die Regulation von Condensin II am G2/M Übergang machen eine Interaktion zwischen Microcephalin und Cyclin A/CDK wahrscheinlich. Diese Cyclin-abhängigen Kinasen zeigen Aktivität in den beiden entscheidenden Phasen der Zellteilung und viele Studien zeigen, dass die Kontrolle des G2 Fortschritts von Cyclin A abhängigen Kinasen kontrolliert wird (Furuno *et al*, 1999; Pines & Rieder, 2001; Matsusaka & Pines, 2004; Lindqvist *et al*, 2005). Bisher fehlen aber direkte experimentelle Evidenzen für eine Interaktion zwischen Microcephalin und Cyclin A/CDK.

Es wurde auch berichtet, dass Microcephalin/BRIT1 als Repressor der humanen Telomerase wirkt (Lin & Elledge, 2003). Es hat somit vermutlich Einfluss auf den zellulären Alterungsprozess und damit die Anzahl der Zellteilungen, die eine einzelne Zelle vollziehen kann.

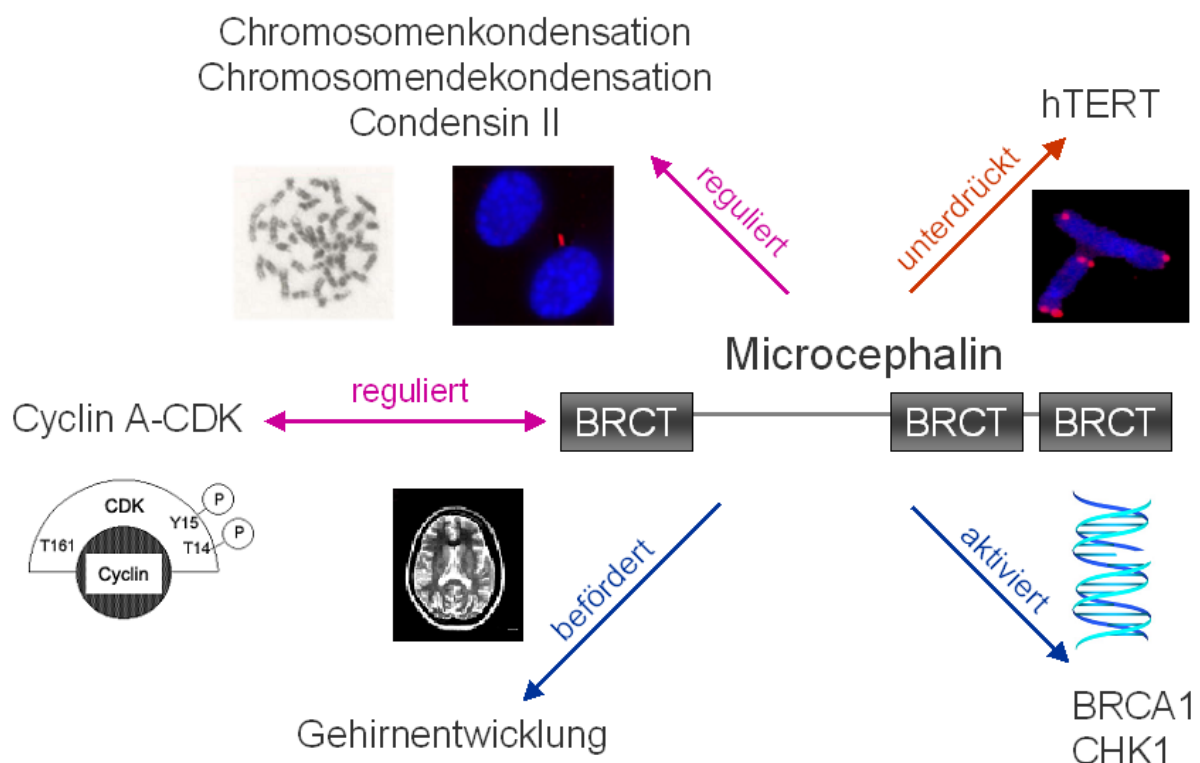


Abbildung 40 **Zusammenfassung der bisher bekannten Funktionen von Microcephalin.** Das Protein übt in seinen Rollen als Regulator der Chromosomenkondensation und der Telomerase offensichtlich inhibitorische Funktionen aus. (Illustration: Prophase-ähnliche Zelle einer lymphoblastoiden Zellkultur eines MCPH1 Patienten und Hybridisierung einer *all telomere probe* auf eine Metaphase) Wohingegen es die Chromosomendekondensation positiv reguliert, sowie die Expression von BRCA1 und CHK1 aktiviert und die Entwicklung des menschlichen Gehirns befördert. (Illustration: PLC in G1, definiert durch Bildung des Midbodies, schematische Darstellung eines DNA-Einzelstrangbruchs und MRT-Scan eines MCPH1 Patienten.) Einige der Funktionen werden vermutlich über Cyclin A/CDK vermittelt. (Illustration: Schematische Darstellung eines (inaktiven) Cyclin/CDK Komplexes mit inhibitorischen, bzw. aktivierenden Phosphorylierungsstellen.)

Die bisherigen Publikationen und die vorliegende Arbeit zeigen, dass Microcephalin sich offenbar als vielseitiges „Multitalent“ in der Zellzykluskontrolle erweist, das in viele Prozesse

eingreift und sowohl als Repressor (Telomerase, Chromosomenkondensation) als auch als Aktivator (Chromosomendekondensation, Expression von BRCA1, CHK1) wirken kann. Es ist davon auszugehen, dass in naher Zukunft noch weitere Funktionen von Microcephalin beschrieben werden.

Dringend notwendig ist aus Sicht der Patienten eine genauere Charakterisierung des Einflusses von Microcephalin auf die Kontrolle der DNA-Schadensantwort, der DNA-Reparatur und des G2/M-Checkpoints. Mcph1-Knockout-Mäuse könnten in diesem Zusammenhang sehr hilfreich sein. Bei der Analyse des G2/M Checkpoints sollten Verfahren zum Einsatz kommen, die eine Analyse großer Zellzahlen möglich machen, wie z.B. Durchflusszytometrie. Dabei muss genau zwischen RNAi vermitteltem Microcephalin-Abbau und den Effekten in Patientenzelllinien unterschieden werden. Außerdem sollte nicht nur die Fähigkeit zur DNA-Schadenserkenkung sondern auch das Vermögen untersucht werden, DNA-Schäden tatsächlich reparieren zu können. Dafür bieten sich beispielsweise *alkaline unwinding* oder COMET (Einzelzell-Gelelektrophorese) Assays an. Des Weiteren sollte der Einfluss von Microcephalin auf die Phosphorylierung bzw. Expression weiterer Enzyme in der DNA-Schadenskontrolle durch Westernblots und quantitative PCR untersucht werden. Die Diagnose weiterer Patienten und das langjährige *follow-up* der bisher bekannten Patienten wird nicht nur für die Genotyp/Phänotyp-Korrelation wichtig sein, sondern auch für die klinische Prognostik in Bezug auf die Tumorentstehung.

Lohnenswert ist sicher auch eine fortführende Untersuchung der Chromosomenkondensationsstörung und der Telomerase-spezifischen Funktionen, um wertvolle Daten über diese Prozesse zu erlangen. Weitere Schlüsselproteine der Chromosomenkondensation wie z. B. Topoisomerase II müssten auf ihre Rolle im Kondensationsdefekt ebenso genauer untersucht werden, wie das Verhalten des Cohesin-Komplexes. Dies ist aufgrund der unterdessen nachgewiesenen Einbindung von Cohesin in DNA Reparaturmechanismen besonders notwendig (Strom *et al*, 2004; Unal *et al*, 2004). Dafür wären synchronisierbare Zelllinien hilfreich, die durch endogene Expression von *small hairpin* RNAs gegen MCPH1 in synchronisierbaren Zelllinien gewonnen werden könnten.

Zur Charakterisierung neuer Funktionen bzw. Identifikation weiterer Interaktionspartner könnte ein weiterer *yeast-two-hybrid* Screen gegen eine weniger spezialisierte und größere cDNA-Bank durchgeführt werden. Am Wichtigsten für die exaktere Charakterisierung der bisher bekannten und für die Definition neuer Funktionen des Proteins wären jedoch spezifische Antikörper gegen Microcephalin, deren Herstellung sich jedoch bisher als schwierig erwiesen hat. Weder die kommerziell erwerbbar noch die von unserer Arbeitsgruppe hergestellten und von mir

getesteten Peptidantikörper erwiesen sich als brauchbar. Immunisierungen gegen größere Fragmente des Proteins könnten sich daher als sinnvoll erweisen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich das Wissen um die unterschiedlichen Aktivitäten von Microcephalin in den letzten drei Jahren seit seiner Identifikation erheblich erweitert hat. Von einem tiefergreifenden Verständnis seiner vielfältigen Funktionen ist man aber sicherlich noch weit entfernt. Es ist allerdings vorauszusehen, dass die weitere Charakterisierung des MCPH1-Proteins Microcephalin den wissenschaftlichen Diskurs in vielen Feldern bereichern wird. Dazu gehören unter anderem so fundamentale Prozesse wie Chromosomenkondensation, Zellzyklus, DNA-Checkpointkontrolle und DNA-Reparatur.